STUDIES ON NATURAL INHIBITORY PHYTO-METABOLITES TARGETING ACETYLCHOLINESTERASE FOR ALZHEIMER'S TREATMENT

GOURAV CHOUDHIR

CENTER FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

SEPTEMBER 2023

STUDIES ON NATURAL INHIBITORY PHYTO-METABOLITES TARGETING ACETYLCHOLINESTERASE FOR ALZHEIMER'S TREATMENT

by

GOURAV CHOUDHIR

Center for Rural Development and Technology

Submitted

In fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

SEPTEMBER 2023

Dedicated to my parents, friends, and seniors.

Certificate

This is to certify that the thesis entitled " **Studies on Natural Inhibitory Phyto-metabolites Targeting Acetylcholinesterase for Alzheimer's Treatment**" being submitted by **Mr. Gourav Choudhir** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of "Doctor of Philosophy" is a record of bonafide research work carried out by him. He has worked under our guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of this thesis. To the best of our knowledge, the results contained in this thesis have not been submitted in part or full to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

Satyawati

(Hariprasad P.) **(Satyawati Sharma)**

Associate Professor **Professor**

Centre for Rural Development and Technology,

Indian Institute of Technology Delhi,

Hauz Khas, New Delhi

110016

Acknowledgments

The past five years of my Ph.D. journey have been a whirlwind of intense emotions, a maze of experiments, lab meetings, conferences, and countless deadlines. As I reflect on this journey, I realize that a Ph.D. is more than just a scientific degree. It has transformed me into a focused and resilient individual, ready to take on life's challenges.

On this occasion, I want to express my heartfelt gratitude to all the people who played a role, knowingly or unknowingly, in helping me complete my Ph.D. First and foremost, I am deeply thankful to my Ph.D. supervisors, Prof. Hariprasad P. and Prof. Satyawati Sharma, for their unwavering support and guidance. Their mentorship has shaped my scientific skills and instilled in me the courage to face both successes and failures with optimism. I am grateful to Prof. P. M. V. Subbarao and the predecessors at the Centre of Rural Development and Technology (CRDT) for providing the necessary facilities for our research.

My sincere thanks to the members of my student research committee, Prof. Anushree Malik, Prof. Shivajirao L. Gholap, Prof. Kavya Dashora, and CRC convenor Prof. Ram Chandra and CRC chair Prof. VM Chariar, for their valuable time, thoughtful support, and insightful remarks.

I want to acknowledge the contribution of my teachers, Prof. Y. Vimala, Prof. PK Gupta, Prof. Vijai Malik, Brajendra Kumar, Prof. Pravindra Kumar, Prof. Debabrata Sircar, Prof. Kiran Ambatipudi, Prof. N. Karur, Gaurav Mishra, Prof. Chinmay Hazra, and Prof. Tarak Karmakar.

My heartfelt gratitude goes to the Indian Council of Medical Research (ICMR) for granting me the research fellowship as a Junior Research Fellow (JRF) and Senior Research Fellow (SRF). This fellowship has been crucial in supporting my research and academic pursuits in improving human health. I also extend my thanks to Mohammad Iliyas for his invaluable support and mentorship throughout my journey.

I cherish the camaraderie with all my labmates, who have made this doctoral journey enjoyable and stress-relieving. Thank you to Ms. Leena, Ms. Shazia, and Mr. Kapil for their constant help. I am grateful to Dr. Supreet, Dr. Ayushman, Dr. Pratibha, Dr. Vasanth, and all others who supported me and fostered a positive lab culture.

I extend my appreciation to Dr. Durai, Ms. Ambika, Ms. Anjali, Ms. Bhani, Mr. Ajay, Mrs. Monu, Ms. Priyanka, Ms. Shivangi, Ms. Lemnrao, and Ms. Jaya for their ongoing support and excellent camaraderie. Thanks also to Mrs. Pratibha and Mr. Hridya Ram for their help beyond lab work.

