

## Závěrečná zpráva projektu specifického výzkumu zakázka č. 2107

**Název projektu: Vývoj insekticidů inhibujících acetylcholinesterasu**

### Specifikace řešitelského týmu

Odpovědný řešitel: Mgr. Veronika Hrabcová

Studenti doktorského studia na UHK: Mgr. Veronika Hrabcová

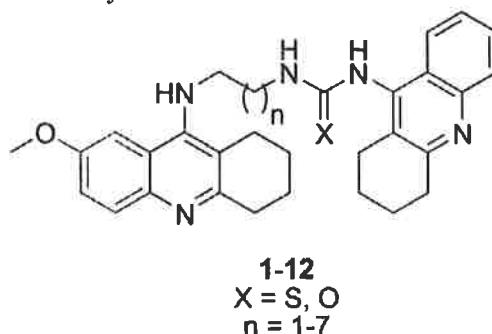
Studenti magisterského studia na PŘF UHK:

Další výzkumní pracovníci: prof. Ing. Kamil Kuča, Ph.D.

**Celková částka přidělené dotace: 111 000 Kč**

### Stručný popis postupu při řešení projektu (max. 2 strany).

V návaznosti na předešlý projekt SV bylo na začátku provedeno hodnocení derivátů takrinu a 7-methoxytakrinu (homodimerní a heterodimerní struktury) a monokvartérních a biskvartérních amoniových solí, odvozených od pyridinu a akridinu. Jejich inhibiční schopnost vůči acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) byla vyjádřena hodnotou  $IC_{50}$ , odpovídající koncentraci látky při které je enzym inhibován právě z 50 %. Látky byly testovány pomocí modifikované Ellmanovy metody. Zdrojem hmyzího enzymu byl homogenát, získaný z hlav mouchy domácí. K porovnání účinku látek na lidskou AChE byl použit enzym, získaný ultracentrifugací z hemolyzovaných erytrocytů. Měření probíhalo paralelně na hmyzím a lidském enzymu. Látky byly testovány v rozmezí koncentrací  $10^{-3}$ - $10^{-10}$  M, každá koncentrace byla změřena v triplicátu. Aktivita enzymu byla určena měřením nárůstu absorbance vzorku při vlnové délce 412 nm a při 37 °C a byla měřena ve dvou minutových intervalech za použití Microplate readeru Synergy 2. Ke statistickému vyhodnocení dat byl využit software Microsoft Excel a GraphPad Prism 5.02 pro Windows. Index selektivity byl vypočítán jako poměr  $IC_{50}$  lidského enzymu k  $IC_{50}$  hmyzí AChE. Hodnoty  $IC_{50}$  byly mezidruhově porovnány a nejselektivnější kandidáti jsou vyznačeni v Tabulka 1. Látka K009 (prekurzor takrinu) dle výsledků vykazuje největší selektivitu k hmyzí AChE, avšak hodnota  $IC_{50}$  leží v mikromolární oblasti. Proto se jeví jako vhodnější potenciální insekticidy sloučeniny 1-10 (obecná struktura viz. Obrázek 1), které mají desetkrát nižší hodnotu  $IC_{50}$  u obou enzymů



Obrázek 1. Obecná struktura látek označených 1-10.

Látka 2 vykazovala nejsilnější inhibiční účinek při nejvyšší mezidruhové selektivitě, a proto by mohla sloužit jako vhodný strukturální motiv pro další vývoj selektivních inhibitorů komáři AChE. Uvedené výsledky byly prezentovány na konferenci ve Španělsku (The 12th International Meeting on Cholinesterases and Sixth International Conference on Paraoxonases).

