

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biologie

Vývoj nových insekticidů založených na inhibici cholinesteras

Disertační práce

Autor: Mgr. Veronika Hrabcová

Studijní program: P1501 Biologie

Studijní obor: Aplikovaná biologie a ekologie

Vedoucí práce: prof. Ing. Kamil Kuča, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D

Katedra toxikologie a vojenské farmacie,

Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Brně

Hradec Králové

duben 2020



Zadání disertační práce

Autor: Mgr. Veronika Hrabcová

Studium: S18BI005DK

Studijní program: P1501 Biologie

Studijní obor: Aplikovaná biologie a ekologie

Název disertační práce: **Vývoj nových insekticidů založených na inhibici cholinesteras**

Název disertační práce AJ: Development of novel insecticides based on cholinesterase inhibition

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Malárie je jedním z celosvětových problémů. Dle organizace WHO je 3,2 miliard lidí na světě vystaveno riziku malarické infekce a následnému rozvoji onemocnění. Strategie boje proti šíření tohoto onemocnění je komplexní, kdy jedním z přístupů je plošné použití insekticidů. Použití insekticidů dostupných v současnosti, které inhibují enzymy ze skupiny cholinesteras (organofosfátů a karbamátů), je omezeno kvůli jejich relativně vysoké toxicitě u savců. Proto se v současné době vývoj ubírá směrem k látkám, které by se vyznačovaly selektivní toxicitou vůči hmyzu. Jednou z možných cest je vývoj selektivních inhibitorů hmyzí acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7).

V rámci disertační práce bude vypracovaná metodika pro získání hmyzí AChE. Následně budou pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody otestovány inhibitory AChE z domácí knihovny látek. Inhibiční efekt pro lidský a hmyzí enzym bude vyjádřen hodnotami IC_{50} , které budou následně porovnány a vyjádřeny indexem selektivity. Cílem práce bude zjistit, zda jsou dané látky selektivní vůči hmyzímu enzymu a tak by mohly sloužit jako předlohy nové struktury nových insekticidům.

Seznam doporučené literatury

- Anyanwu, G.I., Molyneux, D.H., Phillips, A., 2000. Variation in cuticular hydrocarbons among strains of the *Anopheles gambiae sensu stricto* by analysis of cuticular hydrocarbons using gas liquid chromatography of larvae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 295?300
- Awolola, T.S., Oduola, O.A., Strode, C., Koekemoer, L.L., Brooke, B., Ranson, H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103, 1139?1145
- Ayad, H., Georghiou, G.P., 1975. Resistance to Organophosphates and Carbamates in *Anopheles albimanus* Based on Reduced Sensitivity of Acetylcholinesterase. J. Econ. Entomol. 68, 295?297

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: prof. Ing. Kamil Kuča, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 1.9.2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla citace všech použitých zdrojů.

V Hradci Králové, dne 20. 4. 2020

Mgr. Veronika Hrabcová

Poděkování

Děkuji Mgr. Monice Schmidt, Ph.D., doc. PharmDr. Danieli Junovi, Ph.D. a prof. Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a vedení při řešení mé dizertační práce. Dále děkuji PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. za vyhodnocení molekulově modelovacích studií. Zároveň děkuji všem pracovníkům a kolegům z katedry toxikologie a vojenské farmacie, fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Brně a Centra biomedicinského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové za odbornou pomoc a podporu v průběhu doktorského studia. V neposlední řadě děkuji za finanční podporu grantům Specifického výzkumu Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové (č. SV UHK 2109/2014 a SV UHK 2107/2015), internímu projektu Fakultní nemocnice Hradec Králové a projektu Ministerstva zdravotnictví České republiky (č. 16-34390A). Nakonec bych chtěla poděkovat laboratoři Miguela Prudencio na pracovišti Instituto de Medicina Molecular, kde jsem absolvovala tříměsíční stáž v rámci fondu mobility Erasmus+.

Anotace

Hrabcová, V. *Vývoj nových insekticidů založených na inhibici cholinesteras*. Hradec Králové, 2020. Disertační práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí disertační práce Kamil Kuča. 124 s.

Onemocnění přenášená vektorem představují asi 17 % odhadované globální zátěže způsobené infekčními chorobami. V roce 2017 bylo celosvětově zaznamenáno 219 milionů nových případů malárie přenášené samičkami komára rodu *Anopheles*. V současné době jsou pro redukci populace komárů *Anopheles gambiae* povoleny čtyři skupiny insekticidů (karbamáty, organofosfáty, pyrethroidy a organochloridy). Vysoká mezidruhová toxicita používaných karbamátů a organofosfátů v kombinaci s rozvojem rezistence k používaným pyrethroidům vede k potřebě nových insekticidních sloučenin. V současné době směřuje výzkum k insekticidům, které by se vyznačovaly selektivní toxicitou vůči hmyzu, kdy jednou z možných cest je vývoj selektivních inhibitorů hmyzí acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7).

V rámci disertační práce byly vypracovány metodiky pro získání AChE z různých druhů hmyzu, jak homogenizací z hlav *Musca domestica* (MdAChE), tak rekombinantní produkci AChE komára *Anopheles gambiae* (AgAChE1). Pomocí Ellmanovy metody byly otestovány inhibitory AChE z interní databáze sloučenin. Inhibiční efekt byl vyjádřen hodnotami IC_{50} a indexem selektivity (IC_{50} lidské AChE/ IC_{50} hmyzí AChE). Z otestovaných sloučenin byly nejúčinnější inhibitory ze skupiny **K1323-K1336** inhibující obě hmyzí AChE v nanomolárních koncentracích. Nejslibnějším inhibitorem MdAChE byla sloučenina **K1324** s hodnotou IC_{50} 13,6 nM a s indexem selektivity 26,1. Nejslibnějším inhibitorem AgAChE1 byla sloučenina **K1328** s hodnotou IC_{50} 6,61 nM a s indexem selektivity 44,2.

Klíčová slova

insekticid, acetylcholinesterasa, malárie, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica*

Annotation

Hrabcová, V. *Development of novel insecticides based on cholinesterase inhibition*. Hradec Králové, 2020. Dissertation Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Kamil Kuča. 124 p.

Vector-transmitted diseases account for about 17 % of the estimated global burden of infectious diseases. In 2017, 219 million new cases of malaria transmitted by female *Anopheles* mosquitoes were reported worldwide. Currently, four groups of insecticides (carbamates, organophosphates, pyrethroids and organochlorides) are permitted to reduce the population of *Anopheles gambiae* mosquitoes. The high interspecies toxicity of the carbamates and organophosphates in combination with the development of resistance to the used pyrethroids lead to the need for new insecticidal substances. Research and development is currently moving towards insecticides that are characterized by selective insect toxicity, one of which is the development of insect selective acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) inhibitors.

In this dissertation thesis, methodology for production of insect AChEs was developed, both by homogenization from heads of *Musca domestica* (MdAChE) and by recombinant production of mosquito *Anopheles gambiae* AChE (AgAChE1). AChE inhibitors from the internal database were evaluated using the Ellman method. The inhibitory effect was expressed by IC₅₀ values and by calculated selectivity index (human AChE IC₅₀/insect AChE IC₅₀). Among tested compounds, the group of compounds **K1323-K1336** inhibited both insect AChEs in the nanomolar range. The most promising MdAChE inhibitor was compound **K1324** with an IC₅₀ value of 13.6 nM and a selectivity index of 26.1. The most promising AgAChE1 inhibitor was compound **K1328** with an IC₅₀ value of 6.61 nM and a selectivity index of 44.2.

Key words

insecticide, acetylcholinesterase, malaria, *Anopheles gambiae*, *Musca domestica*

Seznam použitých zkratek

<i>Ace</i>	gen pro acetylcholinesterasu
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>AgAChE1</i>	acetylcholinesterasa 1 komára <i>An. gambiae</i>
<i>AgAChE1-G119S</i>	rezistentní enzym <i>AgAChE1</i>
<i>AgNP</i>	stříbrné nanočástice
<i>AChE</i>	acetylcholinesterasa
<i>AChE1</i>	acetylcholinesterasa 1
<i>AChE2</i>	acetylcholinesterasa 2
<i>An. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>Bacillus sphaericus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	páry bazí (base pair)
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis var israelensis</i>
<i>C. quiquefasciatus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CA	karbamáty
CAS	katalytické anionické místo
COE	karboxyesterasa
CSP	cirkumsporozoitový povrchový protein
DAR	D1 dopaminový receptor
DDT	1,1'-(2,2,2-trichlorethan-1,1-diyl)bis(4-chlorbenzen)
<i>DmAChE</i>	acetylcholinesterasa <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ES	esterová podjednotka
FBS	fetální bovinní sérum
GST	glutathion S-transferasa

hAChE	lidská acetylcholinesterase
hBChE	lidská butyrylcholinesterasa
IGR	regulátory růstu hmyzu
IRS	indoor residual spraying
ITNs	ochranné sítě ošetřeny insekticidem (insecticide-treated nets)
kDa	kilodaltony
<i>Kdr</i>	knockdown rezistence
K_m	Michaelisova konstanta
<i>MdAChE</i>	acetylcholinesterasa <i>Musca domestica</i>
<i>M. domestica</i>	<i>Musca domestica</i>
MOI	multiplicita infekce
OP	organofosfáty
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAS	periferní anionické místo
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	real-time PCR
SDS-PAGE	gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsíranu sodného
Sf9	hmyzí buňky <i>Spodoptera frugiperda</i>
SH	thiolová skupina
<i>TcAChE</i>	acetylcholinesterasa <i>Torpedo californica</i>
THA	takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin)

WHO	Světová zdravotnická organizace
WHOPES	WHO pesticides evaluation scheme
WT	alela divokého typu
<i>Z. diphylla</i>	<i>Zornia diphylla</i>
7-MEOTA	7-methoxytakrin

Obsah

Úvod	12
1 Malárie	13
2 Vývojový cyklus rodu <i>Plasmodium</i>	14
3 Léčiva blokující přenos malárie	16
4 Vakcinace	17
5 Kontrola vektorů malárie	18
5.1 Insekticidy působící na sodné kanály	19
5.2 Insekticidy inhibující acetylcholinesterasu	23
5.3 Regulátory růstu hmyzu.....	28
5.4 Bakteriální larvicidy	29
6 Mechanismus rezistence komára <i>Anopheles gambiae</i>	30
6.1 Modifikace cílových míst napětově řízených iontových kanálů	30
6.2 Modifikace cílových míst acetylcholinesterasy	31
6.3 Metabolická detoxifikace	31
7 Strategie k překonání rezistence.....	34
8 Nově navržené insekticidy	36
9 Cíle disertační práce	46
10 Metodika.....	47
10.1 Chemikálie.....	47
10.2 Příprava muší acetylcholinesterasy	47
10.2.1 Příprava mušního homogenátu	47
10.2.2 Purifikace muší AChE.....	47
10.3 Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára <i>Anopheles gambiae</i>	49
10.3.1 Amplifikace templátové DNA.....	49
10.3.2 Bac-to-Bac® TOPO® klonovací systém	51
10.3.3 Bac-to-bac® HBM TOPO sekreční expresní systém	53
10.3.4 Transfekce izolované bakmidové DNA	54
10.3.5 Kvantifikace bakulovirů metodou real-time PCR.....	54
10.3.6 Amplifikace virového titru roztoku.....	56
10.3.7 Exprese rekombinantní AgAChE1.....	56
10.3.8 Purifikace rekombinantní AgAChE1	57

10.4	Stanovení aktivity acetylcholinesterasy pomocí Ellmanovy metody	57
10.5	Charakterizace enzymu pomocí stanovení Michaelisovy konstanty.....	58
10.6	Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE	58
10.7	Statistické vyhodnocení dat	63
11	Výsledky.....	64
11.1	Příprava muší acetylcholinesterasy	64
11.1.1	Příprava mušího homogenátu	64
11.1.2	Purifikace muší AChE.....	66
11.2	Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára <i>Anopheles gambiae</i>	67
11.2.1	Amplifikace templátové DNA.....	67
11.2.2	Bac-to-Bac® TOPO® klonovací systém	68
11.2.3	Bac-to-Bac® HBM TOPO® sekreční expresní systém	69
11.2.4	Transfekce izolované bakmidové DNA	70
11.2.5	Kvantifikace bakulovirů metodou real-time PCR.....	71
11.2.6	Purifikace rekombinantní AgAChE1	73
11.3	Charakterizace enzymů pomocí stanovení Michaelisovy konstanty.....	80
11.4	Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE	81
12	Diskuze.....	93
12.1	Příprava muší acetylcholinesterasy	93
12.2	Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára <i>Anopheles gambiae</i>	95
12.3	Charakterizace enzymu pomocí stanovení Michaelisovy konstanty.....	98
12.4	Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE	99
13	Závěr	106
14	Seznam použité literatury	108
15	Seznam publikovaných prací.....	122
15.1	Seznam publikací vztahujících se k disertační práci	122
15.2	Seznam publikací nevztahujících se k disertační práci	122
15.3	Abstrakta z přednášek a konferencí	123
16	Přílohy	124

Úvod

Hmyzem přenášená infekční onemocnění patří mezi hlavní příčiny nákazy a úmrtí v tropických a subtropických zemích. V roce 2017 bylo dle Světové zdravotnické organizace (WHO) celosvětově zaznamenáno 219 milionů nových případů malárie přenášené samičkami komára rodu *Anopheles*, které mělo za následek 435 000 úmrtí. Malárie je nejrozšířenější v Africe (92 %), dále pak v Jihovýchodní Asii (5 %) a v zemích Blízkého východu (2 %) (WHO, 2018).

Kontrola vektorů malárie je obecně neúčinnějším opatřením prevence přenosu onemocnění, a proto je jedním ze základních prvků globální strategie pro kontrolu malárie (WHO, 2008). V současné době jsou pro redukci populace komárů *Anopheles gambiae* (*An. gambiae*) dle WHOPES (WHO pesticides evaluation scheme) povoleny čtyři skupiny insekticidů (karbamáty, organofosfáty, pyrethroidy a organochloridy) (WHO, 2006a). Karbamáty a organofosfáty jsou zástupci insekticidů inhibující AChE (Hemingway and Ranson, 2000). AChE je serinová hydrolasa umístěná v nervosvalových ploténkách a cholinergních synapsích u bezobratlých i u obratlovců (Kim et al., 2010; Lu et al., 2012). Funkcí AChE je regulace cholinergní transmise štěpením neurotransmiteru acetylcholinu. AChE je velmi účinný enzym a jeho inhibice vede k akumulaci acetylcholinu v synapsi a tím k zamezení ukončení nervového přenosu (Toutant, 1989).

Vzhledem k dlouhodobě zvýšené spotřebě insekticidů byl pozorován nárůst rezistence u exponovaného hmyzu (Awolola et al., 2009; Mutunga et al., 2015). Také toxicita organofosfátů a karbamátů vůči necílovým organismům a jejich perzistence v půdě (Jeyaratnam, 1990; Satoh and Gupta, 2011) vedla k vývoji nových insekticidů, které by se vyznačovaly vyšší selektivitou vůči hmyzím enzymům. V rámci předkládané disertační práce byla zdrojem hmyzí AChE zvolena moucha domácí (*Musca domestica*) pro její dobrou dostupnost. Cílem práce bylo na získaném homogenátu otestovat již dříve popsané inhibitory AChE, zjistit jejich účinek a selektivitu k hmyzímu enzymu. Dále byla rekombinantní produkcí připravena AgAChE1 komára *An. gambiae*, na které byly testovány stejné inhibitory s následným vyhodnocením mezidruhové selektivity.

1 Malárie

Malárie je u člověka způsobena 5 druhy parazita rodu *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* a *P. knowlesi*) (WHO, 2015a; Winzeler, 2008). Pro člověka je nejvirulentnějším druhem *P. falciparum*, který se nejčastěji vyskytuje v Africe (Klein, 2013). *P. falciparum* je původcem tzv. tropické malárie vyznačující se malarickými záchvaty s nepravidelnou periodicitou – od každodenní až po třídní (maligní terciána). Na druhou stranu *P. vivax* je původcem tzv. benigní terciány se záchvaty opakujícími se každých 48 hodin (Volf and Horák, 2007). Oproti výše zmíněnému *P. falciparum* je druh *P. vivax* daleko více rozšířen v Asii a Americe, pravděpodobně díky jeho adaptaci na chladnější prostředí. *P. vivax* je schopný dokončit vývojový cyklus v komárovi rodu *Anopheles* i za nižších teplot i přežít období zimy, během kterého není komár jako mezihostitel dostupný vůbec (WHO, 2015a; Winzeler, 2008). *P. vivax* a *P. ovale* jsou známí pro své latentní jaterní stádium, které může být zaktivováno měsíce po prvotní infekci a vyvolat tak relaps klinických příznaků (Klein, 2013). *P. ovale* je také původcem benigní terciány a řadou dalších vlastností je podobné onemocnění *P. vivax*. *P. malariae* se vyskytuje v tropech a subtropích Afriky a Jižní Ameriky, kde způsobuje tzv. kvartánu se záchvaty opakujícími se v 72 hodinových intervalech (Volf and Horák, 2007).

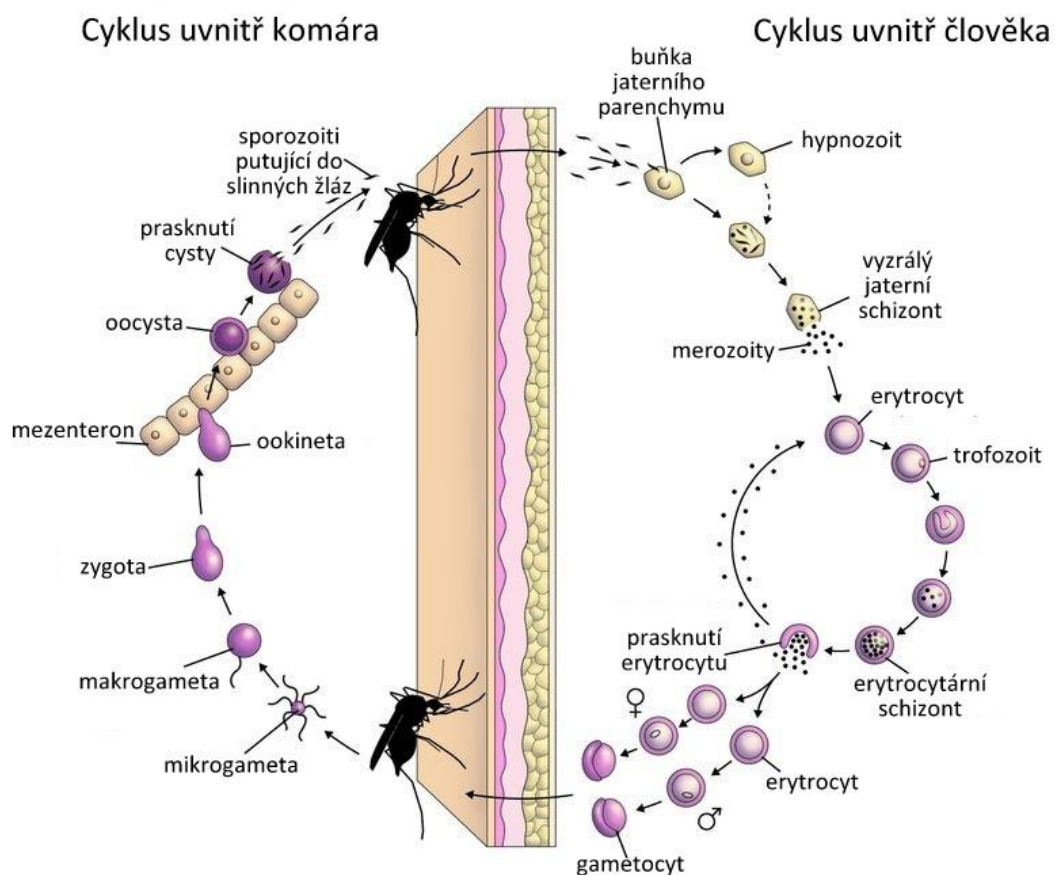
V posledních dekádě byly v lesnatých oblastech Jihovýchodní Asie zaznamenány případy malárie způsobené *P. knowlesi*, u kterých byl popsán přenos z infikovaných opic na člověka, proto se tento typ onemocnění řadí mezi zoonózy (WHO, 2015a). Zvláštním typem indukované nákazy je tzv. letištní malárie postihující vesměs zaměstnance provozu nebo osoby bydlící v blízkosti letiště (v okruhu cca 30 km). Nákazu způsobují infikovaní komáři, kteří jsou přepraveni v prostorách letadel. Obdobně jsou také popsány případy nákazy z okolí námořních a říčních přístavů (Jíra, 2009).

2 Vývojový cyklus rodu *Plasmodium*

Malárie je přenášena na člověka při sání samičky komára *Anopheles*, při kterém jsou sporozoitů inokulováni do krve hostitele (Prudêncio et al., 2006; Winzeler, 2008). Pro vývojový cyklus rodu *Plasmodium* (Obrázek 1) je charakteristické střídání dvou hostitelů – člověka jako hostitele a komára jako přenašeče (Jíra, 2009). U člověka dochází k sérii rozmnožovacích cyklů (schizogonií), z nichž první a několik dalších probíhá asymptomaticky v buňkách jaterního parenchymu (exoerytrocytární schizogonie) (Bednář et al., 1996). Po inokulaci *Plasmodium* do krve hostitele putuje ve formě sporozoitu do jater a tam tvoří parazitoformní vakuolu (PV). V této fázi může zůstat latentní ve formě hypnozoitu (např. *P. vivax* a *P. ovale*) nebo pokračovat dále ve vývoji k tvorbě stovek merozoitů (Sturm et al., 2006; Winzeler, 2008). Paraziti následně migrují do jaterních sinusoid, kde tvoří meronty (Volf and Horák, 2007; Winzeler, 2008). Mezi druhými až šestnáctým dnem v závislosti na druhu, nově vytvoření merozoiti (až 20 000 jedinců) pronikají do jaterních sinusoid, kde napadají cirkulující erytrocyty (Jíra, 2009; Prudêncio et al., 2006). Během dalších 48 hodin parazit projde dalšími intraerytrocytárními stádii (prstencové formy s centrální vakuolou, trofozoit a schizont), kdy jeden schizont produkuje přibližně dalších 16 nových dceřiných merozoitů (Klein, 2013). Následně infikované erytrocyty praskají ve vzájemné synchronii, což má za následek klinicky charakteristické cykly horečky a zimnice (Klein, 2013; Prudêncio et al., 2006; Winzeler, 2008). U neimunizovaných jedinců je inkubační doba malárie 7–30 dní. Typickými příznaky onemocnění jsou horečka, pocení, zimnice, bolest hlavy, nauzea a zvracení (CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2019; Volf and Horák, 2007).

Při každé replikaci část merozoitů tvoří pohlavní stádium gametocytů, které je schopno infikovat vnímavé komáry (Klein, 2013). V případě, že jsou gametocyty nasáty komárem, okamžitě dochází k přeměně na aktivní samčí a samičí gamety, které společně vytvoří zygotu (Klein, 2013; Winzeler, 2008). Zygota se během 18-24 h mění na ookinetu červovitého tvaru, která prochází střevní stěnou (mezenteron) komára. Po průchodu střevní stěnou se ookineta usadí na vnějším povrchu mezenteronu a změní se v kulovitou oocystu s několika

jádry obklopenou pouzdrém. Oocysta se během 4-21 dní zvětšuje, z polyploidního syncytiálního jádra se formuje sporoblast, kde se vytvářejí vřetenovité sporozoiti. Výsledkem asi 11 synchronních mitotických dělení je tvorba asi 8000 sporozoitů v každé oocystě. Z tisíců gametocytů nasátých s krví hostitele se tvoří jen 50-100 ookinet a jen některé z nich vytvoří oocysty. Zralí sporozoiti, kteří po ruptuře oocysty vstupují do hemocelu, putují hemolymfou do slinných žláz komára (Jíra, 2009). Zde čekají na vhodného hostitele (zde mohou přežívat 50 i více dnů), kde při sání komára znovu zopakují svůj cyklus (Jíra, 2009; Klein, 2013; Winzeler, 2008).

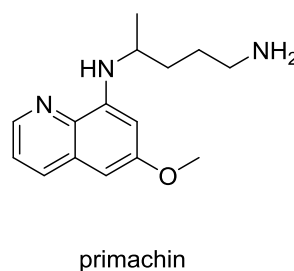
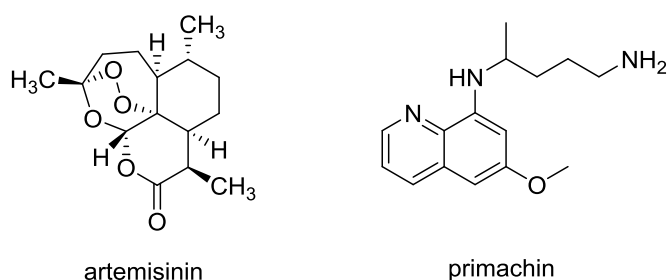


Obrázek 1. Schematické znázornění vývojového cyklu malárie. Převzato z MALWEST (2016).

Z 50 000 nově vytvořených sporozoitů je jen 15-80 jedinců inokulováno do hostitele (Sinden and Billingsley, 2001). Přenos malárie z člověka na komára je závislý na vývoji pohlavních stádií *Plasmodium*, a proto je řada opatření zabraňující šíření malárie cílena právě na tato stádia (Cowman et al., 2016).

3 Léčiva blokující přenos malárie

Sporogonická fáze vývojového cyklu *Plasmodium* je jedním z klíčových míst pro prevenci šíření malárie. Jedna ze strategií, jak snížit prevalenci šíření malárie v endemických oblastech, je zacílena na vývojová stádia uvnitř komára. Nová antimalarika s účinkem blokujícím přenos nemoci mají za cíl přerušit přenos z infikovaného jedince na vektor nemoci a eliminovat tak parazity z komárů (Griffin et al., 2010). Prvním krokem k nalezení sloučenin s gametocidním účinkem byl screening komerčně dostupných antimalarik (Pukrittayakamee et al., 2004). Principem účinků léčiv blokujících přenos je zničení většiny gametocytů v krvi hostitele, kdy ta již není nadále infekční pro komára (Gonçalves and Hunziker, 2016). V minulosti byla vyvinuta klíčová dvojkombinace léků artemisininu s primachinem (Obrázek 2), která sloužila k eliminaci malárie například v Kambodžských vesnicích (Song et al., 2010). Nicméně není úplně jasné, zda je to gametocidní účinek, který je zodpovědný za snížení výskytu onemocnění v populaci (Graves et al., 2015). Doporučené dávkování pro člověka k docílení gametocidního účinku je dle WHO 0,25 mg/kg primachinu v kombinaci s artemisininem. Mezi další lékové kombinace registrované v některých zemích patří například artesunat s pyronaridinem, arterolan s piperachinem, artemisinin s naftochinem a artemisinin s piperachinem (WHO, 2015b). Dalšíh několik nových lékových přípravků čeká na výsledky klinického hodnocení, aby mohly být schváleny jako nová antimalarika (Okombo and Chibale, 2018).



Obrázek 2. Chemická struktura běžně používaných léčiv blokujících přenos malárie.

4 Vakcinace

K celosvětové eradikaci malárie je potřeba kombinace nových přístupů a nástrojů, z nichž jednou z možností je vakcinace. V minulosti vývoj vakcín cílil na exoerytrocytární stádium (sporozoiti a jaterní infekci), erytrocytární stádium a blokování přenosu (pohlavní stádium - gametocyty) (Barry and Arnott, 2014; Cowman et al., 2016). Plně účinná vakcína proti gametocytům může přerušit cyklus přenosu onemocnění, ale nebude mít přímý účinek na průběh infekce u očkovaného jedince. Na druhou stranu vakcíny cílené na erytrocytární stádium mohou mít vliv také při kontrole morbidity a mortality (Jíra, 2009).

Nejpokročilejší vakcínou v klinických studiích je RTS,S/AS01 (obchodní název Mosquirix) cílená na sporozoity. Tento typ očkování indukuje humorální a buněčnou imunitní odezvu proti specifickému povrchovému proteinu (cirkumsporozoitový povrchový protein - CSP), který je přítomný na povrchu sporozoitů *P. falciparum* i u schizontů jaterní fáze infekce (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2014). Tento typ vakcíny se dostal do III. fáze klinického testování, které se účastnilo 15 000 afrických dětí. V dalším roce probíhající studie bylo zjištěno, že vakcinace tří dávek snížila výskyt onemocnění o 28 % u malých dětí a o 18 % u kojenců (Greenwood and Doumbo, 2016). V současné době probíhá implementační program RTS,S vakcíny ve třech zemích subsaharské Afriky. Pilotní program je navržen tak, aby generoval důkazy a zkušenosti s vakcínou v souvislosti s běžnou imunizační prací (WHO, 2019a). RTS,S/AS01 vakcína je považována za experimentální standard, se kterým budou v budoucnu porovnávány všechny nově vyvinuté vakcíny (Cowman et al., 2016; Greenwood and Doumbo, 2016). Dlouhodobý cíl výzkumu je do roku 2030 vyvinout druhou generaci vakcín/y, která by dokázala poskytnout dlouhodobou ochranu a účinek proti více druhům *Plasmodium* (Barry and Arnott, 2014).

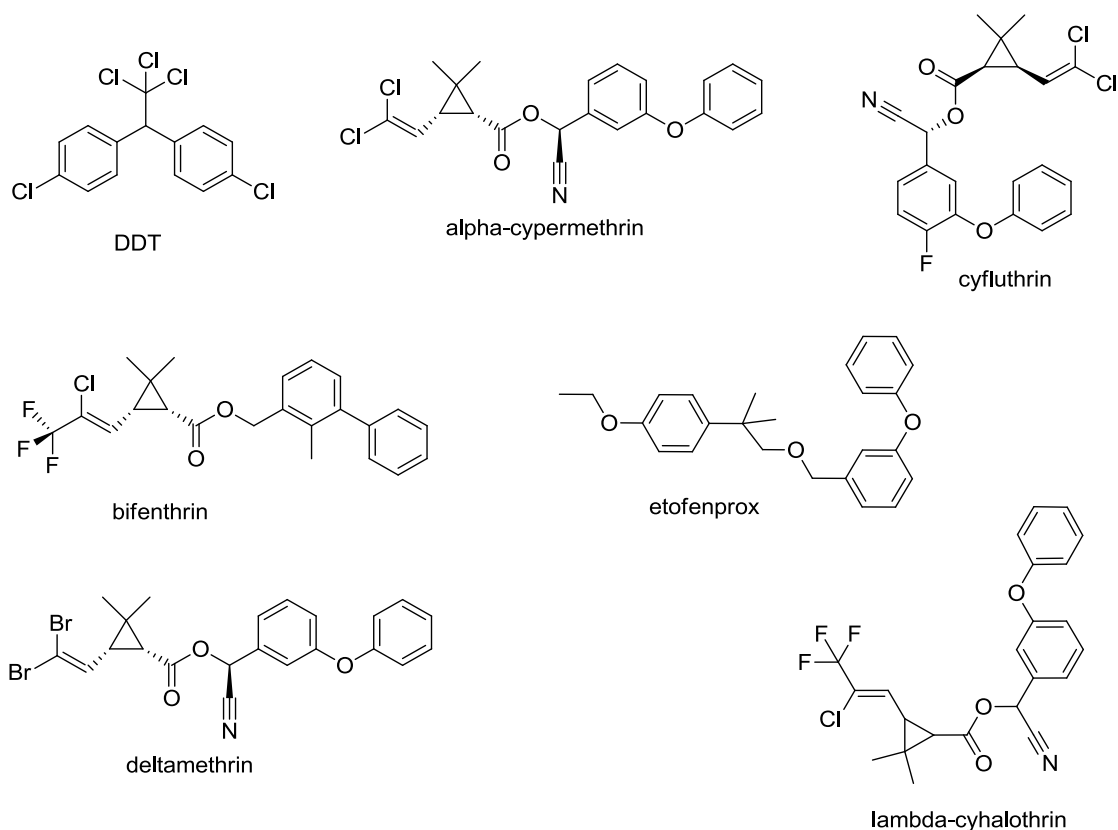
5 Kontrola vektorů malárie

Komár hraje důležitou roli ve vývojovém cyklu *Plasmodium*, a proto eliminace tohoto vektoru pomocí insekticidů hraje zásadní roli při redukci přenosu malárie. Od použití dichlorodifenyltrichloroethanu (DDT) a dalších organochlorových insekticidů ve 40. letech 20. století spočívala kontrola přenašečů malárie převážně na účinku chemických insekticidů (van den Berg et al., 2012). DDT v kombinaci s pyrethroidy hraje dodnes důležitou roli v kontrole komárů přenášejících malárii. Když bylo v roce 1996 v Jižní Africe vyloučeno DDT z programu pro kontrolu malárie, došlo k historicky největšímu rozšíření malárie v zemi. V rozmezí let 1996 až 2000 došlo v Jižní Africe k nárůstu nových případů malárie až o 450 % a mortalita vzrostla téměř o 1 000 %. Epidemie takového rozsahu se dostala znovu pod kontrolu až se znovuzavedením DDT v roce 2000 (Davies et al., 2007a).

V současnosti jsou pouze čtyři skupiny insekticidů schváleny v oblasti veřejného zdraví dle WHO pesticides evaluation scheme (WHOPES) (WHO, 2006a). Jedná se o organochloridy, karbamáty, pyrethroidy a organofosfáty. Tyto insekticidy můžeme dále dělit podle mechanismu účinku na insekticidy ovlivňující napětově řízený sodíkový kanál (organochloridy, pyrethroidy) nebo enzym AChE (karbamáty, organofosfáty). Všechny výše zmíněné skupiny insekticidů mohou být použity pro systematickou aplikaci residuálních insekticidních postřiků, ale pouze pyrethroidy byly schváleny k použití na moskytiérách. Účinek moskytiér ošetřených pyrethroidy je výrazně zvýšen vytvořením tzv. chemického haló efektu, který rozšíří účinek insekticidu i mimo moskytiéra. Tato aplikace má komára odpudit a tak zabránit saní komára na člověku anebo komára přímo usmrtit. Protože pyrethroidy jsou jediným povoleným typem insekticidů schváleným pro použití na moskytiérách, je nutné používání této třídy zachovat po dostatečně dlouhou dobu i přes rozšíření rezistence (Davies et al., 2007a). V oblastech s rozšířenou rezistencí vůči pyrethroidním insekticidům byla provedena studie, která i přesto potvrdila snížení přenosu malárie při použití moskytiéry impregnované pyrethroidy (N'Guessan et al., 2001).

5.1 Insekticidy působící na sodné kanály

Pyrethroidy a organochlorové látky (např. DDT) působí na nervový systém hmyzu pomocí sodných (Na^+) napětově řízených kanálů umístěných v plasmatické membráně buněk. V současnosti jsou pyrethroidy považovány za nejbezpečnější a nejúčinnější insekticidy používané ke kontrole populace malarických komárů. Jak bylo zmíněno výše, jsou jedinou schválenou třídou insekticidů používaných na moskytiérách z důvodu jejich nízké toxicity pro člověka a selektivnímu účinku ke komárům (WHO, 2006a). Chemické struktury sloučenin doporučených organizací WHO pro aplikaci pomocí residuálních insekticidních postřiků jsou uvedeny viz. Obrázek 3.

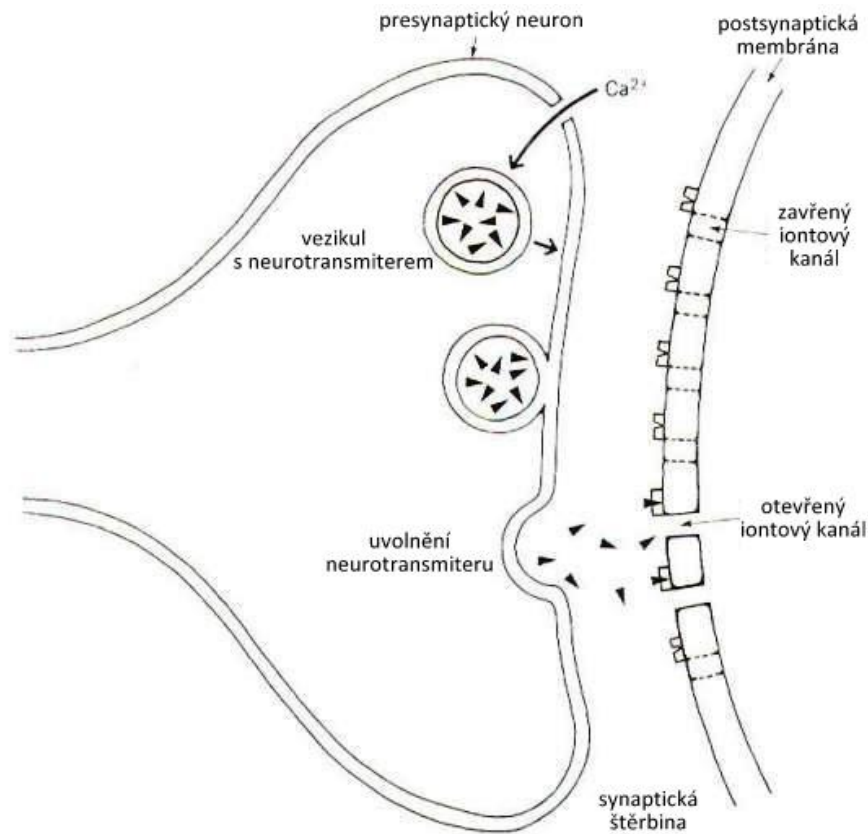


Obrázek 3. Chemická struktura organochlorové sloučeniny (DDT) a pyrethroidů doporučené WHO pro aplikaci residuálních insekticidních postřiků.

Selektivní toxicita pyrethroidních insekticidů je založena na jejich vyšší afinitě k hmyzímu Na^+ kanálu oproti lidskému (Warmke et al., 1997; Zlotkin, 1999). Také rozdílná tělesná teplota a menší velikost hmyzu v porovnání

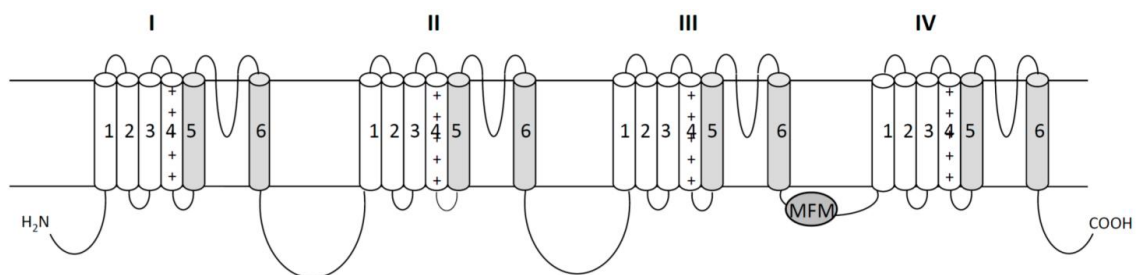
s člověkem hraje roli v selektivní toxicitě. Například toxický účinek DDT a pyrethroidů značně stoupá s nižší teplotou. Metabolismus insekticidů je u hmyzu pomalejší než u člověka a to v kombinaci s malým hmyzím tělem vede k dostupnosti insekticidu v cílovém místě ještě před jeho případnou detoxifikací (Narahashi, 1992; Zlotkin, 1999).

Na⁺ kanály mají klíčovou roli v přenosu elektrického signálu v nervové soustavě (Obrázek 4). Tyto transmembránové proteiny tvoří póry (kanály), které jsou vysoce selektivní pro sodné ionty. Za běžných podmínek ionty sodíku aktivují kanál, který se otevře, čímž dojde ke změně náboje (depolarizace) a následnou repolarizaci membrány se kanál znovu uzavře. Tento proces trvá několik milisekund a sodíkový kanál je ihned deaktivován. DDT a pyrethroidy se přednostně vážou na otevřený Na⁺ kanál a tím ho stabilizují (Bloomquist, 1996; Narahashi, 2000; Vijverberg and Bercken, 1982). Na⁺ kanál s navázanými insekticidy má prodlouženou odezvu z milisekund na minuty a zpoždění deaktivace vede k setrvalé excitaci. To má za následek potlačení amplitudy nervového impulsu, zvýšené uvolňování neurotransmiteru a blokovanou excitaci sodíkových kanálů (Bloomquist, 1996; Narahashi, 1996; Vijverberg and Bercken, 1990).



Obrázek 4. Mechanismus synaptického přenosu. Upraveno z CNS Clinic-Jordan (2016).

Gen kódující α -podjednotku Na^+ kanálu komára *An. gambiae* obsahuje 6420 párů bazí (base pair, bp) a dává vzniknout proteinu o délce 2139 aminokyselin s předpokládanou molekulovou hmotností 240 kDa. Na^+ kanál je integrální transmembránový protein s očekávanou topologií čtyř velkých hydrofobních domén (I-IV), kde každá doména má šest α -helixových membránových segmentů (S1-S6) spojených smyčkou (Obrázek 5) (Davies et al., 2007b).



Obrázek 5. Topologie komářího Na^+ kanálu a jeho strukturální charakteristiky. Homologní domény jsou značeny I-IV. Transmembránové segmenty domén jsou popsány

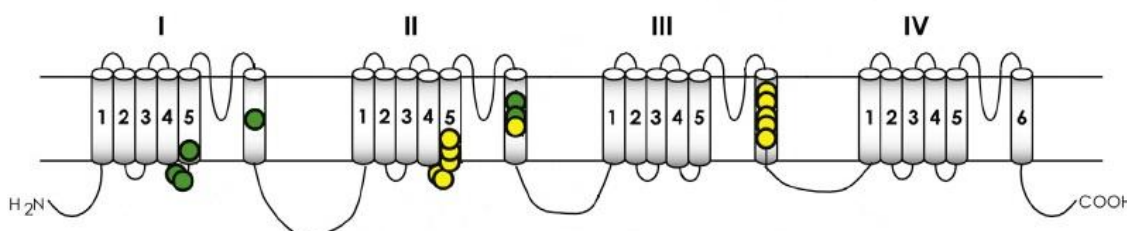
číslicemi 1-6, Šedě označené segmenty formují transmembránový pór. S4 obsahuje kladně nabitě AMK značené „+“. MFK část zodpovědná za inaktivaci kanálu. Převzato z Du et al. (2016).

V každé doméně segmenty S1-S4 tvoří modul detekující napětí, který je kvazi-symetricky rozmístěn kolem vnějšího okraje modulu póru. Segmenty S5 a S6 spojené P-smyčkou tvoří tzv. membránový pór (Obrázek 5, šedá výplň). Každý S4 segment, který slouží jako napěťový senzor kanálu, obsahuje opakované motivy (dva hydrofobní aminokyselinové zbytky a jeden pozitivně nabitý). Po depolarizaci membrány se segmenty S4 pohybují v extracelulárním směru, což iniciuje konformační změnu, během které se C-terminální poloviny segmentů S6 (aktivační brána) posouvají od osy pórů, čímž dojde k jeho otevření. Během posuvu kanálu krátké intracelulární spojovací řetězce mezi segmenty S4 a S5 přenášejí pohyb na segmenty S5 a S6. Po krátkém otevření dochází k rychlé inaktivaci Na⁺ kanálů, která je zprostředkována inaktivační částicí fyzicky uzavírající vnitřní póry. Část inaktivace je lokalizována v krátkých intracelulárních spojovacích oblastech domén III a IV a je tvořena hlavně motivem MFM (aminokyselinové zbytky methioninu, fenylalaninu a methioninu). Methionin v motivu MFM je zásadní pro rychlou inaktivaci v Na⁺ kanálech u hmyzu, naproti tomu u člověka je substituován isoleucinem (IFM-aminokyselinové zbytky isoleucinu, fenylalaninu a methioninu) (Du et al., 2016).

Ačkoli je kódující DNA sodného kanálu mušky *Drosophila melanogaster* shodná z 82 % se sekvencí komára *An. gambiae*, alternativní sestřih vede u obou organismů k různým variantám Na⁺ kanálů, které se liší svou citlivostí k daným insekticidům (Davies et al., 2007a). Dalším procesem, který může ovlivnit různou funkci Na⁺ kanálů, je editace RNA. Posttranskripční modifikace mohou vést ke změně přepisu transkriptu v cílovém místě (záměnou jednotlivých bazí, jejich inzercí nebo delecí). Identifikace vzniklých variant tak poskytuje zásadní informace ohledně pořadí aminokyselin v Na⁺ kanálu, což hraje důležitou roli při interakcích s insekticidy (Davies et al., 2007b; Dong et al., 2014).

I když DDT a pyrethroidy mají stejný mechanismus účinku, liší se místem vazby na Na⁺ kanál. V otevřeném Na⁺ kanále se oblast vazající insekticidy nachází v hydrofobní kavitě spirály tvořené doménou II S4 (ohraničené S4-S5 řetězcem),

doménou II S5 a doménou III S6. Tato kavita je přístupná z lipidové dvojvrstvy, a proto se zde vážou lipofilní insekticidy (Obrázek 6). Vazba insekticidu na kanál jej stabilizuje v otevřené formě (O'Reilly et al., 2006). Tento princip byl potvrzen cílenou mutagenezí klíčových reziduí ve vazebné oblasti Na⁺ kanálů u švába (*Blattodea sp.*) a u octomilky (*Drosophila melanogaster*), kdy záměny aminokyselin zodpovědných za interakci insekticidů s kanálem vedly ke ztrátě citlivosti k tomuto insekticidu (Du et al., 2009; Usherwood et al., 2007).



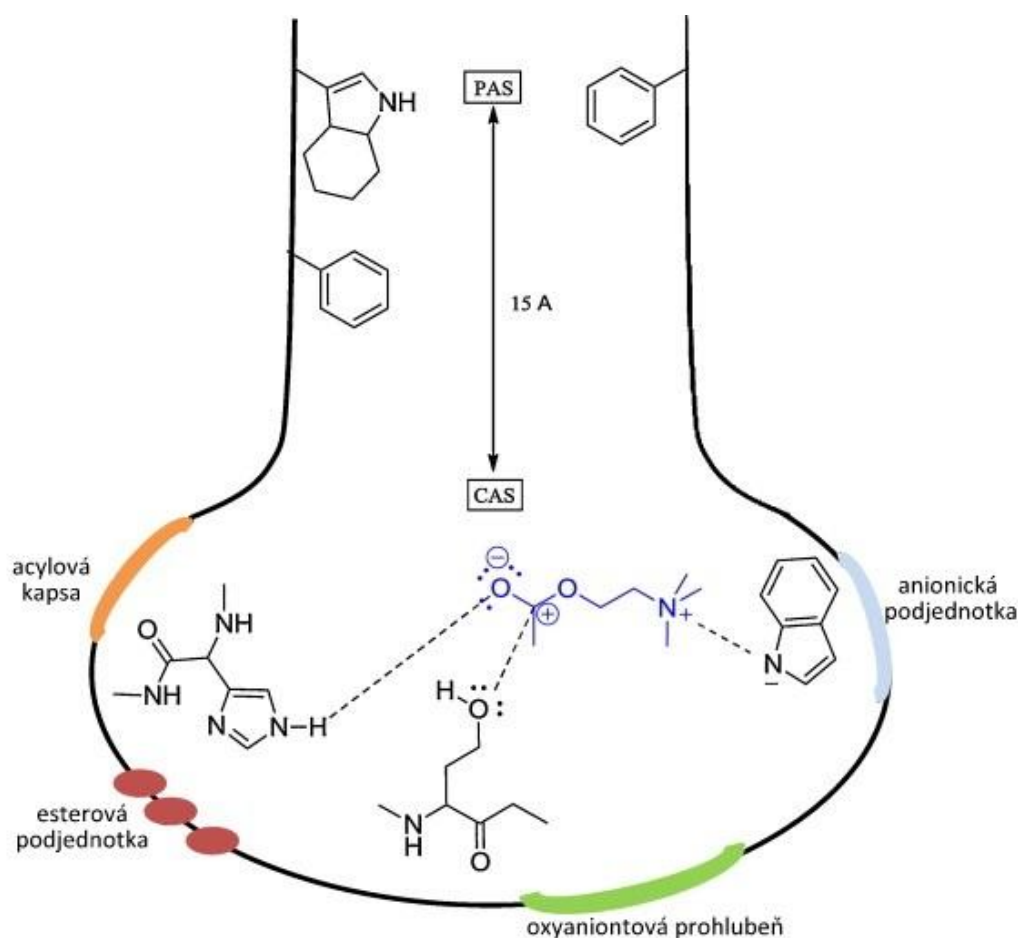
Obrázek 6. Aminokyselinové zbytky detekující pyrethroidy jsou označeny žlutě pro vazebné místo S1 a zeleně pro vazebné místo S2. Převzato z Dong et al. (2014).

5.2 Insekticidy inhibující acetylcholinesterasu

Další velkou skupinou insekticidů používaných ke kontrole hmyzích vektorů tvoří karbamáty (CA) a organofosfáty (OP). CA a OP jsou široce používanou skupinou insekticidů inhibující enzym AChE. AChE je serinová hydrolasa umístěná v cholinergních synapsích a nervosvalových ploténkách u bezobratlých i u obratlovců (Obrázek 4) (Kim et al., 2010; Lu et al., 2012; Pang, 2006; Pang et al., 2012). Funkcí AChE je regulace cholinergní transmise rozštěpením neurotransmiteru acetylcholinu na acetát a cholin. AChE je velmi účinný enzym katalizující přeměnu 10³-10⁴ molekul substrátu za sekundu (Quinn, 1987; Rosenberry, 1975). Inhibice AChE vede k akumulaci acetylcholinu v synapsi a tím k zamezení ukončení nervového přenosu (Toutant, 1989).

Struktura AChE byla zkoumána na modelovém organismu parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*), kde bylo popsáno aktivní místo enzymu (katalytické anionické místo, CAS), které je lokalizováno na dně úzké štěrbiny

(Obrázek 7). Pro CAS jsou typické některé podjednotky jako například anionická podjednotka, kde dochází k interakci se substrátem acetylcholinem; esterová podjednotka (ES), které obsahuje aminokyselinové zbytky katalytické triády enzymu; oxyaniontovou prohlubeň a acylovou kapsu, které jsou zodpovědné za substrátovou specifitu. Další důležitá podjednotka známá jako periferní anionické místo (PAS) je umístěna přibližně 15Å od CAS (Silva et al., 2014).



Obrázek 7. Schématický pohled na kavitu aktivního místa AChE *Torpedo californica* (TcAChE). CAS-katalytické aniontové místo, PAS-periferní aniontové místo. Molekula substrátu acetylcholinu je značena modře. Převzato a upraveno z Silva et al. (2014).

První 3D struktura AChE bezobratlých byla popsána u octomilky *D. melanogaster* (DmAChE). K rozpoznání hlavních mezidruhových strukturních rozdílů byla získaná struktura DmAChE následně porovnána s enzymem parejnoka kalifornského *Torpedo californica* (TcAChE) a s lidským enzymem (hAChE).

Ačkoli byla nalezena pouze nízká identita sekvencí (36 %) *DmAChE* a *TcAChE*, topologie enzymů byla u obou druhů velmi podobná, s částečným překryvem jejich aktivních míst (Harel et al., 2000). V nedávné době byla publikována krystalová struktura G119S mutované *AgAChE1* (*AgAChE1-G119S*), která je rezistentní k většině acetylcholinesterasových insekticidů (Cheung et al., 2018).

Nárůst v necitlivosti k používaným insekticidům mezi určitými kmeny *Culex pipiens*, kdy nebyla identifikovaná mutace v daném AChE genu (*Ace*), vedl k vytvoření hypotézy o dvou genech hmyzí acetylcholinesterasy (Malcolm et al., 1998; Pang et al., 2012; Tomita et al., 2000; Toutant, 1989). První *Ace* gen paralogní ke genu *D. melanogaster* byl popsán u mšice (*Schizaphis graminum*) (Gao and Zhu, 2002). Následně byla hypotéza dvou AChE genů potvrzena dalšími studii o paralogním genu *Ace* u afrického malarického komára *An. gambiae* a u bavlníkové mšice *Aphis gossypii* (Li and Han, 2002). V současnosti je známa velká část hmyzu (škůdci a přenašeči onemocnění), kteří mají dva geny pro AChE (AChE1 a AChE2) (Pang et al., 2009). Výjimkou jsou druhy, které patří do řádu vyšších *Diptera* (dvoukřídlí) (Lu et al., 2012; Pang, 2014). Funkce AChE1 a AChE2 byly následně definovány Lu et al. (2012), kdy AChE1 je nezbytná pro přežití hmyzu regulující cholinergní transmissi, zatímco AChE2 zastává důležitou necholinergní funkci při embryotickém vývoji hmyzu, růstu a reprodukci.

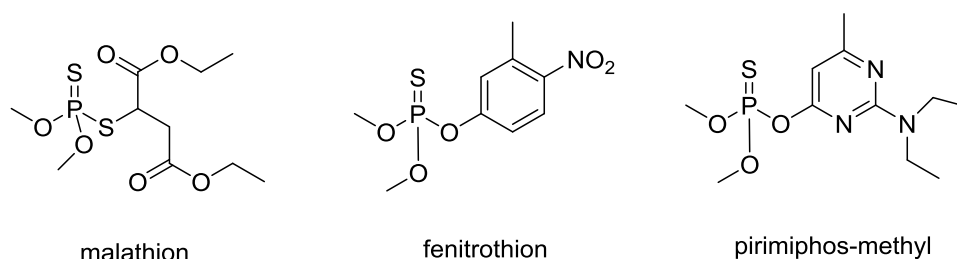
Během 30. let 20. století byly syntetizovány první vysoce toxické organofosforové nervově paralytické látky (tabun, sarin, soman) (Abreu-Villaça and Levin, 2018; Khurana and Prabhakar, 2000). Jako insekticidy byly OP poprvé představeny ve 40. letech a největší rozmach většiny hlavních OP byl v roce 1965 (Casida and Quistad, 1998). OP nahradily v 70. letech organochlorové insekticidy, které byly zakázány z důvodu jejich perzistence a akumulace v životním prostředí. Pokles v používání OP nastal po roce 2011 kvůli jejich nadměrnému užívání v 90. letech především v Indii (WHO, 2011). Organofosfátové insekticidy jsou irreverzibilní inhibitory AChE, které vytvářejí kovalentní vazbu se serinovým zbytkem S199 *AgChE1* (S203 u lidské AChE) v katalytickém místě enzymu (Darvesh et al., 2008; Pang, 2014; Schmidt et al., 2018). Většina OP používaných v současnosti (chlorpyrifos, malathion a diazinon) vyžadují bioaktivaci monooxygenasou, která převede fosfonothioát (S analog) na oxonovou formu

(O analog), který má silné inhibiční účinky vůči AChE (Abreu-Villaça and Levin, 2018; Perera et al., 2008; Wilkinson, 1983). Jak již bylo zmíněno výše, blokadou AChE dojde k blokaci nervového přenosu, který následně vede k usmrcení hmyzu.

OP insekticidy mohou podléhat rychlé degradaci, ale mají poměrně vysoké riziko akutní otravy u vysoce exponovaných osob (Rahimi et al., 2006). V případě nárůstu inhibice AChE nad 70–75 % dojde k akumulaci acetylcholinu v centrálním nervovém systému, autonomních gangliích a jejich cílových orgánech a v nervosvalových spojeních, která vede k rozvoji závažného cholinergního syndromu. Tento syndrom je charakterizován účinky na centrální nervový systém (např. zmatenost, závratě, útlum dýchacích funkcí, křeče, kóma) a účinky na perifernii (např. zvýšené pocení, slinění, únik moči, slzení, bronchokonstikce, zúžení zornic, třes). Kromě AChE ovlivňují OP jako sekundární cíle i další enzymy ze skupiny serinových esterás, kterými jsou například karboxylesterasa, butyrylcholinesterasa, arylformamidasa, acetylhydrolasa faktoru aktivujícího destičky, cílová neuropatická esterasa, hydrolasa amidů mastných kyselin a monoacylglycerol lipasa. Snížená aktivita cílové esterasy neuropatie vede k degeneraci axonů a k demyelinizaci nervových vláken známých jako syndrom OP-indukované opožděné neuropatie. Monoacylglycerol lipasa a hydrolasa amidu mastné kyseliny jsou zahrnuty při degradaci endokannabinoidů, neurotransmiterů regulující synaptickou funkci. Jejich inhibice může ovlivnit tvoření synapsí, neurogenezi a ve výsledku má vliv i na kognitivní funkce, náladu a kontrolu motoriky (Abreu-Villaça and Levin, 2018).

OP vykazují toxicitu také prostřednictvím interakcí s různými receptory. Při expozici OP byla popsána přímá interakce s muskarinovými, nikotinovými, serotoninovými, *N*-methyl-D-aspartátovými (NMDA) receptory, snížená denzita cholinergních receptorů, porušená funkce GABA-ergního, noradrenergního, dopaminergního systému evokující zvýšené uvolnění glutamátu. Mimo to dochází i k zásahu do energetického metabolismu. Funkčními důsledky těchto změn jsou například zvýšená excitotoxicita, neurotoxicita, blokáda oxidativního metabolismu s acidózou, čímž se dále prohlubuje toxický efekt organofosfátů (Voicu et al., 2010).

V současnosti jsou dle WHO doporučeny pro aplikaci residuálních insekticidních postřiků proti malarickým komárům tyto zástupci OP: malathion, fenitrothion a pirimiphos-methyl (Obrázek 8) (WHO, 2006a).

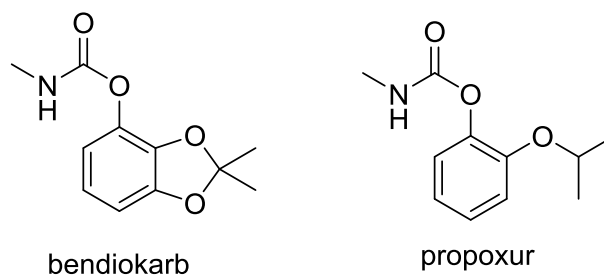


Obrázek 8. Organofosfáty doporučené pro aplikaci residuálních insekticidních postřiků.

Insekticidy ze skupiny karbamátů (CA) jsou deriváty karbamové kyseliny, které AChE inhibují reverzibilně. Zájem o CA vznikl díky poznání účinků alkaloidu fyzostigminu, které byly popsány v roce 1925 (Verma, 2014). Později v 50. letech byly vyvinuty aryl methyl karbamáty a byl představen velmi účinný karbamát nazývaný karbaryl (Casida and Quistad, 1998; Verma, 2014). Od té doby byly CA analogy používány jako insekticidy po několik desetiletí (Casida and Quistad, 1998). CA inhibují AChE pomocí karbamylace serinového zbytku v aktivním místě enzymu (Verma, 2014), vytvořený komplex AChE-karbamat může podléhat spontánní hydrolyze, a tím se pomalu reaktivovat. Dekarbamylace trvá v rozmezí 30-40 minut (Darvesh et al., 2008).

CA mají stejné příznaky spojené s akutní otravou jako OP. Na druhou stranu CA nezpůsobují opožděnou neuropatii a způsobují nižší kožní toxicitu než OP (Čolović et al., 2013; Verma, 2014). Příznaky akutní otravy CA u savců se objevují rychleji a nejsou tak závažné jako příznaky vyvolané OP (Abreu-Villaça and Levin, 2018)

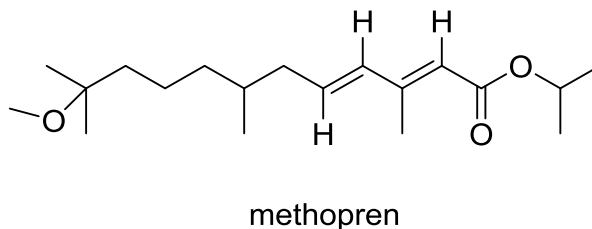
V současnosti jsou dle WHO doporučeny pro aplikaci residuálních insekticidních postřiků proti malarickým komárům bendiokarb a propoxur (Obrázek 9) (WHO, 2006a).



Obrázek 9. Karbamáty doporučené pro aplikaci residuálních insekticidních postřiků.

5.3 Regulátory růstu hmyzu

Vedle klasických chemických insekticidů existují i další alternativy, kterými jsou například regulátory růstu hmyzu (insect growth regulator - IGR). Tyto sloučeniny interferují s metabolismem hmyzu a ovlivňují tak jeho růst narušením embryogeneze a metamorfózy. Během vývoje hmyzu z vajíčka v dospělého jedince může IGR inhibovat formování chitinu (inhibitory chitinu) nebo nahradit/přerušit produkci juvenilního hormonu (analoga juvenilních hormonů). IGR jsou letální pro stadium kukly, larvy i pro vajíčka. Jelikož IGR nejsou neurotoxické, zdá se, že mají menší potenciál škodit člověku a jiným obratlovcům než běžné insekticidy (Mian and Mulla, 1982). Nejvíce používaným IGR je analog juvenilních hormonů methopren (Obrázek 10), který byl v minulosti používán pro kontrolu populace komárů a dalších škůdců z řádu *Diptera* (Mulla, 1995). Methopren ovlivňuje metamorfózu střeva u *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) a zpomaluje zrání vajíček u samic komára *An. gambiae*, čímž ovlivňuje jejich reprodukční schopnost (Bai et al., 2010; Wu et al., 2006).



Obrázek 10. Struktura methoprenu, analog juvenilního hormonu.

5.4 Bakteriální larvicidy

Dalšími strategiemi kontroly vektorů onemocnění je použití biopesticidů, jakými jsou například biologické toxiny, viry, mikroorganismy nebo přírodní produkty. Bakteriální larvicidy, jako například *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) a *Bacillus sphaericus* (*B. sphaericus*) jsou běžně používány při kontrole populace malarických komárů (Fillinger et al., 2003). Současné trendy ve vývoji biologických larvicidů, jejich mechanismu účinků a jejich dopady na rezistenci byly shrnuty Ferreira and Silva-Filha (2013) a Poopathi (2012). Ve stručnosti, *B. sphaericus* and *Bti* produkují insekticidní proteiny, které jsou produkovány ve formě krystalů. Tyto protoxiny larva pozře a v trávicím ústrojí se přemění na aktivní toxiny, které následně reagují s receptory ve střevním epitelu a vyvolávají tak cytopatologický účinek vedoucí k úmrtí larvy (Ferreira and Silva-Filha, 2013). Kromě výše zmíněných rekombinantních larvicidních bakterií jsou dalším předmětem výzkumů i sinice produkující moskytocidní protein z *Bti*. Vhodnou kombinací genů z různých organismů by mělo být možné vytvořit tzv. chytrou bakterii, která vyhledá a usmrtí larvy pouze určitých komárů (Poopathi, 2012). Pro kultivaci bakterií bylo navíc použito několik typů kultivačních médií z odpadních materiálů (např. vyčištěný máslový odpad, koláč z kokosového oleje, kukuřičný škrob, odpad z kávy), která umožnila snížení nákladů. Navíc bylo dosaženo vyšší bakteriální produkce než za použití běžných médií Luria-Bertani a Nutrient Yeast Extract Salt Media. Průmyslová výroba *B. sphaericus* a *Bti* je proto snadno dostupná, ekologická, nákladově efektivní, a navíc recykluje environmentální odpad (Poopathi, 2012).

6 Mechanismus rezistence komára *Anopheles gambiae*

U komára *An. gambiae* byly popsány dva typy rezistence, a to zvýšená metabolická detoxifikace insekticidů a modifikace cílového místa působení insekticidů.

6.1 Modifikace cílových míst napětově řízených iontových kanálů

Jednou z nejznámějších mechanismů je rezistence označená jako knockdown rezistence (*kdr*), vedoucí ke ztrátě aktivity genu. *Kdr* mutace byla poprvé pozorována u mouchy domácí (*Musca domestica*, *M. domestica*) v Sardinii, Itálie (Busvine, 1951). Později byla identifikována záměna leucinu za fenylalanin na pozici 1014 iontového kanálu označena za mutaci zodpovědnou za *kdr* rezistentní fenotyp (Williamson et al., 1996). Následně bylo objeveno mnoho dalších mutací tohoto klíčového rezidua umístěného ve vazebném místě Na⁺ napětového kanálu uzavřeného řetězcem S4-S5 domény II a S5 a S5 helixy II. domény. Stejnou mutaci můžeme nalézt i u rezistentního kmene *An. gambiae*, kde je *kdr* mutace spojována s mutací leucinového zbytku v pozici 1014 umístěného uvnitř vazebného místa S6 transmembránového segmentu domény II iontového kanálu (číslováno dle Na⁺ kanálu *M. domestica*). Klíčový leucin vazebného místa je nejčastěji nahrazen fenylalaninovým (L1014P) nebo serinovým zbytkem (L014S) (Martinez-Torres et al., 1998; Ranson et al., 2000). V současnosti byla v iontovém kanálu *An. gambiae* na pozici 1575 popsána nová mutace, která se nachází v řetězci mezi doménami III a IV. Změna asparaginu za tyrosin (N1575Y) se objevuje pouze společně s L1014P mutací a poskytuje komáru další výhody spojené s rezistentním fenotypem (Jones et al., 2012).

Kromě standardní *kdr* mutace byl u *M. domestica* také popsán tzv. *super-kdr* fenotyp (M918T) spojený s vysokou rezistencí k pyrethroidům (Williamson et al., 1996). M918 aminokyselinový zbytek se nachází ve spojovacím řetězci mezi doménami II a III. *Super-kdr* mutace je zodpovědná za snížení sensitivity k pyrethroidům 1000krát oproti variantě alely divokého typu (wild-type, WT) (Vais et al., 2003, 2000). Dosud nebyla pozorována žádná *super-kdr* mutace u komára *An. gambiae* (Schmidt et al., 2018).

6.2 Modifikace cílových míst acetylcholinesterasy

Necitlivost AChE k OP a CA byla poprvé objevena u druhu *Anopheles albimanus* v Salvadoru roku 1970. Tato necitlivost se týkala změny v aktivním místě, čímž znemožnila vazbu OP a CA k enzymu (Ayad and Georghiou, 1975). Nárůst rezistence k insekticidům byly potvrzeny také v západní Africe na Pobřeží Slonoviny v populaci komára *An. gambiae*. Nejdříve se vyskytla rezistence k pyrethroidům a později také ke karbamátům (N'Guessan et al., 2003). Karbamátová rezistence je výsledkem záměny jedné aminokyseliny u AChE v pozici 119. Tato glycin-serin substituce označena jako ACE-1^R, vznikla záměnou kodonu GGC→AGC a tato záměna jednoho kodonu vedla k vytvoření restričního místa, a proto byla lehce detekovatelná metodou využívající polymorfismu délky restričních fragmentů (PCR-RFLP) (Weill et al., 2004, 2003). Mutovaný G119 aminokyselinový zbytek leží v oxyaniontové prohlubni blízko katalytickému aktivnímu místu. To vede k významným změnám, jelikož mutace snižuje objem aktivního místa enzymu a tak G119 aminokyselinový zbytek blokuje karbamylaci katalytického serinového zbytku S199 (Weill et al., 2003). Rekombinantně exprimovaná a purifikovaná katalytická část AChE1-G119S vykazovala pouze 3 % z reakčního obrátu WT enzymu (Wong et al., 2012).

6.3 Metabolická detoxifikace

Velmi dobře známým mechanismem rezistence je u hmyzu zvýšení metabolismu podílejícího se na detoxifikaci insekticidů. Mechanismus degradace je založen na nadměrné expresi detoxifikačních enzymů jako jsou například karboxyesterasa (COE), cytochrom P450 a glutathion S-transferasa (GST) (Hemingway and Ranson, 2000). Monitorování a detekce rezistentních alel cílových míst u *An. gambiae* je důležitým bodem při řízení výskytu malárie. Mnoho stanovení je založeno na technologiích využívající polymerázovou řetězovou reakci (PCR), díky kterým je následně možné detekovat sekvenci s rezistentním místem. Proces metabolické detoxifikace může zahrnovat velké množství enzymů, z toho důvodu byla k analýze použita technologie DNA čipů – DNA microarray. Po první generaci analýzy genomové exprese u komára *An. gambiae* byly zjištěny geny, které hrají roli při obraně jeho organismu (Dimopoulos et al., 2002). Tento typ DNA čipů je zaměřený na identifikaci genů s rozdílnou expresí u hmyzu

se zvýšenou metabolickou detoxifikací, a tím i rezistencí hmyzu k insekticidům (David et al., 2005).

Široce používané metody sekvenování komářního genomu poskytly nástroje pro zintenzivnění výzkumu v oblasti insekticidní rezistence. Tzv. sekvenace nové generace (next generation sequencing) v kombinaci s klonováním individuálních metabolických genů vedla k hlubšímu porozumění funkcí proteinů a k objasnění mechanismu rezistence. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) byl použit k identifikaci genů kódujících COE, cytochrom P450 a GST proteiny genomu komára *An. gambiae*. Sekvence oblastí zahrnující konzervativní regiony, katalytickou aktivní oblast a délky proteinové sekvence byly použity k potvrzení správné kategorizace genu a správného shlukování do proteinových rodin. Tento proces poskytl informace o předpokládaných počtech genových sekvencí v genomu *An. gambiae*: 51 COE, 111 cytochrom P450 a 31 GST. Bohužel průzkum genomu *An. gambiae* neposkytl informace o kódování funkčních (aktivních) proteinů (Ranson et al., 2002).

V roce 2014 byla v Beninu popsána nadměrná exprese metabolických genů (CYP6P3, CYP6M2 and GSTD3) u komára *An. gambiae* vztahujících se k rezistenci na pyrethroidy. Zároveň v období 2012-2014 nebylo zjištěno navýšení *kdr* mutace. Nárůst rezistence v této oblasti na deltamethrin byl tedy výsledkem zvýšené exprese metabolických detoxifikačních genů a ne *kdr* mutací (Yahouédo et al., 2016). Navíc absence *kdr* alel u rezistentních komárů potvrzuje důležitost metabolické detoxifikace u *An. gambiae* rezistentního fenotypu (Awolola et al., 2009).

I když metody molekulární biologie a buněčné biologie poskytují nástroje k analýze exprese určitých genů, musí být brán zřetel i na vzájemné interakce určitých genů. Nadměrná exprese genů a necitlivost cílových míst jsou důležité faktory v mechanismu insekticidní rezistence, avšak zásadní roli může hrát také interakce mezi rezistentními a regulatorními geny (Liu, 2015).

Vedle modifikace metabolismu a ztráty citlivostí cílového místa k insekticidům byl nedávno popsán další možný typ rezistence vyznačující se změnou kutikuly hmyzu (kožní rezistence). Nadměrná exprese kutikulárních genů (CPLC8 a CPLC #) po expozici insekticidu u *An. gambiae* ukázala jejich potenciál při metabolismu pyrethroidů (Awolola et al., 2009). Analýza

kutikulárních lipidů z populací *An. gambiae* v Nigérii, Tanzanii a Gambii naznačuje zjevné rozdíly ve složení sacharidů kutikuly (Anyanwu et al., 2000).

7 Strategie k překonání rezistence

V minulých letech se znovu ukázalo, že onemocnění přenášená komáry představují v mnoha oblastech významný problém. Tato situace je způsobena mnoha faktory, jako například nedostatečným posunem ve vývoji vakcín, vývojem rezistence u *Plasmodium sp.* k dostupným léčivům, ekonomickými ztrátami v endemických zemích nebo vývojem rezistence na běžně používané insekticidy u komárů (Davies et al., 2007b).

Rozšíření insekticidní rezistence také ohrozilo účinnost insekticidních přípravků používaných v současnosti. Zvláště alarmující zprávy ohledně pyrethroidní rezistence mezi komáry rodu *Anopheles* přicházejí ze zemí subsaharské Afriky (Ranson et al., 2011; Ranson and Lissenden, 2016). Na druhou stranu, produkce velkého množství insekticidů, a s tím spojené jejich masivní používání vedlo jejich k akumulaci v ekosystému. Výrazná environmentální kontaminace a toxicita pro velké množství necílových druhů (včetně člověka) vedla k další regulaci používaných insekticidů (Casida and Quistad, 1998).

Strategie pro boj s malárií doporučené WHO v Globálním malarickém programu jsou vedeny souborem *Globální technické strategie pro malárii 2016-2030* (WHO, 2015c). Ta si dává do roku 2030 ambiciózní cíle jako například eliminaci malárie v nejméně 35 zemích, snížení incidence malárie a její mortality nejméně na 90 % a zamezení opakovanému výskytu malárie ve všech zemích, kde se již nevyskytuje (WHO, 2019b). Boj proti malárii se komplikuje kvůli několika souvisejícím faktorům, jako například nedostatku předvídatelného a trvalého domácího i zahraničního financování nebo výše zmíněným biologickým problémům, jako je parazitická a insekticidní rezistence, která může vážně oslabit účinnost v potlačování malárie a tak narušit nedávno dosažené úspěchy (WHO, 2015c).

Některé strategie nespolehají pouze na monitorování vývoje rezistence, ale také na plánování zásahů pro minimalizování vývoje od rezistence s minimálním výskytem k běžnému typu rezistence. Další doporučení jsou založena na kombinovaném užívání insekticidů s různým mechanismem účinku namísto opakovaného používání pesticidů se stejným účinkem. Nejeftivnějším způsobem ovlivnění vzniku insekticidní rezistence by mělo být použití kombinací nebo směsí různých skupin insekticidů, kde aspoň jedna třída by měla letální efekt

na rezistentní komáry (např. karbamáty aplikovány reziduálními postřiky a moskytiéra ošetřená pyrethroidy) (WHO, 2015b, 2015c).