My humble appreciation to Dr. Sushil Kumar, Dr. Upendra Kumar, Dr. Pusphendra, Dr. Sanjay Kumar, Dr. Anuj Kumar, Dr. Garima, Dr. Nidhi, and Dr. Krishankant for their support.

A special mention goes to Dr. Anu Dalal for providing beautiful words of motivation during my final years. I am grateful to Mr. Tushar Kushwaha and Mr. Vikas Rana for being my stress busters and lending their helping hands.

I want to acknowledge my colleagues, Mr. Ashish Dhillon, and Mr. Abhay Tiwari, for their guidance and support. My heartfelt thanks to my friends Dr. Mukund, Dr. Jai Krishna, Dr. Akshay, Dr. Virendra, Anand, Pooja, Upanshu, Arvind, Sajjan, Ruchi, Soumya, Ankit, Vikas, Hemant, Satendra, Himanshu, Amit, Vikas, Rohit, Akanksha, Abhishek, and Lahur for their constant encouragement and affection.

Thanks to the hostel staff, Mr. Lokesh K. Saini, and Mr. Nitish Kumar, for their continuous cooperation.

Lastly, my family, friends, and relatives deserve my utmost gratitude. Their unwavering love and support have made my journey worthwhile. I am forever indebted to my parents and brother for always being there for me, encouraging me with smiles, and lifting me during tough times. And I am deeply grateful to the all-powerful God, my source of inner wisdom.

With heartfelt appreciation,
Gourav Choudhir

Abstract

More than 55 million people are suffering from dementia globally. According to estimates, 139 million people will be affected by 2050. Alzheimer's disease (AD) is a form of dementia that affects the brain's structure and function. It is a multi-factorial disease characterized by the dregs of ß-amyloid that appear in the form of disks and hyper-phosphorylated tau protein that emerges as neurofibrillary tangles in the brain. Acetylcholinesterase is a vital enzyme of the CNS and PNS; it terminates nerve signals by the hydrolysis of acetylcholine. Reduction of acetylcholinesterase activity with the aid of inhibitors has been a reliable target for Alzheimer's therapy. Commonly used cholinesterase inhibitors mediated treatment of diseases has its limitations along with several side-effects. Therefore, the discovery of AD therapy is an urgent need and a significant area of interest. Natural compounds are comparatively safer than molecules of synthetic origin. The study aimed to identify some selected medicinal plants with acetylcholinesterase inhibitory potential using *in silico* and experimental analysis.

In objective I I have explored the inhibition potential of sixty-one samples of 58 plant species collected from different regions of India and subjected to the acetylcholinesterase inhibition assay. Among 366 extracts, 40 extracts belonging to 18 plant species were found to inhibit acetylcholinesterase activity by 50 % or more. *Cyperus rotundus* rhizome extract in acetone (0.5mg/ml) exhibited the lowest IC_{50} values, followed by *Terminalia arjuna* bark extract in methanol (0.95 mg/ml), and *Acacia catechu* stems extract in water (0.95 mg/ml). This study does not provide information about the nature of inhibition by the PSMs (plant secondary metabolites).

In objective II *in-silico* analysis of plant secondary metabolites obtained from the positive plants. *in-silico* analysis revealed the drug-likeliness of plant secondary metabolites and their binding affinity with acetylcholinesterase using molecular docking and molecular dynamic simulation. Plant secondary metabolites library was prepared using a literature survey and in-silico analysis of ADMET analysis 73 PSMs qualified the required parameters and were taken for further studies. These 73 with the four standard drug compounds were screened for site-specific docking by using AutoDock Vina. The top 12 compounds with binding energy less than -8.1 kcal/mol, standard drugs, and substrate were subjected to MD simulation for 50 ns. The molecular dynamics simulation studies revealed that RMSD of the backbone showed the stability of protein-PSMs, and protein-drug molecules manifested the stability throughout

the simulation time. Additionally, parameters such as RMSF, Rg, and SASA were also found to wave less during the simulation time. Hydrogen bond number, hydrogen bond distribution, and hydrogen bond occupancy showed that protein interacted with PSMs and drug molecules throughout the simulation time and occupied with crucial amino acid residues that play vital roles in the catalytic activity.

