

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

Příprava mutantní formy komáří acetylcholinesterázy

Bakalářská práce

Autor: Pavlína Fiandová

Studijní program: S16CH045BP, BTOX

Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin

Vedoucí práce: Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2019

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne _____

Pavλίna Fiandová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Monice Schmidt, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za vedení, trpělivost, zájem, připomínky a čas, který mi věnovala.

Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Práce byla podpořena projektem Specifického výzkumu (SV2018-2115).

Anotace

Malárie je infekční onemocnění způsobené parazity prvoků rodu zimnička, které jsou přenášeny komářími (*Anopheles gambiae*) kousnutím. Prevence proti přenosu malárie je založena na užití insekticidů účinkujícím na cholinergní enzym acetylcholinesterázu. Komár si za dobu používání pesticidů vybudoval rezistenci spočívající v mutaci genu pro acetylcholinesterázu, která vede k produkci enzymu záměnou glycinu na pozici 119 za serin (G119S).

V literárním přehledu po úvodu týkajícím se malárie a přenosu tohoto onemocnění, následuje kapitola zabývající se prostředky prevence vůči malárii. Následující kapitoly představují enzym acetylcholinesterázu a rezistentní mechanismus komára. Další část teoretického přehledu je věnována přípravě rekombinantních proteinů a expresních systémů, ve kterých je možné rekombinantní proteiny produkovat.

Experimentální část se zabývá přípravou komáří mutantní acetylcholinesterázy, která je důležitá pro vývoj nových insekticidů překonávající rezistenci. Po záměně byl gen použit pro tvorbu rekombinantního bakmidu a následně byl bakmid využit k tvorbě bakulovirů v kultuře buněk Sf9. V buňkách byl rekombinantní enzym exprimován jako sekretovaný do buněčného média a byla stanovena jeho základní aktivita vůči nemutovanému (wild-type) enzymu.

Klíčová slova:

malárie, insekticidy, acetylcholinesteráza, bakulovirus, *Spodoptera frugiperda* Sf9

Annotation

Malaria is an infectious disease caused by protozoan parasites which are transmitted by mosquito bites (*Anopheles gambiae*). Prevention of malaria transmission is based on the use of insecticides acting on the cholinergic enzyme acetylcholinesterase. The mosquito has built up resistance to the acetylcholinesterase gene mutation during pesticide use, leading to enzyme production by replacing glycine at position 119 with serin (G119S).

The first part of the literary review contains the introduction of malaria, the transmission of the disease and a chapter about the means of preventing malaria. The following chapters present the enzyme acetylcholinesterase and the mosquito resistant mechanism. The final part of the review is focused on the preparation of recombinant proteins and expression systems in which the recombinant proteins can be produced.

The experimental part of this theses documents the used procedures for the preparation of the mutated mosquito acetylcholinesterase and the exchange of bases in the gene. This change is important for the development of new overcoming resistance insecticides. After substitution, the gene was used for the formation of a recombinant bacmid. Subsequently, the bacmid was used to form baculoviruses in the cell culture Sf9. The recombinant enzyme was expressed as secreted into the cell medium. Its basal activity against the wild-type enzyme was determined.

Keywords:

malaria, insecticides, acetylcholinesterase, baculovirus, expression system, *Spodoptera frugiperda* Sf9

Obsah

1.	Úvod.....	9
2.	Literární přehled.....	10
2.1	Malárie.....	10
2.1.1	Přenos malárie.....	11
2.1.2	Původce malárie – zimnička (<i>Plasmodium</i>).....	12
2.2	Léčba.....	13
2.3	Prevence.....	13
2.3.1	Léčiva blokující přenos.....	14
2.3.2	Očkování.....	14
2.3.3	Kontrola vektorů.....	15
2.4	Acetylcholinesteráza.....	16
2.4.1	Struktura enzymu AChE.....	17
2.4.2	Fyziologická funkce u hmyzu.....	18
2.4.3	Inhibice acetylcholinesterázy insekticidy.....	19
2.4.4	Rezistence.....	20
2.5	Rekombinantní proteiny.....	21
2.5.1	Využití rekombinantních proteinů.....	21
2.6	Expresní systémy.....	22
2.6.1	Bakulovirový expresní systém.....	23
3.	Cíl práce.....	25
4.	Experimentální část.....	26
4.1	Použitý materiál.....	26
4.1.1	Laboratorní zařízení.....	26
4.1.2	Laboratorní pomůcky.....	26
4.1.3	Biologický materiál.....	27

4.1.4	Použité chemikálie	27
4.2	Tvorba mutace v genu pro komáří acetylcholinesterázu (AgAChE1).....	28
4.2.1	Návrh mutagenních primerů	28
4.2.2	PCR-záměna nukleotidů pomocí mutagenních primerů	29
4.2.3	Rozštěpení templátů enzymem <i>Dpn I</i>	30
4.2.4	Transformace plazmidu do chemokompetentních buněk.....	30
4.2.5	Analýza kolonií	31
4.2.6	Izolace plazmidové DNA	32
4.3	Příprava rekombinantního bakmidu.....	33
4.3.1	Transformace DH10Bac buněk <i>E. coli</i>	33
4.3.2	Analýza rekombinantního bakmidu.....	34
4.3.3	Izolace bakmidové DNA	35
4.4	Transfekce hmyzích buněk <i>Spodoptera frugiperda</i> ExpiSf9®	36
4.4.1	Práce s buňkami ExpiSf9®	36
4.4.2	Transfekce pomocí kitu ExpiSf9™	37
4.4.3	Expresse sekretovaného rekombinantního proteinu.....	37
4.5	Měření aktivity enzymu	38
5.	Výsledky	39
5.1	PCR na koloniích pFastBac ace1 G119S.....	39
5.2	Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA.....	39
5.3	Tvorba bakmidu.....	40
5.4	Transfekce buněk ExpiSf9 bakmidovou DNA.....	41
5.5	Expresse rekombinantních proteinů AgAChE a AgAChE G119S.....	42
5.6	Stanovení aktivity enzymu AgAChE1 a AgAChE1-G119S	43
6.	Diskuze.....	45
7.	Závěr	47
8.	Literatura.....	48

Seznam zkratk použitých v textu

AChE	acetylcholinesteráza
AgAChE1	komáří acetylcholinesteráza <i>Anopheles gambiae</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace
DDT	dichlordifenytrichlorethan
ACT	artemisinin based combination therapy

1. Úvod

Po tuberkulóze je malárie druhou nejčastější infekční smrtelnou chorobou na světě.[1] Příčinou tohoto lidského onemocnění jsou různé druhy prvoků rodu zimnička (*Plasmodium*). Tito prvoci jsou charakterističtí svým životním cyklem, kdy za život vymění dva hostitele, komára a člověka.[2]

Využívají se různé metody obrany proti přenosu tohoto onemocnění, jak chemoprophylaxe, tak látky pro kontrolu vektorů. Chemoprophylaxe je založena na zabrání šíření onemocnění odstraněním parazita z lidského těla pomocí léčiv blokujících přenos. Dalším způsobem prevence je imunizace jedinců pomocí očkování. Do prevence proti malárii je také zahrnuta kontrola vektorů. Komáry lze kontrolovat pomocí inhibitorů iontových kanálů a acetylcholinesterázy, bakteriálními larvicidy a regulátory růstu hmyzu.

Nejčastějším vektorem pro přenos malárie je komár *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*). Proti vektorům lze dnes využít čtyři třídy insekticidů: organochloridy, karbamáty, pyrethroidy, organofosfáty. Tyto pesticidy se dělí dle mechanismu účinku na insekticidy účinkující na napětově řízené sodíkové kanály a insekticidy účinkující na acetylcholinesterázu. Běžně používané organofosfátové sloučeniny však mají nedostatky, jelikož nejsou příliš selektivní ke komářímu enzymu a dochází ke vzniku rezistence vůči cílovým strukturám.[3]

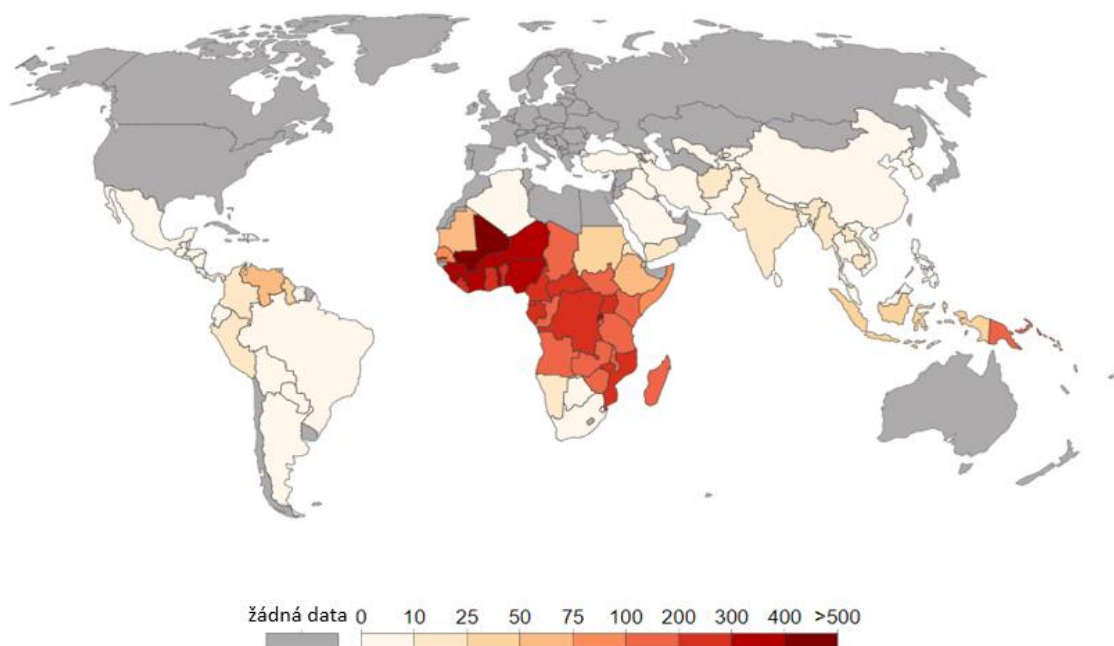
Rezistence na organofosfátové insekticidy u komára *An. gambiae* způsobuje mutace genu pro acetylcholinesterázu, která vede k produkci enzymu záměnou glycinu na pozici 119 za serin (G119S).

V této práci bude vytvořena mutantní verze rekombinantního enzymu acetylcholinesterázy komára *An. gambiae* a budou porovnány aktivity obou exprimovaných proteinů, wild-type a mutantního.

2. Literární přehled

2.1 Malárie

Malárie patří k nejčastějším onemocněním v mnoha tropických a subtropických oblastech. V roce 2017 bylo zaznamenáno 219 milionů nových případů nákazy v 90 zemích světa a zemřelo na něj okolo 435 000 lidí. Celosvětově je malárie nejrozšířenější na africkém kontinentu.[4] Kromě Afriky (90 %) se toto onemocnění vyskytuje také v jihovýchodní Asii (7 %), ve východním Středomoří (2 %) a Jižní Americe. [5]



Obrázek 1: Rizika vypuknutí malárie, 2015 měřítko na 1000 ohrožených lidí za rok, upraveno dle Our World In Data. [74]

Onemocnění malárií způsobují parazitické prvoci rodu zimnička (*Plasmodium*).[6] Komárem z člověka na člověka jsou přenášeny čtyři druhy: zimnička třetidenní (*Plasmodium vivax*), zimnička tropická (*Plasmodium falciparum*), zimnička čtvrtodenní (*Plasmodium malariae*) a *Plasmodium ovale*. V posledních letech se objevují případy malárie spojené se zoonózou (infekce přirozeně přenosné ze zvířat na člověka) *Plasmodium knowlesi* v oblastech jižní Asie, kde jsou u tohoto druhu parazita hlášeny případy přenosu malárie z infikovaných opic na člověka.[7]

Nejrozšířenějšími druhy zimniček způsobujících malárii jsou zimnička tropická (*Plasmodium falciparum*) a zimnička třetidenní (*Plasmodium vivax*). Například zimnička tropická způsobila 99,7 % případů malárie v roce 2017 v Africe.[7]

Malárie je parazitická infekce přenosná na člověka kousnutím infikovaným komárem. Po přenosu infekce do lidského těla je nákaza nejprve přenesena do jater. V játrech se parazit rozmnožuje a proniká do červených krvinek, kde se množí až krvinka praskne. Prasknutím krvinky se do krevního řečiště uvolní více parazitů. [8]

Nákaza malárií se špatně rozpoznává, jelikož má první příznaky podobné chřipkovým onemocněním. Nejprve se objeví horečka, která je charakteristická typickými cykly horečky, záchvatů zimnice a vydatným pocením. Dalšími příznaky podobnými s chřipkovým onemocněním jsou bolesti kloubů, bolesti hlavy, nauzea, časté zvracení, bolesti svalů, křeče, krvavá stolice až kóma. Pokud se malárie neléčí v začátcích, může se vyvinout v těžkou formu onemocnění. V důsledku snížení počtu červených krvinek může dojít k anémii. Mezi život ohrožující symptomy patří opuchnutí krevních cév mozku, hromadění tekutiny v plicích, která může způsobit problémy s dýcháním až edém plic a selhání orgánů. [9, 10]