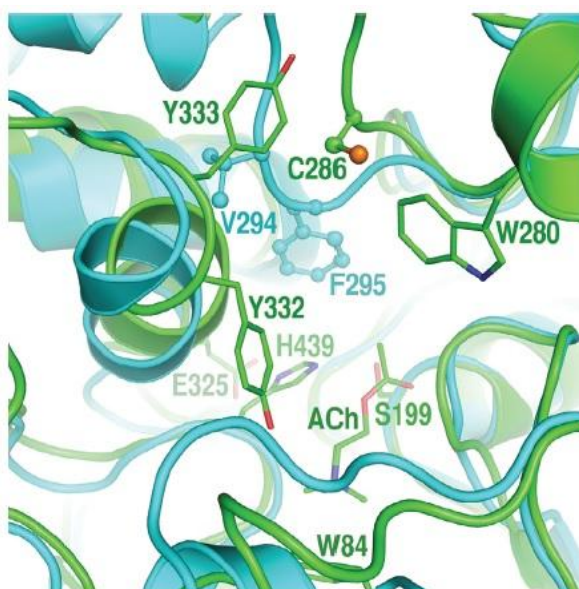
V případě že by rozsah protimalarických opatření zůstal na současné úrovni, mohlo by dle matematických modelů dojít k nárůstu incidence onemocnění a jeho důsledků. Tomuto lze zabránit optimalizací využívání aktuálně dostupných prostředků. Pokud by redukce vektorů malárie v rizikových oblastech fungovala nad 80 %, mohla by se výrazně snížit incidence i následná úmrtnost (WHO, 2015c).

V oblastech s vysokým přenosem malárie je kladen velký důraz na vývoj dalších inovativních nástrojů a přístupů vedoucích k eliminaci onemocnění. Základní výzkum hraje zásadní roli v prohlubování znalostí ohledně *Plasmodium* sp. a jeho vektoru, které jsou pak dále využity ve vývoji účinnějších diagnostických postupů, léčiv nebo vakcín. Nové poznatky jsou také aplikovány pro vylepšení metod řízení vektorů malárie. Navazující aplikovaný výzkum pak hraje důležitou roli při rychlosti zavádění nových poznatků v rizikové oblasti, optimalizaci jejich dopadů a efektivnosti finančních výdajů (WHO, 2015c).

V současnosti neexistuje předvídatelný způsob, jak najít nový mechanismus účinků insekticidů a zdá se, že náhodnost bude důležitější než bio-racionální přístup. V prvním případě úspěch závisí na strukturální diverzitě a množství přírodních produktů nebo syntetických sloučenin, jejich screeningu, optimalizaci strukturně-aktivních vztahů pomocí syntézy chemických analogů a nakonec objasnění cílového místa. Bio-racionální cesta je usnadněna enzymatickými, membránovými nebo kanálovými cílovými testy, které doplňují stanovení insekticidní aktivity. Pokrok v oblasti genetického inženýrství poskytl možnost usnadnění výroby insekticidů izolovaných z rostlin zvětšením jejich výtěžků nebo možností produkce a zkoumání cílových enzymů a receptorů (Casida and Quistad, 1998).

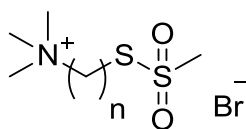
8 Nově navržené insekticidy

Jedním ze způsobů vývoje selektivních insekticidů je nalezení sloučenin s novým mechanismem účinku. Jak již bylo zmíněno výše, mnoho hmyzích škůdců a přenašečů onemocnění má dva enzymy AChE1 a AChE2. Pezzementi et al. (2006) popsali inaktivaci AChE u bezobratlých sulfhydrylovým činidlem, které reagovalo s volnými thiolovými (SH) skupinami cysteinu AChE. Inaktivace enzymové aktivity naznačila modifikaci mezi SH skupinami a sulfhydrylovými činidly (Pezzementi et al., 2006). Ve stejné době Pang (2006) publikoval 3D model AChE1 komára *An. gambiae*, který byl získán pomocí homologického modelování a zdokonalen simulací s vícečetnou molekulovou dynamikou (Obrázek 11). Ten vedl k nalezení nativního cysteinu s volnou SH skupinou (Cys286), umístěného v blízkosti aktivního místa, který může sloužit jako cíl pro nové insekticidy (Pang, 2006). Volná SH skupina cysteinu se nachází u vstupu do aktivního místa hmyzí AChE1 a nevyskytuje se u AChE2 a u AChE savců, ptáků a ryb (Pang, 2006; Pezzementi et al., 2006).



Obrázek 11. Překrytí hmyzí AChE1 *An. gambiae* a lidského enzymu. Pohled shora dolů na acetylcholin v katalytickém místě. Identifikátory proteinové datové banky pro komáří a lidský enzym jsou 2AZG a 4EY4. Převzato z (Pang, 2014)

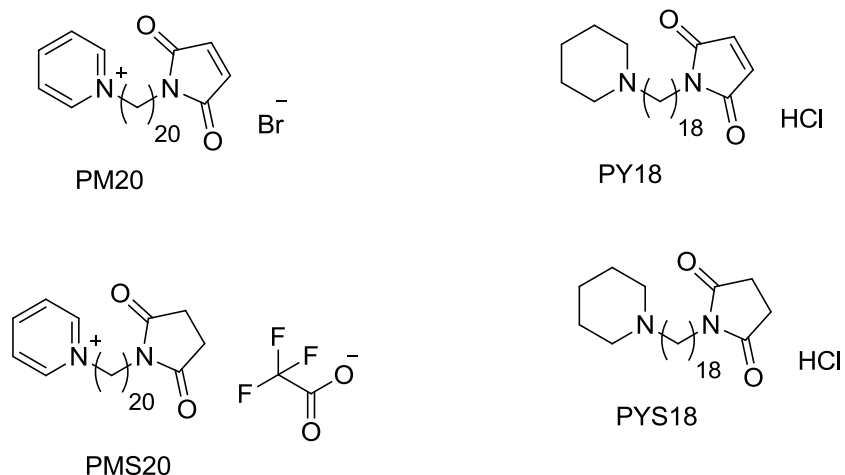
Molekula obsahující methanthiosulfonát, thiol-reaktivní sloučeninu (Obrázek 12) navrženou cíleně pro vazebného místo cysteinového SH residua irreverzibilně inhibovala více než 95 % enzymové aktivity po 1 hodinové expozici při koncentraci 6 μM AChE1 komára *An. gambiae* (*AgAChE1*) zatímco totožná expozice nezpůsobila žádný účinek u hAChE (Pang et al., 2009). Na druhou stranu, analýza odezvy na plnou dávku odhalila u některých sloučenin ireversibilní inhibici hAChE při koncentraci > 10 μM . Tím bylo prokázáno, že volná SH skupina cysteinu v aktivním místě *AgAChE1* je perspektivním cílem pro vývoj selektivních insekticidů (Pang et al., 2009).



AMTS_n (n = 7-20)

Obrázek 12. Chemická struktura derivátu obsahujících methanethiosulfonát.

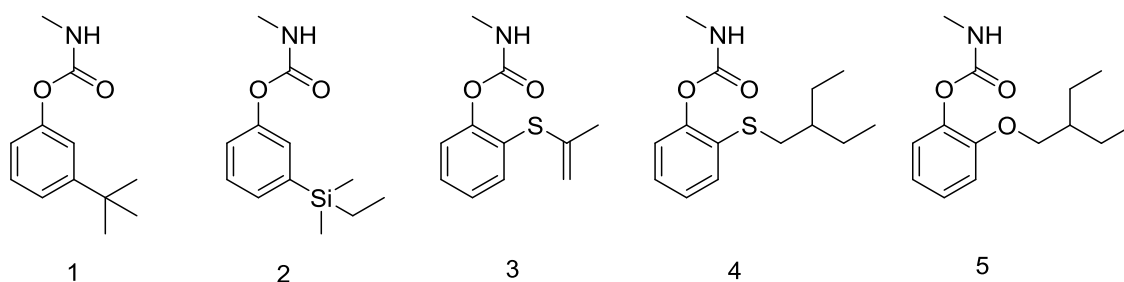
Pro potvrzení konjugace sulfhydrylového činidla se specifickým cysteinem hmyzí AChE1 byla navržena druhá generace inhibitorů obsahujících maleinimid (**PM20** a **PY18**, Obrázek 13). Předpokládá se, že maleinimid tvoří s volnou SH skupinou cysteinu 286 C-S vazbu, a tak jsou jejich adukty stabilní během procesu přípravy vzorku při kapalně chromatografii a hmotnostní spektroskopii. Deriváty sukcinimidu (**PMS20** a **PYS18**), které jsou stericky téměř shodné s maleinimidem, však nereagují s cysteinem 286 za vzniku vazby, a tak byly navrženy k rozlišení vazebné afinity sloučenin (Dou et al., 2013).



Obrázek 13. Chemická struktura druhé generace inhibitorů cílených na cystein obsahujících maleinimid a sukcinimid.

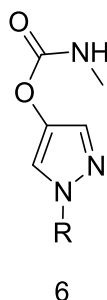
Experimenty s časovým průběhem prokázaly ireversibilní inhibici rekombinantní hmyzí AChE1 způsobenou inhibitory obsahující maleinimid, ty ale neinhibovaly rekombinantní hAChE. Naproti tomu inhibitory obsahující sukcinimid nebyly schopné inhibovat ani jeden z enzymů. Tyto údaje potvrzují, že pro hmyz specifický cystein 286 je dostupný pro konjugaci se sulfhydrylovými činidly (Dou et al., 2013).

Dalším způsobem vývoje nových selektivních insekticidů je redesign klasických insekticidů. Hartsel et al. (2012) se zaměřili na derivaci aryl methyl karbamátu. Syntetizovali fenyl-substituované karbamáty (**1-5**, Obrázek 14), které měly oproti komerčně dostupným CA (propoxur, bendiokarb, karbofuran) vyšší selektivitu k AgAChE1 (> 100násobně) (Hartsel et al., 2012). Nové CA byly méně toxické než komerčně dostupné sloučeniny, jak při tarsálním kontaktu, tak při testu topické aplikace. Nízká korelace, mezi inhibičními aktivitami nových CA při tarsálním kontaktu a mezi jejich relevantní inhibiční účinností, naznačuje vliv dalších faktorů ovlivňujících schopnost inhibice enzymu v případě testování *in vivo* (Hartsel et al., 2012; Jiang et al., 2013; Wong et al., 2013). Tyto experimentální CA vykazaly vysokou selektivitu k různým druhům komárů spojenou s nízkou aktivitou vůči hmyzu prospěšnému v zemědělské produkci a nízkou orální toxicitu u myší. Všechny tyto výsledky naznačují, že připravené karbamáty by mohly být užitečné v programech pro redukci populace vektorů (Swale et al., 2015).



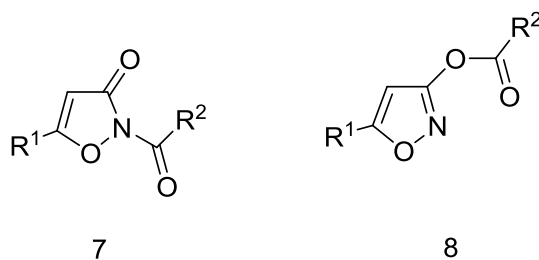
Obrázek 14. Chemické struktury fenyl-substituovaných karbamátů.

Wong et al. (2012) syntetizovali pyrazol-4-yl methyl karbamáty (**6**, Obrázek 15), které měly překonat G119S karbamátovou rezistenci. Tyto nové aryl methyl karbamáty vykazovaly vysokou *in vivo* toxicitu pro *An. gambiae* kmene Akron při použití testu toxicity tarsálním kontaktem. Na druhou stranu, žádná z těchto sloučenin nevykazovala zvýšenou selektivitu ve prospěch *AgAChE1* (Wong et al., 2012).



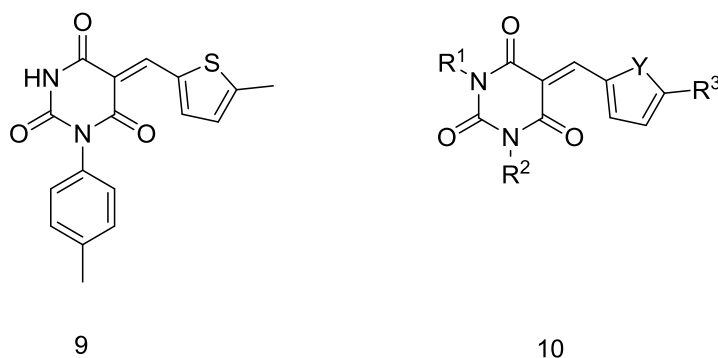
Obrázek 15. Chemická struktura pyrazol-4-yl methyl karbamátů.

Dále byly připraveny nové CA a karboxyamidy založené na základě isoxalového jádra (**7** a **8**, Obrázek 16). Tyto sloučeniny cílily na oba kmene *An. gambiae*, jak na karbamát-citlivý kmen (G3), tak na karbamát-rezistentní kmen (Akron). Nové sloučeniny vykazovaly vysokou kontaktní toxicitu u obou kmenů (G3 a Akron). Nicméně selektivita nových sloučenin k enzymu *AgAChE1* byla velmi nízká, pro nejlepší sloučeninu pouze 8násobná (Verma et al., 2015).



Obrázek 16. Chemická struktura karbamátů a karboxamidů s isoxalovým jádrem.

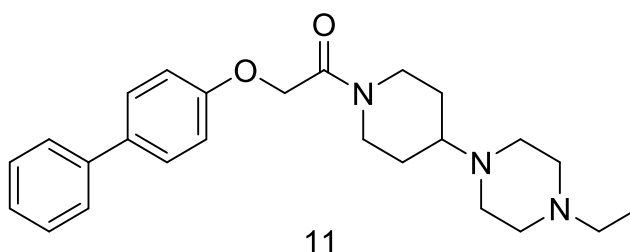
Alout et al. (2012) otestovali chemickou knihovnu 3000 sloučenin pro jejich efektivnější inhibici rezistentního enzymu *AgAChE1-G119S*. Pyrimidinetrion furan-substituované sloučeniny (**9** a **10**, Obrázek 17) působící jako ireversibilní kompetitivní inhibitory *AgAChE1* se ukázaly jako nejslibnější molekuly. Tyto sloučeniny přednostně inhibovaly mutovanou formu *AgAChE1-G119S*, která je necitlivá vůči CA a OP. Sloučeniny zároveň prokázaly *in vivo* toxicitu k OP rezistentním larvám komára *An. gambiae*. Tato nová třída sloučenin pojmenována „zabijáci rezistence“ může být přednostně cílená na OP rezistentní komáry, a tak by mohlo v komáří populaci dojít k obnově citlivosti k této skupině insekticidů (Alout et al., 2012).



Obrázek 17. Chemické struktury nejlepších insekticidních kandidátů ze screeningu provedeném Alout et al. (2012).

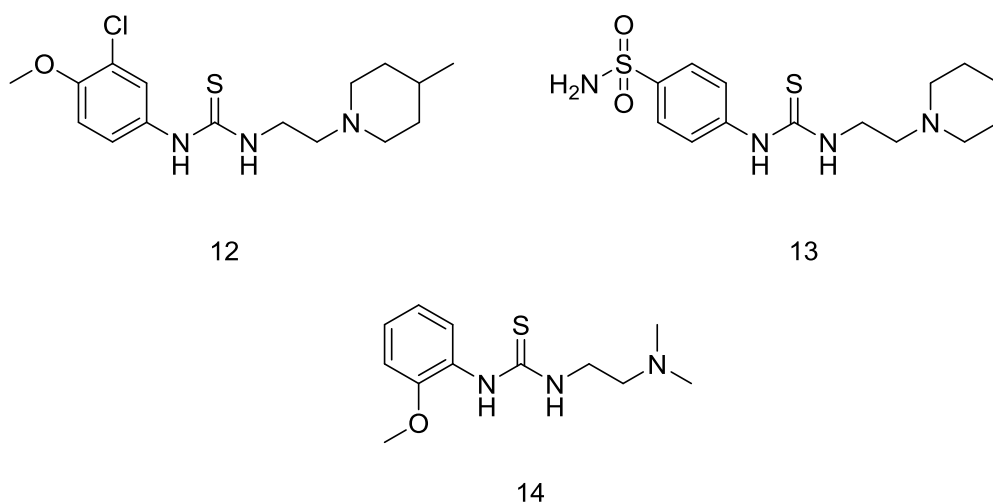
Pro vývoj selektivních inhibitorů AChE1 Engdahl et al. (2016) provedli screening 175 000 sloučenin na enzimech AChE1 komára *An. gambiae* a *Ae. aegypti*. Kolem 338 sloučenin významně snížilo aktivitu AChE1 *An. gambiae*, *Ae. aegypti* nebo obou. Další analýzy poskytly data pro úroveň selektivity hmyz/člověk, která mohla být rozdělena na základě chemické rozmanitosti

sloučenin. U devíti vybraných struktur byl dále testován vztah mezi dávkou a účinkem. Sloučenina založená na struktuře fenoxycetamidu (**11**, Obrázek 18) se jevila jako potentní nekovalentní inhibitor AChE1 s hodnotou IC_{50} v submikromolárním rozmezí u obou hmyzích enzymů. Inhibitor založený na fenoxycetamidu inhiboval také mutantní formu *AgAChE1-G119S*. Tento nový inhibitor kombinuje selektivitu ke komářímu enzymu s účinností na obě WT AChE1 a rezistenci nesoucí *AgAChE1-G119S*, a tak ukazuje možnost vývoje nových selektivních nekovalentních AChE1 inhibitorů (Engdahl et al., 2016).

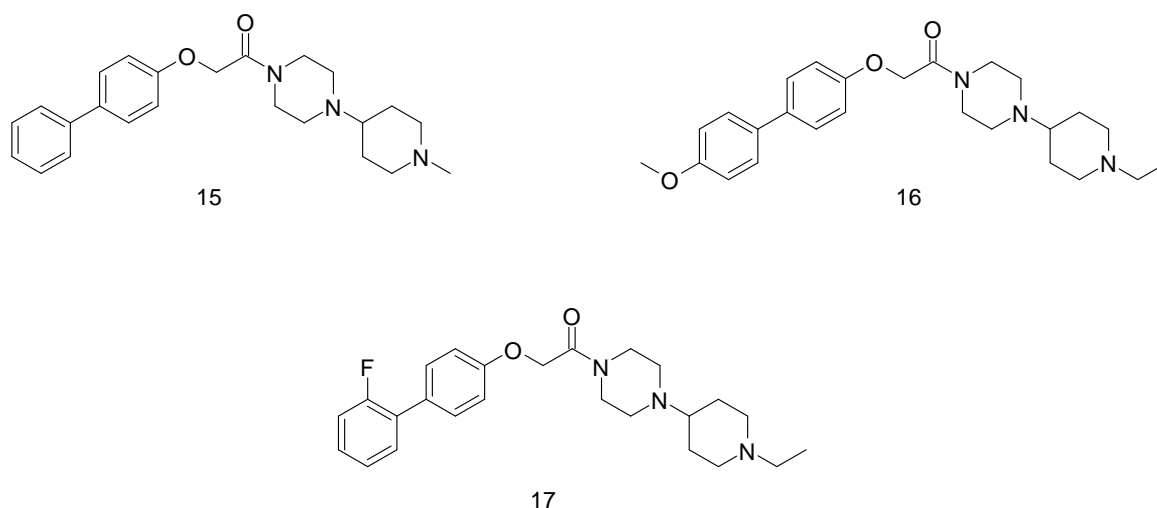


Obrázek 18. Chemická struktura nejlepšího inhibitoru vzešlého ze screeningu.

V návaznosti na publikované výsledky předchozího screeningu byly dále optimalizovány struktury tří asymetrických thiomocovin (**12-14**, Obrázek 19). Inhibiční účinky nových derivátů byly velice variabilní. Sedm sloučenin prokázalo inhibiční účinnost s hodnotou IC_{50} menší než 20 nM, pět sloučenin mělo hodnotu IC_{50} v rozmezí 20-100 μ M a devět sloučenin bylo slabými inhibitory hmyzí AChE1 (Knutsson et al., 2017). V poslední době byla publikována analoga fenoxycetamidu s cílem optimalizace inhibičního potenciálu původních sloučenin. Bylo vytvořeno 20 analogů, které zkoumaly vliv přítomnosti skupiny ethylpiperazinu, piperidinového spojovacího řetězce a bifenylové skupiny. Z těchto nových derivátů byly nejlepšími inhibitory tři sloučeniny (**15-17**, Obrázek 20), které měly hodnotu IC_{50} v submikromolárním rozmezí. Oproti thiomocovinovým derivátům byly tyto molekuly účinné i při inhibici rezistentního enzymu *AgAChE1-G119S* (Knutsson et al., 2018).



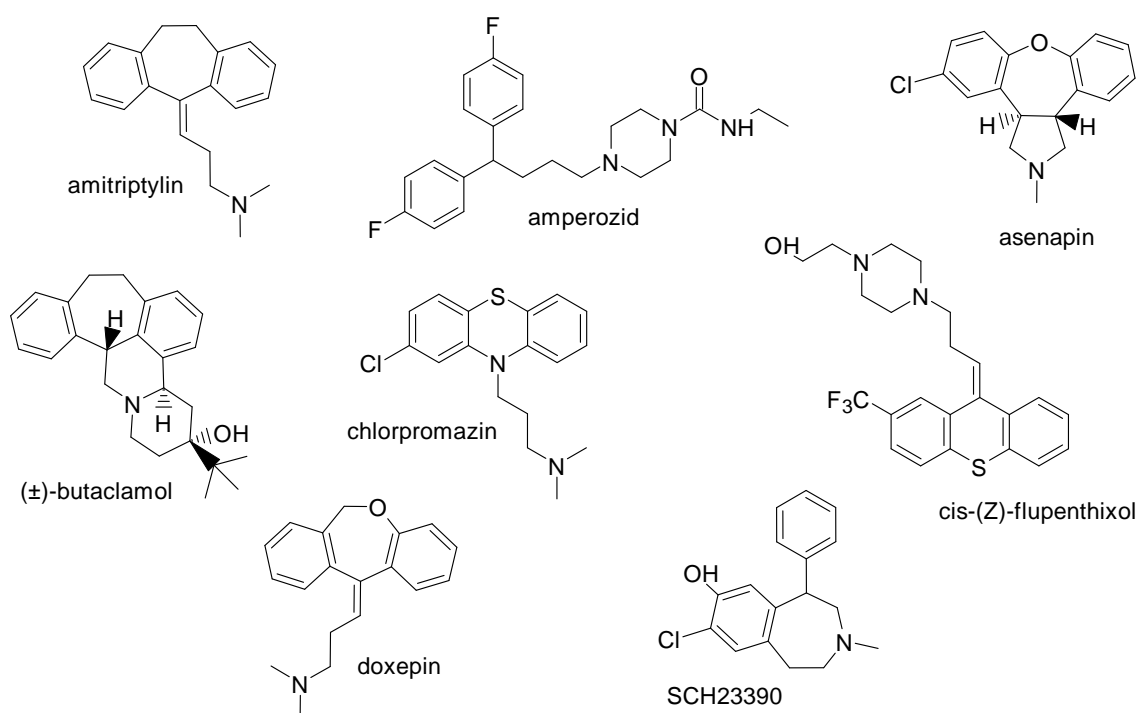
Obrázek 19. Chemické struktury tří molekul, které tvořily základ pro další deriváty v publikaci Knutsson et al. (2017).



Obrázek 20. Chemické struktury nejlepších kandidátů vzešlých z publikace Knutsson et al. (2018)

Jako nová předpokládaná třída insekticidů byli nedávno představeni antagonisté D1 dopaminových receptorů (DAR; Obrázek 21). Neurotransmitter dopamin a jeho receptory jsou esenciálním mechanismem pro chování u členovců. Několik studií předpokládá, že interference s dopaminergním procesem může vést k úmrtí, ke zneschopnění jedince nebo narušení vývoje, což činí DAR vysoce atraktivními pro vývoj insekticidů (Hill et al., 2013; Meyer et al., 2012). Bezobratlí mají dva D1 receptory (DOP1 a DOP2) a jeden D2 receptor (Mustard et al., 2005).

Při porovnání sekvencí transmembránových domén DOP2 receptorů u vybraných druhů bezobratlých byla zjištěna vysoká identita aminokyselin v transmembránových oblastech u *Ae. aegypti* ve srovnání s *Culex quinquefasciatus* (*C. quiquefasciatus*), *An. gambiae* a *D. melanogaster* (100 %, 94 % a 97 % shody aminokyselinových sekvencí). Porovnání také ukázalo na nižší aminokyselinovou shodu mezi transmembránovými sekvencemi *Ae. aegypti* a lidskými D1 ortology, hD₁ (51 %) a hD₅ (47 %) (Hill et al., 2013).



Obrázek 21. Chemická struktura antagonistů D1-like dopaminových receptorů.

DOP2 antagonisté s moskytociдными vlastnostmi proti *Ae. aegypti* byli testováni v tzv. „early drug discovery studies“ a mnoho sloučenin bylo více selektivních ke komářímu receptoru než k lidskému. Tyto antagonisté prokazovali *in vivo* vysokou toxicitu pro komáří larvy u obou druhů *Ae. aegypti* a *C. quiquefasciatus*. V poslední době byla toxicita DOP2 antagonistů testována u larev *An. gambiae*, kdy tyto sloučeniny vykazaly stejnou odezvu jako u *Ae. egypti*. Rozdíl v aktivitě antagonistů mezi lidským a komáří receptoru ukazuje na možnou strategii ve vývoji nových selektivních insekticidů, vyžadujících bezpečnost pro necílové organismy. Antagonisté hmyzího DOP2 receptoru jsou slibným cílem pro redukci přenašečů, ačkoli je stále nutné objasnit otázky týkající

se mechanismu účinku a komplexních farmakologických reakcí (Hill et al., 2013; Nuss et al., 2015).

Další oblastí je hledání přírodního insekticidu, který by nebyl toxický k necílovým organismům a byl by zároveň i lehce rozložitelný. Rostlinné druhy, jako jsou zederach indický (*Azadirachta indica*) a kožnatec indický (*Pongamia glabra*), jsou zdroji esenciálních olejů s insekticidními účinky (Maheswaran and Ignacimuthu, 2015). Rostlinné oleje a jejich extrakty jsou bezpečné pro člověka a jiné savce (Maheswaran and Ignacimuthu, 2012). Byla vytvořena směs olejů ze zederachu indického a kožnatce indického, která byla patentována jako nový biopesticid s označením PONNEEM. Tato směs byla testována na larvicidní, ovicidní efekt a na aktivitu odrazující od ovipozice u lidských přenašečů *Anopheles stephensi* a *C. quinquefasciatus*. PONNEM prokázal 100% mortalitu u larev u obou druhů při nejnižší koncentraci 0,1 ppm. Ovicidní aktivita PONNEMu byla 100 % při koncentraci 1 ppm u obou druhů, nicméně narušení ovipozice bylo za stejných podmínek jako u ovicidní aktivity nižší. Účinek na necílové organismy *Gambusia affinis* a *Diplonychus indicus* (predátoři komárů) byl neškodný. Index bezpečnosti naznačuje, že PONNEM by mohl být používán společně s dravými rybami a s prospěšným hmyzem v programech kontroly vektorů. Biologická aktivita PONNEMu by mohla být výsledkem různých sloučenin přítomných v rostlinných olejích (Maheswaran and Ignacimuthu, 2015). Ošetření PONNEMem vedlo k redukci aktivity AChE1, α a β -esteras a GST a k larvicidnímu, ovicidnímu účinku s narušením ovipozice i u komárů *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* (Maheswaran and Ignacimuthu, 2012). Celkové poznatky naznačují, že přípravek PONNEEM může být použit jako alternativa k syntetickým chemickým pesticidům pro kontrolu onemocnění přenášených hmyzem (Maheswaran and Ignacimuthu, 2015).

Další alternativou k syntetickým chemickým insekticidům jsou stříbrné nanočástice (AgNP) využívající vodný roztok z listů rostliny *Zornia diphylla* (*Z. diphylla*) jako redukční a uzavírající činidlo pro Ag⁺ ionty. Akutní toxicita extraktu z listu *Z. diphylla* a biosyntetizovaných AgNP byla testována na larvách komára přenášející malárii *Anopheles subpictus*, horečku dengue *A. albopictus* a Japonskou encefalitidu *Culex tritaeniorhynchus*. Syntetizované AgNP prokázaly

larvicidní účinek závislý na dávce u všech druhů komárů a zároveň byly bezpečné pro necílové organismy *Chironomus circumdatus*, *Anisops bouvieri* a *Gambusia affinis* (Govindarajan et al., 2016). Odlišný typ AgNP byl syntetizován za použití extraktu z listu *Rhizophora mucronata* a byl testován na larvách *Ae. aegypti* a *C. quinquefasciatus*, kdy prokázal možnou larvicidní aktivitu (Gnanadesigan et al., 2011). AgNP jsou snadno a levně vyráběny, jsou stabilní v průběhu času a také mohou být použity v nízkých dávkách pro snížení počtu larválních populací komárů bez škodlivých účinků na jejich přírodní nepřátele (např. dravé ryby a koryši) (Govindarajan et al., 2016).

9 Cíle disertační práce

- a) Rešeršně zpracovat současné poznatky z oblasti problematiky malárie, jejího šíření a možnosti v komplexním přístupu v boji s tímto onemocněním, včetně vývoje nových insekticidů, jako jeden z nástrojů k zabránění šíření tohoto celosvětově rozšířeného onemocnění.
- b) Na základě získaných informací vybrat vhodné modelové organismy pro izolaci hmyzí AChE.
- c) Vývoj metodiky pro získání hmyzí AChE z modelového organismu.
- d) Zavedení rekombinantní produkce AChE1 komára *Anopheles gambiae*.
- e) Na dostupných hmyzích enzymech otestovat inhibitory AChE z interní databáze sloučenin. Výsledky porovnat s účinky na hAChE a vyhodnotit jejich selektivitu.

10 Metodika

10.1 Chemikálie

Běžné chemikálie použité během řešení disertační práce byly získány od firem Sigma–Aldrich člena společnosti Merck KGaA (Německo), Bio–Rad Laboratories (USA) a ThermoFisher Scientific (USA) v čistotě p. a.

10.2 Příprava muší acetylcholinesterasy

10.2.1 Příprava mušího homogenátu

Na základě informací z literatury a dostupnosti v České republice byla jako zdroj hmyzí AChE zvolena moucha domácí (*Musca domestica*). Larvy byly pořízeny ve specializované prodejně, následně byly ponechány ve tmě při laboratorní teplotě, dokud nedošlo k vylíhnutí dospělců. Mouchy byly zmrazeny a skladovány nejméně dva týdny při teplotě -80 °C. Zmražení jedinci byli dekapitováni a muší hlavy homogenizovány v ultrazvukové lázni (0,1 M fosfátový pufr s hodnotou pH 7,4) obsahující různé koncentrace detergentu Triton X-100 za použití sonikačního zařízení Bandelin sonoplus HD2070. Homogenizace probíhala ve třech 2-minutových intervalech při 4 °C při maximálním výkonu amplitudy s 60 % aktivních pulzů, homogenát byl následně centrifugován (Boeco Germany) 15 minut (4 °C, 2370 × g) a výsledný supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm polyvinylidenfluoridový (PVDF) filtr. Pro zvýšení výtěžku byly optimalizovány parametry délky homogenizace, počtu muších hlav a délky rozestupů mezi homogenizačními cykly. U získaných supernatantů po homogenizaci byla stanovena aktivita mušího enzymu pomocí Ellmanovy metody (Ellman et al., 1961; Pohanka et al., 2010).

10.2.2 Purifikace muší AChE

Příprava nosiče s afinitním ligandem

K purifikaci muší AChE ze supernatantu po homogenizaci bylo využito principu afinitní chromatografie. Jako výchozí nosič byla zvolena 6B Sepharosa s volnou epoxidovou skupinou (GE Healthcare) modifikována inhibitorem AChE takrinem (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin, THA). Jeden gram epoxy-aktivované Sepharosy byl hodinu promýván destilovanou vodou, vazebným puffrem (50 mM

uhličitan sodný, 50 % (v/v) dimethylformamid, pH 10,5) s přídatkem 1 g THA a vzniklá směs byla míchána do druhého dne na třepačce (Barnstead® MaxQ™ 4000; 40 °C, 60 rpm, 16 hod). Následující den byla směs několikrát promyta destilovanou vodou a nezreagované skupiny nosiče byly zablokovány 1M ethanolaminem (40 °C, 60 RPM, 4 hod). Připravený nosič byl třikrát promyt roztoky o různém pH a destilovanou vodou. Každý cyklus zahrnoval promytí octanovým pufrům (25 ml 0,1 M octan draselný, 0,5 M chlorid sodný, pH 4,5), tetraboritanovým pufrům (25 ml 0,01 M tetraboritan sodný, 0,5 M chlorid sodný, pH 10) a 25 ml destilované vody. Výsledný nosič s afinitním ligandem byl skladován v lednici v 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 8,0 s obsahem 0,5 M chloridu sodného a 20% ethanolu.

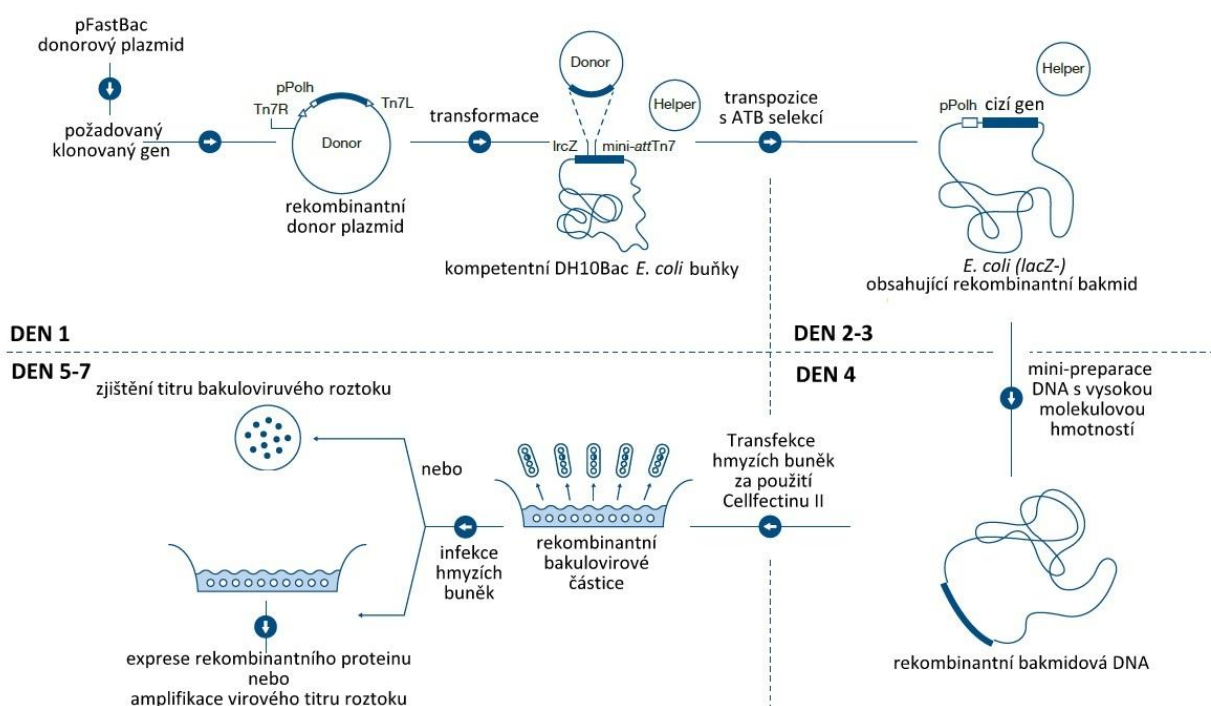
Pro purifikaci muší AChE byl afinitní nosič naplněn do 8 ml kolonky a nasycen nanášecím pufrům (0,1 M fosfátový pufr s hodnotou pH 7,4). Muší homogenát byl na kolonce inkubován 10 min s afinitním nosičem, který byl následně třikrát promyt nanášecím pufrům. Pro vyvázání enzymu byl použit buď nadbytek substrátu (30 mM acetylcholin jodid v nanášecím pufru) nebo nadbytek inhibitoru takrinu (10 mM THA v nanášecím pufru). Vyvázaný enzym byl dialyzován proti nanášecímu pufru po dobu 12-24 hodin. Afinitní kolonka byla regenerována pomocí 6 M guanidin hydrochloridu a skladována v lednici při 4 °C v 0,1 M Tris-HCl pufru, pH 8,0 s obsahem 0,5 M chloridu sodného a 20% ethanolu.

Dialýza eluátu a stanovení přítomnosti proteinů

V průběhu dialýzy byla zjišťována aktivita *MdAChE* Ellmanovou metodou, v případě nedostatečných hodnot enzymových aktivit byl proveden test na přítomnost inhibitoru. Tento test spočíval v naředění dialyzátu s hAChE v poměru 1:1 s následnou detekcí aktivity Ellmanovou metodou. Při průkazu zbytkové přítomnosti inhibitoru byl proces dialýzy opakován. Dialyzát byl následně zakoncentrován centrifugací (2370 × g, 4 °C) v centrifugačních zkumavkách Vivaspin 500 (molekulová hmotnost rozhodovacího limitu 30 000 Da, PES) nebo Vivaspin 6 (molekulová hmotnost rozhodovacího limitu 30 000 Da, PES) s ohledem na objem zpracovávaného vzorku dialyzátu.

10.3 Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára *Anopheles gambiae*

Hmyzí enzym AgAChE1 byl produkován pomocí Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted expression systému (Invitrogen) využívající hmyzí buněčné linie. Bakulovirový expresní systém je založen na generování rekombinantního bakuloviru lokálně specifickou transpozicí v *Escherichia coli* (*E. coli*) namísto homologní rekombinace v hmyzích buňkách. Expresní kazeta vektorů pFastBac™ se rekombinuje s rodičovským bakmidem v *E. coli* DH10Bac™ za vzniku expresního bakmidu. Mateřský bakmid obsahuje komplementační faktor lacZ-alfa pro efektivní modro/bílou selekci pozitivních rekombinantů. Bakmid je následně transfekován do hmyzích buněk pro produkci rekombinantních bakulovirových částic (Obrázek 22) (Thermo Fisher Scientific, nedatováno).



Obrázek 22. Rekombinantní produkce pomocí Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted expression kitu. Převzato a upraveno z Thermo Fisher Scientific, (nedatováno).

10.3.1 Amplifikace templátové DNA

Templátová DNA (Uniprot ID: Q869C3) byla připravena firmou Life Technologies a namnožena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro PCR reakci byla

použita Phusion DNA polymerasa (New England Biolabs), která generuje tupé konce na amplifikované DNA. Oligonukleotidy (Generi Biotech, Česká Republika) použité pro amplifikaci jsou uvedeny viz. Tabulka 1 a reakční směs PCR o celkovém objemu 25 μ l je uvedena viz. Tabulka 2.

Tabulka 1. Sekvence a orientace primerů pro PCR.

Název primeru	Orientace	Sekvence (5' - 3')
Anoga_AChE-f	přední	GATAACGACCCACTCGTCGTGAATACAGACAAAGG
Anoga_AChE-r	zadní	CCACCCTCAGAACCGTGCGAGTCCTCT

Tabulka 2. Příprava reakční směsi pro PCR.

Název reagentie	Objem (μ l)
5 x Phusion HF pufru	5
Phusion DNA polymerasa	0,3
10 mM dNTP	0,5
10 μ M přední primer	1
10 μ M zadní primer	1
110 ng/ μ l templátová DNA	2
deionizovaná voda	15,2
Celkový objem reakce	25

PCR směs byla promíchána na vortexu (IKA) a PCR zkumavky byly přeneseny do termocykleru (Labcycler, SensoQuest). Teplotní profil PCR reakce je uveden viz. Tabulka 3.

Tabulka 3. Teplotní profil PCR reakce.

Cyklus	Teplota	Čas (minuty)	Počet opakování
Úvodní denaturace	98 °C	1:00	1
Denaturace	98 °C	0:10	30
Nasedání primerů	55 °C	0:30	
Prodloužení DNA	72 °C	1:00	
Finální prodloužení	72 °C	10:00	1
Chlazení	4 °C	neurčito	1

Analýza PCR produktu probíhala separací elektroforézou v 1% preparativním agarózovém gelu (Lonza) za přítomnosti interkalačního barviva DNA SYBR SAFE (Invitrogen) při konstantním napětí 100 V po dobu 30 minut. Amplifikovaná DNA byla vizualizována pomocí transluminátoru, jako DNA velikostní standard molekulových hmotností byl použit O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder (Thermo Scientific). PCR produkt odpovídající velikosti byl vyříznut z gelu a izolován pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) dle postupu výrobce.

10.3.2 Bac-to-Bac® TOPO® klonovací systém

Pro vložení izolované DNA do vektoru pFastBac byl použit Bac-to-Bac® HBM TOPO® klonovací kit (Invitrogen). Reakce pro topoklonování byla připravena smícháním 3 µL izolované DNA, 1 µl roztoku solí (Invitrogen), 1 µl sterilní vody a 1 µl Topo® vektoru (Invitrogen). Směs byla jemně promíchána a inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Pro transformaci chemokompetentních bakterií *E. coli* byly 2 µl klonovací směsi přidány ke 100 µl One shot® Mach1™ buňkám (Invitrogen) a vzniklá směs byla znovu jemně promíchána a inkubována na ledu po dobu 30 min. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (30 s, 42 °C) a znovu vráceny na led po dobu 2 minut. Transformované buňky byly smíchány s 500 µl S.O.C média (Invitrogen), převedeny do 10 ml zkumavky a inkubovány hodinu na třepačce (200 rpm) při 37°C. Po hodině bylo 50 µl transformovaných buněk vyseto na LB plotnu obsahující antibiotikum karbecilin (100 µg/ml), zbytek buněk byl centrifugován (5000 × g, 10 min), peleta byla znovu resuspendována v 50 µl média a nanesena na druhou LB plotnu s antibiotikem. Takto naočkované plotny byly inkubovány v termostatu při 37 °C dnem vzhůru do druhého dne.

Vyrostlé kolonie byly přeneseny do sterilních 1,5 ml zkumavek s 50 µl sterilní vody. 20 µl z každého vzorku bylo povařeno (95 °C, 5 min) a následně použito jako templátová DNA pro kontrolní PCR reakci. Pro kontrolní PCR byla namíchána reakční směs dle rozpisu (Tabulka 5) za použití FastStart™ master mixu (Sigma-Aldrich) a jednoho vektor-specifického a jednoho gen-specifického primeru (Tabulka 4). Teplotní profil PCR reakce je uveden viz. Tabulka 6.

Tabulka 4. Sekvence a orientace primerů pro PCR.

Název primeru	Orientace	Sekvence (5'-3')
Anoga_AChE-f	přední	GGAATTCACGACAACGATCCGCTG
SV40 polyA	zadní	CTCTGACTTGAGCGTCGATTTT

Tabulka 5. Příprava reakční směsi pro PCR.

Název reagensů	Objem (μl)
2 x FastStart™ mastermix	12,5
10 μM přední primer	1
10 μM zadní primer	1
110 ng/μl templátová DNA	1
deionizovaná voda	9,5
Celkový objem reakce	25

Tabulka 6. Teplotní profil kontrolní PCR reakce.

Cyklus	Teplota	Čas (minuty)	Počet opakování
Úvodní denaturace	95 °C	4:00	1
Denaturace	95 °C	0:30	30
Nasedání primerů	50 °C	0:30	
Prodloužení DNA	72 °C	2:00	
Finální prodloužení	72 °C	7:00	1
Chlazení	4 °C	neurčito	1

PCR produkty z kolonií byly rozděleny na 1 % agarózovém gelu (Serva) a pozitivní kolonie se správnou orientací byly očkované do 10 ml LB média s přídavkem 100 μg/ml karbenicilinu a inkubovány do druhého dne na třepačce (150 rpm) při 37 °C. Z narostlých kultur byly připraveny zásobní kultury (ve 30 % glycerolu pro dlouhodobé skladování při -80 °C) a 5 ml kultury inkubované přes noc bylo použito k izolaci plazmidové DNA pomocí High Pure Plasmid Isolation kitu (Roche). Plazmidová DNA byla eluována do 30 μl sterilní vody a její koncentrace byla měřena pomocí NanoPhoto-metru™ (Implen). Izolovaná DNA byla zaslána do Sekvenačního střediska AV ČR pro potvrzení správné sekvence vkládaného genu.

10.3.3 Bac-to-bac® HBM TOPO sekreční expresní systém

Vialka MAX Efficiency® DH10Bac™ *E. coli* kompetentních buněk (Invitrogen) byla rozmrazena na ledu. Pro každou transformaci bylo použito 100 µl DH10Bac™ buněk a 1 ng rekombinantního pFastBac™ HBM konstruktů a směs byla inkubována 30 min na ledu. Následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (45 s, 42 °C) a inkubovány 2 min na ledu. K buňkám bylo přidáno 900 µl S.O.C. média pokojové teploty a buňky s pFastBac™ Ag-ace konstruktem byly třepány 4 hod (225 rpm, 37 °C). Transformované buňky byly naředěny S.O.C. médiem a rozočkovány na LB agar (50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamycin, 10 µg/ml tetracyklin, 100 µg/ml X-gal a 40 µg/ml IPTG). Plotny byly inkubovány dnem vzhůru 48 hod při 37 °C. Po inkubaci bylo odebráno 10 bílých kolonií a očkováno do tekutého LB média (50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamycin a 10 µg/ml tetracyklin).

Bílé kolonie byly analyzovány pomocí PCR za použití pUC/M13 předního a zadního primeru pro ověření vzniku bakmidu (Tabulka 7). Reakční směs PCR byla připravena dle rozpisu uvedeného viz. Tabulka 5 a reakce probíhala dle rozpisu uvedeného viz. Tabulka 8. Pozitivní kolonie byly rozmnoženy a přes noc inkubované kultury byly použity pro izolaci bakmidové DNA. Vzhledem k velikosti DNA nad 100 kbp byla vynechána vazba na silikamembránu, DNA byla vysrážena isopropanolem a ethanolem a rozpuštěna v TE pufru.

Tabulka 7. Sekvence a orientace primerů pro PCR.

Název primeru	Orientace	Sekvence (5' - 3')
pUC/M13	přední	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
pUC/M13	zadní	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG

Tabulka 8. Teplotní profil PCR reakce.

Cyklus	Teplota	Čas (minuty)	Počet opakování
Úvodní denaturace	95 °C	4:00	1
Denaturace	95 °C	0:30	30
Nasedání primerů	55 °C	0:30	
Prodloužení DNA	72 °C	4:00	

Finální prodloužení	72 °C	7:00	1
Chlazení	4 °C	neurčito	1

10.3.4 Transfekce izolované bakmidové DNA

Bakmid byl transfekován do hmyzích buněk *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Transfekce byla provedena v 6-jamkové destičce, kde na každou jamku bylo nasazeno 8×10^5 Sf9 buněk s životností vyšší než 95 %. Pro každou transfekci probíhající v jednotlivých jamkách byla připravena koncentrační řada bakulovirové DNA (1, 2, 3, 4 a 5 μ g). Následně byl k bakulovirové DNA přidán roztok Cellfectinu® II (Invitrogen) a po 30 min inkubace byla DNA-lipidová směs po kapkách přidána do jamky s přisedlými Sf9 buňkami. Buňky byly inkubovány 3-5 hod při 27 °C, poté byla od buněk odsáta transfekční směs a do každé jamky bylo přidáno 2 ml kompletního růstového média (Grace's insect médium doplněno 10 % FBS). Takto transfekované buňky byly inkubovány 72 hod při 27 °C nebo do pozorování pozdních příznaků virové infekce. Infikované buňky byly zcentrifugovány (500 \times g, 5 min) a supernatant byl přenesen do nové 15 ml zkumavky a označen jako P1 zásobní roztok bakulovirové populace. Přítomnost rekombinantního proteinu byla potvrzena 1D mini gelovou elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s přidavkem dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) a detekce proteinu byla potvrzena pomocí Western blottingu imunodetekcí monoklonální Anti-His tag protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1: 5000) (Thermo Fisher, MA1-21315-HRP). Buněčný supernatant byl použit pro stanovení aktivity komáří AgAChE1 pomocí Ellmanovy metody. Dalším krokem bylo zjištění titru P1 bakulovirového roztoku plakovou esejí a amplifikace P1 virového roztoku.

10.3.5 Kvantifikace bakulovirů metodou real-time PCR

Plaková esej je časově náročná, několikadenní metoda, a proto byla pro zjištění titru bakulovirového roztoku použita metoda kvantifikace pomocí PCR v reálném čase (real-time PCR, qPCR). Bakulovirová DNA byla izolována pomocí sady PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kit (Invitrogen). Pro kvantifikaci bakuloviru byly použity dvě sady primerů – jedna sada nasedající na gen *ace-1* a druhá sada amplifikující gen pro GP-64 obalový glykoprotein

nukleopolyhedroviru můry *Autographa californica* (Tabulka 9), který je nezbytný pro vstup bakuloviru do buňky (Hitchman et al., 2007). Pro sestavení kalibrační křivky v rozsahu koncentrací 10^8 - 10^5 pfu/ml byla použita plazmidová pFastBac DNA o přesně stanovené koncentraci.

Tabulka 9. Sekvence a orientace primerů pro qPCR.

Název primeru	Orientace	Sekvence (5' - 3')
Anoga_AChE_RT-f	přední	GTCAGCTCTTTCACGTGATCTAT
Anoga_AChE_RT-r	zadní	GTAGTGCTCTTAGTGTGGCTTC
Gp-64-f	přední	CGGCGTGAGTATGATTCTCAA
Gp-64-r	zadní	ATGAGCAGACACGCAGCTTTT

Pro qPCR analýzu byla připravena reakční směs za použití DNA interkalačního činidla SYBR Green (gb SG PCR Master Mix, Generi Biotech) spolu s příslušnou sadou primerů a templátovou DNA (Tabulka 10).

Tabulka 10. Příprava reakční směsi pro qPCR.

Název reagensů	Objem (μl)
2 x gb SG PCR Master Mix	10
10 μM přední primer	1
10 μM zadní primer	1
110 ng/μl templátová DNA	2
deionizovaná voda	6
Celkový objem reakce	20

PCR směs byla promíchána na vortexu (IKA) a krátce centrifugována. qPCR probíhala v kapilárách v přístroji LightCycler® 2.0 Instrument (Roche) dle teplotního profilu qPCR reakce (Tabulka 11).

Tabulka 11. Teplotní profil qPCR reakce.

Cyklus	Teplota	Čas (minuty)	Počet opakování
Úvodní denaturace	95 °C	3:00	1
Denaturace	95 °C	0:10	35
Nasedání primerů	60 °C	0:30	
Prodloužení DNA	72 °C	2:00	

Finální prodloužení	72 °C	7:00	1
Chlazení	4 °C	neurčito	1

10.3.6 Amplifikace virového titru roztoku

Amplifikace P1 bakulovirového roztoku probíhala v 6-jamkové destičce, kde bylo na jamku nasazeno 2×10^6 Sf9 buněk v Sf-900™ II SFM médiu obsahujícím 2 % FBS. Do každé jamky bylo přidáno Sf-900™ II SFM média s 2 % FBS a P1 bakulovirový roztok o vypočteném objemu:

$$\text{P1 roztok (ml)} = \frac{\text{MOI (PFU/buňka)} \times \text{celkový počet buněk}}{\text{titr bakulovirového roztoku (PFU/ml)}}$$

Multiplicita infekce (MOI) je poměr, který určuje počet virových jednotek na jednu buňku (plaque forming units, plak tvořících jednotek, PFU). Pro prvotní amplifikaci byl titr P1 bakulovirového roztoku odhadnut na 1×10^6 PFU/ml a MOI byla zvolena 0,1 PFU/buňku. Jako negativní kontrola sloužila jamka obsahující pouze buněčnou kulturu Sf9 s Sf-900™ II SFM médiem obsahujícím 2 % FBS. Destička byla inkubována 48 hod při 27 °C nebo do pozorování pozdní fáze virové infekce. Médium obsahující virus bylo odebráno do 15 ml zkumavky, centrifugováno 10 min při $500 \times g$ a supernatant byl označen jako P2 bakulovirový roztok. Stejným postupem může být P2 bakulovirový roztok amplifikován na P3 roztok s ještě vyšším virovým titrem.

10.3.7 Exprese rekombinantní AgAChE1

Rekombinantní produkce komáří AgAChE1 probíhala na Sf9 buňkách stejným postupem jako předchozí amplifikace titru bakulovirových roztoků. Do 6-jamkové destičky bylo nasazeno 2×10^6 Sf9 buněk na jamku. Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě bylo médium odebráno a nahrazeno Sf-900™ II SFM médiem, 2 % FBS a vypočteným množstvím P3 bakulovirového roztoku pro dosažení požadované hodnoty MOI. Infikovaná destička byla inkubována při 27 °C do zpozorování pozdní fáze virové infekce. Následně bylo médium odebráno a centrifugováno po dobu 10 min při $500 \times g$. Supernatant byl rozdělen po 1 ml do sterilních 1,5 ml zkumavek a skladován při 4 °C pro další analýzy.

10.3.8 Purifikace rekombinantní *AgAChE1*

Při purifikaci byla použita afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech s využitím nosičů HisLink™ Protein Purification Resin (Promega) a Ni Sepharose™ excel (GE Healthcare). Před zavedením afinitního nosiče byla optimalizována koncentrace imidazolu vhodná pro promývací pufr. Purifikace probíhala v 5ml propylenové kolonce (QIAGEN) s ekvilibrováním afinitním nosičem vazebným puforem (50mM Tris-HCl s hodnotou pH 7,5, 500 mM chlorid sodný a 10mM imidazol). K afinitnímu nosiči byl přidán buněčný supernatant v poměru 1:1 a směs byla za stálého míchání inkubována 1 hodinu v lednici. Afinitní nosič s navázanou *AgAChE1* byl promyt promývacím puforem (50 mM Tris-HCl pufr, pH 7,5, 500 mM NaCl) s různou koncentrací imidazolu (20, 30, 40, 50, 70 a 90 mM). V konečném kroku byl enzym vyvázan elučním puforem (50 mM Tris-HCl s hodnotou pH 7,5, 500 mM NaCl a 500 mM imidazol).

Purifikace na nosiči HisLink™ Protein Purification Resin probíhala dle optimalizovaného protokolu výrobce. HisLink byl nanesen na 5 ml propylenovou kolonku (QIAGEN) a ekvilibrován vazebným puforem (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl a 10 mM imidazol). Poté byl k afinitnímu nosiči přidán supernatant v poměru 1:1 a směs byla za stálého míchání inkubována 1 hodinu v lednici. Afinitní nosič s navázanou AChE byl několikrát promyt promývacím puforem (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol). V konečném kroku byl enzym vyvázan elučním puforem (50 mM Tris-HCl s hodnotou pH 7,5, 500 mM NaCl a 500 mM imidazol). Purifikace byla doplněna o dialýzu proti 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 obsahující 500 mM NaCl.

10.4 Stanovení aktivity acetylcholinesterasy pomocí Ellmanovy metody

Ellmanovým protokolem byla stanovena aktivita AChE při přípravě mušního homogenátu, komářního supernatantu a při zkoumání selektivity AChE inhibitorů k enzymům (Ellman et al., 1961; Pohanka et al., 2010). Reakce enzymu probíhala v 0,1 M fosfátovém pufru s hodnotou pH 7,4 za přítomnosti chromogenu 0,25 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) a substrátu 1 mM jodidu acetylthiocholinu. Aktivita enzymu byla stanovena měřením nárůstu absorbance

za minutu stanovených ve 2 min intervalech při vlnové délce 412 nm při 37 °C za použití Multi-mode microplate reader Synergy 2 (Vermont).

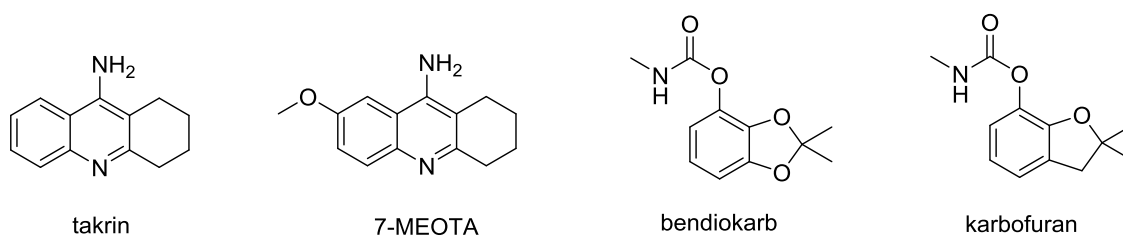
10.5 Charakterizace enzymu pomocí stanovení Michaelisovy konstanty

Pro určení Michaelisovy konstanty (K_m) byla použita výše popsaná Ellmanova metoda s různou koncentrační řadou substrátu acetylthiocholin jodid. Každá koncentrace substrátu byla měřena v triplicátu s určením směrodatných odchylek. Následným zpracování dat pomocí software GraphPad 6.0 byla určena optimální koncentrace substrátu pro enzymy *MdAChE* a *AgAChE1*, která byla dále použita pro další stanovování aktivit daných enzymů.

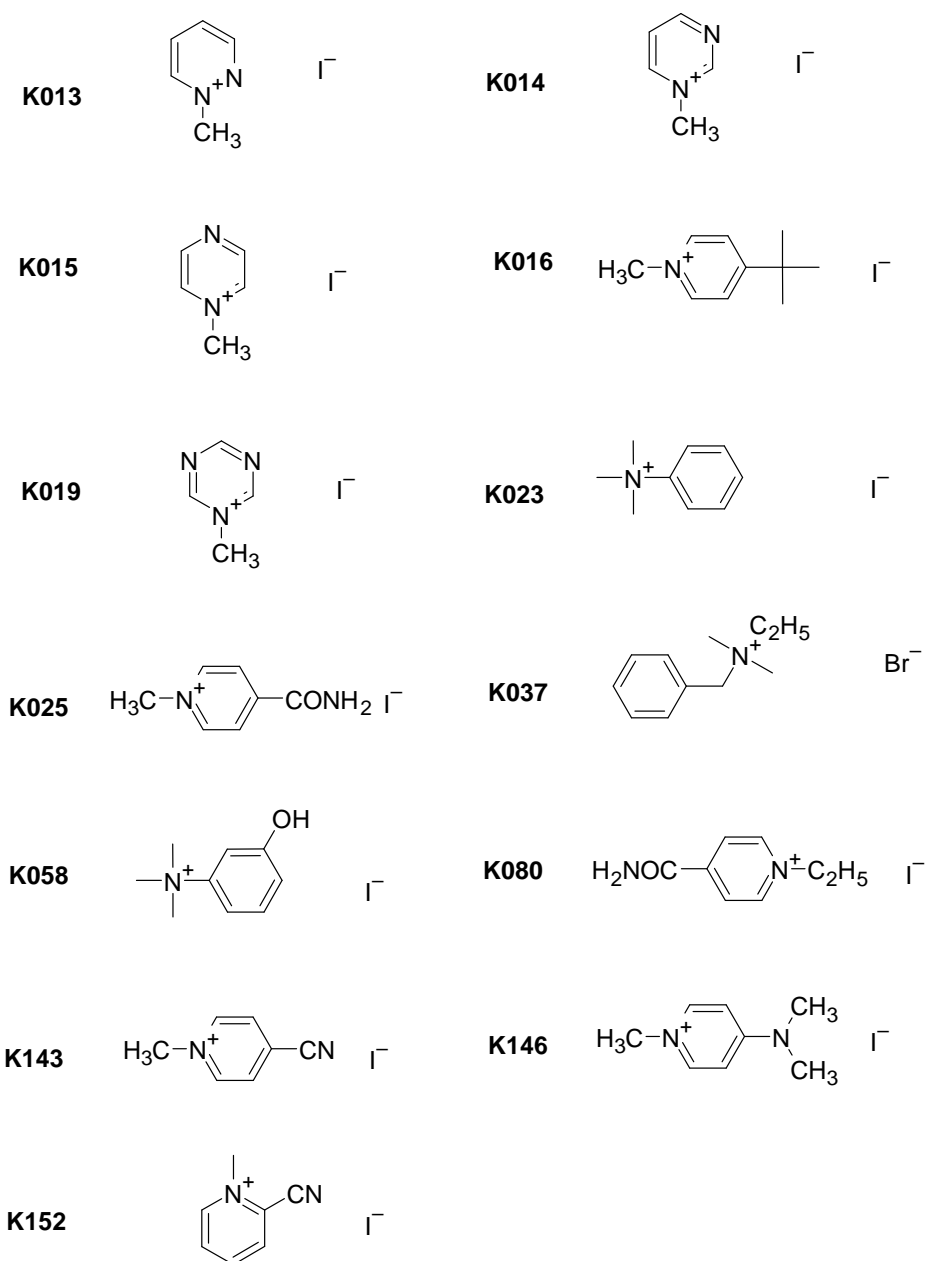
10.6 Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE

Pro měření inhibiční účinnosti látek bylo vybráno celkem 75 sloučenin pocházejících z interní databáze, které byly na základě strukturní podobnosti rozděleny do 6 skupin (Obrázek 24–29). Enzymové měření bylo provedeno po homogenizaci na supernatantu obsahující *MdAChE* a na buněčném supernatantu obsahující rekombinantní *AgAChE1* jak u standardních inhibitorů AChE (Obrázek 23), tak u vybraných sloučenin z interní databáze sloučenin.

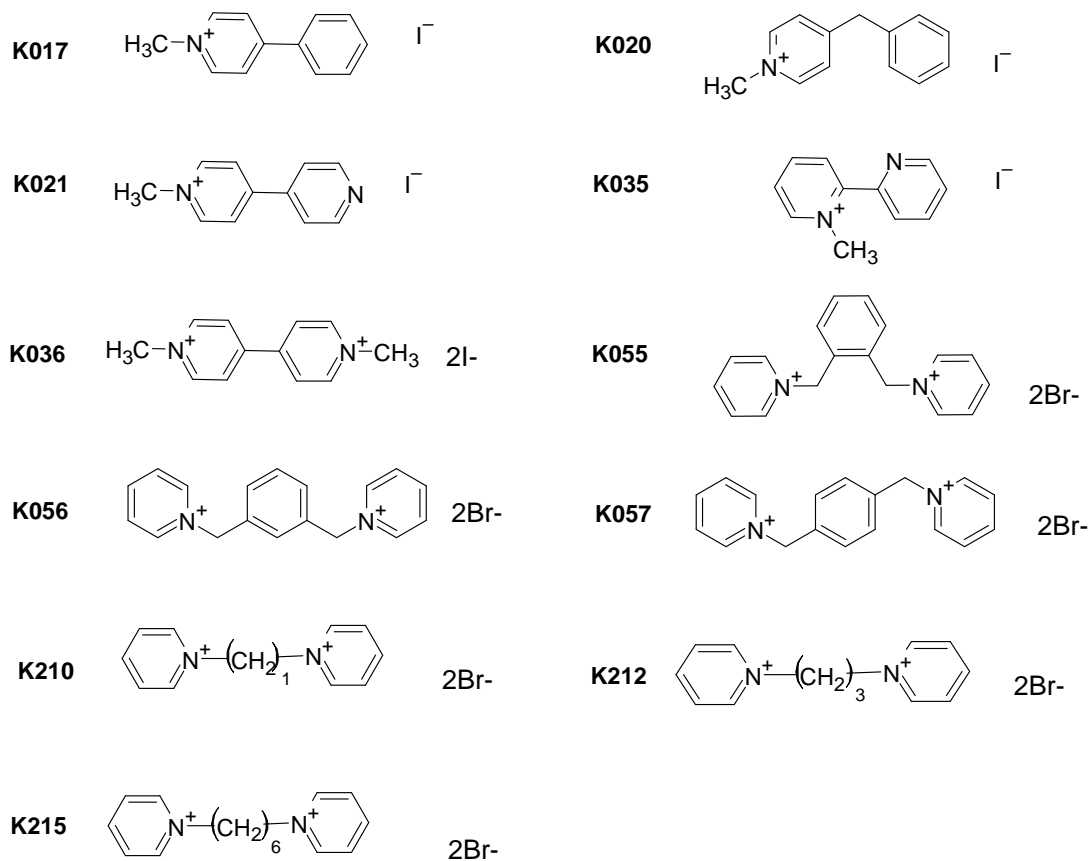
Testování inhibitorů probíhalo paralelně na lidských a hmyzích enzymech, kdy zdrojem lidské AChE byly erytrocyty zbavené hemoglobinu a zdrojem lidské BChE byla separovaná plazma, obojí dostupné na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Univerzity Obrany v Brně (Hrabcova et al., 2017). Hodnota IC_{50} byla vyjádřena jako koncentrace sloučeniny, která inhibuje danou enzymovou aktivitu na úrovni 50 %. Roztoky testovaných sloučenin v koncentračním rozsahu 10^{-3} – 10^{-10} M byly inkubovány v 96-jamkové destičce po dobu 5 minut při 37 °C. Každá koncentrace byla měřena v triplicátu. Aktivita enzymu byla určena měřením nárůstu absorbance vzorku za minutu při vlnové délce 412 nm při 37 °C. Měření probíhalo ve 2minutových intervalech za použití Microplate readeru Synergy 2. Selektivní index (SI) byl vypočítán jako poměr hodnoty IC_{50} lidské AChE k hodnotě IC_{50} hmyzího enzymu (IC_{50} lidská AChE/ IC_{50} hmyzí AChE).



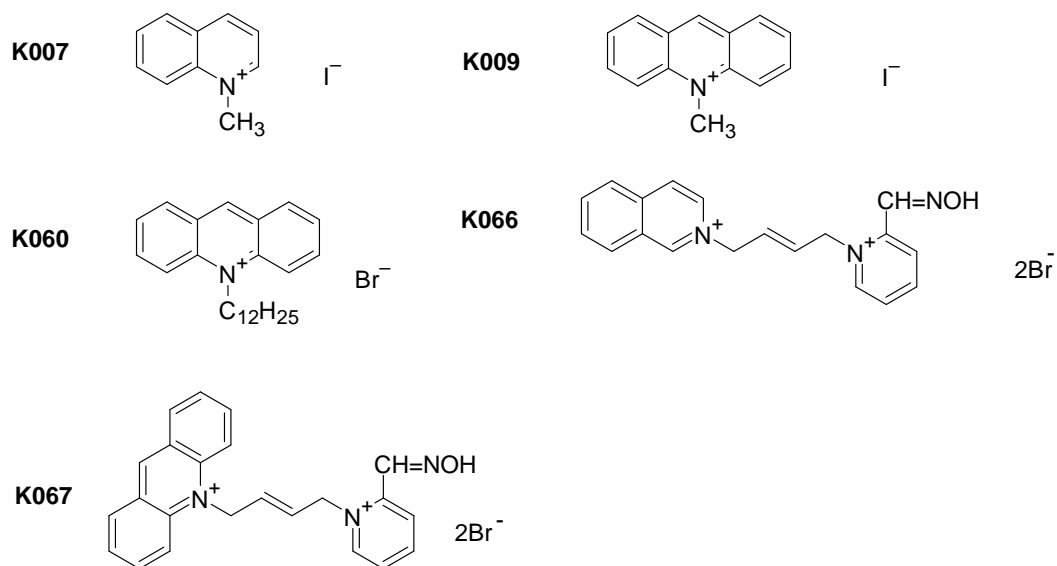
Obrázek 23. Struktury standardních inhibitorů AChE.



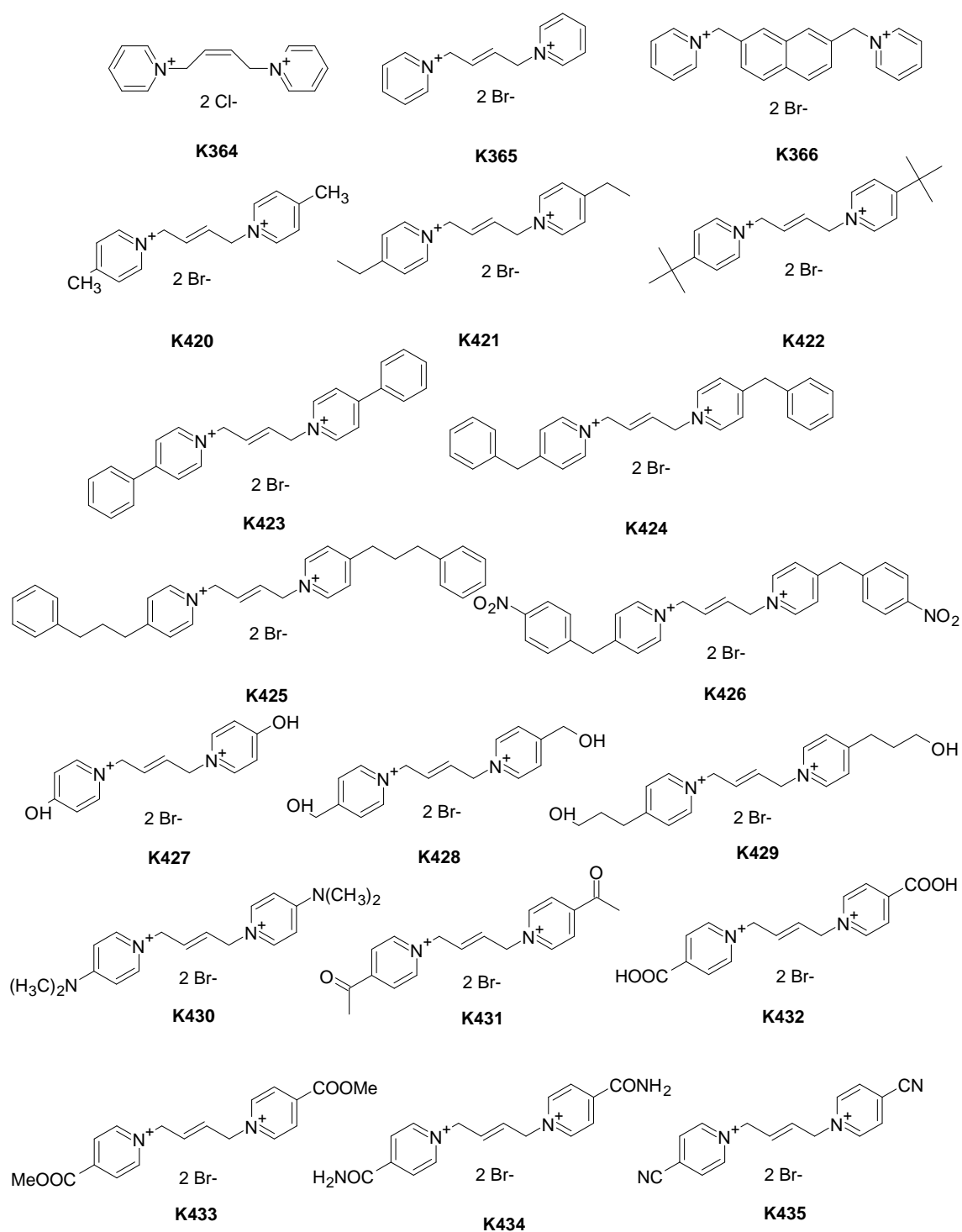
Obrázek 24. Skupina 1 – struktury sloučenin s jedním aromatickým jádrem.