In objective III, I have explored the permeability of acetylcholinesterase inhibitory drug and plant secondary metabolites showed promising binding affinity with the lipid bilayer membranes. Understanding of the permeability and interaction of PSMs and drugs with DOPC and POPC lipid bilayer using molecular dynamics simulation and meta-dynamics studies. These studies revealed that PSMs and drugs have differential permeability in the different membranes due to their structural diversity and DOPC and POPC membrane differences. Different analyses such as order parameters dipole movement, showed that the PSMs and drug molecules did not affect membrane integrity. The free energy barrier showed all PSMs, and drug molecules showed the free energy barrier below 100 kJ/mol expected acetylcholine. The free energy barrier analysis revealed high probability of drugs crossing the membrane. The structural diversity of drugs has a big impact on the drug permeability through the membrane. the *in-vitro* study can provide a more precise understanding of membrane permeability.

In objective IV based on the results of the above three objectives, rhizome extracts of *Cyperus rotundus* were selected for further studies. The LC-MS metabolomics of *Cyperus rotundus* PSMs based chemometrics analysis and their antioxidant activities. Chemometrics analysis and antioxidant activities showed that the acetone extract of *Cyperus rotundus* has more concentrated PSMs and is rich in antioxidant activity. Further chromatographic and enzyme kinetics experiments were performed to understand the enzyme inhibition and constant mechanism. The Acetone extract of *Cyperus rotundas* showed the un-competitive type of inhibition fractions 12^{th} and 14^{th} showed the mixed types of inhibitions. The 13^{th} fraction showed the non-competitive type of inhibition. Fractions 15^{th}, $16^{th,}$ and 17^{th} showed the un-competitive type of inhibition. Mechanisms of inhibition in mixtures of bioactive compounds were found due to the dominance of specific compounds. Further studies, such as *in vitro* and *in vivo* tests with purified bioactive compounds and toxicological studies, are needed to completely accept *Cyperus rotundus* as a source of natural drug molecules.

शोध सारांश

विश्व स्तर पर 55 मिलियन से अधिक लोग डिमेंशिया से पीड़ित हैं। अनुमान के मुताबिक, 2050 तक 139 मिलियन लोग प्रभावित होंगे। अल्जाइमर रोग (एडी) डिमेंशिया का एक रूप है जो मस्तिष्क की संरचना और कार्य दोनों को प्रभावित करता है। यह एक बहु-तथ्यात्मक रोग है जो डिस्क के रूप में प्रकट होने वाले ß-amyloid के मैल और मस्तिष्क में न्यूरोफाइब्रिलरी टेंगल्स के रूप में उभरने वाले हाइपर-फॉस्फोराइलेटेड ताऊ प्रोटीन की विशेषता है। एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ सीएनएस और पीएनएस का एक महत्वपूर्ण एंजाइम है; यह एसिटाइलकोलाइन के हाइड्रोलिसिस द्वारा तंत्रिका संकेतों को समाप्त करता है। अवरोधकों की सहायता से एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ गतिविधि को कम करना अल्जाइमर के उपचार के लिए एक विश्वसनीय लक्ष्य रहा है। आमतौर पर इस्तेमाल किए जाने वाले कोलेलिनेस्टरेज़ इनहिबिटर्स की मध्यस्थता से रोगों के उपचार की अपनी सीमाएँ हैं, साथ ही कई दुष्प्रभाव भी हैं। इसलिए, एडी थेरेपी की खोज एक तत्काल आवश्यकता और रुचि का एक महत्वपूर्ण क्षेत्र है। सिंथेटिक उत्पत्ति के अणुओं की तुलना में प्राकृतिक यौगिक तुलनात्मक रूप से सुरक्षित हैं। अध्ययन का उद्देश्य सिलिको और प्रयोगात्मक विश्लेषण में एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ निरोधात्मक क्षमता वाले कुछ चयनित औषधीय पौधों की पहचान करना है।