2.1.1 Přenos malárie

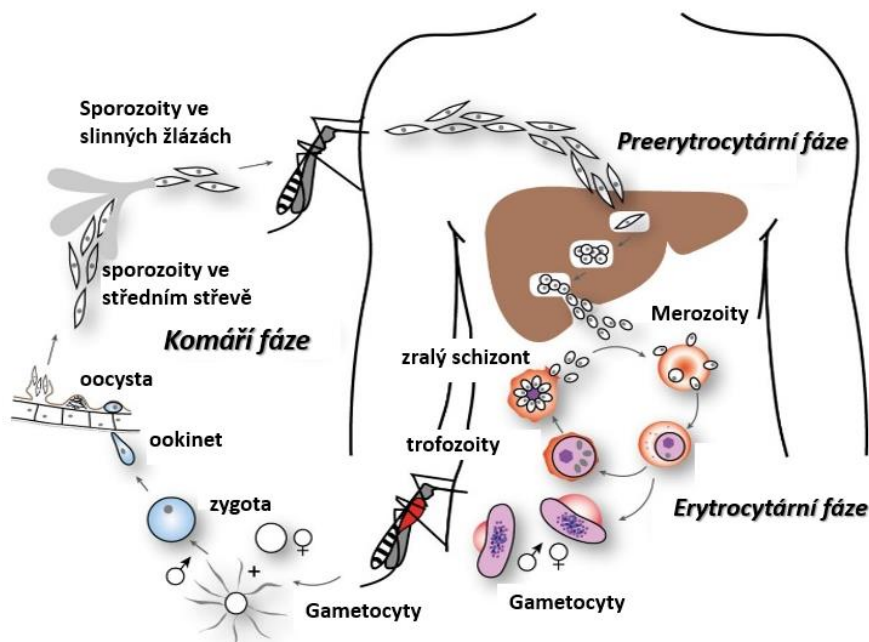
Malárie je transmisivní nákaza, tedy nákaza přenášená pomocí vektorů – komárů. Přenášet malárii mohou pouze komáří samičky, samečci nekoušou, proto malárii a jiné nemoci přenášet nemohou. Komárů rodu *Anopheles* existuje více než 400 druhů, ale pouze 30-40 druhů přenáší malárii. Přenos závisí na mnoha faktorech například na druhu parazita, vektoru, hostiteli nebo prostředí. [8]

Komáři prochází kompletní metamorfózou přes 4 vývojová stadia: vajíčko, larvu, kuklu a dospělce. Obecně dospělé samičky žijí velmi krátkou dobu, jen malý podíl jich žije tak dlouho, aby mohlo dojít k přenosu malárie. Samičky nakladou vajíčka, která se líhnou po 2 dnech až 3 týdnech. Vyvinou se v larvu a následně se larva zavine do kukly. Po nějaké době kukla praskne a na hladině se objeví mladý komár. [11]

2.1.2 Původce malárie – zimnička (*Plasmodium*)

Pravým původcem malárie jsou zimničky. Zimnička neboli *Plasmodium* patří do rodu prvoků z kmene výtrusovci a třídy krvinkovky. Zimničky za svůj životní cyklus vymění dva hostitele, komára rodu *Anopheles* a člověka. [12]

Cyklus nákazy malárií začíná nasátím infikované krve obsahující gametocyty zimničky komáří samičkou. V komářím střevě dojde k oplodnění gamety, přes stádium zygoty a ookinetu vznikne oocysta. Z oocysty vznikne sporozoit. Sporozoity se při sání komárem inokulují do krevní kapiláry nebo do perivaskulární tkáně člověka. Po proniknutí preerytrocytárního stádia zimniček do parenchymových buněk jater schizonti dospějí v merozoity. Dojde k hepatolýze a následně merozoit pronikne do krevního řečiště, kde napadá erythrocyty. V krvi probíhá erythrocytární fáze asexuálního množení, kde merozoity rostou a mění se v trofozoity. Trofozoity se vyznačují dělením jádra, které se rozdělí a vzniknou nové merozoity. Erythrocyty se rozpadnou a vzniklé merozoity napadají další erythrocyty. Erythrocytární cyklus se tímto způsobem opakuje a synchronizuje, proto se většina erythrocytů rozpadne zároveň. Tento rozpad je provázen typickým vzestupem teploty. [2, 8, 13]



Obrázek 2: Biologický cyklus *P. falciparum*, Komár kousne člověka a injikuje sporozoitové formy. Sporozoity jsou přeneseny do jater a napadají hepatocyty, ve kterých se vyvíjejí do exoerythrocytárních forem merozoitů, které se uvolňují do krevního oběhu. Merozoity napadají erythrocyty a rostou do trofozoitů a zralých schizontů. Merozoity jsou uvolněny a napadají další erythrocyty. Gametocyty, vytvořené z asexuálního krevního stádia, jsou přijímány komárem do střeva, kde zrají v samčí a samičí gamety. Oplodněná zygota se vyvíjí na ookinetu a oocystu a nakonec ve sporozoity, které migrují do slinné žlázy. [14]

Trvale pohlavní formy vznikají z některých merozoitů jejich zvětšením až přes velikost erytrocytů. Tato forma je následně nasáta komárem a tímto je uzavřen životní cyklus zimniček. [8] [14]

2.2 Léčba

Malárie je jedno z nejzávažnějších onemocnění, které si ročně vyžádá přes půl milionu lidských životů. Existují metody prevence před nákazou, které spočívají v ochraně před sáním infikovaných komárů. V některých případech však prevence selže a musí dojít k léčbě antimalariky. Účinná léčba proti všem druhům těžké tropické malárie je léčba chininem a chinolinovými léčivy. Chlorochin (dle IUPAC - *N*⁴-(7-chlorchinolin-4-yl)-*N*¹,*N*¹-diethylpentan-1,4-diamin), primachin (dle IUPAC - 8-(4-amino-1-methylbutylamino)-6-methoxychinolin) pro protirelapsovou terapii a meflochin jsou některá z dnes používaných účinných antimalarik. V tropických zemích je v rostoucí míře ohroženo veřejné zdraví kvůli rezistenci *Plasmodium falciparum*, vůči chlorochinu a antifolátům, proto se využívají kombinovaná antimalarika s artemisininem. [15]

Nejčastěji se k léčbě malárie používá antimalarikum artemisinin v kombinaci s jinými léčivy. Artemisinin (dle IUPAC (1*R*, 4*S*, 5*R*, 8*S*, 9*R*, 12*S*, 13*R*)-1,5,9-trimethyl-11,14,15,16-tetraoxatetracyklo[10.3.1.0^{4,13}.0^{8,13}]hexadek-10-on) je přírodní extrakt z pelyňku (*Artemisia annua*). Artemisininy jsou léčiva určená pouze k terapeutickému využití, pro prevenci však nejsou vhodná. [16]

2.3 Prevence

Ačkoli je léčba malárie založena na odstranění parazitických zimniček z lidského těla pomocí antimalarik jako je chinin nebo artemisinin, existují také způsoby prevence proti nákaze.

K prevenci malárie mohou být použita antimalarická léčiva a očkování. Léčiva blokují přenos a očkování mají svůj cíl v člověku. Dalším způsobem, jak lze zamezit přenosu malárie, je kontrola vektorů. Kontrola probíhá pomocí inhibitorů iontových kanálů a acetylcholinesterázy, bakteriálních larvicidů a regulátorů růstu hmyzu. [17]

2.3.1 Léčiva blokující přenos

Antimalarika blokující přenos infekce, např. kombinace artemisinin-piperaquin přerušuje šíření nemoci z infikovaného hostitele na komáří vektor. Komerčně dostupná antimalarika s gametocidním účinkem mohou blokovat přenos infekce odstraněním většiny gametocytů z lidského hostitele. Lidské tělo se po užití těchto antimalarik chová jako neinfekční vůči vektorům, což má za následek snížení přenosu infekce. [18, 19]

Gametocidní aktivita komerčně dostupných antimalarických léků, kombinovaná látka ACT (artemisinin based combination therapy) s nízkou dávkou primachinu, byla zkoumána v 17 kambodžských vesnicích. Ze získaných výsledků v roce 2010 Světová zdravotnická organizace doporučila jednorázovou dávku a omezení pro léčivo ACT v kombinaci s dávkou primachinu. [19] V některých státech jsou nově registrovaná a užívaná léčiva založená na látce artesunat (systematický název - 4-oxo-4-[[[(4S, 5R, 8S, 9R, 10R, 12R, 13R)-1,5,9-trimethyl-11, 14, 15, 16-tetraoxotetacyklo[10.3.1.0^{4,13}.0^{8,13}]hexadekan-10-yl]oxy]butanová kyselina) v kombinaci s dalšími léčivy. [20]

2.3.2 Očkování

Přenos blokující vakcíny jsou určeny k vyvolání imunitní odpovědi proti parazitům. Imunizovaní jedinci nemohou přenášet malárii. Nechrání před onemocněním, ale populaci před přenosem malárie. Od infikovaného lidského zdroje nákazy je malarická infekce přenesena komárem převážně do několika stovek metrů. Užívání TBV (transmission blocking vaccination) uvnitř komunity by ochránilo od nákazy bezprostřední sousedství očkovaných jedinců. [21]

V posledních letech se vývin vakcíny zaměřuje na preerytrocytární, tedy sporozoitové a jaterní stadia zimničky. Principem plně účinné vakcíny proti preerytrocytárnímu stádiu je zastavení infekce v krvi. Vakcíny, které by působily proti sexuálním stádiím zimniček, by mohly přerušit cyklus přenosu, neměly by však přímý účinek na stávající infekci očkovaného člověka. [14]

2.3.3 Kontrola vektorů

Komár hraje důležitou roli v životním cyklu parazitů, a tudíž jsou insekticidy pro regulaci vektorů klíčovým mechanismem pro snížení počtu nakažených malárií. Dnes existují pouze čtyři třídy insekticidů (organochloridy, karbamáty, pyrethroidy a organofosfáty), které jsou doporučeny Světovou zdravotnickou organizací (WHO) pro použití jako pesticidy. [1]

Tyto insekticidy mohou být rozděleny na základě jejich mechanismu působení na aktivátory napětově řízeného sodíkového kanálu nebo inhibitory enzymu acetylcholinesterázy. Použití insekticidů pro kontrolu malárie spočívá v použití těchto látek pro vnitřní postřik nebo venkovní postřiky proti komárům. [22]

Kromě konvenčních insekticidů na bázi chemických látek existují také alternativy jako regulátory růstu hmyzu nebo bakteriální larvicidy. Regulátory růstu hmyzu interagují s metabolismem a tím ovlivňují růst hmyzu pomocí narušení jeho embryogeneze a metamorfózy. Výhodou těchto regulátorů je, že vykazují menší toxicitu vůči člověku nebo obratlovcům než konvenční insekticidy. [23, 24] Bakteriální larvicidy jsou proteiny produkované bakteriemi, které mají insekticidní a selektivní účinek na larvální střední střevo. Tyto toxiny reagují s receptory v epitelu středního střeva a vyvolávají cytopatologické účinky vedoucí ke smrti larvy. [25]

2.3.3.1 Insekticidy cílící na napětově řízené sodíkové kanály

Napětově řízené sodíkové kanály jsou iontové kanály přítomné na membránách buněk. Sodíkové kanály mohou být blokovány pomocí určitých chemických látek např. pyrethroidovými a organochlorovými insekticidy, které narušují jejich funkci. [26]

V dnešní době jsou pyrethroidy nejúčinnějšími a nejbezpečnějšími insekticidy pro kontrolu vektorů. Pyrethroid se v organismu naváže na otevřený kanál a zabraňuje jeho uzavření, tím se prodlužuje akční potenciál, což má za následek rychlou paralýzu hmyzu, známou jako „knockdown“ a následnou smrt. [27] Selektivní toxicita pyrethroidů je založena na vyšší afinitě insekticidu k sodíkovým kanálům hmyzu než k savčím. [28, 29] Něktěrymi zástupci syntetických pyrethroidů jsou deltamethrin (systematický název - [(S)-kyano(3-fenoxyfenyl)methyl]-(1R,3R)-3-(2,2-dibromethenyl)-2,2-dimethylcyklopropan-1-karboxylát)

a permethrin (systematický název - (3-fenoxyfenyl)methylester 3-(2,2-dichlorethyl)-2,2-dimethylcyklopropan-1-karboxylát). [24, 30, 31]

Dalšími insekticidy cílícími na napěťově řízené sodíkové kanály jsou organochlorové pesticidy. Nejznámějším zástupcem těchto insekticidů je DDT (dichlordifenyltrichlorethan), kterého bylo hojně využíváno, ale kvůli jeho účinkům na životní prostředí byl vyloučen z programu kontroly vektorů. V důsledku vyloučení tohoto insekticidu vypukla v roce 1996 jedna z nejhorších epidemií malárie v historii Jihoafrické republiky. Přestože pyrethroidy a organochlorové pesticidy sdílejí stejný mechanismus účinku, liší se ve svých vazebných místech sodíkový kanál. [1, 32]

2.3.3.2 Insekticidy cílící na acetylcholinesterázu

Dnešní acetylcholinesterázové pesticidy pro hubení škůdců byly vyvinuty v průběhu druhé světové války. Acetylcholinesteráza (AChE) je životně důležitý enzym pro regulaci neurotransmiteru acetylcholinu u savců a hmyzu. Insekticidy užívané pro kontrolu hmyzích vektorů jsou karbamátové a organofosfátové insekticidy. [33]

Organofosfáty jsou chemicky estery kyseliny ortho-, thio- a pyro- fosforečné. Jejich mechanismus účinku je reakce se serinem za vzniku kovalentní vazby v aktivním místě acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy. Tato reakce vede k inhibici synaptického vedení signálu v nervových vláknech. Mezi zástupce organofosfátů patří paraoxon (systematický název - diethyl-4-nitrofenyl fosfát). V minulosti byly připraveny různé deriváty organofosfátů pro zvýšení selektivity pesticidů vůči škodlivému hmyzu. Selektivity bylo docíleno obměnou oxo formy pesticidu na thio analoga. Tato analoga jsou konvertována pomocí oxidáz s širokou specifitou účinku. [34]

Karbamátové insekticidy jsou chemické estery kyseliny karbaminové nebo karbamidové. Mechanismus účinku je skoro stejný jako u organofosfátů s tím rozdílem, že se u karbamátů jedná o pseudoireverzibilní inhibici. [25]

