

KOLINESTERAZE: STRUKTURA, ULOGA, INHIBICIJA

Anita BOSAK*, Maja KATALINIĆ* i Zrinka KOVARIK

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska

Primljen u travnju 2011.
CrossCheck u svibnju 2011.
Prihvaćen u svibnju 2011.

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BChE; E.C. 3.1.1.8) enzimi su koji se zbog svoje uloge u organizmu intenzivno istražuju unutar područja biomedicine i toksikologije. Iako strukturno homologni, ovi enzimi razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, odnosno specifičnosti prema supstratima koje mogu hidrolizirati te selektivnosti za vezanje mnogih liganada. U ovom radu dan je pregled dosadašnjih istraživanja kolinesteraza i njihovih interakcija s ligandima i inhibitorima te su izdvojene aminokiseline aktivnog mjesta koje sudjeluju u tim interakcijama.

KLJUČNE RIJEČI: *acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza, inhibitori, selektivnost, stereoselektivnost*

Istraživanja provedena početkom prošlog stoljeća pokazala su da se u prisutnosti krvi i tkiva koncentracija acetilkolina (ACh) snižava. Već početkom 30-ih godina ta se pojava pripisala djelovanju enzima koji hidrolizira ACh i koji je nazvan kolin-esteraza ili kolinesteraza (1). Ubrzo je postalo jasno da se radi o najmanje dvije kolinesteraze s različitim specifičnostima prema supstratima i različitim katalitičkim svojstvima. Naime, brzina hidrolize ACh eritrocitnim enzimom dosegala je maksimum kod relativno niskih koncentracija ACh, a enzim se pokazao specifičnim za hidrolizu acetatnih estera, dok butiratne estere nije hidrolizirao. Taj enzim prozvan je pravom ili specifičnom kolinesterazom (engl. *true*). Za razliku od nje kolinesteraza iz seruma pratila je Michaelis-Menteninu kinetiku i hidrolizirala je butiratne estere te je stoga nazvana pseudo ili nespecifičnom kolinesterazom (1-3). Usljedilo je razdoblje intenzivnog proučavanja specifičnosti obaju enzima prema supstratima. Na sastanku Biokemijskog društva Velike Britanije održanom 1948. godine kolinesteraze

su dobile imena koja su i danas u upotrebi: prava kolinesteraza nazvana je acetilkolinesterazom (AChE), dok je pseudokolinesteraza nazvana butirilkolinesterazom (BChE). Oba su enzima, prema *Enzyme Nomenclature* iz 1961. godine, uvrštena na popis enzima i dodijeljene su im klasifikacijske oznake: E.C. 3.1.1.7 za acetilkolinesterazu i E.C. 3.1.1.8 za butirilkolinesterazu, koje se rabe i danas (4). Kolinesteraze se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina (4). Zbog svoje rasprostranjenosti u cjelokupnome životinjskom, ali i biljnom svijetu (5) te svoje važne uloge u organizmu, oba se enzima od samog svog otkrića pa do danas intenzivno istražuju i unutar područja biokemije i unutar područja toksikologije.

ULOGA KOLINESTERAZA

AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih

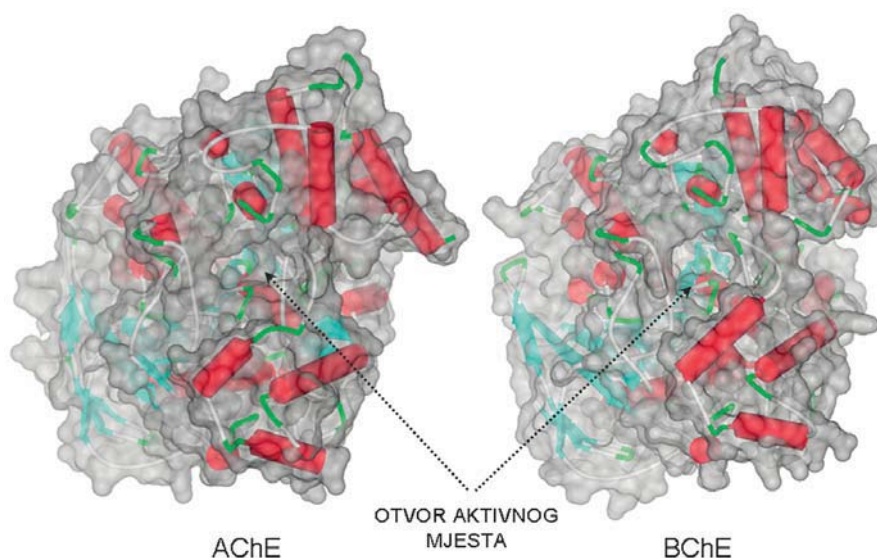
*Autori su jednako vrijedni

impulsa. Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava (6, 7). Naime, dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu gdje se zatim veže na kolinergičke receptore (nikotinski i muskarinski receptori) koji su vezani na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili na mišićne stanice (7). Vezanjem acetilkolina pokreće se niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom signala odnosno živčanog impulsa (7). Brzom razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem AChE, ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje (7). Prema brzini hidrolize acetilkolina, AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi (7-10). Za ljudsku AChE konstanta brzine hidrolize acetilkolina, k_{cat} , iznosi približno 400.000 min^{-1} te je njegova hidroliza stoga ograničena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima (10). AChE se sintetizira u koštanjoj srži, mozgu i mišićima, a osim u živčanim stanicama, mišićima i mozgu AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite. Uloga AChE u eritrocitima za sada nije poznata (6).

BChE je u višoj koncentraciji prisutna u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri (2, 6,

11, 12). Iako je dokazano da BChE, kao i AChE, može hidrolizirati acetilkolin u sinapsi, njezin specifični fiziološki supstrat nije pronađen i time prava fiziološka uloga u organizmu do danas nije razjašnjena (13, 14). Za BChE je međutim poznato da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva (2, 13). Zamijećena je i pojačana ekspresija BChE kod neurodegenerativnih bolesti kao što je Alzheimerova bolest, no uloga ovog enzima u patologiji bolesti nije potpuno razjašnjena (2, 13, 15). Nadalje, BChE sudjeluje u biokonverziji nekoliko farmakološki važnih spojeva na način da ih aktivira (bambuterol, heroin) ili deaktivira (sukcinitildikolin, aspirin, kokain, amitriptilin) (2, 16, 17).

AChE i BChE važne su ciljane mete kod tretmana neurodegenerativnih bolesti miastenije gravis, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (2, 18, 19). Nadalje, oba enzima osim ključne esterazne aktivnosti posjeduju i peptidaznu aktivnost koja se povezuje s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti te arilamilamidaznu aktivnost čija fiziološka uloga za sada nije razjašnjena (13). Osim "klasične" katalitičke uloge AChE ima i tzv. nekatalitičke funkcije koje nisu povezane s njezinom fiziološkom funkcijom. Do danas je potvrđeno da AChE potpomaže nastajanje neurita, da sudjeluje u sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih receptora i agregaciji amiloidnih vlakana, dok se njezina uloga u nastajanju krvnih stanica i trombocita povezuje s povećanim rizikom od leukemije kod osoba izloženih djelovanju anti-AChE pesticida (9, 20, 21).



Slika 1 Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze (AChE) (kristalna struktura PDB kod 1F8U, ref. 43) i ljudske butirilkolinesteraze (BChE) (kristalna struktura PDB kod 1POI, ref. 22). Crvenom bojom označene su α -uzvojnice, plavom β -nabrane ploče, zelenom bojom petlje, a sivom površina enzima dostupna vodi. Na slici je strelicom naznačen otvor aktivnog mjesta svake od kolinesteraza.

IZOFORME KOLINESTERAZA

AChE i BChE nastaju kao produkt ekspresije različitih gena, ali dijele izniman postotak homologije u primarnoj sekvenci i čak 90 % u terciarnoj strukturi (slika 1) (6, 22-24). Ljudsku AChE čini oko 550 aminokiselina (\approx 66 kDa), a nastaje kao produkt gena na kromosomskoj poziciji 7q22 (6). Sam gen za AChE u ljudi je konzerviran, no mogući su takozvani polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) (25). Do danas je otkriveno 13 SNP-a koji ne mijenjaju glavne karakteristike enzima, već mogu pojačati osjetljivost prema nekim inhibitorima i utjecati na proteinsko-proteinske interakcije (25). Alternativnim prekrajanjem predglasničke RNA na 3' kraju nastaju tri glasničke RNA odnosno tri izoforme enzima s različitom duljinom C-terminalnog kraja odgovornom za stupanj oligomerizacije enzima (6, 20, 26, 27). Bitno je napomenuti da svaka podjedinica oligomera zadržava jednaku katalitičku aktivnost. Najzastupljeniji oblik AChE je AChE-S ili sinaptička AChE, koja je prisutna u obliku tetramera gdje su dvije podjedinice jednog dimera povezane disulfidnim vezama, dok dva dimera hidrofobnim interakcijama tvore tetramerni oblik enzima (20, 26, 27). Tetramerne podjedinice koordiniraju se oko proteinskog motiva bogatog prolinom koji se nalazi na kraju kolagenskog vlakna (ColQ) ili PRiMA proteina (engl. *proline-rich membrane anchor protein*) (28). Ovim se proteinskim motivima tetrameri AChE vežu na postsinaptičke membrane živčanih odnosno mišićnih stanica (20, 26-28). AChE-S izoforma ima ujedno i najvažniju ulogu u hidrolizi acetilkolina u sinapsi (20, 26-28). AChE-E ili eritrocitna prisutna je u obliku dimera koji se nalaze vezani glikofosfatidilinozitolnim sidrom za membrane eritrocita i pločastih krvnih stanica (20, 26-28). Uloga ove izoforme enzima do danas nije razjašnjena, ali se pokazalo da je aktivnost AChE-E izolirane iz eritrocita pouzdan pokazatelj aktivnosti AChE-S u sinapsi (29). Stoga se na toj činjenici osniva dijagnosticiranje otrovanja inhibitorima AChE, ali i dijagnosticiranje nekih neurodegenerativnih bolesti čija je patologija povezana s promjenom aktivnosti ovog enzima (30-33). Treći oblik AChE, AChE-R ili engl. *read-through* na kratkom C-terminalnom kraju nema elemente koji bi omogućili oligomerizaciju i vezanje za membrane (20, 26-28). AChE-R je prisutna u obliku topljivog monomera i lokalizirana je u sinaptičkoj pukotini ili u krvi (20, 26-28). U normalnim uvjetima ova je izoforma prisutna u niskim