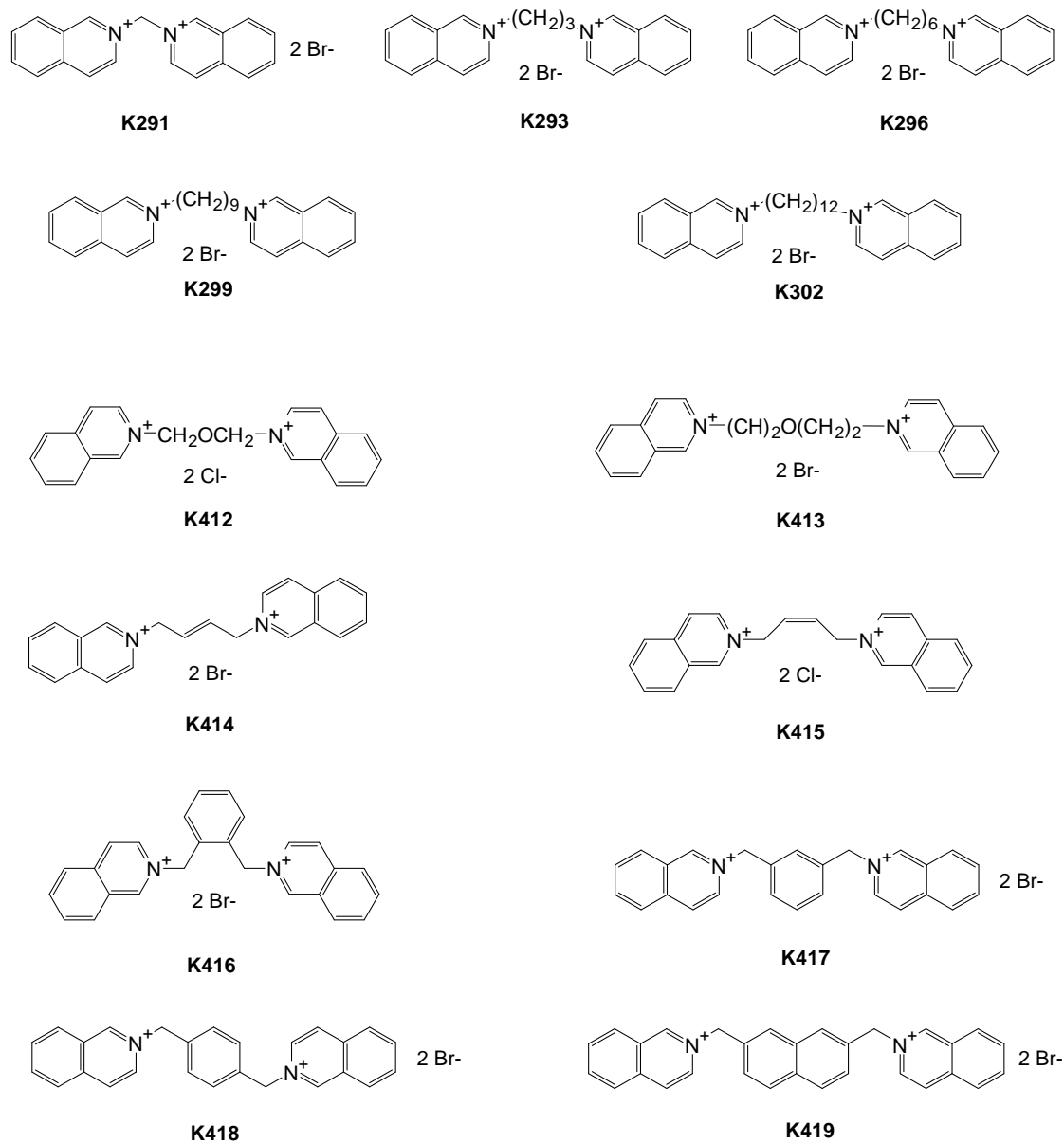
Obrázek 25. Skupina 2 – struktury derivátů pyridiniových solí.



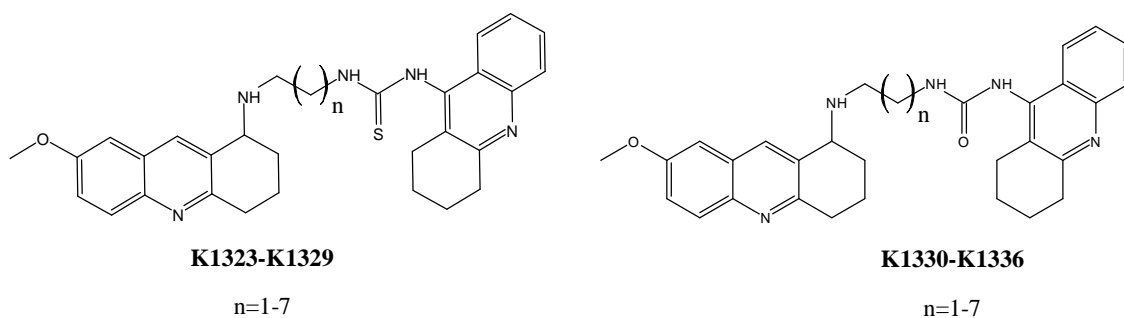
Obrázek 26. Skupina 3 – struktury chinoliniových a akridiniových derivátů.



Obrázek 27. Skupina 4 – struktury bis-pyridiniových sloučenin (nesubstituovaných a *para*-substituovaných).



Obrázek 28. Skupina 5 – struktury bis-isochinoliniových sloučenin s alifatickými a aromatickými spojujícími řetězci.



Obrázek 29. Skupina 6 – struktury 7-methoxytakrin-takrinových heterodimerů nesoucích thiomocovinový a močovinný fragment ve spojovacím řetězci.

10.7 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení dat byly použity programy Microsoft Excel (Redmont, WA, USA) a GraphPad Prism version 6.0 pro Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

11 Výsledky

11.1 Příprava muší acetylcholinesterasy

11.1.1 Příprava mušního homogenátu

Stanovení optimální koncentrace detergentu pro výtěžek MdAChE

Pro přípravu mušního homogenátu byla nejprve optimalizována koncentrace detergentu Triton X-100. Pro tento účel bylo použito 30 muších hlav a 0,1M fosfátový pufr, pH 7,4 ve finálním objemu 2 ml. Byly vybrány dvě koncentrace detergentu a to 0,1 % a 1 %. Získané aktivity byly porovnány s enzymovou aktivitou bez použití detergentu a u obou koncentrací detergentu byl patrný statisticky významný nárůst aktivity dle testu Kruskal-Wallis na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ s hodnotou $p < 0,0001$. Nejvyšší výtěžky pro MdAChE byly získány za použití 1% koncentrace Tritonu X-100 (Tabulka 12). Hodnoty získané aktivity za použití 0,1 % a 1 % Tritonu X-100 se dle Dunnova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně nelišily.

Tabulka 12. Výsledky aktivity za různých koncentrací Tritonu X-100.

Koncentrace detergentu	$\Delta A_{412} / \text{min} \pm \text{SD}$	Relativní výtěžek (%)
0 % Triton X-100	$0,079 \pm 0,007$	28,9 %
0,1 % Triton X-100	$0,222 \pm 0,005$	81,3 %
1 % Triton X-100	$0,273 \pm 0,002$	100 %

Stanovení optimálního počtu muších hlav na výtěžek MdAChE

Homogenizace muších hlav byla zopakována pro různý počet hlav a dle výsledné celkové aktivity homogenátu byl vybrán optimální počet pro biochemické stanovení (Tabulka 13). Při sledování závislosti mezi získanou enzymovou aktivitou po filtraci a počtem homogenizovaných muších hlav byla patrná vzrůstající lineární tendence (Tabulka 13) charakterizovaná rovnicí $y = 0,01976 \cdot x - 0,02152$ s hodnotou $R^2 = 0,982$. Z porovnání z enzymových aktivit před a po filtraci jsou patrné vyšší ztráty u velmi nízkých počtů muších hlav. Po porovnání získané enzymové aktivity a procentuálního úbytku aktivity po filtraci bylo zvoleno jako optimální množství 30 muších hlav.

Tabulka 13. Enzymová aktivita *MdAChE* v homogenátu v závislosti na počtu muších hlav.

Počet hlav	$\Delta A_{412}/\text{min}$ po centrifugaci	$\Delta A_{412}/\text{min}$ po filtraci	Úbytek $\Delta A_{412}/\text{min}$ po filtraci (%)
1	$0,030 \pm 0,007$	$0,019 \pm 0,002$	37
5	$0,083 \pm 0,003$	$0,064 \pm 0,003$	23
10	$0,286 \pm 0,002$	$0,142 \pm 0,004$	50
20	$0,623 \pm 0,005$	$0,416 \pm 0,003$	33
25	$0,541 \pm 0,003$	$0,491 \pm 0,003$	9
30	$0,523 \pm 0,003$	$0,516 \pm 0,002$	1
35	$0,846 \pm 0,005$	$0,691 \pm 0,003$	18

Stanovení optimálního délky homogenizace na výtěžek *MdAChE*

Pro stanovení závislosti délky homogenizace na množství enzymu byla homogenizace prováděna 2, 3, 4 a 5 minut. Z dostupných dat na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyla patrná statisticky významná korelace (Spearmanův test, hodnota $p = 0,750$) mezi nárůstem délky homogenizace a nárůstem detekované aktivity *MdAChE* v homogenátu (Tabulka 14).

Tabulka 14. Hodnota aktivity *MdAChE* v homogenátu v závislosti na délce homogenizace.

Délka homogenizace (min)	$\Delta A_{412}/\text{min}$ po centrifugaci	$\Delta A_{412}/\text{min}$ po filtraci	Úbytek $\Delta A_{412}/\text{min}$ po filtraci (%)
2	$0,430 \pm 0,007$	$0,406 \pm 0,007$	6
3	$0,513 \pm 0,009$	$0,494 \pm 0,006$	4
4	$0,533 \pm 0,005$	$0,452 \pm 0,008$	15
5	$0,569 \pm 0,003$	$0,484 \pm 0,006$	15

Dalším faktorem optimalizace bylo zavedení 10minutové pauzy mezi jednotlivými kroky. Z naměřených dat vyplývá, že zavedení 10minutové pauzy mezi jednotlivými homogenizacemi vedlo k vyšším výtěžkům a to o 20,7 % (Tabulka 15). Dle Mann-Whitney testu se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jedná o statistický významný nárůst v detekované aktivitě enzymu v homogenátu (hodnota $p = 0,0022$).

Tabulka 15. Změna výtěžku aktivity *MdAChE* v homogenátu po 10min. pauze mezi jednotlivými homogenizacemi.

	$\Delta A_{412} / \text{min} \pm \text{SD}$	nárůst $\Delta A_{412} / \text{min}$ po pauze (%)
Sonikace bez pauzy	0,184 ± 0,007	-
Sonikace s 10 min. pauzou	0,222 ± 0,005	20,7 %

Pro konečný protokol přípravy mušího homogenátu byly používány mouchy zamražené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu alespoň 14 dní. Pro izolaci *MdAChE* bylo 30 muších hlav homogenizováno v 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,4; 0,1 % Tritonu X-100 při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Homogenizace probíhala ve třech 2minutových intervalech a při maximálním výkonu amplitudy s 60 % aktivních pulzů, jak bylo popsáno výše.

11.1.2 Purifikace muší AChE

Z homogenátu byla purifikována *MdAChE* pomocí nosiče s afinitním ligandem THA. Pro eluci navázaného enzymu byly použity dva přístupy, jednak nadbytek substrátu anebo použití inhibitoru THA. Optimalizace podmínek purifikace probíhala v duplikátu za použití 1 ml homogenátu a purifikovaná *MdAChE* byla zakoncentrována na finální objem 1 ml. Výtěžnost purifikace za použití THA jako elučního činidla byla 33 % původní aktivity enzymu v homogenátu. Ačkoli nebylo ve vzorku prokázáno zbytkové množství inhibitoru THA, získaná hodnota aktivity purifikovaného enzymu nebyla dostatečně vysoká pro testování inhibičních vlastností sloučenin na *MdAChE* (Tabulka 16).

Tabulka 16. Výtěžnost purifikace *MdAChE* na základě eluce pomocí inhibitoru THA a nadbytku substrátu jodidu acetylthiocholinu.

	$\Delta A_{412} / \text{min} \pm \text{SD}$ homogenátu	$\Delta A_{412} / \text{min} \pm \text{SD}$ čisté ACHE	výtěžek $\Delta A_{412} / \text{min}$ (%)
10 mM takrin	0,156 ± 0,014	0,052 ± 0,011	33,3
15 mM jodid acetylcholinu	0,206 ± 0,015	-	-
20 mM jodid acetylcholinu	0,133 ± 0,013	0,034 ± 0,020	25,6
30 mM jodid acetylcholinu	0,205 ± 0,011	0,029 ± 0,015	14,1

Eluce nadbytkem substrátu byla provedena v několika různých koncentracích jodidu acetylcholinu, který byl pro účely testování enzymové

aktivity následně až stonásobně naředěn. Při použití nejnižší koncentrace substrátu (15 mM) se nám nepodařilo získat aktivní purifikovanou *MdAChE*. Navýšení koncentrace substrátu (20 mM a 30 mM) vedlo k získání aktivní purifikované *MdAChE* (Tabulka 16), avšak s velmi rozdílnými výtěžky mezi jednotlivými opakováními.

Pro stabilizaci purifikovaného enzymu bylo do eluátu získaného promytím afinitního nosiče s navázanou *MdAChE* přidán albumin o finální koncentraci 1 mg/ml. Přítomnost albuminu zlepšila stabilitu *MdAChE* během zpracování, což vedlo ke zvýšení výtěžku purifikace na 63 %. Nicméně ani aktivita purifikované *MdAChE* s albuminem nebyla dostatečně vysoká pro testování inhibičního účinku sloučenin (Tabulka 17). Z výše uvedených důvodů a pro časovou tíseň byl pro další práci s enzymem a testování sloučenin použita *MdAChE* obsažena v homogenátu.

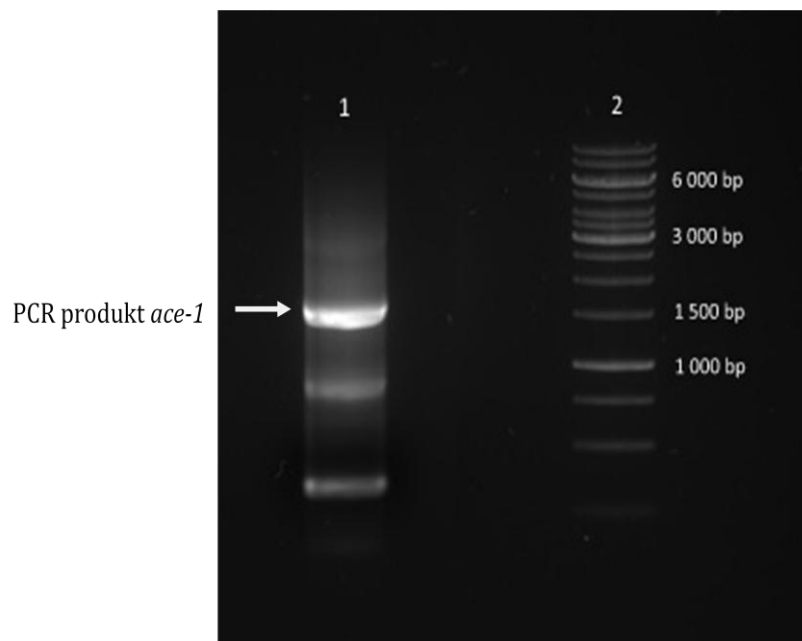
Tabulka 17. Vliv albuminu na výtěžnost purifikace *MdAChE*.

	ΔA_{412} /min \pm SD homogenátu	ΔA_{412} /min \pm SD čisté ACHE	výtěžek ΔA_{412} /min (%)
30 mM jodid acetylcholinu	0,112 \pm 0,007	0,017 \pm 0,006	15,2
30 mM jodid acetylcholinu + albumin	0,135 \pm 0,008	0,088 \pm 0,007	65,2

11.2 Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára *Anopheles gambiae*

11.2.1 Amplifikace templátové DNA

Navržená sekvence templátové DNA byla amplifikována pomocí PCR a výsledný produkt byl separován na agarózovém gelu a zobrazen pomocí transluminátoru (Obrázek 30). PCR produkt genu *ace-1* se nacházel v první jamce a fragment se pohyboval v oblasti okolo velikosti 1 500 páru bazí (base pair – bp). Dle místa nasednutí použitých primerů bychom měli dostat PCR produkt o délce 1653 bp, což odpovídalo našemu nálezu na gelu (Obrázek 30). Označený PCR produkt v první jamce byl z gelu vyřezán, vyizolován z agarózy a použit pro klonování.



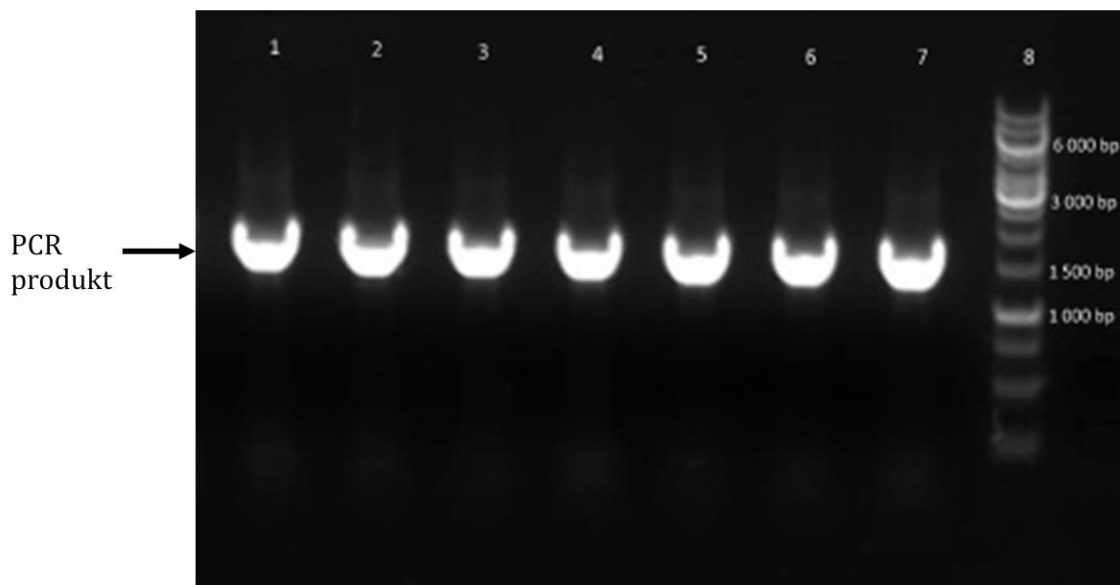
Obrázek 30. Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA.

1 – Produkt reakce PCR,

2 – DNA velikostní standardy molekulových hmotností O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder.

11.2.2 Bac-to-Bac® TOPO® klonovací systém

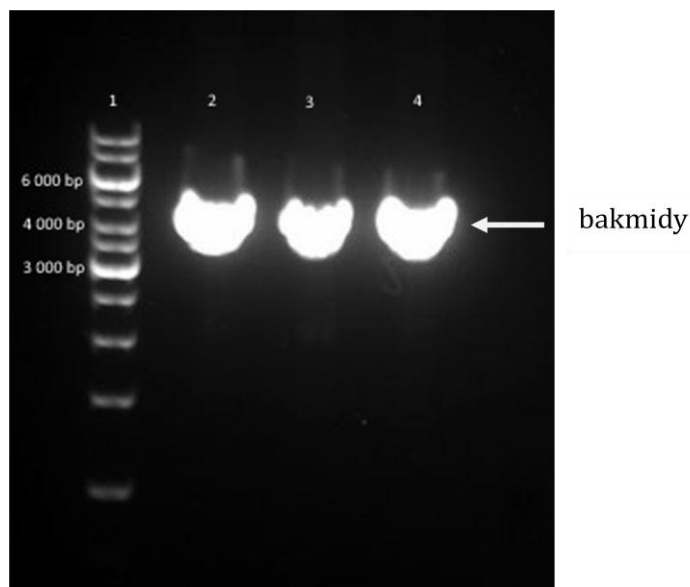
Izolovaný fragment DNA byl vložen do vektoru pFastBac s následnou transformací *E. coli* One shot Mach1™ buněk. Vyrostlé kolonie byly analyzovány pomocí kontrolní PCR (Obrázek 31). V jamkách 1–7 se nachází výsledný produkt amplifikace DNA, který u všech kolonií odpovídá velikosti našeho insertu v plazmidu. Pro potvrzení úspěšného vložení insertu ve správném směru byly jednotlivé produkty podrobeny sekvenaci. Ze sedmi vybraných kolonií došlo ke správnému vložení insertu ve třech případech.



Obrázek 31. Identifikace produktů PCR po transformaci *E. coli* One shot Mach1™ buněk.
 1 – 7 - produkty PCR,
 8 - DNA velikostní standardy molekulových hmotností O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder.

11.2.3 Bac-to-Bac® HBM TOPO® sekreční expresní systém

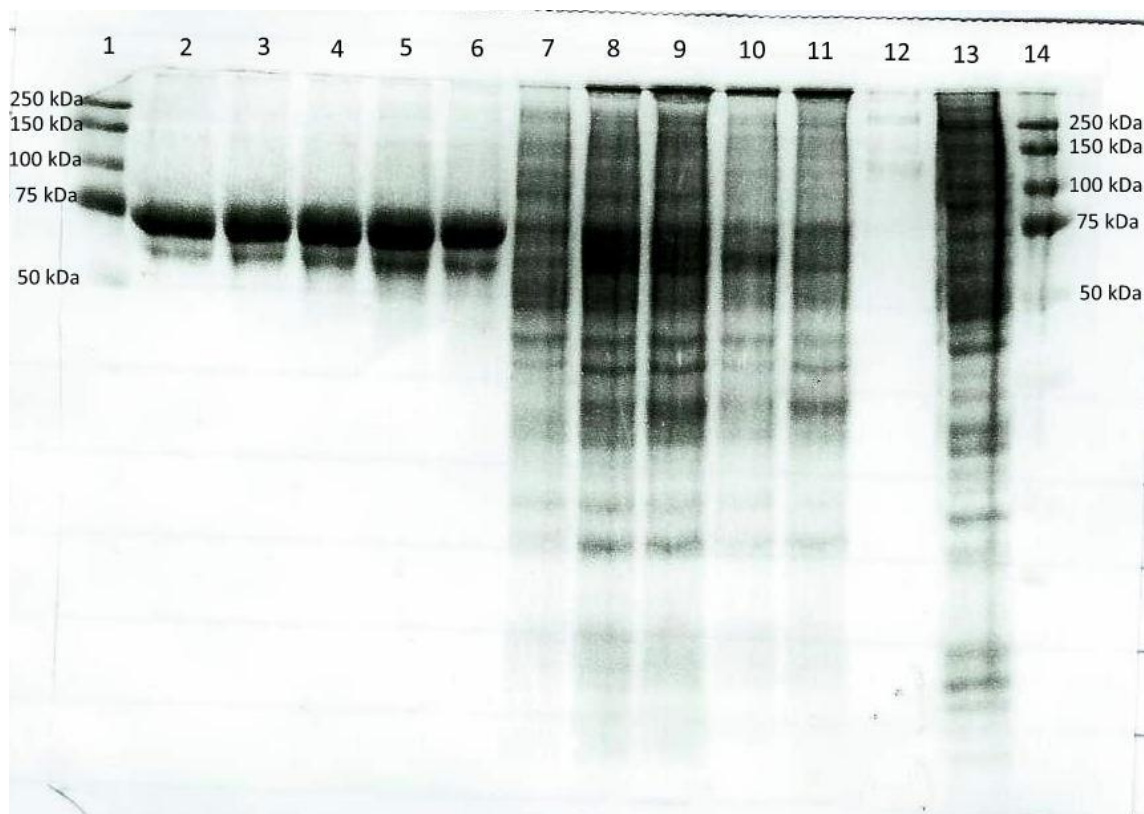
Získaný pFastBac™/HBM TOPO® konstrukt nesoucí gen *ace-1* s potvrzenou sekvencí DNA byl transformován do kompetentních buněk DH10Bac™ *E. coli* a podroben modro-bílé selekci. Z bílých kolonií byl izolován vzniklý expresní bakmid a analyzován pomocí PCR s následnou detekcí na 1% agarózovém gelu (Obrázek 32). Úspěšná integrace cílové DNA do bakmidu pomocí transpozice byla analyzována pomocí bakmid-specifických primerů. Samotný bakulovirus transponovaný pFastBac™/HBM TOPO® měl velikost uvedenou výrobcem 2500 bp, velikost bakulovirusu s vloženou templátovou DNA by tedy měla odpovídat 4153 bp. Zobrazení PCR produktu v oblasti odpovídající přibližně 4 000 bp (Obrázek 32) potvrdil v jamkách 2–4 úspěšnou inkorporaci DNA do bakmidu.



Obrázek 32. Identifikace produktů PCR po transformaci *E. coli* DH10Bac™ buněk.
 1 – DNA velikostní standardy molekulových hmotností O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder,
 2 – 4 – produkty PCR.

11.2.4 Transfekce izolované bakmidové DNA

Pro účel transfekce hmyzích buněk byla rekombinantní bakmidová DNA izolována v dostatečné koncentraci a čistotě. Po transfekci bakmidu do hmyzích buněk byl pozorován průběh virové infekce až do pozdní fáze infekce. Buňky byly centrifugovány a rozděleny na supernatant a peletu, ve kterých byla potvrzena přítomnost rekombinantního proteinu elektroforézou (SDS-PAGE) (Obrázek 33). V jamkách supernatantu byly zjištěny dva pruhy s velikostí mezi 50 a 75 kilodaltony (kDa), což odpovídá předpokládané velikosti rekombinantního proteinu okolo 64 kDa (63 393 Da dle serveru ExPASy, dostupné z https://web.expasy.org/compute_pi/). V jamkách obsahující vzorky buněčných pelet byly detekovány proteiny v celém rozmezí velikostí, jak jsme předpokládali. Negativní kontrola pro supernatant neobsahovala žádný výrazný pruh proteinu a negativní kontrola pro peletu obsahovala proteinové spektrum podobné tomu v jamkách 7-11. Následná detekce Anti-his tag protilátkou potvrdila přítomnost rekombinantního proteinu v supernatantu. V dalším kroku byla prokázána aktivita enzymu v supernatantu pomocí Ellmanovy metody. Po potvrzení rekombinantní produkce *AgAChE1* do média následovalo zjištění titru P1 bakulovirového roztoku plakovou esejí a amplifikace virového titru, jak bylo popsáno výše.



Obrázek 33. Detekce proteinů po bakulovirové infekci Sf9 buněk na polyakrylamidovém gelu.

1 a 14 – velikostní standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad),

2–6 – supernatant buněk Sf9 po infekci v časových intervalech 48, 72, 96, 120 a 144 hodin,

7–11 – peleta buněk Sf9 po infekci v časových intervalech 48, 72, 96, 120 a 144 hodin,

12 – supernatant buněk Sf9 bez infekce,

13 – peleta buněk Sf9 bez infekce.

11.2.5 Kvantifikace bakulovirů metodou real-time PCR

Pro sestrojení kalibrační přímky (Graf 1) byla použita pFastBac™/HBM TOPO® plazmidová DNA o koncentraci 348 ng/μl. Pomocí známé velikosti plazmidu byla DNA naředěna na různé koncentrace, ze které byla vytvořena kalibrační přímka pro stanovení virového titru (PFU/μl).

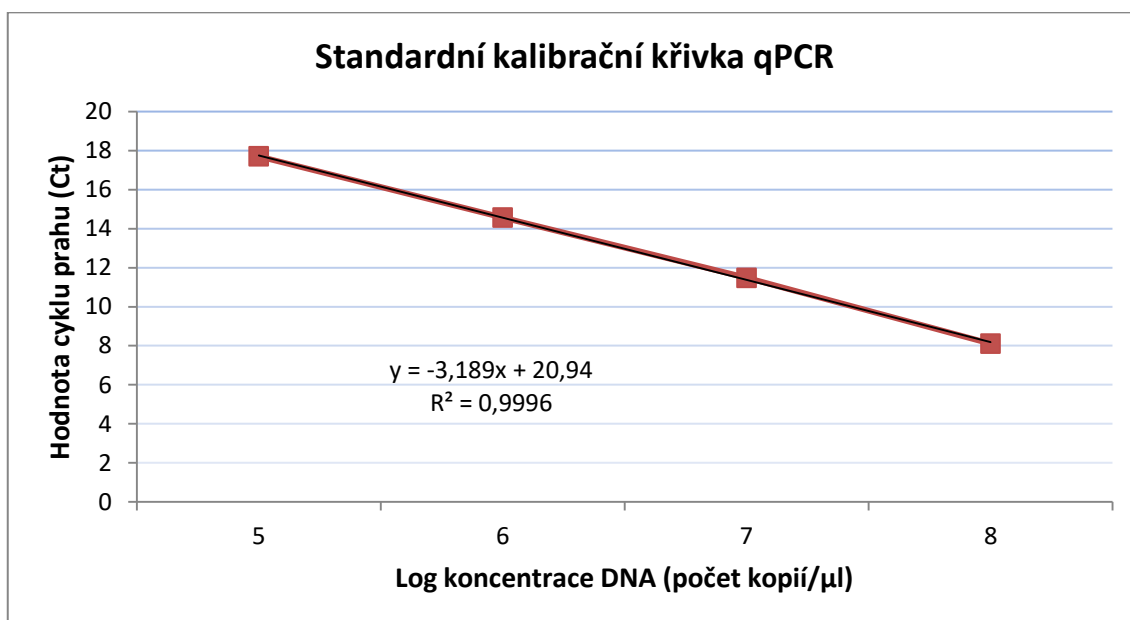
Kalibrace qPCR byla provedena v koncentračním rozmezí 10⁵–10⁸ pfu/ml za použití sady primerů pro gen *ace-1*. Počet vzniklých kopií qPCR byl přepočítán na koncentraci *ace-1* dle vzorce:

$$\text{počet kopií/ml} = \frac{\text{počet} \frac{\text{kopíí}}{\mu\text{l}} \times \text{objem eluce} (\mu\text{l})}{\text{vzorek} (\text{ml})}$$

Naměřené hodnoty kalibrační křivky odpovídaly vstupním koncentracím (Tabulka 18).

Tabulka 18. Kalibrační křivka qPCR pro gen *ace1*.

Vstupní koncentrace <i>ace1</i> (počet kopií/μl)	Hodnota cyklu prahu (C _t)	Zjištěná koncentrace <i>ace1</i> (počet kopií/μl)
1*10 ⁵	17,71	1,00*10 ⁵
1*10 ⁶	14,57	1,04*10 ⁶
1*10 ⁷	11,48	9,33*10 ⁶
1*10 ⁸	8,11	1,03*10 ⁸



Graf 1. Standardní kalibrační křivka qPCR pro gen *ace-1*.

Nastavená qPCR metodika byla použita ke zjištění titru bakulovirového roztoku u tří vzorků (P2, P3-1 a P3-2). Pro kvantifikaci byla bakulovirová DNA izolována z objemu 0,5 ml vzorků P2, P3-1 a P3-2, eluována do 60 μl deionizované vody. Pro průběh qPCR byl použit 1 μl eluátu.

Koncentrace získané za použití sady primerů pro *ace-1* a koncentrace získané za použití sady primerů nasedající v oblasti genu pro GP-64 obalový glykoprotein se pohybovaly ve stejném řádu (Tabulka 19). Výsledky ukazují, že je možné použít sadu primerů pro GP-64 obalový glykoprotein ke kvantifikaci vloženého *ace1* genu v bakuloviru.

Tabulka 19. Kvantifikace bakulovirových roztoků metodou qPCR.

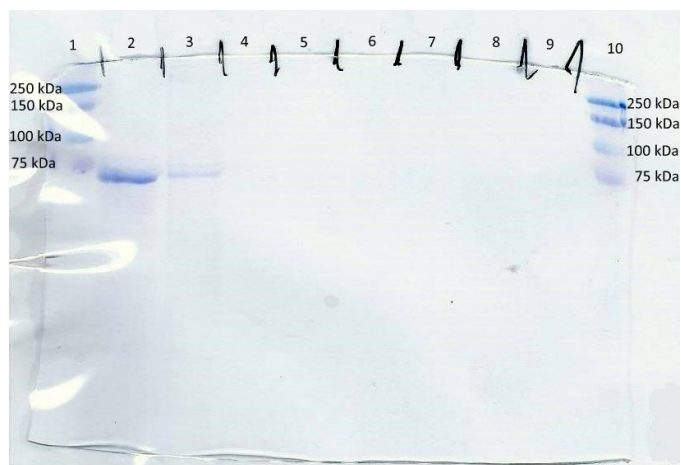
	<i>ace-1</i> : počet kopií/ μ l	GP-64: počet kopií/ μ l
P2 bakulovirový roztok	0,935*10 ⁶	0,975*10 ⁶
P3-1 bakulovirový roztok	4,755 *10 ⁵	0,545 *10 ⁶
P3-2 bakulovirový roztok	0,765 *10 ⁵	0,605 *10 ⁵

11.2.6 Purifikace rekombinantní *AgAChE1*

Optimalizace elučních podmínek

Při zavádění afinitního nosiče byly porovnány purifikační nosiče Ni Sepharosa excel s HisLink nosičem. Pro purifikaci bylo v obou případech použito 1 ml buněčného supernatantu obsahujícího sekretovaný enzym *AgAChE1*. Během purifikace vznikly frakce F (po průchodu buněčného supernatantu afinitním nosičem), frakce W (promytí nosiče promývacím puftrem) a frakce E (eluze proteinu). Pro sledování rekombinantního proteinu v průběhu purifikace byla každá frakce po nanesení na nosič proměřená na zbytkovou aktivitu enzymu Ellmanovou metodou a nanesena na SDS-PAGE gel. Rekombinantní *AgAChE1* byla v dalším kroku detekována pomocí Anti-his tag protilátky.

V SDS-PAGE gelech byly v obou případech (Obrázek 34 a Obrázek 35) shodně lokalizované pruhy obarvených proteinů v jamce číslo 2 a slabě v jamce číslo 3 v oblasti mezi 50 a 75 kDa. V dalších jamkách gelů nebyly patrné žádné pruhy. Měřením zbytkové enzymové aktivity ukázalo negativní výsledky ve frakci F (jamka číslo 2) a ve frakci W s 20mM imidazolem (jamka číslo 3), což ukazuje na to, že se jednalo o detekci nespecifických proteinů obsažených v supernatantu. Tím došlo v prvních dvou krocích purifikace v případě obou afinitních nosičů k odstranění nespecifických proteinů.



Obrázek 34. Optimalizace purifikace AgAChE1 pomocí HisLink nosiče.

1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,

2 – frakce F,

3 – frakce W, 20 mM imidazol,

4 – frakce W, 30 mM imidazol,

5 – frakce W, 40 mM imidazol,

6 – frakce W, 50 mM imidazol,

7 – frakce W, 70 mM imidazol,

8 – frakce W, 90 mM imidazol,

9 – frakce E, 500 mM imidazolem.



Obrázek 35. Optimalizace purifikace AgAChE1 pomocí nosiče Ni Sepharosy excel.

1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,

2 – frakce F,

3 – frakce W, 20 mM imidazol,

4 – frakce W, 30 mM imidazol,

5 – frakce W, 40 mM imidazol,

6 – frakce W, 50 mM imidazol,

7 – frakce W, 70 mM imidazol,

8 – frakce W, 90 mM imidazol,

9 – frakce E, 500 mM imidazolem

Při detekci rekombinantní *AgAChE1* Anti-his tag protilátkou byly patrné rozdíly mezi použitými afinitními nosiči. Různé koncentrace imidazolu v promývacích pufrch neměly vliv na předčasnou eluci proteinu z nosiče HisLink (Obrázek 36). Eluce v tomto případě proběhla až cíleně za použití vysoké koncentrace imidazolu v elučním pufru (jamka číslo 9). Na druhou stranu při použití Ni Sepharosy excel docházelo k uvolňování proteinu z nosiče i za nízkých koncentrací imidazolu (Obrázek 37). Mírná eluce probíhala již při koncentraci 30 mM (jamka číslo 4) a u koncentrací zastoupených v jamkách číslo 5–8 (40 mM, 50 mM, 70 mM a 90 mM imidazol) docházelo prakticky k úplnému vymytí proteinu z afinitního nosiče. Ve frakci E (jamka číslo 9, 500 mM imidazol) již nebyl přítomný protein, což odpovídalo vymytí proteinu z nosiče již v průběhu nízkých koncentrací imidazolu v předchozích krocích. Z tohoto důvodu nebyl afinitní nosič Ni Sepharosa excel vhodný pro použití k další purifikaci.



Obrázek 36. Detekce HisLink purifikované rekombinantní *AgAChE1* pomocí Anti-his tag protilátky.

1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,

2 – frakce F,

3 – frakce W, 20 mM imidazol,

4 – frakce W, 30 mM imidazol,

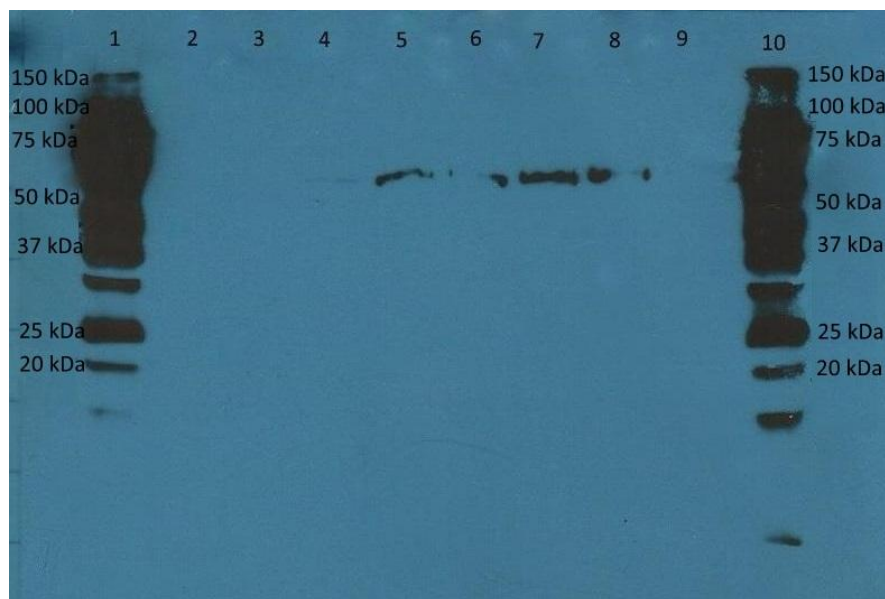
5 – frakce W, 40 mM imidazol,

6 – frakce W, 50 mM imidazol,

7 – frakce W, 70 mM imidazol,

8 – frakce W, 90 mM imidazol,

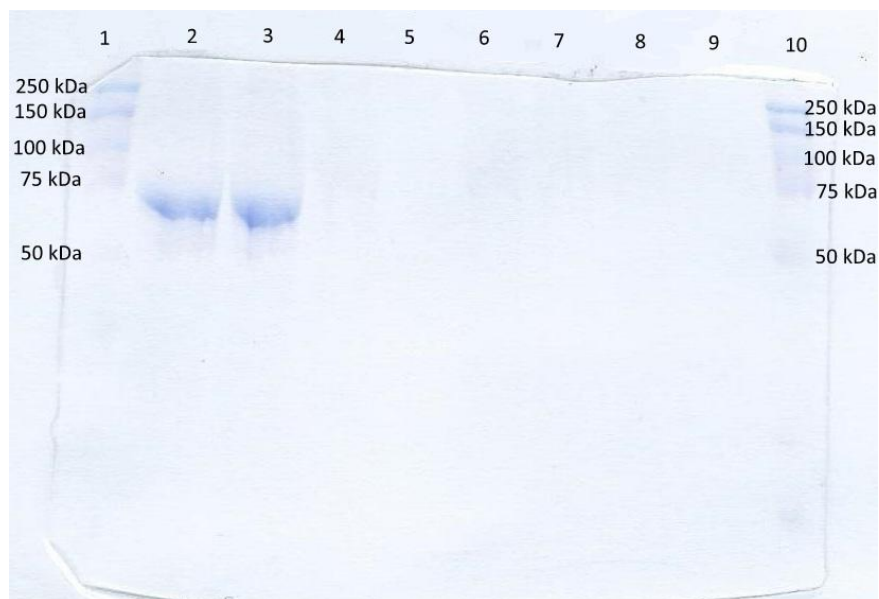
9 – frakce E, 500 mM imidazolem.



Obrázek 37. Detekce Ni Sepharosa excel purifikované rekombinantní *AgAChE1* pomocí Anti-his tag protilátky za použití různých koncentrací imidazolu v promývacích pufrech. 1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, 2 – frakce F, 3 – frakce W, 20 mM imidazol, 4 – frakce W, 30 mM imidazol, 5 – frakce W, 40 mM imidazol, 6 – frakce W, 50 mM imidazol, 7 – frakce W, 70 mM imidazol, 8 – frakce W, 90 mM imidazol, 9 – frakce E, 500 mM imidazolem.

Purifikace AgAChE1 pomocí nosiče HisLink

Pro finální purifikaci byl použit 1 ml buněčného supernatantu obsahujícího sekretovaný enzym *AgAChE1* v kombinaci s nosičem HisLink (Obrázek 38 a Obrázek 39). Pouze v jamkách číslo 2 a 3 na SDS-PAGE gelu se nacházely pruhy obarvených proteinů lokalizovaných v oblasti mezi 75 a 50 kDa (Obrázek 38). To odpovídalo nálezů dříve popsaných nespecifických proteinů ve frakcích F a W u optimalizace podmínek pro nosič HisLink (Obrázek 34). Při detekci rekombinantní *AgAChE1* pomocí Anti-histag protilátky (Obrázek 39) byly detekovány proteiny pouze ve frakci E (jamky číslo 6–8, 500 mM imidazol). Rekombinantní protein je však v eluátech v tak malém množství, že po obarvení methylenovou modří není patrný na gelu a zobrazí se až při citlivější detekci pomocí Anti-his tag protilátky.



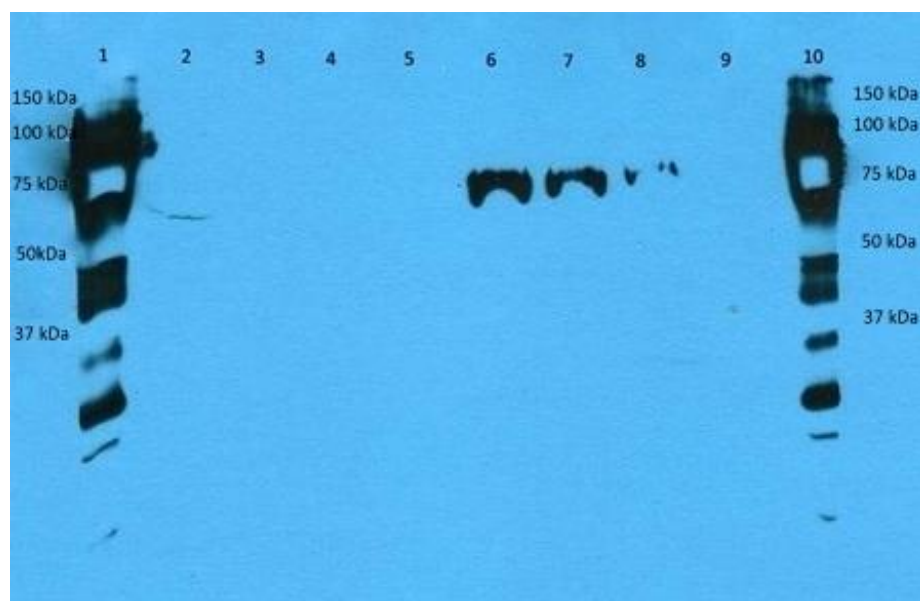
Obrázek 38. Purifikace *AgAChE1* pomocí nosiče HisLink.

1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,

2 – frakce F,

3 – 5 – frakce W, 20 mM imidazol,

6 – 9 frakce E, 500 mM imidazol.



Obrázek 39. Detekce purifikované rekombinantní *AgAChE1* pomocí Anti-his tag protilátky.

1 a 10 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,

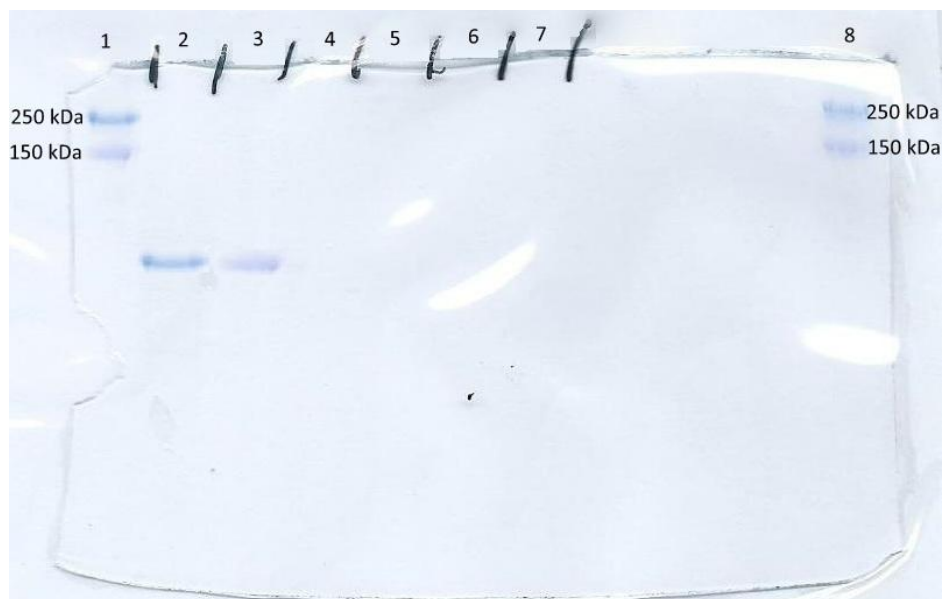
2 – frakce F,

3 – 5 – frakce W, 20 mM imidazol,

6 – 9 frakce E, 500 mM imidazol.

Při purifikaci většího množství buněčného supernatantu (7 ml) afinitním nosičem HisLink byl nález na SDS-PAGE gelu (Obrázek 40) opět shodný s předchozími nálezy (Obrázek 34 a Obrázek 38). Ve frakci F (jamka číslo 2) byl patrný o něco silnější pruh obarvených proteinů než ve frakci W (jamka číslo 3, 20 mM imidazol) (Obrázek 40). V ostatních jamkách (jamky číslo 4–7) pak nebyl detekovaný žádný pruh odpovídající proteinům.

Při detekci rekombinantní *AgAChE1* pomocí Anti-his tag protilátky (Obrázek 41) jsme pozorovali částečné vymytí proteinu již při použití promývacího pufru v druhém a třetím kroku (jamky číslo 4 a 5, 20 mM imidazol). Nejsilnější pruh byl zaznamenán v jamce číslo 6 po použití elučního pufru. Dalším navazujícím krokem po purifikaci byla dialýza, během které došlo k odplavení použitého imidazolu ve frakci E. Tento krok byl důležitý pro eliminaci možných interferencí během stanovení inhibičních schopností sloučenin. V dialyzátu (jamka číslo 7) byl detekován až o polovinu slabší pruh oproti frakci E (jamka číslo 6, 500 mM imidazol). To mohlo být způsobeno i naředěním proteinu v průběhu dialýzy. V tomto případě se nám tedy nepodařilo úspěšně zopakovat purifikaci na afinitním nosiči HisLink s větším objemem buněčného supernatantu. Z toho důvodu a pro časovou tíseň jsme pro další charakterizaci proteinu a testování sloučenin používali rekombinantní protein obsažený v supernatantu.



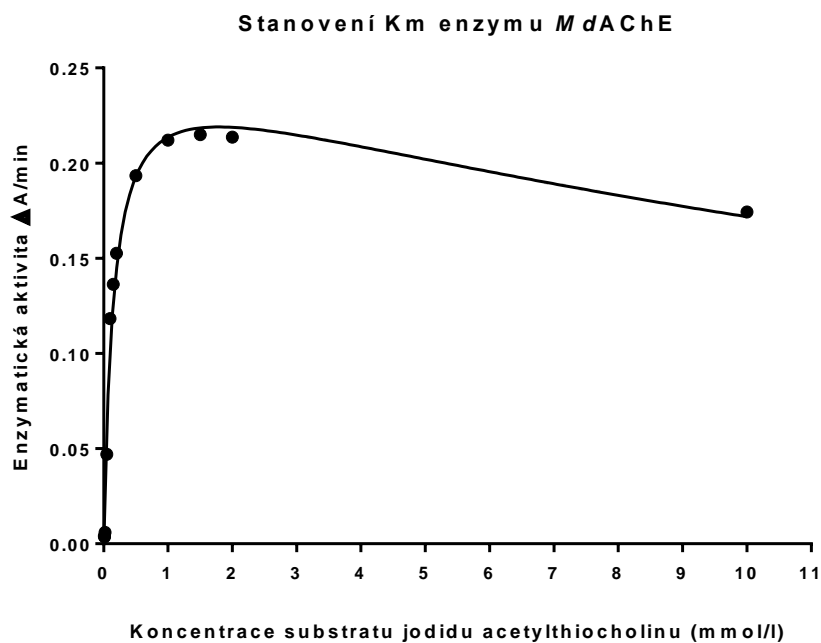
Obrázek 40. Purifikace buněčného supernatantu pomocí nosiče HisLink.
 1 a 8 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,
 2 – frakce F,
 3 – 5 – frakce W, 20 mM imidazol,
 6 – frakce E, 500 mM imidazol,
 7 – dialyzát.



Obrázek 41. Detekce HisLink purifikované rekombinantní AgAChE1 pomocí Anti-his tag protilátky.
 1 a 8 – standardy molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards,
 2 – frakce F,
 3 – 5 – frakce W, 20 mM imidazol,
 6 – frakce E, 500 mM imidazol,
 7 – dialyzát.

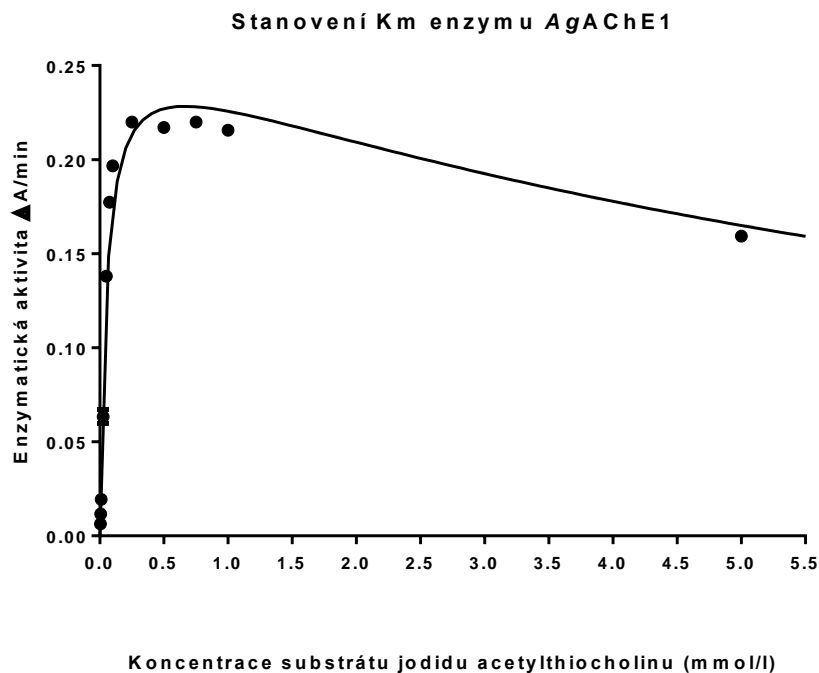
11.3 Charakterizace enzymů pomocí stanovení Michaelisovy konstanty

Kinetické parametry *MdAChE* byly určeny pomocí K_m a V_{max} , které byly získány výpočtem z hodnot uvedených viz. Graf 2. Hodnota $K_m \pm SD$ pro acetylthiocholin jodid byla $152,3 \pm 14,65 \mu\text{M}$ a hodnota $V_{max} \pm SD$ byla $0,256 \pm 0,008 \Delta\text{A}/\text{min}$.



Graf 2. Zobrazení průběhu inhibice muší acetylcholinesterasy nadbytkem acetylthiocholin jodidu.

Kinetické parametry *AgAChE1* K_m a V_{max} byly získány výpočtem z hodnot uvedených viz. Graf 3. Hodnota $K_m \pm SD$ pro acetylthiocholin jodid byla $51,6 \pm 6,0 \mu\text{M}$ a hodnota $V_{max} \pm SD$ byla $0,264 \pm 0,009 \Delta\text{A}/\text{min}$.



Graf 3. Zobrazení průběhu inhibice komáří acetylcholinesterasy nadbytkem jodidu acetylthiocholinu.

11.4 Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE

Testované sloučeniny pocházely z interní databáze. Tato databáze sloučenin vznikla z inhibitorů a reaktivátorů lidské AChE s možným využitím pro terapii Alzheimerovy choroby nebo při intoxikaci organofosfáty. Z toho důvodu byly jako standardy použity reverzibilní inhibitory AChE ze skupiny léčiv Alzheimerovy choroby – THA a 7-methoxytakrin (7-MEOTA) (Soukup et al., 2013), které byly v některých případech prekurzory testovaných molekul (Obrázek 23). THA inhiboval hmyzí enzymy v sub-mikromolárním rozmezí a u 7-MEOTA se hodnoty IC_{50} pro hmyzí enzymy pohybovaly v mikromolárním rozmezí (Tabulka 20). V obou případech byly u obou hmyzích enzymů hodnoty IC_{50} srovnatelné s hodnotami IC_{50} lidské AChE, a tudíž byly hodnoty SI srovnatelné. V této práci byly jako standardy běžně používaných insekticidů vybrány bendiokarb a karbofuran (Obrázek 23). Bendiokarb inhiboval hAChE, *MdAChE* a *AgAChE1* v nanomolárním rozmezí. U karbofuranu byla v případě inhibice hAChE hodnota IC_{50} o řád vyšší oproti hodnotám IC_{50} *MdAChE* a *AgAChE1*. Selektivita vůči hmyzím enzymům byla v případě inhibice bendiokarbem srovnatelná, kdy hodnota SI odpovídala

u *MdAChE* 3,1 a u *AgAChE* 2,82. Na druhou stranu, v případě karbofuranu došlo k rozdílu v selektivitě mezi hmyzími enzymy. Selektivita k *AgAChE* byla nízká (SI 6,67), kdežto v případě *MdAChE* byla mírná selektivita pro hmyzí enzym pozorována (SI 20).

Tabulka 20. Naměřené hodnoty IC_{50} standardů.

Sloučenina	IC_{50} hAChE ± SEM (μM)	IC_{50} <i>MdAChE</i> ± SEM (μM)	<i>MdAChE</i> SI	IC_{50} <i>AgAChE</i> ± SEM (μM)	<i>AgAChE</i> SI
takrin	0,320 ± 0,013 ^a	0,510 ± 0,029	0,63	0,506 ± 0,042	0,63
7-MEOTA	10,0 ± 1,0 ^a	10,90 ± 1,160	0,92	6,550 ± 0,455	1,53
bendiokarb	0,031 ± 0,001	0,010 ± 0,001	3,10	0,011 ± 0,001	2,82
karbofuran	0,020 ± 0,001	0,001 ± 0,001	20	0,003 ± 0,001	6,67

^aData byla získána z publikace Hepnarova et al. (2018).

Na základě strukturních podobností byly inhibitory testované na *MdAChE* rozděleny do šesti skupin. Do první skupiny sloučenin (**K013-K016**, **K019**, **K023**, **K025**, **K037**, **K058**, **K080**, **K143**, **K146** a **K152**) byly zařazeny soli derivátů s jedním aromatickým jádrem (Obrázek 24). **K013-K015** jsou *N*-methyl heterocyklickými deriváty se dvěma dusíky. Sloučeniny **K014** a **K015** mají dusíky v *meta* a *para* pozici a nevykazovaly inhibiční schopnost *MdAChE* (Tabulka 21). Na druhou stranu, sloučenina **K013** s dusíky v *ortho* poloze inhibovala *MdAChE* v mikromolárním rozmezí s hodnotou IC_{50} 762 μM. Další navýšení počtu heteroatomů dusíku (**K019**) vedlo ke ztrátě inhibiční schopnosti sloučeniny. Ve skupině sloučenin s pyridiniovým skeletem (**K016**, **K025**, **K080**, **K143**, **K146** a **K152**), molekuly **K025** a **K080** nesoucí amidovou funkční skupinu v *para* pozici v testovaném koncentračním rozmezí neprokázaly inhibici enzymu *MdAChE*. **K146** s terciárním aminem v *para* poloze inhibovala *MdAChE* v sub-milimolární koncentraci. Záměna funkční skupiny za tert-butyl (**K016**) nebo nitrilovou skupinu (**K143**) vedla ke zvýšení inhibičního účinku, kdy hodnota IC_{50} pro *MdAChE* byla 82 μM, resp. 76,3 μM. Přesunutí nitrilové funkční skupiny do *meta* polohy (**K152**) vedlo ke snížení inhibičního účinku *MdAChE* přibližně o jeden řád. Z derivátů amoniových solí s aromatickým jádrem (**K023**, **K037** a **K058**) pouze **K058** inhibovala *MdAChE*, a to v sub-milimolárním rozmezí. Nejlepším inhibitorem v této skupině sloučenin byla **K143** inhibující 50 % enzymové aktivity *MdAChE* v desítkách mikromolů.

V souvislosti se selektivitou v první skupině sloučenin byla nejlepším inhibitorem molekula **K143** s hodnotou SI 9,33 (Tabulka 21). Záměna funkční skupiny za tert-butyl (**K016**) vedla ke snížení selektivity téměř o polovinu. Pokles selektivity o jeden řád byl patrný u záměny nitrilové skupiny za terciární amin v *para* poloze (**K146**) nebo u přesunutí nitrilové funkční skupiny do *meta* polohy (**K152**). O jeden řád nižší selektivita oproti **K143** byla také zjištěna u molekuly **K058** (SI 0,100) a nejnižší hodnota SI (0,005) byla pozorována u sloučeniny **K013** s dusíky v *ortho* poloze. U ostatních sloučenin z první skupiny (**K014** a **K015**, **K019**, **K023**, **K025**, **K037** a **K080**) nebylo možné hodnotu SI vypočítat, z důvodu nedostatečné inhibice jednoho nebo obou enzymů.

Tabulka 21. Naměřené hodnoty IC₅₀ sloučenin s jedním aromatickým jádrem v molekule.

Sloučenina	IC ₅₀ hAChE ± SEM (μM)	IC ₅₀ MdAChE ± SEM (μM)	MdAChE SI
K013	3,98 ± 0,670	762 ± 229	0,005
K014	>1000	>1000	-
K015	>1000	>1000	-
K016	347 ± 28,8	82,0 ± 4,78	4,23
K019	>1000	>1000	-
K023	761 ± 48,7	>1000	-
K025	>1000	>1000	-
K037	>1000	>1000	-
K058	10,2 ± 0,594	102 ± 5,24	0,100
K080	>1000	>1000	-
K143	711 ± 78,7	76,3 ± 5,31	9,33
K146	104 ± 9,20	591 ± 43,9	0,176
K152	133 ± 11,2	583 ± 46,3	0,227

Do druhé skupiny sloučenin byly zařazeny deriváty pyridiniových sloučenin se dvěma aromatickými jádry spojenými alifatickými nebo aromatickými linkery (Obrázek 25). Sloučeniny **K017**, **K021-K036** mají aromatická jádra spojena přímou vazbou bez použití linkeru, můžeme je označit jako aromatické deriváty *N*-methylpyridinia. U molekuly **K017** byl v *para* poloze navázaný fenyl a tato sloučenina neprokázala inhibiční účinek (Tabulka 22). Záměna fenylu za benzylovou funkční skupinu (**K020**) vedla k nárůstu inhibiční schopnosti sloučeniny u MdAChE s hodnotou IC₅₀ 73,7 μM. Záměna fenylu za pyridin (**K021**)

vedla k inhibici *MdAChE* v sub-milimolárním rozmezí. Umístění 2-pyridylu do *ortho* polohy (**K035**) vedlo znovu ke ztrátě inhibiční schopnosti pro *MdAChE*. Ke ztrátě inhibiční schopnosti u *MdAChE* došlo i v případě *N,N*-dimethyl-bis-pyridiniového derivátu (**K036**). Mezi bis-pyridiniovými sloučeninami spojenými aromatickým linkerem (**K055-K057**) *MdAChE* inhiboval také pouze jeden derivát a to **K055** s *ortho*-xylenovým linkerem (Tabulka 22). Ve skupině bis-pyridiniových sloučenin spojených různě dlouhým alifatickým řetězcem (**K210-K215**) inhibovala *MdAChE* pouze sloučenina **K215** s hodnotou IC_{50} v milimolární oblasti. V souvislosti s nejnižšími hodnotami IC_{50} byla v druhé skupině sloučenin nejslibnějším inhibitorem **K020** inhibující *MdAChE* v mikromolárním řádu.

Ve druhé skupině sloučenin inhibovaly *MdAChE* pouze čtyři molekuly. Nejvyšší selektivita pro hmyzí enzym s hodnotou SI 14,8 byla zjištěna u sloučeniny **K020**, která byla zároveň i nejlepším inhibitorem dané skupiny (Tabulka 22). Záměna benzylové funkční skupiny za 4-pyridyl (**K021**) vedla k sedminásobnému poklesu selektivity (hodnota SI 2,02). Prodloužení linkeru mezi dvěma pyridinii pomocí alifatického (**K215**) nebo aromatického linkeru (**K055**) vedlo k vyšší selektivitě pro *hAChE*.

Tabulka 22. Naměřené hodnoty IC_{50} sloučenin se dvěma aromatickými jádry spojené alifatickými a aromatickými linkery.

Sloučenina	IC_{50} <i>hAChE</i> ± SEM (μM)	IC_{50} <i>MdAChE</i> ± SEM (μM)	<i>MdAChE</i> SI
K017	>1000	>1000	-
K020	1092 ± 383	73,7 ± 8,29	14,8
K021	993 ± 36,0	491 ± 30,3	2,02
K035	1023 ± 79,7	>1000	-
K036	841 ± 39,2	>1000	-
K055	62,6 ± 5,42	718 ± 124	0,087
K056	520 ± 68,0	>1000	-
K057	484 ± 51,2	>1000	-
K210	>1000	>1000	-
K212	>1000	>1000	-
K215	146 ± 7,55	1534 ± 127	0,095

Ve třetí skupině sloučenin jsou zařazeny deriváty chinolinia a akridinia (Obrázek 26). **K007** je jodid *N*-methylchinolinia, který inhiboval *MdAChE*

v mikromolárním rozmezí (Tabulka 23). Navýšení v počtu aromatických jader z *N*-methylcholinia na *N*-methylakridinium (**K009**) vedlo ke zlepšení inhibiční vlastnosti. Hodnota IC₅₀ **K009** pro *MdAChE* byla naměřena v sub-mikromolárním rozmezí. Prodloužení alifatického řetězce u derivátu akridinu (**K060**) pak vedlo ke snížení inhibiční schopnosti u *MdAChE* o dva řády. Navázání 2-pyridiniumkarbaldoximu pomocí but-(2*E*)-en-1,4-diylového linkeru k chinoliniu (**K066**) a akridiniu (**K067**) ovlivnilo inhibiční schopnost k *MdAChE* různým způsobem. U **K066** došlo ke ztrátě inhibice *MdAChE* v porovnání s jejím prekursorem **K007**. Na druhou stranu sloučenina **K067** inhibovala *MdAChE* v mikromolárním rozmezí a oproti jejímu prekursoru **K009** byla o řád slabším inhibitorem. **K009** tak byla v této skupině sloučenin nejúčinnějším inhibitorem.

Ve třetí skupině inhibovaly *MdAChE* čtyři sloučeniny, kdy hodnota SI byla vypočítána u třech z nich. **K060** neinhibovala *hAChE*, a tak u ní nemohla být hodnota SI stanovena (Tabulka 23). Nejselektivnějším inhibitorem ve třetí skupině byla sloučenina **K009** s hodnotou SI 32,2. Rozdíl v počtu aromatických jader mezi chinolínem (**K007**) a akridínem (**K009**) vedl v případě selektivity k poklesu o jeden řád. Nejméně selektivní sloučeninou pro *MdAChE* v této skupině byla molekula **K067**.

Tabulka 23. Naměřené hodnoty IC₅₀ chinoliniových a akridiniových derivátů.

Sloučenina	IC ₅₀ <i>hAChE</i> ± SEM (μM)	IC ₅₀ <i>MdAChE</i> ± SEM (μM)	<i>MdAChE</i> SI
K007	246 ± 38,9	90,8 ± 6,34	2,71
K009	3,51 ± 0,464	0,109 ± 0,008	32,3
K060	>1000	17,9 ± 3,24	-
K066	>1000	>1000	-
K067	3,98 ± 0,454	6,61 ± 0,280	0,602

Čtvrtá skupina sloučenin se skládá ze symetrických bis-pyridiniových sloučenin (**K364-K366**, **K420-K435**), které se liší ve spojovacím řetězci (Obrázek 27). Sloučenina **K366** je nesubstituovaná bis-pyridiniová molekula a jako jediná v této skupině má aromatický linker. Hodnota IC₅₀ se u **K366** pro *MdAChE* i pro *hAChE* pohybovala v mikromolárním rozmezí hodnot (Tabulka 24). Sloučeniny **K364** a **K365** jsou (*E*) a (*Z*) nesubstituované izomery bis-pyridiniových solí

spojené but-(2*E*)-en-1,4-diylovým linkerem. Tyto dvě molekuly neprokázaly inhibiční účinek v rámci testovaného koncentračního rozmezí. Oproti tomu *para*-substituované molekuly nesoucí but-(2*E*)-en-1,4-diylový linker (**K420-K435**) vykazovaly širokou variabilitu inhibice v závislosti na použitém substituentu. Mezi lipofilními substituenty měly sloučeniny s alifatickými funkčními skupinami (**K420-K422**) nízkou schopnost inhibice ve srovnání s molekulami nesoucími aromatické jádro. V rámci sloučenin s aromatickou funkční skupinou (**K423-K426**) byla nejlepším inhibitorem *MdAChE* **K423** s fenylem v *para* poloze, která měla hodnotou IC_{50} v nanomolárním řádu. Hodnoty IC_{50} molekul s benzylovou skupinou (**K424**) nebo s 3-fenylpropylovou skupinou (**K425**) byly v porovnání s **K423** vyšší, kdy obě sloučeniny nevykazovaly inhibici *MdAChE* v daném koncentračním rozmezí. Výsledky ukazují, že pouze **K423** nesoucí fenylovou skupinu připojenou přímo k pyridiniové části, dokázala inhibovat *MdAChE*. Naopak prodloužení řetězce mezi těmito dvěma částmi (**K424** a **K425**) vedlo ke ztrátě inhibičního účinku. Na druhou stranu 4-nitrobenzylová sloučenina (**K426**) vykazovala inhibici *MdAChE* v mikromolárním rozmezí, avšak selektivita vůči *MdAChE* byla velmi nízká. Sloučeniny obsahující hydrofilní funkční skupiny (**K427-K435**) se také lišily ve schopnosti inhibice *MdAChE*. V této skupině 3-hydroxypropyl (**K429**), *N,N*-dimethylamino (**K430**) a 4-karbonitrilové sloučeniny (**K435**) byly lepší inhibitory než jiné hydroxylové (**K427**, **K428**) nebo karbonylové sloučeniny (**K431-K434**). **K429**, **K430** a **K435** měly hodnoty IC_{50} v mikromolárním rozmezí, avšak ve srovnání s hodnou IC_{50} jejich fenylového analogu **K423** byla jejich inhibiční schopnost o dva řády nižší. V souvislosti s nejnižšími hodnotami IC_{50} byla v této skupině sloučenin nejslibnějším inhibitorem **K423** inhibující *MdAChE* v sub-mikromolárním řádu.

V rámci čtvrté skupiny sloučenin bylo možno určit hodnotu SI u šesti inhibitorů **K366**, **K423**, **K426**, **K429**, **K430** a **K435** (Tabulka 24). V pěti případech byla selektivita vůči *MdAChE* zanedbatelná nebo ve prospěch *hAChE* (**K366**, **K426**, **K429**, **K430** a **K435**). Pouze sloučenina **K423** s hodnotou SI 7,06 prokázala selektivitu k hmyzímu enzymu a zároveň se jednalo i o nejúčinnější inhibitor čtvrté skupiny.

Tabulka 24. Naměřené hodnoty IC_{50} bis-pyridiniových sloučenin (nesubstituovaných a *para*-substituovaných).

Sloučenina	IC_{50} hAChE \pm SEM (μ M)	IC_{50} MdAChE \pm SEM (μ M)	MdAChE SI
K364	>1000	>1000	-
K365	>1000	>1000	-
K366	8,01 \pm 1,30	14,1 \pm 1,5	0,568
K420	>1000	>1000	-
K421	>1000	>1000	-
K422	>1000	>1000	-
K423	4,93 \pm 3,61	0,699 \pm 0,089	7,06
K424	4,09 \pm 1,01	>1000	-
K425	0,0554 \pm 0,0029	>1000	-
K426	5,19 \pm 0,56	20,7 \pm 2,8	0,251
K427	>1000	>1000	-
K428	>1000	>1000	-
K429	31,5 \pm 2,0	107 \pm 15	0,294
K430	1,05 \pm 0,06	4,14 \pm 0,23	0,253
K431	>1000	>1000	-
K432	>1000	>1000	-
K433	>1000	>1000	-
K434	>1000	>1000	-
K435	37,3 \pm 3,3	103 \pm 11	0,362

Pátou skupinou sloučenin jsou bis-isochinoliniové deriváty s různými spojovacími řetězci (Obrázek 28). Sloučeniny v této skupině (**K291-K299**, **K302** a **K412-K419**) byly účinnými inhibitory a pouze tři z nich (**K291**, **K293** a **K413**) neinhibovaly lidskou a/nebo *MdAChE* v daném koncentračním rozmezí (Tabulka 25). Mezi sloučeninami s alifatickým spojovacím řetězcem (**K291-K299**, **K302** a **K412-K415**) sloučeniny obsahující devět (**K299**) a dvanáct methylenových skupin (**K302**) vykazovaly hodnoty IC_{50} u *MdAChE* v nanomolárním řádu. **K296** s šesti metylenovými skupinami inhibovala *MdAChE* v mikromolárních koncentracích a další zkrácení spojovacího uhlíkatého řetězce vedlo postupně ke ztrátě inhibiční schopnosti. Přítomnost kyslíkového heteroatomu v molekule (**K412** a **K413**) nebo dvojná vazba (**K414** a **K415**) nevedla k vyšší afinitě k enzymu. V tomto případě byly hodnoty IC_{50} v mikromolárním rozmezí s nízkou selektivitou vůči *MdAChE*. Délka spojovacího řetězce u těchto sloučenin byla čtyři methylenové jednotky, což je v souladu s výsledky **K296**. Ve skupině bis-

isochinoliniových sloučenin spojených aromatickým linkerem (**K416-K419**) byla naftylem spojená molekula (**K419**) účinnějším inhibitorem než xylenem spojené sloučeniny (**K416-K418**) inhibující *MdAChE* v nanomolárním řádu. V souvislosti s nejnižšími hodnotami IC_{50} byly v této skupině sloučenin nejslibnějšími inhibitory **K299**, **K302** a **K419** inhibující *MdAChE* v nanomolárním řádu.

Z dvanácti sloučenin páté skupiny (**K296**, **K299**, **K302**, **K412** a **K414-K419**) byla selektivita určena u deseti z nich (Tabulka 25). Sloučenina **K413** neinhibovala hAChE v daném koncentračním rozmezí, z toho důvodu nebyl index selektivity stanoven. Mezi sloučeniny selektivní pro *MdAChE* patřily **K299**, **K302** a **K416-K417**, kdy nejselektivnější z nich byla **K416** s *o*-xylenem ve spojovacím řetězci. Napojením xyleny ve spojovacím řetězci v poloze *meta* (**K417**) došlo k přibližně trojnásobnému snížení selektivity. Záměna xyleny (**K416**) za alifatický řetězec (**K299**) vedla k poklesu selektivity o polovinu. Navýšením délky alifatického spojovacího řetězce na dvanáct methylenových zbytků (**K302**) došlo k trojnásobnému snížení selektivity k *MdAChE*.

Tabulka 25. Naměřené hodnoty IC_{50} bis-isochinoliniových sloučenin.

Sloučenina	IC_{50} hAChE ± SEM (μM)	IC_{50} <i>MdAChE</i> ± SEM (μM)	<i>MdAChE</i> SI
K291	>1000	>1000	-
K293	>1000	>1000	-
K296	0,881 ± 0,322	2,77 ± 0,08	0,318
K299	0,138 ± 0,008	0,0226 ± 0,0006	6,10
K302	0,0697 ± 0,0032	0,036 ± 0,001	1,99
K412	5,10 ± 0,39	7,40 ± 0,39	0,690
K413	>1000	693 ± 59	-
K414	15,8 ± 1,12	17,6 ± 2,1	0,897
K415	38,7 ± 4,4	112 ± 11	0,346
K416	267 ± 11	21,9 ± 4,7	12,2
K417	8,59 ± 0,86	1,79 ± 0,12	4,79
K418	5,87 ± 0,49	5,56 ± 0,49	1,06
K419	0,214 ± 0,011	0,228 ± 0,009	0,936

Šestá skupina testovaných sloučenin je tvořena 7-methoxytakrin-takrinovými (7-MEOTA-THA) heterodimery (**K1323-K1336**). Tyto sloučeniny jsou spojeny močovinou (**K1330-K1336**) nebo thiomčovinou (**K1323-K1329**),

kteřá navazuje na methylenový linker různé dĚlky (Obrázek 29). Nejslabšími inhibitory *MdAChE* ze skupiny sloučenin nesoucích thiomocovinu byly **K1323**, **K1325** a **K1327** s jedním, třemi a pĚti methylenovými skupinami ve spojovacím řetĚzci, kteřé inhibovaly *MdAChE* v sub-mikromolárním řádu (Tabulka 26). Ostatní deriváty obsahující thiomocovinu inhibovaly *MdAChE* v nanomolárním řádu. Nejlepším inhibitorem byla sloučenina **K1324** s hodnotou IC_{50} 13,6 nM, kteřá obsahovala tři methylenové skupiny v linkeru. U sloučenin s mocovinou ve spojovacím řetĚzci inhibovala *MdAChE* v sub-mikromolárním koncentračním řádu pouze jedna sloučenina (**K1330**). Další mocovinové deriváty inhibovaly muší enzym v nanomolárním rozmezí, kdy nejlepším inhibitorem *MdAChE* byla **K1334** s pĚti methylenovými skupinami v linkeru s hodnotou IC_{50} 11,6 nM. Vzhledem k tomu, že tyto 7-MEOTA-THA heterodimery inhibovaly *MdAChE* v sub-mikromolárním až nanomolárním koncentračním rozmezí, přistoupili jsme k dalšímu testování sloučenin na rekombinantní *AgAChE1*.