2.4 Acetylcholinesteráza

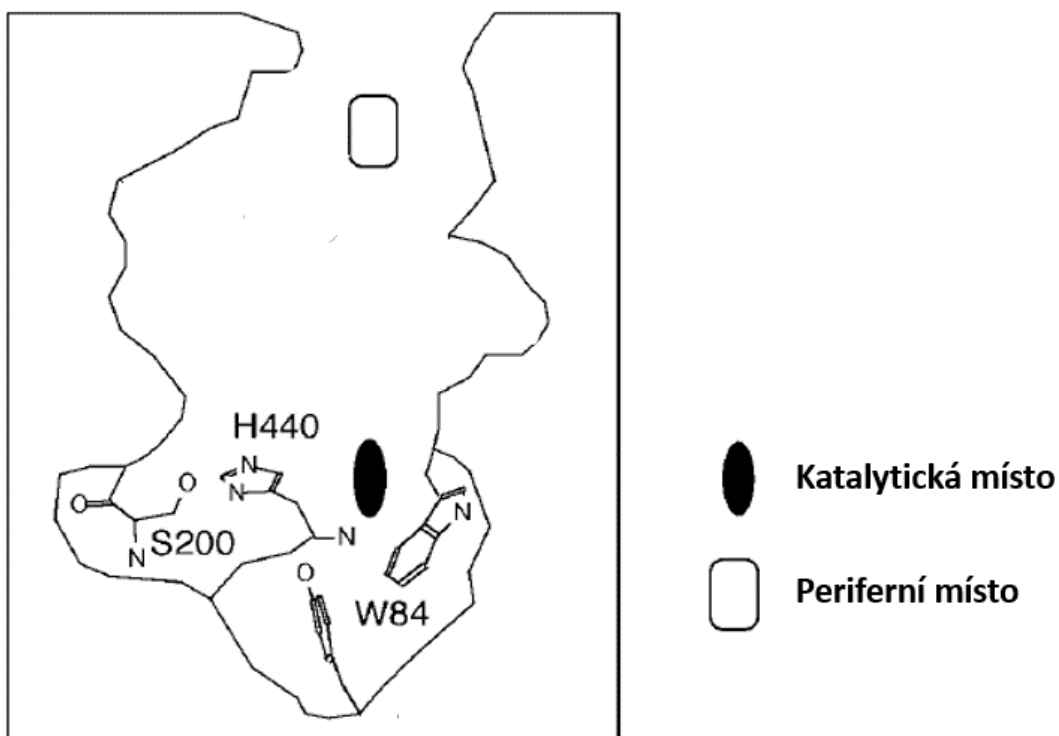
Acetylcholinesteráza (AChE) (EC 3.1.1.7) je serinová hydroláza patřící do skupiny cholinesteráz, které katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin

a kyselinu octovou. Tato reakce je nezbytná pro umožnění návratu cholinergního neuronu do klidového stavu po aktivaci. Má-li dojít k repolarizaci, musí být acetylcholin rychle odstraněn ze synapse. [35]

2.4.1 Struktura enzymu AChE

Enzym AChE je tvořen řetězcem o 737 aminokyselinách a velikosti 80,902 Da. Enzym se vyskytuje jako homodimer.[36]

Tento enzym má hluboké a úzké úžlabí s katalytickým místem uvnitř a periferním místem u vstupu do úžlabí aktivního místa. Úžlabí je lemované aromatickými zbytky, které usnadňují pohyb kladně nabitého acetylcholinu nebo kationtového inhibitoru z periferního místa u vstupu k vnitřku katalytického místa v dolní části. [37, 38]



Obrázek 3: Úžlabí AChE s aktivním místem s vyobrazeným katalytickým a periferním místem, obrázek byl převzat a upraven z [37]

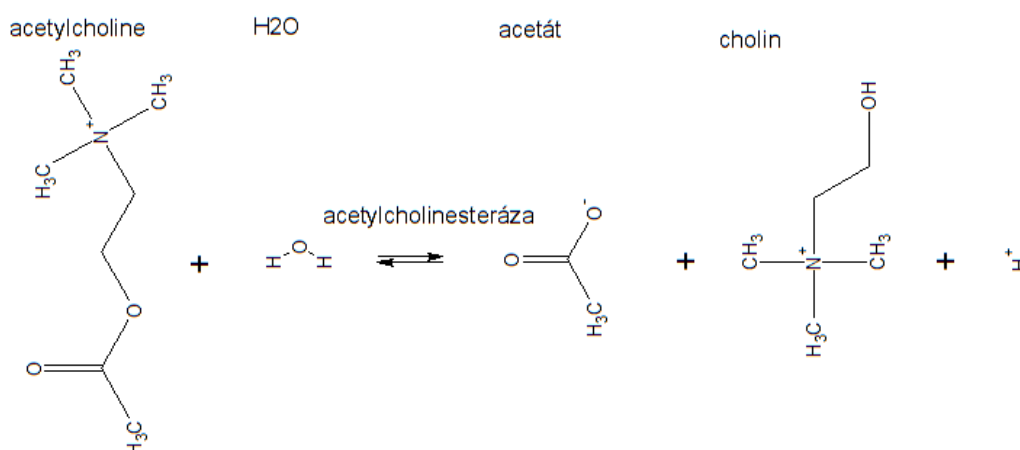
V katalytickém místě se nachází serinový, histidinový a glutamátový zbytek. Tyto aminokyselinové zbytky tvoří katalytickou triádu, která má síť vodíkových vazeb, zvyšující nukleofilitu serinové hydroxyskupiny pro hydrolýzu substrátu

acetylcholinu. Toto konstrukční uspořádání poskytuje vysokou katalytickou účinnost. [39–41]

Existuje několik rozdílů ve struktuře mezi lidskou a hmyzí acetylcholinesterázou. Jedním z nich je aminokyselina na okraji úžlabí enzymu, kdy hmyzí AChE se u vstupu do aktivního místa nachází volný (nespárovaný) cysteinový zbytek. [42] Africký komár (*An. gambiae*) má dvě AChE, Ace-paralogickou AChE a Ace-ortologickou AChE, kdy obě mají na úžlabí v blízkosti aktivního místa cysteinový zbytek. [43] Lidská AChE spolu s dalšími zástupci obratlovců má v tomto místě aminokyselinu fenylyalanin.

2.4.2 Fyziologická funkce u hmyzu

Acetylcholin se nachází ve vysokých koncentracích uzavřen v malých, synaptických váčcích v zakončení cholinergního neuronu. Syntetizuje se reakcí cholinu s acetátem. Acetylcholin je excitační neurotransmiter olfaktorických a mechanosenzorických neuronů a interneuronů. Acetylcholinesteráza ukončuje přenos impulsů na synapsi prostřednictvím rychlé hydrolyzy neurotransmiteru acetylcholinu na kyselinu octovou a cholin (Obr. č 4) [39] Po reakci je acetylcholin vezikulárním přenašečem zpětně vychytáván do synaptických váčků. [26] Acetylcholinesteráza je zodpovědná za nervosvalový přenos mezi neurony u obratlovců, avšak u hmyzu za transmissi v nervosvalovém spojení je zodpovědná pro inhibici kyselina γ -amino máselná (GABA) a glutamát pro excitaci. [44]

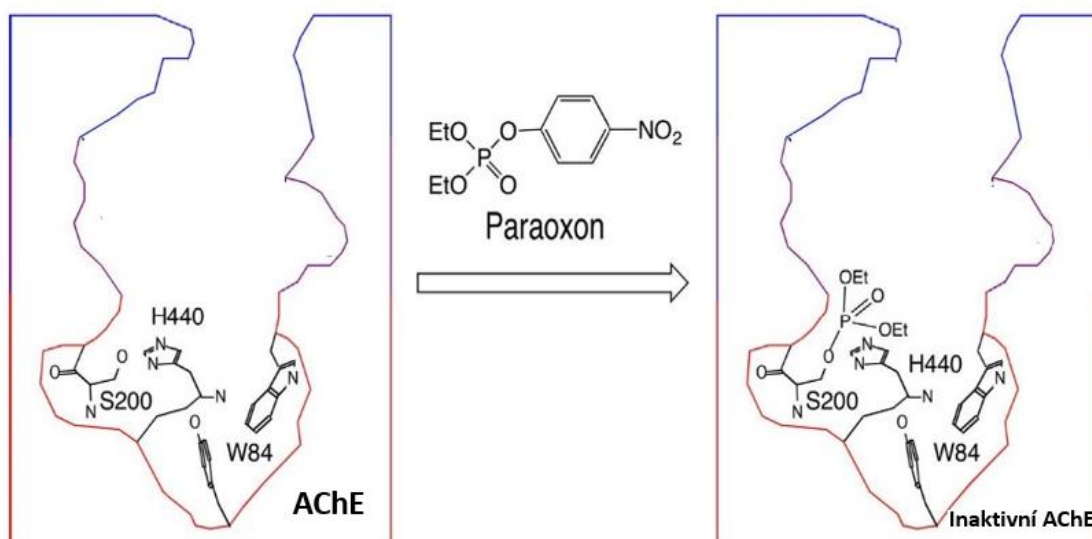


Obrázek 4: Hydrolyza acetylcholinu za katalýzy AChE na acetát a cholin, vytvořeno v ChemSketch

2.4.3 Inhibice acetylcholinesterázy insekticidy

Malárie způsobí ročně obrovské ztráty na lidských životech. Úsilí kontrolovat komáří vektor pomocí vnitřního a vnějšího postřiku insekticidy je úspěšné pro snižování globální úmrtnosti na malárii. AChE není pouze cílem insekticidů, ale také chemicky příbuzných bojových látek a přirozeně se vyskytujících toxinů (např. hadí jedy). [45]

Insekticidy fungují na principu reakce látky se serinem v katalytickém místě pro znemožnění fungování AChE. Aromatické zbytky okolo katalytického místa pomáhají při přenosu substrátu. Jelikož se nachází stejné serinové reziduum také v katalytickém místě savčí AChE, bylo využívání těchto pesticidů limitováno kvůli toxicitě k savcům. I když se dlouho uvažovalo o tom, že lidem malé dávky insekticidů neškodí. Nedávná zpráva americké agentury pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency's Office of Inspector General) poukazuje na to, že některé insekticidy mohou prostoupit přes hematoencefalickou bariéru do mozku zárodků člověka a malých dětí, kde mohou zničit buňky ve vyvíjejícím se nervovém systému. Dalším důvodem limitování insekticidů byl vznik rezistence mutací v genu pro acetylcholinesterázu (G119S mutant AChE komára *An. gambiae*), kvůli kterému je komár nesoucí tuto záměnu rezistentní vůči těmto pesticidům. [19, 46]



Obrázek 5: Periferní a katalytická místa v úžlabí aktivního místa Acetylcholinesterázy, ID reziduí převzaty z krystalové struktury *Torpedo californica* acetylcholinesterázy (Protein Data Bank ID: 2ACE), obrázek byl převzat a upraven z [37]

2.4.4 Rezistence

Obecně odolnost hmyzu vůči insekticidům je velmi závažný problém. Tento mimořádný jev poskytuje model adaptace eukaryot na toxické prostředí. Odolnost vůči insekticidům vyplývá ze tří hlavních mechanismů: snížená penetrace insekticidů, účinnější metabolizace insekticidu a genetická úprava insekticidního cíle. [47]

Komár *An. gambiae* má tři rezistentní mechanismy proti insekticidům, dva spočívají ve změně cílového místa a třetí mechanismus rezistence je zvýšení účinnosti metabolické detoxifikace insekticidů. [48]

Mutace cílového místa pro gen acetylcholinesterázy, vede k záměně G119S AChE a je zodpovědná za necitlivost acetylcholinesterázové rezistence vůči organofosfátovým a karbamátovým insekticidům u populace *An. gambiae* v západní Africe. [49]

Předpokládá se, že mutace snižuje prostupnost inhibitoru ke katalytickému místu, které je stericky bráněné. Tato mutace však také ovlivňuje zpracování přirozených substrátů a mutant G119S *An. gambiae* AChE vykazuje snížený obrat enzymu ve srovnání s nemutovanou verzí. [50]

Aminokyselinový zbytek G119 leží uvnitř oxoanionového otvoru v blízkosti katalyticky aktivního místa. [50, 51] Mutace snižuje objem aktivního místa a serin S119 blokuje karbamylaci katalytického zbytku serinu S199. Rekombinantně exprimovaná a purifikovaná katalytická část G119S AChE1 prokázala pouze 3 % obrat wild-typ enzymu. [48]

Druhým rezistentním mechanismem je také mutace napěťových sodíkových kanálů. Široké používání pesticidů pravděpodobně přispělo k rezistenci napříč subsaharskou Afrikou. U *An. gambiae* je rezistence způsobena mutacemi sodíkových kanálů leucinu (TTA) na fenylalanin (TTT) nebo leucinu na serin (TCA) v kodonu 1014 (mutace označované jako *kdr* – knock down resistance nebo *super-kdr*). [52]

Dalším rezistentním mechanismem je metabolická detoxifikace. Mechanismus detoxifikace je založen na zvýšené expresi detoxifikačních enzymů patřících do skupiny karboxyesteráz, cytochrom P450 monooxidáz a glutathion S-transferáz. [53]

Je třeba brát v úvahu, že do rezistence je zapojeno více složitějších mechanismů, proto ačkoliv nám metody molekulární a buněčné biologie poskytují mnoho prostředků pro analýzu určitých genů, nemusí být tyto metody úplně přesné. Interakce rezistentních a regulačních genů může hrát klíčovou roli v insekticidní rezistenci kvůli nadměrné genové expresi a necitlivosti vůči cílovému místu. [54]