koncentracijama, međutim, izloženost stresu ili inhibitorima AChE pojačava ekspresiju AChE-R u mozgu, mišićima i drugim organima (9, 20). Na taj način, smatra se, AChE-R ima ulogu u obrani organizma i ublažavanju neželjenih posljedica izloženosti stresu ili drugim štetnim čimbenicima (9, 20). Novija istraživanja upućuju na postojanje i drugih izoformi AChE nastalih alternativnim prekrajanjem 5'-kraja predglasničke RNA (20). Pretpostavlja se da bi promjene na 5'-kraju mogle rezultirati direktnim vezanjem monomera bilo koje od izoformi AChE N-terminalnim krajem na membrane, no uloga takvih izoformi enzima još nije razjašnjena (20).

Gen za ljudsku BChE lokaliziran je na kromosomu 3q26 koji kodira protein veličine približno 570 aminokiselina (2, 6). Iako regija dugačka 70 kb sadržava četiri eksona i tri dugačka introna, alternativna prekrajanja predglasničke RNA nisu otkrivena (2, 6, 13). Analogno AChE, ovaj enzim može postojati u obliku monomera, dimera ili tetramera koji sadržavaju podjedinice jednake katalitičke aktivnosti (2, 6, 13). Oligomerizacija se također odvija s pomoću cisteina i triptofana smještenih na C-terminalnom kraju enzima. Za razliku od AChE, BChE se najčešće nalazi u organizmu u obliku slobodnoga nevezanog tetramera (2, 6, 13). Budući da je gen za BChE u ljudi znatno manje konzerviran od gena za AChE, smatra se da ovaj enzim i ne može imati esencijalnu fiziološku ulogu (34, 35). Otkako je 1987. godine gen *BCHE* kloniran, dokazano je postojanje više od 50 različitih prirodnih mutacija različite učestalosti (34). Kao posljedica tih mutacija sintetiziraju se različite inačice BChE.

INAČICE BChE

Do danas je poznato oko 40 različitih inačica ljudske BChE koje uključuju kako promjene samo jednog nukleotida tako i deleciju/inserciju većeg broja nukleotida (35-37). Homozigoti uobičajene BChE ($BChE_{UU}$) čine oko 74 % ljudske populacije, dok ostatak otpada na nosioce najmanje jednog alela za neku od inačica BChE (12). Neke od inačica i njihove prirodne mutacije i glavne karakteristike prikazane su u tablici 1. Tridesetak inačica spada u tzv. tihe (engl. *silent*) inačice koje nemaju esteraznu aktivnost ili im je aktivnost do 10 % od aktivnosti $BChE_{UU}$. Na temelju različite aktivnosti prema supstratima, kao i različite inhibicije sa specifičnim inhibitorima, moguće je odrediti neke genotipove butirilkolinesteraze; UU,

UA, AA/AS i FF/FS (38, 39). Međutim, ostale inačice tihe i fluoridne BChE, kvantitativne inačice i rijetke inačice moguće je odrediti genotipiziranjem (40). Kvantitativne inačice: K-, J- i Hammersmithova inačica imaju sniženu koncentraciju BChE u serumu i prisutne su u 30 %, 70 % odnosno 90 % nižoj koncentraciji od uobičajene BChE. Klinički je najzanimljivija atipična inačica koja mišićni relaksans sukcinildikolin hidrolizira vrlo sporo, a nosioci takve inačice rizične su osobe u slučaju primjene sukcinildikolina jer u vrijeme anestezije mogu doživjeti produženi respiratorni arrest. Valja napomenuti da osobe koje su nosioci tihe inačice BChE ili neke od kvantitativnih inačica sa sniženom koncentracijom BChE nemaju nikakvih zdravstvenih teškoća, ali čine rizičnu skupinu kod trovanja pesticidima i u slučaju primjene lijekova za Alzheimerovu bolest (donepezil i huperzin A) (12, 40). Grupiranjem svih tih i fluoridnih inačica u dvije skupine, a izuzimanjem H, J, Cynthiane i drugih rijetkih inačica može se govoriti o 15 mogućih genotipova ljudske BChE (12). Kod Amerikanaca i Europljana najveću frekvenciju pojavljivanja, osim homozigota UU, ima heterozigot

UK koji se pojavljuje kod svake pete osobe, dok se homozigot KK pojavljuje kod svake 69. osobe (12). Mutacija nađena na K-alelu najčešća je mutacija gena *BCHE* u europskoj, američkoj i japanskoj populaciji i ima ju svaka četvrta osoba (12). Upravo se ta inačica BChE povezuje s povećanjem rizika od razvoja Alzheimerove bolesti (41).

STRUKTURA KOLINESTERAZA

Osnovnu strukturu AChE i BChE čini 12 β -nabranih ploča okruženih s 14 α -uzvojnica, što obje kolinesteraze klasificira u skupinu hidrolaza α/β -strukture (2, 6, 23).

Određivanje kristalne strukture AChE 1991. godine, izolirane iz raže *Torpedo californica*, omogućilo je novi pogled na ovaj enzim i novu eru usmjerenih istraživanja (42). Kristalna struktura ljudske AChE određena je 2000. godine i pokazano je da je visoko homologna strukturi AChE iz *Torpedo californica* (42, 43). Iako postoji varijabilnost u strukturi AChE različitih specija, aminokiseline koje

Tablica 1 Neke prirodne inačice ljudske butirilkolinesteraze (BChE).

BChE inačica	Oznaka	Promjena u proteinu	Karakteristike	Referenca
uobičajena	U	–	–	
atipična inačica	A	Asp70→Gly	slaba inhibicija dibukainom i fluoridnim ionom	60, 119
fluoridna-1	F	Thr243→Met	slaba inhibicija fluoridnim ionom	120
fluoridna-2	F	Gly390→Val	slaba inhibicija fluoridnim ionom	121
Kalow-inačica	K	Ala539→Thr	30 % manja koncentracija proteina u odnosu na U	122, 123
James-inačica	J	Glu497→Val Ala539→Thr	70 % manja koncentracija proteina u odnosu na U	124, 125
Hammersmith-inačica	H	Val142→Met	90 % manja koncentracija proteina u odnosu na U	126, 127
tiha-1	S	Gly117→pomak okvira čitanja	aktivnost manja od 10 % aktivnosti U	128, 37*
tiha-2	S	Ile6→pomak okvira čitanja		
tiha-3	S	Tyr500→stop		
Cynthiana		nepoznata	180-300 % veća aktivnost od U	74
Johannesburg		nije u kodirajućoj regiji	180 % veća aktivnost od U	usp. 52
C5+		nepoznata	dodatna vrpca u poliakrilamidnom gelu s 25 % većom aktivnošću od U	129