V rámci selektivity 7-MEOTA-THA heterodimerů k *MdAChE* byl index selektivity vypočítán u všech čtrnácti inhibitorů. Nejselektivnějším inhibitorem byl thiomocovinový derivát **K1324** se dvěma methylenovými zbytky ve spojovacím řetĚzci s hodnotou SI 26,1 (Tabulka 26). Zkrácení spojovacího řetĚzce na jeden methylenový zbytek (**K1323**) vedlo ke snížení selektivity na hodnotu SI 17,6. Oproti tomu byla třetím nejselektivnějším inhibitorem sloučenina s nejdelším linkerem v molekule (**K1329**). Mezi mocovinovými deriváty byla nejselektivnější molekula s šesti methylenovými linkery (**K1335**) s hodnotou SI 7,02. Dalšími dva mocovinové 7-MEOTA-THA heterodimery (**K1330** a **K1331**) měly hodnotu SI téměř shodnou a ve srovnání s jejich thiomocovinovými deriváty (**K1323** a **K1324**) u nich došlo až k pĚtinásobnému poklesu selektivity.

Tabulka 26. Naměřené hodnoty IC_{50} 7-methoxytakrin-takrinových heterodimerů u *MdAChE*.

Sloučenina	n	IC_{50} hAChE ± SEM (nM)	IC_{50} hBuChE ± SEM (nM)	IC_{50} <i>MdAChE</i> ± SEM (nM)	<i>MdAChE</i> SI
K 1323	1	14 830 ± 1237	1 827 ± 64,5	842 ± 38,3	17,6
K 1324	2	355 ± 16,2	2 145 ± 117	13,6 ± 0,365	26,1
K 1325	3	276 ± 10,7	88,1 ± 1,33	227 ± 12,6	1,22
K 1326	4	186 ± 10,5	17 560 ± 795	48,7 ± 1,33	3,82

K 1327	5	560 ± 36,7	1 277 ± 65,7	487 ± 22,2	1,15
K 1328	6	292 ± 22,1	213 ± 4,39	31,4 ± 1,43	9,30
K 1329	7	758 ± 38,1	1 321 ± 24,0	74,9 ± 4,40	10,1
K 1330	1	4 992 ± 289	1 453 ± 36,9	870 ± 45,4	5,74
K 1331	2	299 ± 13,8	900 ± 42,7	53,1 ± 1,93	5,64
K 1332	3	54,5 ± 1,60	879 ± 43,3	30,8 ± 0,673	1,77
K 1333	4	72,7 ± 2,20	579 ± 14,1	27,7 ± 0,772	2,62
K 1334	5	37,5 ± 0,918	1 089 ± 26,3	11,6 ± 0,392	3,23
K 1335	6	129 ± 9,11	83,7 ± 2,11	18,3 ± 0,462	7,02
K 1336	7	112 ± 7,22	544 ± 11,8	26,6 ± 1,19	4,19

Účinek 7-MEOTA-THA derivátů s thiomocovinou se u *AgAChE1* v některých případech lišil od účinků pozorovaných na *MdAChE*. **K1323** byl nejslabším inhibítorem i v tomto případě a oproti inhibici *MdAChE* vykazoval vyšší hodnotu IC_{50} ; konkrétně 4,4 μ M (Tabulka 27). Na druhou stranu sloučeniny **K1325** a **K1327**, které inhibovaly *MdAChE* v sub-mikromolárním rozmezí, vykazaly u *AgAChE1* o řád silnější inhibiční účinek s hodnotou IC_{50} v nanomolárním rozmezí. Nejslibnějším inhibítorem v rámci 7-MEOTA-THA thiomocovinových derivátů byla molekula **K1328** s hodnotou IC_{50} 6,61 nM, která měla ve spojovacím řetězci sedm methylenových skupin.

V rámci sloučenin 7-MEOTA-THA s močovinou patřily deriváty **K1330** a **K1335** k molekulám s hodnotou IC_{50} inhibujících *AgAChE1* v mikromolárním rozmezí. V porovnání s účinkem sloučenin na *MdAChE*, došlo k nárůstu hodnot IC_{50} u *AgAChE1* o řád (**K1330**) až o dva řády (**K1335**). Navíc záměna heteroatomu síry (**K1328**) za kyslík (**K1335**) vedla u *AgAChE1* k nárůstu hodnoty IC_{50} o tři řády a ke ztrátě selektivity. Sloučeniny **K1331**, **K1333** a **K1336** inhibovaly *AgAChE1* v sub-mikromolárním rozmezí hodnot IC_{50} a i v tomto případě došlo oproti hodnotám IC_{50} *MdAChE* k nárůstu u všech sloučenin o jeden řád. V neposlední řadě molekuly **K1332** a **K1334** inhibovaly *AgAChE1* v nanomolárním koncentračním rozmezí, kdy účinnějším inhibítorem byla sloučenina **K1334** obsahující linker s pěti methylenovými skupinami. Na základě výsledků jsme u jednotlivých močovinných derivátů pozorovali silnější inhibiční účinek k *MdAChE* než k *AgAChE1*.

Index selektivity 7-MEOTA-THA heterodimerů k *AgAChE1* byl vypočítán u všech čtrnácti inhibitorů, stejně jako v případě *MdAChE*. Nejselektivnějším inhibitorem mezi 7-MEOTA-THA deriváty k *AgAChE1* byla sloučenina (**K1328**) se šesti methylenovými skupinami a thiomocovinou ve spojovacím řetězci (SI 44,2). Na druhou stranu molekula **K1335** měla vůbec nejnižší SI hodnotu (0,0612) zjištěnou v této sérii, což je v porovnání s jejím thiomocovinovým derivátem (**K1328**) 722krát nižší hodnota SI.

Druhým významným inhibitorem *AgAChE1* v souvislosti s hodnotou SI (SI 35,4) byla sloučenina **K1329** obsahující osm methylenových skupin v linkeru, avšak v porovnání s **K1328** je zároveň o jeden řád horším inhibitorem *AgAChE1*. Třetím nejselektivnějším 7-MEOTA-THA heterodimerem byl inhibitor **K1327** s hodnotou SI 18,7, který měl o jeden methylenový zbytek kratší linker než **K1328**. V porovnání močovinných a thiomocovinových derivátů 7-MEOTA-THA heterodimerů můžeme pozorovat vyšší selektivitu k *AgAChE1* thiomocovinových derivátu oproti jejich kyslíkovým isomerům. Z výsledků vychází jako optimální délka spojovacího řetězce u thiomocovinových molekul sedm až osm methylenových zbytků pro inhibici *AgAChE1*. Na druhou stranu u *MdAChE* byla nejvyšší selektivita pozorována u thiomocovinových derivátů se dvěma až třemi methylenovými zbytky v linkeru. Na základě výsledků nebyl pozorován trend závislosti selektivity na nárůstu nebo zkracování délky spojovacího řetězce.

Protože 7-MEOTA-THA heterodimery prokázaly dobrou inhibiční schopnost hmyzích enzymů spojenou zároveň i s jejich dobrou selektivitou, přistoupili jsme k testování těchto sloučenin i na další cholinesterase přítomné u člověka. *hBuChE* je schopna rozdělit širokou škálu cholinových (např. sukcinylcholinových) a necholinových (např. kokainových) esterů, nejen acetylcholin. *hAChE* a *hBuChE* vykazují vysokou úroveň homologie (Romano, Jr. et al., 2007), a proto se *hBuChE* stává významným vedlejším cílem (off-targetem) běžně používaných pesticidů.

Z močovinných derivátů 7-MEOTA-THA heterodimerů (**K1330-K1336**) byly všechny sloučeniny slabšími inhibitory *hBChE* oproti *MdAChE* (Tabulka 26). V případě molekul s thiomocovinou ve spojovacím řetězci (**K1323-K1329**) byla pouze jedna sloučenina (**K1325**) silnějším inhibitorem *hBChE* ve srovnání s *MdAChE*. Z tohoto důvodu jsou 7-MEOTA-THA heterodimery vyjma **K1325** zajímavé selektivní inhibitory *MdAChE*. V porovnání s inhibicí *AgAChE1* byly

thiomocovinové deriváty (**K1323-K1329**) slabšími inhibitory hBChE (Tabulka 27). U močovinyových derivátů 7-MEOTA-THA heterodimerů (**K1330-K1336**) pouze **K1335** silněji inhibovala hBChE než *AgAChE1*.

Tabulka 27. Naměřené hodnoty IC_{50} 7-methoxytakrin-takrinových heterodimerů u *AgAChE1*.

Sloučenina	n	IC_{50} hAChE ± SEM (nM)	IC_{50} hBuChE ± SEM (nM)	IC_{50} <i>AgAChE1</i> ± SEM (nM)	<i>AgAChE1</i> SI
K 1323	1	14 830 ± 1237	1 827 ± 64,5	4 430 ± 233	3,35
K 1324	2	355 ± 16,2	2 145 ± 117	74,0 ± 3,30	4,80
K 1325	3	276 ± 10,7	88.1 ± 1,33	33,0 ± 2,00	8,35
K 1326	4	186 ± 10,5	17 560 ± 795	16,7 ± 0,664	11,2
K 1327	5	560 ± 36,7	1 277 ± 65,7	30,0 ± 1,14	18,7
K 1328	6	292 ± 22,1	213 ± 4,39	6,61 ± 0,160	44,2
K 1329	7	758 ± 38,1	1 321 ± 24,0	21,4 ± 0,645	35,4
K 1330	1	4 992 ± 289	1 453 ± 36,9	3 045 ± 95,6	1,64
K 1331	2	299 ± 13,8	900 ± 42,7	105 ± 5,75	2,85
K 1332	3	54,5 ± 1,60	879 ± 43,3	62,9 ± 2,42	0,867
K 1333	4	72,7 ± 2,20	579 ± 14,1	126 ± 5,55	0,578
K 1334	5	37,5 ± 0,918	1 089 ± 26,3	24,2 ± 1,71	1,55
K 1335	6	129 ± 9,11	83,7 ± 2,11	2 101 ± 105	0,0612
K 1336	7	112 ± 7,22	544 ± 11,8	190 ± 9,01	0,586

12 Diskuze

Vektorem přenášená onemocnění představují asi 17 % odhadované globální zátěže způsobené infekčními chorobami. Mezi nemoci, které jsou obvykle přenášeny prostřednictvím vektorů, jako jsou komáři nebo mušky, patří například horečka dengue (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*), malárie (více než 400 druhů komára *Anopheles*), leishmanióza (mušky druhu *Plebotomus* a *Lutzomyia*), lymfatická filarióza (komáři rodu *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* a *Mansonia*) a japonská encefalitida (komáři druhu *Culex*) (WHO, 2020, 2019c, 2019d, 2019e, 2006a). Kromě toho bylo potvrzeno, že mouchy domácí (*M. domestica*) hrají významnou roli v mechanickém přenosu trachomu a průjmových onemocnění, která mohou být příčinou dětského oslepnutí nebo úmrtí. Přestože jsou tyto dvě nemoci přenášeny i jinými cestami, měly by být mouchy považovány za významné vektory infekčních onemocnění (WHO, 2006a).

V roce 2017 se na celém světě vyskytlo odhadem 219 miliónů případů malárie a z toho 435 tisíc nemocných touto onemocnění podlelo (WHO, 2018). V globálním měřítku patří mezi nejzranitelnější skupinu nakažených malárií děti, které do věku 14 let tvoří více než dvě třetiny všech úmrtí na toto onemocnění. Úmrtnost dětí do pěti let věku tvořila v roce 2017 dokonce 57 % z celkové úmrtnosti v důsledku malárie (Roser and Ritchie, 2019). Hlavním vektorem malárie je v subsaharské Africe komár *An. gambiae*. Vzhledem k tomu, že samičky *An. gambiae* upřednostňují sání krve v noci, lze účinného řízení vektoru dosáhnout nasazením kontaktních insekticidů v obydlích, a to buď jejich nanesením na vnitřní stěny (indoor residual spraying – IRS) nebo použitím insekticidy ošetřených moskytiér (insecticide-treated nets - ITNs) (Carlier et al., 2017). Insekticidy schválené WHO pro použití jako IRS patří do skupiny karbamátů, organofosfátů, organochloridů a pyrethroidů. Na druhou stranu, pouze insekticidy ze skupiny pyrethroidů jsou dle WHO schváleny pro použití na ITNs (Carlier et al., 2017; WHO, 2006a).

12.1 Příprava muší acetylcholinesterasy

V současné době neexistuje komerčně dostupná hmyzí AChE použitelná pro testování inhibičního účinků sloučenin. Z toho důvodu jsme v prvním kroku

přistoupili k získání hmyzí AChE z modelového organismu. Pro naše potřeby byla vybrána *Musca domestica*, která nese ve svém genomu pouze jeden *ace* gen (Weill et al., 2002), a tudíž je vhodná pro přípravu enzymu homogenizací celých muších hlav. V naší studii jsme vycházeli z dříve publikovaného postupu pro přípravu homogenátu, ve kterém byl popsán vliv detergentu Triton X-100 na výtěžek získané aktivity *MdAChE*. V tomto publikovaném postupu byl supernatant s obsahem 1 % Tritonu X-100 (90-100 % celkové aktivity AChE) porovnáván se supernatantem bez přídavku Tritonu X-100, který vykazoval pouze 15 % celkové aktivity (Devonshire, 1975). Průměr naměřených aktivitních dat v této disertační práci s použitím 1 % Tritonu X-100 jsme považovali za 100 % z celkové získané aktivity *MdAChE* a porovnávali je s průměry získaných aktivit s použitím 0,1% Tritonu X-100 (odpovídal 81 %) a bez použití Tritonu X-100 (pouze 29 %). Získaná data byla v souladu s publikovanými údaji (Devonshire, 1975). Ačkoli jsme byli schopni dosáhnout trojnásobného výtěžku při použití 1% detergentu v porovnání s výtěžkem bez tohoto detergentu, vzorky obsahující vyšší koncentraci detergentu v našem případě nebylo možno zpracovat, jelikož docházelo k výraznému pění vzorku a tím k jeho výrazným ztrátám. Z těchto důvodů byla pro další produkci vybrána koncentrace detergentu 0,1 %.

V minulosti byla AChE získána z různých zdrojů a purifikována různými způsoby, například pomocí dvou krokové afinitní chromatografie. Askar et al. (2011) purifikovali AChE z ovčích jater na koloně s nosičem Concavalin A-Sepharosou, kdy výsledná AChE byla 12krát čistější s výtěžkem 25 % z celkového množství enzymu v původní tkáni. V druhém kroku byl eluát purifikován na nosiči s edrophonium sepharosou 6B s výtěžkem 8 % a výsledný enzym byl 842krát čistější. Kaya et al. (2013) purifikovali AChE z lidských erytrocytů na nosiči Sepharosa 4B-L-tyrosin-takrinu. Tento postup vedl k 23% výtěžku z celkového množství enzymu a 658krát čistějšímu enzymu. Naopak Carroll et al. (1995) použili nosič takrin-epoxy Sepharosy 6B, která byla použita pro purifikaci AChE ze tří vzorků (komerčně dostupná úhoří AChE, AChE z bovinního séra a AChE z elektrických orgánů parejnoka). Purifikovaná AChE z bovinního séra byla 65 000krát čistější a výtěžnost purifikace byla 59 % z celkového množství enzymu. Na druhou stranu AChE z homogenátu elektrických orgánů parejnoka (*Torpedo*) byla 733krát čistější s výtěžkem 38 %.

Pro purifikaci *MdAChE* ze supernatantu jsme vycházeli z postupu publikovaného Carroll et al. (1995), kde byla AChE purifikována pomocí nosiče takrin-epoxy Sepharosy 6B. Námi purifikovaná *MdAChE* měla při eluci 10 mM takrinem výtěžnost 33,3 %, což odpovídá hodnotám publikovaným pro purifikaci z parejnoka (Carroll et al., 1995). V důsledku časové náročnosti purifikace, a to především z důvodu opakování dialýzy, jsme od eluce *MdAChE* z ligandu takrinem upustili. Ani eluce nadbytkem substrátu nebyla dostatečně účinná a neposkytla dostatečně aktivní purifikovanou *MdAChE*, ani po navýšení vstupního množství homogenátu na objem 4 ml.

MdAChE byla v minulosti úspěšně purifikována Fournier et al. (1987) za pomoci kombinace precipitace 70% síranem amonným, použitím Concavalin A-Sepharosy, afinitní kolony s trimethylammonium-6-hexylaminem spojeným s CH-4B Sepharosou a *N*-methylakridinové kolony (Fournier et al., 1987). Nicméně v uvedené studii Fournier et al. (1987) použili jako vstupní množství pro homogenizaci 20 000–30 000 muších hlav. To je mnohonásobně větší množství, než jaké jsme byli schopni v našich podmínkách zajistit. Z časových důvodů potřebných pro další vývoj purifikačního protokolu a s přihlédnutím k faktu, že v minulosti byly sloučeniny testovány na samotném muším supernatantu (Devonshire, 1975) jsme přistoupili k testování inhibice sloučenin na *MdAChE* ze supernatantu.

12.2 Příprava rekombinantní acetylcholinesterasy komára *Anopheles gambiae*

Homogenizace těl komárů není vhodný způsob pro získání komářích AChE z několika důvodů. Prvním problémem je velikost komáříchho organismu, jehož hmota neposkytuje dostatek materiálu pro purifikace. Druhým je způsob obživy samiček komára (sání krve), které znemožňuje odlišení hmyzího enzymu od enzymu hostitele. Další komplikací pro purifikaci z homogenizovaných těl komárů je také fakt, že komár *An. gambiae* nese dva typy enzymu AChE1 a AChE2, kdy za cholinergní funkci u komára zodpovídá pouze enzym AChE1 (Weill et al., 2002). Z výše popsaných důvodů jsme přistoupili k rekombinantní produkci komářích *AgAChE1*. Zaměřili jsme se na produkci části katalytické domény *AgAChE1*, která již byla dříve v literatuře publikována (Jiang et al., 2009).

Pro produkci jsme zvolili komerčně dostupný systém Bac-to-bac zahrnující hmyzí buňky Sf9 v kombinaci s plazmidem pFastBac, který následně dává vzniku bakmidu nesoucí rekombinantní bakulovirus pro infekci buněk. Ačkoliv Jiang et al. (2009) použil příbuzný typ buněk (*Spodoptera frugiperda* Sf21), použití hmyzích buněk Sf9 vycházelo ze snažší kultivace a manipulace, ačkoliv je jejich schopnost produkce rekombinantního proteinu nižší (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Pro produkci proteinu do buněčného média a následnou purifikaci byl klonovaný gen fúzován se sekvencí poskytující N-terminální HBM sekrečním signál a C-koncovou histidinovou značku, což skladbou odpovídalo publikovanému konstrukt. Oproti proteinu publikovanému Jiang et al. (2009) naše sekvence navíc obsahovala TEV štěpící místo umístěné mezi histidinovou kotvou a sekvencí *AgAChE1*. Vzniklý konstrukt byl proto o něco delší.

Enzym *AgAChE1* byl v minulosti rekombinantně připraven i v jiných expresních systémech. Jako první byla rekombinantní produkce katalytické podjednotky *AgAChE1* popsána v hmyzích buňkách *Drosophila* S2 (Carlier et al., 2017, 2008; Weill et al., 2003). Dále byla připravena purifikovaná katalytická doména *AgAChE1* v buňkách Sf21 (Jiang et al., 2009) nebo v buňkách kvasinek *Pichia pastoris* (Wong et al., 2012). Stejný expresní systém využívající buněk Sf9 byl zvolen v nedávné době také švédskou skupinou (Engdahl et al., 2015). V jejich studii byla za použití buněk Sf9 a pomocí bakulovirového expresního systému exprimována kompletní sekvence *ace-1*.

Bakulovirový expresní systém je široce využíván expresní systém pro produkci proteinů s vysokými výtěžky. Tento systém poskytuje posttranslační modifikace, které jsou velice podobné těm, které vznikají ve vyšších eukaryotických buňkách (Kost et al., 2005; Lo and Chao, 2004). Pro docílení maximálních výtěžků rekombinantní produkce je zapotřebí znát titr vzniklé virové suspenze, aby bylo možno dosáhnout optimální infekce hostitelských buněk. V současné době je stanovení titru bakulovirového roztoku hlavním časově náročným krokem v expresi genů bakuloviru (Lo and Chao, 2004).

Kurčení titru bakulovirového roztoku je dle výrobce doporučeno použití plakové eseje, která probíhá 7-10 dní. Publikovány byly také jiné metody, například komerčně dostupné imunocytochemické testy s monoklonálními protilátkami proti bakulovirovému proteinu GP-64, které jsou schopny prokázat

titr bakulovirového roztoku v rámci 48 hodin (Kitts and Green, 1999). Dále byla popsána kvantifikace pomocí průtokové cytometrie, která zkrátila kvantifikaci na 2 hodiny (Shen et al., 2002). Další rychlou metodou detekce a kvantifikace je kvantitativní PCR (qPCR), jehož hlavní výhodou je rychlost stanovení virového titru, kde výsledky kvantifikace jsou dostupné do 1 hodiny po izolaci bakulovirové DNA. Navíc bylo prokázáno, že bakulovirový titr získaný standartní plakovou esejí dobře koreluje s titrem získaným pomocí qPCR (Hitchman et al., 2007; Lo and Chao, 2004).

V našem případě jsme stanovení titru virové suspenze nahradili plakovou esejí metodou qPCR. V této metodě jsme s použitím DNA interkalačního činidla SYBR Green kvantifikovali virový titr za použití kalibrační křivky. Titr byl stanoven pro gen *ace-1* (kvantifikace specifická k targetu) a pro gp-64 (kvantifikace specifická k bakmidu). Hodnoty titru bakulovirového roztoku byly v obou případech velice podobné, což potvrzuje přesnost stanovení přítomné DNA, a proto další stanovení může být použita jak insert specifická sada primerů (*ace-1*), tak bakmid specifická sada primerů (GP-64). Z hlediska větší robustnosti metodiky je pro využití v praxi vhodnější použití primerů pro GP-64, kdy můžeme určit titr bakulovirového roztoku pro jakýkoli vnesený gen v bakmidu.

Existuje několik přístupů k purifikaci enzymu ze supernatantu po homogenizaci cílové tkáně. Ačkoli přístupy pro purifikaci *MdAChE* zahrnují vazbu enzymu na nosič pomocí interakce enzym-inhibitor, rekombinantní protein poskytuje více možností purifikace ze supernatantu. V případě purifikace enzymu *AgAChE1* byly v literatuře popsány použití nosičů dextran sulfát-Sepharosa CL-6B, Concavalin A-Sepharosa a his-tag afinitní nikl-chelatační nosič (Ni-NTA agaróza), kdy byl dosažen výtěžek purifikace 51,8 % a enzym byl 2 491krát čistší (Jiang et al., 2009). V této disertační práci jsme zvolili způsob purifikace bez úpravy supernatantu v kombinaci s nikl-chelatačními nosiči. Rozdíl mezi nosiči je v druhu matrice, kdy HisLink je tvořen modifikovanou porézní křemičitou pryskyřicí (silika gel) a Ni excel Sepharosa má jako základ vysoce zesíťovanou agarózu. Oba nosiče byly zvoleny na základě deklarované schopnosti vazby resinu k his-tag značenému proteinu v přítomnosti interferujících molekul nebo k his-tag značenému proteinu vyskytujícímu se v hrubých lyzátech buněk. Ani u jednoho nosiče se však

nepodařilo optimalizovat vazebné podmínky, a tudíž při purifikaci docházelo k odmytí rekombinantního proteinu již při velmi nízkých koncentracích elučňního činidla. Engdahl et al. (2015) rovněž popsali neúspěšné použití C-terminální His-tag značky při purifikaci pomocí Ni-NTA agarózy, kdy purifikovali rekombinantní protein za použití prokainamid Sepharosy. V nedávné době byla v rámci pracovní skupiny, ve které vznikala tato disertační práce, publikována úspěšná purifikace rekombinantního enzymu *AgAChE1* pomocí vysolování na koloně HiTrap Desalting column (Gorecki et al., 2020).

Z dostupné literatury je však známo, že měření inhibičního potenciálu sloučenin lze provést i na samotném supernatantu (Engdahl et al., 2016) a výsledky porovnání kinetických parametrů enzymu a inhibičních konstant byly publikovány jako srovnatelné a tudíž i zastupitelné (Wong et al., 2012). Z výše uvedených důvodů jsme přistoupili k stanovení inhibice enzymu *AgAChE1* na supernatantu po buněčné kultuře.

12.3 Charakterizace enzymu pomocí stanovení Michaelisovy konstanty

Pro charakterizaci proteinu jsme stanovili hodnotu Michaelisovy konstanty (K_m) pro substrát acetylthiocholin jodid. Jelikož je hodnota K_m pro daný enzym a substrát konstantní, lze pomocí této hodnoty porovnat jednotlivé přípravy enzymu mezi jednotlivými pracovišti. Námi naměřená hodnota K_m *MdAChE* pro substrát acetylthiocholin jodid odpovídala hodnotám K_m v homogenátu obsahujícím Triton X-100 publikovaným Devonshire et al. (1975) pro rezistentní kmen *M. domestica* (Devonshire, 1975).

Hodnota K_m *AgAChE1* měřené v buněčném supernatantu pro substrát acetylthiocholin jodid rovněž korelovala s hodnotou K_m publikovanou Jiang et al. (2009), tedy s publikací, ze které jsme vycházeli. V nedávné době byla v rámci pracovní skupiny, ve které vznikala tato disertační práce, publikována hodnota K_m 54,63 μM u purifikovaného enzymu *AgAChE1* za použití substrátu acetylthiocholin jodidu, což ukazuje, že hodnoty K_m u purifikovaného enzymu a *AgAChE1* v buněčném supernatantu jsou shodné (Gorecki et al., 2020). Tato zjištění odpovídají již dříve publikovaným datům Wong et al. (2012).

Na druhou stranu hodnoty K_m publikovane Engdahl et al. (2015) se v případě WT *AgAChE1* lišily s hodnotami námi získanými až o polovinu. Tento rozdíl mohl být způsoben jak rozdílem v metodice měření, tak rozdílem ve způsobu vyhodnocení dat. Engdahl et al. (2015) z vyhodnocení vyloučili koncentrace substrátu acetylthiocholin jodidu, za kterých již docházelo k substrátové inhibici, kdežto v našem případě bylo s tímto jevem počítáno a pro vyhodnocení K_m tak byla použita křivka pro substrátovou inhibici.

12.4 Měření inhibiční schopnosti sloučenin a jejich selektivity vůči hmyzí AChE

V této práci byly jako standardy běžně používaných insekticidů vybrány inhibitory acetylcholinesterasy bendiokarb a karbofuran. Bendiokarb byl vybrán z důvodu vyššího insekticidního účinku (Jiang et al., 2013), kdežto karbofuran byl vybrán vzhledem ke svému širokospektrálnímu účinku (Richards, 2011). Oba insekticidy jsou obecně považovány za neselektivní inhibitory (Jiang et al., 2013; Swale et al., 2015), což odpovídalo také výsledkům pro bendiokarb dosažených v této práci. Bendiokarb inhiboval ve stejném řádu jak hmyzí (*AgAChE1* a *MdAChE*), tak lidskou acetylcholinesterasu, a tudíž byl jeho SI vůči hmyzím enzymům nízký. Na druhou stranu, v případě použití karbofuranu se selektivita k hmyzím enzymům lišila. Dle výsledků získaných v této práci karbofuran vykazoval určitou selektivitu vůči *MdAChE* (SI 20), kdežto selektivita k *AgAChE1* byla nízká (SI 6,67).

Insekticidy ze skupiny karbamátů a organofosfátů jsou kovalentními inhibitory AChE působící na serin v CAS (Knutsson et al., 2018) a spolu s inhibitory cysteinu 286 (hmyzí selektivita) cílí na konkrétní aminokyselinu (Dou et al., 2013). Na druhou stranu nekovalentní inhibitory mohou v případě inhibice katalytické aktivity interagovat s jakoukoli oblastí proteinu (Engdahl et al., 2016). Mezi nekovalentní inhibitory patří také THA a 7-MEOTA, které byly v této práci použity jako další standardy. THA a 7-MEOTA byli v porovnání s bendiokarbem a karbofuranem slabšími inhibitory hmyzích enzymů, navíc s nižší selektivitou k hmyzím enzymům.

V rámci disertační práce bylo na *MdAChE* testováno celkem 75 sloučenin. Ve skupinách vytvořených podle strukturálních podobností byla nejlepšími inhibitory *MdAChE* šestá skupina sloučenin, heterodimery 7-MEOTA-THA (**K1323-K1336**). Dalšími významnými inhibitory *MdAChE* byly molekuly ze skupiny bis-isochinoliniových derivátů **K299**, **K302** a **K419**, sloučenina ze skupiny derivátů chinolinia a akridinia **K009** a molekula ze skupiny bis-pyridiniových derivátů **K423**. Z inhibitorů testovaných na *MdAChE* měly srovnatelné inhibiční schopnosti v porovnání s použitými karbamáty sloučeniny **K299**, **K302**, **K1324-K1336** s hodnotami IC_{50} v nanomolárním řádu.

Z hlediska selektivity z testovaných inhibitorů na *MdAChE* vynikaly sloučeniny **K009** (SI 32,3), **K1324** (SI 26,1), **K1323** (SI 17,6), **K020** (SI 14,8), **K416** (SI 12,2) a **K1329** (SI 10,1). Z těchto šesti molekul byly čtyři (**K009**, **K1324**, **K1323** a **K1329**) také dostatečnými inhibitory *MdAChE* s hodnotami IC_{50} v řádech desítek a stovek nanomolů. Derivát akridinia (**K009**) byl nejselektivnějším inhibitorem *MdAChE* a v porovnání s THA byl 51krát selektivnější. Molekula **K009** byla o jeden řád silnějším inhibitorem než THA. Silnější inhibice akridinu oproti THA byla v minulosti popsána již na *hAChE* (Drtinova et al., 2014). Spojení THA s 7-MEOTOU pomocí alifatického linkeru (**K1323-K1336**) vedlo ke zvýšení selektivity, kdy molekuly s kratším methylenovým spojovacím řetězcem (**K1323**, **K1324**) byly selektivnějšími inhibitory *MdAChE* než sloučenina **K1329** nesoucí sedm methylenových zbytků.

U testovaných molekul vykazující nejvyšší selektivitu k *MdAChE* byly tyto hodnoty selektivity porovnávány se standardními inhibitory bendiokarbem a karbofuranem. Výše zmíněné inhibitory (**K009**, **K020**, **K416**, **K1324**, **K1323** a **K1329**) byly všechny selektivnějšími inhibitory než námi testovaný standard bendiokarb (SI 3,1). Nicméně pouze sloučeniny **K009** a **K1324** předčily svou selektivitou i hodnotu SI testovaného standardu karbofuranu (SI 20). Z toho důvodu se molekuly **K009** a **K1324** jeví jako nejvhodnější kandidáti na insekticidy použitelné pro *M. domestica*.

V rámci pracovní skupiny byla provedena molekulově modelovací studie za účelem zjištění vztahu mezi strukturou sloučenin a jejich vlivu na afinitu k daným hmyzím enzymům. U enzymu *MdAChE* byly zkoumány sloučeniny **K299**,

K416, K423, K1328 a K1335. Ze skupiny bis-isocholiniových inhibitorů vykázala molekula **K299** duální charakter inhibice *MdAChE*, přičemž klíčovou roli v kotvení ligandu hraje pravděpodobně Tyr151 a to tvorbou π - π /kation- π interakcí s oběma isochinoliniovými částmi molekuly i s methylenovým linkerem (hydrofobní interakce). Záměna alifatického spojovacího řetězce za aromatický řetězec obsahující *ortho*-substituovaný xylen (**K416**) vedla v komplexu **K416-MdAChE** ke stabilizaci sloučeniny rovněž pomocí paralelních π - π interakcí s různými aromatickými aminokyselinami. Navíc v tomto případě byla patrná hydrofobní interakce sloučeniny s His557 z katalytické triády enzymu *MdAChE*. Sloučenina **K423** nesoucí but-(2*E*)-en-1,1-diylový řetězec byla nejslibnějším inhibitorem bis-pyridiniových derivátů, která také vykazovala duální inhibiční charakter vazbou do obou anionických částí enzymu. Stabilizace v komplexu **K423-MdAChE** proběhla opět pomocí π - π /kation- π interakcí s aromatickými aminokyselinovými rezidui po obvodu lemující vazebné místo enzymu. Výraznější afinita **K423** k *MdAChE* oproti lidskému enzymu byla patrně způsobena vyšším množstvím kation- π interakcí (Hrabcova et al., 2017).

Na šesté skupině 7-MEOTA-THA heterodimerů (**K1323-K1336**) bylo možné pozorovat rozdílné schopnosti inhibice vůči *MdAChE* a *AgAChE1*. Z hlediska inhibice *AgAChE1* mezi těmito sloučeninami nejvíce vynikala sloučenina **K1328** inhibující *AgAChE1* v nanomolárním řádu s hodnotou SI 44,2. Na druhou stranu neúčinnějším inhibitorem *MdAChE* byla molekula **K1324** inhibující také v nanomolárním řádu s hodnotou SI 26,1. Z daných výsledků vyplývá, že *MdAChE* nejlépe inhibuje 7-MEOTA-THA heterodimer s thiomocovinou ve spojovacím řetězci obsahujícím dva methylenové zbytky. Oproti tomu *AgAChE1* byla nejlépe inhibována 7-MEOTA-THA heterodimerem s thiomocovinou nesoucí šest methylenových zbytků v linkeru. Rozdílnost inhibičních účinků mezi *MdAChE* a *AgAChE1* bylo možné očekávat z důvodu odlišných sekvencí kódujících příslušné enzymy (geny *ace-2* a *ace-1*), a tím rozdílné struktury daných enzymů. V minulosti bylo provedeno porovnání sekvencí *DmAChE* (*ace-2*) a *AgAChE1* (*ace-1*), kdy z výsledků vyplynulo, že *DmAChE* sdílí pouze 41 % sekvenční identity (56% podobnost) s *AgAChE1* (Carrier et al., 2008).

Různé deriváty tetrahydroakridinů nebo jejich hybridů vykazovaly v minulosti vynikající inhibiční aktivitu vůči cholinesterasám související s jejich schopností interakce s CAS a/nebo periferním aniontovým místem (PAS) enzymu (Korabecny et al., 2014; Spilovska et al., 2013). Schopnost bivalentní inhibice byla u *AgAChE1* popsána například u molekuly BW284c54 nebo bis(7)-takrinu (Carrier et al., 2008). Námi testovaná skupina heterodimerů 7-MEOTA-THA (**K1324-K1336**) prokázala dobrou inhibiční aktivitu vůči oběma hmyzím enzymům (*MdAChE* a *AgAChE1*) a svými hodnotami IC_{50} se významně přiblížili k účinnosti karbamátových insekticidů, které účinkují jako pseudoireverzibilní inhibitory.

Z hlediska schopnosti inhibice *AgAChE1* se 7-MEOTA-THA heterodimery (**K1323-K1336**) přiblížily ke komerčně používaným insekticidům. Mezi WHO schválené insekticidy pro IRS u komára *An. gambiae* patří ze skupiny karbamátů propoxur a bendiokarb (WHO, 2006a). Z hlediska selektivity překonaly bendiokarb (SI 2,82) všechny inhibitory nesoucí thiomocovinu v linkeru (**K1323-K1329**). Na druhou stranu sloučeniny s močovinou ve spojovacím řetězci (**K1330-K1336**) nepatřily k selektivním inhibitorům *AgAChE1*.

Karbamáty prošly v posledních deseti letech vývojem, který měl za cíl dosažení větší selektivity nových insekticidů a překonání insekticidové rezistence (Hartsel et al., 2012; Swale et al., 2015; Wong et al., 2012). Nejlepší molekuly z aryl methyl karbamátů měly hodnoty IC_{50} pro *AgAChE1* v sub-mikromolárním rozmezí (Jiang et al., 2013). Testované molekuly **K1328** a **K1329** byly v porovnání s novými karbamáty o řád až dva lepšími inhibitory, nicméně byly o řád méně selektivní (SI 44,2 pro **K1328** versus SI 574 pro aryl methyl karbamáty). V nedávné době probíhal intenzivní screening velkého množství sloučenin pro jejich možný insekticidní účinek. Engdahl et al. (2016) se povedlo na základě screeningu vyprofilovat nekovalentní inhibitory, které inhibovaly enzym AChE1 komára *An. gambiae* a/nebo *Ae. aegypti*. Tyto sloučeniny byly selektivní pro hmyzí AChE1 a inhibovaly také rezistentní formu enzymu *AgAChE1-G119S* (Engdahl et al., 2016). V optimalizaci inhibitorů *N*-aryl-*N'*-ethylenaminothiomocovin dále pokračovala Knutsson et al. (2017), kdy nejlepší sloučenina **8** inhibovala *AgAChE1* v submikromolárním rozmezí s hodnotou SI 117 (Knutsson et al., 2017). Nejlepší testovaný thiomocovinový derivát **K1328** byl v porovnání s molekulou **8** o dva

řády lepším inhibítozem *AgAChE1*. Nicméně jeho selektivita byla 2,7krát nižší v porovnání s publikovaným derivátem *N*-aryl-*N'*-ethylenaminothiomočoviny (**8**).

Z porovnání s dříve publikovanými sloučeninami vyplývá, že heterodimery 7-MEOTA-THA jsou slibnými inhibitory hmyzích enzymů. Nasledně by bylo rovněž vhodné molekuly testovat na enzymu *AgAChE1*-G119S pro zjištění insekticidního účinku sloučenin na bázi inhibitorů AChE efektivních na populaci *An. gambiae* rezistentních k používaným insekticidům. Na základě těchto poznatků by bylo dále možno optimalizovat strukturu za cílem zvýšení jejich selektivity vůči *AgAChE1*. V případě dobrých výsledků nových optimalizovaných struktur by bylo vhodné doplnit výsledky *in vitro* testování o *in vivo* testy na živých komárech, o testy mezidruhové specifity a informace o off-target účincích.

Na základě popsaných rozdílných inhibičních schopností 7-MEOTA-THA heterodimerů na hmyzích enzimech *MdAChE* a *AgAChE1* by bylo vhodné otestovat také sloučeniny ze skupin 1–5 na enzymu *AgAChE1*. Tímto dalším krokem by bylo možné najít další nové selektivní inhibitory *AgAChE1*, které se však na základě výsledků získaných na *MdAChE* zatím mohou jevit jako neperspektivní sloučeniny. Z časových důvodů však již k tomuto kroku v této práci nedošlo. Tyto další kroky by mohly vést k nalezení acetylcholinesterasových insekticidů netoxických k jiným organismům.

Nové, účinnější a selektivnější insekticidy na principu inhibice AChE by mohly v budoucnu pomoci s eliminací druhů komárů nesoucí rezistenci vůči pyrethroidním insekticidům. Nárůst rezistence k používaným insekticidům mezi druhy komárů šířící malárii a další infekční onemocnění významně ovlivňuje úspěšnost regulace výskytu daných nemocí (Hemingway and Ranson, 2000). Pyrethroidní rezistence je jednou z nejrozšířenějších typů rezistence (Dabiré et al., 2014; Dery et al., 2016; Elissa et al., 1993), což je důsledek faktu, že pyrethroidy jsou jedinými insekticidy používanými pro impregnaci moskytiér a doposud nebyly WHO schváleny žádné sloučeniny ze skupiny inhibitorů AChE pro použití moskytiéry ošetřené insekticidy. Důvodem jsou obavy z toxických účinků na člověka.

Použití nepyrethroidních insekticidů na bázi inhibice AChE by navíc mohlo vést k přípravě nových kombinací směsí typu „dva v jednom“ (pyrethroidní a nepyrethroidní insekticid), které by mohly být přínosné ke kontrole vektorů díky působení insekticidů s různým mechanismem účinku (Guillet et al., 2001). Vzhledem k dobře známým toxickým účinkům inhibitorů AChE u savců je ale nutné u nových insekticidních kandidátů hledat nízkou schopnost inhibice lidského enzymu a naopak vysokou selektivitu k hmyzím enzymům ($SI > 100$) (Carlier et al., 2017; Casida and Quistad, 2004).

K vývoji insekticidů však vede od identifikace předlokové struktury (tzv. lead structure) dlouhá cesta. V minulosti byly WHO vydány doporučení shrnující postupy nutné k registraci nového insekticidu pro použití v malarických oblastech. Účelem těchto pokynů je popsat vědecké údaje a informace, které mohou být potřebné k tomu, aby vlády daných států mohly hodnotit pesticidy za účelem jejich registrace. Tyto informace mají státům pomoci zajistit, aby všechny pesticidy používané v jakémkoli odvětví, včetně zemědělství a veřejného zdraví, byly účinné pro zamýšlený účel a nepředstavovaly nepřijatelné riziko pro zdraví lidí, zvířat nebo pro životní prostředí. Dále by tato doporučení měla usnadnit získávání údajů a podávání žádostí o registraci pesticidů v členských státech Evropské Unie, Spojených států Amerických a Kanady (WHO/FAO, 2013). Tato obecná ustanovení jsou následně upravena dalšími dokumenty, kde je již možné dohledat konkrétní požadavky laboratorních výsledků a dalších studií nutných například pro registraci pesticidu k použití pro impregnaci moskytiér nebo jako vnitřní reziduální postřiky proti komárům přenášející malárii (WHO, 2006b). Tento dokument blíže specifikuje tři fáze testování, kdy ve fázi I. jsou zahrnuty laboratorní studie, ve fázi II. probíhá testování sloučeniny v malém měřítku v terénních podmínkách a ve III. fázi následuje testování sloučeniny v terénních podmínkách ve velkém měřítku. V případě absolvování všech tří fází by měly být známy údaje o stanovení účinnosti, míry aplikace v terénu a provozní proveditelnost a přijatelnost insekticidu určeného pro IRS a / nebo ITN pro řízení populace komárů. Tyto doporučené postupy poskytují zároveň některé informace o bezpečnosti a toxicitě insekticidního přípravku pro necílové organismy. Nicméně se předpokládá, že předběžné posouzení ekologické toxicity a bezpečnosti pro

člověka pro danou novou sloučeninu proběhlo již před provedením jakékoli terénní studie (WHO, 2006b).

13 Závěr

V rámci této disertační práce byly rešeršně zpracovány současné poznatky z oblasti problematiky šíření malárie a možnosti v komplexním přístupu v boji s tímto onemocněním. Jedním z nástrojů k zabránění šíření tohoto celosvětově rozšířeného onemocnění je vývoj nových a selektivnějších insekticidů, které budou zároveň šetrné k životnímu prostředí.

Na základě dostupných informací byla jako vhodný modelový organismus pro přípravu hmyzí AChE vybrána *M. domestica*. V rámci disertační práce byla vypracována metodika homogenizace hlav *M. domestica* pro získání hmyzího enzymu. Ačkoli zavedení metodiky homogenizace proběhlo úspěšně, purifikace tohoto enzymu z homogenátu za použití afinitní chromatografie nevedla k uspokojivým výtěžkům a čistoty MdAChE, což mohlo být částečně způsobeno relativně nízkým vstupním počtem homogenizovaných muších hlav. Z důvodů nedostatečné purifikace enzymu a ztrátám spojených s touto purifikací byl v práci pro testování inhibičních schopností nových sloučenin dále používán pouze supernatant získaný homogenizací.

Pro zavedení rekombinantní produkce AChE1 komára *An. gambiae* byl použit bakulovirový Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted expression systém. V rámci rekombinantní produkce AgAChE1 se nám podařilo nahradit stanovení titru bakulovirového roztoku plakovou esejí metodou kvantitativní PCR, což vedlo k výraznému zkrácení produkce daného enzymu. Ačkoli zavedení produkce rekombinantního enzymu za využití hmyzích buněk *Spodoptera frugiperda* proběhlo úspěšně, purifikace tohoto enzymu z buněčného supernatantu za použití histidinové kotvy umístěné na C-konci tohoto proteinu nevedla k uspokojivým výtěžkům a čistotě rekombinantního enzymu. Z důvodů nedostatečné purifikace enzymu a ztrátám spojených s touto purifikací byl v práci pro testování inhibičních schopností nových sloučenin dále používán pouze buněčný supernatant.

Na získaných hmyzích enzymech byly testovány inhibitory AChE z interní databáze sloučenin. Výsledky byly porovnány s jejich účinky na lidském enzymu a následně byla vyhodnocena i jejich selektivita. Mezi 75 inhibitory testovanými na enzymu MdAChE v homogenátu byla nejslibnější skupinou inhibitorů šestá skupina sloučenin (**K1323-K1336**). Šestá skupina tzv. heterodimery 7-MEOTA-

THA inhibovala v nanomolárním řádu také enzym *AgAChE1*. Mezi danými hmyzími enzymy byly pozorovány mezidruhové rozdíly v účinních molekul **K1323-K1336**. Nejslibnějším inhibitorem *AgAChE1* z šesté skupiny byla sloučenina **K1328** s hodnotou IC_{50} v nanomolárním rozmezí a indexem selektivity 44,2. V případě inhibice *MdAChE* vynikala z šesté skupiny sloučenina **K1324** s hodnotou IC_{50} také v nanomolárním rozmezí a indexem selektivity 26,1.

14 Seznam použité literatury

- Abreu-Villaça, Y., Levin, E.D., 2018. Chapter 40 - Developmental Neurobehavioral Neurotoxicity of Insecticides, in: Slikker, W., Paule, M.G., Wang, C. (Eds.), Handbook of Developmental Neurotoxicology (Second Edition). Academic Press, London. pp. 453–466. ISBN: 978-0-12-809405-1
- Alout, H., Labbé, P., Berthomieu, A., Djogbénu, L., Leonetti, J.-P., Fort, P., Weill, M., 2012. Novel AChE Inhibitors for Sustainable Insecticide Resistance Management. PLOS ONE. 7(10), e47125. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047125>
- Anyanwu, G.I., Molyneux, D.H., Phillips, A., 2000. Variation in cuticular hydrocarbons among strains of the *Anopheles gambiae sensu stricto* by analysis of cuticular hydrocarbons using gas liquid chromatography of larvae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(3), 295–300. ISSN 0074-0276. Dostupné z <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000300003>
- Askar, K.A., Kudi, A.C., Moody, A.J., 2011. Purification of Soluble Acetylcholinesterase from Sheep Liver by Affinity Chromatography. Appl. Biochem. Biotechnol. 165(1), 336. ISSN 1559-0291. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9254-7>
- Awolola, T.S., Oduola, O.A., Strode, C., Koekemoer, L.L., Brooke, B., Ranson, H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 103(11), 1139–1145. ISSN 0035-9203. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.08.021>
- Ayad, H., Georghiou, G.P., 1975. Resistance to Organophosphates and Carbamates in *Anopheles albimanus* Based on Reduced Sensitivity of Acetylcholinesterase. J. Econ. Entomol. 68(3), 295–297. ISSN 0022-0493. Dostupné z <https://doi.org/10.1093/jee/68.3.295>
- Bai, H., Gelman, D.B., Palli, S.R., 2010. Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. Pest Manag. Sci. 66(9), 936–943. ISSN 1526-4998. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/ps.1962>
- Barry, A.E., Arnott, A., 2014. Strategies for Designing and Monitoring Malaria Vaccines Targeting Diverse Antigens. Front. Immunol. 5, 359. ISSN 1664-3224. Dostupné z <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00359>
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Marvil, Praha. ISBN 978-80-2380-297-9
- Bloomquist, J.R., 1996. Ion Channels as Targets for Insecticides. Annu. Rev. Entomol. 41(1), 163–190. Dostupné z <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001115>
- Busvine, J.R., 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. Nature 168(4266), 193–195. ISSN 0028-0836. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/168193a0>
- Carlier, P.R., Anderson, T.D., Wong, D.M., Hsu, D.C., Hartsel, J., Ma, M., Wong, E.A., Choudhury, R., Lam, P.C.-H., Totrov, M.M., Bloomquist, J.R., 2008. Towards a species-selective acetylcholinesterase inhibitor to control the mosquito vector of malaria, *Anopheles gambiae*. Chem. Biol. Interact. 175(1), 368–375. ISSN 0009-2797. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.037>

- Carlier, P.R., Bloomquist, J.R., Totrov, M., Li, J., 2017. Discovery of Species-selective and Resistance-breaking Anticholinesterase Insecticides for the Malaria Mosquito. *Curr. Med. Chem.* 24(27), 2946–2958. ISSN 1875-533X. Dostupné z <https://doi.org/10.2174/0929867324666170206130024>
- Carroll, R.T., Grimm, J.L., Hepburn, T.W., Emmerling, M.R., 1995. Purification of Acetylcholinesterase by Tacrine Affinity Chromatography. *Protein Expr. Purif.* 6(4), 389–393. ISSN 1046-5928. Dostupné z <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1051>
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17(8), 983–998. ISSN 0893-228X. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/tx0499259>
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.* 43(1), 1–16. Dostupné z <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2019. CDC - Malaria - About Malaria - Disease [online]. Poslední změna 4.1.2019 [cit. 4.1.2020]. Dostupné z <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
- CNS Clinic-Jordan, ©2016. THE SYNAPSE [online]. [cit. 12.1.2020]. Dostupné z <http://www.humanneurophysiology.com/synapse.htm>
- Cowman, A.F., Healer, J., Marapana, D., Marsh, K., 2016. Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167(3), 610–624. ISSN 0092-8674. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11(3), 315–335. ISSN 1570-159X. Dostupné z <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>
- Dabiré, R.K., Namountougou, M., Diabaté, A., Soma, D.D., Bado, J., Toé, H.K., Bass, C., Combarry, P., 2014. Distribution and Frequency of kdr Mutations within *Anopheles gambiae* s.l. Populations and First Report of the Ace.1 G119S Mutation in *Anopheles arabiensis* from Burkina Faso (West Africa). *PLOS ONE* 9(7), e101484. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101484>
- Darvesh, S., Darvesh, K.V., McDonald, R.S., Mataija, D., Walsh, R., Mothana, S., Lockridge, O., Martin, E., 2008. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 51(14), 4200–4212. ISSN 0022-2623. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/jm8002075>
- David, J.-P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P.M., Louis, C., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(11), 4080–4084. ISSN 1091-6490. Dostupné z <https://doi.org/10.1073/pnas.0409348102>
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., 2007a. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59(3), 151–162. ISSN 1521-6551. Dostupné z <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., 2007b. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran

- species. *Insect Mol. Biol.* 16(3), 361–375. ISSN 0962-1075. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00733.x>
- Dery, D.B., Segbaya, S., Asoalla, V., Amoyaw, F., Amoako, N., Agyeman-Budu, A., Oduro, A., Owusu-Agyei, S., Asante, K.P., 2016. *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) Susceptibility to Insecticides and Knockdown Resistance Genes Prior to Introduction of Indoor Residual Spraying in 11 Districts in Ghana. *J. Med. Entomol.* 53(6), 1403–1409. ISSN 1938-2928. Dostupné z <https://doi.org/10.1093/jme/tjw098>
- Devonshire, A.L., 1975. Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Biochem. J.* 149(2), 463–469. ISSN 0264-6021. Dostupné z <https://doi.org/10.1042/bj1490463>
- Dimopoulos, G., Christophides, G.K., Meister, S., Schultz, J., White, K.P., Barillas-Mury, C., Kafatos, F.C., 2002. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(13), 8814–8819. ISSN 0027-8424. Dostupné z <https://doi.org/10.1073/pnas.092274999>
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., Zhorov, B.S., 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50, 1–17. ISSN 1879-0240. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>
- Dou, D., Park, J.G., Rana, S., Madden, B.J., Jiang, H., Pang, Y.-P., 2013. Novel Selective and Irreversible Mosquito Acetylcholinesterase Inhibitors for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *Sci. Rep.* 3, 1068. ISSN 2045-2322. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/srep01068>
- Drtinova, L., Dobes, P., Pohanka, M., 2014. Low molecular weight precursor applicable for Alzheimer disease drugs synthesis (AChE and BChE inhibition, BACE inhibition, antioxidant properties and in silico modulation). *J. Appl. Biomed.* 12(4), 285–290. ISSN 1214-021X. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.jab.2014.01.010>
- Du, Y., Lee, J.-E., Nomura, Y., Zhang, T., Zhorov, B.S., Dong, K., 2009. Identification of a cluster of residues in transmembrane segment 6 of domain III of the cockroach sodium channel essential for the action of pyrethroid insecticides. *Biochem. J.* 419(2), 377–385. ISSN 0264-6021. Dostupné z <https://doi.org/10.1042/BJ20082082>
- Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B.S., Dong, K., 2016. Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti*. *Insects* 7(4), 60. ISSN 2075-4450. Dostupné z <https://doi.org/10.3390/insects7040060>
- Elissa, N., Mouchet, J., Riviere, F., Meunier, J.Y., Yao, K., 1993. Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 73(4), 291–294. ISSN 0772-4128.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. ISSN 0006-2952. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Engdahl, C., Knutsson, S., Ekström, F., Linusson, A., 2016. Discovery of Selective Inhibitors Targeting Acetylcholinesterase 1 from Disease-Transmitting Mosquitoes. *J. Med. Chem.* 59(20), 9409–9421. ISSN 1520-4804. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00967>

- Engdahl, C., Knutsson, S., Fredriksson, S.-Å., Linusson, A., Bucht, G., Ekström, F., 2015. Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. *PloS One*. 10(10), e0138598. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138598>
- Ferreira, L.M., Silva-Filha, M.H.N.L., 2013. Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 23(10), 1137–1168. ISSN 0958-3157. Dostupné z <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822472>
- Fillinger, U., Knols, B.G.J., Becker, N., 2003. Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 8(1), 37–47. ISSN 1360-2276. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2003.00979.x>
- Fournier, D., Cuany, A., Bride, J.M., Bergé, J.B., 1987. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.* 49(5), 1455–1461. ISSN 0022-3042. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb01014.x>
- Gao, J.-R., Zhu, K.Y., 2002. Increased expression of an acetylcholinesterase gene may confer organophosphate resistance in the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 73(3), 164–173. ISSN 0048-3575. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00105-0)
- Gnanadesigan, M., Anand, M., Ravikumar, S., Maruthupandy, M., Vijayakumar, V., Selvam, S., Dhineshkumar, M., Kumaraguru, A.K., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4(10), 799–803. ISSN 2352-4146. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60197-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60197-1)
- Gonçalves, D., Hunziker, P., 2016. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malar. J.* 15. ISSN 1475-2875. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1163-3>
- Gorecki, L., Andrys, R., Schmidt, M., Kucera, T., Psołka, M., Svobodova, B., Hrabcova, V., Hepnarova, V., Bzonek, P., Jun, D., Kuca, K., Korabecny, J., Musilek, K., 2020. Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase Are Neither Selective nor Reversible Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 11(1), 65–71. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00477>
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Muthukumar, U., Hoti, S.L., Khater, H.F., Benelli, G., 2016. Single-step biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Zornia diphylla* leaves: A potent eco-friendly tool against malaria and arbovirus vectors. *J. Photochem. Photobiol. B* 161, 482–489. ISSN 1873-2682. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.016>
- Graves, P.M., Choi, L., Gelband, H., Garner, P., 2015. Primaquine or other 8-aminoquinolines for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD008152. ISSN 1469-493X. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008152.pub5>

- Greenwood, B., Doumbo, O.K., 2016. Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *The Lancet* 387(10016), 318–319. ISSN 1474-547X. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00807-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00807-7)
- Griffin, J.T., Hollingsworth, T.D., Okell, L.C., Churcher, T.S., White, M., Hinsley, W., Bousema, T., Drakeley, C.J., Ferguson, N.M., Basáñez, M.-G., Ghani, A.C., 2010. Reducing *Plasmodium falciparum* malaria transmission in Africa: a model-based evaluation of intervention strategies. *PLoS Med.* 7(8), e1000324. ISSN 1549-1676. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000324>
- Guillet, P., N'Guessan, R., Darriet, F., Traore-Lamizana, M., Chandre, F., Carnevale, P., 2001. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 15(1), 105–112. ISSN 0269-283X. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00288.x>
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T.L., Mallender, W.D., Lewis, T., Fletcher, R.J., Guss, J.M., Silman, I., Sussman, J.L., 2000. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9(6), 1063–1072. ISSN 0961-8368. Dostupné z <https://doi.org/10.1110/ps.9.6.1063>
- Hartsel, J.A., Wong, D.M., Mutunga, J.M., Ma, M., Anderson, T.D., Wysinski, A., Islam, R., Wong, E.A., Paulson, S.L., Li, J., Lam, P.C.H., Totrov, M.M., Bloomquist, J.R., Carlier, P.R., 2012. Re-engineering aryl methylcarbamates to confer high selectivity for inhibition of *Anopheles gambiae* versus human acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(14), 4593–4598. ISSN 1464-3405. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.103>
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371–391. ISSN 0066-4170. Dostupné z <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.371>
- Hepnarova, V., Korabecny, J., Matouskova, L., Jost, P., Muckova, L., Hrabimova, M., Vykoukalova, N., Kerhartova, M., Kucera, T., Dolezal, R., Nepovimova, E., Spilovska, K., Mezeiova, E., Pham, N.L., Jun, D., Staud, F., Kaping, D., Kuca, K., Soukup, O., 2018. The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 150, 292–306. ISSN 1768-3254. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.083>
- Hill, C.A., Meyer, J.M., Ejendal, K.F.K., Echeverry, D.F., Lang, E.G., Avramova, L.V., Conley, J.M., Watts, V.J., 2013. Re-invigorating the insecticide discovery pipeline for vector control: GPCRs as targets for the identification of next gen insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol., Special Issue: Advances in Vector and Urban Pest Management and Resistance* 106(3), 141–148. ISSN 0048-3575. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.008>
- Hitchman, R.B., Siaterli, E.A., Nixon, C.P., King, L.A., 2007. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnol. Bioeng.* 96(4), 810–814. ISSN 0006-3592. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/bit.21177>
- Hrabcova, V., Korabecny, J., Manyova, B., Matouskova, L., Kucera, T., Dolezal, R., Musilek, K., Gorecki, L., Nepovimova, E., Kuca, K., Jun, D., 2017. Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: in vitro screening of probes for novel selective insecticides. *RSC Adv.* 7(62), 39279–39291. Dostupné z <https://doi.org/10.1039/C7RA05838A>

- Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L., Carlier, P.R., 2018. Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Struct.* 26(1), 130-136.e2. ISSN 1878-4186. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.11.021>
- Jeyaratnam, J., 1990. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. *World Health Stat. Q. Rapp. Trimest. Stat. Sanit. Mond.* 43(3), 139-144. ISSN 0379-8070. Dostupné z <https://apps.who.int/iris/handle/10665/51746>
- Jiang, H., Liu, S., Zhao, P., Pope, C., 2009. Recombinant expression and biochemical characterization of the catalytic domain of acetylcholinesterase-1 from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39(9), 646-653. ISSN 1879-0240. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.07.002>
- Jiang, Y., Swale, D., Carlier, P.R., Hartsel, J.A., Ma, M., Ekström, F., Bloomquist, J.R., 2013. Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species. *Pestic. Biochem. Physiol., Special Issue: Advances in Vector and Urban Pest Management and Resistance* 106(3), 156-161. ISSN 0048-3575. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.03.006>
- Jíra, J., 2009. *Lékařská protozoologie*. Galén, Praha. ISBN 9788072623815
- Jones, C.M., Liyanapathirana, M., Agossa, F.R., Weetman, D., Ranson, H., Donnelly, M.J., Wilding, C.S., 2012. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(17), 6614-6619. ISSN 1091-6490. Dostupné z <https://doi.org/10.1073/pnas.1201475109>
- Kaya, H.B., Özcan, B., Şişecioglu, M., Ozdemir, H., 2013. Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from human erythrocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170(1), 198-209. ISSN 1559-0291. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0177-3>
- Khurana, D., Prabhakar, S., 2000. Organophosphorus intoxication. *Arch. Neurol.* 57(4), 600-602. ISSN 0003-9942. Dostupné z <https://doi.org/10.1001/archneur.57.4.600>
- Kim, Y.H., Choi, J.Y., Je, Y.H., Koh, Y.H., Lee, S.H., 2010. Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*. *Insect Mol. Biol.* 19(6), 765-776. ISSN 1365-2583. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01036.x>
- Kitts, P.A., Green, G., 1999. An immunological assay for determination of baculovirus titers in 48 hours. *Anal. Biochem.* 268(2), 173-178. ISSN 0003-2697. Dostupné z <https://doi.org/10.1006/abio.1998.3042>
- Klein, E.Y., 2013. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *Int. J. Antimicrob. Agents* 41(4), 311-317. ISSN 1872-7913. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.007>
- Knutsson, S., Engdahl, C., Kumari, R., Forsgren, N., Lindgren, C., Kindahl, T., Kitur, S., Wachira, L., Kamau, L., Ekström, F., Linusson, A., 2018. Noncovalent Inhibitors of Mosquito Acetylcholinesterase 1 with Resistance-Breaking Potency. *J. Med. Chem.* 61(23), 10545-10557. ISSN 1520-4804. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01060>
- Knutsson, S., Kindahl, T., Engdahl, C., Nikjoo, D., Forsgren, N., Kitur, S., Ekström, F., Kamau, L., Linusson, A., 2017. N-Aryl-N'-ethyleneaminothioureas effectively inhibit acetylcholinesterase 1 from disease-transmitting mosquitoes. *Eur. J.*

- Med. Chem. 134, 415–427. ISSN 1768-3254. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.050>
- Korabecny, J., Dolezal, R., Cabelova, P., Horova, A., Hrubá, E., Ricny, J., Sedlacek, L., Nepovimova, E., Spilovska, K., Andrs, M., Musilek, K., Opletalova, V., Sepsova, V., Ripova, D., Kuca, K., 2014. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. *Eur. J. Med. Chem.* 82, 426–438. ISSN 0223-5234. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.066>
- Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L., 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23(5), 567–575. ISSN 1087-0156. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Li, F., Han, Z.-J., 2002. Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*). *Genome* 45(6), 1134–1141. ISSN 0831-2796. Dostupné z <https://doi.org/10.1139/g02-085>
- Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 537–559. ISSN 1545-4487. Dostupné z <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>
- Lo, H.-R., Chao, Y.-C., 2004. Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Prog.* 20(1), 354–360. ISSN 8756-7938. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/bp034132i>
- Lu, Y., Park, Y., Gao, X., Zhang, X., Yao, J., Pang, Y.-P., Jiang, H., Zhu, K.Y., 2012. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. *Sci. Rep.* 2, 288. ISSN 2045-2322. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/srep00288>
- Maheswaran, R., Ignacimuthu, S., 2015. A novel biopesticide PONNEEM to control human vector mosquitoes *Anopheles stephensi* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22(17), 13153–13166. ISSN 1614-7499. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4586-4>
- Maheswaran, R., Ignacimuthu, S., 2012. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasitol. Res.* 110(5), 1801–1813. ISSN 1432-1955. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2702-z>
- Malcolm, C.A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S.J., Garvey, C.F., Hall, L.M.C., Pasteur, N., Raymond, M., 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.* 7(2), 107–120. ISSN 1365-2583. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.72055.x>
- MALWEST, ©2016. Plasmodium Life cycle [online]. [cit. 8.1.2020]. Dostupné z <http://www.malwest.gr/en-us/malaria/informationforhealthcareprofessionals/plasmodiumlifecycle.aspx>
- Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Bergé, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., Pauron, D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7(2), 179–184. ISSN 0962-1075. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x>
- Meyer, J.M., Ejendal, K.F.K., Avramova, L.V., Garland-Kuntz, E.E., Giraldo-Calderón, G.I., Brust, T.F., Watts, V.J., Hill, C.A., 2012. A “Genome-to-Lead” Approach for

- Insecticide Discovery: Pharmacological Characterization and Screening of *Aedes aegypti* D1-like Dopamine Receptors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(1), e1478. ISSN 1935-2735. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001478>
- Mian, L.S., Mulla, M.S., 1982. Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance. *Residue Rev.* 84, 27–112. ISSN 0080-181X. Dostupné z https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5756-1_2
- Mulla, M.S., 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(2), 269–273. ISSN 8756-971X.
- Mustard, J.A., Beggs, K.T., Mercer, A.R., 2005. Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59(3), 103–117. ISSN 0739-4462. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/arch.20065>
- Mutunga, J.M., Anderson, T.D., Craft, D.T., Gross, A.D., Swale, D.R., Tong, F., Wong, D.M., Carlier, P.R., Bloomquist, J.R., 2015. Carbamate and pyrethroid resistance in the akron strain of *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 116–121. ISSN 1095-9939. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.03.001>
- Narahashi, T., 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294(1), 1–26. ISSN 0022-3565.
- Narahashi, T., 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 79(1), 1–14. ISSN 0901-9928. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x>
- Narahashi, T., 1992. Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(6), 236–241. ISSN 0165-6147. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90075-h](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90075-h)
- N'Guessan, R., Darriet, F., Doannio, J.M., Chandre, F., Carnevale, P., 2001. Olyset Net efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years' field use in Côte d'Ivoire. *Med. Vet. Entomol.* 15(1), 97–104. ISSN 0269-283X. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00284.x>
- N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi, A.A., Chandre, F., 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med. Vet. Entomol.* 17(1), 19–25. ISSN 0269-283X. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00406.x>
- Nuss, A.B., Ejendal, K.F.K., Doyle, T.B., Meyer, J.M., Lang, E.G., Watts, V.J., Hill, C.A., 2015. Dopamine receptor antagonists as new mode-of-action insecticide leads for control of *Aedes* and *Culex* mosquito vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(3), e0003515. ISSN 1935-2735. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003515>
- Okombo, J., Chibale, K., 2018. Recent updates in the discovery and development of novel antimalarial drug candidates. *MedChemComm* 9(3), 437–453. ISSN 2040-2511. Dostupné z <https://doi.org/10.1039/C7MD00637C>
- O'Reilly, A.O., Khambay, B.P.S., Williamson, M.S., Field, L.M., Wallace, B.A., Davies, T.G.E., 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396(2), 255–263. ISSN 1470-8728. Dostupné z <https://doi.org/10.1042/BJ20051925>

- Pang, Y.-P., 2014. Chapter Six - Insect Acetylcholinesterase as a Target for Effective and Environmentally Safe Insecticides, in: Cohen, E. (Ed.), *Advances in Insect Physiology, Target Receptors in the Control of Insect Pests: Part II*. Academic Press, pp. 435–494. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417010-0.00006-9>
- Pang, Y.-P., 2006. Novel Acetylcholinesterase Target Site for Malaria Mosquito Control. *PLoS ONE*. 1(1), e58. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000058>
- Pang, Y.-P., Brimijoin, S., Ragsdale, D.W., Zhu, K.Y., Suranyi, R., 2012. Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides. *Curr. Drug Targets* 13(4), 471–482. ISSN 1873-5592. Dostupné z <https://doi.org/10.2174/138945012799499703>
- Pang, Y.-P., Ekström, F., Polsinelli, G.A., Gao, Y., Rana, S., Hua, D.H., Andersson, B., Andersson, P.O., Peng, L., Singh, S.K., Mishra, R.K., Zhu, K.Y., Fallon, A.M., Ragsdale, D.W., Brimijoin, S., 2009. Selective and irreversible inhibitors of mosquito acetylcholinesterases for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *PloS One* 4(8), e6851. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006851>
- Perera, M.D.B., Hemingway, J., Karunaratne, S.P., 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar. J.* 7, 168. ISSN 1475-2875. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-168>
- Pezzementi, L., Rowland, M., Wolfe, M., Tsigelny, I., 2006. Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: the roles of two cysteines in the catalytic gorge of the enzyme. *Invertebr. Neurosci.* 6(2), 47–55. ISSN 1354-2516. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0017-z>
- Pohanka, M., Karasova, J.Z., Kuca, K., Pikula, J., Holas, O., Korabecny, J., Cabal, J., 2010. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta* 81(1-2), 621–624. ISSN 1873-3573. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.052>
- Poopathi, S., 2012. Current Trends in the Control of Mosquito Vectors by Means of Biological Larvicides. *J. Agric. Sci. Food Res.* 3(4), 1–14. ISSN 2593-9173. Dostupné z <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000125>
- Prudêncio, M., Rodriguez, A., Mota, M.M., 2006. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(11), 849–856. ISSN 1740-1534. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/nrmicro1529>
- Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Chantra, A., Clemens, R., Looareesuwan, S., White, N.J., 2004. Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(4), 1329–1334. ISSN 0066-4804. Dostupné z <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1329-1334.2004>
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87(5), 955–979. ISSN 0009-2665. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>
- Rahimi, R., Nikfar, S., Abdollahi, M., 2006. Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: a

- meta-analysis of clinical trials. *Hum. Exp. Toxicol.* 25(3), 157–162. ISSN 0960-3271. Dostupné z <https://doi.org/10.1191/0960327106ht602oa>
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R., 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298(5591), 179–181. ISSN 1095-9203. Dostupné z <https://doi.org/10.1126/science.1076781>
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9(5), 491–497. ISSN 0962-1075. Dostupné z <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x>
- Ranson, H., Lissenden, N., 2016. Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* 32(3), 187–196. ISSN 1471-5007. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.010>
- Ranson, H., N'guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., Corbel, V., 2011. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 27(2), 91–98. ISSN 1471-5007. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.08.004>
- Richards, N., 2011. *Carbofuran and Wildlife Poisoning: Global Perspectives and Forensic Approaches*. John Wiley & Sons, Chichester. ISBN 978-0-470-74523-6
- Romano, Jr., J.A., Lukey, B.J., Salem, H., 2007. *Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics*, 2. vydání. CRC Press, Boca Ranton. ISBN 9781420046618
- Rosenberry, T.L., 1975. Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(10), 3834–3838. ISSN 0027-8424. Dostupné z <https://doi.org/10.1073/pnas.72.10.3834>
- Roser, M., Ritchie, H., 2019. Malaria. *Our World in Data*. [online]. Poslední změna 11.2019. [cit. 1.11.2019]. Dostupné z <https://ourworldindata.org/malaria>
- RTS,S Clinical Trials Partnership, 2014. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med.* 11(7), e1001685. ISSN 1549-1676. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001685>
- Satoh, T., Gupta, R.C., 2011. *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. Wiley. John Wiley & Sons, Hoboken. ISBN 978-0-470-41030-1
- Shen, C.F., Meghrou, J., Kamen, A., 2002. Quantitation of baculovirus particles by flow cytometry. *J. Virol. Methods* 105(2), 321–330. ISSN 0166-0934. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00128-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00128-3)
- Schmidt, M., Hrabcova, V., Jun, D., Kuca, K., Musilek, K., 2018. Vector Control and Insecticidal Resistance in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Chem. Res. Toxicol.* 31(7), 534–547. ISSN 0893-228X. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00285>
- Silva, T., Reis, J., Teixeira, J., Borges, F., 2014. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes.