2.5 Rekombinantní proteiny

Rekombinantní proteiny jsou proteiny získané vnesením rekombinantní DNA do heterologního hostitele, ve kterém dojde k expresi genu. Expresní systém podporuje expresi genu a translaci jeho mRNA, a tím se může připravit mutantní protein. [42]

Nadprodukce a purifikace rekombinantních proteinů jsou nezbytným předpokladem pro biochemickou funkční charakteristiku proteinu, strukturní analýzu, proteinové inženýrství a produkci léků, vakcín a potravinových doplňků. Většina rekombinantních proteinů je exprimována v jiných organismech. Tyto organismy se nazývají expresní systémy. Existují bakteriální expresní systémy, kvasinkové expresní systémy, expresní systémy využívající hmyzí buňky, savčí expresní systémy a bezbuněčné expresní systémy. [55]

2.5.1 Využití rekombinantních proteinů

Technologie rekombinantních proteinů se vyvinula v nedávné době a má jedinečný vliv v lidském životě. Díky tomuto pokroku je možné bezpečně připravit dostatečné množství klíčových proteinů potřebných pro vědecké a zdravotnické účely, které by jinak nebylo možné získat vůbec, nebo jen stěží. [56]

Užití technologie rekombinantní DNA umožnilo výrobu nových enzymů vhodných pro specifické podmínky zpracování potravy. Výsledkem je vytvoření důležitých potravinářských enzymů, jako jsou amylázy a lipázy s vlastním přizpůsobením konkrétním potravinovým aplikacím. [57]

Tyto metody mají také široké spektrum využití při léčbě onemocnění a zlepšování zdravotních podmínek. Technologie rekombinantní DNA se využívá pro genovou terapii, léčbu kardiovaskulárních onemocnění nebo rakoviny. Dále se tento postup využívá pro vývoj vakcín a rekombinantních hormonů. [25, 58, 59]

Genetické inženýrství má široké uplatnění při řešení environmentálních problémů. Jeho pomocí se rozvíjí fyto-remediace a odolnost rostlin. [60, 61]

2.6 Expresní systémy

Vývoj genetického inženýrství a klonování otevřel mnoho možností pro expresi a izolaci heterologních proteinů pro výzkumné účely. Značný pokrok v technologii umožnil expresi a izolaci rekombinantních proteinů ve velkém měřítku, jako je produkce enzymů, protilátek nebo vakcín. Jelikož tyto proteiny musí být připraveny ve velkých množstvích, využívají se různé expresní systémy. Tyto systémy musí být snadno kultivovatelné a udržovatelné, musí rychle růst a produkovat velké množství proteinů. Existují bakteriální, kvasinkové, hmyzí, savčí a bezbuněčné expresní systémy. [62]

Nejčastěji se využívají bakteriální expresní systémy, v této skupině dominuje *Escherichia coli* (*E. coli*), dalšími bakteriálními systémy jsou *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*. Výhodou použití je snadná kontrola genové exprese, rychlý růst, snadná kultivace, možnost sekrece proteinu do média a nízké náklady. Nevýhodami jsou chybějící posttranslační modifikace, kvůli čemuž protein může postrádat biologickou aktivitu a vysoký obsah endotoxinů v bakteriálních buňkách. [63–65]

Pro expresi rekombinantních proteinů se také využívají kvasinkové systémy. Zástupcem kvasinkových expresních systémů je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Vzhledem k tomu, že se s kvasinkami snadno geneticky manipuluje, lze kmen optimalizovat pro expresi specifických proteinů. Výhoda kvasinkových systémů je, že v nich lze provádět posttranslační modifikace eukaryotických proteinů. Jsou také rychle rostoucí a méně nákladné v porovnání se savčími buněčnými kulturami. [66]

Expresní systémy využívající bakuloviry a hmyzí buňky mají schopnost produkovat mnoho rekombinantních proteinů na vysoké úrovni, tyto systémy také poskytují možnosti posttranslačního zpracování podobné eukaryotickým proteinům. *Baculoviridae* je velká skupina virů s relativně velkými, kružnicovými DNA genomy. Přírodními hostiteli těchto virů jsou členovci, hlavně hmyz. Výhodou těchto systémů jsou posttranslační modifikace podobné savčím, bezpečnost pro člověka a relativně vysoká úroveň exprese proteinu. Nevýhodou je mírně odlišná N-glykosylace. Kultivace těchto buněk je časově i finančně náročná. [63]

V dnešní době je více žádaná produkce proteinů pomocí savčích buněk. Expresní systémy využívající savčí buňky pro tvorbu rekombinantních proteinů jsou schopny produkovat správně složené proteiny včetně posttranslačních modifikací, které jsou důležité pro úplnou biologickou aktivitu proteinu. [67]

Existují i bezbuněčné expresní systémy, kde exprese proteinů probíhá bez použití živých buněk. Místo toho expresní systémy obsahují všechny složky potřebné k transkripci DNA na mRNA. Složky, které překládají mRNA na protein (např. ribozomy, tRNA, enzymy, kofaktory, aminokyseliny), jsou poskytnuty v roztoku pro použití *in vitro*. Obecně se tyto roztoky získávají vytvořením buněčného lyzátu z požadovaného typu buněk. Tyto systémy nejsou obecně praktické pro expresi proteinů ve velkém měřítku. Často se však velmi dobře hodí pro aplikace bezbuněčné exprese zahrnující výrobu proteinů, které jsou toxické pro expresní hostitele *in vivo*, expresi proteinů s modifikovanými aminokyselinami a začlenění posttranslačních modifikací. [68]

2.6.1 Bakulovirový expresní systém

Klasický bakulovirový expresní vektor ve své nejjednodušší formě je rekombinantní bakulovirus, jehož genom obsahuje cizí sekvenci nukleové kyseliny kódující protein, který je předmětem zájmu. Vložený insert je pod transkripční kontrolou velmi silného promotoru genu pro polyhedrin. Rekombinantní virus může být použit k infekci kultivovaných buněk hmyzu nebo larev. [69]

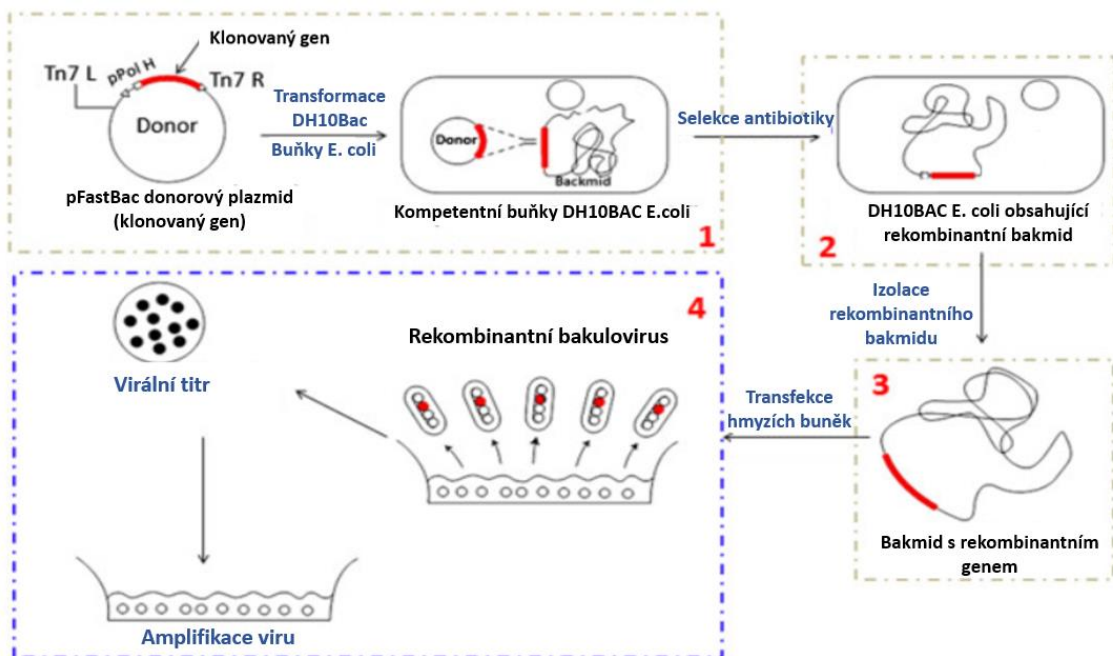
Účinný a rychlý způsob produkce rekombinantních protein je pomocí bakulovirového expresního systému Bac-to-Bac. Tato metoda je založena na místně specifické transpozici expresního vektoru do bakulovirového vektoru (bakmid) produkovaného v *E. coli*. Pro expresi rekombinantních proteinů se užívají buněčné linie odvozené od ovariálních buněk vojnice (*Spodoptera frugiperda*), Sf9 a Sf21 a z embryonálních buněk *Trichoplusia ni*. Ovariální buňky jsou infikovány rekombinantním bakulovirem s cílem získat rekombinantní protein. Výhodou těchto expresních systémů kromě intracelulární exprese může být také efektivní sekrece proteinu do média. [70, 71]

Signální sekvence pro včelí melitin (honeybee melittin - HBM) umožňuje sekreci rekombinantního proteinu do média. Firmy tyto vektory dodávají již obsahující

sekvenci pro HBM, sekvenci homologního genu lacZ spolu s polyhedrinovým promotorem, který řídí rekombinantní expresi fúzního proteinu. [70]

Cizí gen je vnesen do základního vektoru polyhedrinového viru (*AcMNPV-Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus) *Autographa californica*, který obsahuje silný polyhedrinový promotor. Polyhedrinový promotor je obklopen homologními sekvencemi s bakulovirovou DNA, které umožňují homologní rekombinaci vektoru s virovou DNA, a tím produkci bakuloviru a zvoleného proteinu. [70]

Expresí rekombinantního proteinu v bakulovirovém expresním systému zahrnuje postup uvedený na obrázku č. 6.



Obrázek 6: rekombinantní bakuloviry a genový expresní systém využívající expresní systém "bac-to-bac", 1. krok příprava donorového plazmidu, 2. krok produkce bakmidu, 3. krok příprava rekombinantního bakmidu, 4. krok produkce rekombinantního bakulovirů upraveno [72]

3. Cíl práce

Cílem práce bylo připravit mutantní komáří enzym acetylcholinesterázu AgAChE-1 G119S jako rekombinantní enzym pomocí bakulovirového expresního systému v buněčných liniích *ExpiSf9™*. Práce byla členěna do několika částí:

- Literární rešerše
 - Informace o malárii
 - Prevence proti přenosu malárie
 - Acetylcholinesteráza
 - Mutantní acetylcholinesteráza
 - Rekombinantní proteiny
 - Expresní systémy

- Tvorba mutace v genu pro komáří acetylcholinesterázu

- Příprava rekombinantního bakmidu

- Transfekce hmyzích buněk *Spodoptera frugiperda* ExpiSf9®

- Stanovení biochemické aktivity enzymu

4. Experimentální část

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Laboratorní zařízení

- Thermomixer (Grant Instruments)
- PCR thermocykler (Eppendorf)
- Hlubokomrazící box (ThermoFisher)
- Vortex (Grant Instruments)
- Inkubátor s třepací jednotkou (MiuLab)
- Horizontální elektroforéza (SciePlas)
- Box s laminárním prouděním (Faster Dosit)
- UV/VIS spektrofotometr (Tecan Spark)
- UV transiluminátor s kamerou (Uvitec Cambridge)
- Zdroj pro elektroforézu (VWR)
- Mikroskop

4.1.2 Laboratorní pomůcky

- Automatické pipety a špičky
- Kádinky
- Odměrný válec
- Erlenmeyerova baňka
- Mikrozkuhavky typu Eppendorf
- Petriho misky
- PCR mikrozkuhavky
- Parafilm
- Kolonky
- Stopky
- Mikrobiologické hokejky
- Stojánky
- Bürkerova komůrka

4.1.3 Biologický materiál

- Reverse primer pro gen Agace-1G119S (Agilent)
- Forward primer pro gen Agace-1G119S (Agilent)
- Buněčné kultury *Escherchia coli* XL-10 Gold (Agilent)
- Buněčné kultury MAX Efficiency™ DH10bac™ (Thermo Fisher)
- Buněčné kultury ExpiSf™ (Thermo Fisher)
- Templátová DNA pro PCR reakci (Thermo Fisher)

4.1.4 Použité chemikálie

- Agaróza pro rutinní DNA elektroforézu (Serva)
- DNA standard (O'gene Ruler 1kb DNA ladder) (Thermo Fisher)
- Nanášecí pufr (10x Blue Juice – gel loading bugger) (Invitrogen)
- LB Broth (Miler) médium (Sigma-Aldrich)
- LB bakteriální agar (Sigma-Aldrich)
- Antibiotikum karbenicilin (Serva)
- Antibiotikum kanamycin (Serva)
- Antibiotikum gentamicin (Serva)
- Antibiotikum ampicilin (Serva)
- Destilovaná voda
- X-Gal (Serva)
- β -merkapt ethanol (Sigma-Aldrich)
- Buněčné médium CD ExpiSf™ (Thermo Fisher)
- ExpiFectamine™ Sf Transfection Reagent (Thermo Fisher)
- ExpiSf Enhancer™ (Thermo Fisher)
- DTNB (5,5'-dithiobis (kyselina 2 – nitrobenzoová)
- Isopropanol (Serva)
- Ethanol (Serva)
- Sada PureLink Quick Plasmid Mini Prep Kit

4.2 Tvorba mutace v genu pro komáří acetylcholinesterázu (AgAChE1)

In vitro mutagenese je metoda, při níž se mění primární struktura molekul DNA. Tato technika poskytuje neocenitelný zdroj informací pro studium vztahů mezi strukturou a funkcí proteinu, expresi genů a pro provádění vektorových modifikací. [73]

4.2.1 Návrh mutagenních primerů

Primer je krátký oligonukleotidový řetězec komplementární k cílové sekvenci, který ohraničuje amplifikovaný úsek v metodě polymerázové řetězové reakce (PCR). [74]

Pro záměnu bází byla použita komerční sada Quik Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) a postupovalo se dle výrobce. Při designu primerů pro následnou záměnu aminokyselin bylo třeba, aby oligonukleotidové řetězce obsahovaly požadovanou mutaci a navázaly se oba na stejnou sekvenci. Základní primer měl být dlouhý od 25 do 45 bází s teplotou tání větší nebo rovnou 78 °C. Požadovaná mutace by se měla nacházet uprostřed primerů a měla by být obklopena 10-15 bázemi správné (nemutované) sekvence na obou stranách primeru. Primery by měly obsahovat minimálně 40 % GC bází a měly by končit jedním nebo více C nebo G bázemi.