* preostale tihe inačice navedene su u ref. 52

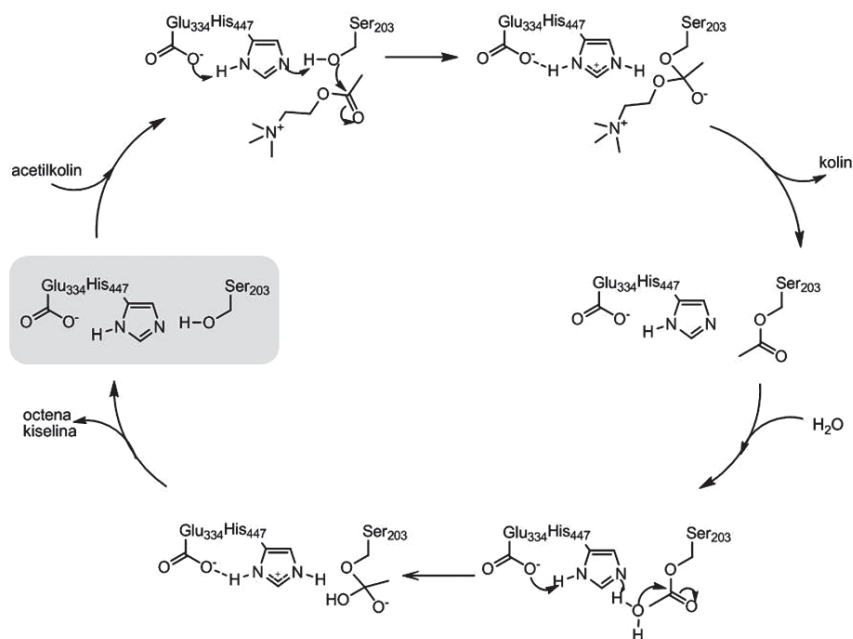
određuju aktivno mjesto visoko su konzervirane (44). Prostor interakcije sa supstratima, ali i s drugim ligandima, kod ljudske AChE precizno je određen s 14 aromatskih aminokiselina raspoređenih kroz aktivno mjesto enzima (6, 45, 46). U svojoj strukturi ljudska AChE ima tri *N*-glikozilacijska mjesta Asn-X-Ser/Thr (33, 47). Prema dosadašnjim spoznajama, promjena u glikozilaciji ne utječe na katalitičku aktivnost AChE. No, nedostatak jednog od glikana snažno utječe na izlučivanje AChE u izvanstanični prostor, povećava podložnost razgradnji proteolitičkim enzimima te utječe na afinitet enzima prema određenim inhibitorima koji se vežu u aktivno mjesto (33, 47). Drugi utjecaji glikozilacije do sada nisu istraživani, no smatra se da glikozilacija utječe na sve češće spominjanu nekolinergičnu funkciju AChE koja nije povezana s njezinom fiziološkom funkcijom.

Kristalna struktura ljudske BChE određena je desetak godina kasnije od kristalne strukture AChE. Razlog tomu je velik broj glikozilacijskih mjesta u BChE, što je ometalo kristalizaciju i određivanje kristalne strukture BChE (48). Kompleksni ugljikohidrati vezani su kovalentno na devet aminokiselinskih ostataka asparagina te čak do 30 % od ukupne mase enzima otpada na vezane ugljikohidrate (2, 47). Glikozilacija ima ulogu u smatanju, izlučivanju i stabilnosti BChE (2, 47). Promjena broja glikozilacijskih mjesta kod BChE ima slične posljedice kao i kod AChE, dakle, bitno utječe na izlučivanje

enzima u izvanstanični prostor i na samu stabilnost enzima (47, 49). Smatra se da visoki stupanj glikozilacije omogućava BChE dugotrajnu stabilnost u plazmi, tj. cirkulaciji krvi, gdje je njezina aktivnost i najizraženija (47, 49). Za uspješnu kristalizaciju BChE mnoge kemijske metode uklanjanja glikana nisu bile potpuno učinkovite te se rješenje pronašlo u kreiranju višestrukih mutanata kojima su supstitucijom aminokiselina (asparagin → glutamin) uklonjena mjesta za glikozilaciju (48). S pomoću takvih mutanata pogodnih za kristalizaciju riješena je trodimenzionalna struktura BChE (48, 50). Iako je BChE strukturno vrlo slična AChE, umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje nalazimo unutar aktivnog mjesta AChE, kod BChE je njih 6 zamijenjeno alifatskim aminokiselinama (2, 6, 13, 22). To čini volumen aktivnog mjesta BChE oko 200 Å³ većim u odnosu na aktivno mjesto AChE (46).

MEHANIZAM HIDROLIZE KOLINESTERAZAMA

Iako postoje razlike u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnog mjesta AChE i BChE, mehanizam hidrolize supstrata je jednak (6, 43, 50, 51). Mehanizam hidrolize supstrata na primjeru acetilkolina (ACh), prijenosnika živčanih impulsa, prikazan je na slici 2. Hidroliza kolinesterazama zbiva



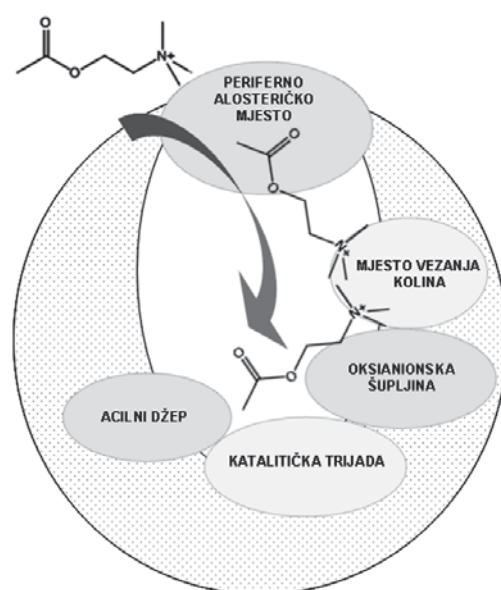
Slika 2 Reakcijski stupnjevi u hidrolizi acetilkolina kataliziranog kolinesterazama. Broj aminokiselina odnosi se na položaj aminokiseline u ljudskoj AChE.

se u tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje Michaelisova kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskoga prijelaznog stanja koje čine aktivni serin i supstrat. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi uključuju stvaranje intermedijera u kojemu se acilna skupina supstrata prenosi na serinski ostatak enzima.

AKTIVNO MJESTO

Aktivno mjesto obaju enzima je 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo (52). Spomoću kristalografije, specifičnog vezanja liganada i ciljane mutageneze, identificirane su četiri domene koje čine aktivno mjesto obaju enzima: a) katalitičko mjesto (katalitička trijada s oksianionskom šupljinom), b) kolinsko mjesto (kation- π mjesto) važno za stabilizaciju pozitivno nabijenoga kvaternog dijela kolinskih supstrata, smještavanje tricikličkog fenotiazina i akridinijevih analoga koji su snažni inhibitori kolinesteraza (42, 53), c) acilni džep odgovoran za smještavanje acilnog dijela supstrata i d) periferno mjesto koje je smješteno na rubu ždrijela (slika 3).

Katalitička trijada smještena je simetrično na dnu ždrijela, a čine ju aminokiseline Ser203₍₁₉₈₎^{*}, His447₍₄₃₈₎ i Glu334₍₃₂₅₎ koje direktno sudjeluju u katalizi. Aktivni serin Ser203₍₁₉₈₎ nukleofilniji je od ostalih serina u enzimu za što je zaslužna mreža vodikovih veza koja se formira između O γ -protona Ser203₍₁₉₈₎ i slobodnog elektronskog para na dušiku iz imidazolskog prstena His447₍₄₃₈₎. Mrežu vodikovih atoma čini i Glu334₍₃₂₅₎ vodikovom vezom između svoje karbonilne skupine i slobodnog elektronskog para na drugom dušiku iz imidazolskog prstena His447₍₄₃₈₎. Prilikom stvaranja tetraedarskoga prijelaznog stanja, karbonilni kisik supstrata stabilizira se vodikovim vezama s Gly118₍₁₁₆₎, Gly119₍₁₁₇₎ i Ala201₍₁₉₉₎ koji čine oksianionsku šupljinu. Katalitičko mjesto kolinesteraza sadržava aminokiselinski ogranak glutamata koji je smješten tik do aktivnog serina (kod ljudske AChE glutamat je na položaju 202, a u ljudskoj BChE na 197). Njegova je uloga stabiliziranje prijelaznih stanja tijekom katalize koja se ostvaruje elektrostatskim interakcijama s protoniranim katalitičkim histidinom. Istraživanja rađena na ljudskoj AChE pokazala su da upravo Glu202, stabilizirajući imidazolski prsten His447,



Slika 3 Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza s naznačenim strukturnim domenama i supstratom acetilkolinom. Strelica označava smjer ulaska i pozicioniranja acetilkolina u aktivno mjesto kolinesteraza.

pridonosi dealkilaciji (tzv. starenje) enzima fosfoniliranog s organofosforovim spojevima kakav je soman, za razliku od mutanta Glu202Gln koji je otporniji na starenje i može se reaktivirati oksimima (52, 54).

Kolinsko mjesto enzima čine aminokiselinski ogranci Trp86₍₈₂₎, Tyr337_(Ala328) i Tyr338_(Phe325). Navedeni triptofan konzervirana je aminokiselina u svim do sada sekvenciranim kolinesterazama. Umjesto Tyr337 u ljudskoj AChE na tom položaju u *Torpedo californica* AChE nalazi se fenilalanin. Zbog prisutnosti aromatskih aminokiselina, interakcije između veznog mjesta kolina i liganda jesu kation- π tipa. Triptofan orijentira i omogućava smještavanje nabijenog dijela supstrata, omogućavajući time bržu hidrolizu kolinskih supstrata (55). Ranije se smatralo da vezanju kvaterne aminoskupine mora pridonositi negativno nabijena karboksilna skupina aspartata ili glutamata. Odsutnost fenilalanina na položaju 328 kod BChE utječe na afinitet enzima prema nekim inhibitorima. Tako npr. huperzin A ima visok afinitet prema AChE jer njegov protonirani primarni amin stvara jaku interakciju s fenilalaninom. Nadalje, Tyr337 kod AChE destabilizira vezanje fenotiazina kakav je etopropazin. Etopropazin je specifični inhibitor BChE vjerojatno zbog steričkih smetnja koje u AChE postoje između dietilamino-2-izopropilnog dijela etopropazina i pobočnog lanca Tyr337 (56, 57).

*U zagradi je naveden broj aminokiseline u ljudskoj BChE, a broj koji nije u zagradi odnosi se na položaj aminokiseline u ljudskoj AChE.