- Ageing Res. Rev. 15, 116–145. ISSN 1872-9649. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.008>
- Sinden, R.E., Billingsley, P.F., 2001. Plasmodium invasion of mosquito cells: hawk or dove? Trends Parasitol. 17(5), 209–211. ISSN 1471-4922. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01928-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01928-6)
- Song, J., Socheat, D., Tan, B., Dara, P., Deng, C., Sokunthea, S., Seila, S., Ou, F., Jian, H., Li, G., 2010. Rapid and effective malaria control in Cambodia through mass administration of artemisinin-piperazine. Malar. J. 9, 57. ISSN 1475-2875. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-57>
- Soukup, O., Jun, D., Zdarova-Karasova, J., Patocka, J., Musilek, K., Korabecny, J., Krusek, J., Kaniakova, M., Sepsova, V., Mandikova, J., Trejtnar, F., Pohanka, M., Drtinova, L., Pavlik, M., Tobin, G., Kuca, K., 2013. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. Curr. Alzheimer Res. 10(8), 893–906. ISSN 1875-5828. Dostupné z <https://doi.org/10.2174/1567205011310080011>
- Spilovska, K., Korabecny, J., Kral, J., Horova, A., Musilek, K., Soukup, O., Drtinova, L., Gazova, Z., Siposova, K., Kuca, K., 2013. 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. Molecules 18(2), 2397–2418. ISSN 1420-3049. Dostupné z <https://doi.org/10.3390/molecules18022397>
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., Heussler, V.T., 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science 313(5791), 1287–1290. ISSN 1095-9203. Dostupné z <https://doi.org/10.1126/science.1129720>
- Swale, D.R., Carlier, P.R., Hartsel, J.A., Ma, M., Bloomquist, J.R., 2015. Mosquitocidal carbamates with low toxicity to agricultural pests: an advantageous property for insecticide resistance management. Pest Manag. Sci. 71(8), 1158–1164. ISSN 1526-4998. Dostupné z <https://doi.org/10.1002/ps.3899>
- Thermo Fisher Scientific, 2017. Growth and maintenance of insect cell lines - user guide. [online]. Poslední změna 14.3.2017. [cit. 13.4.20]. Dostupné z http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Insect_Cell_Lines_UG.pdf
- Thermo Fisher Scientific, nedatováno. Insect Cell-Based Protein Expression — Protein Expression Handbook [online]. [cit. 13.4.2020]. Dostupné z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-expression-handbook/pex-handbook-insect-cell-based-protein-expression.html>
- Tomita, T., Hidoh, O., Kono, Y., 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, Nephrotettix cincticeps. Insect Biochem. Mol. Biol. 30(4), 325–333. ISSN 0965-1748. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00006-0)
- Toutant, J.P., 1989. Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. Prog. Neurobiol. 32(5), 423–446. ISSN 0301-0082. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90031-2)

- Usherwood, P.N.R., Davies, T.G.E., Mellor, I.R., O'Reilly, A.O., Peng, F., Vais, H., Khambay, B.P.S., Field, L.M., Williamson, M.S., 2007. Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. *FEBS Lett.* 581(28), 5485–5492. ISSN 0014-5793. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.057>
- Vais, H., Atkinson, S., Pluteanu, F., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., Usherwood, P.N.R., 2003. Mutations of the para sodium channel of *Drosophila melanogaster* identify putative binding sites for pyrethroids. *Mol. Pharmacol.* 64(4), 914–922. ISSN 0026-895X. Dostupné z <https://doi.org/10.1124/mol.64.4.914>
- Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W., Usherwood, P.N., Cohen, C.J., 2000. Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J. Gen. Physiol.* 115(3), 305–318. ISSN 0022-1295. Dostupné z <https://doi.org/10.1085/jgp.115.3.305>
- van den Berg, H., Zaim, M., Yadav, R.S., Soares, A., Ameneshewa, B., Mnzava, A., Hii, J., Dash, A.P., Ejov, M., 2012. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environ. Health Perspect.* 120(4), 577–582. ISSN 1552-9924. Dostupné z <https://doi.org/10.1289/ehp.1104340>
- Verma, A., 2014. Small Core Heterocyclic Carbamates and Carboxamides: Resistance-breaking Acetylcholinesterase Inhibitors Targeting the Malaria Mosquito, *Anopheles gambiae*. Dissertation thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University
- Verma, A., Wong, D.M., Islam, R., Tong, F., Ghavami, M., Mutunga, J.M., Slobodnick, C., Li, J., Viayna, E., Lam, P.C.-H., Totrov, M.M., Bloomquist, J.R., Carlier, P.R., 2015. 3-Oxoisoxazole-2(3H)-carboxamides and isoxazol-3-yl carbamates: Resistance-breaking acetylcholinesterase inhibitors targeting the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Bioorg. Med. Chem.* 23(6), 1321–1340. ISSN 1464-3391. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.026>
- Vijverberg, H.P.M., Bercken, J.V.D., 1982. Action of Pyrethroid Insecticides on the Vertebrate Nervous System. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8(6), 421–440. ISSN 1365-2990. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1982.tb00311.x>
- Vijverberg, H.P.M., Bercken, J. vanden, 1990. Neurotoxicological Effects and the Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. *Crit. Rev. Toxicol.* 21(2), 105–126. ISSN 1040-8444. Dostupné z <https://doi.org/10.3109/10408449009089875>
- Voicu, V.A., Thiermann, H., Rădulescu, F.Ş., Mircioiu, C., Miron, D.S., 2010. The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 106(2), 73–85. ISSN 1742-7843. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00486.x>
- Volf, P., Horák, P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-008-9
- Warmke, J.W., Reenan, R.A., Wang, P., Qian, S., Arena, J.P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G.J., Van der Ploeg, L.H., Ganetzky, B., Cohen, C.J., 1997. Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 110(2),

- 119–133. ISSN 0022-1295. Dostupné z <https://doi.org/10.1085/jgp.110.2.119>
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M.P., Pasteur, N., Raymond, M., 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269(1504), 2007–2016. ISSN 0962-8452. Dostupné z <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2122>
- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., Raymond, M., 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423(6936), 136–137. ISSN 0028-0836. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/423136b>
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M., Raymond, M., 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 13(1), 1–7. ISSN 0962-1075. Dostupné z <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x>
- WHO, 2020. Leishmaniasis > Vector control [online]. WHO. [cit. 5.1.2020]. Dostupné z <http://www.who.int/leishmaniasis/vector-control/en/>
- WHO, 2019a. First malaria vaccine in Africa: A potential new tool for child health and improved malaria control [online]. WHO. Poslední změna 11.2019. [cit. 3.1.2020]. Dostupné z <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/first-malaria-vaccine/en/>
- WHO, 2019b. About the WHO Global Malaria Programme [online]. WHO. Poslední změna 16.9.2019. [cit. 4.1.2020]. Dostupné z http://www.who.int/malaria/about_us/en/
- WHO, 2019c. Dengue and severe dengue [online]. WHO. Poslední změna 15.4.2019. [cit. 2.11.2019]. Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- WHO, 2019d. Fact sheet about Malaria [online]. WHO. Poslední změna 27.3.2019. [cit. 2.11.2019]. Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- WHO, ©2019e. Lymphatic filariasis > Epidemiology [online]. WHO. [cit. 2.11.2019]. Dostupné z http://www.who.int/lymphatic_filariasis/epidemiology/en/
- WHO, 2018. World malaria report 2018. WHO Press, Geneva. ISBN 978-92-4-156565-3
- WHO, 2015a. World Malaria Report 2015. WHO Press, Geneva. ISBN 978 92 4 156515 8
- WHO, 2015b. Guidelines for the treatment of malaria. 3. vydání. WHO Press, Geneva. ISBN 978 92 4 154912 7
- WHO, 2015c. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. WHO Press, Geneva. ISBN 978 92 4 156499 1
- WHO, 2011. Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment [2000-2009], 5. vydání. World Health Organization, Geneva. ISBN 978 92 4 150215 3
- WHO, 2008. Global malaria control and elimination – Report of a technical review. WHO Press, Geneva. ISBN 978 92 4 159675 6
- WHO, 2006a. Pesticides and their application: for the control of vectors and pests of public health importance, 6. vydání. World Health Organization, Geneva. Dostupné z <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69223>

- WHO, 2006b. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. WHO Press, Geneva. Dostupné z <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69296>
- WHO/FAO, 2013. Guidelines on data requirements for the registration of pesticides. [online]. WHO/FAO. Poslední změna 1.2013. [cit. 15.1.2020]. Dostupné z http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Code/Annotated_Guidelines2013.pdf
- Wilkinson, C.F., 1983. Role of Mixed-Function Oxidases in Insecticide Resistance, in: Georghiou, G.P., Saito, T. (Eds.), *Pest Resistance to Pesticides*. Springer, Boston, MA, pp. 175–205. ISBN 978-1-4684-4466-7. Dostupné z https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7_7
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L., 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* MGG 252(1), 51–60. ISSN 1432-1874. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/BF02173204>
- Winzeler, E.A., 2008. Malaria research in the post-genomic era. *Nature* 455(7214), 751–756. ISSN 1476-4687. Dostupné z <https://doi.org/10.1038/nature07361>
- Wong, D.M., Li, J., Chen, Q.-H., Han, Q., Mutunga, J.M., Wysinski, A., Anderson, T.D., Ding, H., Carpenetti, T.L., Verma, A., Islam, R., Paulson, S.L., Lam, P.C.-H., Totrov, M., Bloomquist, J.R., Carlier, P.R., 2012. Select small core structure carbamates exhibit high contact toxicity to “carbamate-resistant” strain malaria mosquitoes, *Anopheles gambiae* (Akron). *PloS One.* 7(10), e46712. ISSN 1932-6203. Dostupné z <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046712>
- Wong, D.M., Li, J., Lam, P.C.H., Hartsel, J.A., Mutunga, J.M., Totrov, M., Bloomquist, J.R., Carlier, P.R., 2013. Aryl methylcarbamates: potency and selectivity towards wild-type and carbamate-insensitive (G119S) *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase, and toxicity to G3 strain *An. gambiae*. *Chem. Biol. Interact.* 203(1), 314–318. ISSN 1872-7786. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.09.001>
- Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., Palli, S.R., 2006. Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.* 123(7), 530–547. ISSN 0925-4773. Dostupné z <https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.05.005>
- Yahouédo, G.A., Cornélie, S., Djègbè, I., Ahlonsou, J., Aboubakar, S., Soares, C., Akogbéto, M., Corbel, V., 2016. Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasit. Vectors* 9, 385. ISSN 1756-3305. Dostupné z <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1661-8>
- Zlotkin, E., 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 429–455. ISSN 0066-4170. Dostupné z <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.429>

15 Seznam publikovaných prací

15.1 Seznam publikací vztahujících se k disertační práci

Gorecki, L., Andrys, R., Schmidt, M., Kucera, T., Psočka, M., Svobodová, B., **Hrabcová, V.**, Hepnarová, V., Bzonek, P., Jun, D., Kuca, K., Korabecny, J., Musilek, K., 2020. Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase Are Neither Selective nor Reversible Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* 11(1), 65–71. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00477>

Schmidt, M., **Hrabcová, V.**, Jun, D., Kuca, K., Musilek, K., 2018. Vector Control and Insecticidal Resistance in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Chem. Res. Toxicol.* 31(7), 534–547. ISSN 0893-228X. Dostupné z <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00285>

Hrabcová, V., Korabecny, J., Manyová, B., Matousková, L., Kucera, T., Doležal, R., Musilek, K., Gorecki, L., Nepovimová, E., Kuca, K., Jun, D., 2017. Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: in vitro screening of probes for novel selective insecticides. *RSC Adv.* 7(62), 39279–39291. Dostupné z <https://doi.org/10.1039/C7RA05838A>

15.2 Seznam publikací nevztahujících se k disertační práci

Šafratová, M., Hošťálková, A., Hulcová, D., Breiterová, K., **Hrabcová, V.**, Machado, M., Fontinha, D., Prudêncio, M., Kuneš, J., Chlebek, J., Jun, D., Hrabínová, M., Nováková, L., Havelek, R., Seifrtová, M., Opletal, L., Cahlíková, L., 2018. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Arch. Pharm. Res.* 41(2), 208–218. ISSN 1976-3786. Dostupné z <https://doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4>

Zitko, J., Servusová, B., Paterová, P., Mandíková, J., Kubíček, V., Kučera, R., **Hrabcová, V.**, Kuneš, J., Soukup, O., Doležal, M., 2013. Synthesis, Antimycobacterial Activity and In Vitro Cytotoxicity of 5-Chloro-N-

phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* 18(12), 14807–14825.
Dostupné z <https://doi.org/10.3390/molecules181214807>

15.3 Abstrakta z přednášek a konferencí

Hrabcova, V., Schmidt, M., Sepsova, V., Jelinkova, P., Korabecny, J., Jun, D., Kuca, K., Musilek, K. Recombinant production of *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase and evaluation of novel 7-methoxytacrine-tacrine dimmer inhibitors, prezentace formou posteru, Malaria – Gordon Research Conference, Les Diablerets, Švýcarsko, 2017, mezinárodní konference

Hrabcova, V., Mányová, B., Matoušková, L., Jun, D., Korabecny, J., Kuca, K., Nové selektivní insekticidy na bázi inhibitorů acetylcholinesterasy, ústní přednáška, Květinův den, Mezioborový seminář mladých farmakologů a toxikologů, Brno, 2016

Hrabcova, V., Jun, D., Babková, K., Korabecny, J., Kuca, K., Non-acylating acetylcholinesterase inhibitors as a new potential environment friendly pesticides, prezentace formou posteru, 12th International Meeting on Cholinesterases - Sixth International Conference on Paraoxonases, Alicante, Španělsko, 2015

16 Přílohy

Příloha č. 1

Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase Are Neither Selective nor Reversible Inhibitors

Lukas Gorecki,^{†,§,⊥} Rudolf Andrys,^{‡,⊥} Monika Schmidt,^{†,‡,⊥} Tomas Kucera,[§] Miroslav Psoška,^{†,‡} Barbora Svobodova,^{†,§} Veronika Hrabcova,^{‡,§} Vendula Hepnarova,^{†,§} Petr Bzonek,^{‡,§} Daniel Jun,^{†,§} Kamil Kuca,[‡] Jan Korabecny,^{*,†,§} and Kamil Musilek^{*,†,‡,||}

[†]University Hospital Hradec Kralove, Biomedical Research Centre, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

[‡]University of Hradec Kralove, Faculty of Science, Department of Chemistry, Rokytanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

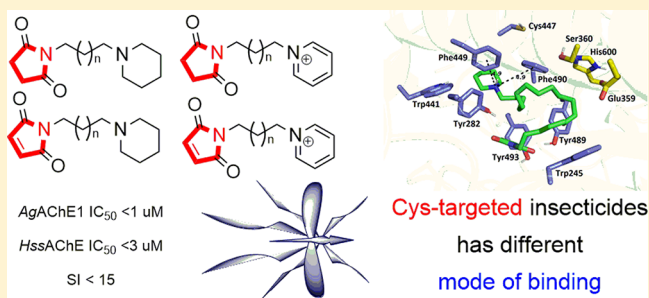
[§]University of Defence, Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

^{||}Florida International University, Herbert Wertheim College of Medicine, Department of Cellular Biology & Pharmacology, 11200 SW Eighth Street GL 495-G Miami, Florida 33199, United States

Supporting Information

ABSTRACT: Acetylcholinesterase cysteine-targeted insecticides against malaria vector *Anopheles gambiae* and other mosquitoes have already been introduced. We have applied the olefin metathesis for the preparation of cysteine-targeted insecticides in high yields. The prepared compounds with either a succinimide or maleimide moiety were evaluated on *Anopheles gambiae* and human acetylcholinesterase with relatively high irreversible inhibition of both enzymes but poor selectivity. The concept of cysteine binding was not proved by several methods, and poor stability was observed of the chosen most potent/selective compounds in a water/buffer environment. Thus, our findings do not support the proposed concept of cysteine-targeted selective insecticides for the prepared series of succinimide or maleimide compounds.

KEYWORDS: Acetylcholinesterase, inhibitor, insecticide, *Anopheles gambiae*, human, selectivity



According to the World Malaria Report 2017, there were 216 million cases of malaria with 445,000 deaths in 2016. Almost 2.7 billion people were reported at risk of malaria. Based on these alarming data, malaria remains a huge threat.¹ Chemical insecticides are one of the major tools used for insect elimination and/or prevention of the spread of vector-borne diseases.^{2,3} However, traditional chemical insecticides are often associated with significant toxicity to mammals and beneficial insects such as honey bees or bumble bees.^{4,5}

The principal mechanism of insecticide action is the formation of a covalent bond to acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), a vital enzyme that is responsible for rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh).^{6–8} The standard organophosphate and carbamate insecticides covalently block Ser360 (*Anopheles gambiae* acetylcholinesterase, AgAChE) and thus disable the process of ACh hydrolysis in invertebrates as well as in vertebrates. In recent years, several compounds were introduced having very good and selective inhibition potency against AgAChE over human AChE.^{9–11} Cysteine-targeted insecticides aimed at the Cys447 residue (full-length numbering; in *Torpedo californica* the numbering is Cys286) in the peripheral anionic site (PAS) of some insect

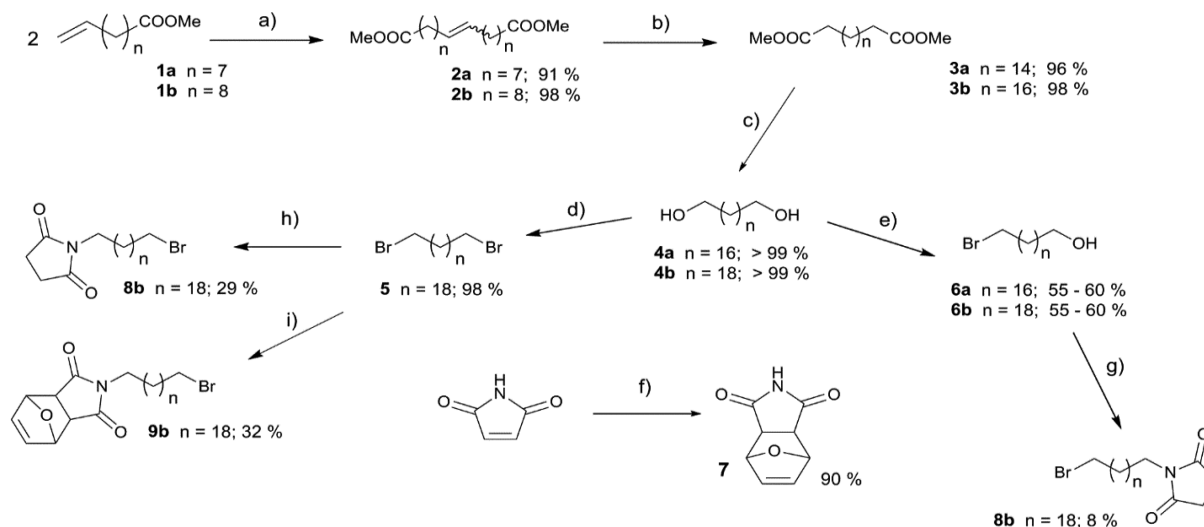
species have been proposed to overcome insecticide resistance.¹² The uniqueness of this approach depends on the fact that the Cys residue is missing in the mammalian enzyme. Moreover, the Cys residue is sterically hindered in some insects such as *Drosophila melanogaster* and it is accessible to standard insecticides only with difficulty.^{12,13} Thus, it is believed that Cys-targeted insecticides might possess significant selectivity favoring *Anopheles* AChE over mammalian AChE.^{3,11,14}

In this paper we report the optimization and total synthesis of some of the previously reported Cys-targeted insecticides. Insecticides targeted to free cysteine were first proposed by computational studies in 2012, and some of them have already been investigated.^{12,15} Herein, we describe a novel and more straightforward synthetic strategy for Cys-targeted insecticides starting from commercially available reagents. In other recent work, a similar synthetic approach was applied for development of several novel insecticides. The maleimide-containing

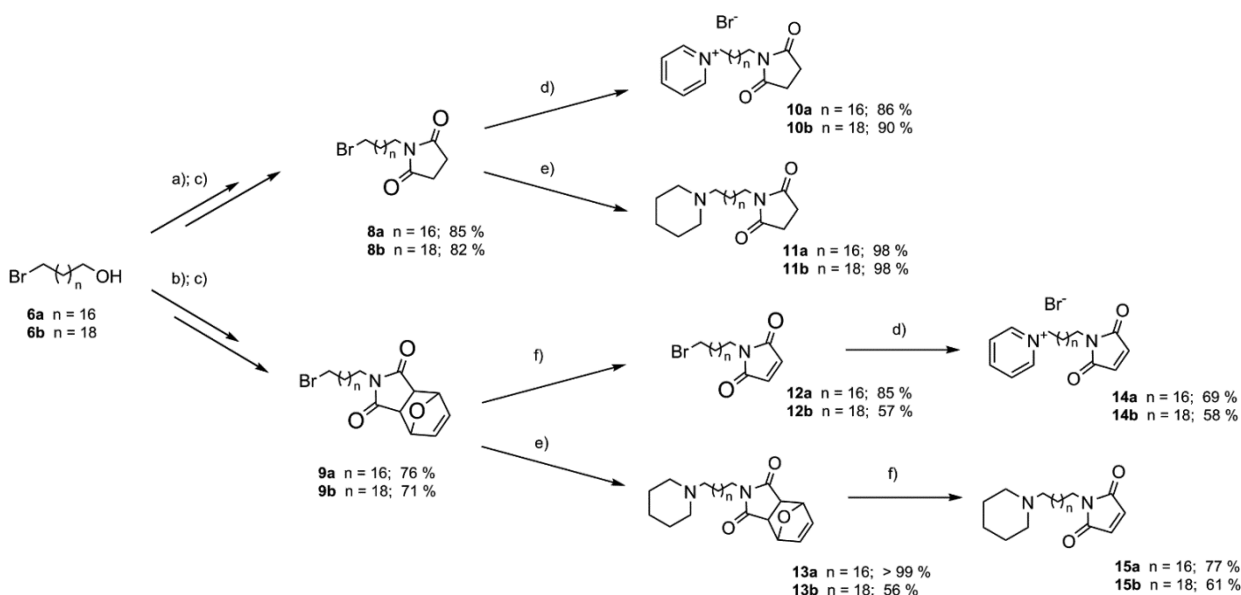
Received: October 16, 2019

Accepted: November 26, 2019

Published: November 26, 2019

Scheme 1. Application of Olefin Metathesis to Obtain Diversely Substituted Long Chain Alkanes^a

^aReagents and conditions: (a) Grubbs 1st gen. (0.02 equiv), reduced pressure up to 2 mbar, RT up to 50 °C; (b) Pd(OH)₂ on C (20%; 0.2 equiv), H₂, MeOH/EA (2:1), RT; (c) LiAlH₄ 2 M solution in THF (2.5 equiv), THF, reflux; (d) NBS (3.0 equiv), PPh₃ (3.0 equiv), THF, RT; (e) HBr 48% solution in H₂O (3.0 equiv), toluene, reflux; (f) furan (3.0 equiv), dioxane, 90 °C; (g) DIAD (1.3 equiv), PPh₃ (1.3 equiv), THF, 0 °C to RT; (h) succinimide (1.5 equiv), K₂CO₃ (1.5 equiv), DMF, 60 °C; (i) **7** (1.5 equiv), K₂CO₃ (1.5 equiv), DMF, 60 °C.

Scheme 2. Synthetic Approach for Cys-Targeted Insecticides^a

^aReagents and conditions: (a) succinimide (1.5 equiv), K₂CO₃ (1.5 equiv), DMF, 60 °C; (b) **7** (1.5 equiv), K₂CO₃ (1.5 equiv), DMF, 60 °C; (c) NBS (1.5 equiv); PPh₃ (1.5 equiv), THF, RT; (d) microwave irradiation (MW), dynamic curve with 100 W and 300 PSI max cap, pyridine (2.0 equiv), MeCN, 90 °C; (e) MW, dynamic curve with 100 W and 300 PSI max cap, piperidine (2.0 equiv), K₂CO₃ (3.0 equiv), MeCN, 90 °C; (f) vacuum app. 1 mbar, 130 °C.

compounds were prepared as Cys-targeted molecules that should directly bind to Cys447, whereas succinimide-containing compounds were developed for comparison purposes. All of them were then evaluated *in vitro* for their potency to block the action of recombinant *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase (AgAChE1), human acetylcholinesterase (HsAChE), and human butyrylcholinesterase (HsBChE).

For the chemical synthesis, the long polymethylene chains were required as the basic scaffolds for the outlined compounds. The methyl esters with terminal double bond (**1a** and **1b**) were chosen as the starting material. Olefin

metathesis was applied (instead of using Grignard reactions) with Grubbs reaction yielding dimeric intermediates **2a** and **2b** in nearly quantitative yields (Scheme 1). There was no need to use a stereoselective reaction, because hydrogenation of the double bond took place in the next step. For this reason, a cheaper first generation Grubbs catalyst was preferred and used to obtain esters **3a** and **3b** instead of using one of the second generation.¹⁶ Subsequent reduction of the esters provided alcohols **4a** and **4b** in quantitative yields. The ester reduction can be managed by two synthetic routes. Besides lithium aluminum hydride, diisobutylaluminum hydride (DIBAL-H)

was efficiently applied to obtain α,ω -dihydroxy compounds **4a** and **4b** (Scheme 1).

A challenging step was the attempt at selective protection of one hydroxyl group to successively and selectively proceed toward the formation of alkylating agent. Initial attempts for selective protection were not successful and are described in the Supporting Information (SI section 2.4). A convenient approach consisted in the use of HBr as a selective reagent with **4a** and **4b** resulting in monobromide intermediates **6a** and **6b**.¹⁷ HBr was also employed for the synthesis in previous work; however, the authors did not fully describe how they obtained monobromide intermediates.¹⁵

Further reactions were analogous to those published.¹⁵ Diels–Alder reaction of maleimide with furan provided imide **7**.¹⁸ Imide **7** and succinimide were then coupled with brominated alcohols **6a** and **6b**. The intermediates **8a/b** and **9a/b** were obtained in two steps via coupling reaction and subsequent bromination with *N*-bromosuccinimide (NBS) in high yields (>70%) (Scheme 2). The original procedure was simplified by skipping isolation of the alcohol intermediates (**17a**, **17b**, **18a**, and **18b**; described in SI) by direct bromination to get **9a** and **9b**. Succinimide was used for analogous *N*-alkylation to obtain **8a** and **8b**. In this way better yields were achieved and further reduction of maleimide into a succinimide scaffold, as was described in the original work, was avoided.¹⁵

The final compounds containing the succinimide moiety (**10a/b** and **11a/b**) were obtained using microwave irradiation. The *N*-alkylation of **8a/b** achieved almost quantitative yields in the case of the piperidine analogues (**11a** and **11b**) and around 90% for the pyridine analogues (**10a** and **10b**; Scheme 2). The final preparation of compounds **14a/b** and **15a/b** containing a maleimide residue required a slightly different approach. In the case of the pyridinium compounds **14a** and **14b**, retro Diels–Alder reaction was used prior to the *N*-alkylation. For the piperidine analogues **15a** and **15b**, the *N*-alkylation of **9a/b** had to precede the retro Diels–Alder reaction to achieve the desired products. Both the *N*-alkylation and the retro Diels–Alder reactions were carried out with good yields over 58% (Scheme 2). These final steps were slightly distinct from those reported in the original work, by using different conditions and by implementation of microwave (MW) irradiation.¹⁵ Note that compounds **14a/b** correspond to previously published compounds under code names **PM18** and **PM20**, and compounds **10b**, **15a**, and **11a** are analogous to **PMS20**, **PY18**, and **PYS18**, respectively (only the salts are different).¹⁵ The rest of the compounds **10a**, **11b**, and **15b** are reported herein for the first time.

The crucial mechanism of action should be based on the formation of a covalent bond between the maleimide moiety and Cys447 in AgAChE1, resulting in irreversible inhibition. A detailed *in vitro* evaluation was made by Dou et al. in 2013.¹⁵ For *in vitro* purposes, recombinant AgAChE1 was prepared and purified in our laboratories (see SI Figure S1). The kinetic parameters of the enzyme were evaluated (see SI Figure S2). The K_M constant of AgAChE1 was found to be 54.63 μM for acetylthiocholine iodide (ATCh) as a substrate, which is in very good correlation with the previously published data.^{19,20} To verify the enzyme and assay results, the standard inhibitors including paraoxon and carbamates (bendiocarb, carbofuran) were evaluated.

The inhibitory ability of the prepared insecticides toward HssAChE and AgAChE1 was determined using the spectro-

photometric method described by Ellman et al. (Table 1).²¹ HssBChE was used as a common off-target for AChE

Table 1. Inhibitory Activity toward AgAChE1 and HssAChE

Compound	IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a		Selectivity index ^b	
	AgAChE1	HssAChE		
10a	---	3.60 ± 0.095	3.38 ± 0.143	0.94
10b	PMS20	2.06 ± 0.040	3.39 ± 0.338	1.65
11a	PYS18	9.97 ± 0.213	21.48 ± 0.843	2.15
11b	---	25.87 ± 1.704	29.30 ± 2.536	1.13
14a	PM18	0.465 ± 0.020	3.26 ± 0.194	7.00
14b	PM20	0.810 ± 0.060	2.03 ± 0.138	2.51
15a	PY18	0.545 ± 0.028	3.52 ± 0.523	6.45
15b	---	2.65 ± 0.344	39.50 ± 4.598	14.89
paraoxon		0.0072 ± 0.0004	0.0084 ± 0.0004	1.16
bendiocarb		0.0024 ± 0.0003	0.0309 ± 0.0008	12.70
carbofuran		0.0062 ± 0.0008	0.0221 ± 0.0012	3.59

^aIC₅₀ values measured by modified Ellman's assay 15 min after introduction of inhibitor. ^bSelectivity for AgAChE1 is determined as the ratio IC₅₀ (HssAChE)/IC₅₀ (AgAChE1).

inhibitors. As shown in the Supporting Information, the HssBChE inhibition levels observed for the prepared compounds were over 60 μM (see SI Table S1). Maleimides **14a**, **14b**, and **15a** were found to be the most potent inhibitors of AgAChE1 and several-fold more potent than corresponding succinimides. For HssAChE, maleimides **14a**, **14b**, and **15b** are similar in potency to the related succinimides **10a**, **10b**, and **11b**. However, maleimide **15a** was found to be several-fold more potent than its corresponding succinimide **11a** for HssAChE. As HssAChE does not contain a free cysteine residue which could react with maleimide **15a**, the inhibitory ability of this compound was found unexpected and cannot be rationalized by interaction with Cys447.

The selectivity for AgAChE1 was rather poor, and most compounds were found to be relatively potent inhibitors of HssAChE. Only in the case of **15b** was the selectivity toward the insect enzyme found to be over 10-fold. However, the prepared compounds possess only poor inhibitory activity toward AgAChE1 compared to paraoxon or bendiocarb.

Further, time-dependent inhibition was used to determine differences between both enzymes. A rapid decrease in enzyme activity was observed within 3 min, and the activity remained almost steady for 15 min for both HssAChE and AgAChE1 (Figure 1 and 2). Surprisingly, increased potency of maleimides vs succinimides for AgAChE1 is not necessarily

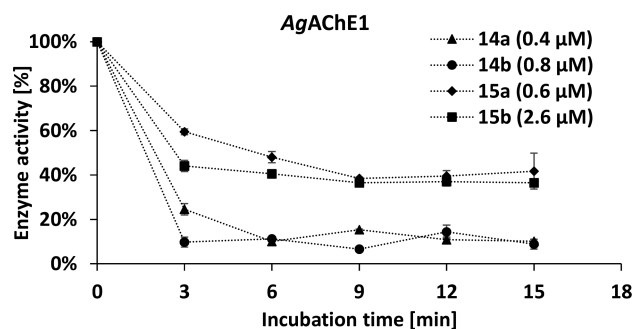


Figure 1. Time-dependent inhibition of maleimide derivatives on AgAChE1.

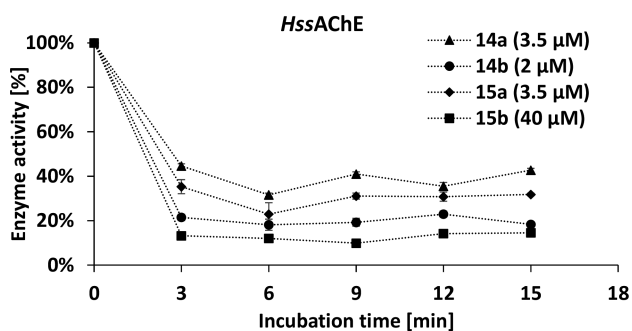


Figure 2. Time-dependent inhibition of maleimide derivatives on *HssAChE*.

evidence of covalent binding, since the same phenomenon is seen for *HssAChE*. Additionally, the rate of enzyme–inhibitor complex formation could be explained by noncovalent interaction between pyridine/piperidine parts of the tested compounds with both enzymes. Such interactions are in general very rapid, and there is probably no covalent bond formation involved in this short time period.^{22,23} The previously published time-dependency¹⁵ did not prove covalent binding of the compounds but depicted only a slower or faster rate of binding to the enzyme.

Thus, the mechanism of interaction is truly crucial for this series of compounds. We have tested the reversibility of the reaction using the removal of the selected insecticides by dialysis (Figure 3). Apparently, none of the tested compounds showed reversible action of inhibition for either *AgAChE1* or *HssAChE*. Based on the previous work,¹⁵ maleimide-harboring compounds were presumed to act as irreversible inhibitors and succinimide compounds were prepared only as the controls to prove insect-specific cysteine involvement in covalent bond formation. The presented results are showing different findings, with all succinimide- or maleimide-containing compounds found to be irreversible-acting inhibitors when incubated 30 min with enzymes and further dialyzed overnight (Figure 3). The irreversible inhibition was shown toward *HssAChE* as well, although in this enzyme the Cys is substituted by Phe (Figure 4). It should also be noted that maleimide is able to form a covalent bond with other amino acid residues (except free cysteine) as was formerly reported.²⁴ However, the most surprising fact is that all succinimides (10a/b, 11a/b) were found to be irreversible inhibitors of both enzymes with recovery less than 20%. Such findings could

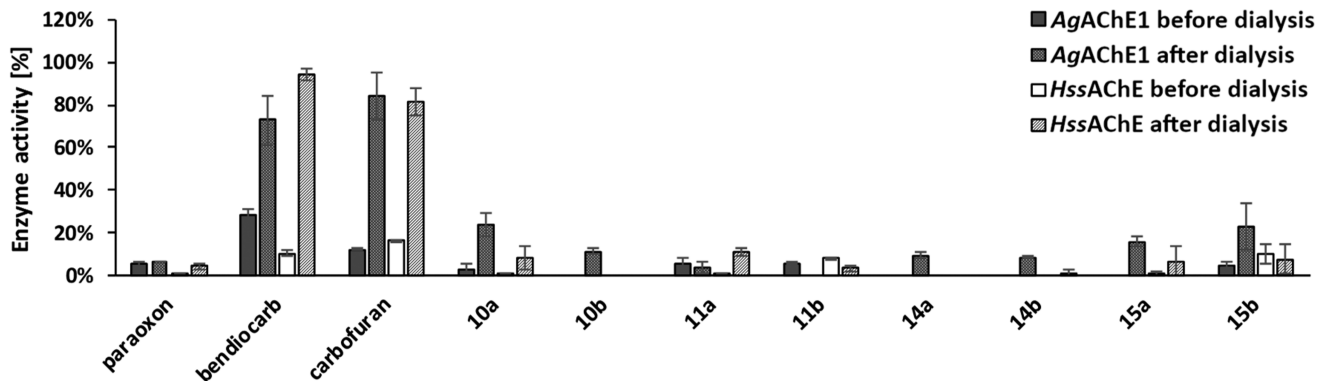


Figure 3. Reversibility of inhibition on *AgAChE1* and *HssAChE* using the dialysis method.

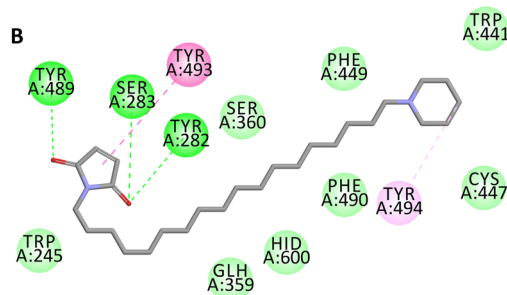
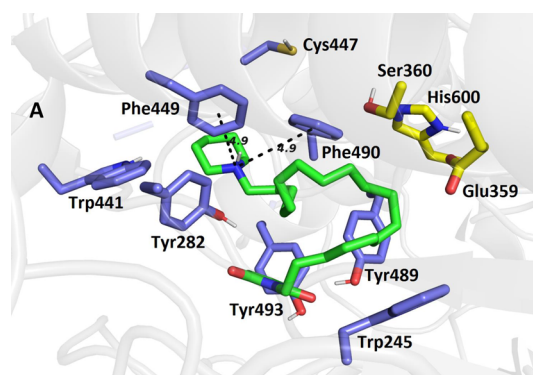


Figure 4. Superimposition of compound 15a in the *AgAChE1* active site (PDB ID: 6ARX, G119S mutation). The close-up view for ligand is presented as three-dimensional (4A; 15a is presented in green, important amino acid residues in blue, and catalytic triad residues in yellow) and two-dimensional (4B) diagrams.

be plausibly explained by, e.g., precipitation or denaturation of the enzymes by the detergent-like succinimides.

Additionally, a molecular docking study was conducted. Compound 15a was selected from all the tested compounds for its valuable and higher inhibition activity on *AgAChE1* and moderate effect on *HssAChE*/BChE. Two protein structures were used (PDB IDs: 6ARX in Figure 4 and SI Figure S3; SYDH only in SI Figure S3) to reveal and better understand the binding interactions between ligand 15a and the *AgAChE1* active site.²⁵ The top docking-scored pose of 15a was found different in each of the used proteins. For 6ARX with G119S mutation (Figure 4), ligand 15a resulted in binding of the maleimide moiety close to the catalytic triad and interaction with tyrosine residues (Tyr489 and Tyr493), with the piperidine ring attached at the rim of the gorge (Phe449, Phe 490, and Tyr494). Differently in the SYDH protein (SI Figure S3), the maleimide moiety was found interacting with

the rim of the AgAChE1 gorge (Cys447, Phe449, Tyr494), with the piperidine scaffold attached close to the active site (Trp245, Tyr291, Glu359). The literature was checked to elucidate these contradictory results for the involvement of tyrosine residues in maleimide binding, but there were no literature data supporting the hypothesis of covalent bond formation between a hydroxyl from either tyrosine or serine residues, and thus different binding of ligand **15a** in 6ARX (Figure 4). Apart from sulfhydryl cysteine residues, only primary amines can be expected to possibly conjugate with maleimide at pH values higher than 7.5; however, for **15a** this is not the case.²⁶

The contradictory finding within *in vitro* evaluation and molecular docking raised the question of binding of the presented maleimide/succinimide molecules to AgAChE1 or HssAChE. The enzymes were treated with 100 molar excess of iodoacetamide (IAA) to determine the affinity of the presented inhibitors toward Cys447. IAA is a commonly used blocking agent of free thiol groups.²⁷ Although IAA is not strictly thiol selective (as well as maleimide), the reaction should result in AgAChE1 enzyme that is resistant to irreversible inhibition by maleimide-based inhibitors. However, both enzymes treated with IAA were found irreversibly inhibited by selected compounds **11a** (succinimide scaffold) and **15b** (maleimide scaffold; Figure 5). Apparently, these results indicate that

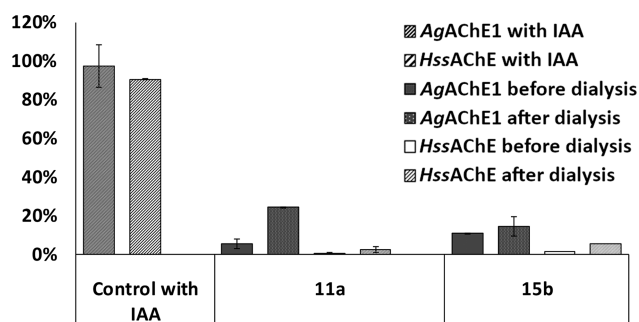


Figure 5. Reversibility of inhibition on AgAChE1 and HssAChE using dialysis method after iodoacetamide (IAA) pretreatment.

irreversible inhibition is most probably not mediated by the free cysteine residue Cys447 in AgAChE1 as was formerly

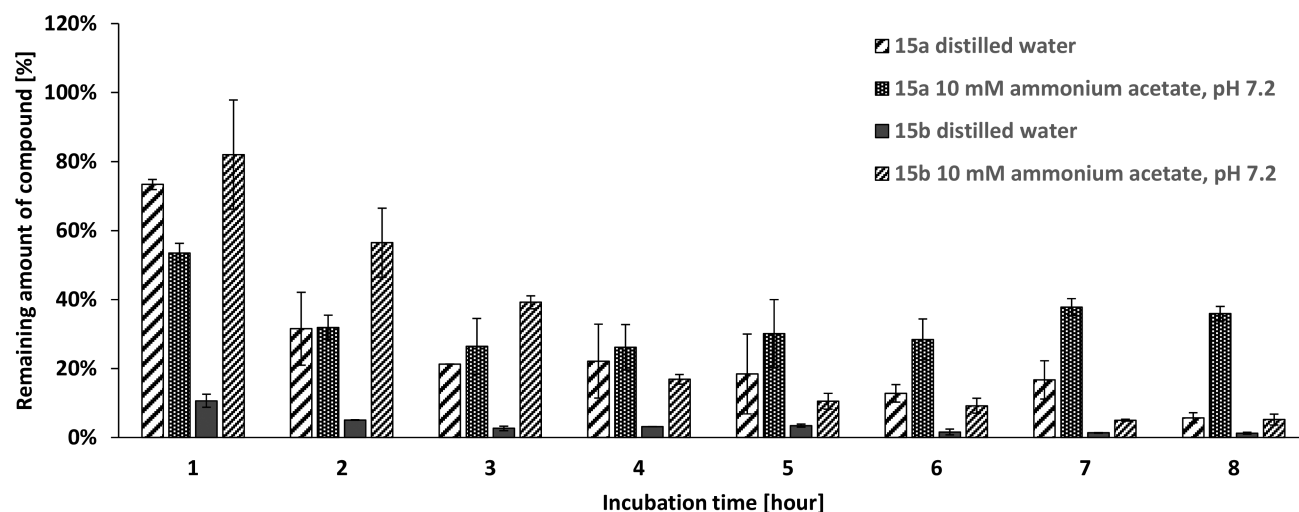


Figure 6. Stability determination of **15a** and **15b** over time in distilled water or buffer.

reported.¹⁵ The maleimide or succinimide moiety can also interact with other amino acid residues, e.g. with histidine from the catalytic triad of AgAChE1 or HssAChE, and thus may irreversibly inhibit both enzymes this way.

From the point of practical use for insecticidal purposes, stability of the most potent and most selective compounds for AgAChE1 (**15a** and **15b**) was inspected by incubation at 40 °C (Figure 6). Fast degradation of both compounds was observed in a water or buffer environment, with the water degradation found to be apparently more rapid. In particular, compound **15b** (the most selective for AgAChE1) was almost completely degraded within 1 h in water. Both compounds were more stable in ammonium acetate buffer, but a degradation ratio of over 50% was observed in 3 h.

In summary, eight compounds with a succinimide or maleimide moiety were prepared and evaluated as cysteine-targeted insecticides. Some of the compounds were shown as potent AgAChE1 inhibitors, but they were found to be potent inhibitors of HssAChE with a limited selectivity ratio as well. The time-dependent inhibition of the compounds was very fast, resulting in inhibition of both enzymes within minutes. The presented compounds acted in an irreversible manner to both AgAChE1 and HssAChE. Molecular docking on two distinct AgAChE1 proteins indicated contradictory results showing the possibility of different interactions than the proposed Cys-targeted binding. This phenomenon was further confirmed by cysteine blocking treatment of both enzymes, after which they were still found irreversibly inhibited by the tested compounds, suggesting a different mode of irreversible binding. The potential use of the tested compounds might be limited by the relatively low stability depicted within the degradation assay. Thus, our findings do not support the proposed concept of cysteine-targeted selective insecticides. We presume that this class of molecules will not be effective as insecticides due to the aforementioned findings.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmchemlett.9b00477>.

General synthetic methods; general procedure and spectral data; HPLC analysis of final compounds;

recombinant AgAChE1 production and characterization; enzymatic assays; molecular modeling studies; time-dependent stability measurement (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: korabecny.jan@gmail.com.

*E-mail: kamil.musilek@gmail.com.

ORCID

Veronika Hrabcova: 0000-0001-5371-497X

Kamil Kuca: 0000-0001-9664-1109

Jan Korabecny: 0000-0001-6977-7596

Kamil Musilek: 0000-0002-7504-4062

Author Contributions

[†]L.G., R.A., and M.S. contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic (no. NV16-34390A), University of Hradec Kralove (no. SV2115-2018, no. VT2019-2021 and postdoctoral job positions at UHK), and University of Defence (Faculty of Military Health Sciences, Long-term development plan and SV/FVZ2019/01). The authors are grateful to Ian McColl MD PhD for assistance with the manuscript.

ABBREVIATIONS

ACh acetylcholine; AChE acetylcholinesterase; ATCh acetylthiocholine iodide; AgAChE1 *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase; DIBAL-H diisobutylaluminum hydride; HssAChE human acetylcholinesterase; HssBChE human butyrylcholinesterase; IAA iodoacetamide; IC₅₀ median inhibitory concentration; MW microwave irradiation; NBS *N*-bromosuccinimide; PAS peripheral active site; TBAF tetrabutylammonium fluoride; TBDPSCl *tert*-butyl(chloro)diphenylsilane.

REFERENCES

- (1) *World Malaria Report 2016*; World Health Organization: Geneva; 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- (2) Fox, C. M.; Kim, K.-S.; Cregan, P. B.; Hill, C. B.; Hartman, G. L.; Diers, B. W. Inheritance of Soybean Aphid Resistance in 21 Soybean Plant Introductions. *Theor. Appl. Genet.* **2014**, *127* (1), 43–50.
- (3) Pang, Y. P. Insect Acetylcholinesterase as a Target for Effective and Environmentally Safe Insecticides. *Adv. Insect Physiol.* **2014**, *46*, 435–494.
- (4) Johnson, R. M. Honey Bee Toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* **2015**, *60*, 415–434.
- (5) Casida, J. E.; Durkin, K. A. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* **2013**, *58*, 99–117.
- (6) Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Malinak, D.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. SAR Study to Find Optimal Cholinesterase Reactivator against Organophosphorous Nerve Agents and Pesticides. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90* (12), 2831–2859.
- (7) Colović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (3), 315–335.
- (8) Engdahl, C.; Knutsson, S.; Ekström, F.; Linusson, A. Discovery of Selective Inhibitors Targeting Acetylcholinesterase 1 from Disease-Transmitting Mosquitoes. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9409–9421.

(9) Wong, D. M.; Li, J.; Chen, Q.-H.; Han, Q.; Mutunga, J. M.; Wysinski, A.; Anderson, T. D.; Ding, H.; Carpenetti, T. L.; Verma, A.; et al. Select Small Core Structure Carbamates Exhibit High Contact Toxicity to “Carbamate-Resistant” Strain Malaria Mosquitoes, *Anopheles gambiae* (Akron). *PLoS One* **2012**, *7* (10), No. e46712.

(10) Hartsel, J. A.; Wong, D. M.; Mutunga, J. M.; Ma, M.; Anderson, T. D.; Wysinski, A.; Islam, R.; Wong, E. A.; Paulson, S. L.; Li, J.; et al. Re-Engineering Aryl Methylcarbamates to Confer High Selectivity for Inhibition of *Anopheles gambiae* versus Human Acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (14), 4593–4598.

(11) Carlier, P. R.; Bloomquist, J. R.; Totrov, M.; Li, J. Discovery of Species-Selective and Resistance-Breaking Anticholinesterase Insecticides for the Malaria Mosquito. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24* (27), 2946–2958.

(12) Pang, Y.-P.; Brimijoin, S.; Ragsdale, D. W.; Zhu, K. Y.; Suranyi, R. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. *Curr. Drug Targets* **2012**, *13* (4), 471–482.

(13) Harel, M.; Kryger, G.; Rosenberry, T. L.; Mallender, W. D.; Lewis, T.; Fletcher, R. J.; Guss, J. M.; Silman, I.; Sussman, J. L. Three-Dimensional Structures of *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase and of Its Complexes with Two Potent Inhibitors. *Protein Sci.* **2000**, *9* (6), 1063–1072.

(14) Schmidt, M.; Hrabcova, V.; Jun, D.; Kuca, K.; Musilek, K. Vector Control and Insecticidal Resistance in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Chem. Res. Toxicol.* **2018**, *31* (7), 534–547.

(15) Dou, D.; Park, J. G.; Rana, S.; Madden, B. J.; Jiang, H.; Pang, Y.-P. Novel Selective and Irreversible Mosquito Acetylcholinesterase Inhibitors for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1068.

(16) Trzaskowski, J.; Quinzler, D.; Bährle, C.; Mecking, S. Aliphatic Long-Chain C20 Polyesters from Olefin Metathesis. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32* (17), 1352–1356.

(17) Chang, J.; Zhang, S.-J.; Jiang, Y.-W.; Xu, L.; Yu, J.-M.; Zhou, W.-J.; Sun, X. Design, Synthesis, and Antibacterial Activity of Demethylvancomycin Analogues against Drug-Resistant Bacteria. *ChemMedChem* **2013**, *8* (6), 976–984.

(18) Fujita, D.; Suzuki, K.; Sato, S.; Yagi-Utsumi, M.; Kurimoto, E.; Yamaguchi, Y.; Kato, K.; Fujita, M. Synthesis of a Bridging Ligand with a Non-Denatured Protein Pendant: Toward Protein Encapsulation in a Coordination Cage. *Chem. Lett.* **2012**, *41* (3), 313–315.

(19) Jiang, H.; Liu, S.; Zhao, P.; Pope, C. Recombinant Expression and Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Acetylcholinesterase-1 from the African Malaria Mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39* (9), 646–653.

(20) Engdahl, C.; Knutsson, S.; Fredriksson, S.-Å.; Linusson, A.; Bucht, G.; Ekström, F. Acetylcholinesterases from the Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*: Functional Characterization and Comparisons with Vertebrate Orthologues. *PLoS One* **2015**, *10* (10), No. e0138598.

(21) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-Stone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.

(22) Ramsay, R. R.; Tipton, K. F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1192.

(23) Pandolfi, F.; De Vita, D.; Bortolami, M.; Coluccia, A.; Di Santo, R.; Costi, R.; Andrisano, V.; Alabiso, F.; Bergamini, C.; Fato, R.; et al. New Pyridine Derivatives as Inhibitors of Acetylcholinesterase and Amyloid Aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *141*, 197–210.

(24) Trujillo-Ferrara, J.; Vázquez, I.; Espinosa, J.; Santillan, R.; Farfán, N.; Höpfl, H. Reversible and Irreversible Inhibitory Activity of Succinic and Maleic Acid Derivatives on Acetylcholinesterase. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18* (5), 313–322.

(25) Cheung, J.; Mahmood, A.; Kalathur, R.; Liu, L.; Carlier, P. R. Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria

Vector *Anopheles Gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Structure* **2018**, *26* (1), 130–136.e2.

(26) Nanda, J. S.; Lorsch, J. R. Labeling of a Protein with Fluorophores Using Maleimide Derivatization. *Methods Enzymol.* **2014**, *536*, 79–86.

(27) Wang, Z.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Harrington, P. B.; Chen, H. Fast and Selective Modification of Thiol Proteins/Peptides by N-(Phenylseleno)phthalimide. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (3), 520–529.

Příloha č. 2

Supporting information

Cysteine-Targeted Insecticides against *A. gambiae* Acetylcholinesterase are neither Selective nor Reversible Inhibitors

Lukas Gorecki,^{a,c‡} Rudolf Andrys,^{b‡} Monika Schmidt,^{a,b‡} Tomas Kucera,^c Miroslav Psoška,^{a,b} Barbora Svobodova,^{a,c} Veronika Hrabčová,^{a,b} Vendula Hepnarová,^{a,c} Petr Bzonek,^{b,c} Daniel Jun,^{a,c} Kamil Kuca,^b Jan Korabecny,^{a,c*} and Kamil Musilek,^{a,b,d*}

^a University Hospital Hradec Kralove, Biomedical Research Centre, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic;

^b University of Hradec Kralove, Faculty of Science, Department of Chemistry, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic;

^c University of Defence, Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic;

^d Florida International University, Herbert Wertheim College of Medicine, Department of Cellular Biology & Pharmacology, 11200 SW 8th Street GL 495-G Miami, Florida 33199, United States.

‡These authors contributed equally.

* Corresponding authors emails: kamil.musilek@gmail.com, korabecny.jan@gmail.com

Table of contents

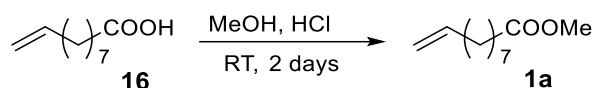
1.	General synthetic methods.....	2
2.	General procedure and spectral data.....	2
2.1	Synthesis of compounds 5, 6a, 6b	2
2.2	Synthesis of compounds containing succinimide moiety 10a/b and 11a/b	5
2.3	Synthesis of compounds bearing maleimide moiety 14a/b and 15a/b.....	8
2.4	Unsuccessful synthetic routes.....	13
2.5	¹ H and ¹³ C NMR Spectra.....	17
3.	HPLC analysis of final compounds	33
5.	Recombinant AgAChE1 production and characterisation	41
5.1	Cloning and expression of recombinant AgAChE1	41
5.2	Protein purification	42
6.	Enzymatic assays	43
6.1	Maximum velocity and Michaelis constant determination.....	43
6.2	Cholinesterase enzymatic assays	43
6.3	Time-dependent enzyme inhibition progress.....	44
6.4	Reversibility of inhibition.....	45
6.5	Reversibility of inhibition after iodoacetamide pretreatment	45
7.	Molecular modelling studies.....	46
8.	Time-dependent stability measurement of 15a and 15b.....	47
9.	References.....	47

1. General synthetic methods

The column chromatography was performed using silica gel 100 at atmospheric pressure (70 – 230 mesh ASTM, Merck, Prague Czech Republic). The analytical thin-layer chromatography was carried out using plates coated with silica gel 60 with a fluorescent indicator F254 (Merck, Prague Czech Republic). Thin-layer chromatography plates were visualized by exposure to ultraviolet light (254 nm) or by detection reagents phosphomolybdic acid (PMA) and *p*-anisaldehyde (Pernod reagent). NMR spectra were all recorded on a Varian S500 spectrometer (500 MHz for ^1H and 126 MHz for ^{13}C). Chemical shifts are reported in δ ppm referenced to an internal SiMe_4 standard for ^1H NMR and chloroform-*d* ($\text{CHCl}_3\text{-}d_1$; 7.26 (D); 77.16 (C) ppm), CD_3OD ($\text{CH}_3\text{OH-}d_4$; 3.35, 4.78 (D), 49.3 (C) ppm), or hexadeuteriodimethylsulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$; 2.50 (D), 39.7 (C) ppm). Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC and were used without additional purification. CEM Explorer SP 12 S Class was used for microwave irradiation. Human recombinant AChE (*HssAChE*, EC 3.1.1.7), human recombinant BChE (*HssBChE*, EC 3.1.1.8), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent, DTNB), acetylthiocholine iodide (ATCh), and butyrylthiocholine iodide (BTCh) were purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic. The final compounds were analyzed by LC-MS consisting of UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS coupled with Q Exactive Plus Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) to obtain high-resolution mass spectra. Gradient LC analysis confirmed > 95% purity.

2. General procedure and spectral data

2.1 Synthesis of compounds 5, 6a, 6b



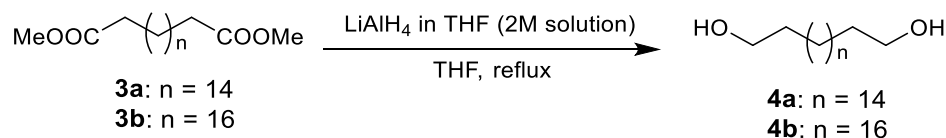
Methyl 9-decenoate (1a): 9-Decenoic acid (**16**) (20 ml, 102.45 mmol) and methanol (MeOH, 150 mL) were charged into the dried round-bottom flask filled with inert atmosphere (argon; Ar). HCl (sat. aq. solution, 40 mL) was added dropwise at room temperature and the final mixture was stirred for 2 days. After 2 days reaction mixture was neutralized with 10 % NaOH (300 mL) and extracted with dichloromethane (DCM; 2 × 500 mL). The organic layers were collected, dried with anhydrous Na_2SO_4 and filtered-off. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **1a** (18.90 g) with quantitative yield as an orange oil. The structure of **1a** was identified by NMR analysis and it was directly transferred into the next reaction.

The compounds **2a** or **2b** (913 mg, 2.68 mmol for **2a** and 822 mg, 2.23 mmol for **2b**) were dissolved in solution of MeOH:EA (20:40 mL) in the round flask filled with Ar. Pd(OH)₂ on C (20 %) (0.2 eq) was added slowly in small portions at room temperature. The atmosphere in the flask was five times removed with oil vacuum pump at values around 1 mBar. Same procedure followed with H₂ atmosphere (three times atmosphere exchange). Finally, the mixture was stirred for 1 hour under H₂ atmosphere. The mixture was then filtered through a celite pad and the filter cake was washed three times with MeOH and EA. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford title intermediates **3a** (882 mg, 96 % yield) and **3b** (846 mg, 98 % yield), respectively. **3a** and **3b** were obtained as white solids.

1,18-dimethyl octadecanedioate (3a) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.67 (s, 6H), 2.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.66 – 1.57 (m, 4H), 1.35 – 1.21 (m, 24H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 174.30, 51.39, 34.09, 29.63, 29.61, 29.56, 29.42, 29.23, 29.13, 24.94.

1,20-dimethyl icosanedioate (3b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.67 (s, 6H), 2.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 5H), 1.68 – 1.57 (m, 4H), 1.26 (s, 28H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 174.31, 51.40, 34.09, 29.64, 29.61, 29.56, 29.42, 29.23, 29.13, 24.94.

General procedure for reduction using LiAlH₄ in THF:

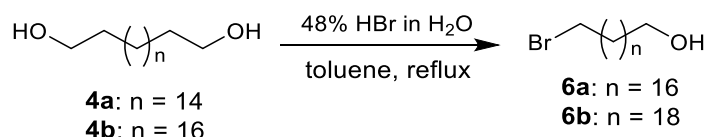


The compounds **3a** or **3b** (712 mg, 2.08 mmol for **3a** and 629 mg, 1.7 mmol for **3b**) were charged into an oven-dried flask following addition of anhydrous THF (34 mL) under the inert atmosphere (Ar). 2 M solution of LiAlH₄ in THF (2.5 eq) was added dropwise into vigorously stirred reaction mixture continuously within 1 hour and final reaction mixture was heated to reflux for 30 minutes. The reaction was quenched by addition of 2M solution of NaOH (8.5 mL) and mixture was extracted with DCM 3× 100 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford title product **4a** (597 mg) and **4b** (534 mg) with quantitative yields as white solids. No additional purification was needed.

Octadecane-1,18-diol (4a) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.69 – 3.61 (m, 4H), 1.63 – 1.53 (m, 4H), 1.41 – 1.20 (m, 28H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 63.09, 32.80, 29.63, 29.59, 29.57, 29.41, 25.72.

Icosane-1,20-diol (4b) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 3.65 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 1.62 – 1.54 (m, 4H), 1.41 – 1.23 (m, 32H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 63.10, 32.81, 29.66, 29.64, 29.60, 29.58, 29.43, 25.73.

General procedure for selective mono-bromination:



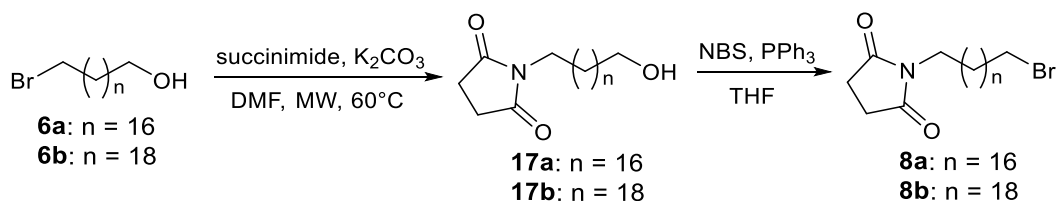
The compounds **4a** or **4b** (705 g, 3.49 mmol for **4a** and 609 mg, 1.94 mmol for **4b**) were stirred in toluene (50 mL) under inert atmosphere. Solution of 48 % HBr in H_2O (4.0 eq) was added dropwise and the reaction mixture was heated at 120 °C for 48 hours. The reaction was finished by portionwise addition of saturated Na_2CO_3 (10 mL), then diluted by water (60 mL) and extracted with DCM 2 × 120 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na_2SO_4 and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified with column chromatography (H/EA = 9:1) to afford **6a** (524 mg, 61 % yield) and **6b** (440 mg, 60 % yield), respectively. **6a** and **6b** were obtained as light orange solids.

18-bromooctadecan-1-ol (6a) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 3.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.41 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.92 – 1.81 (m, 2H), 1.63 – 1.53 (m, 2H), 1.46 – 1.39 (m, 2H), 1.39 – 1.22 (m, 26H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 63.08, 34.04, 32.83, 32.80, 29.65, 29.63, 29.59, 29.58, 29.52, 29.42, 28.75, 28.16, 25.72.

20-bromoicosan-1-ol (6b) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_1) δ 3.65 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.92 – 1.81 (m, 2H), 1.62 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.19 (m, 30H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 63.09, 34.04, 32.83, 32.80, 29.66, 29.64, 29.60, 29.58, 29.52, 29.42, 28.75, 28.16, 25.72.

2.2 Synthesis of compounds containing succinimide moiety 10a/b and 11a/b

General procedure for the synthesis of compounds 8a and 8b:

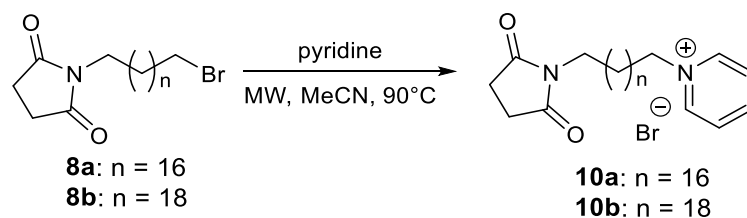


The compounds **6a** or **6b** (671 mg, 1.92 mmol for **6a** and 286 mg, 0.758 mmol for **6b**), succinimide (1.2 eq) and dried K₂CO₃ (1.2 eq) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL). The reaction mixture was stirred at 60 °C for 12 hours following extraction with brine (200 mL) and DCM 2 × 200 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and directly used into the next reaction. Then, **17a** or **17b** were initially dissolved in anhydrous THF (40 mL) under the inert atmosphere (Ar). NBS (1.5 eq) and PPh₃ (1.5 eq) were added consequently at room temperature. The final reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was diluted with water (50 mL) and extracted with DCM 2 × 175 mL. The organic layers were collected, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified with column chromatography (PE/EA = 3:1) to afford **8a** (702 mg, 85 % yield after two steps from **6a**), **8b** (286 mg, 82 % yield after two steps from **6b**), respectively, as white solids.

1-(18-bromooctadecyl)pyrrolidine-2,5-dione (8a) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.52 – 3.47 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.70 (s, 4H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.59 – 1.53 (m, 2H), 1.46 – 1.39 (m, 2H), 1.34 – 1.22 (m, 26H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 177.22, 38.89, 34.04, 32.82, 29.64, 29.62, 29.58, 29.52, 29.45, 29.41, 29.13, 28.74, 28.16, 28.13, 27.69, 26.84.

1-(20-bromoicosyl)pyrrolidine-2,5-dione (8b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.70 (s, 4H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.59 – 1.52 (m, 2H), 1.48 – 1.39 (m, 2H), 1.36 – 1.17 (m, 30H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 177.23, 38.90, 34.03, 32.83, 29.65, 29.60, 29.52, 29.45, 29.41, 29.14, 28.75, 28.16, 28.14, 27.70, 26.85.

General procedure for the synthesis of pyridin-1-ium bromides **10a** and **10b**:



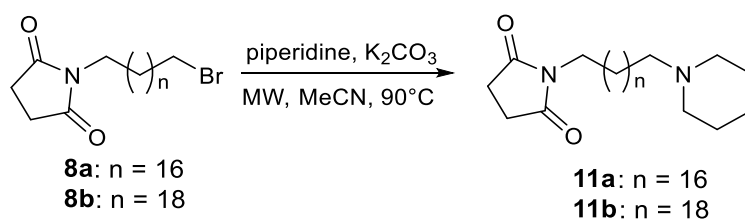
Starting material, **8a** or **8b** (150 mg, 0.348 mmol for **8a** and 136 mg, 0.297 mmol for **8b**), and pyridine (2.0 eq) were added into the microwave-sealed tube and dissolved with anhydrous MeCN (2 mL). The reaction mixture was charged into microwave reactor with following settings: dynamic curve, power max cap 100 W, pressure max cap 300 PSI, 90 °C, for 24 hours. The mixture was directly

purified by column chromatography (DCM/MeOH = 9:1) to afford **10a** (152 mg, 86 % yield), and **10b** (143 mg, 90 % yield), respectively. Both products were isolated as white solids.

1-(18-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)octadecyl)-pyridin-1-ium bromide (10a) ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 9.08 – 9.02 (m, 2H), 8.65 – 8.59 (m, 1H), 8.18 – 8.10 (m, 2H), 4.70 – 4.65 (m, 2H), 3.51 – 3.43 (m, 2H), 2.69 (s, 4H), 2.11 – 1.96 (m, 2H), 1.62 – 1.51 (m, 2H), 1.44 – 1.23 (m, 28H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 178.63, 145.47, 144.56, 128.13, 61.74, 38.18, 31.10, 29.33, 29.32, 29.30, 29.28, 29.25, 29.20, 29.17, 29.08, 28.84, 28.70, 27.68, 27.22, 26.47, 25.78. HRMS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_2^+$ (m/z): 429.3476; detected: 429.3466. LC-MS purity > 95 %.

1-(20-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)icosyl)-pyridin-1-ium bromide (10b) ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 9.13 – 8.97 (m, 2H), 8.70 – 8.57 (m, 1H), 8.23 – 8.09 (m, 2H), 4.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.46 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.70 (s, 4H), 2.06 (qd, $J = 9.0, 8.3, 5.3$ Hz, 2H), 1.62 – 1.47 (m, 2H), 1.47 – 1.15 (m, 32H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 179.92, 146.81, 145.93, 129.48, 63.07, 39.55, 32.50, 30.73, 30.70, 30.68, 30.64, 30.59, 30.56, 30.47, 30.23, 30.09, 29.08, 28.61, 27.87, 27.15. HRMS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_2^+$ (m/z): 457.3789; detected: 457.3792. LC-MS purity > 95 %.

General procedure for synthesis of compounds **11a** and **11b**:



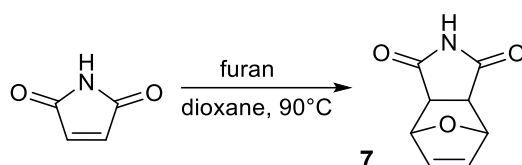
Compounds **8a** or **8b** (143 mg, 0.332 mmol for **8a** and 131 mg, 0.2857 mmol for **8b**), anhydrous K_2CO_3 (3.0 eq) and piperidine (2.0 eq) were charged into the microwave-sealed tube and dissolved in anhydrous MeCN (2 mL). The reaction mixture was charged into microwave reactor with following settings: dynamic curve, power max cap 100 W, pressure max cap 300 PSI, at 90 °C for 30 min. The mixture was directly purified using column chromatography (DCM/MeOH = 9:1) to afford **11a** (141 mg, 98 % yield), and **11b** (129 mg, 98 % yield), respectively, as white solids.

1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)pyrrolidine-2,5-dione (11a) ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 3.49 – 3.43 (m, 2H), 3.30 – 3.07 (m, 4H), 3.07 – 3.01 (m, 2H), 2.69 (s, 4H), 1.91 – 1.81 (m, 4H), 1.78 – 1.71 (m, 2H), 1.70 – 1.63 (m, 2H), 1.55 (p, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.47 – 1.36 (m, 4H), 1.30 (d, $J = 4.2$ Hz, 24H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 180.01, 58.43, 54.31, 39.57, 30.74, 30.71, 30.65, 30.62, 30.57, 30.50, 30.24, 30.21,

29.06, 28.62, 27.87, 27.73, 25.17, 24.38, 22.83. HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: calculated for C₂₇H₅₁N₂O₂⁺ (m/z): 435.3945; detected: 435.3935. LC-MS purity > 95 %.

1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)pyrroline-2,5-dione (11b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.55 – 3.44 (m, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.58 – 2.43 (m, 4H), 2.43 – 2.34 (m, 2H), 1.74 – 1.64 (m, 4H), 1.61 – 1.51 (m, 4H), 1.52 – 1.44 (m, 2H), 1.38 – 1.19 (m, 32H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 177.21, 57.80, 53.25, 38.86, 29.62, 29.60, 29.56, 29.52, 29.50, 29.43, 29.42, 29.35, 29.10, 29.04, 28.11, 27.66, 26.96, 26.82, 23.86, 22.92, 22.42. HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: calculated for C₂₉H₅₅N₂O₂⁺ (m/z): 463.4258; detected: 463.4260. LC-MS purity > 96 %.

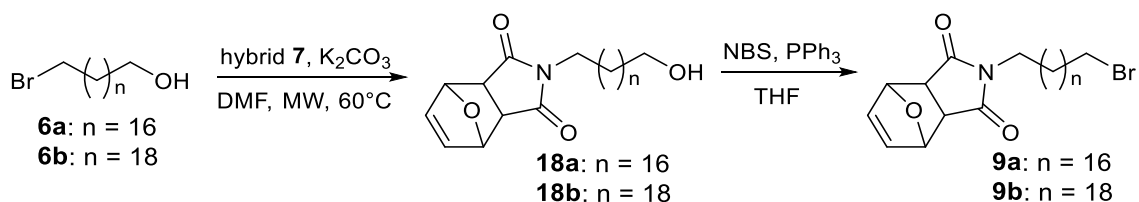
2.3 Synthesis of compounds bearing maleimide moiety 14a/b and 15a/b



10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione (7): Into an oven-dried flask maleimide (5.0 g, 51.51 mmol) was dissolved in anhydrous dioxane (76 mL) under the inert atmosphere (Ar). Furan (12 mL, 154.53 mmol) was added and the mixture was stirred and heated at 90 °C overnight. The reaction was diluted with water (250 mL) and extracted with EA 2 x 600 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **7** (7.66 g, 90 % yield) as a white solid.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.13 (s, 1H), 6.52 (t, *J* = 1.0 Hz, 2H), 5.10 (t, *J* = 1.0 Hz, 2H), 3.32 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 178.29, 136.92, 80.77, 48.89.

General procedure for synthesis 9a and 9b:



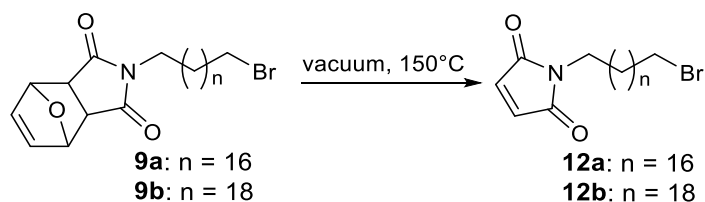
The compounds **6a** or **6b** (296 mg, 0.847 mmol for **6a** and 180 mg, 0.4769 mmol for **6b**), **7** (1.2 eq) and anhydrous K₂CO₃ (1.2 eq) were dissolved in dry DMF (4 mL). The mixture was stirred at 60 °C

for 12 hours. The resulting mixture was extracted with brine (200 mL) and DCM 2 × 200 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and directly used without further purification into the next reaction. **18a** or **18b** were then dissolved in anhydrous THF (40 mL) under the inert atmosphere (Ar). NBS (1.5 eq) and PPh₃ (1.5 eq) were added subsequently under room temperature conditions with stirring for 30 min. The reaction mixtures were diluted with water (50 mL) and extracted with DCM 2 × 175 mL. The organic layers were collected, dried with anhydrous Na₂SO₄ and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified with column chromatography to afford **9a** (H/EA = 4:1, 320 mg, 76 % yield after two steps from **6a**), and **9b** (PE/EA = 5:1, 177 mg, 71 % yield after two steps from **6b**) as white solids.

4-(18-bromooctadecyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0*2,6*]-dec-8-ene-3,5-dione (9a) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 6.51 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.48 – 3.44 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.83 (s, 2H), 1.91 – 1.81 (m, 2H), 1.59 – 1.50 (m, 2H), 1.46 – 1.38 (m, 2H), 1.36 – 1.19 (m, 26H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.24, 136.51, 80.88, 47.36, 39.02, 34.04, 32.83, 29.67, 29.64, 29.63, 29.59, 29.52, 29.44, 29.42, 29.10, 28.75, 28.17, 27.58, 26.67.

4-(20-bromoicosyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0*2,6*]dec-8-ene-3,5-dione (9b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 6.51 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.50 – 3.44 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.83 (s, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H), 1.35 – 1.20 (m, 30H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.26, 136.52, 80.89, 47.38, 39.04, 34.04, 32.85, 29.67, 29.65, 29.61, 29.54, 29.45, 29.43, 29.11, 28.76, 28.18, 27.59, 26.68.

General procedure for retro Diels-Alder reaction leading to **12a** and **12b**:

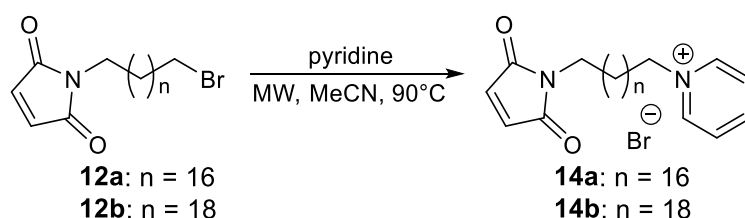


9a or **9b** (296 mg, 0.596 mmol for **9a** and 422 mg, 0.804 mmol for **9b**) were put into dried flask with reduced pressure (1 mBar). The flask was heated at 130 °C for 60 min. The product was purified by column chromatography (PE/EA = 7:1) to afford **12a** (216 mg, 85 % yield), or **12b** (208 mg, 57 % yield), respectively, as white solids.

1-(18-bromooctadecyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (12a) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 6.69 (s, 2H), 3.54 – 3.49 (m, 2H), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 1.50 – 1.38 (m, 2H), 1.38 – 1.16 (m, 26H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.86, 133.99, 37.93, 34.04, 32.83, 29.64, 29.62, 29.59, 29.52, 29.46, 29.42, 29.11, 28.75, 28.52, 28.16, 26.73.

1-(20-bromoicosyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (12b) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 6.69 (s, 2H), 3.55 – 3.48 (m, 2H), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.94 – 1.81 (m, 2H), 1.68 – 1.53 (m, 2H), 1.48 – 1.39 (m, 2H), 1.36 – 1.20 (m, 30H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 170.88, 134.01, 37.95, 34.06, 32.85, 29.68, 29.65, 29.62, 29.54, 29.48, 29.44, 29.13, 28.77, 28.54, 28.18, 26.75.