Primery byly navrženy pomocí QuickChange Design programu, který je k dispozici online na adrese www.agilent.com/genomics/qcpd.

V tabulce číslo 1 jsou uvedené sekvence forward a revers primerů. Pomocí primerů dochází k záměně tripletu GGA kódující aminokyselinu glycin na triplet AGC, který kóduje aminokyselinu serin.

4.2.3 Rozštěpení templátů enzymem *Dpn I*

Amplifikační reakce byla přenesena do 1,5 ml zkumavky a bylo přidáno 1 μ l *Dpn I* restričního enzymu, který štěpí methylovanou DNA. Jemně a důkladně byla reakce promíchána pomocí propipetování roztoku. Poté byla směs krátce zcentrifugována a inkubována při 37 °C po dobu 1 hodiny pro rozštěpení templátové plazmidové DNA.

4.2.4 Transformace plazmidu do chemokompetentních buněk

Pro transformaci byly na ledu rozmrazeny superkompetentní buňky *Escherchia coli* XL-10 Gold. Při postupu práce s buňkami a transformací byl dodržen protokol dodaný výrobcem.

Do zkumavek bylo napipetováno 45 μ l buněk, bylo přidáno 2 μ l β -merkaptoethanolu, směs byla jemně promíchána a inkubována po dobu 10 minut na ledu s promícháním každé dvě minuty. K superchemokompetentním buňkám bylo přidáno 2 μ l PCR reakce ošetřené enzymem *Dpn I* a buňky byly inkubovány dalších 30 minut na ledu. Následně byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 30 sekund a směs byla umístěna zpátky na led po dobu 2 minut. Po teplotním šoku bylo k buňkám přidáno SOC médium a směs byla třepána po dobu 1 hodiny na 37 °C na 200 rpm. Pro výsev kultury byly použity Petriho misky umožňující modro-bílou selekci.

Pro přípravu misek pro modro-bílou selekci bylo do zchlazeného LB média obsahující 1,5% agar přidáno 80 μ g/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) a 20 mM IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid). Dále bylo přidáno příslušné antibiotikum pro plazmidový vektor v tomto případě karbenicillin o koncentraci 100 μ g/ml média.

Po inkubaci byly transformované buňky přeneseny na agarové plotny. Agarové plotny byly poté inkubovány při 37 °C po dobu minimálně 16 hodin.

4.2.5 Analýza kolonií

Vyrostlé kolonie byly analyzovány pomocí PCR na koloniích, pozitivní kolonie byly kultivovány přes noc v LB médiu obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Byla izolována plazmidová DNA pomocí soupravy PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), pro vysoce čistou plazmidovou DNA z transformantů *E. coli*. Izolovaný plazmid byl sekvenován pro potvrzení požadované záměny.

Odpíchnutí kolonií

Bílé kolonie na Petriho miskách byly sterilně odpíchnuty do 50 µl sterilní vody a část kultury byla použita jako templátová DNA pro analýzu pomocí PCR reakce. Bylo analyzováno 7 kolonií nesoucích plazmid pFastBac Agace-1 G119S pomocí PCR na koloniích.

PCR na koloniích

Pro PCR na koloniích byla použita předpřipravená komerční směs pro rutinní PCR PPP MasterMix (Top-Bio). Příprava reakční směsi PPP MasterMix je uvedena v tabulce číslo 4 a parametry cyklování v tabulce číslo 5. Produkt byl dále analyzován pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Tabulka č. 4 – Příprava reakční směsi PPP MasterMix

Komponenta	Množství
PPP Mastermix	12,5 µl
Přední primer ace1	1 µl
Zadní primer ace1	1 µl
Templát	3 µl
Voda	7,5 µl

Tabulka č. 5 - Parametry cyklování

Teplota	Čas	Cykly
94 [°C]	1 [min]	1x
94 [°C]	15 [s]	30x
55 [°C]	15 [s]	
72 [°C]	1 min 30 sec	
72 [°C]	7 [min]	1x
22 [°C]	∞	

Agarózová gelová elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu byl nejprve připraven gel dle následujícího postupu. Do erlenmeyerovy baňky bylo přidáno 40 ml 1x TAE pufru a 0,4 g agarózy (Serva) a tato směs byla zahřívána, dokud nebyla agaróza rozpuštěna. Poté byla směs zchlazena a byly přidány 4 µl DNA barvy Sybr Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Gel byl poté nalit do připravené aparatury a nechal se zatuhnout. Po zatuhnutí gelu byl nalit elektroforetický pufr do elektroforetické vany. Následně byl pipetou nanesen vzorek a standard DNA velikostí (O'GeneRuler, 1kbp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific) do komůrek pod hladinou elektroforetického pufru.

4.2.6 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerční sady PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kit z noční kultury pozitivních transformantů a postupovalo se dle výrobce.

Nejprve bylo 1-5 ml LB noční kultury buněk centrifugováno a odstraněno všechno médium. Buněčná peleta byla resuspendována 250 µl resuspendačního pufru (R3) s RNázou. Poté byla směs zlyzována 250 µl lyzačního pufru (L7). Dále bylo přidáno 350 µl srážecího pufru (N4). Buněčný lyzát byl centrifugován při 14 100 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl nanesen na kolonu obsahující

silika membránu. Kolona byla centrifugována po dobu 1 minuty při 14 100 x g. Proteklé frakce byly odstraňovány do odpadu. Kolona s naneseným vzorkem byla promyta 500 µl promývacího pufru (W10) a inkubována po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Následně byla centrifugována při 14 100 x g po dobu 1 minuty. Do kolony bylo přidáno 700 µl promývacího pufru (W9) a kolona byla centrifugována při 14 100 x g po dobu 1 minuty.

Plazmidová DNA byla eluována do 30 µl vody a byla stanovena její koncentrace a čistota pomocí spektrofotometru (Tecan Spark). Pro ověření zavedení mutace do plazmidu pFastBac ace1 byl vzorek DNA odeslán na sekvenaci na spolupracující pracoviště (Mikrobiologický ústav, AVČR, Praha).

4.3 Příprava rekombinantního bakmidu

4.3.1 Transformace DH10Bac buněk *E. coli*

Transformace plazmidové DNA do buněk MAX Efficiency™ DH10bac™ buněk *E. coli* byla provedena dle manuálu Bac® HBM TOPO® Secreted Expression System od firmy Thermo Fisher Scientific. Byl transformován konstrukt pFastBac™ ace1G119S.

Pro transformaci bylo přeneseno 100 µl buněk DH10Bac™ do předem vychlazené 15ml zkumavky. Bylo přidáno 1 ng konstrukt pFastBac™ nesoucí gen ace1 se záměnou. Buňky byly inkubovány na ledu po dobu 30 minut. Poté byl proveden teplotní šok na 45 sekund při 42 °C. Okamžitě byly buňky přesunuty na led na 2 minuty. Následně se přidalo 900 µl SOC media a dále byla transformační směs inkubována při 37 °C na 225 rpm po dobu 4 hodin.

Následoval výsev 100 µl transformace na plotny s obsahem 50 µg/ml kanamycinu, 7 µg/ml gentamicinu, 10 µg/ml tetracyklinu, 100 µg/ml X-Gal a 40 µg/ml IPTG. Plotny byly inkubovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Pro další analýzu byly vybrány bílé kolonie.

4.3.2 Analýza rekombinantního bakmidu

Bílé kolonie byly sterilně odpíchnuty a byla provedena kontrolní PCR reakce. Složení kontrolní PCR reakce je uvedena v tabulce č. 6. Pro zjištění velikosti rekombinantního bakmidu byly použity primery pUC19 nasedající na bakmid. PCR reakce byla analyzována pomocí gelové elektroforézy a kolonie o správné velikosti byly použity dále pro izolaci bakmidové DNA.

Tabulka č. 6 – PCR reakce

Komponenta	Množství
10x Taq buffer	2,5 µl
dNTP's	0,5 µl
Přední primer pUC19	0,5 µl
Zadní primer pUC19	0,5 µl
Templát	3 µl
polymeráza	0,2 µl
Voda	17,8 µl

Tabulka č. 7 - Parametry cyklování

Teplota	Čas	Cyklování
95 [°C]	30 [s]	1x
95 [°C]	30 [s]	30x
55 [°C]	40 [s]	
68 [°C]	4 [min] 30 [s]	
68 [°C]	5 [min]	
4 [°C]		∞

4.3.3 Izolace bakmidové DNA

Byly vybrány tři bílé kolonie, které byly zaočkovány do 10 ml tekutého LB média obsahujícího 50 μ l/ml kanamycinu, 50 μ l/ml tetracyklin a 7 μ l/ml gentamycinu, 100 μ l/ml X-Gal a 40 μ l/ml IPTG. Následně byla izolována bakmidová DNA.

Kultura o objemu 1,5 ml byla stočena na 14 100 x g po dobu jedné minuty. Peleta byla resuspendována pomocí 300 μ L solution 1 (15mM TRIS-HCl, 10mM EDTA, 100 μ g RNáza). Bylo přidáno 300 μ L solution 2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) a směs byla míchána a inkubována na 5 minut při laboratorní teplotě. Pomalu bylo přidáváno 0,3 ml 3M octanu draselného (pH 5,5) a opatrně bylo se směsí mícháno. Směs byla umístěna na led a inkubována po dobu 5 minut. Následně byla směs centrifugována 10 minut na 14 000 x g. Do druhé sady mikrozkušavek bylo napipetováno 0,8 ml absolutního isopropanolu, byl k němu připipetován supernatant vzorku po centrifugaci a směs byla opatrně promíchána. Zkušavka byla umístěna na led na 5 až 10 minut a následně centrifugována na 15 minut při laboratorní teplotě na 14 100 x g. Supernatant byl odstraněn a bylo přidáno 500 μ L 70 % ethanolu. Zkušavka byla jemně převrácena pro omytí pelety. Směs byla dále centrifugována na 5 minut na 14 100 x g při laboratorní teplotě. Bylo odstraněno co nejvíce supernatantu a peleta byla vysušena na 5-10 minut při laboratorní teplotě. DNA byla rozpuštěna v 40 μ L TE pufru a byla stanovena koncentrace bakmidové DNA. Takto připravená DNA byla skladována krátkodobě při +4 °C anebo při -20 °C dlouhodobě.

4.4 Transfekce hmyzích buněk *Spodoptera frugiperda* ExpiSf9®

4.4.1 Práce s buňkami ExpiSf9®

Rozmrazování buněk

Buňky byly dovezeny na suchém ledu. Lahvička s buňkami byla vyjmuta ze suchého ledu a buňky byly rozmrazovány jemným vířením ve vodní lázni zahřáté na teplotu 27 °C po dobu 1 až 2 minut. Těsně před tím, než byly buňky roztáté, lahvička byla dekontaminována 70% ethanolem a dále se pracovalo v boxu s laminárním prouděním. Celý obsah kryovialky byl přenesen do 125 ml sterilní Erlenmeyerovy třepací baňky, která obsahovala 25 ml předeřátého média CD ExpiSf™. Buňky byly inkubovány bez atmosféry CO₂ při 27 °C v inkubátoru na orbitální třepače při 125 rpm. Tři dny po rozmražení byla stanovena jejich densita a viabilita. Množství buněk a jejich viabilita byla monitorována, dokud buněčná kultura nedosáhla 5 – 10 x 10⁶ buněk na mililitr média.

Pasážování buněk

Pro subkultivaci byly buňky naředěny na koncentraci 0,5 x 10⁶ na mililitr média do čerstvého předeřátého CD ExpiSf™ média do třepací baňky. Buňky byly inkubovány v inkubátoru, dokud kultury nedosáhly hustoty 5 – 10 x 10⁶/ml. Každý den byla stanovována densita a viabilita buněk, aby buňky nepřesáhly exponenciální růstovou fázi a nezačaly odumírat.

Zamrazování buněk

Pro uchování buněk byly buněčné kultury zamrazeny. Buňky byly zamrazeny při konečné hustotě 1 x 10⁷ životaschopných buněk/ml v celkovém objemu 1,5 ml. Zamrazovací médium se skládalo z 92,5 % kondiciovaného média ExpiSf™ CD a 7,5 % DMSO (dimethylsulfoxid). Pro dosažení koncentrace 1 x 10⁷ / ml byly buňky odstředěny při 100 x g po dobu 5 minut, kondiciované médium bylo přeneseno do sterilní 15 ml falkonky a buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml kondiciovaného média. Množství a životnost buněk byla stanovena v Bürkerkově komůrce smícháním buněk v poměru 1:1 s 0,4 % trypanovou modří a nanesením suspenze do komůrky. K buňkám bylo přidáno požadované množství média a požadovaný objem DMSO a celá směs byla jemně promíchána. Okamžitě byl objem

buněk alikvotován do 1,5ml označených kryovialek. Kryovialky byly přeneseny do zařízení pro zamrazování buněk CoolCell a byly umístěny do -80 °C hlubokomrazícího boxu.