Kolinsko mjesto BChE nije specifično za pozitivno nabijene ligande, već taj enzim može hidrolizirati i neutralne, pa čak i neke negativno nabijene ligande (aspirin). Ta činjenica potkrijepljena je kristalnom strukturom ljudske BChE u kojoj je kolinsko mjesto okupirano molekulom glicerola koji je upotrijebljen kao krioprotektant (50).

Acilni džep omogućava smještavanje acilne skupine supstrata, određujući time njegovu orijentaciju prema aktivnom serinu i ostatku enzima. Dva fenilalanina na položaju 295 i 297 definiraju dimenziju acilnog džepa aktivnog mjesta ljudske AChE i tako ograničavaju smještavanje supstrata većih od propionilkolina (52, 55, 58). U acilnom džepu ljudske BChE umjesto aromatskih, nalaze se aminokiselinski ogranci alifatskih aminokiselina Leu286 i Val288 koje svojim manjim dimenzijama smanjuju selektivnost BChE te omogućavaju hidrolizu šireg spektra supstrata u odnosu na AChE (52).

Periferno mjesto ljudske AChE čine aminokiselinski ogranci tirozina na položajima 72 i 124 te triptofan na položaju 286. Te su aminokiseline važne za specifičnost inhibicije AChE s BW284C51, dekametonijem, propidijem i peptidom fascikulinom (56). Periferno je mjesto odgovorno i za alosterički mehanizam inhibicije AChE pri visokim koncentracijama acetilkolina (59). U ljudskoj BChE se, na odgovarajućim položajima, nalaze alifatske aminokiseline Asn, Gln i Arg pa je stoga otvor u ždrijelo veći (52, 56). Zbog te razlike u aminokiselinama BChE ima manji afinitet prema spojevima koji su specifični inhibitori AChE (propidij, fascikulin) (55). U blizini ruba ždrijela i kolinskog mjesta ljudske AChE nalazi se Asp74 koji također sudjeluje u stabilizaciji i vezanju BW284C51 i dekametonija (56). On pridonosi prihvaćanju liganada, osobito kationskih, i njihovoj pravilnoj orijentaciji pri ulazu u aktivno mjesto, a njegova specifična uloga djelomično je posljedica njegova posebnog položaja u ždrijelu. Međutim, Asp74 u AChE nalazi se u BChE na položaju 70, a mutacija Asp70 u glicin pronađena je u atipičnoj inačici BChE (60). Uloga perifernog mjesta u BChE dodijeljena je upravo Asp70 te Tyr332 koji je također smješten na ulazu ždrijela. Pokazalo se da je Asp70 važan za aktivaciju/inhibiciju BChE jer kod mutirane BChE, koja umjesto aspartata ima glicin ili lizin, nema pojave aktivacije butirilkolinom, niti inhibicije benzoililkolinom, što je inače karakteristično za uobičajenu inačicu BChE (61).

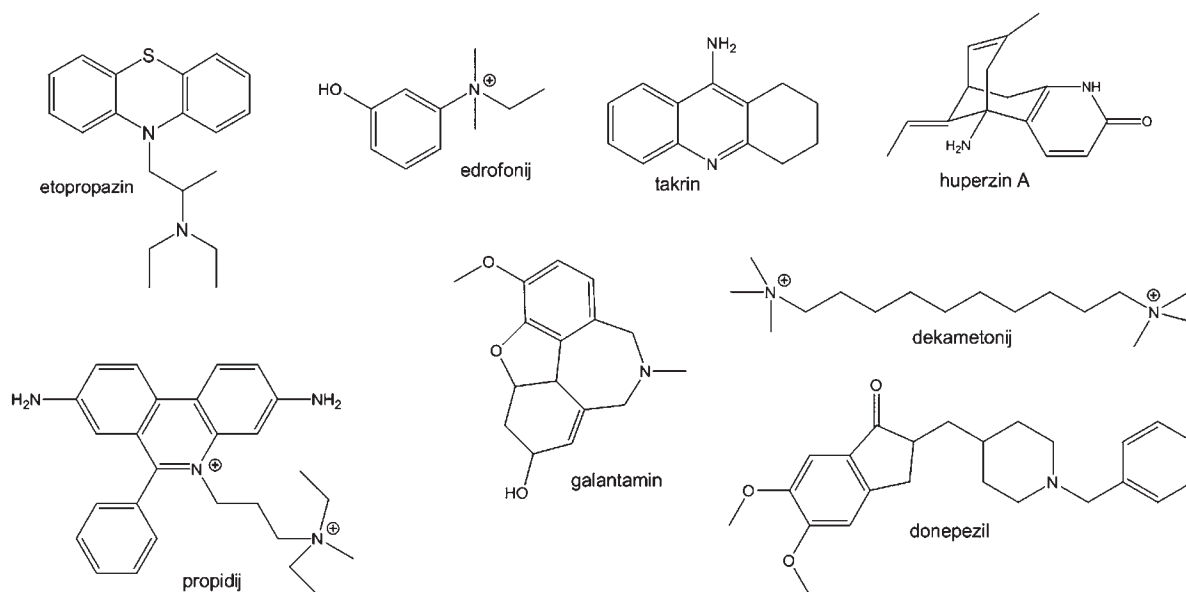
INHIBITORI KOLINESTERAZA

Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa (desenzibilizacija receptora), što se manifestira tzv. kolinergičkom krizom (7, 62). Ova kriza koja uključuje mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava, kao krajnji ishod ima smrt organizma (62, 63). Dok inhibicija AChE ima posljedice opasne za život, inhibicija BChE istim spojem ne utječe na vitalne funkcije organizma (2, 6, 11, 64). BChE stoga u organizmu djeluje kao prirodno čistilo od spojeva koji inhibiraju AChE i na taj ju način štite od inhibicije (64-66).

Povijest inhibitora kolinesteraza počinje i prije otkrića ovih enzima. Naime, učinak mnogih biljaka koje su se rabile u tradicionalnim obredima afričkih plemena kod dokazivanja krivnje osuđenima, ali i biljaka koje se još i danas rabe u tradicionalnoj kineskoj medicini, temelji se na spojevima koji inhibiraju AChE (67). Kako je kasnije otkriveno, inhibicija kolinesteraza postiže se vezanjem spojeva nekovalentnim interakcijama (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnim vezanjem za serin katalitičke trijade (ireverzibilna ili progresivna inhibicija) (23, 67).

Reverzibilni inhibitori

Interakcija kolinesteraza i reverzibilnih inhibitora nekovalentne je prirode. Mnogi takvi inhibitori prirodnog su podrijetla i izolirani su iz biljaka, kao npr. alkaloidi (huperzin A, solanidin, solanin) i flavonoidi (npr. galangin) (68, 69). Uz prirodne spojeve kao inhibitore kolinesteraza, nove spoznaje o ovim enzimima i njihovoj uključenosti u patologiju mnogih bolesti kao što su miastenija gravis, Alzheimerova i Parkinsonova bolest, potaknule su razvoj i sintetskih inhibitora (68). Tako su danas u kliničkoj upotrebi reverzibilni inhibitori AChE donepezil (Aricept®) i takrin (Cognex®) koji se primjenjuju u terapiji demencije (67-69). Strukture nekih od reverzibilnih inhibitora kolinesteraza prikazane su na slici 4. Reverzibilni inhibitori vežu se ili u aktivno mjesto (etopropazin, edrofonij, takrin, huperzin A) ili na periferno mjesto enzima (propidij, galantamin, fascikulin) ili istodobno na oba mjesta (dekametonij) (70). Prema tome inhibicija može biti posljedica: a) konformacijske promjene enzima uzrokovane vezanjem inhibitora, b) elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih inhibitora s kationskim dijelom supstrata tijekom katalitičke reakcije ili c)



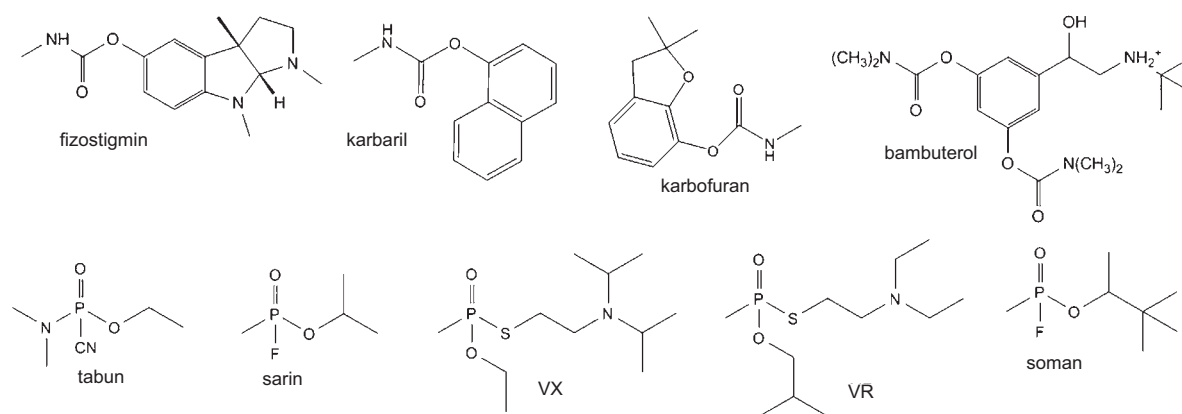
Slika 4 Struktura nekih reverzibilnih inhibitora kolinesteraza.