General procedure for synthesis pyridin-1-ium bromides **14a** and **14b**:



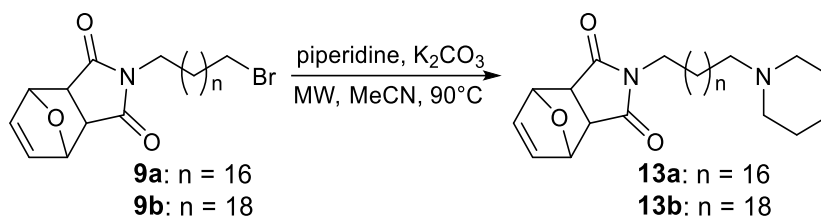
12a or **12b** (204 mg, 0.476 mmol of **12a** and 92 mg, 0.2015 mmol of **12b**) and pyridine (2.0 eq) were dissolved in MeCN (2 mL) and added into the microwave-sealed tube followed by microwave-heated conditions as follows: dynamic curve, power max cap 100 W, pressure max cap 300 PSI, at 90 °C for 24 hours. The mixture was directly purified via column chromatography (DCM/MeOH = 9:1) to afford **14a** (168 mg, 69 %), and **14b** (63 mg, 58 % yield), respectively, as white solids.

1-(18-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)octadecyl)pyridin-1-ium bromide (14a) ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 9.06 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 8.62 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 6.81 (s, 2H), 4.71 – 4.64 (m, 2H), 3.48 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.10 – 1.98 (m, 2H), 1.62 – 1.52 (m, 2H), 1.45 – 1.37 (m, 4H), 1.36 – 1.20 (m, 24H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 172.57, 146.83, 145.94, 135.33, 129.50, 63.11, 38.53, 32.50, 30.71, 30.67, 30.60, 30.59, 30.55, 30.46, 30.15, 30.09, 29.46, 27.74, 27.16. HRMS (ESI $^+$): $[\text{M}]^+$: calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_2^+$ (m/z): 427.3319; detected: 427.3310. LC-MS purity > 95 %.

1-(20-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)icosyl)pyridin-1-ium bromide (14b) ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ 9.07 – 9.01 (m, 2H), 8.70 – 8.53 (m, 1H), 8.17 – 8.10 (m, 2H), 6.81 (s, 2H), 4.72 – 4.60 (m, 2H), 3.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.11 – 1.98 (m, 2H), 1.66 – 1.51 (m, 2H), 1.43 – 1.22 (m, 32H). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 172.56, 146.84, 145.93, 135.32, 129.50, 63.12, 38.53, 32.50, 30.73, 30.69, 30.62, 30.60,

30.57, 30.48, 30.17, 30.10, 29.48, 27.76, 27.18. HRMS (ESI⁺): [M]⁺: calculated for C₂₉H₄₇N₂O₂⁺ (m/z): 455.3632; detected: 455.3636. LC-MS purity > 95 %.

General procedure for synthesis **13a** and **13b**:

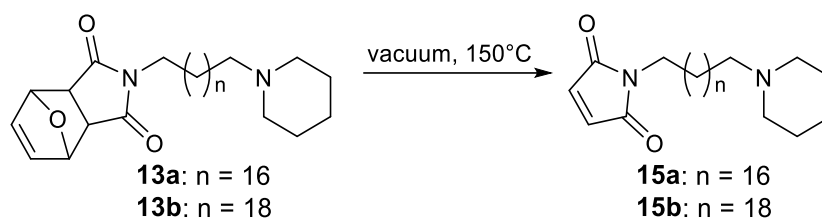


9a or **9b** (207 mg, 0.417 mmol for **9a** and 199 mg, 0.380 mmol for **9b**), K₂CO₃ (3 eq) and piperidine (2 eq) were dissolved in MeCN (2 mL) and added into the microwave-sealed tube followed by microwave-heated conditions as follows: dynamic curve, power max cap 100 W, pressure max cap 300 PSI, at 90 °C for 30 min. The mixture was directly purified by column chromatography to afford **13a** (DCM/MeOH = 9:1, 209 mg, quantitative yield) and **13b** (DCM/MeOH = 20:1, 111 mg, 56 % yield), respectively, as white solids.

4-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0*2,6*]dec-8-ene-3,5-dione (13a): The crude compound was directly used for the next reaction.

4-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0*2,6*]dec-8-ene-3,5-dione (13b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 6.51 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 5.26 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 3.52 – 3.41 (m, 2H), 2.83 (s, 2H), 2.75 – 2.60 (m, 2H), 2.59 – 2.49 (m, 2H), 1.86 – 1.72 (m, 4H), 1.70 – 1.60 (m, 2H), 1.59 – 1.49 (m, 4H), 1.36 – 1.17 (m, 34H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.27, 136.53, 80.89, 58.71, 53.92, 47.38, 39.03, 29.68, 29.66, 29.62, 29.55, 29.49, 29.46, 29.34, 29.12, 27.59, 27.38, 26.68, 25.35, 24.41, 23.46.

General procedure for retro Diels-Alder reaction yielding to 15a and 15b:

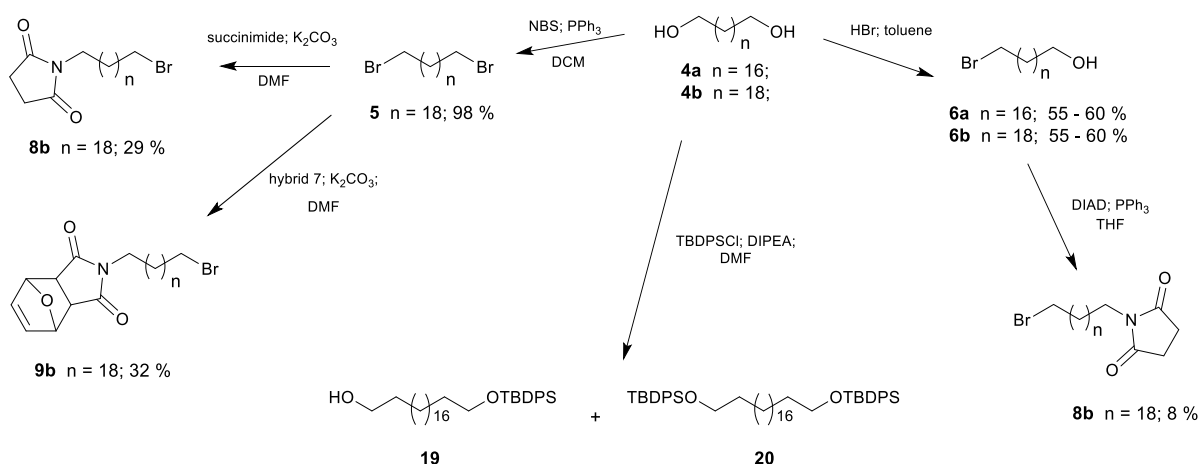


13a or **13b** (209 mg, 0.417 mmol for **13a** and 94 mg, 0.178 mmol for **13b**) were charged into the dried flask. The flask was heated at 130 °C under the reduced pressure (1 mBar) for 60 min. **15a** (139 mg, 77 % yield) was prepared without any further purification. **15b** (50 mg, 61 % yield) had to be purified by column chromatography (PE/EA = 7:1). Both products **15a** and **15b** were isolated as white solids.

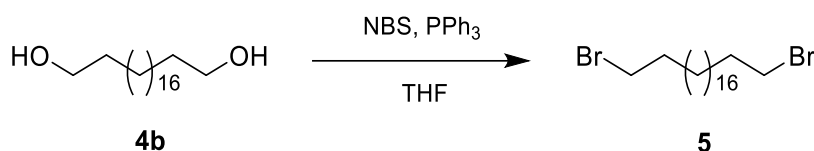
1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15a) ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 6.81 (s, 2H), 3.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.26 – 3.11 (m, 4H), 3.06 – 2.99 (m, 2H), 1.89 – 1.82 (m, 4H), 1.78 – 1.70 (m, 2H), 1.70 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.50 (m, 2H), 1.42 – 1.35 (m, 4H), 1.35 – 1.23 (m, 24H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 172.55, 135.33, 58.48, 54.32, 49.51, 49.34, 49.17, 49.00, 48.83, 48.68, 48.66, 48.49, 38.53, 30.74, 30.71, 30.63, 30.58, 30.51, 30.22, 30.17, 29.48, 27.76, 25.21, 24.42, 22.90. HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: calculated for C₂₇H₄₉N₂O₂⁺ (m/z): 433.3789; detected: 433.3777. LC-MS purity > 95 %.

1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15b) ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 6.81 (s, 2H), 3.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.25 – 3.08 (m, 4H), 3.07 – 2.96 (m, 2H), 1.92 – 1.81 (m, 4H), 1.79 – 1.69 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 2H), 1.62 – 1.52 (m, 2H), 1.44 – 1.21 (m, 32H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 172.48, 135.32, 58.49, 54.30, 38.53, 30.77, 30.74, 30.65, 30.60, 30.54, 30.24, 30.20, 29.51, 27.81, 27.78, 25.23, 24.43, 22.95. HRMS (ESI⁺): [M+H]⁺: calculated for C₂₉H₅₃N₂O₂⁺ (m/z): 461.4102; detected: 461.4106. LC-MS purity > 95 %.

2.4 Unsuccessful synthetic routes



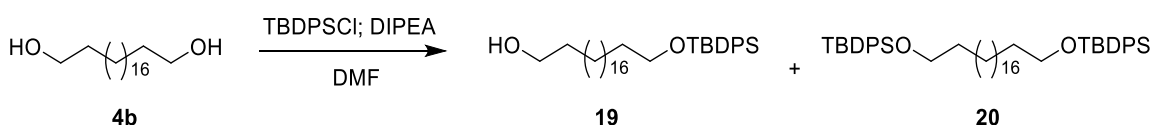
General procedure of bis-bromination:



1,20-dibromoicosane (5): The compound **4b** (534 mg 1.7 mmol) was charged into the oven-dried flask and dissolved in anhydrous THF (20 ml). NBS (1.21 g, 6.8 mmol) and PPh_3 (1.784 g, 6.8 mmol) were added consequently. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was diluted with water (50 mL) and extracted with DCM 3×30 mL. The organic layers were combined, dried with anhydrous Na_2SO_4 and filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified via column chromatography (PE/EA = 299:1) to afford **5** (735 mg, 98 % yield) as a white solid.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) δ 3.42 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 1.86 (dt, $J = 14.8, 6.9$ Hz, 4H), 1.48 – 1.37 (m, 4H), 1.27 (s, 28H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 34.04, 32.85, 29.67, 29.65, 29.61, 29.54, 29.44, 28.77, 28.18.

General procedure of silylation:



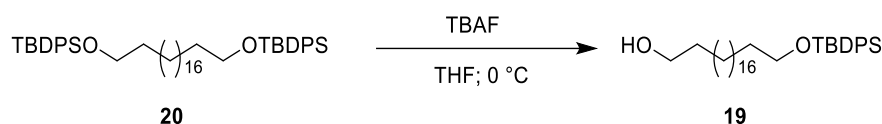
The icosane-1,20-diol **4b** (378 mg; 1.2 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (4 mL) under Ar atmosphere. *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA; 2.1 mL; 12.0 mmol) was slowly added and the mixture was stirred for 15 min. Finally, *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (TBDPSCI; 330 μL ; 1.26 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at RT for 2 hours. The resulting mixture was

diluted with H₂O and DCM and extracted with DCM (2 × 50 mL). The organic layers were collected and washed with 1M HCl; then with saturated NaHCO₃ and with brine. The resulting organic phase was dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using mobile phase PE/EA (8:1) to obtain **19**, **20** as white solids (**19**: 299 mg, 45 % yield; **20**: 216 mg, 23 %) and starting material turnover (**4b**, 165 mg, 25 %)

20-[(tert-butyldiphenylsilyl)oxy]icosan-1-ol (19) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.78 – 7.24 (m, 10H), 3.73 – 3.60 (m, 4H), 1.64 – 1.52 (m, 4H), 1.43 – 1.23 (m, 32H), 1.07 (s, 9H).

2,2,27,27-tetramethyl-3,3,26,26-tetraphenyl-4,25-dioxa-3,26-disilaoctacosane (20) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.90 – 7.19 (m, 20H), 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 1.66 – 1.51 (m, 4H), 1.41 – 1.20 (m, 32H), 1.07 (s, 18H).

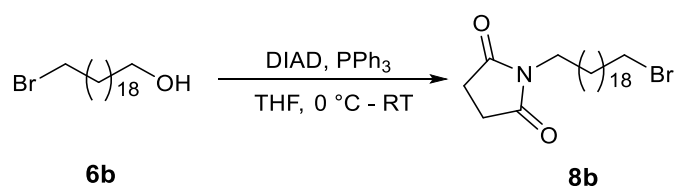
The general procedure of monosilyl-deprotection of compound **20**:



Under Ar atmosphere, **20** (168 mg; 0.2123 mmol) was dissolved in anhydrous THF (5 mL) and cooled to 0 °C. Tetrabutylammonium fluoride (TBAF; 223 μL, 0.223 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 hour at room temperature. The resulting reaction mixture was diluted with DCM and H₂O and extracted with DCM (3 × 30 mL). The organic layers were combined, dried with anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using mobile phase PE/EA (8:1) to give crude product **19** (92 mg, 78 % yield) as white solid.

20-[(tert-butyldiphenylsilyl)oxy]icosan-1-ol (19) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.78 – 7.24 (m, 10H), 3.73 – 3.60 (m, 4H), 1.64 – 1.52 (m, 4H), 1.43 – 1.23 (m, 32H), 1.07 (s, 9H).

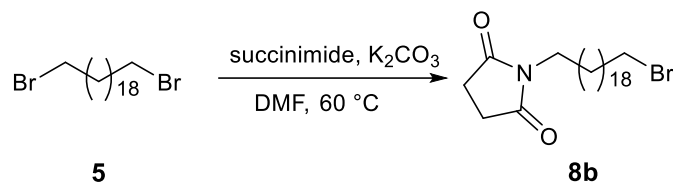
The general procedure of Mitsunobu reaction



The compound **6b** (170 mg, 0.3074 mmol), succinimide (40 mg, 0.40 mmol) and PPh₃ was dissolved in anhydrous THF and cooled to 0 °C under Ar atmosphere. Diisopropyl azodicarboxylate (DIAD; 79 μL, 0.40 mmol) was dropwise added and the mixture was stirred at RT for 20 hours. The resulting mixture was diluted with H₂O and extracted with DCM (3x 30 mL). The organics were collected, dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified using column chromatography with mobile phase PE/EA (3:1) to give **8b** (11 mg, 8 % yield).

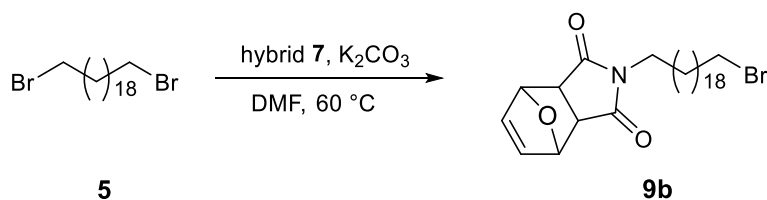
1-(20-bromoicosyl)pyrrolidine-2,5-dione (8b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.52 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.43 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.72 (s, 4H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.61 – 1.54 (m, 2H), 1.50 – 1.41 (m, 2H), 1.37 – 1.19 (m, 30H).

General procedure of reactions from 1,20-dibromoicosane (5)



1,20-Dibromoicosane **5** (498 mg; 1.13 mmol), succinimide (124 mg; 1.244 mmol) and anhydrous K₂CO₃ (172 mg; 1.244 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (4 mL) under Ar atmosphere. The mixture was heated to 60 °C for 3 hours. The resulting mixture was diluted with ammonium chloride saturated solution (50 mL) and extracted with DCM (3 × 50 mL). The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using mobile phase PE/EA (4:1) to give **8b** (150 mg, 29 % yield).

1-(20-bromoicosyl)pyrrolidine-2,5-dione (8b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 3.52 – 3.47 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 20.2 Hz, 4H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 1.47 – 1.38 (m, 2H), 1.35 – 1.20 (m, 30H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 177.22, 38.89, 34.03, 32.82, 29.65, 29.63, 29.59, 29.53, 29.51, 29.45, 29.41, 29.13, 28.74, 28.15, 28.13, 27.69, 26.84.



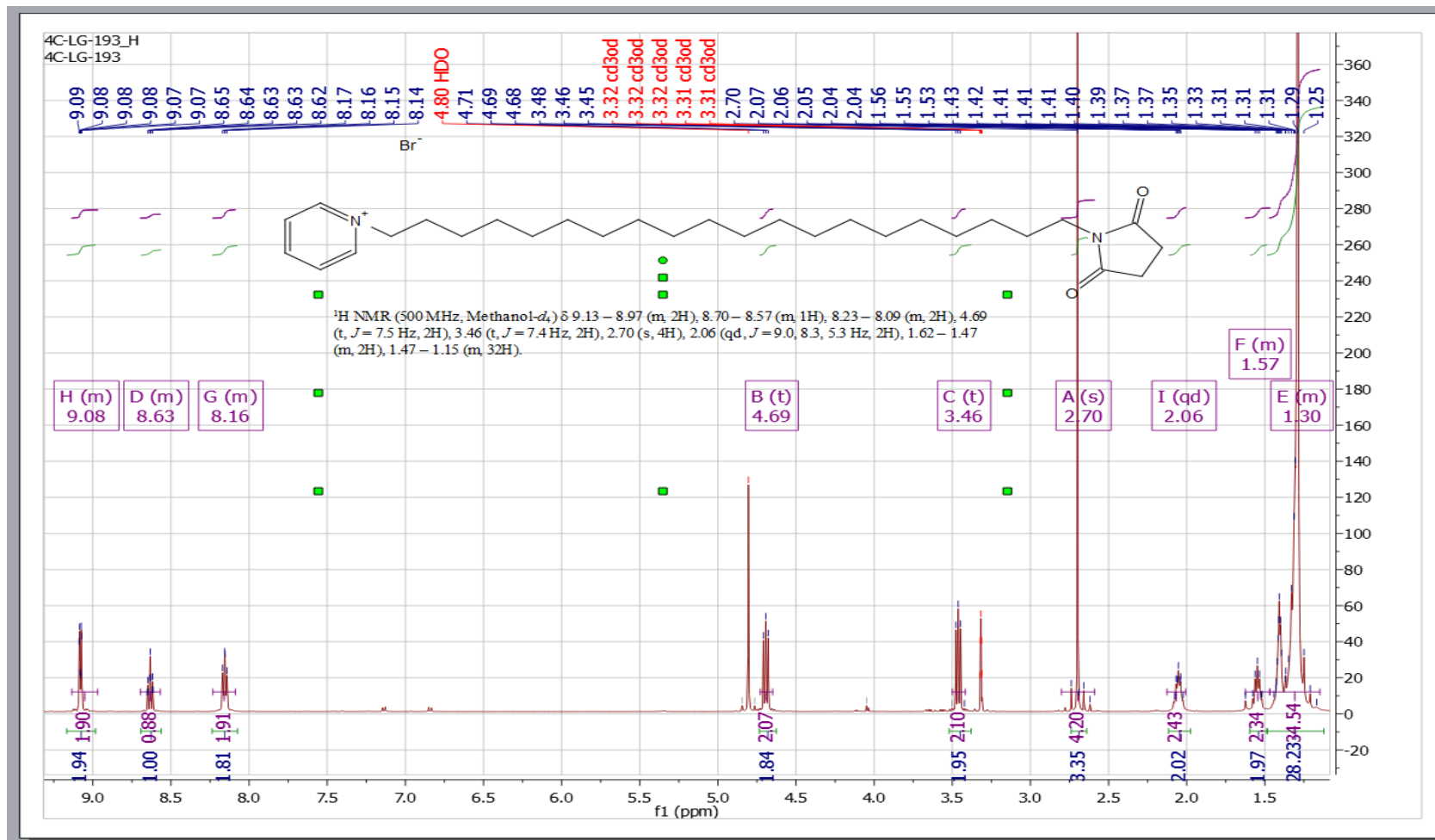
1,20-Dibromoicosane **5** (209 mg; 0.4746 mmol), **7** (118 mg; 0.712 mmol) and K₂CO₃ (98 mg; 0.712 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL) under Ar atmosphere. The mixture was heated

to 60 °C for 3 hours. The resulting mixture was diluted with ammonium chloride saturated solution (50 mL) and extracted with DCM (3 × 50 mL). The organic layers were combined, dried with anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using mobile phase PE/EA (5:1) to give **8b** (80 mg, 32 % yield).

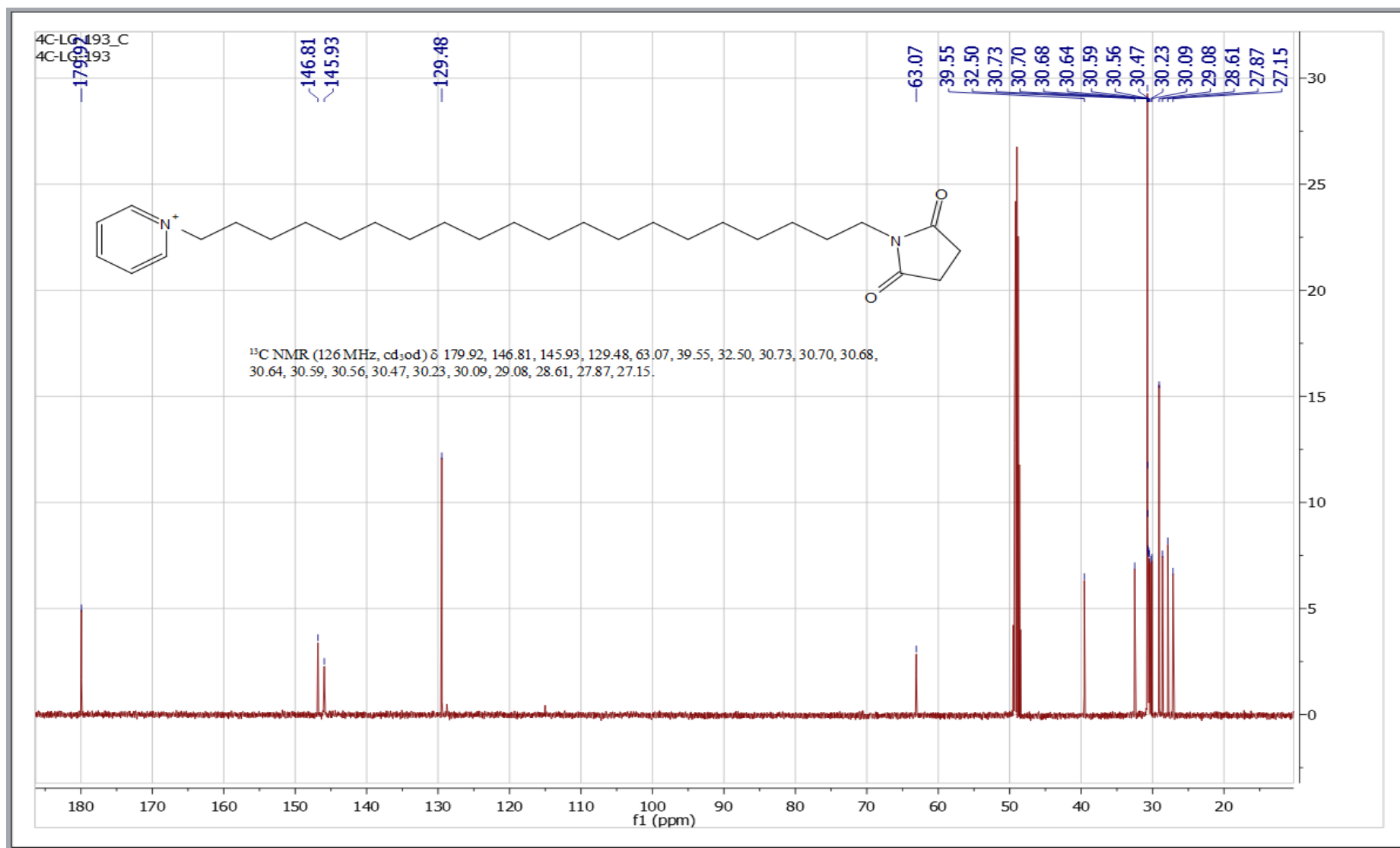
4-(20-bromoicosyl)-10-oxa-4-azatricyclo[5.2.1.0*2,6*]dec-8-ene-3,5-dione (9b) ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d₁) δ 6.51 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 3.49 – 3.44 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.83 (s, 2H), 1.90 – 1.82 (m, 2H), 1.60 – 1.51 (m, 2H), 1.48 – 1.38 (m, 2H), 1.36 – 1.17 (m, 30H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 176.25, 136.51, 80.87, 47.36, 39.02, 34.03, 32.83, 29.66, 29.64, 29.59, 29.52, 29.44, 29.42, 29.10, 28.75, 28.16, 27.58, 26.66.

2.5 ¹H and ¹³C NMR Spectra

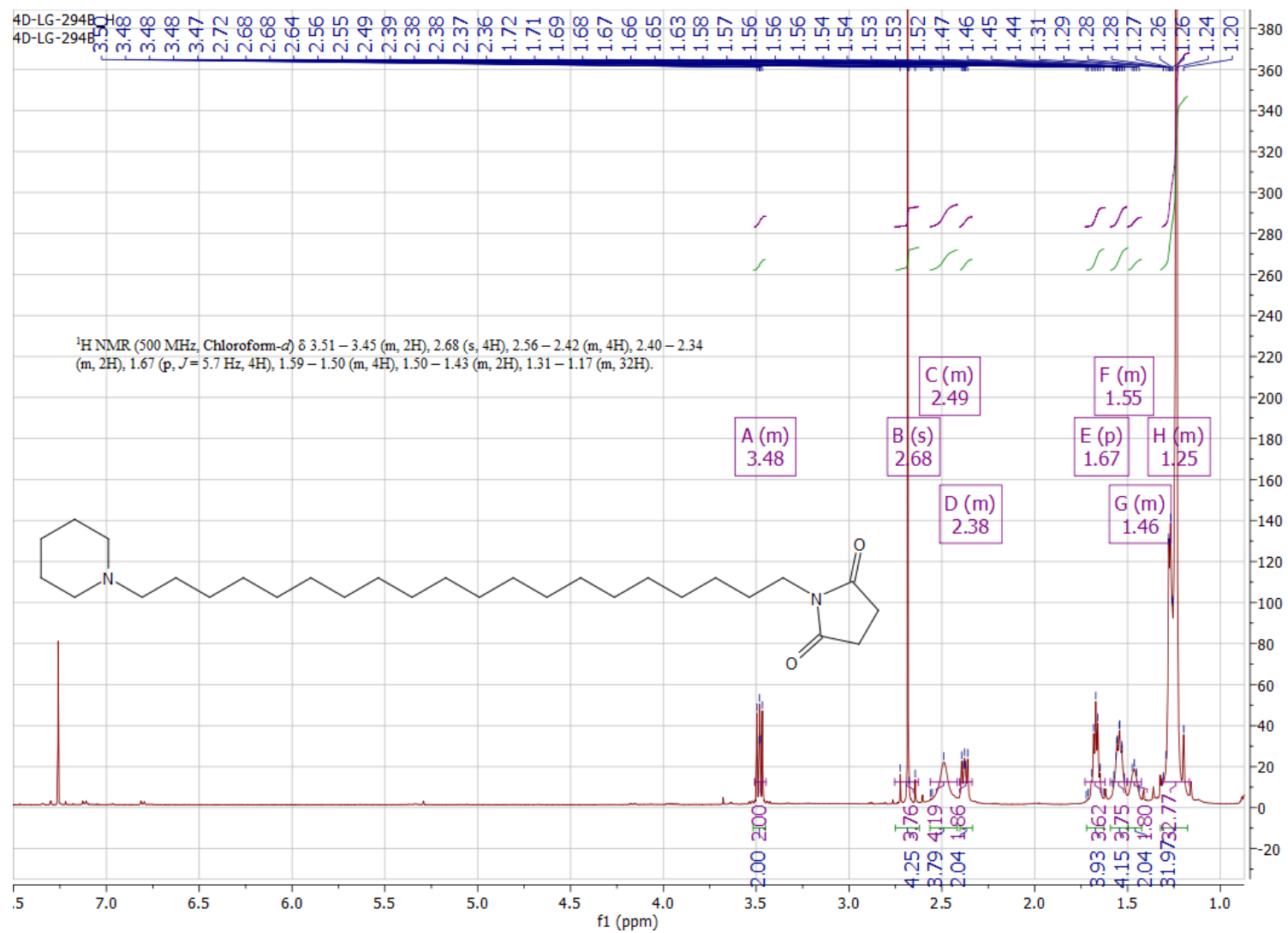
1-(20-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)icosyl)-pyridin-1-ium bromide (10b) ¹H NMR:



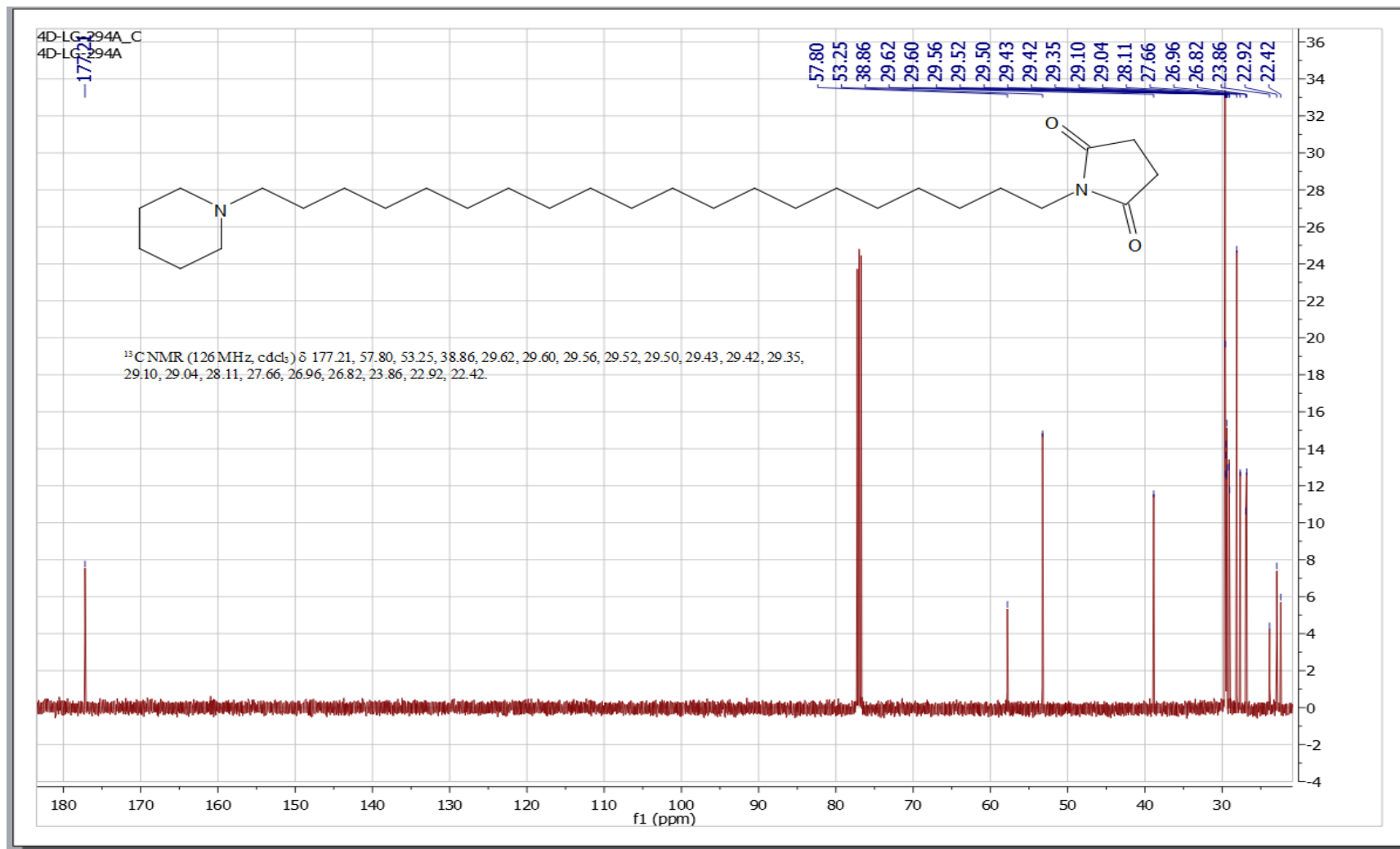
1-(20-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)icosyl)-pyridin-1-ium bromide (10b) ^{13}C NMR:



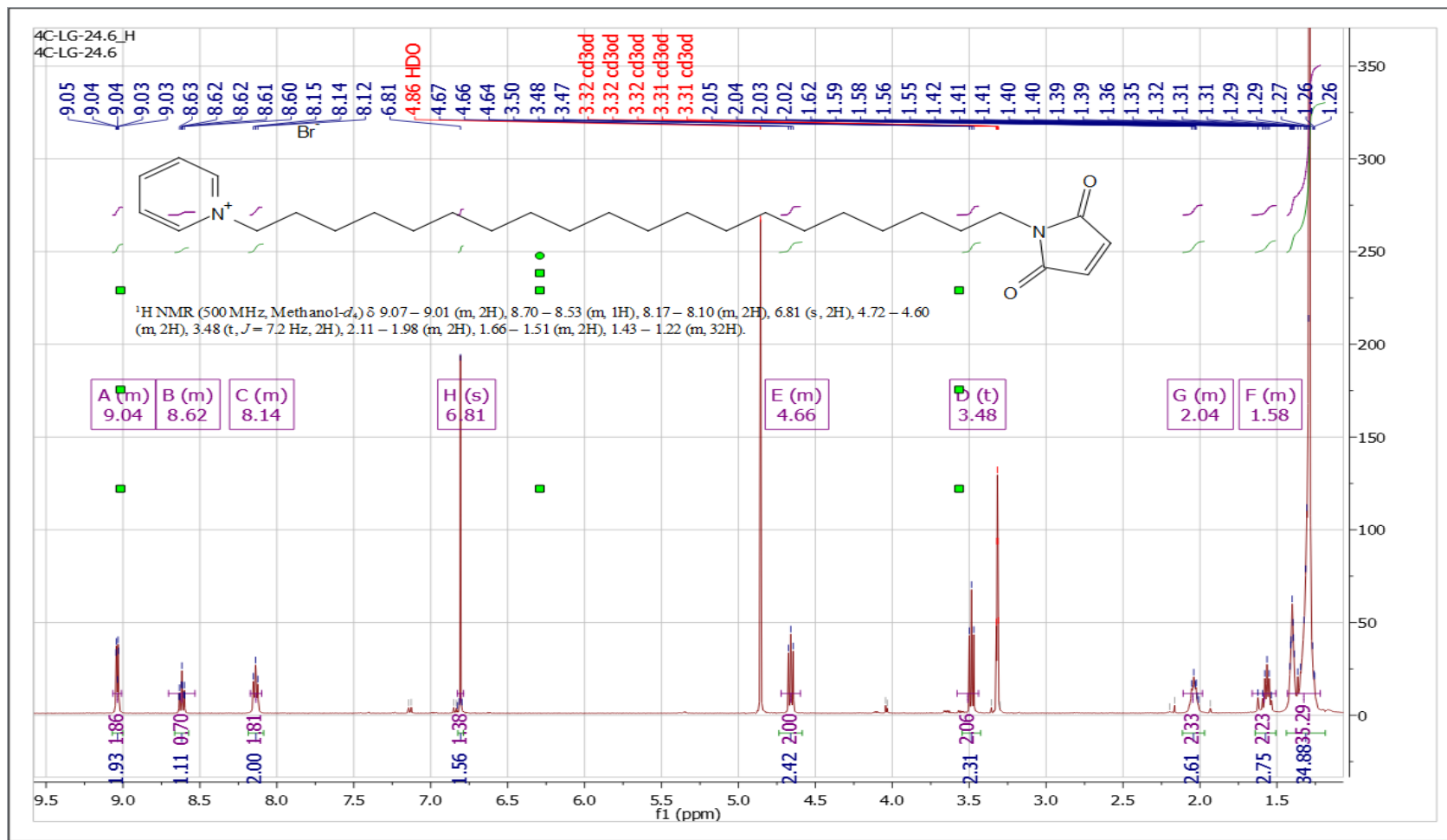
1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)pyrrolidine-2,5-dione (11b) ¹H NMR:



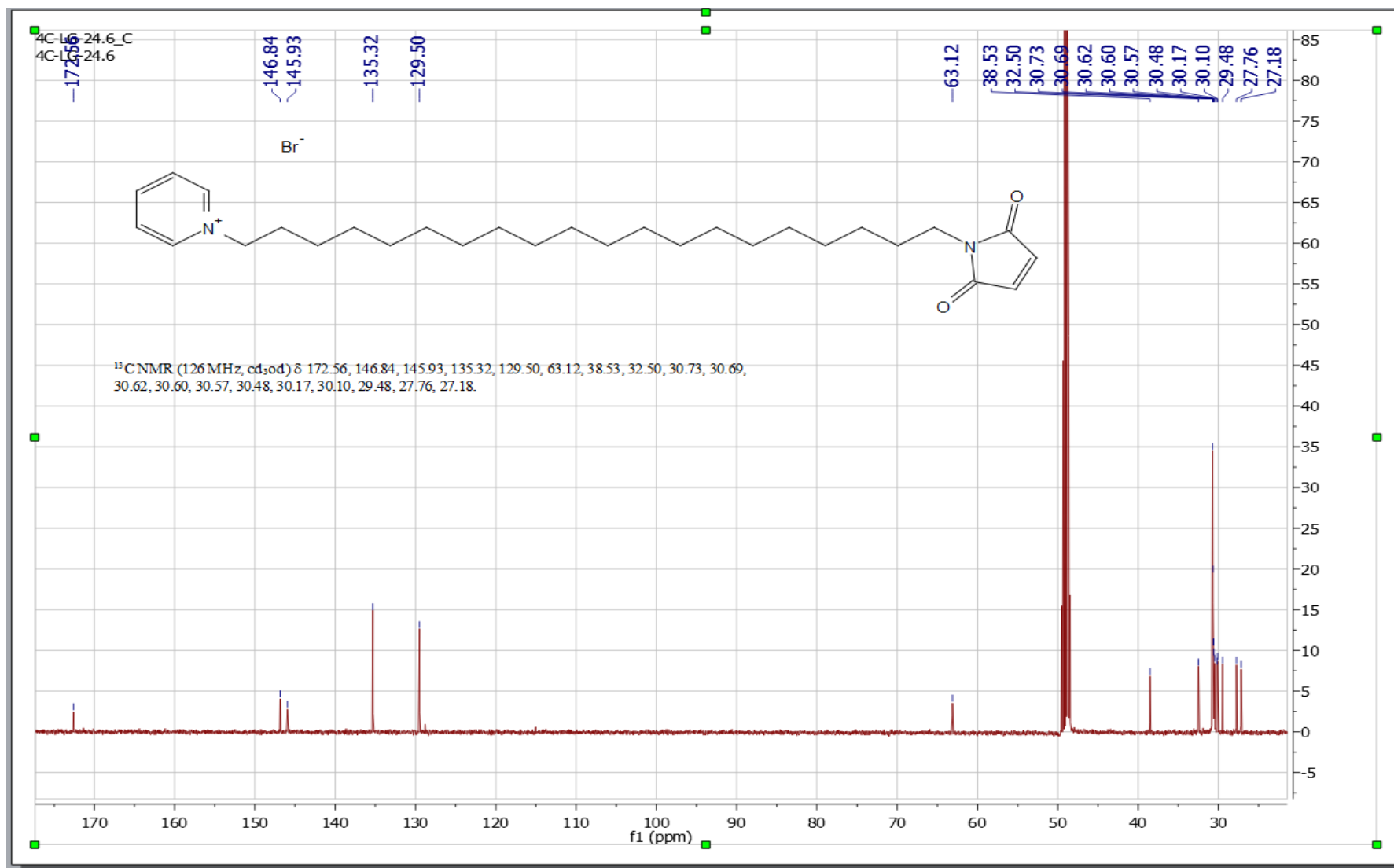
1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)pyrrolidine-2,5-dione (11b) ¹³C NMR:



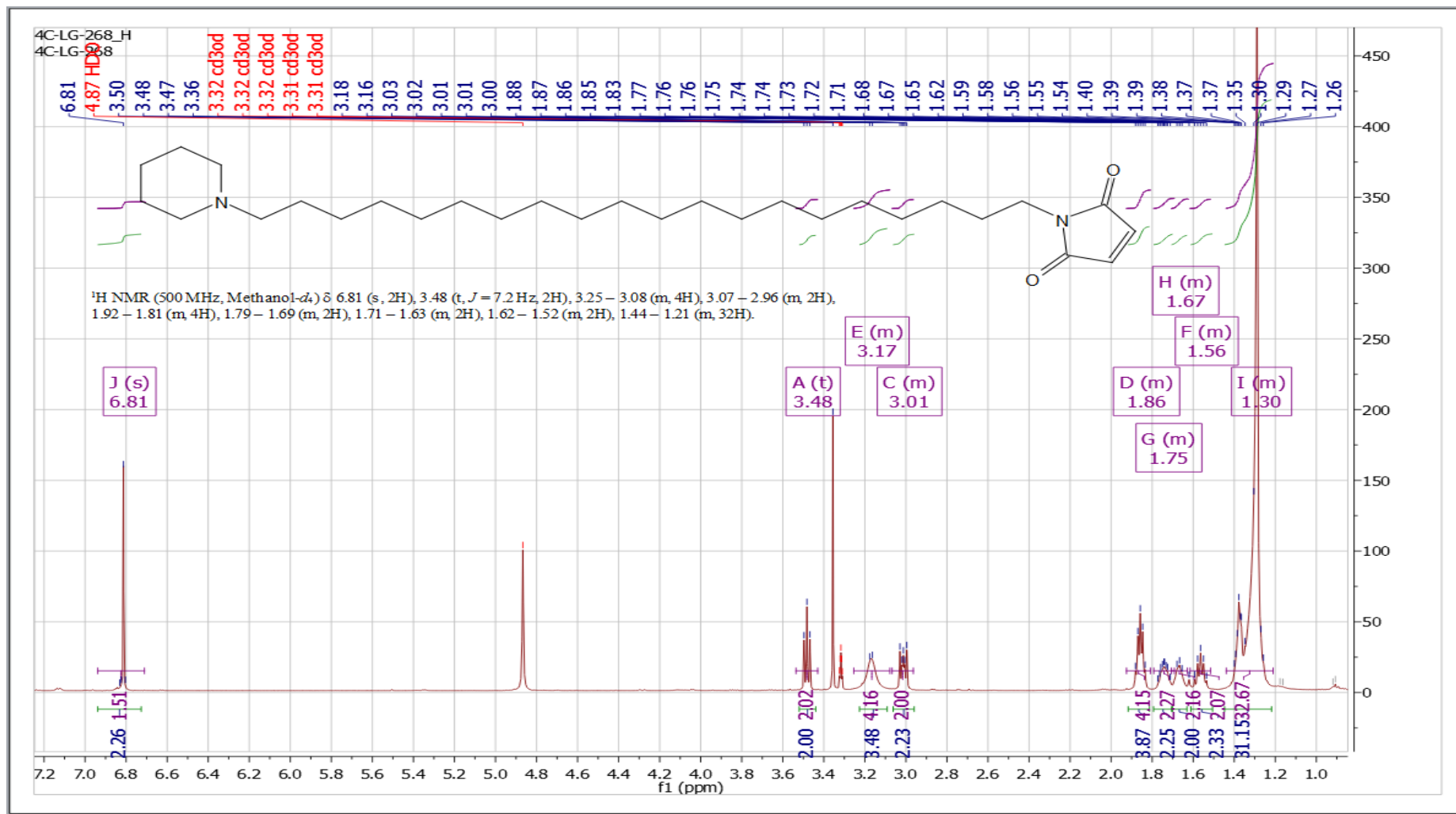
1-(20-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)icosyl)pyridin-1-ium bromide (14b) ¹H NMR:



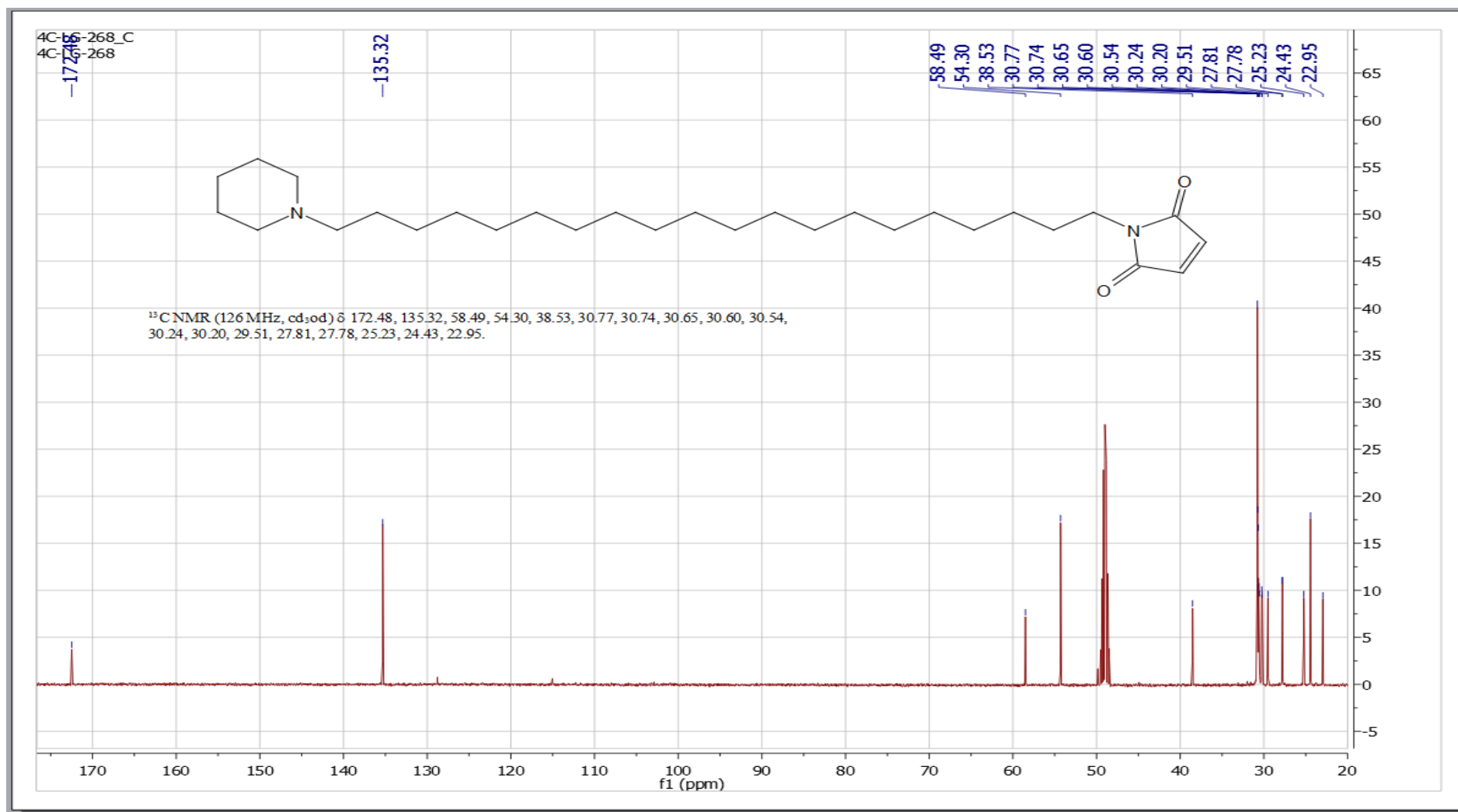
1-(20-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)icosyl)pyridin-1-ium bromide (14b) ¹³C NMR:



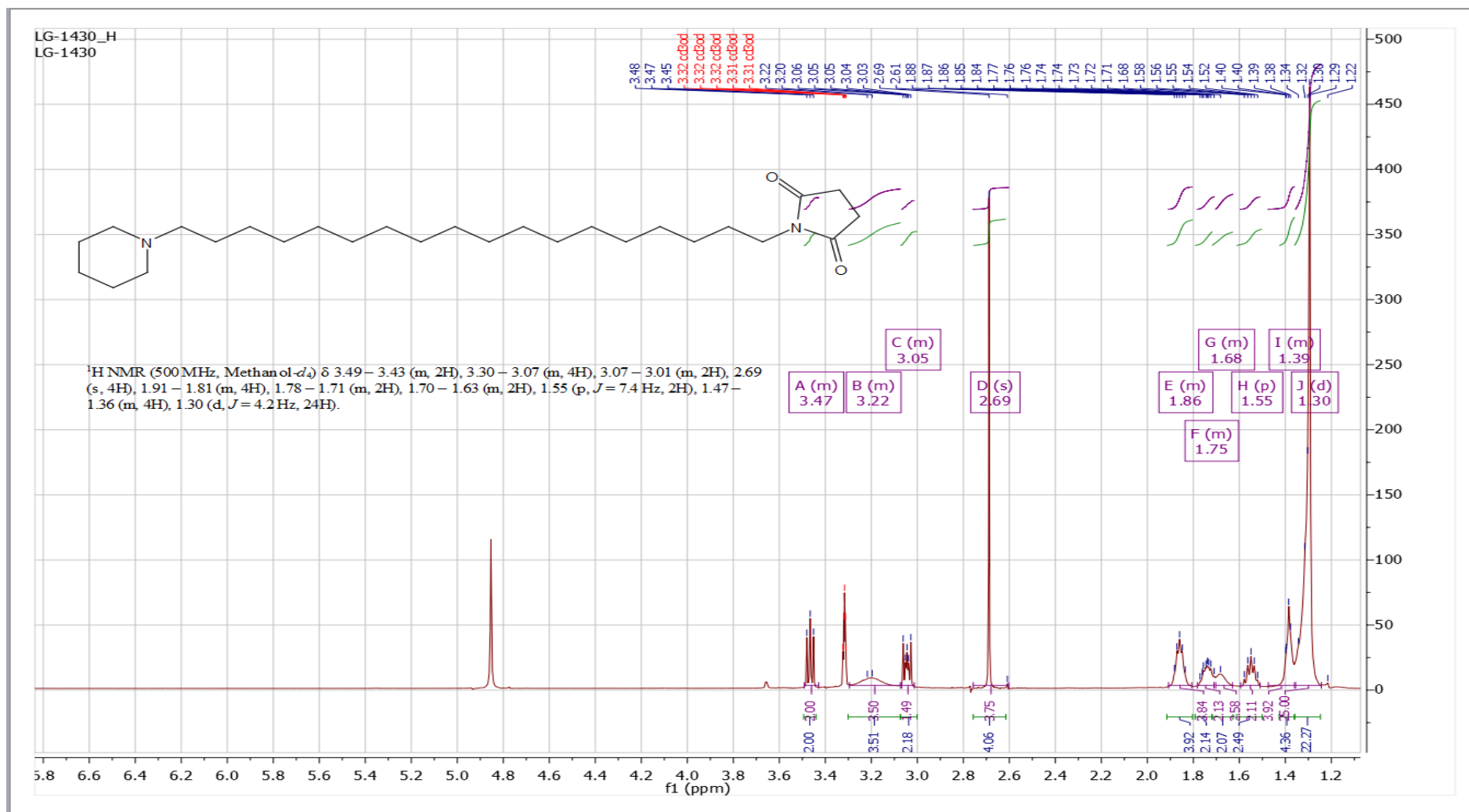
1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15b) ¹H NMR:



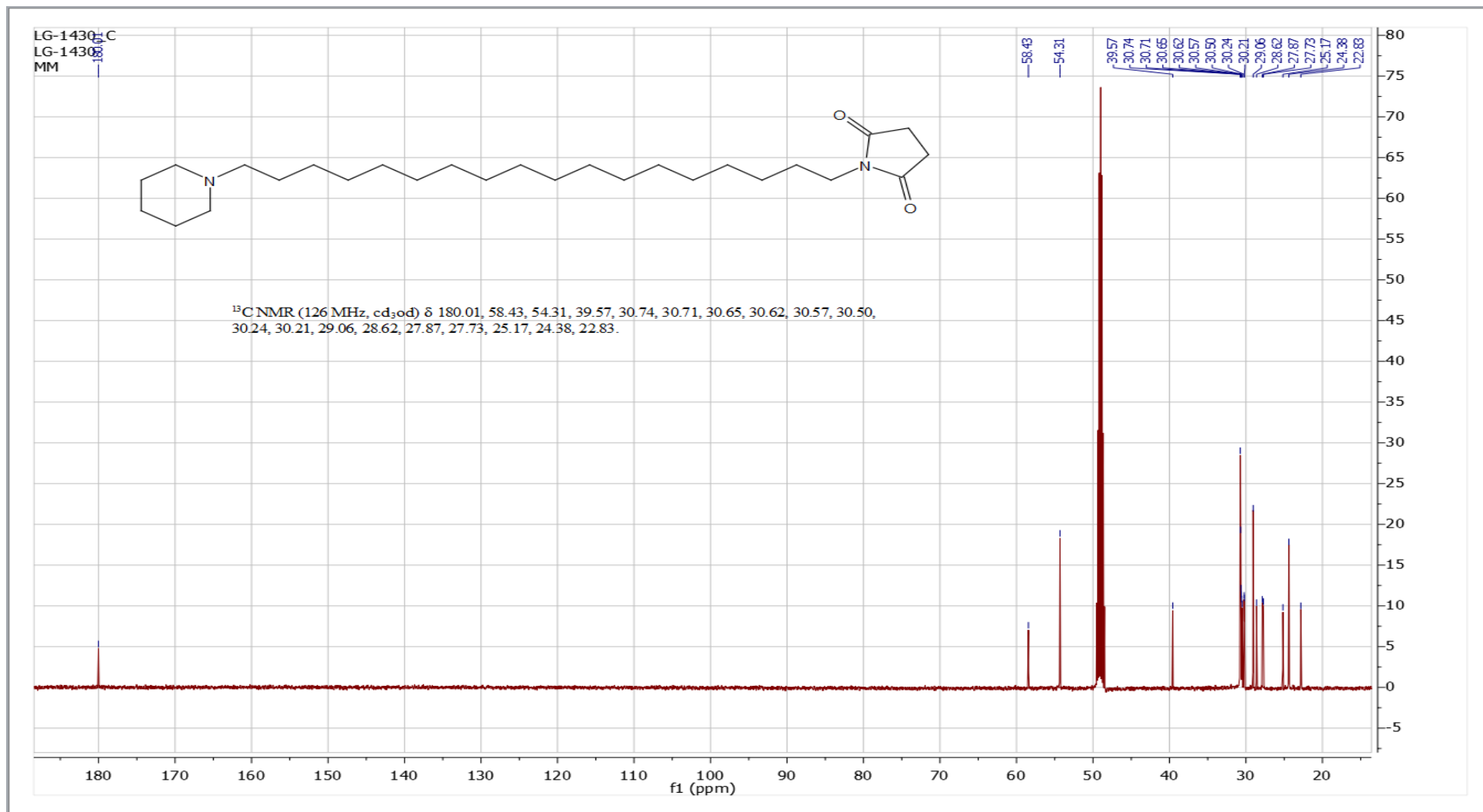
1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15b) ^{13}C NMR:



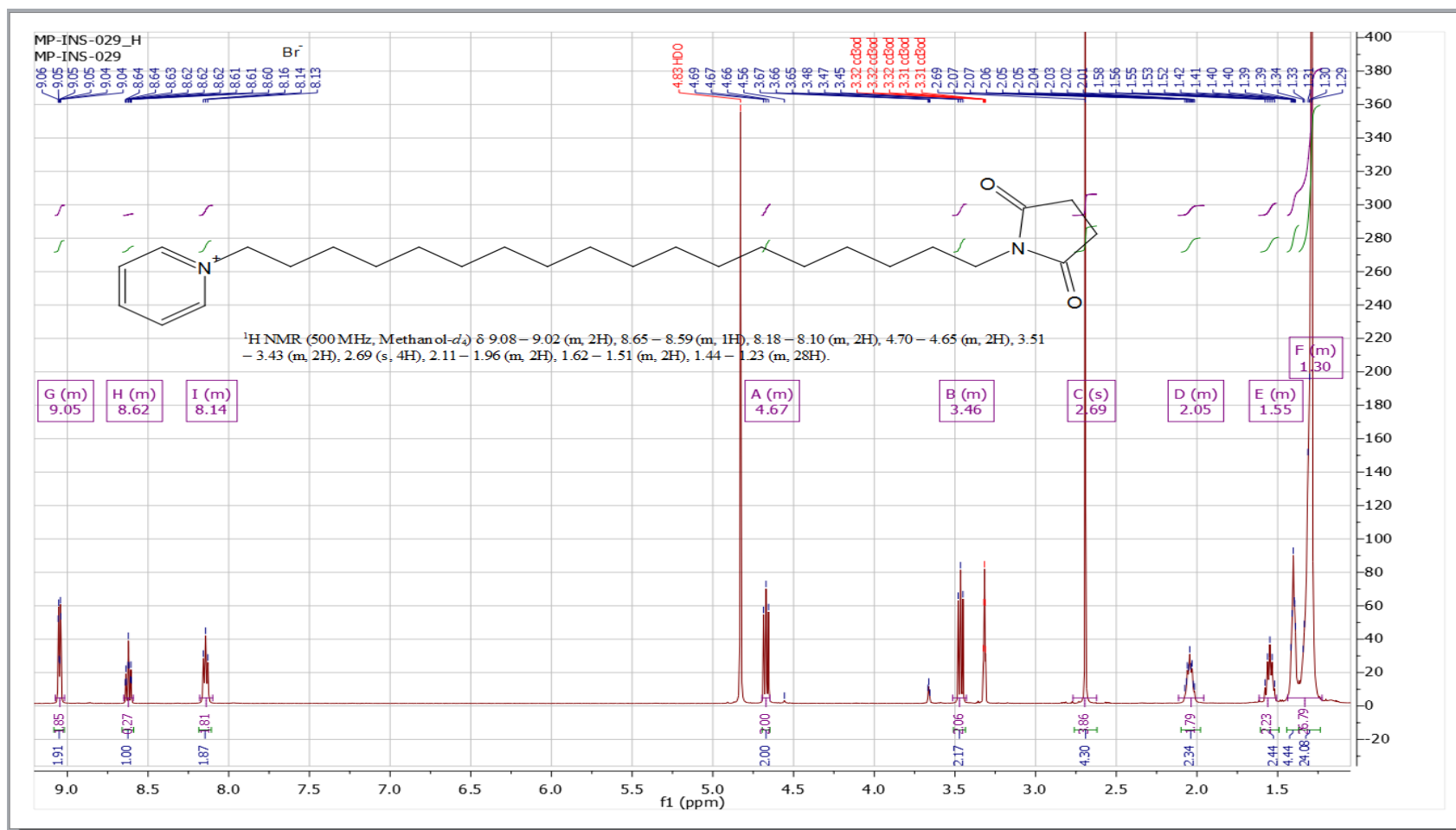
1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)pyrroline-2,5-dione (11a) ¹H NMR:



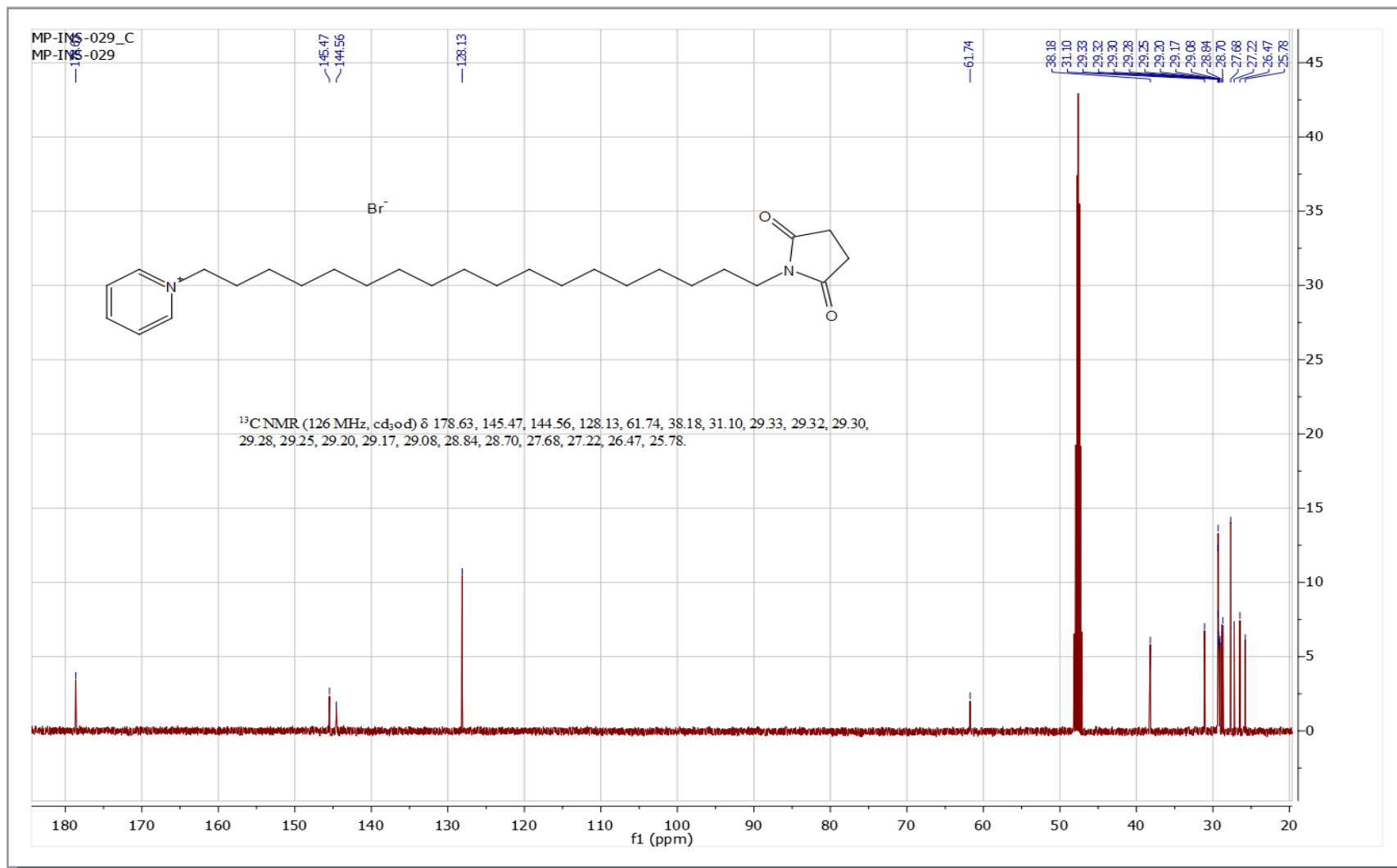
1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)pyrroldine-2,5-dione (11a) ^{13}C NMR:



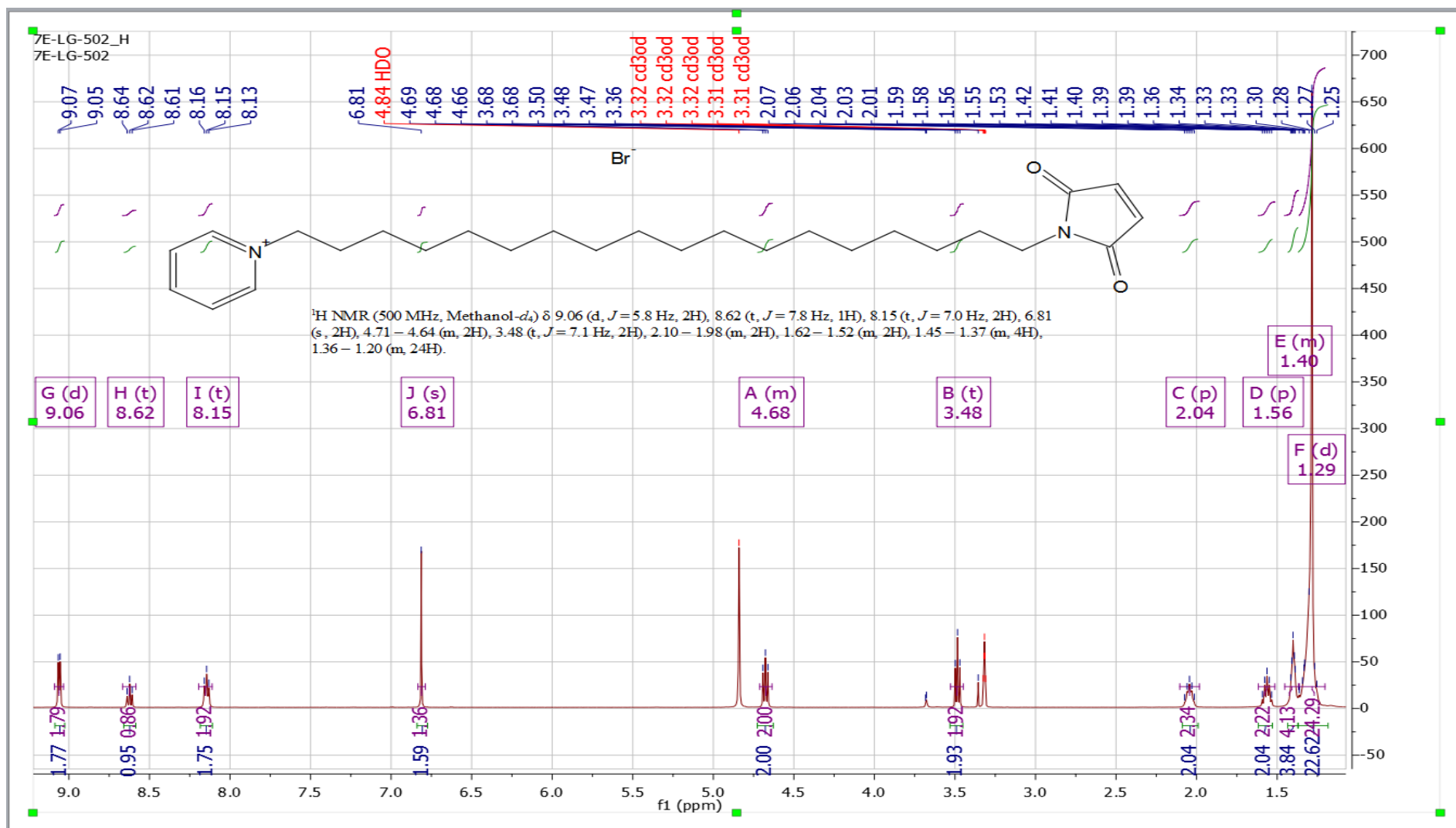
1-(18-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)octadecyl)-pyridin-1-ium bromide (10a) ¹H NMR:



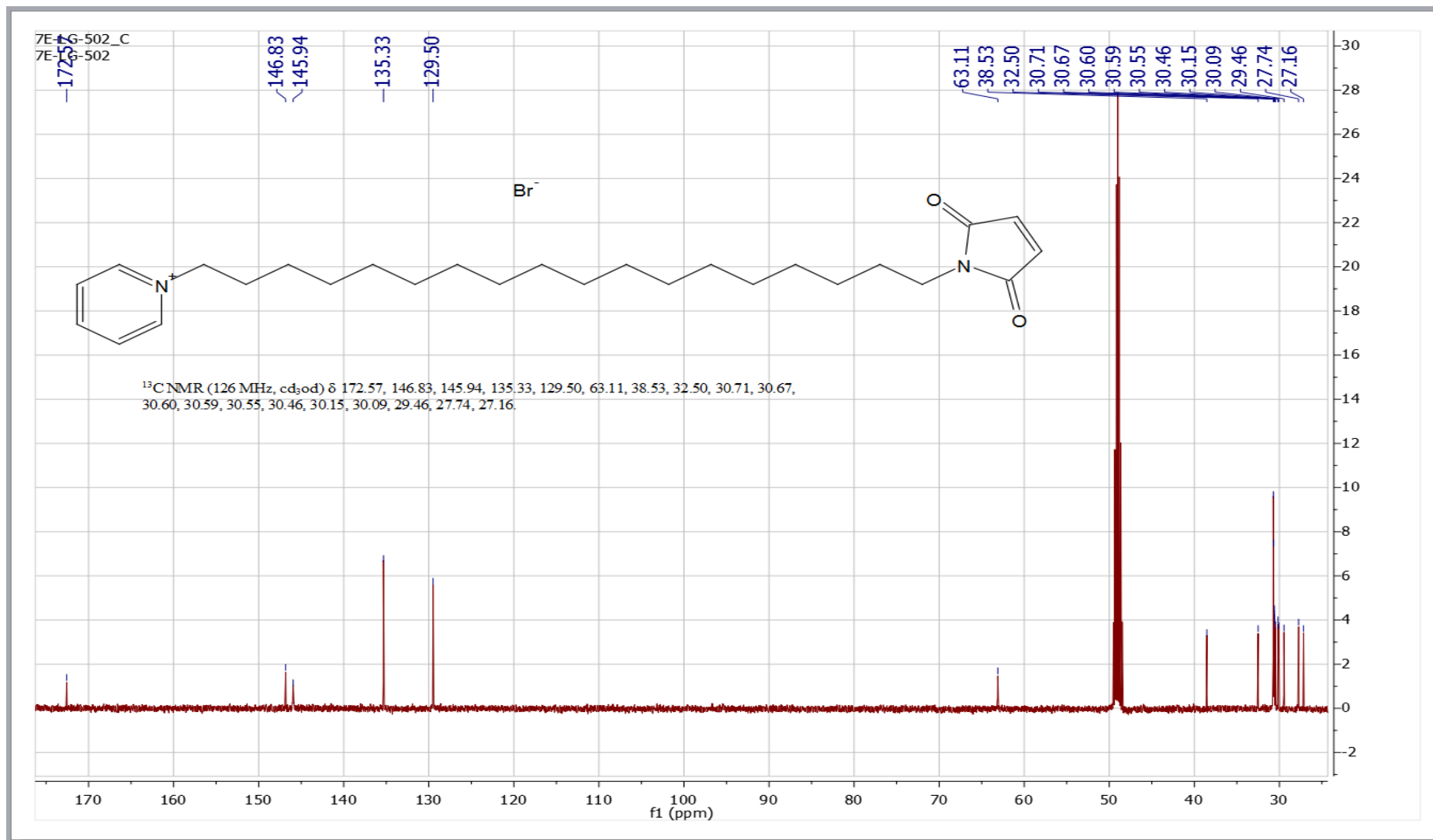
1-(18-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)octadecyl)-pyridin-1-ium bromide (10a) ¹³C NMR:



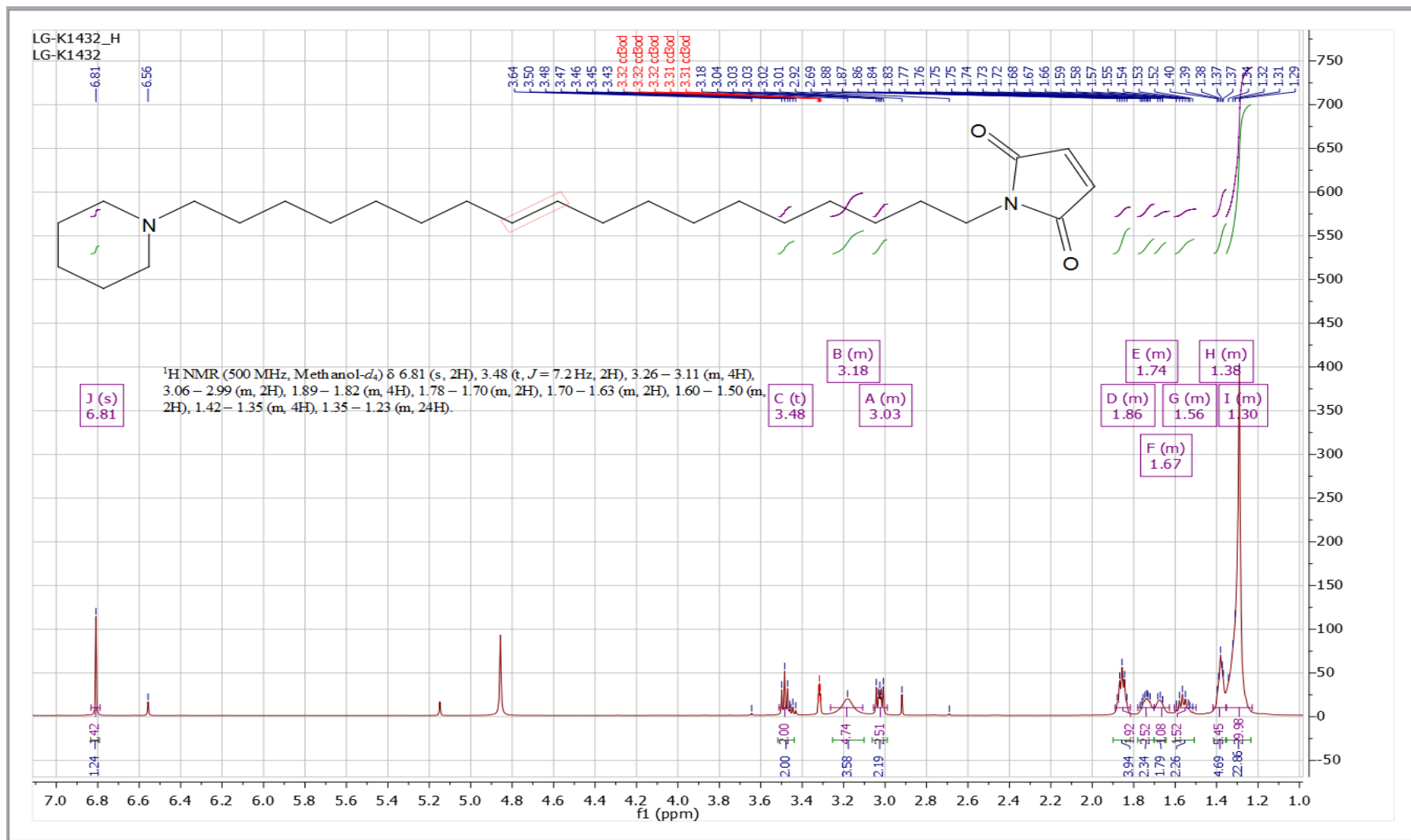
1-(18-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)octadecyl)pyridin-1-ium bromide (14a) ¹H NMR:



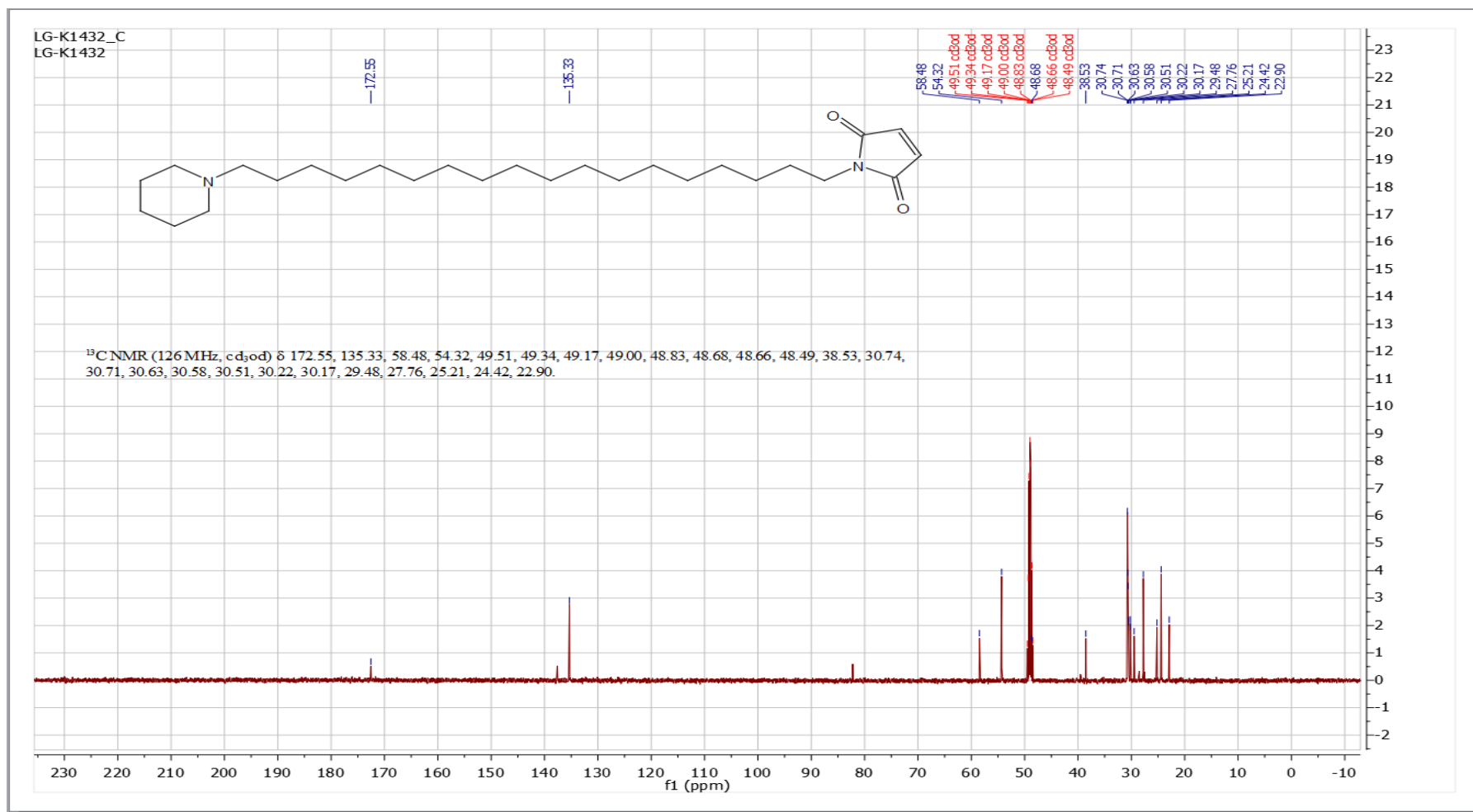
1-(18-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)octadecyl)pyridin-1-ium bromide (14a) ^{13}C NMR:



1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15a) ¹H NMR:

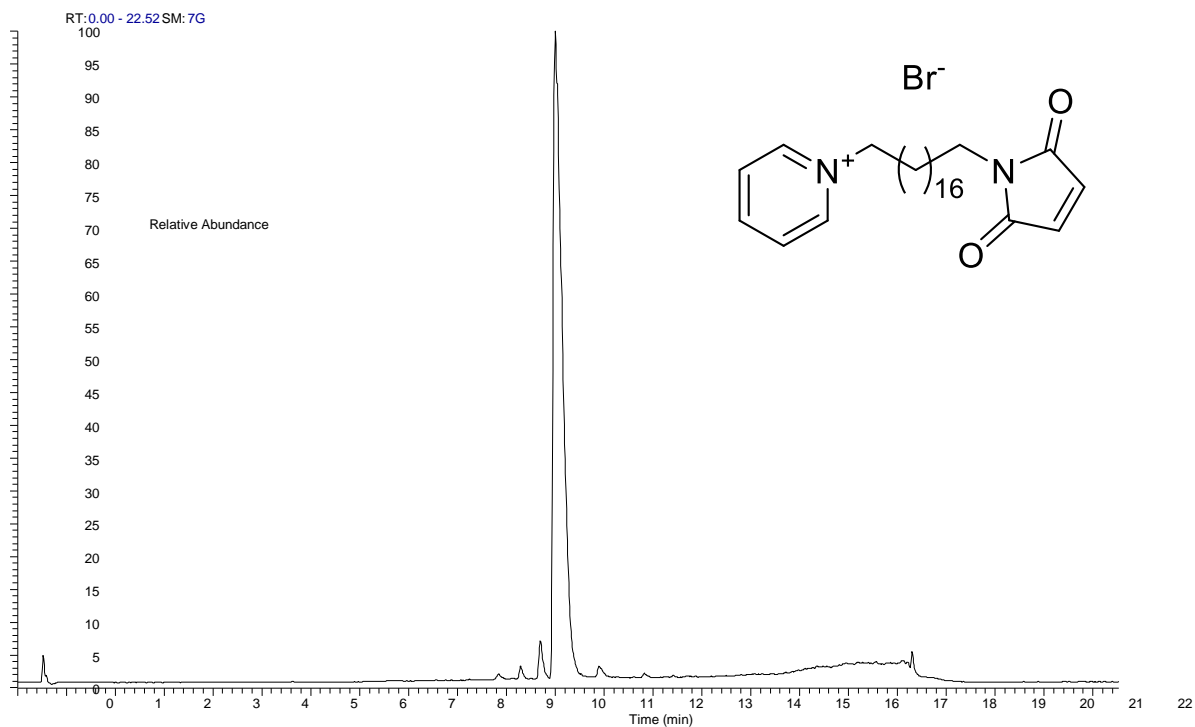


1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15a) ¹³C NMR:



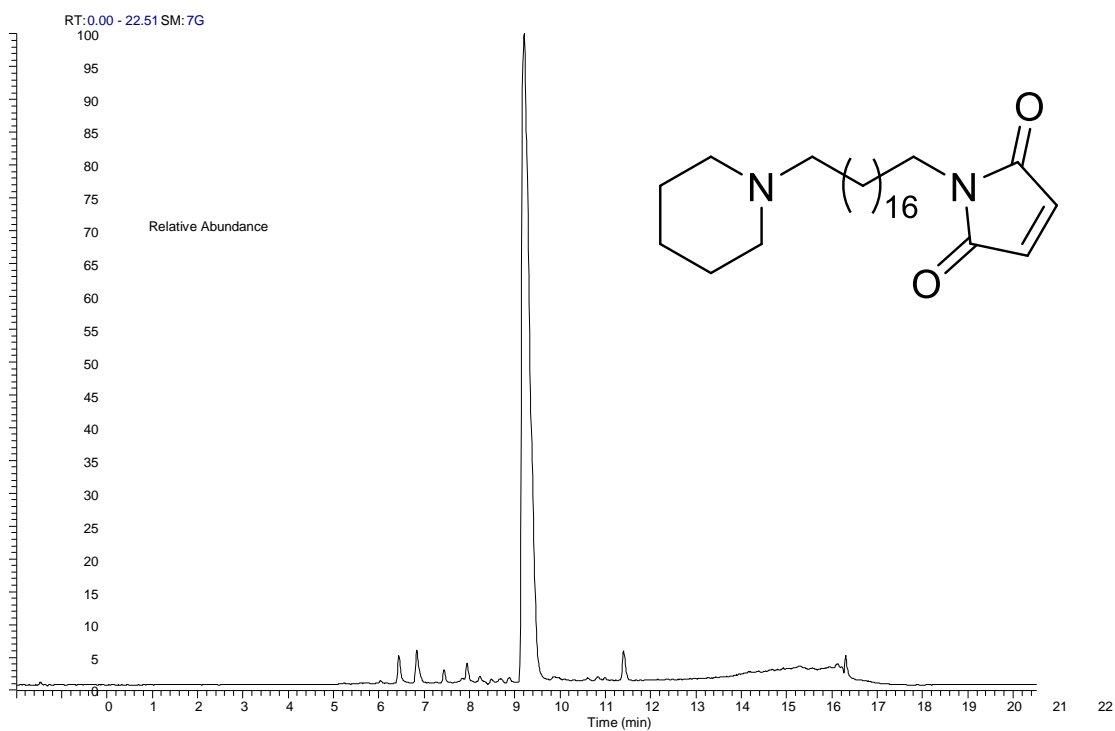
3. HPLC analysis of final compounds

1-(18-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)octadecyl)pyridin-1-ium bromide (14a):



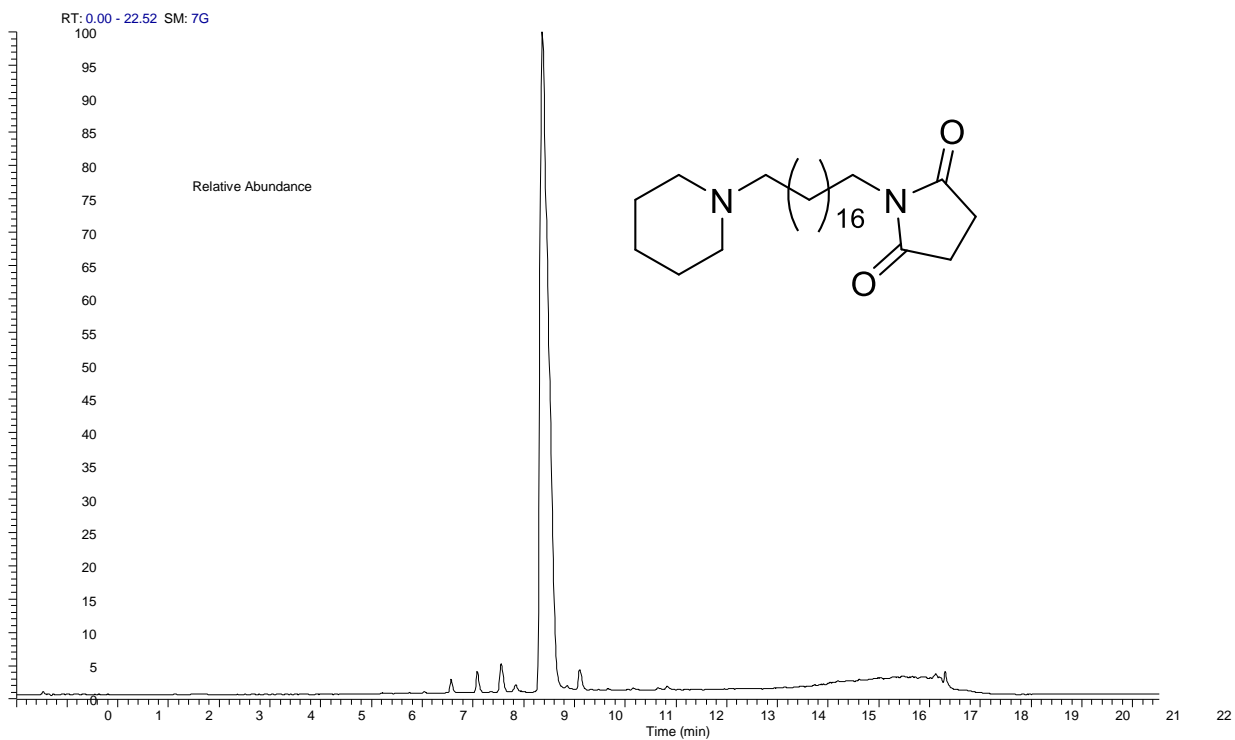
		Area	%
peak substance		55769475537	95.19143
impurities	9.84	262592695	0.448212
	10.3	416773449	0.711379
	10.7	1453898827	2.481621
	11.9	524625347	0.895469
	12.83	159290829	0.271889

1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15a):



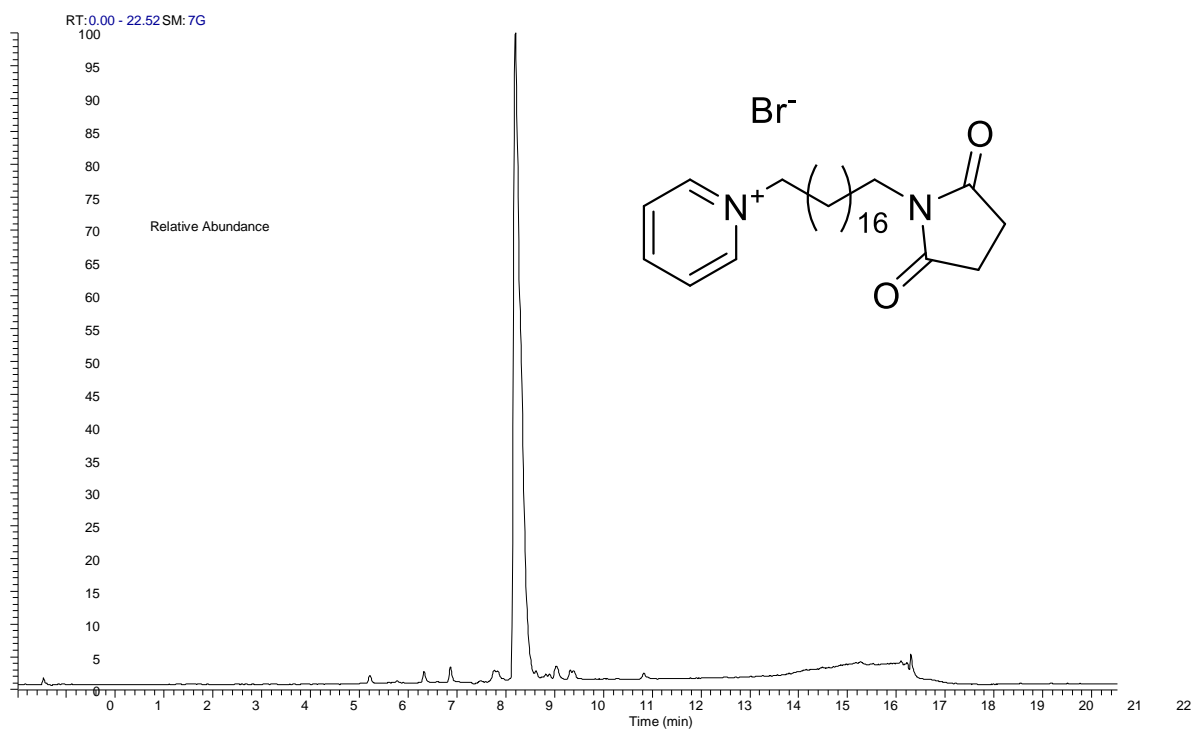
		Area	%
peak substance		55871630470	95.1547
impurities	8.44	878882858	1.496821
	8.84	1176917440	2.004402
	9.44	374656378	0.638075
	9.94	414539234	0.706

1-(18-(piperidin-1-yl)octadecyl)pyrrolidine-2,5-dione (11a):



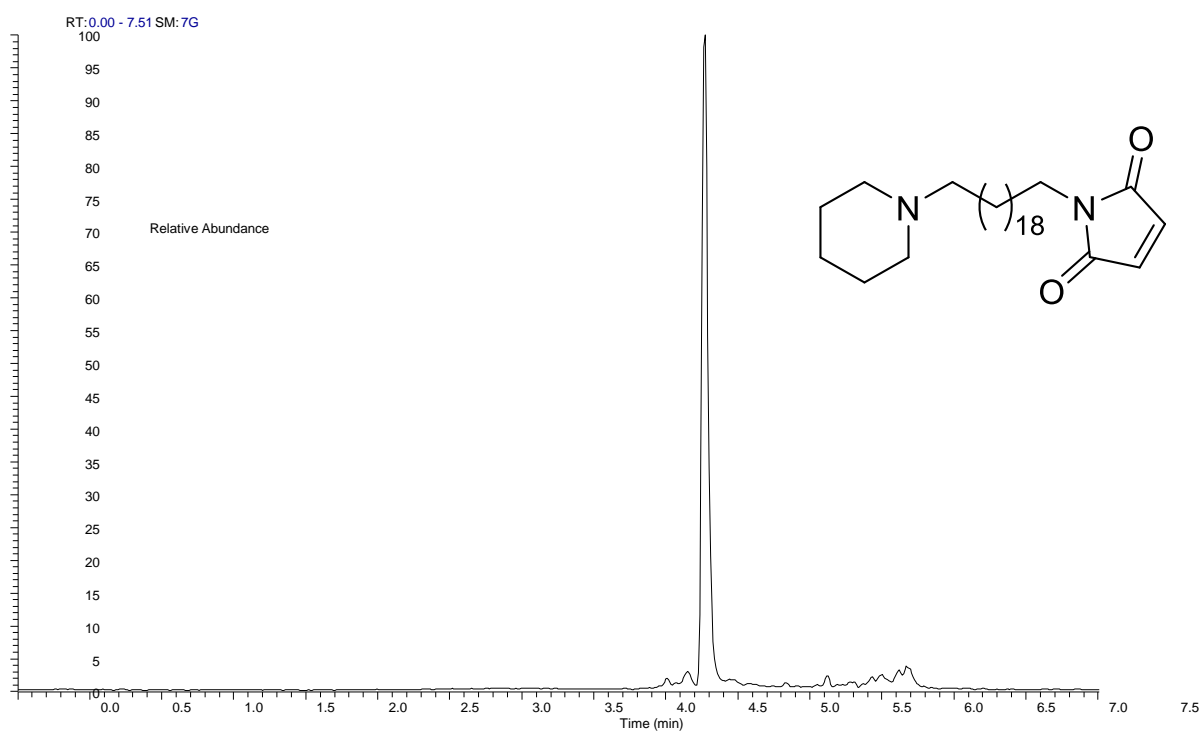
		Area	%
peak substance		60079112755	95.25943
impurities	8.56	372820220	0.591131
	9.08	604331095	0.958207
	9.55	1032576753	1.637219
	9.84	307867553	0.488144
	11.1	672234440	1.065872

1-(18-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)octadecyl)-pyridin-1-ium bromide (10a):



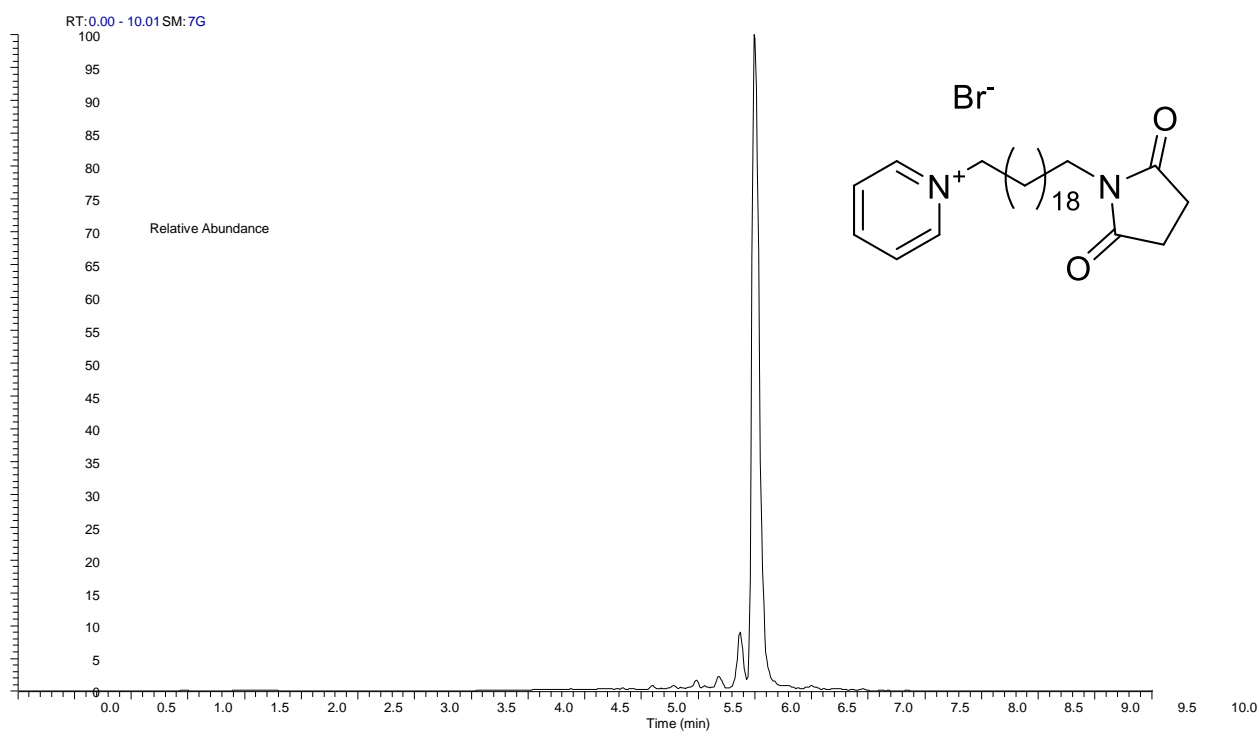
peak substance	Area	%
impurities	45640111750	95.06252
8.33	301823770	0.62866
8.87	410833635	0.855714
9.76	665515833	1.386184
11.03	403617333	0.840683
11.32	395070740	0.822882
12.83	193655071	0.403359

1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrole-2,5-dione (15b):



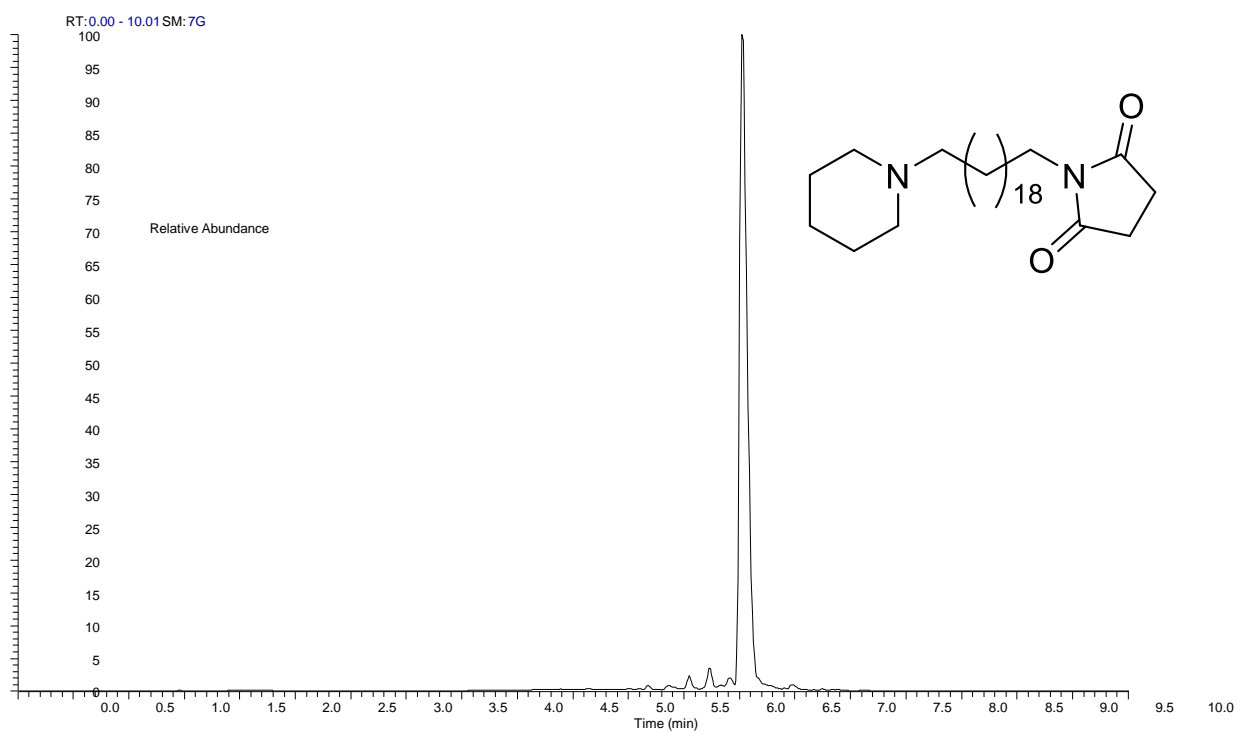
		Area	%
peak substance		3271696187	95.11933
impurities	4.51	22450787	0.652721
	4.67	56016974	1.628604
	5.34	52944019	1.539263
	5.62	36462147	1.060079

1-(20-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)icosyl)-pyridin-1-ium bromide (10b):



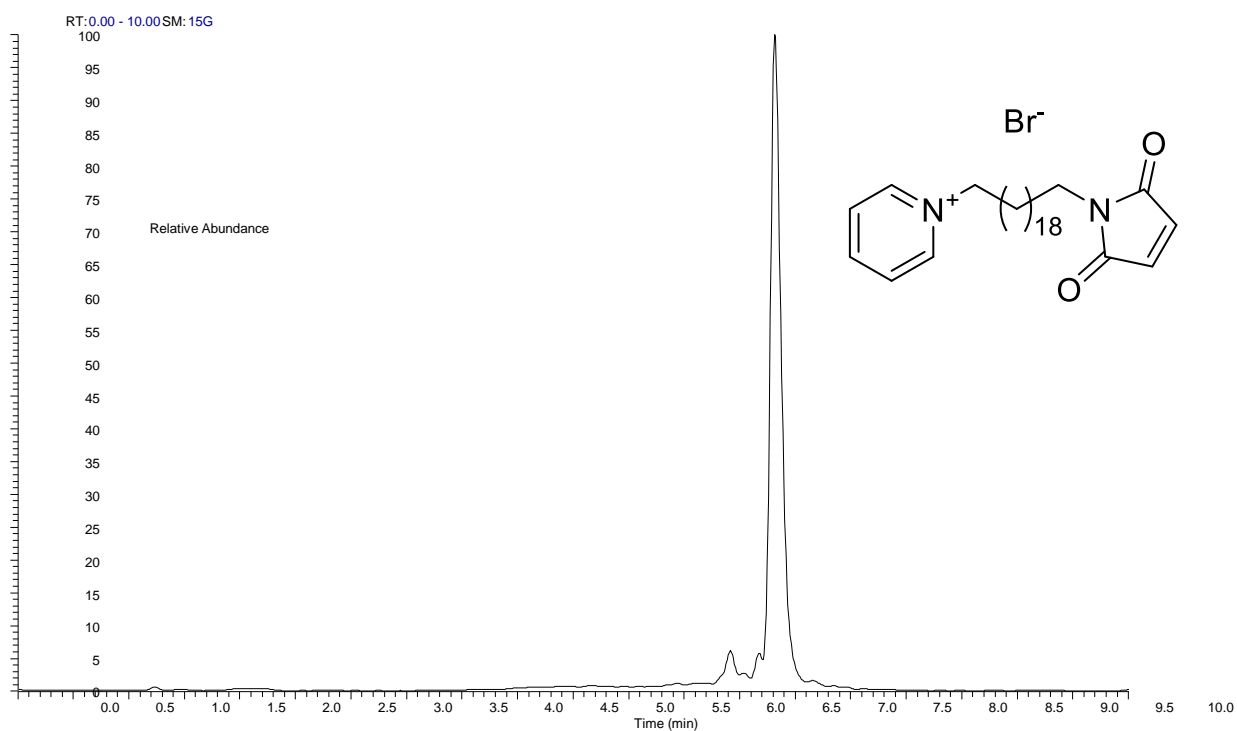
		Area	%
peak substance		47736803230	95.12007
impurities	5.98	213837792	0.426092
	6.18	460706115	0.918
	6.37	1774489370	3.535837

1-(20-(piperidin-1-yl)icosyl)pyrrolidine-2,5-dione (11a):



		Area	%
peak substance		50807497771	96.15594
impurities	6.05	530201669	1.003435
	6.23	814937644	1.542314
	6.41	455082926	0.861269
	6.98	230925161	0.437038

1-(20-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)icosyl)pyridin-1-ium bromide (14b):



		Area	%
peak substance		28747204791	95.09511
impurities	6.42	629077823	2.080975
	6.67	853667279	2.823912

5. Recombinant AgAChE1 production and characterisation

5.1 Cloning and expression of recombinant AgAChE1

For recombinant *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase (AgAChE1) production, the catalytic domain ranging from D162 to S713 (ACES_ANOGA numbering, UniProtKB) was expressed. The DNA sequence encoding catalytic domain of AgAChE1 was obtained from UniProtKB Server (www.uniprot.org, accession no: Q869C3), codon-optimised and *de novo* synthesized by GeneArt Gene Synthesis Service (ThermoFisher Scientific) as GeneArt Strings DNA fragment. Two gene-specific primers (AgACHE_F: 5'- GATAACGACCCACTCGTCGTGAATACAGACAAAGG-3' and AgACHE_R: 5'- CCACCCTCAGAACCGTGCGAGTCCTCT-3') were used for PCR amplification of the catalytic domain coding region. The blunt-end PCR product was cloned into pFastBac™ HBM TOPO® vector (Thermo Fisher Scientific) under the control of the strong polyhedrin promoter. The cloned DNA was isolated and sequenced to verify the correct insertion of the fragment in frame with the N-terminal Honey Bee Mellitin secretion signal coding sequence and C-terminal hexahistidine tag coding sequence. For recombinant bacmid DNA generation, the pFastBac™ HBM TOPO® vector carrying the AgAChE1 catalytic domain coding sequence was transformed into DH10Bac *E. coli* cells for transposition into the bacmid followed by the blue-white screening. True white colonies were picked up and PCR analysed using pUC/M13 forward and pUC/M13 reverse primer pair to verify successful site-specific transposition. The recombinant bacmid DNA was isolated using PureLink™ HiPure Plasmid DNA Mini Prep Kit (Thermo Fisher Scientific) and stored in TE buffer at 4°C up to 2 weeks or at -20°C for long-term storage.

The recombinant baculovirus was produced by transfection of *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells as host cells (Thermo Fisher Scientific). The insect cells were maintained in SF-900™ II serum free medium as suspension culture and the cells were grown at 27°C in the incubated shaker at 125 rpm. The bacmid DNA was transfected into insect cells using cationic lipid Cellfectin™ II reagent in unsupplemented Grace's insect cell medium (Thermo Fisher Scientific). Four hours after transfection, the transfection mixture was replaced with complete growth medium and cells were incubated at 27°C until signs of the late stage of viral infection have appeared. The viral supernatant was collected, clarified and used for generation of high-titre viral stocks at multiplicities of infection (MOIs) of 0.1-0.5. The recombinant AgAChE1 was expressed using high-titre recombinant baculovirus stocks in insect suspension cultures in the mid-logarithmic phase of growth. The MOI used for expression was 3. The expression kinetics of the produced recombinant protein were determined every day by measuring the activity of acetylcholinesterase in the cultured supernatant using Ellman's method.¹ At the end of the expression, the recombinant proteins in the culture supernatant were harvested, cleared by centrifugation and stored at -80°C for further experiments.

5.2 Protein purification

Recombinant *AgAChE1* was purified using NGC Medium-Pressure Chromatography System (Bio-Rad, USA). The total volume of 6-8 mL of medium containing secreted protein was desalted using 5 mL HiTrap Desalting column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A (20 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, 15 mM imidazole and 20 % (v/v) glycerol; pH 7.4). Acquired supernatant was loaded onto a 1 mL HisTrap FF column (GE Healthcare) equilibrated with buffer A. Captured proteins were eluted with buffer B (20 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole and 20 % (v/v) glycerol; pH 7.4). Imidazole was subsequently removed by repeated centrifugation in Amicon Ultra-4 (Ultracel-10K) tube (Merck Millipore). Protein concentration was determined by linearized Bradford method adapted for 96-well plate.² Protein purity was determined by SDS-PAGE (12.5 % polyacrylamide gel) followed by Western-blot analysis using primary rabbit anti-His-Tag antibody (dilution 1:16,000, ab9108, Abcam); and a secondary horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit antibody (dilution 1:10,000, P0217, Dako)(Fig S1).

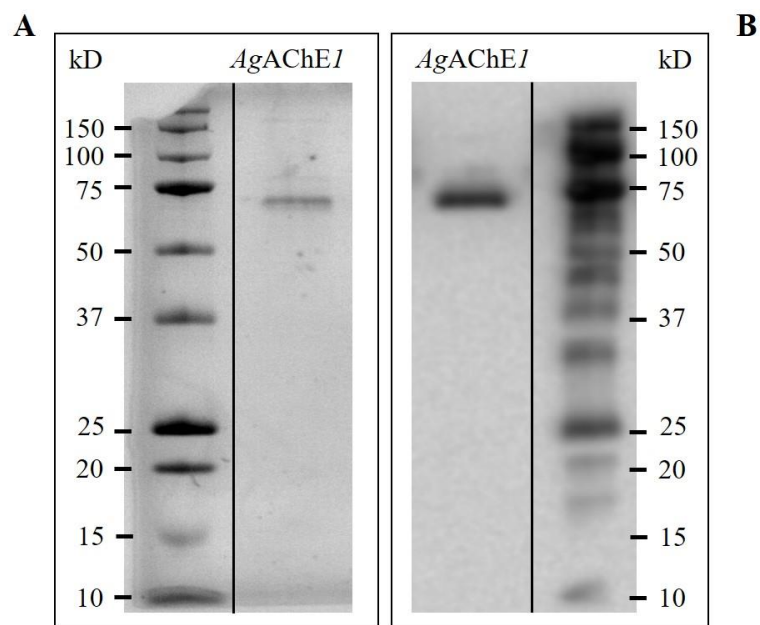


Figure S1. Detection of recombinant *AgAChE1*. The mosquito enzyme was separated in polyacrylamide gel and (A) stained using Coomassie blue staining or (B) transferred to PVDF membrane followed by immunodetection of the histidine tag.

6. Enzymatic assays

6.1 Maximum velocity and Michaelis constant determination

The recombinant *AgAChE1* enzyme was assayed for enzyme kinetics parameters – the maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_M). The enzyme was mixed with various concentrations of substrate (ranging from 25 μ M to 2 mM) and the reaction was measured using Ellman's assay (Figure S2). The activity data of the enzyme was plotted versus the substrate concentration data and non-linear regression analysis was used to determine the K_M and V_{max} values in GraphPad Prism 7 software. As the substrate is known to inhibit the enzyme, the inhibition of substrate determination was used for K_M calculation. The catalytic activity was evaluated as the enzyme unit formed by milligram of protein (U/mg).

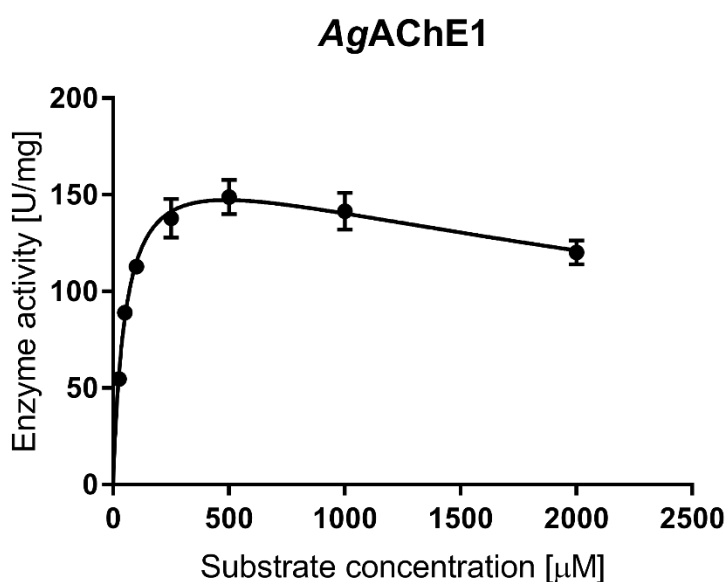


Figure S2. Determination of Michaelis constant and maximum velocity of the *AgAChE1* enzyme. The enzyme was measured with increasing concentration of substrate ATCh and the rates of product formation were used for calculation of V_{max} and K_M values.

6.2 Cholinesterase enzymatic assays

The catalytic activity of enzymes was determined by standard Ellman method¹ adapted for 96-well plates. All tested inhibitors were freshly prepared in 50 % dimethyl sulfoxide (DMSO) / 50 % methanol at 10 mM concentration as stock solutions and then diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The reaction mixture contained *HssAChE* (70 ng/mL; 11 nM), *AgAChE1* (150 ng/mL; 24 nM) or *HssBChE* (220 ng/mL; 35 nM); inhibitor at required concentration (0.2 μ M to 100 μ M) and 500 μ M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The mixture was

pre-incubated at 37°C for 15 min and subsequently substrate (acetylthiocholine iodide - ATCh or butyrylthiocholine iodide - BTCh) was added to the final concentration of 2000 μ M. The final volume of the reaction was 100 μ L. The catalytic activity was evaluated as the amount of product (%) formed by enzyme after 10 minutes of incubation at 37°C. The IC₅₀ values from three independent experiments for each inhibitor concentration in triplicate were calculated using non-linear regression curve analysis in Prism 7 Software (GraphPad). The selectivity index was determined as ratio of IC₅₀ (*HssAChE*) /IC₅₀ (*AgAChE1*) values.

Table S1. Inhibitory activity towards *HssBChE*.

Compound		<i>HssBChE</i> IC ₅₀ \pm SEM (μ M) ^a
10a	---	> 60
10b	PMS20	> 60
11a	PYS18	> 60
11b	---	> 60
14a	PM18	> 60
14b	PM20	> 60
15a	PY18	> 60
15b	---	> 60
	paraoxon	0.009 \pm 0.0002
	bendiocarb	4.3 \pm 0.1
	carbofuran	18.6 \pm 0.7

^a IC₅₀ values measured by modified Ellman's assay 15 min after introduction of inhibitor; results are mean values of three independent experiments

6.3 Time-dependent enzyme inhibition progress

The binding rates of compounds harbouring maleimide moieties (**14a-b** and **15a-b**) were analysed on *HssAChE* and *AgAChE1* enzymes. The enzyme-compound mixtures were preincubated for different time periods (0 – 15 min) to achieve enzyme inhibitions over 50%. The level of enzyme inhibition was determined using Ellman's assay (same conditions as in Section 6.2) and expressed as percents of uninhibited control reactions.

6.4 Reversibility of inhibition

The reversibility of *HssAChE*/*AgAChE1* inhibition was determined by incubation of the enzymes with a high concentration of tested compound (at least 4 times higher than IC_{50} value where possible) for 30 minutes followed by overnight dialysis of the enzyme-inhibitor complex and subsequent determination of enzyme catalytic activity recovery. The reaction mixture contained *HssAChE* (105 ng/mL) or *AgAChE1* (225 ng/mL) with inhibitor in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The inhibitor concentrations were 50 μ M for *HssAChE* and 50 μ M (**11a** and **11b**) or 10 μ M (the rest of the compounds) for *AgAChE1*. The mixture was pre-incubated at 37°C for 30 min and divided into two fractions. The first fraction was analyzed on remaining enzymatic activity before dialysis, the second fraction was dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C for 14 hours (three buffer exchanges). The recovery of enzymatic activity after dialysis procedure was examined using Ellman's assay (same conditions as in Section 6.2). The remaining enzymatic activity was calculated as a per cent of non-inhibited control reactions after dialysis and the data of the residual enzyme activity are shown as means and standard errors from two independent experiments, each in triplicate.

6.5 Reversibility of inhibition after iodoacetamide pretreatment

The role of the cysteine residues on reversible or irreversible bond formation was tested by blocking the free cysteines before the addition of the inhibitors. Recombinant *HssAChE* or *AgAChE1* were treated with different molar excess of iodoacetamide (1:1 to 1:500) at 37°C for 30 min (Figure S3). The 100× molar excess of iodoacetamide (2,4 μ M in case of *AgAChE1* and 1,1 μ M in case of *HssAChE*) was chosen to perform the experiments. The enzyme's activity without iodoacetamide was used as the control. After iodoacetamide pretreatment, the compounds with the highest selectivity towards *AgAChE1* harbouring succinimide (**11a**) or maleimide moiety (**15b**) were added at 50 μ M or 10 μ M concentration. The dialysis part of the experiment and remaining enzyme activity measurement after dialysis were performed in the same manner as in Section 6.4.

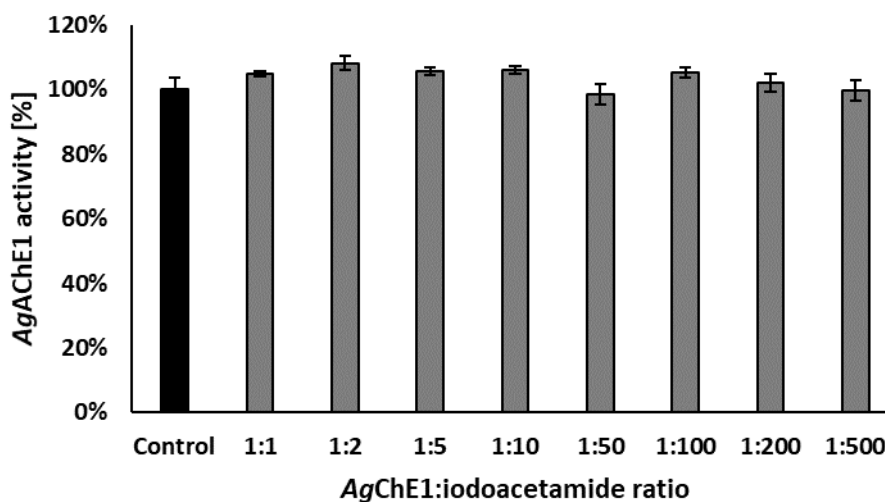


Figure S3. Influence of iodoacetamide ratio on activity of AgChE1.

7. Molecular modelling studies

The structure of AgAChE1 catalytic subunit was gained from RCSB Protein Data Bank – PDB ID: 5YDH. For comparative purposes, we also included G119S resistant mutation structure (PDB ID: 6ARX).³ Receptor structures were prepared by DockPrep function of UCSF Chimera (version 1.4) and converted to pdbqt-files using AutodockTools (v. 1.5.6).^{4,5} In case of using G119S resistant mutation structure, Ser119 was manually replaced with Gly119. Flexible residues selection was based on our previous experience with *HssAChE* or spherical region around the binding cavity.^{6,7} Three-dimensional structure of ligand was built by Open Babel (v. 2.3.1), minimized by Avogadro (v 1.1.0) and converted to pdbqt-file format by AutodockTools.⁸ The docking calculations were done by Autodock Vina (v. 1.1.2) with the exhaustiveness of 8.⁹ Calculations were repeated 15 times for each ligand and receptor and the best-scored result was selected for manual inspection. The visualization of enzyme-ligand interactions was prepared using The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany. 2D diagrams were created with Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego, USA: Dassault Systèmes, 2016.

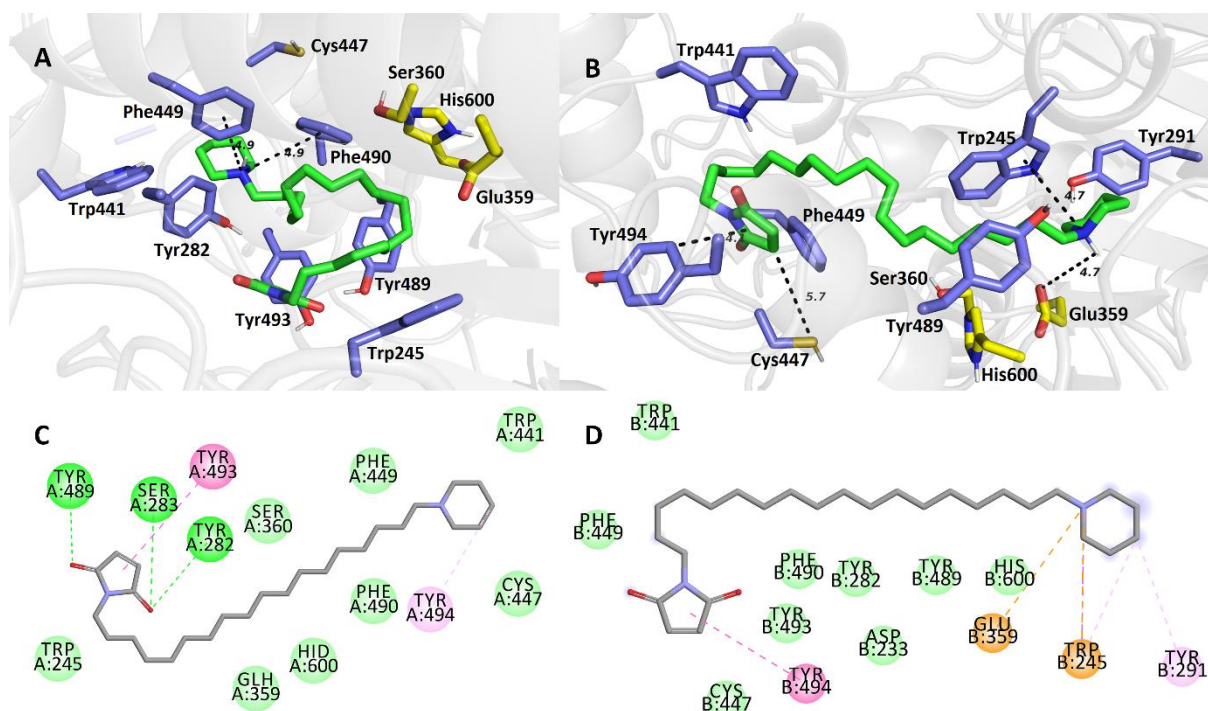


Figure S3. Superimposition of **15a** in the *AgAChE1* active site (PDB ID: 6ARX, G119S mutation – A and C; PDB ID: 5YDH, wild type – B and D). The overall topology with particular focus on PAS region is demonstrated in A and B. The close-up view for ligand is presented as three-dimensional (A, B) and two-dimensional (C, D) diagrams. Compound **15a** is presented in green (A and B), important amino acid residues in blue and catalytic triad residues in yellow.

8. Time-dependent stability measurement of **15a** and **15b**

The stability of compounds **15a** and **15b** was determined by incubation of compounds in pure distilled water or 10 mM ammonium acetate buffer (pH 7.2) at 40°C every hour. The amount of compounds remaining in the sample was determined by UHPLC–MS/MS on a 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm Zorbax RRHD Eclipse plus C18 column (Agilent), by using an 6470 Series Triple Quadrupole mass spectrometer (Agilent) (electrospray ionisation - positive ion mode). Two MRM transitions were followed for each compound: **15a** (m/z 433.4⇒110.0, 86.1), **15b** (m/z 461.4⇒100.0, 86.1). Eluents: (A) 0.05% formic acid in water; (B) 0.05% formic acid in acetonitrile.

9. References

- (1) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-Stone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- (2) Zor, T.; Selinger, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* **1996**, *236* (2), 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>.

- (3) Cheung, J.; Mahmood, A.; Kalathur, R.; Liu, L.; Carlier, P. R. Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles Gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Struct. Lond. Engl.* **2018**, *26* (1), 130-136.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.11.021>.
- (4) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (5) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (6) Hepnarova, V.; Korabecny, J.; Matouskova, L.; Jost, P.; Muckova, L.; Hrabanova, M.; Vykoukalova, N.; Kerhartova, M.; Kucera, T.; Dolezal, R.; et al. The Concept of Hybrid Molecules of Tacrine and Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *150*, 292–306. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.083>.
- (7) Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabanova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; et al. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Mol. Basel Switz.* **2017**, *22* (8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081265>.
- (8) O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An Open Chemical Toolbox. *J. Cheminformatics* **2011**, *3*, 33. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.
- (9) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Příloha č. 3

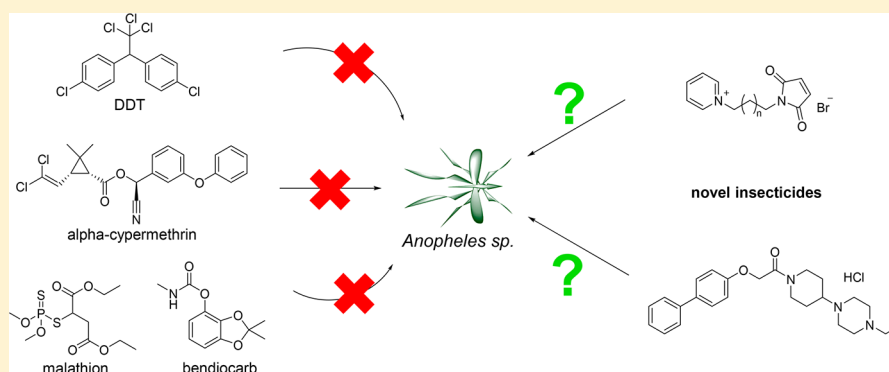
Vector Control and Insecticidal Resistance in the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*

Monika Schmidt,^{†,‡,⊥} Veronika Hrabcova,^{†,‡,⊥} Daniel Jun,^{†,§} Kamil Kuca,^{†,‡} and Kamil Musilek^{*,†,‡,⊥}

[†]Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

[‡]Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Hradec Kralove, Rokitanskeho 62, 500 03 Hradec Kralove, Czech Republic

[§]Faculty of Military Health Sciences, Department of Toxicology and Military Pharmacy, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic



ABSTRACT: Mosquito-borne diseases (including malaria) belong among the leading causes of death in humans. Vector control is a crucial part of the global strategy for management of mosquito-associated diseases, when insecticide use is the most important component in this effort. However, drug and insecticide resistance threaten the successes made with existing methods. Reduction or elimination of malaria is not possible without effective mosquito control. This article reviews current strategies of intervention in vector control to decrease transmission of disease and covers current relevant knowledge in molecular biology, biochemistry, and medicinal chemistry.

CONTENTS

1. Introduction	534
2. Malaria Transmission	535
3. Transmission Blocking Drugs	535
4. Vaccination	535
5. Vector Control	536
5.1. Insecticides Targeting Voltage-Gated Sodium Channels	536
5.2. Insecticides Targeting Acetylcholinesterase	537
5.3. Insect Growth Regulators	538
5.4. Bacterial Larvicides	538
6. Resistance Mechanisms in <i>Anopheles gambiae</i>	539
6.1. Target-Site Modification of VGSC	539
6.2. Target-Site Modification of Acetylcholinesterase	539
6.3. Metabolic Detoxification	539
7. Strategies To Overcome Resistance	540
8. Newly Designed Insecticides	540
9. Conclusion	543
Author Information	543
Corresponding Author	543
ORCID	543
Author Contributions	543

Funding	543
Notes	543
Biographies	543
Acknowledgments	544
Abbreviations	544
References	544

1. INTRODUCTION

Vector-borne diseases belong among the major causes of illness and death in many tropical or subtropical countries. In 2016, 216 million new cases of malaria (transmitted by *Anopheles gambiae*) occurred globally and led to about 445 000 deaths. The African countries accounted for the highest number of global cases of malaria (90%), followed by the South-East Asian (7%) and the Eastern Mediterranean countries (2%).¹ Malaria in humans is caused by five species of protozoan parasites that belong to the genus *Plasmodium*. Four of them, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale*, are responsible for human malaria transmitted from one person to another and are spread by female

Received: October 12, 2017

Published: May 31, 2018

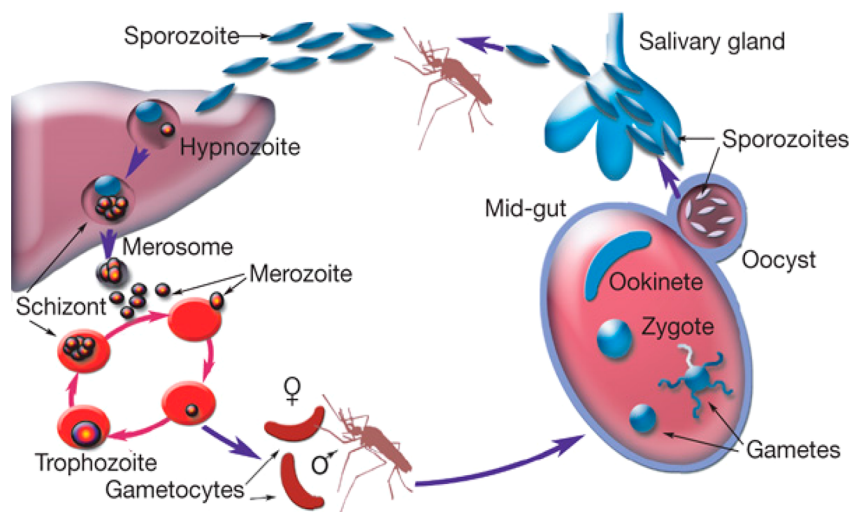


Figure 1. Life cycle of the malaria parasite.^{11,12}

Anopheles mosquitoes. In recent years, malaria associated with *P. knowlesi* has been reported as a zoonosis in forested areas of Southeast Asia. To date, information has suggested that this malaria is transmitted by mosquitoes from infected monkeys to humans.²

P. falciparum malaria is the most prevalent type of malaria and also the most severe disease on the African continent. *P. vivax* has broader geographical distribution, in Asia and America, when it can be developed in the *Anopheles* mosquito in lower temperatures and it can survive in a cooler climate.^{1,2} *P. vivax* and *P. ovale* have a dormant liver stage that may be activated months after an initial infection and can cause relapse of symptoms.³

2. MALARIA TRANSMISSION

Malaria is transmitted by a female *Anopheles* mosquito, which can inject hundreds of sporozoites into bloodstream of a vertebrate host.^{4,5} The *Plasmodium* parasite has a complex life cycle, which consists of numerous transitions and stages (Figure 1). The *Plasmodium* migrates to the liver and forms parasitophorous vacuoles in hepatocytes. At this point, it can remain dormant as a hypnozoite (*P. ovale* or *P. vivax*) or develop into thousands of merozoites (*P. falciparum*). The parasites further induce detachment of the infected hepatocytes, allowing them to migrate to the liver sinusoid where vesicles filled with parasites (syn. merosomes) are formed.⁶ Between 2 and 16 days (depending on the *Plasmodium* species), the new merozoites invade erythrocytes and replicate. Over the next 48 h, the parasite progresses through several stages (ring, trophozoite, and schizont) and produces approximately 16 daughter merozoites per schizont.^{6,7} The schizonts then burst producing the characteristic fever and chills cycles and the disease is clinically manifested. In a nonimmune individual, malaria symptoms include fever, sweating, headache, nausea, vomiting, and chills. The incubation period of the disease is from 7 to 30 days.⁸

In each replication, some merozoites are developed into gametocytes, which can subsequently infect other mosquitoes. When they enter the mosquito via a blood meal they are rapidly transformed into activated male and female gametes. The ookinete (motile and short-lived diploid parasite form) migrates out of the blood meal, through the peritrophic matrix to the midgut where an oocyst is produced. Within the oocyst, numerous sporozoites are formed after a meiotic reduction of the

chromosome. When the oocyst ruptures the sporozoites migrate to the salivary gland where they wait for transfer to the host, completing the transmission cycle.⁹ The transmission of malaria from humans to mosquitoes is much dependent on evolution of the *Plasmodium* sexual stages and it is considered as a possible intervention point via vaccination or transmission-blocking agents.¹⁰

3. TRANSMISSION BLOCKING DRUGS

The sporogonic stage of the parasite life cycle is one of the key targets for preventing malaria spreading. Transmission-blocking strategies are aimed to reduce the prevalence of infection in endemic population by targeting vector stage of *Plasmodium*. Antimalarials with transmission-blocking activity should interrupt the transmission of the disease from an infected host to the vector and thus clear the parasite from the vector. Screening of commercially available antimalarial drugs with gametocytocidal activity was one of the first approaches toward finding transmission blocking compounds. Gametocytocidal activity of commercially available antimalarial drugs is able to block transmission by eliminating most of gametocytes in the human. These patients render as noninfectious to mosquitoes with high impact to reduction of transmissibility of the infection.^{11,12} Artemisinin (1) combination therapies (ACT), which include low-dose primaquine (2) (Figure 2), have been developed for eliminating malaria in Cambodian villages;¹³ however, it is not clear if the role of primaquine, specifically its effect on the gametocyte, was responsible for reduction of the disease in the population.¹⁴ Nevertheless, World Health Organization (WHO) recommended that primaquine (0.25 mg/kg) should be administered in combination with ACTs as a gametocytocidal agent to decrease *Plasmodium* transmission. Combinations of other compounds such as artesunate (3) plus pyronaridine (4), artemisinin (1) plus piperaquine (6), artesunate (3) plus pyronaridine (4), artemisinin (1) plus naphthoquine (7), and artemisinin plus piperaquine are new ACTs (Figure 2), which are registered and used in some countries. In addition, there are several new generic formulations of existing drugs. None of these provided sufficient evidence for general recommendation to become an antimalarial drug combination (i.e., for unrestricted use).¹⁵

4. VACCINATION

No malaria vaccine is available to date. The new tools including vaccines are necessary to maintain recently achieved standards of

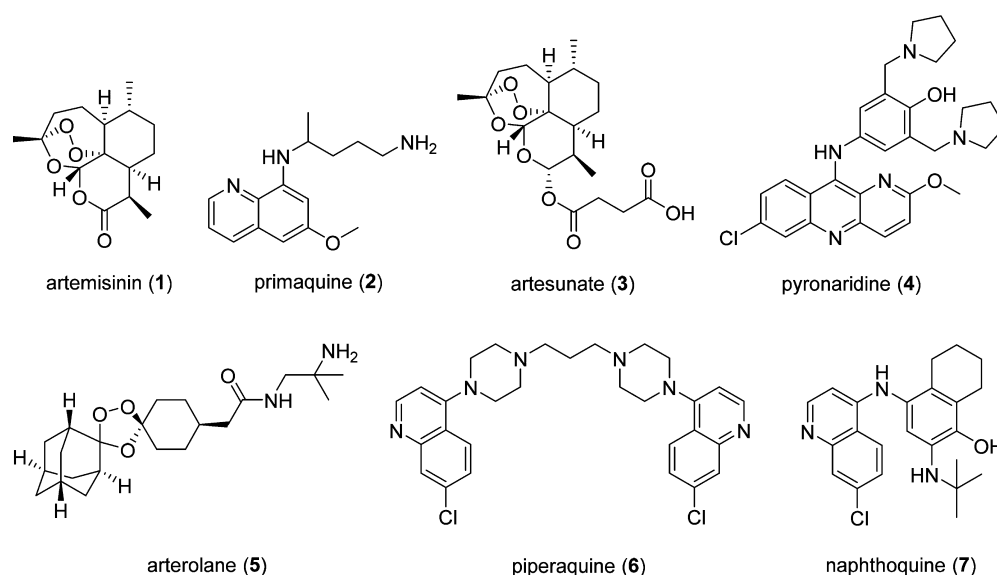


Figure 2. Chemical structures of widely used transmission-blocking drugs.

disease control and to continue the elimination or global eradication of malaria. The developed vaccines in the past 30 years targeted pre-erythrocytic stages (sporozoite and liver stages), blood stages, and transmission-blocking vaccines (sexual stages).^{10,16} An effective vaccine against the sexual stages should interrupt the transmission cycle but would not have effect on the already induced infection in the vaccinated person. On the other hand, vaccines aimed to the replicating (asexual) blood stages should be highlighted to reduce morbidity and mortality.¹⁰ The most advanced clinical candidate to date is RTS,S/AS01, an anti-sporozoite vaccine. This vaccine influences immune responses to the circumsporozoite protein that is presented on the surface of *P. falciparum* sporozoites and liver stage schizonts.¹⁷ This vaccine already passed through phase III clinical trials involving over 15 000 African children. It is considered to be the gold experimental standard, which will be used for evaluation of all future vaccines. The vaccination follow-up study with a three-dose regimen reduced cases of clinical malaria in young children by 28% and in infants by 18%.¹⁸ The goal of further research is to develop a second-generation of vaccine(s) by year 2030 that will accomplish broad and long-term protection against multiple *Plasmodium* species and strains.¹⁶

5. VECTOR CONTROL

Since the mosquito plays an important role in the parasite life cycle, a vector control insecticide is crucial for reducing malaria transmission. Mosquito control has depended mainly on the effects of chemical insecticides since the introduction of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT, 8) and other organochlorine insecticides from the 1940s. When DDT was excluded from the malaria control program of South Africa in 1996, one of the worst malaria outbreaks in the history of the country occurred. Between 1996 and 2000, the amount of malaria patients in South Africa increased by over 450% with mortality increasing by almost 1000%.¹⁹ In South African KwaZulu Natal, the epidemic was only controlled when DDT was reintroduced in 2000.²⁰ In 2006, DTT was reintroduced by WHO for indoor residual spraying (IRS) to decrease malaria transmission.²¹ To date, only four classes of insecticides (organochlorides, carbamates, pyrethroids, and organophosphates) have been evaluated and recommended for use by the WHO pesticides

evaluation scheme (WHOPES) in public health (more information on www.who.int/whopes/en).²² These insecticides can be further subdivided based on their modes of action, at the insect voltage-gated sodium channel (VGSC) activators or the insect acetylcholinesterase enzyme inhibitors. Malaria control consists in the use of insecticides for indoor residual spraying or for mosquito net treatments. All insecticides from these four classes can be used as the active compounds for indoor residual spraying, but only pyrethroids are approved for application on insecticidal nets. The effectiveness of nets treated with pyrethroid insecticide is highly improved by generating a chemical halo that is even more effective than the mosquito net itself. This use of insecticide tends to either deter or repel mosquitoes from biting or substantially shorten their life span. Where pyrethroids are the only option for treating the mosquito nets to date, it is important to maintain the use of these insecticides for as long as possible. Studies in areas with pyrethroid resistance have indicated that pyrethroid-impregnated nets in combination with insect growth regulator reduce malaria transmission in spite of a high frequency of pyrethroid resistance in mosquito populations.²³

5.1. Insecticides Targeting Voltage-Gated Sodium Channels. Two main classes of insecticides used for adult mosquito control target voltage-gated sodium channel (VGSC) functions. Chlorinated hydrocarbons (organochlorines) such as DDT (8; Figure 3) and pyrethroids (9–14; Figure 3) have this mechanism of action targeted on the insect nervous system. Currently, pyrethroids are the most effective and safest insecticide for control of adult malaria vectors. They are the only class approved and recommended by WHO for insecticidal net fabric because of their decreased human toxicity and selective rapid effects on mosquitoes.²² The selective toxicity of pyrethroid insecticides is largely based on the higher affinity of pyrethroid insecticides for insect sodium channels than for mammalian sodium channels.^{24,25} The difference in body temperature and the size of insects compared to humans also have a huge impact and lead to lower toxicity for humans. Specifically, the toxic potency of pyrethroids and DDT greatly increases with lower temperatures. Moreover, the metabolism of insecticides is slower in insects than in mammals, which together with the insect's small body size allows the insecticides to reach their target before detoxification.^{25,26}

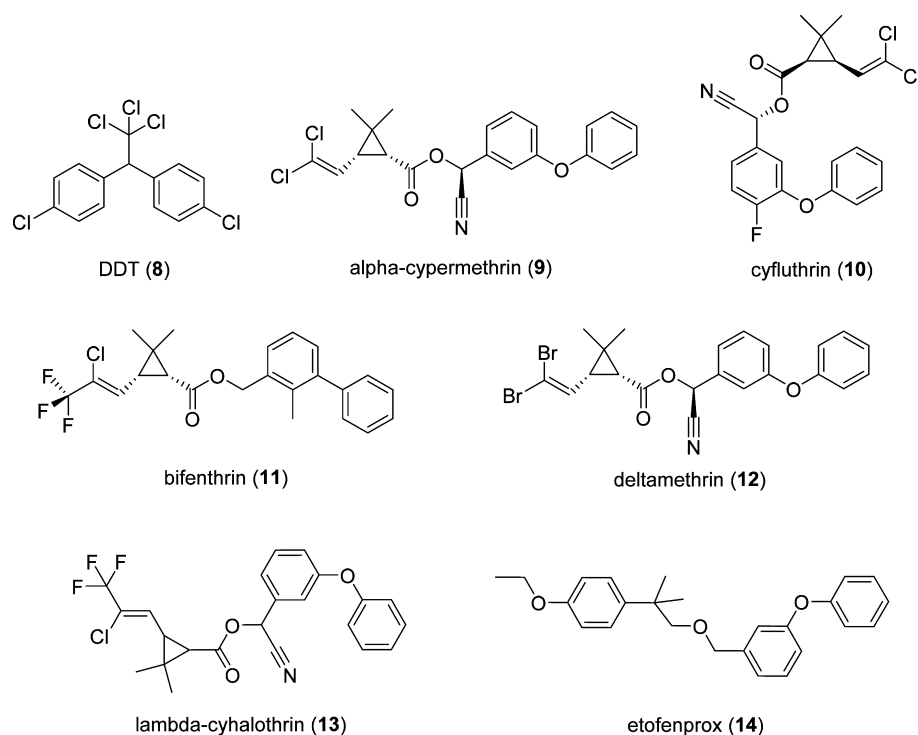


Figure 3. Organochlorine insecticide (DDT) and pyrethroids recommended by WHO for indoor residual spraying against malaria vectors.

Sodium channels are crucial for controlling electrical signals in the nervous system. These transmembrane proteins form a pore in the membrane and are highly selective for sodium ions. In the normal mode of action, the membrane current flow of sodium ions activates the channel to open and then inactivates to shut the channels in response to depolarization of the membrane potential. This action lasts only a few milliseconds, and the sodium channels are rapidly inactivated. The shut-down of the pyrethroid-modified sodium channel is prolonged (from milliseconds to minutes) and the delay in action results in persistent excitation. This results in repetitive firing, repetitive activity on the sense organs, depolarization of the membrane, suppression of the amplitude of the nerve pulse, enhanced release of the neurotransmitter, and blocked excitation of the sodium channel.^{27–29} The pyrethroids and DDT preferably target the open state of the VGSC, and the binding to the channel seems to stabilize the open state and inhibit the transition to the deactivated or inactivated forms of the channel.^{27,30,31}

The *Anopheles gambiae* sodium channel α -subunit gene contains 6420 nucleotides and encodes a 2139-amino acid protein with a predicted molecular mass of 240 kDa. The sodium channel is a transmembrane protein with the expected topology of four large hydrophobic domains (I–IV), each of which has six membrane-spanning segments (S1–S6) connected by several loops.¹⁹ The cDNA for the *Drosophila melanogaster* sodium channel possesses 82% identity with the *An. gambiae* sequence and in both organisms alternative and optional splicing can introduce sodium channel protein variants differentially sensitive to insecticides.³² The other process that can influence sodium channel diverse function is RNA editing. This post-transcriptional modification can change the gene transcripts by introducing site-specific alterations—one base to other conversion, or insertion or deletion of specific nucleotides. Since the RNA editing is a major mechanism for increase of sodium channel functional plasticity, the identification of alternative splicing and

RNA-editing variants critical for sodium channel function in insecticide interaction can provide the information for understanding the physiological roles of this post-transcriptional mechanism.^{33,34}

Although the pyrethroids and DDT share the same mechanism of action, they differ in the binding sites within VGSC. In a sodium channel in the opened conformation, the insecticide binding site is placed in a lipophilic cavity in the domain II S4 (bordered by S4–S5 linker), domain II S5, and domain III S6 helices. This cavity can be entered from the lipid bilayer and allows entry by lipophilic insecticides. The binding of the insecticide to the channel can stabilize the channel in the open state.³⁵ This model was confirmed by site-directed mutagenesis of key residues in the binding region of cockroach (*Blattodea sp.*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*) sodium channels. The substitutions altered sodium channel sensitivity to selected insecticides and provided the evidence that alteration of amino acids in the binding domain for insecticides can contribute to the distinct binding properties of insect sodium channels.^{36,37}

5.2. Insecticides Targeting Acetylcholinesterase. A large group of adult vector insecticides consists of carbamates (CA) and organophosphates (OP). OP and CA are commonly used for insect control and share the same target in *An. gambiae* mosquito: the enzyme acetylcholinesterase (recently reviewed³⁸). Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is a serine hydrolase located at cholinergic synapses of most invertebrates and vertebrates.³⁹ The function of AChE is in regulation of cholinergic neurotransmission where it terminates the neurotransmission by rapid decomposition of the neurotransmitter acetylcholine to acetate and choline. AChE inhibition leads to accumulation of acetylcholine in the synapses preventing the interruption of neurotransmission. AChE is a very efficient enzyme with a turnover of 10^3 to 10^4 s⁻¹.^{39–41}

The first invertebrate acetylcholinesterase 3D structure to be determined was for the fruit fly, *Drosophila melanogaster*

(DmAChE). The solved structure of DmAChE was then compared with vertebrate enzymes from the Pacific electric ray, *Torpedo californica* (TcAChE), and from humans (hAChE) to determine the main structural differences. Although only low sequence identity was found between DmAChE and TcAChE (36%), the 3D structures folded similarly and their active sites closely overlapped.⁴² More recently, the crystal structure of the G119S AChE mutant of *An. gambiae* (AgAChE) resistant to most cholinesterase targeted insecticides was revealed.⁴³ Compared to hAChE, a less aromatic and enlarged peripheral active site was found for AgAChE, confirming the presence of C447 close to the entrance of the gorge instead of F295 in hAChE. Moreover, the open channel was found on the base of the gorge, supporting the idea of rational design of improved and selective AgAChE targeted insecticides.