THA.HCL	234,72	0,32	0,5856	0,546	K223	367,18	37,82	52,89	0,7151
E-CL-THA.HCL	269,17	0,017	1,465	0,012	K229	404,14	<b>0,1377</b>	<b>0,0226</b>	<b>6,0929</b>
7 MEOTA.LAKTÁT	318,37	10	13,83	0,723	K302	586,44	<b>0,0697</b>	<b>0,036</b>	<b>1,9361</b>
K007	271,1	246,1	90,82	2,710	K364	283,2	N.D.	N.D.	
K009	321,16	3,51	0,1087	<b>32,291</b>	K365	372,1	N.D.	N.D.	
K013	222,03	3,977	761,8	0,005	K366	472,22	8,011	14,1	0,5682
K014	222,03	N.D.	N.D.		K412	373,28	5,1	7,396	0,6896
K015	222,03	N.D.	N.D.		K413	490,23	N.D.	693,9	
K016	277,15	346,8	81,99	4,230	K414	472,22	15,78	17,6	0,8966
K017	297,13	N.D.	N.D.		1	715,84	<b>0,1001</b>	<b>0,0436</b>	<b>2,2959</b>
K019	223,02	N.D.	N.D.		2	675,27	<b>0,355</b>	<b>0,014</b>	<b>25,3571</b>
K020	311,16	1092	73,72	14,813	3	659,73	<b>0,3</b>	<b>0,029</b>	<b>10,3448</b>
K021	298,12	993,2	490,9	2,023	4	703,85	<b>0,186</b>	<b>0,049</b>	<b>3,7959</b>
K023	263,12	761,2	AKTIVUJE		5	717,87	0,1261	0,1372	0,9191
K025	264,06	N.D.	N.D.		6	745,93	<b>0,712</b>	<b>0,077</b>	<b>9,2468</b>
K035	298,12	1023	AKTIVUJE		7	687,78	<b>0,073</b>	<b>0,028</b>	<b>2,6071</b>
K036	440,06	841,4	AKTIVUJE		8	729,86	<b>0,193</b>	<b>0,027</b>	<b>7,1481</b>
K037	244,17	N.D.	AKTIVUJE		9	689,82	<b>0,123</b>	<b>0,083</b>	<b>1,4819</b>
K055	422,16	62,59	718,4	0,087	10	731,9	<b>0,294</b>	<b>0,031</b>	<b>9,4839</b>
K056	422,16	519,8	N.D.		11	673,76	<b>0,059</b>	<b>0,031</b>	<b>1,9032</b>
K057	422,16	484,3	N.D.		12	701,81	<b>0,038</b>	<b>0,012</b>	<b>3,1667</b>
K058	279,12	10,18	102,2	0,100	13	655,84	<b>0,519</b>	<b>0,279</b>	<b>1,8602</b>
K080	278,09	N.D.	N.D.		14	612,71	0,521	0,714	0,7297
K143	246,05	711,1	76,25	9,326	15	670,82	1400	N.D.	
K146	264,11	103,9	590,7	0,176	16	612,67	1400	N.D.	
K152	232,02	132,5	583	0,227	17	346,94	0,1	1,153	0,0867
K153	410,11	N.D.	N.D.		18	360,97	0,1	3,655	0,0274
K210	332,03	N.D.	N.D.		19	489,45	0,03	1,032	0,0291
K212	360,09	N.D.	N.D.		20	503,47	0,03	0,5801	0,0517
K215	402,17	145,7	1534	0,0950					

Tabulka 2. Mezi druhové porovnání hodnot IC<sub>50</sub> u hmyzího a lidského enzymu.

Souběžně s testováním látek proběhlo i zahájení produkce rekombinantní AChE1 komára druhu *Anopheles gambiae*. DNA fragment AgAChE1 (Uniprot ID:Q869C3) byl připraven firmou Life Technologies. Pomocí polymerázová řetězová reakce (PCR) byla namnožena templátová DNA. K ohraničení amplifikovaného úseku byly použity oligonukleotidové primery (j910: 5'-GGAATTCACGACAACGATCCGCTG, nukleotidy 702-725 a j911: 5'-ACTCGAGGCTGCTTTCGCACG, reverzně komplementární k nukleotidům 2353-2373) vyrobené firmou Generi Biotech s.r.o. K získání PCR produktů bylo nutné provést teplotní profil reakce a optimalizovat teplotu vzhledem k teplotě tání primerů.

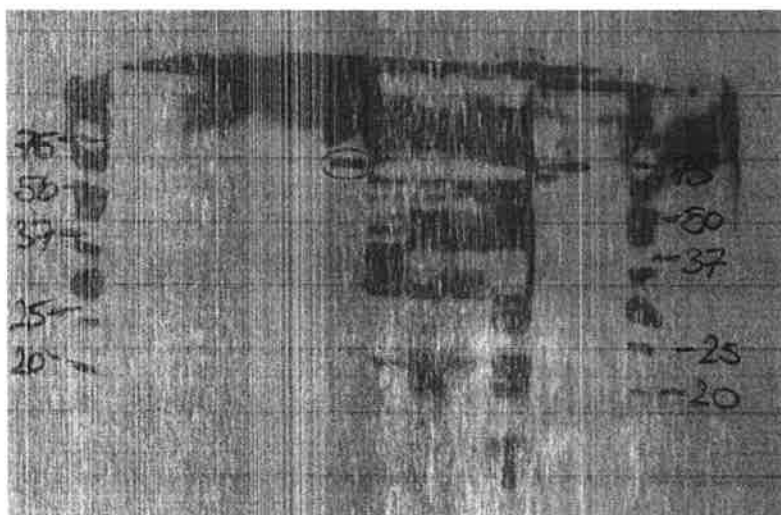
Dalším krokem bylo vložení amplifikované DNA do vektoru pFastBac pomocí Bacto-Bac® C-His TOPO® klonovacího kitu. Pozitivní kolonie byly izolovány, sekvenací potvrzené klony se správně orientovaným cílovým konstruktem byly pomnoženy a uchovány při -80 °C. Verifikovaný konstrukt byl transformován do buněk *E. coli* DH10Bac. Zde došlo ke vzniku rekombinantního bakmidu transpozicí mezi vektorem pFastBac a bakmidem.