steričkih i/ili elektrostatskih smetnja ulasku supstrata u aktivni centar enzima (70). Zajedničko strukturalno obilježje svih potentnih inhibitora kolinesteraza jest prisutnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata, što olakšava ulazak i smještanje inhibitora u aktivno mjesto enzima. Naime, svaka podjedinica AChE mali je elektrostatski dipol kolinearano s osi koja prolazi ždrijelom aktivnog mjesta enzima (71). Postojanje takvog dipola olakšava vezanje pozitivno nabijenih spojeva, a osobito je važno kod vezanja velikih viševalentnih kationa kakvi su peptidi fascikulini koji zbog svoje veličine ne mogu ući u ždrijelo, ali zatvaraju aktivno mjesto enzima (23, 71, 72). Dugački i tanki ligandi koji imaju dva aromatska prstena ili dvije pozitivno nabijene molekule udaljene 10 Å do 12 Å mogu se istodobno vezati u kolinsko i periferno mjesto enzima kao donepezil i dekametonij (70). Do uspostavljanja ravnoteže između asocijacije i disocijacije inhibitora i enzima kod reverzibilnih inhibitora s konstantama disocijacije manjim od 1 nmol dm⁻³ dolazi unutar nekoliko mikrosekundi do nekoliko milisekundi, dok se kod inhibitora visokog afiniteta s konstantama disocijacije većim od 1 nmol dm⁻³ ravnoteža postiže polagano (min → dani). Jedan od najjačih inhibitora AChE, peptid fascikulin, izoliran je iz otrova zelene mambe (43, 45). Nekoliko reverzibilnih inhibitora visokog afiniteta prema AChE, s konstantama disocijacije u femtomolarnom rasponu, načinjeno je s pomoću tzv. klik-kemije gdje je aktivno mjesto

AChE služilo kao reakcijska posuda (73, 74). Reverzibilni inhibitori rabe se i u istraživanju mehanizma interakcije kolinesteraza sa supstratima (23, 45, 56).

Ireverzibilni inhibitori

Da bi neki kolinesterazni inhibitor bio ireverzibilan, on u aktivnome mjestu enzima mora formirati Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom, a zatim se inhibitor kovalentno veže s katalitičkim serinom, pri čemu se prijelazno stanje stabilizira interakcijama s aminokiselinama u oksianionskoj šupljini. Prijelazno stanje koje nastaje kod vezanja ireverzibilnih inhibitora analogno je onomu kod hidrolize supstrata (67, 75). Međutim, reakcija uklanjanja inhibitora vezanog na katalitički serin izuzetno je spora u usporedbi s reakcijom deacilacije koja je prisutna kod hidrolize supstrata (67, 75). Budući da u vremenskom okviru ta reakcija može trajati i danima, ovi se spojevi stoga smatraju ireverzibilnim inhibitorima kolinesteraza (62, 76, 77). Struktura nekih od ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza prikazana je na slici 5. Prvi poznati inhibitor kolinesteraza, karbamat fizostigmin (znan i kao eserin) izoliran iz sjemenki biljke *Physostigma venenosum*, rabi se u terapiji miastenije gravis i Alzheimerove bolesti, a dugo se uspješno rabio i za liječenje glaukoma (67). Osim prirodnog karbamata fizostigmina brojni sintetički karbamati imaju primjenu kao lijekovi. Tako se rivastigmin (Exelon®)



Slika 5 Struktura nekih ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza (karbamatni i organofosforni spojevi).

rabi u terapiji miastenije gravis, bambuterol (Bambec[®]) predlijek je bronhodilatatora terbutalina i rabi se u terapiji astme, dok postotak inhibicije s Ro-02-0683 koristi u identifikaciji prirodnih inačica ljudske BChE (78-81). Sinteza ireverzibilnih inhibitora kolinesteraza razvijana je i u svrhu upotrebe ovih spojeva kao pesticida u kontroli nametnika u poljoprivrednoj proizvodnji (82). Tako su od karbamatnih pesticida u upotrebi karbaril, aldikarb, karbofuran, metomil i metiokarb (12, 53, 67, 83). Zbog svoje niske toksičnosti za sisavce karbaril je jedan od najupotrebljavanijih insekticida (67). Osim karbamatnih pesticida danas je u upotrebi i oko 80 organofosfornih pesticida (npr. metamidofos, fenamifos, diklorovos - DDVP, klorpirifos, malation i diazinon) (76, 84, 85) kao derivata fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline (62, 76). Međutim ni karbamatni ni organofosfatni pesticidi, iako učinkoviti u djelovanju, ipak ne pokazuju selektivnu inhibiciju AChE između različitih životinjskih vrsta uključujući i čovjeka (84). Neka ispitivanja pokazuju da se godišnje oko 3.000.000 ljudi otruje ovim pesticidima od čega je čak 25 % slučajeva namjerno izazvano trovanje, dok oko 300.000 trovanja godišnje završi smrtnim ishodom (12, 86). Glavni znakovi trovanja ovim spojevima jesu tremor, slinjenje, konvulzije, paraliza skeletnih mišića i respiracijska depresija, a posljedica su izazvane kolinergičke krize (62). U slučaju trovanja ovim spojevima za preživljavanje je iznimno važna pravodobno pružena medicinska pomoć (62).

Iako su organofosforni spojevi sintetizirani s ciljem upotrebe kao pesticidi, 30-ih godina dvadesetog stoljeća dobili su sasvim novu ulogu. Naime, zbog visoke toksičnosti za ljude razvijena je njihova upotreba kao kemijskog oružja (62, 87, 88). Prvi

pesticid kojemu je namijenjena uloga živčanoga bojnog otrova bio je tabun (slika 5) (87, 88). Ovaj organofosforni spoj sintetizirao je kemičar Gerhard Schroder 1936. godine u Njemačkoj (88, 89). Ubrzo zatim, sintetiziran je niz sličnih organofosfornih spojeva (sarin (GB), soman (GD), ciklosarin (GF), VX i VR) kao kemijskih bojnih otrova (87, 88). Iako je 1997. godine 148 država potpisalo konvenciju o zabrani razvoja, proizvodnje i skladištenja navedenih spojeva, opasnost od njihove zloupotrebe, kao i od nehomičnog otrovanja, još je prisutna (87, 88).

SELEKTIVNOST KOLINESTERAZA

Iako strukturno homologne, AChE i BChE razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti vezanja supstrata, liganada i inhibitora (45, 56, 89, 90). Acetilkinesteraza je enzim visoko specifičan za hidrolizu acetilkolina i ne može hidrolizirati supstrate veće od propionilkolina, za razliku od BChE koja hidrolizira puno širi spektar estera (propionil(tio)kolin, benzoil(tio)kolin i dr.) uključujući i voluminozne neutralne estere (heroin, kokain, prokain i dr.) pa čak i neke negativno nabijene estere (aspirin), i to brzinama bliskima brzini hidrolize butirilkolina (12). Također, budući da se zbog specifičnosti aktivnog mjesta AChE i BChE, njihova inhibicija istim spojem može značajno razlikovati, posebna pažnja posvećena je i istraživanju i pronalasku selektivnih inhibitora pojedinih kolinesteraza (45, 91). Takvi inhibitori imaju ključnu ulogu u terapiji, u dijagnostici mnogih bolesti i stanja organizma te u razvoju specifičnih lijekova (68, 75, 91). Trenutačno se u liječenju Alzheimerove bolesti rabe uglavnom inhibitori koji nisu selektivni inhibitori AChE (izuzev

donepezil i huperzin A) (17). Kako Alzheimerovu bolest karakterizira smanjena aktivnost AChE, a u višim koncentracijama u mozgu je prisutna i BChE, boljim omjerom inhibicije AChE i BChE mogla bi se postići veća efikasnost u tretmanu bolesti. Nadalje, selektivni reverzibilni inhibitori BChE odnosno AChE, etopropazin i BW284C51, primjenjuju se u dijagnostici za određivanje aktivnosti pojedinih kolinesteraza u uzorcima krvi ili tkiva (31). U tablici 2 prikazano je nekoliko kolinesteraznih inhibitora (reverzibilnih ili ireverzibilnih) s pripadajućim IC_{50} vrijednostima kao mjerom njihove inhibitorne moći. Valja napomenuti da se kod ireverzibilnih inhibitora IC_{50} odnosi na reverzibilni kompleks enzim-inhibitor i da daje informaciju o afinitetu enzima prema inhibitoru, ali ne govori o brzini progresivne inhibicije. Jednim od vrlo selektivnih inhibitora kolinesteraza pokazao se i već spomenuti bambuterol koji mišju BChE inhibira 16.000 puta brže od mišje AChE, dok ljudsku BChE inhibira oko 10.000 puta brže od ljudske AChE, što ga svrstava u skupinu izrazito selektivnih inhibitora BChE (78, 79, 89).