4.4.2 Transfekce pomocí kitu ExpiSf9™

V den transfekce byla stanovena densita a viabilita buněk, která musela dosahovat minimálně 95 %. Bylo napipetováno $62,5 \times 10^6$ životaschopných buněk do sterilní 50ml zkumavky. Buňky byly centrifugovány při 100 x g po dobu 5 minut. Byl odstraněn supernatant a buňky byly jemně resuspendovány v 25 ml čerstvého média. Buněčná suspenze byla převedena do 125ml baňky a po dobu přípravy bakmidu byly buňky inkubovány při 27 °C.

Pro přípravu komplexů DNA bakmidu bylo přidáno 30 μ l transfekčního činidla k 1 ml média Opti-MEM™ I s redukováným sérem. Tato směs byla promíchána a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 12,5 μ g bakmidové DNA. Celá směs byla promíchána a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.

Připravená směs bakmidové DNA a Expifectaminu byla opatrně přidána k buněčné suspenzi. Tato směs byla inkubována při 27 °C v inkubátoru s orbitální třepačkou na 125 rpm po dobu 72-96 hodin. Virus byl sbírán, když buněčná viabilita klesla na úroveň 60-80 %. Médium s bakulovirem bylo odpipetováno do zkumavky a centrifugováno na 100 x g po dobu 5 minut. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky. Tento bakulovirus byl označen jako P0 a byl skladován při 4 °C. Vygenerovaný P0 virus byl následně použit pro infekci dalších buněk pro expresi rekombinantního proteinu.

4.4.3 Expese sekretovaného rekombinantního proteinu

Den před infekcí byly buňky zaočkovány na konečnou hustotu 5×10^6 buněk/ml čerstvým médiem. Ihned po nasazení buněk bylo přidáno 100 μ l ExpiSf™ enhanceru, který obsahuje inhibitory deacetylázy histonů, což zvýší prepis rekombinantní mRNA a tím i expresi proteinu. Po tomto ošetření by mělo dojít k postupnému zastavení růstu buněk. Přes noc byly buňky inkubovány při 27 °C na 125 rpm. Druhý den po přidání enhanceru byla určena hustota buněk na mililitr média a viabilita. K buněčným kulturám bylo přidáno množství bakulovirů s MOI 5 dle tabulky č. 14.

Po infekci buněčných kultur bakuloviry bylo pravidelně odebíráno 50 μ l kultury, která byla stočena a následně byla změřena cholinesterázová aktivita v těchto vzorcích. Konečná kultura byla rozdělena po 4-5 ml do zkumavek a buňky byly centrifugovány. Supernatant se sekretovaným enzymem byl zamražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

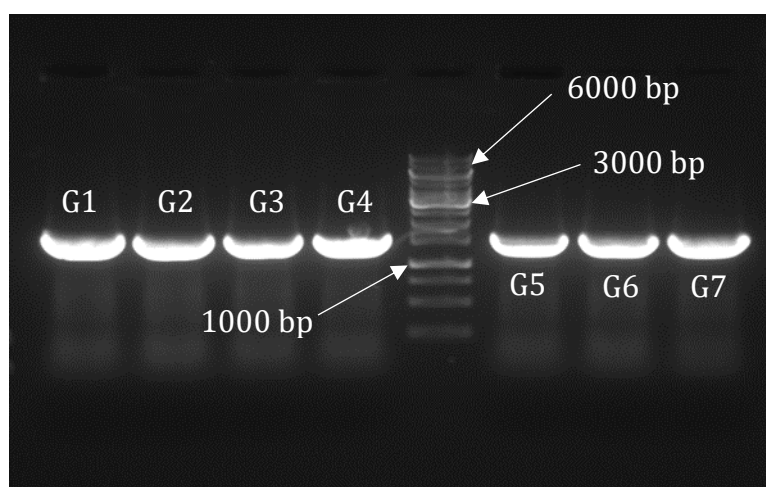
4.5 Měření aktivity enzymu

Enzymová aktivita byla měřena pomocí Ellmanovy metody. Vzorky byly měřeny v triplikátech. Do mikrodestičky bylo převedeno 50 μ l fosfátového pufru, pH 7,4, 10 μ l supernatantu obsahující rekombinantní enzym a 20 μ l 2,5mM DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoová kyselina)). Pro start reakce bylo ke směsi bylo přidáno 20 μ l 1mM substrátu acetylthiocholinjodidu. Závislost absorbance na čase byla měřena ve 20 sekundových intervalech po dobu 2 minut pomocí UV/VIS spektrofotometru Tecan Spark.

5. Výsledky

5.1 PCR na koloniích pFastBac ace1 G119S

Provedená záměna pomocí Quik Change Mutagenesis kitu byla analyzována pomocí PCR na koloniích. Pro potvrzení přítomnosti genu ace1 byla použita reakční směs PPPMasterMix. Analýza PCR reakce probíhala pomocí gelové elektroforézy. Byly detekovány pozitivní kolonie G1, G2, G3, G4, G5, G6 a G7 (Obr. 6), které poskytly PCR amplikon o přibližné velikosti (očekávaná velikost byla 1656 párů bází).



Obrázek 7: PCR na koloniích pFastBac ace1 G119S

5.2 Stanovení koncentrace a čistoty plazmidové DNA

Byly vybrány tři pozitivní kolonie a ty byly zaočkovány pro další práci. Z nočních kultur klonů byla izolována plazmidová DNA pomocí sady Quick Plasmid Miniprep Kit. Na spektrofotometru Tecan Spark byla purifikované plazmidové DNA stanovena čistota a koncentrace pomocí modulu NanoQuant. Byl stanoven také poměr absorbancí při 260 a 280 nm, který udává čistotu purifikované DNA. Výsledná koncentrace a čistota je uvedena v tabulce č. 14. Získaná plazmidová DNA pFastBac nesoucí gen ace1 s vnesenou mutací byla odeslána na sekvenci pro potvrzení provedené mutace.

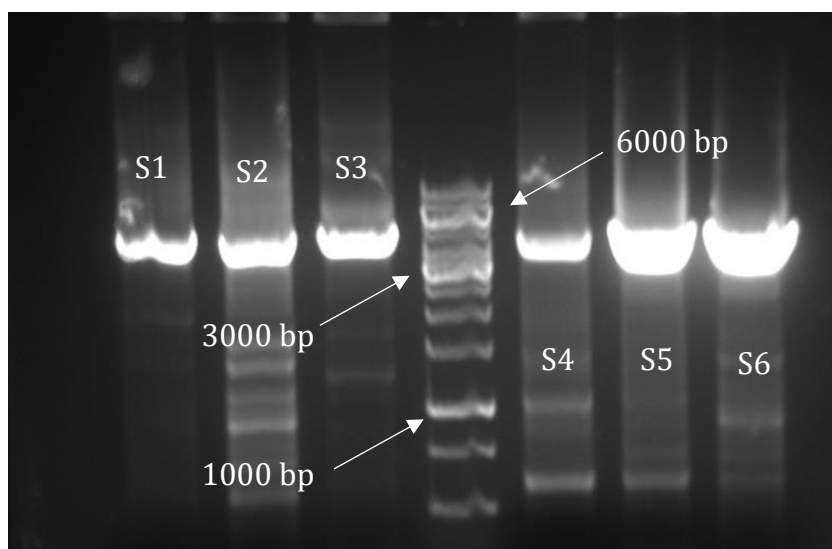
Tabulka č. 8: Stanovení čistoty a koncentrace

Kolonie	Koncentrace [ng/μl]	Čistota 260/280
G1	175	1,88
G2	187	1,88
G3	176	1,88

5.3 Tvorba bakmidu

Rekombinantní bakmid byl vytvořen transformací plazmidu pFastBac ace1 G119S do buněk DH10Bac. Pro identifikaci kolonií obsahující rekombinantní bakmid byl použit modro/bílý test.

Celkem vyrostlo přes 20 bílých kolonií. Bylo odpíchnuto celkem 6 kolonií, u kterých byla stanovena velikost bakmidu jako potvrzení vložení genu ace1 s mutací (obr. 7). Očekávané velikosti prázdného bakmidu a bakmidu s vloženým konstruktem pFastBac ace1 G119S jsou uvedeny v tabulce č. 9. Všechny získané rekombinantní bakmidy měly správnou velikost, a tudíž byly vybrány 2, se kterými se pracovalo dále (označování bakmid S1 a bakmid S3). Rekombinantní bakmidy byly napěstovány a byla izolována bakmidová DNA. Spolu s bakmidy nesoucí gen ace1 se záměnou G119S byla napěstována i kultura bakmidu nesoucí gen ace1 v nezměněné podobě (označení wt – wild type). Získané koncentrace a čistoty bakmidové DNA jsou uvedeny v tabulce č 10.



Obrázek 8: Stanovení velikosti bakmidu jako potvrzení vložení genu ace1 s mutací

Tabulka č. 9: Velikosti produktu PCR

Vzorek	Velikost produktu PCR
Samostatný bakmid	300 bp
Bakmid s pFastBac	2500 bp +1656 bp

Tabulka č. 10: Koncentrace a čistoty izolované plazmidové DNA

Klon	Koncentrace [ng/μl]	Čistota 260/280
S1	1445	1,92
S3	2526	1,98
WT	685	1,91

5.4 Transfekce buněk ExpiSf9 bakmidovou DNA

Před transfekcí byla spočítána densita a viabilita kultur ExpiSf9™. K celkovému počtu $6,25 \times 10^7$ buněk bylo přidáno 12,5 μg bakulovirové DNA v komplexu s Expifectaminem (S1 8,6 μl, S2 4,95 μl a WT1 18,3 μl) v celkovém objemu 25 ml kultury. Byly celkem transfekovány dvě kultury bakmidů S1 a S3 a dvě kultury WT pro nemutovanou formu acetylcholinesterázy (tabulka č. 11). Kultury byly sklizeny po 120 hodinách transfekce a u kultur byla stanovena jejich viabilita. Tyto bakulovirové štoky byly označeny jako P0.

Tabulka č. 11: Densita a viabilita kultur S1, S3, WT1 a WT2

Kultury	S1	S3	WT1	WT2
Densita [b/ml]	$1,11 \times 10^7$	$8,3 \times 10^6$ b/	$6,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
Mortalita [b/ml]	$2,25 \times 10^6$	3×10^6	6×10^6	$8,1 \times 10^6$
Viabilita [%]	83	73	53	46

5.5 Exprese rekombinantních proteinů AgAChE a AgAChE G119S

Pro expresi byla kultura buněk rozpěstována do dostatečné density v 9 samostatných Erlenmeyerových plastových lahvích. Den před začátkem exprese byla u všech lahví stanovena buněčná density (tabulka č.12). Následně bylo do všech kultur přidáno 100 µl ExpiSf™ Enhanceru po dobu 24 hodin. Účinnost enhanceru byla zkontrolována stanovením density buněk po 24 hodinách (tabulka č. 13). K buňkám připraveným na infekci bakuloviry bylo přidáno dle protokolu výrobce určené množství bakulovirového štoku P0. Vzhledem k tomu, že u kultury P0 nebyl stanoven virový titr, postupovalo se dle doporučení výrobce a byl použit základní objem 250 µl a objem dvojnásobný 500 µl kultury P0. Pro kulturu WT1 byl jako u jediné použit také čtyřnásobný objem 1000 µl (tabulka č. 14).

Tabulka č. 12: Koncentrace kultur před přidáním enhanceru

Kultury	Koncentrace [b/ml]
S1, 1	5,45 x 10 ⁶
S1, 2	5,35 x 10 ⁶
S2, 1	5,94 x 10 ⁶
S2, 2	5,8 x 10 ⁶
WT1, 1	5,94 x 10 ⁶
WT1, 2	5,6 x 10 ⁶
WT1, 3	5,3 x 10 ⁶
WT2, 1	5,6 x 10 ⁶
WT2, 2	5,5 x 10 ⁶

Tabulka č. 13: Koncentrace kultur po přidání enhanceru

Kultury	Koncentrace [b/ml]
S1, 1	7 x 10 ⁶
S1, 2	6,1 x 10 ⁶
S2, 1	7,1 x 10 ⁶
S2, 2	6,9 x 10 ⁶
WT1, 1	6,5 x 10 ⁶
WT1, 2	5,7 x 10 ⁶
WT1, 3	6,2 x 10 ⁶
WT2, 1	7,3 x 10 ⁶
WT2, 2	7,4 x 10 ⁶

Tabulka č. 14 - Objem přidanych bakulovirů k buněčným kulturám

Kultury	Objem bakulovirů [μl]
S1, 1	250
S1, 2	500
S2, 1	250
S2, 2	500
WT1, 1	250
WT1, 2	500
WT1, 3	1000
WT2, 1	250
WT2, 2	500

5.6 Stanovení aktivity enzymu AgAChE1 a AgAChE1-G119S

Aktivita enzymu se měřila pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteráz.