उद्देश्य I मैंने भारत के विभिन्न क्षेत्रों से एकत्र किए गए 58 पौधों की प्रजातियों के इकसठ नमूनों की निरोधात्मक क्षमता का पता लगाया है और एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ निषेध परख के अधीन है। 366 अर्क में से, 18 पौधों की प्रजातियों से संबंधित 40 अर्क एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ गतिविधि को 50% या उससे अधिक बाधित करने के लिए पाए गए। एसीटोन (0.5mg/ml) में साइपरस रोटंडस राइजोम एक्सट्रैक्ट ने सबसे कम IC_{50} मान प्रदर्शित किया, इसके बाद मेथनॉल में टर्मिनलिया अर्जुन बार्क एक्सट्रैक्ट (0.95 mg/ml), और पानी में

बबूल केचु के तने का अर्क (0.95 mg/ml) था। यह अध्ययन PSMs (प्लांट सेकेंडरी मेटाबोलाइट्स) द्वारा निषेध की प्रकृति के बारे में जानकारी प्रदान नहीं करता है।

सकारात्मक पौधों से प्राप्त पादप द्वितीयक चयापचयों के वस्तुनिष्ठ II इन-सिलिको विश्लेषण में। इन-सिलिको विश्लेषण से पता चला है कि आणविक डॉकिंग और आणविक गतिशील सिमुलेशन का उपयोग करके एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ के साथ पौधे माध्यमिक मेटाबोलाइट्स की दवा संभावना और उनके बाध्यकारी संबंध। प्लांट सेकेंडरी मेटाबोलाइट्स लाइब्रेरी को एक साहित्य सर्वेक्षण और एडीएमईटी विश्लेषण के इन-सिलिको विश्लेषण का उपयोग करके तैयार किया गया था 73 पीएसएम ने आवश्यक मापदंडों को योग्य बनाया और आगे के अध्ययन के लिए लिया गया। चार मानक दवाओं के यौगिकों के साथ इन 73 को ऑटोडॉक वीना का उपयोग करके साइट-विशिष्ट डॉकिंग के लिए जांचा गया। -8.1 किलो कैलोरी/मोल से कम बाध्यकारी ऊर्जा वाले शीर्ष 12 यौगिकों, मानक दवाओं और सब्सट्रेट को 50 एनएस के लिए एमडी सिमुलेशन के अधीन किया गया था। आणविक गतिशीलता सिमुलेशन अध्ययनों से पता चला है कि रीढ़ की हड्डी के आरएमएसडी ने प्रोटीन-पीएसएम की स्थिरता को दिखाया, और प्रोटीन-दवा के अणुओं ने पूरे सिमुलेशन समय में स्थिरता प्रकट की। इसके अतिरिक्त, सिमुलेशन समय के दौरान आरएमएसएफ, आरजी और एसएएसए जैसे पैरामीटर भी कम तरंग पाए गए। हाइड्रोजन बॉन्ड नंबर, हाइड्रोजन बॉन्ड डिस्ट्रीब्यूशन और हाइड्रोजन बॉन्ड ऑक्यूपेंसी ने दिखाया कि प्रोटीन ने सिमुलेशन समय के दौरान पीएसएम और दवा के अणुओं के साथ बातचीत की और महत्वपूर्ण अमीनो एसिड अवशेषों के साथ कब्जा कर लिया जो उत्प्रेरक गतिविधि में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं।

ऑब्जेक्टिव III में, हमने एसिटाइलकोलिनेस्टरेज़ निरोधात्मक दवा की पारगम्यता का पता लगाया है और प्लांट सेकेंडरी मेटाबोलाइट्स ने लिपिड बाइलेयर मेम्ब्रेन के साथ आशाजनक बंधन संबंध दिखाया है। आणविक गतिशीलता सिमुलेशन और मेटा-गतिशील अध्ययनों का