STEREOSELEKTIVNOST KOLINESTERAZA

Zbog asimetričnosti ždrijela aktivnog mjesta kolinesteraze pokazuju svojstvo enantioselektivnosti prepoznavajući svaki oblik kiralnosti (središnja, planarna i osna) prisutan na supstratu ili inhibitoru, što se očituje u afinitetima vezanja ili u različitim brzinama reakcije s pojedinim enantiomerima (59, 92). AChE je tako stereoselektivna prema karbamatima (–)-fizostigminu, (–)-fizoveninu, (–)-kimserinu i (R)-bambuterolu, dok su AChE i BChE pokazale veći afinitet prema (R)-etopropazinu, lijeku koji se, u obliku racemata, rabi kao neuroleptički lijek u tretmanu Parkinsonove bolesti (93-97). Karboksilni esteri, esteri karbaminske kiseline i trifluoracetofenoni planarne su molekule kod kojih su skupine vezane direktno na elektrofilni ugljik pod kutovima od 120° čineći tako trigonalnu geometriju. Takva planarna konfiguracija ima minimalne steričke zahtjeve za izlazak izlazne skupine iz ždrijela aktivnog mjesta enzima. Za razliku od tih spojeva organofosforni spojevi pokazuju tetraedarsku geometriju, kod koje se skupine direktno vezane na atom fosfora vežu pod idealnim tetraedarskim kutom od 109° (17). Razlika u geometriji između organofosfata i karboksilnih estera uvjetuje različite interferencije između aminokiselinskih ogranaka aminokiselina u aktivnome mjestu sa skupinama koje

Tablica 2 *In vitro* selektivnost (IC_{50}) nekih inhibitora ljudskih kolinesteraza (17).

Spoj	IC_{50} / nmol dm ⁻³		
	AChE	BChE	BChE/AChE
BW284C51	19	48000	2500
huperzin A	47	30000	640
donepezil	22	4200	190
metrifonat	800	18000	23
galantamin	800	7300	9
rivastigmin	48000	54000	1,1
fizostigmin	28	16	0,57
takrin	190	47	0,25
izo-OMPA	34000	980	0,029
etopropazin	260000	300	0,0012
bambuterol	30000	3	0,0001
MF-8622	100000	9	0,00009

IC_{50} je koncentracija inhibitora potrebna da se inhibira 50 % aktivnosti enzima. Uspoređene su IC_{50} vrijednosti za eritrocitnu AChE i BChE iz plazme.

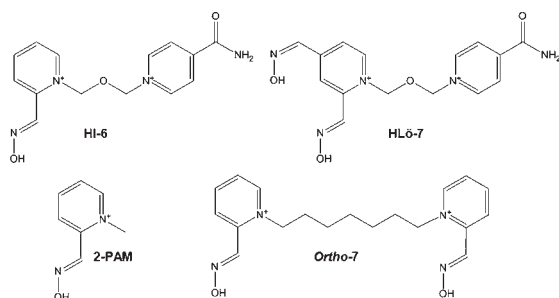
okružuju fosfor. Organofosforni spojevi, koji efikasno fosfoniliraju serin u aktivnome mjestu enzima pri čemu je proces defosfonilacije vrlo spor, pogodni su za proučavanje strukturnih zahtjeva koje aktivno mjesto kolinesteraza postavlja ligandima. Pokazalo se da je enantioselektivnost AChE prema R_p - i S_p -fosfonatima određena ograničenim dimenzijama acilnog džepa aktivnog mjesta enzima (98, 99). AChE i BChE pokazuju i izrazitu stereoselektivnost prema (R)-enantiomerima acetatnih estera derivata kinuklidina (100). Uporaba enantiomera poznate apsolutne stereokemije i proučavanje njihovih interakcija s enzimima omogućava uvid u strukturne zahtjeve koje aktivno mjesto ima prema spojevima i, na temelju toga, predviđanje stereoselektivnosti enzima prema novim enantiomernim spojevima (92). Kako se prilikom uporabe racemičnih biološki aktivnih spojeva može očekivati da će pojedini enantiomeri pokazivati različiti biološki učinak, i to od smanjene aktivnosti pa čak do toksičnosti (101), definiranje stereoselektivnosti kolinesteraza od velike je važnosti, upravo zbog nezamjenjive uloge AChE u organizmu.

MOLEKULARNO MODELIRANJE U ISTRAŽIVANJU KOLINESTERAZA

Određivanje trodimenzionalne strukture kolinesteraza, konjugata kolinesteraza s raznim spojevima, te kompleksa kolinesteraza i raznih liganada, omogućilo je predviđanje mogućih interakcija

ovih enzima sa širim spektrom raznih liganada uporabom računalnih programa. U bazi proteinskih struktura (PDB – engl. *Protein Data Bank*) do danas je pohranjeno više od 160 kristalnih struktura kolinesteraza koje služe kao polazna točka u ovim istraživanjima (102). Podaci o strukturi i funkciji kolinesteraza pohranjuju se također u posebnu bazu nazvanu “ESTHER” koja sjedinjuje veliku porodicu esteraza (hidrolaza) α/β -strukture (103).

U PDB-u su pohranjene i kristalne strukture kolinesteraza inhibiranih nekim organofosornim spojevima. Međutim, svega je nekoliko struktura u kompleksu s oksimima kao što su 2-PAM, HI-6, HLö-7 i *Ortho-7* koje bi mogle poslužiti kao smjernice u dizajnu učinkovitih protuotrova (104, 105). Strukture ovih oksima prikazane su na slici 6. Razlog otežanom



Slika 6 Struktura nekih oksima, reaktivatora inhibiranih kolinesteraza, koji se rabe kao protuotrovi kod trovanja karbamatnim i organofosornim spojevima (2-PAM i HI-6) ili u istraživanju reaktivacije (HLö-7 i *Ortho-7*).

dobivanju odgovarajućih kristala kompleksa oksima i konjugata AChE-organofosfat nalazi se u samom procesu reaktivacije. Naime, učinkovita reaktivacija iznimno je brz proces koji se odvija i pri nižim temperaturama te za kristalizaciju preostane samo slobodni enzim. U svrhu istraživanja interakcija koje se javljaju tijekom reaktivacije kolinesteraza inhibiranih organofosornim spojevima stoga se najčešće rabi računalna metoda molekularnog pristajanja (engl. *molecular docking*) (106). Ovom metodom predviđa se vjerojatni položaj i orijentacija oksima u aktivnome mjestu enzima simulacijom sila, poput električne sile, van der Waalsove sile ili vodikovih veza, gdje je enzim “nepomičan”, a oksimu se dopuštaju svi stupnjevi slobode rotacije (106). Ovakvim pristupom omogućuje se definiranje strukturnih karakteristika potencijalno učinkovitih reaktivatora koje bi služile kao smjernice u sintezi novih oksima (106). Valja imati na umu da predviđanje interakcija u ovom slučaju ne uzima u obzir moguće

pomake u položaju aminokiselina aktivnog odnosno perifernog alosteričkog mjesta enzima. Međutim danas je upotreba računalne metode molekularnog pristajanja postala nezaobilazna i u dizajnu potencijalnih lijekova ciljanog djelovanja (inhibicija AChE/BChE) za bolesti kao što su Alzheimerova i Parkinsonova bolest (106).

Uporaba kompleksnijih računalnih metoda, kao što je metoda molekularne dinamike, usmjereno je uglavnom na proučavanje samog mehanizma hidrolize supstrata kolinesteraza. Ovom je metodom kod AChE predviđeno i postojanje alternativnog izlaza (engl. *back door hypothesis*) kojim bi se kolin nastao pri hidrolizi supstrata mogao eliminirati iz aktivnog mjesta (107, 108). Specifičan oblik aktivnog mjesta i iznimno brza hidroliza fiziološkog supstrata acetilkolina podupiru ovu hipotezu, ali još nedostaje eksperimentalni dokaz (107, 108).

Istraživanje kolinesteraza danas je prošireno i na različite mutante istih enzima s promijenjenim aminokiselinama aktivnog mjesta (43, 56, 109-113). Mutacije koje se uvode pomažu objašnjava utjecaja pojedinih aminokiselina kod interakcija s organofosornim spojevima i/ili oksimima te drugim ligandima (43, 56, 109-113). Uključivanje takvih mutanata u istraživanje može dati i eksperimentalnu potvrdu određenim interakcijama predviđenih molekularnim modeliranjem. Također, zbog mogućnosti inženjerstva i sinteze proteina sa željenim svojstvima mutanti su, jednako kao i BChE, interesantni za razvoj stehiometrijskih ili pseudokatalitičkih čistila kod trovanja organofosornim spojevima (65, 66, 109-112, 116).

Molekularno modeliranje pokazalo se posebice važnim alatom u istraživanju reaktivacije kolinesteraza inhibiranih organofosornim spojevima. Naime, do danas nije poznat univerzalni reaktivator koji bi bio učinkovit u reaktivaciji kolinesteraza inhibiranih različitim organofosornim spojevima (117, 118).