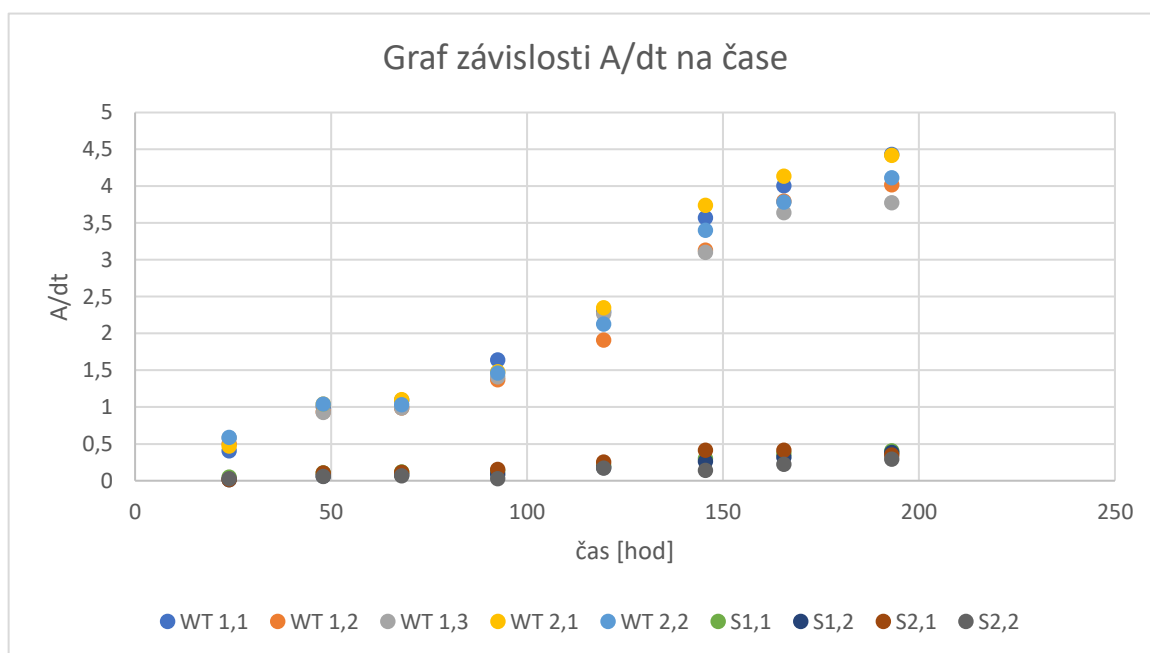
Po infikování buněk bakulovirem byla každý den stanovována aktivita enzymu komáří wild-type acetylcholinesterázy a G119S acetylcholinesterázy. Bylo měřeno

5 expresí wild type ACHE a 4 exprese G119S ACHE. Výsledek enzymové aktivity byl vypočten jako hodnota rozdílu absorbancí za minutu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15: Vypočtené hodnoty aktivit enzymu v čase

čas [hod]	24	48	68	92,5	119,5	145,5	165,5	193
WT1,1 [A/dt]	0,405167	1,005667	1,093467	1,642	2,299	3,57233	4,007	4,429667
WT1,2 [A/dt]	0,5033	0,938267	0,9875	1,37333	1,908667	3,13333	3,797667	4,019
WT1,3 [A/dt]	0,579033	0,928967	0,9901	1,412167	2,267333	3,099667	3,642667	3,776667
WT 2,1 [A/dt]	0,470567	1,042833	1,1039	1,478167	2,350167	3,74	4,13433	4,419
WT 2,2 [A/dt]	0,588467	1,042833	1,031467	1,461167	2,126667	3,40333	3,783	4,11433
S1,1 [A/dt]	0,050067	0,106433	0,120333	0,137833	0,206667	0,304	0,365333	0,406333
S1,2 [A/dt]	0,016167	0,0611	0,080067	0,089	0,180167	0,26333	0,318	0,385667
S2,1 [A/dt]	0,014133	0,106467	0,1136	0,155167	0,252833	0,415667	0,415667	0,350333
S2,2 [A/dt]	0,02905	0,059267	0,0681	0,0305	0,171167	0,143333	0,223667	0,295

Graf 1: Porovnání absorbance AgAChE-1 G119S a AgAChE-1



6. Diskuze

V experimentální části práce byla připravována mutantní forma komáří acetylcholinesterázy AgAChE-1 G119S. Následně byla stanovena aktivita AgAChE-1 G119S a porovnána s aktivitou AgAChE-1. AgAChE-1 G119S vykazovala 7% obrat aktivity AgAChE-1. Tento rozdíl aktivit potvrzuje, že úžlabí u AgAChE-1 G119S je užší pro substrát, může se tedy předpokládat, že toto místo bude užší i pro stávající organofosfátové insekticidy. Tento obrat je jen hrubý odhad, jelikož z kultury buněčného supernatantu nelze určit koncentraci proteinu. Pro stanovení kinetických parametrů je nutno dále pracovat s enzymem a purifikovat ho. Ve světě nově vznikajících populací rezistentních komárů v lokalitách postižených malárií jsou zapotřebí insekticidy schopné překonat rezistenci. Tento mutant může sloužit pro vývoj a *in vitro* testy nově syntetizovaných insekticidů, aby byly účinné i v rezistentní populaci komárů. Nová látka se biochemicky *in vitro* vyzkouší nejen na WT enzymu, ale také na jeho „rezistentní“ formě. [50]

Existují již práce, ve kterých byly připravovány mutantní formy enzymu AChE v bakulovirovém expresním systému, např. Engdahl Cecillia v práci „*Acetylcholinesterases from the Disease Vectors Aedes aegypti and Anopheles gambiae: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues*“ v této práci byl enzym dále purifikován a stanovena hodnota K_M . Pro enzym wild-type 24-36 μM a AgAChE1-G119S vykazoval pokles afinity enzymu k substrátu K_M 58 μM . [75] Další práci zabývající se přípravou AgAChE1 je „*Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, Anopheles gambiae*“. V této práci byl připravován pouze „wild-type“ enzym AgAChE1, který vykazoval K_M 44,5 μM . [76]

V současné době existuje pouze jedna vakcína proti malárii známá jako „RTS, S“. RTS, S injekční vakcína poskytující částečnou ochranu proti malárii u malých dětí. Tato vakcína usiluje o spuštění vlastního imunitního systému těla pro bránění se vůči infekci. Vakcína byla testována v bezpečnostní fázi 3, která skončila v lednu 2014. Studie dokázala, že vakcína má přínos pro veřejné zdraví, proto by se mohly snížit jiné prostředky bojující s přenosem malárie. Implementační program byl zahájen 23. 4. 2019 v Republice Malawi, je jednou ze tří afrických států, ve kterých je vakcína dostupná pro děti starší dvou let. Vakcína bude dostupná v nadcházejících týdnech i v Ghaně a Keni. [77, 78]

Je nutné, aby byly navrženy insekticidy jiného druhu než dnešních čtyř kategorií. Například nově racionálně navržené a vyvinuté insekticidy na bázi thiomocoviny a fenoxycetamidů vykazovaly vysokou účinnost na rekombinantní AChE-1, jak u wild-type, tak mutantní AChE. [79]

S ambicí navrhnout nové insekticidy byly testovány inhibitory na bázi thiomocoviny na enzymatickou aktivitu AChE, jak na rekombinantních proteinech *in vitro*, tak na tkáňových extraktech komárů. Sloučeniny testované *ex vivo* odpovídaly hodnotám IC_{50} stanovených v rekombinantních AChE1. [79]

Existuje hypotéza, že hmyzí specifický cysteinový zbytek umístěný na okraji aktivního místa acetylcholinesterázy, může být novým cílovým místem pro nové insekticidy. Cysteinový zbytek v blízkosti nebo na aktivním místě enzymu může kovalentně vázat malou molekulu, která obsahuje sulfohydroxylovou skupinu nebo odstupující skupinu náchylnou k napadení thiolovou skupinou. [80] [37] Tyto látky již byly připraveny a testovány a vykazovaly selektivitu v inhibici komářího enzymu oproti lidskému. Tyto látky však nebyly testovány dále *in vivo* a nejsou známy ani informace ohledně jejich možné detoxifikace v těle komára.

Po konzultaci odborníků a vědců zabývajících se touto problematikou WHO a globální komunita malárie přednesli vizi „Svět bez malárie“. Tato vize stanovuje cíle, národních programů, za účelem boje s malárií. [20]

Nejlepší řešení je použít kombinaci nebo směs insekticidů různých druhů, kde alespoň jeden z nich má smrtící účinek na komára, který je rezistentní. (např. karbamát nastříkaný na stěnu a pyretroid pro dlouhotrvající efekt). [42]

7. Závěr

Malárie představuje nejzávažnější parazitární infekci, ročně na ni zemře přes 400 000 osob. Díky vývoji genetického inženýrství a přípravě rekombinantních proteinů je možné lépe a snadněji vyvinout účinnou léčbu nebo nové účinnější insekticidy. Produkce rekombinantních proteinů nám také umožňuje studovat biochemické vlastnosti enzymů.

Cílem této práce bylo připravit mutantní komáří acetylcholinesterázu. Na začátku přípravy rekombinantního proteinu metodou bac-to-bac byly navrženy primery vhodné pro amplifikaci cílové sekvence, po PCR-záměně nukleotidů byla templátová DNA rozštěpena pomocí enzymu *Dpn I*. Dále byl transformován plazmid do chemokompetentních buněk. Narostlé kolonie byly analyzovány a poté byl připraven rekombinantní bakmid. Dalším krokem byla transformace vyizolovaného plazmidu do buněk DH10Bac, ze kterých byla izolována bakmidová DNA. Posledním krokem přípravy byl pro expresi genu rekombinantního proteinu vytvořen bakulovirus, kterým byly následně infikovány hmyzí buňky ExpiSf9™. Závěrem práce se měřila aktivita enzymu ze supernatantu buněk.

Z určeného hrubého odhadu obratu aktivit mutantní formy enzymu a wild-type enzymu, by se dále dalo říci, že úzlabí připravené mutantní formy AgAChE-1 G119S je užší pro substrát. Proto se dá předpokládat, že toto místo bude užší i pro stávající organofosfátové insekticidy. Připravená forma mutantního enzymu tímto může pomoci při vývoji nových insekticidů. Nový insekticid by měl vykazovat selektivní inhibici pro komáří enzym s velmi nízkou inhibicí lidského enzymu a zároveň by měl být schopen inhibovat také mutantní formu acetylcholinesterázy G119S, které se vyvinula jako odpověď na selekční tlak při používání stávajících druhů insekticidů.

8. Literatura

- [1] SCHANTZ-DUNN, Julianna a Nawal M NOUR. Malaria and Pregnancy: A Global Health Perspective. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2009, 2(3), 186–192. ISSN 1941-2797.
- [2] HAVLÍK, Jiří. *Infekční nemoci*. Praha: Galén, 2002. ISBN 978-80-7262-173-6.
- [3] HENRY, L. a M. A. KISHIMBA. Levels of pesticide residues in water, soil and sediments from southern Lake Victoria and its basin. *Tanzania Journal of Science* [online]. 2003, 29(1), 77-90–90. ISSN 2507-7961. Dostupné z: doi:10.4314/tjs.v29i1.18368
- [4] *Fact sheet about Malaria* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- [5] WHO | World malaria report 2017. *WHO* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>
- [6] FAJFRLÍK, RNDr Karel. Parazitologie – aktuálně o malárii. nedatováno, 14.
- [7] WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World Malaria Report 2015*. [online]. B.m.: World Health Organization, 2016 [vid. 2019-05-13]. ISBN 978-92-4-069509-2. Dostupné z: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4778804>
- [8] PREVENTION, CDC-Centers for Disease Control and. *CDC - Malaria - About Malaria - Biology* [online]. 28. leden 2019 [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- [9] *Malárie | Lékaři bez hranic* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.lekari-bez-hranic.cz/malarie>
- [10] Malaria - Symptoms and causes. *Mayo Clinic* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/malaria/symptoms-causes/syc-20351184>
- [11] DRAHOTA, Leoš. *Život a smrt komára* [online]. 26. březen 2002 [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.moskyt.net/zivot-smrt-komara>
- [12] VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Praktický slovník medicíny*. Praha: Maxdorf, 1998. ISBN 978-80-85800-81-4.
- [13] KREDBA, ONDRÁČEK, PROCHÁZKA. *Infekční choroby: Učebnice pro lékařské fakulty. 2. vydání. Praha 1: Státní zdravotnické nakladatelství. 2. vyd. 1958.*
- [14] COWMAN, Alan F., Drew BERRY a Jake BAUM. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *The Journal of Cell*

- Biology* [online]. 2012, **198**(6), 961–971. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201206112
- [15] VANIŠTA, Jiří. FARMAKOTERAPIE MALÁRIE V ČESKÉ REPUBLICE. nedatováno, 5.
- [16] HO, Wanxing Eugene, Hong Yong PEH, Tze Khee CHAN a W.S. Fred WONG. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2014, **142**(1), 126–139. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.001
- [17] DAVIES, T. G. E., L. M. FIELD, P. N. R. USHERWOOD a M. S. WILLIAMSON. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology* [online]. 2007, **16**(3), 361–375. ISSN 0962-1075, 1365-2583. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00733.x
- [18] PUKRITTAYAKAMEE, S., K. CHOTIVANICH, A. CHANTRA, R. CLEMENS, S. LOOAREESUWAN a N. J. WHITE. Activities of Artesunate and Primaquine against Asexual- and Sexual-Stage Parasites in Falciparum Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2004, **48**(4), 1329–1334. ISSN 0066-4804, 1098-6596. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.48.4.1329-1334.2004
- [19] GONÇALVES, Daniel a Patrick HUNZIKER. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria Journal* [online]. 2016, **15**(1), 95. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/s12936-016-1163-3
- [20] WORLD HEALTH ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION a GLOBAL MALARIA PROGRAMME. *Global technical strategy for malaria, 2016-2030*. 2015. ISBN 978-92-4-156499-1.
- [21] CARTER, R. Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine*. 2001, **19**(17–19), 2309–2314. ISSN 0264-410X.
- [22] NGUFOR, Corine, Raphael N'GUESSAN, Josias FAGBOHOUN, Damien TODJINOU, Abibath ODJO, David MALONE, Hanafy ISMAIL, Martin AKOGBETO a Mark ROWLAND. Efficacy of the Olyset Duo net against insecticide-resistant mosquito vectors of malaria. *Science Translational Medicine* [online]. 2016, **8**(356), 356ra121-356ra121. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aad3270
- [23] MULLA, Mir S. The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1995, **11**(2), 269–273.
- [24] SODERLUND, David M. Targeting Voltage-Gated Sodium Channels for Insect Control: Past, Present, and Future. In: Aaron D. GROSS, Yoshihisa OZOE a Joel R. COATS, ed. *ACS Symposium Series* [online]. Washington, DC: American Chemical Society, 2017 [vid. 2019-05-13], s. 37–51. ISBN 978-0-8412-3257-0. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2017-1264.ch003