Izolace bakmidové DNA proběhla pomocí High pure plasmid isolation Kit (Roche k.č. 11754758001), kdy došlo k zisku plasmidu, bohužel v nízké koncentraci. Plasmid byl pravděpodobně zachycen na SPE kolonce. Dle publikace byla izolace plasmidu optimalizována, s úspěšným zvýšením koncentrace DNA, která byla potvrzena spektrofotometricky. Pro snadnější analýzu proběhlé transpozice byla použita tzv. modrobílá selekce, kdy vyrostlé kolonie nesoucí rekombinantní bakmid jsou bílé.

Následně jsme transfekovali rekombinantní bakmid do hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) za pomoci lipidického činidla Cellfectin II a 1, 2, 3, 4 a 5  $\mu\text{g}$  bakmidové DNA. Po proběhlé infekci byl určen virový titr štoky pomocí plakové eseje, kdy byl supernatant po infekci naředěn desítkovou řadou. Následně jím byl infikován monolayer hmyzích Sf9 buněk, který se převrstvil agarózou s nízkým bodem tání a tuhnutí (tzv. low melting). Inkubace probíhala při 27°C po dobu 7 dnů. Po této době byl odečten počet vytvořených plaků a spočítán titr.

Získaný bakulovirální štok s přesně určeným titrem byl použit k analýze exprese rekombinantního proteinu v High Five™ (*Trichoplusia ni*) buňkách. Pro prvotní analýzu byla zvolena multiplicita infekce 5, což znamená infekci pěti virionů a jednu hmyzí buňku. Exprese probíhala celkem 72 hodin, při 27°C. Jednotlivé odběry buněk byly po 24, 48, 72, 96 hodinách. Buňky byly centrifugovány 10 min při 800 x g, teplotě 4°C. Supernatanty byly přeneseny do nových zkumavek. Supernatanty a pelety určené pro analýzu rekombinantního proteinu byly zmrazeny při -80°C.

Analýza získaného rekombinantního proteinu probíhala pomocí 1D SDS-PAGE a detekce proteinu byla potvrzena na western-blotu imunodetekcí protilátkou Anti-His tag. Pouze v oblasti supernatantu se vyskytuje proužek odpovídající molekulové hmotnosti našeho rekombinantního proteinu, což potvrzuje produkci proteinu infikovanými buňkami do média (Obrázek 2.).



Obrázek 2. Detekce western blotu a anti-His tag protilátkou. Oválem vyznačena oblast s detekovanou rekombinantní AChE.

Následným krokem byla purifikace rekombinantního proteinu ze supernatantu. Získaný supernatant byl dialyzován proti 50 mM Tris-HCl pufru, pH 7,5 12 hodin při 4 °C. Dialyzát byl nanesen na HisLink™ Protein Purification Resin a inkubován 1 hod. ve 4 °C. Eluce proteinu byla provedena 500mM a 750mM imidazolem. Výskyt rekombinantní AChE byl monitorován ve všech mezikrocích purifikace pomocí 1D SDS-PAGE a western-blotem s imunodetekcí protilátkou Anti-His tag. V eluátech s detekovaným proteinem byla pomocí modifikované Ellmanovy reakce prokázána enzymatická aktivita.

### **Splnění cílů řešení a přínos projektu.**

V rámci projektu byl proveden screening cca 60 potenciálních inhibitorů hmyzí AChE. Nejselektivnější inhibitory mohou v budoucnu sloužit jako předlohy pro nové insekticidy cílené na komára druhu *Anopheles gambiae*. Tyto výsledky byly prezentovány na mezinárodní konferenci 12th International Meeting on Cholinesterases - Sixth International

Conference on Paraoxonases konané 27. 9. 2015 v Alicante ve Španělsku. Výsledky testování skupiny látek byly shrnuty v článku s názvem „Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: in vitro screening to find new selective insecticides” (v redakčním řízení). Protože tato data byla v rámci řešení předchozího projektu, je mu publikace dedikována (SV/UHK2109). Další publikace je před dokončením, odeslání manuskriptu do redakce je plánováno na prosinec 2016. Dále se nám podařilo připravit rekombinantní komáří AChE1. Nicméně je ještě nutné provést optimalizaci produkce a purifikace, aby bylo možné získávat enzym ve větším množství, potřebném pro charakterizaci a testování látek. Přínos projektu je velký vezmeme-li v potaz, že onemocnění šířená komáry se řadí z hlediska úmrtnosti celosvětově na přední místa. Schopnost produkovat vlastní rekombinantní enzym nám dává možnost zařadit se mezi špičková vědecká pracoviště zabývající se problematikou selektivních insekticidů.

### Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

Uveďte jen výstupy, které vznikly na základě řešení tohoto projektu. Dále uveďte, zda byly publikace skutečně zadány do OBD s vazbou na RIV.

Tab. 1 Sumář výstupů řešení projektu<sup>1</sup>

Typ výstupu	Plán	Skutečnost	Poznámka (např. vyšlo, přijato, v redakčním řízení apod.)
Počet obhájených dizertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací			
Zařazeno do kategorie excelence			
Jimp - výstup v impaktovaném časopisu	1	2	v redakčním řízení
Jsc -- výstup v databázi Scopus			
Jncimp -- výstup v databázích Scopus a WOS			
Jrec -- výstup v recenzovaném časopisu			
B -- odborná kniha			
C -- kapitola v odborné knize			
D -- článek ve sborníku			
Počet výsledků celkem			

### Podrobné zdůvodnění výdajů a doložení dodatečných žádostí o změnu rozpočtu:

a) **osobní náklady** (mzdy, odměny; odvody na zdravotní, sociální a úrazové pojištění; tvorba sociálního fondu, dohody o provedení práce a dohody o pracovní činnosti) a jejich stručné zdůvodnění,

Nebyly plánovány.

b) **stipendia** a jejich stručné zdůvodnění,  
Stipendia byla čerpána v souladu s plánem. V nákladech na stipendium bylo zahrnuto financování cestovního a nákladů na konferenci (The 12th International Meeting on Cholinesterases and Sixth International Conference on Paraoxonases, Španělsko)

c) **spotřební materiál** (výdaje na pořízení kancelářských potřeb a ostatního spotřebního materiálu) a jejich stručné zdůvodnění

<sup>1</sup> V případě, že vznikly typy výsledků neuvedené v tabulce, přidejte si do ní řádky.

V položce spotřební materiál došlo ke změně čerpání. Byla podána žádost o změnu rozpočtu a nevyužitá peníze z položky služeb byly využity na nákup chemikálií potřebných k realizaci projektu.

- d) **drobný hmotný majetek** a jejich stručné zdůvodnění,  
Nebyl plánován.
- e) **další náklady** a jejich stručné zdůvodnění,  
Další náklady se nevyskytly.
- f) **náklady nebo výdaje na služby** a jejich stručné zdůvodnění,  
Původně plánované výdaje na služby nebyly využity, a proto byla daná částka převedena na pořízení chemikálií.
- g) **doplňkové (režijní) náklady** nebo výdaje v souladu s příslušným řídicím aktem UHK,  
Nebyly plánovány.
- h) **cestovné** a jeho stručné zdůvodnění.  
Nebylo plánováno

Výsledek čerpání finančních prostředků uveďte v jednotné přehledné tabulce 2.

**Tab. 2 Čerpání finančních prostředků v Kč**

Položka	Plán	Žádost o změnu rozpočtu	Skutečnost
Počet členů řešitelského týmu čerpajících mzdové prostředky	0	0	0
Počet studentů čerpajících mzdové prostředky	1	1	1
Stipendia	40 000	38 786,5	38 786,5
DPP, DPC - studenti	0	0	0
Odměny, DPP, DPC - ostatní	0	0	0
Zákonné zdravotní a sociální pojištění	0	0	0
<b>Celkem osobní náklady</b>	<b>40 000</b>	<b>38 786,5</b>	<b>38 787,0</b>
Spotřební materiál	68 000	72 213,5	73 051,10
Drobný hmotný majetek	0	0	0
<b>Materiálové náklady celkem</b>	<b>68 000</b>	<b>72 213,5</b>	<b>73 051,10</b>
<b>Služby celkem</b>	<b>3 000</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Cestovné celkem</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Celkové náklady</b>	<b>111 000</b>	<b>111 000</b>	<b>111 838,10</b>

Ke zprávě přiložte:

- a) kopie publikačních výstupů,
- b) výpis z OBD – výstupy podpořené tímto projektem

Datum: 30. 11. 2016

Podpis odpovědného řešitele