LITERATURA

1. Whittaker VP. How the cholinesterases got their modern names. *Chem Biol Interact* 2010;187:23-6.
2. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:131-8.
3. Alles GA, Hawes RC. Cholinesterases in the blood of man. *J Biol Chem* 1940;133:375-90.
4. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature

- and Classification of Enzymes. San Diego (CA): Academic Press Inc.; 1992.
5. Sagane Y, Nakagawa T, Yamamoto K, Michikawa S, Oguri S, Momonoki YS. Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiol* 2005;138:1359-71.
 6. Taylor P, Radić Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994;34:281-320.
 7. Stryer L. *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga; 1991.
 8. Quin DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transitions states. *Chem Rev* 1987;78:955-79.
 9. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for and old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:294-302.
 10. Kaplan D, Ordentlich A, Barak D, Ariel N, Kronman C, Velan B, Shafferman A. Does “butyrylization” of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active centre gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? *Biochemistry* 2001;40:7433-45.
 11. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 1989;260:625-34.
 12. Lockridge O, Masson P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* 2000;21:113-26.
 13. Çokuğras NA. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem* 2003;28:54-61.
 14. Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* 2002;110:627-39.
 15. Saez-Valero J, Small DH. Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer’s disease. *Brain Res* 2001;889:247-50.
 16. Fisher MA. Use of cholinesterase inhibitors in the therapy of myasthenia gravis. U: Giacobini E, urednik. *Cholinesterase and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 249-62.
 17. Giacobini E. Butyrylcholinesterase: its role in brain function. U: Giacobini E, urednik. *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2003. str. 1-20.
 18. Poewe W, Gauthier S, Aarsland D, Leverenz JB, Barone P, Weintraub D, Tolosa E, Dubois B. Diagnosis and management of Parkinson’s disease dementia. *Int J Clin Pract* 2008;62:1581-7.
 19. Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci* 2006;95:1177-95.
 20. Meshorer E, Soreq H. Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosci* 2006;29:216-24.
 21. Greenfield SA, Zimmermann M, Bond CE. Non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase. The significance of C-terminal peptides. *FEBS J* 2008;275:604-11.
 22. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 2003;278:41141-7.
 23. Silman I, Sussman J. Structural studies on acetylcholinesterase. U: Giacobini E, urednik. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 9-26.
 24. Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulie J, Silman I. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10827-31.
 25. Hasin Y, Avidan N, Bercovich D, Korczyn AD, Silman I, Beckmann JS, Sussman JL. Analysis of genetic polymorphisms in acetylcholinesterase as reflected in different populations. *Curr Alzheimer Res* 2005;2:207-18.
 26. Gennari K, Brunner J, Brodbeck U. Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and number of active sites. *J Neurochem* 1987;49:12-8.
 27. Massoulié J, Bon S. The molecular form of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann Rev Neurosci* 1982;5:57-106.
 28. Massoulié J, Bonn S, Perrier N, Falasca C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact* 2005;157-158:3-14.
 29. Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Zilker T, Worek F. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact* 2005;157-158:345-7.
 30. Thiermann H, Szinicz L, Eyer P, Felgenhauer N, Zilker T, Worek F. Lessons to be learnt from organophosphorus pesticide poisoning for the treatment of nerve agent poisoning. *Toxicology* 2007;233:145-54.
 31. Reiner E, Šinko G, Škrinjarić-Špoljar M, Simeon-Rudolf V. Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000;51:13-8.
 32. Thiermann H, Mast U, Klimmek R, Eyer P, Hibler A, Pfab R, Felgenhauer N, Zilker T. Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients. *Hum Exp Toxicol* 1997;16:473-80.
 33. Velan B, Kronman C, Ordentlich A, Flashner Y, Leitner M, Cohen S, Shafferman A. N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem J* 1993;296:649-56.
 34. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 1987;262:549-57.
 35. Jensen FS, Schwartz M, Viby-Mogensen J. Identification of human plasma cholinesterase variants using molecular biological techniques. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;39:142-9.
 36. La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lightstone H, Van der Spek A, Lockridge O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin Biochem* 1990;23:423-31.
 37. Primo-Parro SL, Bartels CF, Wiersema B, Van der Spek AFL, Innis JW, La Du BN. Characterisation of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene. *Am J Hum Genet* 1996;58:52-64.
 38. Simeon-Rudolf V, Evans RT. Interlaboratory study into proficiency of attribution of human serum butyrylcholinesterase phenotypes: Reference values of activities and inhibitor numbers. *Acta Pharm* 2001;51:289-96.
 39. Kovarik Z, Simeon-Rudolf V. An improvement in segregation of human butyrylcholinesterase phenotypes having the

- fluoride-resistant variants. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003;54:239-44.
40. Gätke MR, Bundgaard JR, Viby-Mogensen J. Two novel mutations in the BCHE gene in patients with prolonged duration of action of mivacurium or succinylcholine during anaesthesia. *Pharmacogenet Genom* 2007;17:995-9.
 41. Podoly E, Shalev DE, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett ER, Assayag EB, Wilgus H, Livnah O, Soreq H. The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *J Biol Chem* 2009;284:17170-9.
 42. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Tokar L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253:872-9.
 43. Kryger G, Harel M, Giles K, Tokar L, Velan B, Lazar A, Kronman C, Barak D, Ariel N, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr Sect D* 2000;56:1385-94.
 44. Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Prot Sci* 1993;2:366-82.
 45. Taylor P, Radić Z, Hosea NA, Camp S, Marchot P, Berman HA. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol Lett* 1995;82-83:453-8.
 46. Saxena A, Redman AMG, Jiang X, Lockridge O, Doctor BP. Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Chem Biol Interact* 1999;119-120:61-9.
 47. Saxena A, Ashani Y, Raveh L, Stevenson D, Patel T, Doctor BP. Role of oligosaccharides in the pharmacokinetics of tissue-derived and genetically engineered cholinesterases. *Mol Pharmacol* 1998;53:112-22.
 48. Nachon F, Nicolet Y, Viguiera N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: Expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem* 2002;269:630-7.
 49. Kolarich D, Weber A, Pabst M, Stadlmann J, Teschner W, Ehrlich H, Schwarz H-P, Altmann F. Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma. *Proteomics* 2008;8:254-63.
 50. Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 2003;278:41141-7.
 51. Bourne Y, Taylor P, Bougis PB, Marchot P. Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. *J Biol Chem* 1999;274:2963-70.
 52. Nachon F, Masson P, Nicolet Y, Lockridge O, Fontecilla-Camps JC. Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. U: Giacobini E, urednik. *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2003. str. 39.
 53. Ordentlich A, Kronman C, Barak D, Stein D, Ariel N, Marcus D, Velan B, Shafferman A. Engineering resistance to aging of phosphorylated human acetylcholinesterase - Role of hydrogen bond network in the active center. *FEBS Lett* 1993;334:215-20.
 54. Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Stein D, Ariel N, Velan B. Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. *Bichem J* 1996;318:833-40.
 55. Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, Ariel N, Cohen S, Velan B, Shafferman A. Dissection of the human acetylcholinesterase active centre determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem* 1993;268:17083-95.
 56. Radić Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* 1993;32:12074-84.
 57. Goličnik M, Šinko G, Simeon-Rudolf V, Grubič Z, Stojan J. Kinetic model of ethropropazine interaction with horse serum butyrylcholinesterase and its docking into the active site. *Arch Biochem Biophys* 2002;398:23-31.
 58. Harel M, Sussman JL, Krejci E, Bon S, Chanal P, Massoulié P. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase, modelling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10827-31.
 59. Radić Z, Reiner E, Taylor P. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Mol Pharmacol* 1991;39:98-104.
 60. McGuire MC, Nogueira CP, Bartels CF, Lightstone H, Hajra A, Van der Speck AF, Lockridge O, La Du BN. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum butyrylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:953-7.
 61. Masson P, Froment M-T, Bartels CF, Lockridge O. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem* 1996;235:36-48.
 62. Chambers J, Patricia EL. *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. New York (NY): Academic Press, Inc.; 1992.
 63. Jokanović M, Stojiljković MP. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *Eur J Pharmacol* 2006;553:10-7.
 64. Taylor P, Kovarik Z, Reiner E, Radić Z. Acetylcholinesterase: converting a vulnerable target to a template for antidotes and detection of inhibitor exposure. *Toxicology* 2007;233:70-8.
 65. Lenz DE, Yeung D, Smith JR, Sweeney RE, Lumley LA, Cerasoli DM. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology* 2007;233:31-9.
 66. Maxwell DM, Saxena A, Gordon RK, Doctor BP. Improvements in scavenger protection against organophosphorus agents by modification of cholinesterases. *Chem Biol Interact* 1999;119-120:419-28.
 67. Holmstedt B. *Cholinesterase inhibitors: an introduction*. U: Giacobini E, urednik. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 1-8.
 68. Giacobini E. *Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to the Alzheimer therapy*. U: Giacobini E, urednik. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 181-227.
 69. Katalinić M, Rusak G, Domaćinović Barović J, Šinko G, Jelić D, Antolović R, Kovarik Z. Structural aspects of

- flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase. *Eur J Med Chem* 2010;45:186-92.
70. Reiner E, Radić Z. Mechanism of action of cholinesterase inhibitor. U: Giacobini E. urednik. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 103-20.
71. Ripoll DR, Faerman CH, Sussman JL. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5128-32.
72. Yoshida A, Motulsky AG. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. *Am J Hum Genet* 1969;21:486-98.
73. Lewis WG, Green LG, Grynszpan F, Radić Z, Carlier PR, Taylor P, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew Chem Int Ed* 2002;41:1053-7.
74. Krasinski A, Radić Z, Manetsch R, Raushel J, Taylor P, Sharpless KB, Kolb HC. In situ selection of lead compounds by click chemistry: target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *J Am Chem Soc* 2005;127:6686-92.
75. Brufani M, Filocamo L. Rational design of cholinesterase inhibitors. U: Giacobini E. urednik. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. London: Martin Dunitz Ltd.; 2000. str. 27-46.
76. Bosak A. Organofosforni spojevi: klasifikacija i reakcije s enzimima. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006;57:445-57.
77. Worek F, Thiermann H, Szinicz L, Eyer P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2237-48.
78. Tunek A, Svensson LA. Bambuterol, a carbamate ester prodrug of terbutalin, as inhibitor of cholinesterase in human blood. *Drug Metab Dispos* 1988;16:759-64.
79. Kovarik Z, Simeon-Rudolf V. Interaction of human butyrylcholinesterase variants with bambuterol and terbutaline. *J Enzym Inhib Med Chem* 2004;19:113-7.
80. Sitar DS. Clinical pharmacokinetics of bambuterol. *Clin Pharmacokinet* 1996;31:246-56.
81. Nyberg L, Rosenborg J, Weibull E, Jönsson S, Kennedy BM, Nilsson M. Pharmacokinetics of bambuterol in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:471-8.
82. Eto M. Organic and biological chemistry. U: Zweig G, urednik. The organophosphorus pesticides. Cleveland (OH): CRC Press Inc.; 1976. str. 142.
83. Pope C, Karanth S, Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of common mechanism of action. *Environ Toxicol Pharmacol* 2005;19:433-6.
84. Costa LG. Current issue in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 2006;366:1-13.
85. Popis aktivnih tvari dopuštenih za uporabu u sredstvima za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj. *Narodne novine* 80/2008.
86. Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol Rev* 2003;22:165-90.
87. Wiener SW, Hoffman RS. Nerve agents: A comprehensive review. *J Intensive Care Med* 2004;19:22-37.
88. Delfino RT, Ribeiro TS, Figueroa-Villar JD. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *J Braz Chem Soc* 2009;20:407-28.
89. Kovarik Z, Radić Z, Grgas B, Škrinjarić-Špoljar M, Reiner E, Simeon-Rudolf V. Amino acid residues involved in the interaction of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with the carbamates Ro 02-0683 and bambuterol, and with terbutaline. *BBA - Protein Struct Mol Enzymol* 1999;1433:261-71.
90. Reiner E, Bosak A, Simeon-Rudolf V. Activity of cholinesterases in human whole blood measured with acetylthiocholine as substrate and ethopropazine as selective inhibitor of plasma butyrylcholinesterase. *Arh Hig Rada Toksikol* 2004;55:1-4.
91. Kovarik Z, Simeon-Rudolf V. An improvement in segregation of human butyrylcholinesterase phenotypes having the fluoride-resistant variants. *Arh Hig Rada Toksikol* 2003;54:239-44.
92. Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook. 5. izd. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2004.
93. Shafferman A, Barak D, Stein D, Kronman C, Velan B, Greig NG, Ordentlich A. Flexibility versus "rigidity" of the functional architecture of AChE active center. *Chem Biol Interact* 2008;175:166-72.
94. Barak D, Ordentlich A, Stein D, Yu Q-S, Greig NH, Shafferman A. Accommodation of physostigmine and its analogues by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem J* 2009;417:213-22.
95. Šinko G, Radić Z, Taylor P, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Kinetics of interaction of ethopropazine enantiomers with butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. U: Fisher A, Silman I, Soreq H, Anglister L, Michaelson DM, urednici. Proceedings of the XIth ISCM, Cholinergic Mechanisms: Function and Dysfunction; London: & Taylor Francis; 2004. str. 705-6.
96. Gazić I, Bosak A, Šinko G, Vinković V, Kovarik. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Anal Bioanal Chem* 2006;385:1513-9.
97. Bosak A, Gazić I, Vinković V. Stereoselective inhibition of human, mouse, and horse cholinesterases by bambuterol enantiomers. *Chem Biol Interact* 2008;175:192-5.
98. Taylor P, Hosea NA, Tsigelny I, Radić Z, Berman HA. Determining ligand orientation and transphosphorylation mechanisms on acetylcholinesterase by R_p, S_p enantiomer selectivity and site-specific mutagenesis. *Enantiomer* 1997;2:249-60.
99. Hosea NA, Berman HA, Taylor P. Specificity and orientations of trigonal carboxyl esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases. *Biochemistry* 1995;34:11528-36.
100. Bosak A, Primožič I, Oršulić M, Tomić S, Simeon-Rudolf V. Enantiomers of quinuclidin-3-ol derivatives: Resolution and interactions with human cholinesterases. *Croat Chem Acta* 2005;78:121-8.
101. Šinko G. Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih biološki aktivnih enantiomera. *Arh Hig Rada Toksikol* 2005;56:351-61.
102. RCSB Protein Data Bank [pristup 26. studenoga 2010.]. Dostupno na <http://www.pdb.org>.

103. ESTHER Database [pristup 26. studenoga 2010.]. Dostupno na <http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>.
104. Ekström FJ, Astot C, Pang Y-P. Novel nerve-agent antidote design based on crystallographic and mass spectrometric analyses of tabun-conjugated acetylcholinesterase in complex with antidotes. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:282-93.
105. Ekström FJ, Pang Y-P, Boman M, Artursson E, Akfur C, Börjegen S. Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, Ortho-7 and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem Pharmacol* 2006;72:597-607.
106. Lushington GH, Guo J-X, Hurley MM. Acetylcholinesterase reprised: Molecular modeling with the whole toolkit. *Front Med Chem* 2010;5:423-56.
107. Bartolucci C, Perola E, Cellai L, Brufani M, Lamba D. "Back door" opening implied by the crystal structure of a carbamoylated acetylcholinesterase. *Biochemistry* 1999;38:5714-9.
108. Alisaraie L, Fels G. Molecular docking study on the "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase. *J Mol Model* 2006;12:348-54.
109. Kovarik Z, Radić Z, Taylor P. Site-directed mutagenesis of acetylcholinesterase – a tool for studying structure/function relationship. *Period Biol* 2004;106:289-94.
110. Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P. Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates. *Biochemistry* 2004;43:3222-9.
111. Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Taylor P. Mutation of acetylcholinesterase to enhance oxime-assisted catalytic turnover of methylphosphonates. *Toxicology* 2007;233:79-84.
112. Saxena A, Maxwell DM, Quinn DM, Radić Z, Taylor P, Doctor BP. Mutant acetylcholinesterases as potential detoxification agents for organophosphate poisoning. *Biochem Pharmacol* 1997;54:269-74.
113. Gibney G, Camp S, Dionne M, MacPhee-Quigley K, Taylor P. Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7546-50.
114. Bosak A, Gazić I, Vinković V, Kovarik Z. Aminoacids residues involved in stereoselective inhibition of cholinesterases with bambuterol. *Arch Biochem Biophys* 2008;471:72-6.
115. Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner V, Taylor P. Acetylcholinesterase active center and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem J* 2003;373:33-40.
116. Masson P, Nachon F, Broomfield CA, Lenz DE, Verdier L, Schopfer LM, Lockridge O. A collaborative endeavour to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chem Biol Interact* 2008;175:273-80.
117. Kovarik Z, Lucić Vrdoljak A, Berend S, Katalinić M, Kuča K, Musilek K, Radić B. Evaluation of oxime K203 as antidote in tabun poisoning. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009;60:19-26.
118. Stojiljković MP, Jakanović M. Pyridinium oximes: rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006;57:435-43.
119. Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase: Determination of dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol* 1957;35:339-46.
120. Harris H, Whittaker M. differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: Recognition of new phenotypes. *Nature* 1961;191:3898-904.
121. Nogueira CP, Bartels CF, McGuire MC, Adkins S, Lubrano T, Rubinstein HM, Lightstone H, Van der Speck AF, Lockridge O, La Du BN. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am J Hum Gen* 1992;51:821-8.
122. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J Mol Genet* 1978;15:27-9.
123. Bartels CF, Jensen FS, Lockridge O, Van der Speck AFL, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN. 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.
124. Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T, Garry PJ. E1J, a quantitative variant at cholinesterase locus1: Immunological evidence. *J Med Genet* 1976;13:43-5.
125. Bartels CF, James K, La Du BN. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am J Hum Genet* 1992;50:1104-14.
126. Whittaker M, Britten JJ. Plasma cholinesterase variants. Family studies of the E1K gene. *Hum Hered* 1985;35:364-8.
127. Jensen FS, Bartels CF, La Du BN. Cholinesterases: structure, function, genetics, and cell biology. U: Massoulie J, Bacon F, Bernard E, Chatonnet A, Doctor BP, Quinn DM, urednici. Washington (DC): American Chemical Society; 1992.
128. Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Kotani K, Dey DC, Ishikawa J, Izumi M, Etoh K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin Chim Acta* 1995;235:41-57.
129. Harris H, Whittaker M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of new phenotypes. *Nature* 1986;191:3898-904.

Summary

CHOLINESTERASES: STRUCTURE, ROLE, AND INHIBITION

Enzymes acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; E.C. 3.1.1.8) have intensively been investigated in biomedicine and toxicology due to important role in organisms. Even if structurally homologous, they differ in catalytic activity, specificity, for substrates, and selectivity in binding to many ligands. This paper compiles the results of research on cholinesterases and their interactions with ligands and inhibitors, and identifies amino acids of active sites involved in these interactions.

KEY WORDS: *acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibitors, selectivity, stereoselectivity*

CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. sc. Maja Katalinić
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2
HR-10000 Zagreb, Croatia
E-mail: mkatalinic@imi.hr