उपयोग करके डीओपीसी और पीओपीसी लिपिड बाइलेयर के साथ पीएसएम और दवाओं की पारगम्यता और बातचीत की समझ। इन अध्ययनों से पता चला है कि पीएसएम और दवाओं की संरचनात्मक विविधता और डीओपीसी और पीओपीसी झिल्ली के अंतर के कारण विभिन्न झिल्लियों में अंतर पारगम्यता है। अलग-अलग विश्लेषण जैसे ऑर्डर पैरामीटर द्विध्रुवीय आंदोलन, ने दिखाया कि पीएसएम और दवा के अणुओं ने झिल्ली अखंडता को प्रभावित नहीं किया। मुक्त ऊर्जा बाधा ने सभी पीएसएम दिखाए, और दवा के अणुओं ने 100 kJ/mol अपेक्षित एसिटाइलकोलाइन के नीचे मुक्त ऊर्जा अवरोध दिखाया। नि: शुल्क ऊर्जा बाधा विश्लेषण ने झिल्ली को पार करने वाली दवाओं की उच्च संभावना का खुलासा किया। झिल्ली के माध्यम से दवा की पारगम्यता पर दवाओं की संरचनात्मक विविधता का बड़ा प्रभाव पड़ता है। इन-विट्रो अध्ययन झिल्ली पारगम्यता की अधिक सटीक समझ प्रदान कर सकता है।

उद्देश्य में IV उपरोक्त तीन उद्देश्यों के परिणामों के आधार पर, आगे के अध्ययन के लिए साइपरस रोटंडस के प्रकंद अर्क का चयन किया गया। साइपरस रोटंडस पीएसएम आधारित केमोमेट्रिक्स विश्लेषण और उनकी एंटीऑक्सीडेंट गतिविधियों के एलसी-एमएस मेटाबोलॉमिक्स। केमोमेट्रिक्स विश्लेषण और एंटीऑक्सीडेंट गतिविधियों से पता चला है कि साइपरस रोटंडस के एसीटोन निकालने में अधिक केंद्रित पीएसएम हैं और एंटीऑक्सीडेंट गतिविधि में समृद्ध है। आगे क्रोमैटोग्राफिक और एंजाइम कैनेटीक्स प्रयोग एंजाइम निषेध और निरंतर तंत्र को समझने के लिए किए गए थे। साइपरस रोटंडस के एसीटोन के अर्क ने गैर-प्रतिस्पर्धी प्रकार के निषेध अंशों को दिखाया 12 वीं और 14 वीं ने मिश्रित प्रकार के अवरोधों को दिखाया। 13वें अंश ने गैर-प्रतिस्पर्धी प्रकार के अवरोध को दिखाया। 15वें, 16वें और 17वें अंशों ने अन-कॉम्प दिखाया|

Table of Contents

List of Figures

List of Tables

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyl cholinesterase
ACh	Acetylcholine
FDA	Food and Drug Administration
IC	Inhibitory concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
VWE	Van der Waals energy
EE	Electrostatic energy
PSE	Polar solvation energy
MD	Molecular dynamic
Kcal	Kilocalorie
KJ	Kilo joule
ADME/T	Absorption Distribution Metabolism Excretion Toxicity
µg	Microgram
ml	Microliter
PSM	Plant secondary metabolite
MMPBSA	Molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area
SDF	Structure Data File
PDB	Protein databank file
2D	2 dimension
3D	3 dimension
RMSD	Root mean square deviation
RMSF	Root mean square fluctuation
Rg	Radius of gyration
SASA	Solvent accessible surface area
HBO	Hydrogen bond occupancy
ns	nano second
nm	nano meter

BAS	Bioavailability score
LUMO	Lower unoccupied molecular orbital
HOMO	Highest occupied molecular orbital
QM	Quantum mechanics
DFT	Density functional theory
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PME	Particle Mesh Ewald
NVT	Constant Number of atoms, Volume, and Temperature
NPT	Constant Number of atoms, Pressure, and Temperature