- [25] VAQUERO, Carmen, Markus SACK, Flora SCHUSTER, Ricarda FINNERN, Jürgen DROSSARD, Detlef SCHUMANN, Andreas REIMANN a Rainer FISCHER. A carcinoembryonic antigen-specific diabody produced in tobacco. *The FASEB Journal* [online]. 2002, **16**(3), 408–410. ISSN 0892-6638, 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.01-0363fje
- [26] GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany: H & H, 1995. ISBN 978-80-85787-36-8.
- [27] BOWMAN, Natalie M., Kristin AKIALIS, Grayson CAVE, Roberto BARRERA, Charles S. APPERSON a Steven R. MESHNICK. Pyrethroid insecticides maintain repellent effect on knock-down resistant populations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(5), e0196410. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0196410
- [28] WARMKE, Jeffrey W., Robert A.G. REENAN, Peiyi WANG, Su QIAN, Joseph P. ARENA, Jixin WANG, Denise WUNDERLER, Ken LIU, Gregory J. KACZOROWSKI, Lex H.T. Van der PLOEG, Barry GANETZKY a Charles J. COHEN. Functional Expression of *Drosophila para* Sodium Channels: Modulation by the Membrane Protein TipE and Toxin Pharmacology. *The Journal of General Physiology* [online]. 1997, **110**(2), 119–133. ISSN 0022-1295, 1540-7748. Dostupné z: doi:10.1085/jgp.110.2.119
- [29] ZLOTKIN, Eliahu. The Insect Voltage-Gated Sodium Channel as Target of Insecticides. *Annual Review of Entomology* [online]. 1999, **44**(1), 429–455. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ento.44.1.429
- [30] WHO | Methods and operating procedures for aircraft disinsection. *WHO* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/whopes/resources/WHO-CDS-NTD-VEM-2018.07/en/>
- [31] PHILBERT, Anitha, Sylvester Leonard LYANTAGAYE, Gabriele PRADEL, Che Julius NGWA a Gamba NKWENGULILA. Pyrethroids and DDT tolerance of *Anopheles gambiae* s.l. from Sengerema District, an area of intensive pesticide usage in north-western Tanzania. *Tropical Medicine & International Health* [online]. 2017, **22**(4), 388–398. ISSN 13602276. Dostupné z: doi:10.1111/tmi.12850
- [32] O'REILLY, Andrias O., Bhupinder P. S. KHAMBAY, Martin S. WILLIAMSON, Linda M. FIELD, B. A. WALLACE a T. G. Emyr DAVIES. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal* [online]. 2006, **396**(2), 255–263. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20051925
- [33] TAYLOR, P a Z RADIC. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 1994, **34**(1), 281–320. ISSN 0362-1642, 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pa.34.040194.001433

- [34] VLČEK, Vítězslav a Miroslav POHANKA. *ENVIRONMENTÁLNÍ ASPEKTY UŽITÍ ORGANOFOSFOROVÝCH A KARBAMÁTOVÝCH PESTICIDŮ SCHVÁLENÝCH K UŽITÍ V ČESKÉ REPUBLICE*. B.m.: Ústav Agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, b Centrum pokročilých studií, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Brně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, c Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 50005 Hradec Králové. 2011
- [35] COLOVIC, Mirjana B., Danijela Z. KRSTIC, Tamara D. LAZAREVIC-PASTI, Aleksandra M. BONDZIC a Vesna M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [36] *Gene_locus Report for: anoga-ACHE1* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: http://bioweb.supagro.inra.fr/ESTHER/gene_locus?name=anoga-ACHE1&class=Gene_locus
- [37] PANG, Yuan-Ping, Stephen BRIMIJOIN, David W. RAGSDALE, Kun Yan ZHU a Robert SURANYI. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. *Current Drug Targets*. 2012, **13**(4), 471–482. ISSN 1873-5592.
- [38] RAVES, M. L., M. HAREL, Y. P. PANG, I. SILMAN, A. P. KOZIKOWSKI a J. L. SUSSMAN. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nature Structural Biology*. 1997, **4**(1), 57–63. ISSN 1072-8368.
- [39] LEE, Sehan a Mace G. BARRON. A mechanism-based 3D-QSAR approach for classification and prediction of acetylcholinesterase inhibitory potency of organophosphate and carbamate analogs. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* [online]. 2016, **30**(4), 347–363. ISSN 0920-654X, 1573-4951. Dostupné z: doi:10.1007/s10822-016-9910-7
- [40] PANG, Yuan-Ping. Insect Acetylcholinesterase as a Target for Effective and Environmentally Safe Insecticides. In: *Advances in Insect Physiology* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2019-05-13], s. 435–494. ISBN 978-0-12-417010-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-417010-0.00006-9
- [41] QUINN, Daniel M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* [online]. 1987, **87**(5), 955–979. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr00081a005
- [42] PANG, Yuan-Ping, Fredrik EKSTRÖM, Gregory A. POLSINELLI, Yang GAO, Sandeep RANA, Duy H. HUA, Björn ANDERSSON, Per Ola ANDERSSON, Lei PENG, Sanjay K. SINGH, Rajesh K. MISHRA, Kun Yan ZHU, Ann M. FALLON, David W. RAGSDALE a Stephen BRIMIJOIN. Selective and Irreversible Inhibitors of Mosquito Acetylcholinesterases for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *PLoS ONE* [online]. 2009, **4**(8), e6851. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006851

- [43] DOU, Dengfeng, Jewn Giew PARK, Sandeep RANA, Benjamin J. MADDEN, Haobo JIANG a Yuan-Ping PANG. Novel Selective and Irreversible Mosquito Acetylcholinesterase Inhibitors for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3**(1), 1068. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep01068
- [44] KODRÍK, Dalibor. *Fyziologie hmyzu učební text*. 2004
- [45] KILLEEN, Gerry F, Allison TATARSKY, Abdoulaye DIABATE, Carlos J CHACCOUR, John M MARSHALL, Fredros O OKUMU, Shannon BRUNNER, Gretchen NEWBY, Yasmin A WILLIAMS, David MALONE, Lucy S TUSTING a Roland D GOSLING. Developing an expanded vector control toolbox for malaria elimination. *BMJ Global Health* [online]. 2017, **2**(2), e000211. ISSN 2059-7908. Dostupné z: doi:10.1136/bmjgh-2016-000211
- [46] SUSSMAN, J. L., M. HAREL, F. FROLOW, C. OEFNER, A. GOLDMAN, L. TOKER a I. SILMAN. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*. 1991, **253**(5022), 872–879. ISSN 0036-8075.
- [47] FOURNIER, D, J M BRIDE, F HOFFMANN a Francois KARCH. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *The Journal of biological chemistry*. 1992, **267**, 14270–4.
- [48] SCHMIDT, Monika, Veronika HRABCOVA, Daniel JUN, Kamil KUČA a Kamil MUSILEK. Vector Control and Insecticidal Resistance in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2018, **31**(7), 534–547. ISSN 0893-228X, 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.7b00285
- [49] DJOGBÉNOU, Luc, Valérie NOEL a Philip AGNEW. Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malaria Journal* [online]. 2010, **9**(1), 12. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2875-9-12
- [50] CHEUNG, Jonah, Arshad MAHMOOD, Ravi KALATHUR, Lixuan LIU a Paul R. CARLIER. Structure of the G119S mutant acetylcholinesterase of the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals basis of insecticide resistance. *Structure (London, England : 1993)* [online]. 2018, **26**(1), 130-136.e2. ISSN 0969-2126. Dostupné z: doi:10.1016/j.str.2017.11.021
- [51] WEILL, Mylène, Georges LUTFALLA, Knud MOGENSEN, Fabrice CHANDRE, Arnaud BERTHOMIEU, Claire BERTICAT, Nicole PASTEUR, Alexandre PHILIPS, Philippe FORT a Michel RAYMOND. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* [online]. 2003, **423**(6936), 136–137. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/423136b
- [52] JONES, C. M., M. LIYANAPATHIRANA, F. R. AGOSSA, D. WEETMAN, H. RANSON, M. J. DONNELLY a C. S. WILDING. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2012,

- 109**(17), 6614–6619. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1201475109
- [53] HEMINGWAY, Janet a Hilary RANSON. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology* [online]. 2000, **45**(1), 371–391. ISSN 0066-4170, 1545-4487. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371
- [54] LIU, Nannan. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology* [online]. 2015, **60**(1), 537–559. ISSN 0066-4170, 1545-4487. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-ento-010814-020828
- [55] CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK. Recombinant Proteins. In: *Biotechnology* [online]. B.m.: Elsevier, 2016 [vid. 2019-05-13], s. 335–363. ISBN 978-0-12-385015-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385015-7.00010-7
- [56] KHAN, Suliman, Muhammad Wajid ULLAH, Rabeea SIDDIQUE, Ghulam NABI, Sehrish MANAN, Muhammad YOUSAF a Hongwei HOU. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics* [online]. 2016, **2016**, 1–14. ISSN 2314-436X, 2314-4378. Dostupné z: doi:10.1155/2016/2405954
- [57] OLEMPSKA-BEER, Zofia S., Robert I. MERKER, Mary D. DITTO a Michael J. DINOVI. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2006, **45**(2), 144–158. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2006.05.001
- [58] ZHANG, Jianfeng, E Bart TARBET, Haroldo TORO a De-chu C TANG. Adenovirus-vectored drug–vaccine duo as a potential driver for conferring mass protection against infectious diseases. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2011, **10**(11), 1539–1552. ISSN 1476-0584, 1744-8395. Dostupné z: doi:10.1586/erv.11.141
- [59] MATSUI, Keisuke, Junichi TOGAMI, John G. MASON, Stephen F. CHANDLER a Yoshikazu TANAKA. Enhancement of Phosphate Absorption by Garden Plants by Genetic Engineering: A New Tool for Phytoremediation. *BioMed Research International* [online]. 2013, **2013**, 1–7. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2013/182032
- [60] ULLAH, Muhammad Wajid, Mazhar UL-ISLAM, Shaukat KHAN, Yeji KIM a Joong Kon PARK. Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **136**, 908–916. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.010
- [61] FERRER-MIRALLES, Neus, Joan DOMINGO-ESPÍN, José CORCHERO, Esther VÁZQUEZ a Antonio VILLAVERDE. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* [online]. 2009, **8**(1), 17. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-8-17

- [62] *Protein Expression Systems / Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/protein-expression-systems.html>
- [63] RŮČKOVÁ, E., P. MÜLLER a B. VOJTĚŠEK. [Protein expression and purification]. *Klinická Onkologie: Casopis České a Slovenské Onkologické Společnosti*. 2014, **27 Suppl 1**, S92-97. ISSN 0862-495X.
- [64] CHEN, Rachel. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(5), 1102–1107. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.013
- [65] TECHLOVSKÁ, šárka. *Bioléčiva. Bioprospect: Bulletin biotechnologické společnosti*. 2009
- [66] NIELSEN, Klaus H. Protein Expression-Yeast. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2019-05-13], s. 133–147. ISBN 978-0-12-420070-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420070-8.00012-X
- [67] KHAN, Kishwar Hayat. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin; eISSN 2251-7308* [online]. 2013 [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: doi:10.5681/apb.2013.042
- [68] *Magic™ Cell-free Protein Expression in PURE System - Creative Biolabs* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/cell-free-protein-expression-in-pure-system.html>
- [69] JARVIS, Donald L. Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, 2009 [vid. 2019-05-13], s. 191–222. ISBN 978-0-12-374536-1. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(09)63014-7
- [70] HILL-PERKINS, M. S. a R. D. POSSEE. A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* [online]. 1990, **71**(4), 971–976. ISSN 0022-1317, 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/0022-1317-71-4-971
- [71] *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*. B.m.: Invitrogen. 2015
- [72] SUI, Dong, Kuanquan WANG, Heemin PARK a Jinseok CHAE. Bright field microscopic cells counting method for BEVS using nonlinear convergence index sliding band filter. *BioMedical Engineering OnLine* [online]. 2014, **13**(1), 147. ISSN 1475-925X. Dostupné z: doi:10.1186/1475-925X-13-147
- [73] SIKORSKI, Robert S. a Jef D. BOEKE. [20] In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: From cloned gene to mutant yeast. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, 1991 [vid. 2019-05-13], s. 302–318. ISBN 978-0-12-182095-4. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(91)94023-6

- [74] GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2013, **133**(3), 1–4. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1
- [75] ENGDAHL, Cecilia, Sofie KNUTSSON, Sten-Åke FREDRIKSSON, Anna LINUSSON, Göran BUCHT a Fredrik EKSTRÖM. Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(10), e0138598. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0138598
- [76] JIANG, Haobo, Siwei LIU, Picheng ZHAO a Carey POPE. Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2009, **39**(9), 646–653. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibmb.2009.07.002
- [77] RTS, S. *PATH's Malaria Vaccine Initiative* [online]. 15. září 2015 [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/rtss>
- [78] *Malaria vaccine pilot launched in Malawi* [online]. [vid. 2019-05-13]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/detail/23-04-2019-malaria-vaccine-pilot-launched-in-malawi>
- [79] ENGDAHL, Cecilia, UMEÅ UNIVERSITET a KEMISKA INSTITUTIONEN. *Selective inhibition of acetylcholinesterase 1 from disease-transmitting mosquitoes: design and development of new insecticides for vector control*. Umeå, 2017. Umeå University.
- [80] ERLANSON, D. A., A. C. BRAISTED, D. R. RAPHAEL, M. RANDAL, R. M. STROUD, E. M. GORDON a J. A. WELLS. Site-directed ligand discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(17), 9367–9372. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.17.9367