Increased insensitivity to present insecticides in specific strains of the northern house mosquito without confirmed mutation in the *ace* gene led to the two-*ace*-gene hypothesis.^{44–47} This hypothesis was suggested by Bourguet et al., who found two *ace* genes in *Culex pipiens*, differing in substrate specificity and inhibitory sensitivity.⁴⁸ The hypothesis was confirmed with subsequent reports of a paralogous *ace* gene in the African malaria mosquito (*An. gambiae*).⁴⁹ To date, it is known that many disease-transmitting or crop-pest insects have two *ace* genes (*ace1* and *ace2*) leading to two AChE proteins (AChE1 and AChE2). However, the true fly species (the higher *Diptera*) have only one *ace* gene and thus one AChE protein.⁴⁹ The functional specialization between two AChEs in mosquitoes revealed that AChE1 serves the main synaptic function, whereas AChE2 plays only limited synaptic role.⁵⁰ Organophosphorus insecticides were discovered in 1937 in Germany.⁵¹ In the 1970s, OPs replaced the organochlorine insecticides that were banned for their persistence and accumulation in the environment. After extensive use during 1990s (especially in India), a decline in the use of organophosphates has taken place since about 2001.⁵² Although the human and insect nervous systems are very similar (cholinergic nervous systems), the organophosphates act at the insect's central nervous system synapses but not at the neuromuscular junctions, where glutamate and gamma-aminobutyric acid are responsible for the insect's neuromuscular transmission.⁵³ Organophosphorus insecticides are irreversible inhibitors that inhibit AChE by forming a phosphorus conjugate covalently bound to the catalytic serine residue S199 (S203 for human AChE). In some cases, the phosphorus conjugate may affect the peripheral anionic site conformation, although it is distantly located from the catalytic site. Inhibition of the AChE enzyme blocks nervous transmission and leads to the death of the insect. Organophosphate insecticides can be rapidly degraded, but they have a high acute poisoning risk for highly exposed people.⁵⁴ Organophosphate insecticides also require monooxygenase-mediated bioactivation to be converted from the phosphonothioate (P = S analogue) form to the oxon form (P = O analogue) before acting as powerful AChE inhibitors.^{55,56} The organophosphorus AChE inhibitors malathion (15), fenitrothion (16), and pirimiphos-methyl (17) were recommended by WHO for indoor residual spraying against malaria vectors (Figure 4).²²

Carbamate (CA) insecticides are considered reversible inhibitors of the AChE enzyme. The interest in CA originated with usage of the naturally occurring alkaloid physostigmine, which was identified in 1925 and is used to treat myasthenia gravis.⁵¹ Later in the 1950s, Metcalf et al. developed aryl methylcarbamates and a very effective carbamate called carbaryl was introduced by Union Carbide Corporation. Since then, CA analogues

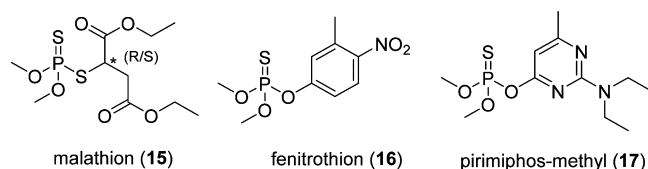


Figure 4. Organophosphates recommended for indoor residual spraying against malaria vectors.

have been applied as pesticides.⁵¹ CA inhibit AChE by carbamylation at the active site serine residue. As carbamates act as pseudo-irreversible inhibitors of AChE, the serine–carbamate complex is not stable and the carbamylated serine residue can be split from the active site by spontaneous hydrolysis (decarbamylation in about 30–40 min), in contrast to the nonreversible and long-lasting mechanism of action of organophosphates.⁵⁷ Carbamates cause toxic acute effects and symptoms similar to poisoning by organophosphates. Additionally, organophosphorus insecticides produce a delayed neurotoxic effect in humans, called OP-induced delayed neuropathy. This neuropathy is linked to phosphorylation and further dealkylation of a protein called neuropathy target esterase. CA are thought to be unable to initiate the neuropathy and thus are not delayed neuropathy inducers, and have lower dermal toxicity compared to OP.⁵⁸ Currently recommended CA for indoor residual spraying against malaria vectors are bendiocarb (18) and propoxur (19) (Figure 5).²²

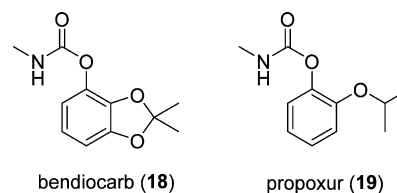


Figure 5. Carbamates recommended for indoor residual spraying against malaria vectors.

5.3. Insect Growth Regulators. In addition to the conventional chemical-based insecticides, there are also alternatives such as insect growth regulators (IGR). These compounds interfere with metabolism and affect insect growth by acting via disruption of embryogenesis and metamorphosis. During insect development from egg to adult, IGR may inhibit the formation of chitin (chitin inhibitors) or they may replace or disrupt the production of juvenile hormones (juvenile hormone analogues). As they are not neurotoxic, they appear to have less potential to be harmful to man and other vertebrates than conventional insecticides. IGR are lethal to eggs, larvae, and pupae.⁵⁹ The most-used IGR is methoprene, a juvenile hormone analogue, which has been used for control of mosquitoes and other pests from the order *Diptera* over the past 40 years.⁶⁰ Methoprene blocks midgut metamorphosis in *Ae. aegypti* and delays egg maturation in *An. gambiae*, thus acting on female mosquito reproduction.^{61,62}

5.4. Bacterial Larvicides. Novel vector control strategies, that is, the use of biological toxins, viruses, microorganisms, and natural products, so-called biopesticides, are under development.⁶³ Bacterial larvicides, that is, *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) and *B. sphaericus*, are already in use for malarial mosquito control.⁶⁴ Current trends in biological larvicides, their mechanism of action, and implications for resistance were reviewed by Ferreira et al. and by Poopathi.^{65,66} Briefly, *B. sphaericus* and *Bti* produce insecticidal proteins, which interact with the larval midgut. These protoxins are ingested and bioactivated by larvae

into active toxins, which further interact with receptors in the midgut epithelium leading to cytopathological effects and larval death.⁶⁵ In addition, the cyanobacteria expressing mosquitoicidal *B. thuringiensis* proteins are developed for the same purposes. By contemporary techniques, it should be possible to design smart bacteria (by combining the genes from a variety of organisms) that will seek and destroy larvae of specific vector mosquitoes. Furthermore, several cost-effective culture media from biological waste materials (e.g., clarified butter waste, coconut oil cake, corncob, coffee husk waste) were used to yield a superior level of bacterial production than conventional Luria–Bertani or Nutrient Yeast Extract Salt media. Thus, the industrial production of *B. sphaericus* and Bti is cost-effective, readily available, environmentally safe, and recycles environmental waste.⁶⁷

6. RESISTANCE MECHANISMS IN ANOPHELES GAMBIAE

Three resistance mechanisms of insecticides are known in *An. gambiae*: two target-site modifications and enhanced metabolic detoxification of insecticides.

6.1. Target-Site Modification of VGSC. One of the best known resistance mechanisms is termed knockdown resistance (*kdr*), which was first observed in the house fly, *M. domestica*, in Sardinia, Italy.⁶⁸ Later a single leucine-phenylalanine change at position 1014 was identified to be responsible for the *kdr* resistance phenotype.⁶⁹ Many mutations occur at this key residue located in the binding pocket of the sodium voltage channel enclosed by linkers S4–S5 of domain II plus S5 and S6 helices also in domain II. The same mutation can be found in resistant strains of *An. gambiae*, where the *kdr* resistance is strongly connected with the mutation of a leucine residue at position 1014 located within the binding pocket of the S6 transmembrane segment of domain II region of VGSC (numbering according to *M. domestica* sodium channel). The binding pocket key leucine residue is mostly substituted with a phenylalanine (L1014F) or serine residue (L1014S).^{70,71} Recently, a new mutation in the sodium channel of *An. gambiae* at position 1575 was reported. This mutation is located within the domain III–IV linker of the sodium channel. The change of asparagine to tyrosine (N1575Y) occurs only together with the L1014F mutation, providing the mosquito with additional benefit associated with the resistant phenotype.⁷² In addition to the *kdr* resistance phenotype, the *superkdr* resistance phenotype (M918T) associated with high pyrethroid insensitivity was identified in the *M. domestica* genome.⁶⁹ The M918 amino acid residue is located in the connecting linkage between domain II and III plus this mutation is responsible for the reduction of pyrethroid sensitivity up to 1000-fold compared to the wild-type variant.^{73,74} To date, no *superkdr* M918T phenotype substitution has been observed in *An. gambiae*, the major malaria mosquito vector.

6.2. Target-Site Modification of Acetylcholinesterase. The insensitivity of AChE in *Anopheles* was first observed in *An. albimanus* strains collected in Salvador in 1970. The active site was altered resulting in failure of certain OP and CA to bind.⁷⁵ The increased resistance was confirmed in malaria vector populations of *An. gambiae* in the Ivory Coast, West Africa first to pyrethroids and later also to carbamates.^{76,77} Carbamate and organophosphate resistance was later described as a single amino acid mutation at position 119 in AChE1.⁷⁸ This glycine-to-serine substitution (G119S), termed *ace-1R*, was generated by a GGC to AGC codon replacement, and this single point mutation created a restriction site and is therefore detectable by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

diagnostics.^{78,79} The mutated G119 residue lies within the oxyanion hole close to the catalytic active site and the mutation leads to a significant change in function. The mutation reduces the volume of the active site and the G119 residue blocks the carbamylation of the catalytic serine residue S199.⁷⁸ The recombinantly expressed and purified catalytic part of G119S-AChE1 revealed only 3% turnover number of the wild-type enzyme.⁸⁰

6.3. Metabolic Detoxification. A well-known resistance mechanism in *An. gambiae* and other insect species is metabolic enhancement of insecticide detoxification. The mechanisms of detoxification are based on overexpression of detoxifying enzymes belonging to carboxylesterases (COEs), cytochrome P450 monooxygenases (P450s), and glutathione S-transferases (GSTs).⁸¹

The monitoring and detection of resistant alleles of *An. gambiae* target sites is an important aspect of malaria control. Many assays are based on molecular biology techniques for resistance sequence detection. In the metabolic detoxification process, many enzymes can be involved and thus large-scale assays using microarray analyses are indispensable. After the first generation of genome expression analysis of *An. gambiae* mosquito defense reaction, the highly specific microarray chip was developed.⁸² This type of microarray chip is focused on gene identification differentially expressed in metabolic-based insecticidal resistance.⁸³

Genome-sequencing methods of mosquito investigation were widely used and provided tools to intensify insecticide resistance research. Deep sequencing together with cloning of individual metabolic genes led to better understanding of the protein function and revealed the resistance mechanism. The Basic Local Alignment Search Tool was used to identify probable genes coding for COE, P450, and GST proteins of the *An. gambiae* genome. Sequence features regarding conserved regions, catalytic active sites, and protein sequence lengths were used to confirm proper gene categorization and clustering into the protein families. This process provided information about 51 putative COEs, 31 GSTs, and 111 P450 gene sequences in the *An. gambiae* genome. Unfortunately, the genome search provides no information about coding of functional (active) proteins.⁸⁴

The overexpression of metabolic genes for pyrethroid resistance (CYP6P3, CYP6M2, and GSTD3) in *An. gambiae* was reported in Benin in 2014. At the same time, no increase in *kdr* mutation frequency was found in Benin during the period 2012–2014. The increase of deltamethrin resistance in this area was a result of increased expression of genes responsible for metabolic detoxification rather than from *kdr* mutations.⁸⁵ Moreover, the absence of *kdr* alleles in resistant mosquitoes confirms the importance of metabolic detoxification for the *An. gambiae* resistance phenotype.⁸⁶

Although the methods of molecular and cellular biology provide powerful tools to analyze expression of certain genes, the relationship between unique genes and their interactions must be considered. Multiple and complex mechanisms are involved in mosquito resistance to insecticides. Since gene overexpression and target-site insensitivity are important in resistance mechanisms, the interaction of resistant and regulatory genes may play a crucial role in insecticide resistance.⁸⁷

More recently, cuticular resistance such as thickening of the cuticle suggests another mechanism of resistance besides metabolic enhancement and target-site modification. The overexpression of cuticular genes CPLC8 and CPLC# after insecticide exposure revealed their potential in pyrethroid metabolism in *An. gambiae*.⁸⁶

The analysis of cuticular lipids from *An. gambiae* populations in Nigeria, Tanzania, and Gambia suggested differences in carbohydrate composition.⁸⁸

7. STRATEGIES TO OVERCOME RESISTANCE

In recent years, mosquito-vectored diseases have re-emerged as significant human health issues in many regions. Numerous factors are involved including lack of progress in vaccine development, the development of resistance by *Plasmodium sp.* to available drugs, the socioeconomic decline in some disease endemic countries, and the presence of resistance in mosquitoes to routinely used insecticides (such as DDT and pyrethroids).¹⁹ The large-scale production and common use of insecticides resulted in their accumulation in ecosystems, causing environmental contamination and toxicity to many off-target species including humans.⁵¹ The extension of insecticide resistance also limits the effectiveness of commonly used insecticides. There have been serious reports from regions in sub-Saharan Africa of pyrethroid resistance among *Anopheles sp.*^{89,90}

The strategies recommended by WHO in its Global Malaria Program are guided by the Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030.⁹¹ It provides ambitious global targets for 2030 including eliminating malaria in at least 35 countries, reducing malaria mortality rates and malaria incidence by at least 90%, and preventing a resurgence of malaria in all regions that are free of malaria. The fight against malaria is being prolonged by several interconnected challenges such as the lack of predictable, robust, and sustained domestic and international financing and by biological challenges already mentioned above such as parasitological and insecticidal resistance, which has the potential to seriously weaken the effectiveness of malaria responses and to erode recently achieved gains.⁹¹

If coverage of malaria interventions remains at current levels, malaria incidence could increase moderately based on mathematical modeling. However, the rise of the disease and its consequences could be averted through a combined effort to optimize the use of currently available tools. Vector control, at levels covering above 80% in at-risk populations, could significantly reduce the incidence and death rate. However, it will be operationally difficult to reach this level of coverage for vectors. Thus, further innovations in tools and approaches are needed for elimination of transmission in areas with high transmission rates.⁹¹ There is no predictable route to find a new mechanism of action for insecticides, and serendipity appears to be more important than biorational approaches. First, future achievement depends on the structural diversity and the number of natural products or synthetic chemicals, their screening, optimization of structure–activity relationship through the synthesis of chemical analogues, and finally deep knowledge of the target site. The biorational way can be facilitated by enzyme, channel, or membrane target assays, which can supplement the determination of insecticidal activity.⁵¹

Some strategies not only rely on monitoring of the resistance evolution, but also on planning interventions to minimize the development of insecticidal resistance to antimalarial drugs. Other recommendations are based on diversified use of insecticides with different mechanisms of action instead of repeated use of insecticides with the same mechanism of action. The most effective resistance management is the use of combinations or mixtures of insecticides from different classes where at least one of them has a lethal effect on the resistant mosquito (e.g., a carbamate sprayed on the wall and a pyrethroid on long-lasting insecticidal nets).^{91,92}

8. NEWLY DESIGNED INSECTICIDES

One approach to development of selective insecticides is to find compounds with new modes of action. As was mentioned above, many disease-transmitting or crop-pest insects have two AChE enzymes (AChE1 and AChE2). In 2006, Pezzementi et al. published deactivation of an invertebrate AChE by thiol reagents interacting with free cysteines of the enzyme. The inactivation of enzyme activity suggested a covalent modification between the cysteines and sulfhydryl reagents.⁹³ Around the same time, Pang et al. published a 3D model of *An. gambiae* mosquito AChE1 using homology modeling plus refinement with multiple molecular dynamics simulations and found a native free cysteine (Cys286) residue located near the active site, which can serve as a target for novel insecticides (Figure 6).⁹⁴ A free Cys residue is

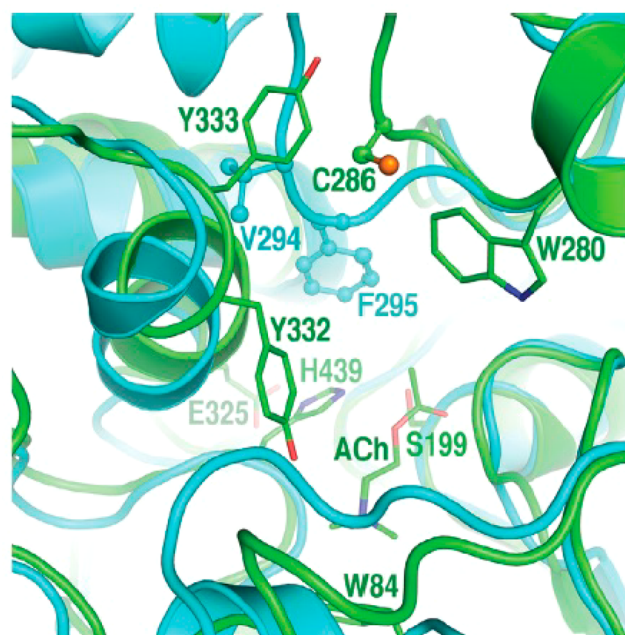


Figure 6. Superimposition of the *An. gambiae* insect acetylcholinesterase over the human counterpart. A perspective looking down on to acetylcholine (ACh) at the catalytic site. The Protein Data Bank IDs for the mosquito and human enzymes are 2AZG and 4EY4.⁹⁵

present at the entrance to the active gorge of insect AChE1 but not at that of AChE2 or AChE specific for mammals, birds, and fishes.^{93,94}

The methanethiosulfonate-containing molecule (**20**; Figure 7), a thiol-reactive compound designed to target the Cys residue,

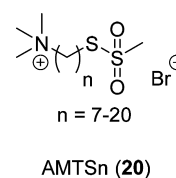


Figure 7. Chemical structure of methanethiosulfonate compounds.

irreversibly inhibited >95% enzyme activity of *An. gambiae* AChE1 after 1 h exposure at 6 μM concentration, while a similar exposure showed no effect on human AChE.⁹⁵ On the other hand, a full dose–response analysis detected in some compounds irreversible inhibition of human AChE at inhibitory concentrations of >10 μM . This proved the concept that the Cys residue

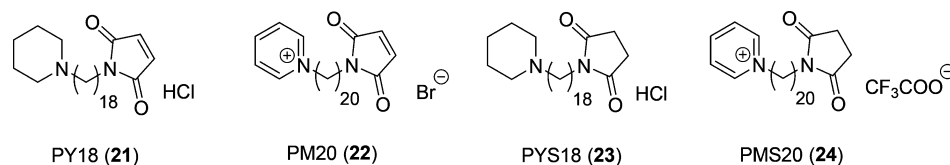


Figure 8. Chemical structures of second generation cysteine-targeting inhibitors.

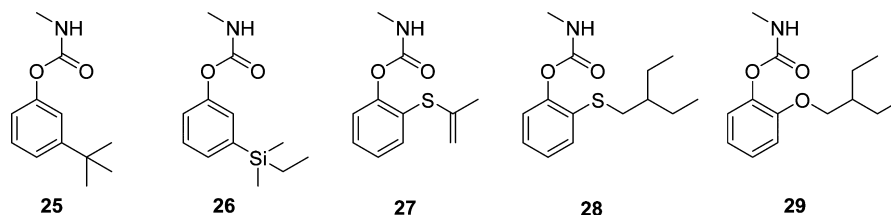


Figure 9. Chemical structures of experimental phenyl-substituted carbamates.

in AChE1 is a feasible target for development of selective insecticides.⁹⁵ To prove the conjugation of a reactive moiety to the insect-specific cysteine, second generation cysteine-targeted maleimide-containing inhibitors (21, 22; Figure 8) were designed. The maleimide moiety is assumed to form a carbon–sulfur bond to cysteine 286, and thus, adducts are stable during the digestion process and can be proved using LC–MS analysis. Succinimide analogues (23, 24), which cannot react with cysteine 286 but that are sterically similar to maleimide, were designed to estimate binding affinity.⁹⁶ Time-course experiments found irreversible inhibition of maleimide-containing inhibitors on recombinant insect AChE1, but not on recombinant human AChE. The succinimide-containing inhibitors were unable to inactivate either the insect or human enzyme. These data confirm that the insect-specific cysteine 286 is accessible for conjugation with reactive moiety. Although this conjugation can lead to selective and irreversible inhibition of AChE1, no insecticidal action has been reported for these compounds on any mosquito species.⁹⁶ Redesign of the classic insecticides is also a suitable way to develop novel selective insecticides. Hartsel et al. focused on variation of the aryl methylcarbamate pharmacophore.^{97–99} They synthesized phenyl-substituted carbamates (20a–e) (Figure 9), which had higher *An. gambiae*/human selectivity for *An. gambiae* AChE1 (>100-fold), unlike commercial carbamate insecticides (propoxur, bendiocarb, carbofuran).⁹⁷ Novel carbamates were found less toxic in comparison with commercial carbamates in both tarsal contact and topical application assay. Low correlation between tarsal contact activities of the novel carbamates and relevant inhibition potency indicates that other factors than enzyme inhibition ability influence *in vivo* insecticidal effectiveness of the tested carbamates.^{97–99} These experimental carbamates provided high selectivity toward mosquito species, coupled with low activity against agricultural insects and low oral toxicity in mice. All these results suggest that such novel carbamates could be beneficial for vector control programs.¹⁰⁰

A new approach to overcoming resistance to pyrethroids that are used for impregnation of insecticide-treated nets would be the development of new anticholinesterase-based compounds. To date, no AChE inhibitors approved by WHO for IRS have been approved for insecticide-treated nets, perhaps because of concerns about human toxicity. A two-in-one combination of pyrethroid and nonpyrethroid insecticides should be beneficial in vector control by its progressive exposure to different insecticides with distinct mechanism of action.¹⁰¹ Many attempts were made

to develop safe acetylcholinesterase inhibitors that ensure high selectivity for inhibition of *An. gambiae* AChE1 over human AChE. Novel acetylcholinesterase inhibitors should have effect not only on *An. gambiae* carrying wild-type AChE1 (G3 strain), but also on mosquitoes carrying its mutated variant, G119S (Akron strain).

Wong et al. synthesized pyrazol-4-yl methylcarbamates (30; Figure 10) to overcome the G119S carbamate resistance. These

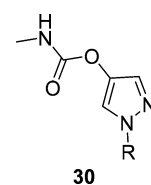


Figure 10. Chemical structure of pyrazol-4-yl methylcarbamates.

novel aryl methylcarbamates showed high *in vivo* toxicity to the *An. gambiae* Akron strain using tarsal contact toxicity assay. On the other hand, none of these carbamates exhibited suitable selectivity for inhibition of *An. gambiae* AChE1 over human AChE.⁸⁰

Novel carbamates and carboxamides have been prepared based on an isoxazole core (31, 32; Figure 11) targeting both

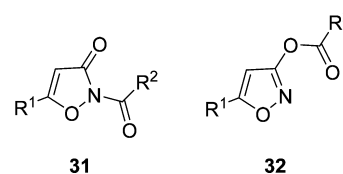


Figure 11. Chemical structures of carbamates and carboxamides with isoxazole core.

carbamate-susceptible (G3) and carbamate-resistant (Akron) strains of *An. gambiae*. The novel compounds showed high contact toxicity toward both G3 and Akron strains. Unfortunately, selectivity for *An. gambiae* AChE1 over human AChE for the novel compounds was very low, achieving a maximum of only eight-fold for the best compound.¹⁰²

Alout et al. screened a 3000-compound chemical library for the ability to inhibit more effectively the G119S-AChE1 enzyme than the wild type AChE1 in respect of organophosphate sensitivity. Pyrimidinetrione furan-substituted compounds (33, 34; Figure 12)

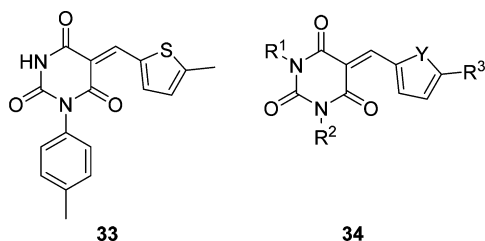


Figure 12. Chemical structures of the best insecticide candidates from high throughput screening by Alout et al.

resulted as the best hits, acting as irreversible and competitive inhibitors of mosquito AChE1. These compounds preferentially inhibited the AChE1 mutated form G119S, which is insensitive to organophosphates and carbamates. The compounds also showed *in vivo* toxicity toward organophosphate-resistant *An. gambiae* mosquito larvae. This new class of compounds called “resistance killers” can target preferentially OP-resistant mosquitoes and were predicted to be able to rapidly restore OP susceptibility in field populations.¹⁰³

To discover new selective AChE1 inhibitors, Engdahl et al. made a high throughput screen of 17 500 compounds for inhibition of AChE1 of *An. gambiae* and *Ae. aegypti*. About 338 compounds significantly reduced activity of *An. gambiae* AChE1, *Ae. aegypti* AChE1, or both. Further assays provided some insect/human selective hits, which can be divided based on their chemical diversity. Nine selected structures were assayed for dose–response analysis. One compound, phenoxyacetamide-based inhibitor (35; Figure 13), was potent as a noncovalent AChE1

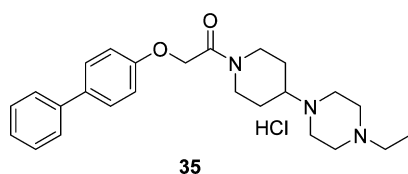


Figure 13. Chemical structure of phenoxyacetamide-based inhibitor from high throughput screening by Engdahl et al.

inhibitor, with IC_{50} values in the submicromolar range for both insects' enzymes. Moreover, it had a moderate selectivity ratio (>12) indicating preferential inhibition of insect enzyme. The phenoxyacetamide-based compound inhibited also G119S-AChE1, which is responsible for insecticide resistance. This new inhibitor combines selectivity for mosquito enzymes with potency for both the resistance-conferring mutation G119S and wild-type AChE1 and demonstrates a possibility for developing new selective noncovalent AChE1 inhibitors.¹⁰⁴

Recently, D1-like dopamine receptor (DAR) antagonists were introduced as a new putative insecticide class. The neurotransmitter dopamine and its receptors are essential for complex behavioral mechanisms in arthropods. Several studies have suggested that interference with the dopaminergic process might cause death or result in incapacitation or disrupted development, which makes DAR highly attractive for insecticide development.^{105,106} Invertebrates possess two D1-like receptors (DOP1 and DOP2) and a single D2-like receptor.¹⁰⁷ Comparison of DOP2 transmembrane domain sequences of selected invertebrates revealed high amino acid identity between transmembrane domains of *Ae. aegypti* in comparison with *Culex quinquefasciatus*, *An. gambiae*, and *D. melanogaster* (100%, 94%, and 97% of amino acid sequence identity, respectively). The comparison also

revealed lower amino acid identity between transmembrane domains of *Ae. aegypti* and human D1-like orthologs hD₁ (51%) and hD₅ (47%).¹⁰⁵

Ae. aegypti DOP2 antagonists with mosquitocidal properties were evaluated in early drug discovery studies and multiple compounds were shown to be more selective for the insect receptor versus human receptor. These antagonists were highly toxic to mosquito larvae *in vivo* for both *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus*. More recently, the toxicity of DOP2 antagonists was evaluated in *An. gambiae* larvae and demonstrated responses similar to those of *Ae. aegypti* DOP2 antagonists. The difference in antagonist activity between human and mosquito receptor suggests a possible strategy for new drug development emphasizing safety for nontarget organisms. The insect DOP2 antagonists are promising targets in vector control, although questions about the mechanisms of action and complex pharmacological responses still remain to be elucidated.^{105,108}

Research of natural insecticides that do not possess a toxic effect on the nontarget population and can be easily degraded belongs to the most prioritized. Plant species such as the Indian neem tree (*Azadirachta indica*) and Karanj tree (*Pongamia glabra*) provide essential oils with insecticidal effects.⁶³ In the most cases, plant oils and extracts were considered as safe to humans and other mammals.¹⁰⁹ A mixture of neem and karanj oil was formulated and patented as PONNEEM, a novel biopesticide. The PONNEEM was assayed for larvicidal, ovicidal, and oviposition deterrence activities against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* and *C. quinquefasciatus*. PONNEEM presented 100% larval mortality against *Anopheles stephensi* and *C. quinquefasciatus* at the lowest concentration (0.1 ppm). The ovicidal activity of PONNEEM was found 100% (at 1 ppm) against two species of mosquitoes, but the oviposition deterrence activity was lower than that of ovicidal activity at same concentration. The effect on nontarget organisms demonstrated that PONNEEM had no effects to *Gambusia affinis* and *Diplonchus indicus*, which are mosquito predators. The safety studies suggested that PONNEEM could be used together with predatory fish and beneficial insects in integrated vector control strategies. The biological activity of PONNEEM may result from various compounds occurring in the plant oils.¹⁰⁹ Treatment with PONNEEM resulted in reduction of the activity of AChE1, glutathione S-transferase, and α - and β -esterases and provided larvicidal, ovicidal, and oviposition deterrent abilities against the vector mosquitoes *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*.¹⁰⁹ The overall findings suggested that PONNEEM could be used as an alternative to synthetic pesticides to control vector-borne diseases.⁶³

The silver nanoparticles (AgNP) using cheap aqueous leaf extract of *Zornia diphylla* as a reducing and capping agent of Ag⁺ ions can be other alternative to synthetic pesticides. The acute toxicity of *Z. diphylla* leaf extract and biosynthesized AgNP was determined against larvae of the malaria vector *Anopheles subpictus*, the dengue vector *Ae. albopictus*, and the Japanese encephalitis vector *Culex tritaeniorhynchus*. Synthesized AgNP presented a dose-dependent larvicidal effect against all tested vector species and resulted safer to nontarget organisms *Chironomus circumdatus*, *Anisops bouvieri*, and *Gambusia affinis*.¹¹⁰ A different type of AgNP prepared via using *Rhizophora mucronata* leaf extract was tested against larvae of *Ae. aegypti* and *C. quinquefasciatus* and showed potential mosquito larvicidal activity.¹¹¹ In summary, AgNP are relatively easy to produce, stable over time, cheap, and may be used at low doses to strongly decrease larval populations

of malaria and arbovirus mosquito vectors. They resulted without detrimental effects on mosquito enemies such as predaceous fish and crustaceans.¹¹⁰

9. CONCLUSION

In 2017, the World Health Organization established Global vector control response 2017–2030 for vector control as a fundamental approach to prevent mosquito-borne disease and respond to outbreaks. In this Global vector control response, several strategic goals were set. The goals include reduction of mortality due to vector-borne disease globally relative to 2016 by at least 75%, reduction of case incidence to vector-borne disease globally relative to 2016 by at least 60%, and prevention of epidemics of vector-borne diseases in all countries. In October 2017, WHO released an online mapping platform to track biological challenges to malaria control and elimination. It presents maps from three WHO global databases: (1) *Anopheles* spp. malaria vector insecticide resistance, (2) *P. falciparum* *hrp2/3* gene deletion (that can lead to false-negative rapid diagnostic test results), and (3) *P. falciparum* and *P. vivax* antimalarial drug efficacy and drug resistance (database Web site: apps.who.int/malaria/maps/threats/).

Increasing drug and insecticide resistance is highly challenging to malaria control programs. Forthcoming insecticide-based approaches should not be dependent on a single active agent to maximize the effectiveness of vector control. It may be useful to continue with combinations of different approaches. The standard insecticides (e.g., carbamates) might be redesigned to fulfill novel findings and demands on the field. To overcome known insecticidal resistance, compounds with novel mechanisms of action should be used in combination and rotation with long-used and well-established insecticides. Furthermore, and in addition to novel insecticides, plenty of supporting activities are needed to prolong the time before resistance decrease the effectiveness of novel molecular scaffolds. Not only should inhibition of target insect enzymes be achieved within novel insecticide development, but also the mechanisms of resistance and the physicochemical properties of novel scaffolds together with their pharmacokinetic parameters (absorption, distribution, metabolism, and excretion) should be taken into consideration. Advanced *in silico* methods can be abundantly used for identification and selection of novel insecticide-like scaffolds fulfilling demands of their low health risk and environmental safety. Scientists, manufacturers, control programs, WHO, and other stakeholders have to work in close collaboration to establish and implement resistance management strategies to stop the progress of malaria transmission.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: kamil.musilek@gmail.com. Phone: +420495833477.

ORCID 

Kamil Musilek: 0000-0002-7504-4062

Author Contributions

[†]These authors contributed equally to the review.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (No. NV16–34390A), University of Hradec Kralove (No. SV2107–2015, VT2201–2017), and EU COST Action CA16227.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies



Photo provided by Monika Schmidt.

Monika Schmidt is Assistant Professor at Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove. She works also in Biomedical Research Centre at University Hospital Hradec Kralove. She obtained her Ph.D. in the field of Biochemistry at Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague. Her work is mainly focused on molecular cloning, expression and purification of human recombinant proteins, and biochemical assays for novel chemical compound screening.



Photo provided by Veronika Hrabcova.

Veronika Hrabcova is a postgraduate student in Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, where she focuses on development of new insecticides based on the inhibition of acetylcholinesterase. She obtained M.Sc. and B.Sc. degrees in the study program Healthcare bioanalytics at the Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague. She has supervised one M.Sc. student and is author of two publications in peer-reviewed journals. Her research focuses on recombinant production of insect acetylcholinesterase and biochemical evaluation of potential insecticides.



Photo provided by Daniel Jun.

Daniel Jun received his Ph.D. in Toxicology from the Faculty of Military Health Sciences, University of Defense in Brno. He is an associate professor of Toxicology at the same faculty and is currently head of the Department of Toxicology and Military Pharmacy. His research involves toxicology of chemical warfare agents, pesticides, and natural compounds, development of new countermeasures for nerve agent and pesticide intoxications, evaluation of different cholinesterase modulators, chemical analysis of antidotes, and development of new disinfectants. He is a coauthor or author of more than 150 peer-reviewed manuscripts, book chapters, and reviews in these fields.



Photo provided by Kamil Kuca.

Kamil Kuca is working for several academic institutes (University of Hradec Kralove, Czech Republic; University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic; Florida International University, USA; Yangtze University, China). He is recently rector of the University of Hradec Kralove. He was also technology scout focused on biomedicine in the past. His research interests are toxicology, pharmacology, drug design, technology transfer, pharmacoconomy, chemical and biological terrorism, etc. He was/is principal investigator on numerous national and international projects (EU, NATO, GACR, IGA MZ, MSMT, etc.). He has published more than 350 IF research papers. He is working with several companies as a scientific advisor. He has numerous cooperators throughout the world (e.g., Korea, Croatia, United Arab Emirates, USA, France, Turkey, China, Singapore, Sweden, and Brazil). His H-index is 40, number of citation in WoS is over 6000.



Photo provided by Kamil Musilek.

Kamil Musilek is Associate Professor at the University of Hradec Kralove and researcher in the Biomedical Research Centre of University Hospital (both Hradec Kralove, Czech Republic). He is currently head of Department of Chemistry the University of Hradec Kralove. He is a pharmacist and medicinal chemist by education with broader knowledge of pharmacology and toxicology. His work is focused on research and

development of novel chemical entities for various molecular targets including insecticides and their antidotes.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank David Herman for the technical assistance. The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

■ ABBREVIATIONS

AChE, acetylcholinesterase; ACT, artemisinin combined therapies; AgNP, silver nanoparticles; Bti, *Bacillus thuringiensis israelensis*; CA, carbamates; COEs, carboxylesterases; DAR, dopamine receptor; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; DmAChE, *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase; DOP1, DOP2, type of D1-like dopamine receptor; GSTs, glutathione S-transferases; IRS, indoor residual spraying; IGR, insect growth regulators; *kdr*, knockdown resistance; OP, organophosphates; P450s, cytochrome P450 monooxygenases; TcAChE, *Torpedo californica* acetylcholinesterase; VGSC, voltage-gated sodium channel; WHO, World Health Organization; WHOPES, WHO pesticides evaluation scheme

■ REFERENCES

- (1) (2017) *World Malaria Report 2017*, WHO.
- (2) (2015) *World Malaria Report 2015*, WHO.
- (3) Cogswell, F. B. (1992) The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 26–35.
- (4) Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., and Menard, R. (2006) Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.* 12, 220–224.
- (5) Medica, D. L., and Sinnis, P. (2005) Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect. Immun.* 73, 4363–4369.
- (6) Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J.-M., Menard, R., and Heussler, V. T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287–1290.
- (7) Reilly, H. B., Wang, H., Steuter, J. A., Marx, A. M., and Ferdig, M. T. (2007) Quantitative dissection of clone-specific growth rates in cultured malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 37, 1599–1607.
- (8) (2015) *Malaria - About Malaria - Disease*, CDC.
- (9) Beier, J. C. (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 519–543.
- (10) Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., and Marsh, K. (2016) Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167, 610–624.
- (11) Pukrittayakamee, S., Chotivanich, K., Chantra, A., Clemens, R., Looareesuwan, S., and White, N. J. (2004) Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1329–1334.
- (12) Gonçalves, D., and Hunziker, P. (2016) Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malar. J.* 15, 95.
- (13) Song, J., Socheat, D., Tan, B., Dara, P., Deng, C., Sokunthea, S., Seila, S., Ou, F., Jian, H., and Li, G. (2010) Rapid and effective malaria control in Cambodia through mass administration of artemisinin-piperazine. *Malar. J.* 9, 57.
- (14) Graves, P. M., Gelband, H., and Garner, P. (2015) Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing Plasmodium falciparum transmission. *Cochrane Db Syst. Rev.*, 1–115.
- (15) (2015) *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3rd ed, WHO.
- (16) Barry, A. E., and Arnott, A. (2014) Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front. Immunol.* 5, 359.
- (17) RTS, S Clinical Trials Partnership (2014) Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a

phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS Med.* 11, e1001685.

(18) Greenwood, B., and Doumbo, O. K. (2016) Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *Lancet* 387, 318–319.

(19) Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., and Williamson, M. S. (2007) A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol. Biol.* 16, 361–375.

(20) Maharaj, R., Mthembu, D. J., and Sharp, B. L. (2005) Impact of DDT re-introduction on malaria transmission in KwaZulu-Natal. *S. Afr. Med. J.* 95, 871–874.

(21) (2006) *Indoor Residual Spraying. Use of Indoor Residual Spraying for Scaling up Global Malaria Control and Elimination (Archived)*, WHO.

(22) (2018) *WHO Pesticide Evaluation Scheme: "WHOPES"*, WHO.

(23) Ngufor, C., N'Guessan, R., Fagbohoun, J., Todjinou, D., Odjo, A., Malone, D., Ismail, H., Akogbeto, M., and Rowland, M. (2016) Efficacy of the Olyset Duo net against insecticide-resistant mosquito vectors of malaria. *Sci. Transl. Med.* 8, 356ra121.

(24) Warmke, J. W., Reenan, R. A., Wang, P., Qian, S., Arena, J. P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G. J., Van der Ploeg, L. H., Ganetzky, B., and Cohen, C. J. (1997) Functional expression of *Drosophila* para sodium channels. Modulation by the membrane protein TipE and toxin pharmacology. *J. Gen. Physiol.* 110, 119–133.

(25) Zlotkin, E. (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 429–455.

(26) Toshio, N. (1992) Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 236–241.

(27) Bloomquist, J. R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 163–190.

(28) Narahashi, T. (1996) Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 1–14.

(29) Vijverberg, H. P., and van den Bercken, J. (1990) Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit. Rev. Toxicol.* 21, 105–126.

(30) Narahashi, T. (2000) Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 1–26.

(31) Vijverberg, H. P., and van den Bercken, J. (1982) Annotation. Action of pyrethroid insecticides on the vertebrate nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 8, 421–440.

(32) Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., and Williamson, M. S. (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162.

(33) Song, W., Liu, Z., Tan, J., Nomura, Y., and Dong, K. (2004) RNA Editing Generates Tissue-specific Sodium Channels with Distinct Gating Properties. *J. Biol. Chem.* 279, 32554–32561.

(34) Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., and Zhorov, B. S. (2014) Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50, 1–17.

(35) O'Reilly, A. O., Khambay, B. P. S., Williamson, M. S., Field, L. M., Wallace, B. A., and Davies, T. G. E. (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396, 255–263.

(36) Du, Y., Lee, J.-E., Nomura, Y., Zhang, T., Zhorov, B. S., and Dong, K. (2009) Identification of a cluster of residues in transmembrane segment 6 of domain III of the cockroach sodium channel essential for the action of pyrethroid insecticides. *Biochem. J.* 419, 377–385.

(37) Usherwood, P. N. R., Davies, T. G. E., Mellor, I. R., O'Reilly, A. O., Peng, F., Vais, H., Khambay, B. P. S., Field, L. M., and Williamson, M. S. (2007) Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. *FEBS Lett.* 581, 5485–5492.

(38) Carlier, P. R., Bloomquist, J. R., Totrov, M., and Li, J. (2017) Discovery of Species-selective and Resistance-breaking Anticholinesterase Insecticides for the Malaria Mosquito. *Curr. Med. Chem.* 24, 2946–2958.

(39) Toutant, J. P. (1989) Insect acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog. Neurobiol.* 32, 423–446.

(40) Rosenberry, T. L. (1975) Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limiting step for acylation with certain substrates precedes general acid-base catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3834–3838.

(41) Quinn, D. M. (1987) Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87, 955–979.

(42) Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I., and Sussman, J. L. (2000) Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci.* 9, 1063–1072.

(43) Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L., and Carlier, P. R. (2018) Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Structure* 26, 130–136.e2.

(44) Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J. M., and Fournier, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5922–5926.

(45) Malcolm, C. A., Bourguet, D., Ascolillo, A., Rooker, S. J., Garvey, C. F., Hall, L. M., Pasteur, N., and Raymond, M. (1998) A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol. Biol.* 7, 107–120.

(46) Tomita, T., Hidoh, O., and Kono, Y. (2000) Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 325–333.

(47) Kono, Y., and Tomita, T. (2006) Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in Ace-paralogous acetylcholinesterase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 85, 123–132.

(48) Bourguet, D., Raymond, M., Fournier, D., Malcolm, C. A., Toutant, J.-P., and Arpagaus, M. (1996) Existence of Two Acetylcholinesterases in the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Neurochem.* 67, 2115–2123.

(49) Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M. P., Pasteur, N., and Raymond, M. (2002) A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 269, 2007–2016.

(50) Huchard, E., Martinez, M., Alout, H., Douzery, E. J. P., Lutfalla, G., Berthomieu, A., Berticat, C., Raymond, M., and Weill, M. (2006) Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* 273, 2595–2604.

(51) Casida, J. E., and Quistad, G. B. (1998) Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16.

(52) Maharaj, R. (2011) Global insecticide use for vector-borne disease control: a 10-year assessment [2000–2009]. *Open Access Insect Physiol.* 27.

(53) Usherwood, P. N. R. (1994) Insect Glutamate Receptors, in *Adv. In Insect Phys.* (Evans, P. D., Ed.) pp 309–341, Academic Press.

(54) Fukuto, T. R. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect* 87, 245–254.

(55) Wilkinson, C. F. (1983) Role of Mixed-Function Oxidases in Insecticide Resistance, in *Pest Resistance to Pesticides*, pp 175–205, Springer, Boston, MA.

(56) Perera, M. D. B., Hemingway, J., and Karunaratne, S. P. (2008) Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malar. J.* 7, 168.

(57) World Health Organization, United Nations Environment Programme, International Labour Organisation (1986) *Organophosphorus Insecticides: A General Introduction*, WHO.

(58) Johnson, M. K. (1990) Organophosphates and delayed neuropathy—is NTE alive and well? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 102, 385–399.

(59) Mian, L. S., and Mulla, M. S. (1982) Biological and environmental dynamics of insect growth regulators (IGRs) as used against Diptera of public health importance, in *Residue Rev.*, pp 27–112, Springer, New York.

(60) Mulla, M. S. (1995) The future of insect growth regulators in vector control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 269–273.

- (61) Wu, Y., Parthasarathy, R., Bai, H., and Palli, S. R. (2006) Mechanisms of midgut remodeling: juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.* 123, 530–547.
- (62) Bai, H., Gelman, D. B., and Palli, S. R. (2010) Mode of action of methoprene in affecting female reproduction in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Pest Manage. Sci.* 66, 936–943.
- (63) Maheswaran, R., and Ignacimuthu, S. (2015) A novel biopesticide PONNEEM to control human vector mosquitoes *Anopheles stephensi* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13153–13166.
- (64) Fillinger, U., Knols, B. G. J., and Becker, N. (2003) Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health* 8, 37–47.
- (65) Ferreira, L. M., and Silva-Filha, M. H. N. L. (2013) Bacterial larvicides for vector control: mode of action of toxins and implications for resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 23, 1137–1168.
- (66) Poopathi, S., and Abidha, S. (2010) Mosquitocidal bacterial toxins (*Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of action, cytopathological effects and mechanism of resistance. *J. Physiol. Pathophysiol.* 1, 22–38.
- (67) Poopathi, S. (2012) Current Trends in the Control of Mosquito Vectors by Means of Biological Larvicides. *J. Biofertil Biopestic* 3, 125.
- (68) Busvine, J. R. (1951) Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies. *Nature* 168, 193.
- (69) Williamson, M. S., Martinez-Torres, D., Hick, C. A., and Devonshire, A. L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51–60.
- (70) Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N., and Pauron, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol. Biol.* 7, 179–184.
- (71) Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J. M., Wang, X., Hemingway, J., and Collins, F. H. (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9, 491–497.
- (72) Jones, C. M., Liyanapathirana, M., Agossa, F. R., Weetman, D., Ranson, H., Donnelly, M. J., and Wilding, C. S. (2012) Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6614–6619.
- (73) Vais, H., Williamson, M. S., Goodson, S. J., Devonshire, A. L., Warmke, J. W., Usherwood, P. N., and Cohen, C. J. (2000) Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin. Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J. Gen. Physiol.* 115, 305–318.
- (74) Vais, H., Atkinson, S., Pluteanu, F., Goodson, S. J., Devonshire, A. L., Williamson, M. S., and Usherwood, P. N. R. (2003) Mutations of the para sodium channel of *Drosophila melanogaster* identify putative binding sites for pyrethroids. *Mol. Pharmacol.* 64, 914–922.
- (75) Ayad, H., and Georghiou, G. P. (1975) Resistance to Organophosphates and Carbamates in *Anopheles albimanus* Based on Reduced Sensitivity of Acetylcholinesterase. *J. Econ. Entomol.* 68, 295–297.
- (76) Elissa, N., Mouchet, J., Riviere, F., Meunier, J. Y., and Yao, K. (1993) Resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to pyrethroids in Côte d'Ivoire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop* 73, 291–294.
- (77) N'Guessan, R., Darriet, F., Guillet, P., Carnevale, P., Traore-Lamizana, M., Corbel, V., Koffi, A. A., and Chandre, F. (2003) Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med. Vet. Entomol.* 17, 19–25.
- (78) Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Phillips, A., Fort, P., and Raymond, M. (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136–137.
- (79) Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M., and Raymond, M. (2004) The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol. Biol.* 13, 1–7.
- (80) Wong, D. M., Li, J., Chen, Q.-H., Han, Q., Mutunga, J. M., Wysinski, A., Anderson, T. D., Ding, H., Carpenetti, T. L., Verma, A., Islam, R., Paulson, S. L., Lam, P. C.-H., Totrov, M., Bloomquist, J. R., and Carlier, P. R. (2012) Select Small Core Structure Carbamates Exhibit High Contact Toxicity to “Carbamate-Resistant” Strain Malaria Mosquitoes, *Anopheles gambiae* (Akron). *PLoS One* 7, e46712.
- (81) Hemingway, J., and Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371–391.
- (82) Dimopoulos, G., Christophides, G. K., Meister, S., Schultz, J., White, K. P., Barillas-Mury, C., and Kafatos, F. C. (2002) Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8814–8819.
- (83) David, J.-P., Strode, C., Vontas, J., Nikou, D., Vaughan, A., Pignatelli, P. M., Louis, C., Hemingway, J., and Ranson, H. (2005) The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4080–4084.
- (84) Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., and Feyereisen, R. (2002) Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179–181.
- (85) Yahouédo, G. A., Cornelie, S., Djègbè, I., Ahlonsou, J., Aboubakar, S., Soares, C., Akogbèto, M., and Corbel, V. (2016) Dynamics of pyrethroid resistance in malaria vectors in southern Benin following a large scale implementation of vector control interventions. *Parasites Vectors* 9, 1.
- (86) Awolola, T. S., Oduola, O. A., Strode, C., Koekemoer, L. L., Brooke, B., and Ranson, H. (2009) Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1139–1145.
- (87) Liu, N. (2015) Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 537–559.
- (88) Anyanwu, G. I., Molyneux, D. H., and Phillips, A. (2000) Variation in cuticular hydrocarbons among strains of the *Anopheles gambiae* sensu stricto by analysis of cuticular hydrocarbons using gas liquid chromatography of larvae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 295–300.
- (89) Ranson, H., and Lissenden, N. (2016) Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* 32, 187–196.
- (90) Ranson, H., N'guessan, R., Lines, J., Moiroux, N., Nkuni, Z., and Corbel, V. (2011) Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol.* 27, 91–98.
- (91) (2016) *Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030*, WHO.
- (92) World Health Organization Global Malaria Programme. (2011) *The Technical Basis for Coordinated Action against Insecticide Resistance: Preserving the Effectiveness of Modern Malaria Vector Control, Meeting Report*, WHO.
- (93) Pezzementi, L., Rowland, M., Wolfe, M., and Tsigelny, I. (2006) Inactivation of an invertebrate acetylcholinesterase by sulfhydryl reagents: the roles of two cysteines in the catalytic gorge of the enzyme. *Invertebr. Neurosci.* 6, 47–55.
- (94) Pang, Y.-P. (2006) Novel acetylcholinesterase target site for malaria mosquito control. *PLoS One* 1, e58.
- (95) Pang, Y.-P., Ekström, F., Polsinelli, G. A., Gao, Y., Rana, S., Hua, D. H., Andersson, B., Andersson, P. O., Peng, L., Singh, S. K., Mishra, R. K., Zhu, K. Y., Fallon, A. M., Ragsdale, D. W., and Brimijoin, S. (2009) Selective and irreversible inhibitors of mosquito acetylcholinesterases for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *PLoS One* 4, e6851.
- (96) Dou, D., Park, J. G., Rana, S., Madden, B. J., Jiang, H., and Pang, Y.-P. (2013) Novel selective and irreversible mosquito acetylcholinesterase

inhibitors for controlling malaria and other mosquito-borne diseases. *Sci. Rep.* 3, 1068.

(97) Hartsel, J. A., Wong, D. M., Mutunga, J. M., Ma, M., Anderson, T. D., Wysinski, A., Islam, R., Wong, E. A., Paulson, S. L., Li, J., Lam, P. C. H., Totrov, M. M., Bloomquist, J. R., and Carlier, P. R. (2012) Re-engineering aryl methylcarbamates to confer high selectivity for inhibition of *Anopheles gambiae* versus human acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4593–4598.

(98) Jiang, Y., Swale, D., Carlier, P. R., Hartsel, J. A., Ma, M., Ekström, F., and Bloomquist, J. R. (2013) Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 156–161.

(99) Wong, D. M., Li, J., Lam, P. C. H., Hartsel, J. A., Mutunga, J. M., Totrov, M., Bloomquist, J. R., and Carlier, P. R. (2013) Aryl methylcarbamates: potency and selectivity towards wild-type and carbamate-insensitive (G119S) *Anopheles gambiae* acetylcholinesterase, and toxicity to G3 strain *An. gambiae*. *Chem.-Biol. Interact.* 203, 314–318.

(100) Swale, D. R., Carlier, P. R., Hartsel, J. A., Ma, M., and Bloomquist, J. R. (2015) Mosquitocidal carbamates with low toxicity to agricultural pests: an advantageous property for insecticide resistance management. *Pest Manage. Sci.* 71, 1158–1164.

(101) Guillet, P., N'Guessan, R., Darriet, F., Traore-Lamizana, M., Chandre, F., and Carnevale, P. (2001) Combined pyrethroid and carbamate “two-in-one” treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.* 15, 105–112.

(102) Verma, A., Wong, D. M., Islam, R., Tong, F., Ghavami, M., Mutunga, J. M., Slebodnick, C., Li, J., Viayna, E., Lam, P. C.-H., Totrov, M. M., Bloomquist, J. R., and Carlier, P. R. (2015) 3-Oxoisoxazole-2(3H)-carboxamides and isoxazol-3-yl carbamates: Resistance-breaking acetylcholinesterase inhibitors targeting the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 1321–1340.

(103) Alout, H., Labbé, P., Berthomieu, A., Djogbénou, L., Leonetti, J.-P., Fort, P., and Weill, M. (2012) Novel AChE Inhibitors for Sustainable Insecticide Resistance Management. *PLoS One* 7, e47125.

(104) Engdahl, C., Knutsson, S., Ekström, F., and Linusson, A. (2016) Discovery of Selective Inhibitors Targeting Acetylcholinesterase 1 from Disease-Transmitting Mosquitoes. *J. Med. Chem.* 59, 9409–9421.

(105) Hill, C. A., Meyer, J. M., Ejendal, K. F. K., Echeverry, D. F., Lang, E. G., Avramova, L. V., Conley, J. M., and Watts, V. J. (2013) Re-invigorating the insecticide discovery pipeline for vector control: GPCRs as targets for the identification of next gen insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 141–148.

(106) Meyer, J. M., Ejendal, K. F. K., Avramova, L. V., Garland-Kuntz, E. E., Giraldo-Calderón, G. I., Brust, T. F., Watts, V. J., and Hill, C. A. (2012) A “Genome-to-Lead” Approach for Insecticide Discovery: Pharmacological Characterization and Screening of *Aedes aegypti* D1-like Dopamine Receptors. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 6, e1478.

(107) Mustard, J. A., Beggs, K. T., and Mercer, A. R. (2005) Molecular biology of the invertebrate dopamine receptors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59, 103–117.

(108) Nuss, A. B., Ejendal, K. F. K., Doyle, T. B., Meyer, J. M., Lang, E. G., Watts, V. J., and Hill, C. A. (2015) Dopamine receptor antagonists as new mode-of-action insecticide leads for control of *Aedes* and *Culex* mosquito vectors. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 9, e0003515.

(109) Maheswaran, R., and Ignacimuthu, S. (2012) A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasitol. Res.* 110, 1801–1813.

(110) Govindarajan, M., Rajeswary, M., Muthukumaran, U., Hoti, S. L., Khater, H. F., and Benelli, G. (2016) Single-step biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Zornia diphylla* leaves: A potent eco-friendly tool against malaria and arbovirus vectors. *J. Photochem. Photobiol., B* 161, 482–489.

(111) Gnanadesigan, M., Anand, M., Ravikumar, S., Maruthupandy, M., Vijayakumar, V., Selvam, S., Dhineshkumar, M., and Kumaraguru, A. K. (2011) Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4, 799–803.

(112) Winzeler, E. A. (2008) Malaria research in the post-genomic era. *Nature* 455, 751–756.

Příloha č. 4



Cite this: *RSC Adv.*, 2017, 7, 39279

Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: *in vitro* screening of probes for novel selective insecticides†

Veronika Hrabcova,^{ab} Jan Korabecny,^{bc} Brigita Manyova,^{bd} Lenka Matouskova,^{bd} Tomas Kucera,^b Rafael Dolezal,^{ac} Kamil Musilek,^{abc} Lukas Gorecki,^{bc} Eugenie Nepovimova,^{bc} Kamil Kuca^{abc} and Daniel Jun^{id*bc}

Insects have a huge impact on quality of life around the world. They play roles in transmitting diseases, crop-destruction, and as residential pests. Their increased resistance to the existing pesticides and the toxicity of carbamates (CA) and organophosphates (OP) has led to the development of new environmentally safe insecticides. In our study, thirty different bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors were tested as candidates for potential new selective pesticides. Our compounds were evaluated *in vitro* on insect acetylcholinesterase (AChE) from *Musca domestica* and human erythrocyte AChE using the modified Ellman's method. The values of IC₅₀ were compared and expressed via a selectivity index (SI) towards the insect enzyme. **K299**, **K416**, and **K423** provided a high SI and seem to be suitable as new lead structures of novel selective anticholinesterase insecticides. Docking studies further provided the rational background uncovering the disparities in the ligand–enzyme binding modes for each AChE enzyme. *In vitro* assessments as well as docking studies highlighted **K299** and **K416** as suitable candidates for lead structures of novel pesticides. However, further evaluation is needed to confirm this statement.

Received 24th May 2017
 Accepted 3rd July 2017

DOI: 10.1039/c7ra05838a

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Vector-borne diseases are among the major causes of illness and death in many tropical and subtropical countries.¹ In 2015, 214 million new cases of malaria, transmitted by *Anopheles gambiae*, globally occurred, and the disease led to 438, 000 deaths.² Dengue fever as well as Zika virus disease is transmitted by another mosquito species, *Aedes aegypti*. Currently, Zika virus infections indicate rapid geographic expansion.³ Worldwide present bed bugs (*Cimex lectularius*) feed on human blood and cause mental stress, acute discomfort, and social stigma.⁴ Finally, soybean aphids (*Aphis glycines*) cost US farmers more than 1 billion dollars in yield losses and the purchase and application of insecticides, hampering the production of bio-diesel from soybean oil.⁵ All the problems caused by crop-

destroying, disease-carrying, and residential insects require urgent solutions.⁶

Carbamates (CA) and organophosphates (OP) are examples of pesticides that inhibit cholinesterases, which are commonly used for insect control.^{7–9} Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) is a serine esterase in the α/β hydrolase-fold enzyme family.¹⁰ The function of AChE is to terminate neurotransmission by rapidly hydrolyzing acetylcholine (ACh) at the cholinergic synapses and neuromuscular junctions of most invertebrates and vertebrates.^{7,11–13} The active site of the enzyme is located at the bottom of a deep and narrow gorge, containing a serine residue in a catalytic triad.^{7,13} Current anticholinesterase insecticides work through covalent modification of serine at the active site of an enzyme, thus disabling its catalytic function and incapacitating insects.^{7–9}

Due to the long-lasting consumption of pesticides, more and more insect species have developed resistance.^{14–16} This resistance has been claimed to be due to three different mechanisms: reduction in insecticide sensitivity of target enzymes, decrease in insecticide penetration into the insect body, and increase in detoxification activities.¹⁷ On the other hand, acute pesticide poisonings (APPs) are responsible for significant morbidity and mortality worldwide, particularly in developing countries.¹⁸ Estimates of the total number of poisonings are quite variable, depending on the period and author. Despite some limitations, a total number of APPs in the range from 250 000 to 500 000 were

^aUniversity Hradec Kralove, Faculty of Science, Department of Biology, Rokitanskeho 62, 50003 Hradec Kralove, Czech Republic

^bUniversity of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Toxicology and Military Pharmacy, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic. E-mail: daniel.jun@unob.cz; Tel: +420 973 255 193

^cUniversity Hospital, Biomedical Research Centre, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^dCharles University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Akademika Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ra05838a



estimated yearly with 3000–30 000 fatalities.¹⁹ Due to the increasing insect resistance to pesticides, off-target toxicity, and several epidemic situations of insect-transmitted diseases, the development of new selective insecticides is needed.

Our aim was to screen selected recently reported AChE inhibitors from our in-house library^{20–22} and find out if any of them provided selectivity to insect AChE. These selective inhibitors could be used as new structure leads for further research. Approximately thirty different symmetrical bis-quaternary AChE inhibitors, namely bis-isoquinolinium and bis-pyridinium salts, were evaluated as new pesticide candidates, and the selectivity of these compounds was determined. Due to the fact that *Musca domestica* has just one type of AChE responsible for cholinergic function,¹¹ it has been chosen as a suitable source of insect enzyme. Finally, *in silico* studies were carried out to justify the results obtained from the *in vitro* assessment. Predictive binding poses of the selected ligands are shown in the cavity of greenbug AChE (*Schizaphis graminum*, SgAChE; enzyme structurally related to *Anopheles gambiae* and/or *Aedes aegypti* AChE) to validate our hypothesis for the compounds under study.

Results and discussion

Biological assay

Herein, thirty different symmetrical bis-quaternary AChE inhibitors were assayed for their selectivity using the modified spectrophotometric method described by Ellman *et al.*^{23–25} The validity of our protocol has been verified on the anti-Alzheimer's disease drug tacrine, a well-known AChE inhibitor (data not shown in the table).^{26,27} *Musca domestica* was used as a suitable source of the insect AChE. *Anopheles gambiae*, a mosquito that transmits malaria, has two types of AChE: paralogous AChE (AP-AChE) to the *Drosophila melanogaster* gene, which is responsible for cholinergic function in mosquito, and orthologous AChE (AO-AChE), which plays a crucial role in the process of reproduction. On the other hand, *Musca domestica*, which belongs to the true fly species, has only one type of AChE, AO-AChE, in particular.⁶

The compounds chosen for selectivity screening can be divided into two groups based on their structural features. All these structures have been recently reported as potential candidates for the treatment for AD or myasthenia gravis.^{20–22} The first group consisted of symmetrical bis-pyridinium compounds (see Fig. 1), which was selected based on the linker length and its previously reported inhibition effect. The IC₅₀ values are listed in Table 1.

Initially, **K366** was the non-substituted bis-pyridinium salt connected with a naphthylene linkage. The IC₅₀ value of **K366** was in the micromolar range for both types of AChE. However, selectivity towards *MdAChE* was very low. **K364** and **K365** are (*E*) and (*Z*) non-substituted bispyridinium isomers with a but-(2*E*)-en-1,4-diyl linker, respectively. They displayed no inhibition effect in the tested concentration scale. The aromatic linkage displayed a promising inhibitory effect, opposite to the linker with a double bond. On the other hand, the substitution at the *para* position of bis-pyridinium inhibitors with the but-(2*E*)-en-1,4-diyl linker diminished the inhibitory ability.

para-Substituted bispyridinium inhibitors (**K420–K435**) provided a very wide inhibition effect based on the used substituent. Lipophilic moieties, such as aliphatic functional groups (**K420–K422**), resulted in poor inhibition as compared to the compounds with an aromatic ring. Among the aromatic functional groups (**K423–K426**), a phenyl-bearing compound (**K423**) was found to be the best inhibitor of *MdAChE*, having an IC₅₀ in the nanomolar range with a SI value of 7.058, which was superior to that of the benzyl compound (**K424**) or the 3-phenylpropyl compound (**K425**). The latter compound exerted no or very low inhibition potency to *MdAChE* in the given concentration scale. The results showed that only **K423**, bearing a phenyl ring directly attached to the pyridinium moiety, was able to inhibit *MdAChE*, whereas chain elongation between these two moieties (**K424** and **K425**) resulted in the loss of activity. On the other hand, a 4-nitrobenzyl compound (**K426**) showed inhibition in the micromolar scale although its selectivity towards *MdAChE* was very low. Compounds (**K427–K435**) containing hydrophilic functional groups also showed apparent differences in their inhibitory ability. Among them, 3-hydroxypropyl (**K429**), *N,N*-dimethylamino (**K430**), and 4-carbonitrile compound (**K435**) were superior to other hydroxyl- (**K427**, **K428**) or carbonyl-containing compounds (**K431–K434**), possessing IC₅₀ values in the micromolar range. Among the hydroxyl-containing compounds (**K427–K429**), no clear SAR can be drawn since only **K429** was able to inhibit *MdAChE*. However, the SI values towards *MdAChE* were negligible for all of them. Although **K429**, **K430**, and **K435** were the best hydrophilic compounds, their inhibitory ability towards *MdAChE* still decreased by two orders of magnitude as compared to that of the phenyl analogue **K423**.

The second subset of compounds consisted of bis-isoquinolinium derivatives bearing various linkers (see Fig. 2). The bis-isoquinolinium derivatives (**K291–K299**, **K302**, and **K412–K419**) were the most potent inhibitors in our study; only three of them (**K291**, **K293**, and **K413**) did not inhibit human and insect AChEs in the tested concentration range. This is probably caused by the presence of the isoquinoline heterocycle in them, which exhibits stronger stabilization *via* π - π or cation- π interaction to the catalytic active site (CAS) and peripheral anionic site (PAS) as compared to the bis-pyridinium compounds.²¹ Moreover, the used linkage and its length markedly influenced the inhibitory ability of bis-isoquinolinium compounds.^{21,28} Among the compounds with an aliphatic linker (**K291–K299**, **K302**, and **K412–K415**), those with nine and twelve methylene units (**K299** and **K302**) were found to be the best inhibitors of *MdAChE*, achieving an IC₅₀ value in the nanomolar range. **K296**, bearing six methylene linkers, inhibited *MdAChE* in the micromolar range with a low selectivity profile towards both AChEs. Furthermore, compounds bearing shorter linkers (one and three methylenes) were found to be inefficient for both enzymes, which was in agreement with previously obtained results.^{22,28} The presence of an oxygen heteroatom (**K412** and **K413**) or a double bond (**K414** and **K415**) in the linker did not yield higher affinity. In this case, the IC₅₀ values lay in the micromolar range, and low selectivity towards *MdAChE* was observed. The linkage length of these



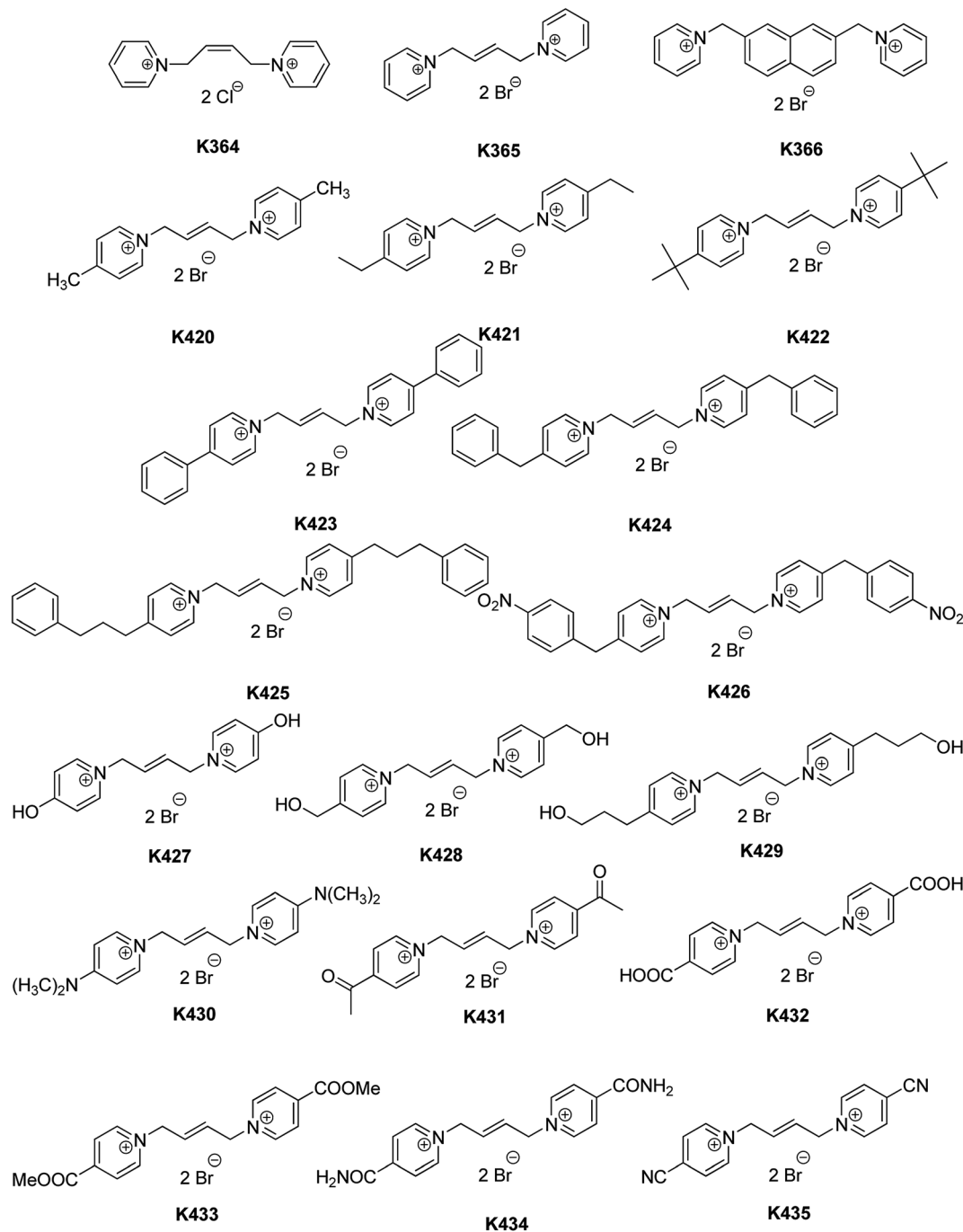


Fig. 1 Structures of the evaluated standards and bis-pyridinium compounds (non-substituted and *p*-substituted).

compounds was four methylene units, which correlated well with the result obtained for **K296**.

Among bis-isoquinolinium salts bearing aromatic linkers (**K416–K419**), naphthylene-linked dimers (**K419**) were more potent as compared to xylene-linked dimers (**K416–K419**). **K419** inhibited *MdAChE* in the nanomolar range, but with low selectivity. On the other hand, **K416–K418** revealed high selectivity for *MdAChE* over *hAChE*. In this regard, **K416** possessed the highest SI value of 12.185, and the second top-ranked compound **K417** had a three-fold lower SI value of 4.789.

However, the most promising compounds in terms of the IC₅₀ values were **K299**, **K302**, and **K419**, achieving IC₅₀ values in the nanomolar range.

A group of four insecticides (pyrethroids (PY), carbamates (CA), organophosphates (OP), and organochlorines (OC)) has currently been recommended by WHO pesticide evaluation scheme (WHOPES) for controlling vector-borne disease such as malaria.²⁹ Compared to organophosphates, the carbamate insecticides probably represent a better option because they act as pseudo-irreversible AChE inhibitors with lower dermal



Table 1 The IC₅₀ values of the evaluated compounds

Compound	IC ₅₀ <i>hAChE</i> ± SEM ^a (μM)	IC ₅₀ <i>MdAChE</i> ± SEM ^a (μM)	SI for <i>MdAChE</i>
Propoxur	2.094 ± 0.040 ^b	0.152 ^c	13.78
Bendiocarb	0.359 ± 0.016 ^b	0.058 ^c	6.19
Compound 1	0.201 ± 0.019 ^b	0.181 ^c	1.11
Compound 7	20.68 ± 9.509 ^b	0.051 ^c	405
Compound 8	247.4 ± 106.8 ^b	0.654 ^c	378
K291	>1000	>1000	—
K293	>1000	>1000	—
K296	0.881 ± 0.322	2.77 ± 0.08	0.318
K299	0.138 ± 0.008	0.0226 ± 0.0006	6.093
K302	0.0697 ± 0.0032	0.036 ± 0.001	1.936
K364	>1000	>1000	—
K365	>1000	>1000	—
K366	8.01 ± 1.30	14.1 ± 1.5	0.568
K412	5.10 ± 0.39	7.40 ± 0.39	0.690
K413	>1000	693 ± 59	—
K414	15.78 ± 1.12	17.6 ± 2.1	0.897
K415	38.7 ± 4.4	112 ± 11	0.346
K416	267 ± 11	21.9 ± 4.7	12.185
K417	8.59 ± 0.86	1.79 ± 0.12	4.789
K418	5.87 ± 0.49	5.56 ± 0.49	1.056
K419	0.214 ± 0.011	0.228 ± 0.009	0.936
K420	>1000	>1000	—
K421	>1000	>1000	—
K422	>1000	>1000	—
K423	4.93 ± 3.61	0.699 ± 0.089	7.058
K424	4.09 ± 1.01	>1000	—
K425	0.0554 ± 0.0029	>1000	—
K426	5.19 ± 0.56	20.7 ± 2.8	0.251
K427	>1000	>1000	—
K428	>1000	>1000	—
K429	31.5 ± 2.0	107 ± 15	0.294
K430	1.05 ± 0.06	4.14 ± 0.23	0.253
K431	>1000	>1000	—
K432	>1000	>1000	—
K433	>1000	>1000	—
K434	>1000	>1000	—
K435	37.3 ± 3.3	103 ± 11	0.362

^a The IC₅₀ values are derived from triplicate and selectivity indexes (SI) were calculated as a ratio of IC₅₀ value for *hAChE*/IC₅₀ value for *MdAChE*.

^b Data were obtained from ref. 30. ^c Data were obtained from ref. 31.

toxicity. Moreover, two approved CA for insecticide-treated nets (ITN) are propoxur and bendiocarb, usually combined with PY. The IC₅₀ value of *hAChE* for bendiocarb was found to be in the submicromolar range (IC₅₀ 0.359 μM), which was one order of magnitude lower than that of propoxur (2.094 μM).³⁰ Based on the reported data, the SI for both of these compounds were calculated (propoxur SI 13.78 and bendiocarb 6.19).^{30,31} The highlighted compounds in our screening study in terms of SI are **K299**, **K416**, and **K423**. All these analogues resemble the SI values of the approved CA. **K416** with a SI of 12.19 is superior to **K423** (SI 7.06) and to **K299** (SI 6.09). In terms of *MdAChE* inhibition potency, **K299** was able to block the enzyme activity in the same range as bendiocarb. **K423** had a comparable effect with propoxur. However, these data need to be taken with precaution since bendiocarb and propoxur presumably exert different modes of AChE inhibition.

Due to the fact that increase in resistance affects all major malaria vector species over all four recommended classes of

insecticides,^{2,31} the development of new insecticides is currently a hot issue. Among the insecticides targeting AChE, a novel class of methylcarbamate hybrids has been developed.^{32,33} In this family, the most potent inhibitors were *meta*-substituted to the phenyl ring (compound **1**) and possessed an IC₅₀ value in the nanomolar range with low selectivity towards *MdAChE*.^{30,33} Compared to those of our highlighted inhibitors (**K299**, **K302**, and **K419**), their inhibitory effect and selectivity index were very similar. On the other hand, the *ortho*-substituted carbamate derivatives (compounds **7** and **8**), which possessed higher values of IC₅₀, *hAChE*, exhibited up to 350-fold selectivity, which significantly exceeded that of our most of the selective compounds (**K299**, **K416**, and **K423**) in this study. Recently, Pang *et al.* have described thiol-reactive compounds, which interfere with free cysteine in PAS of *AgAChE*; *hAChE* has no such free cysteine.⁹ These experimental thiol-compounds inhibited >95% of *AgAChE* activity after a 1 h exposure at 6 μM. Under this condition, *hAChE* activity remained



unchanged.⁸ This suggested that inhibitors that bind to CAS and concomitantly target free cysteine may lead to highly selective insecticides. In this regard, our screened compounds are dual-binding site inhibitors; thus, in some ways, they follow the innovative Pang's dual binding site strategy.

Moreover, it was described that bis-pyridinium compounds bearing a polymethylene linker of up to four carbons did not inhibit the response of the nicotinic ACh receptor.³⁴ Furthermore, a representative compound of bis-isoquinolinium salts was also evaluated for its nicotinic effect, and no inhibitory ability was confirmed.³⁵ Therefore, we do not speculate any inhibitory effect of our most promising compounds (**K299**, **K416**, and **K423**) on the nicotinic ACh receptors.

Docking studies

To explain the reasons for varied potencies between *hAChE* and *MdAChE* inhibition, several ligands were docked into their

active sites as these enzymes were involved in the biological assay. In this context, we followed our previously described protocol.^{36–39} Moreover, the prediction of the ligand anchored onto the cavity of greenbug AChE (*Schizaphis graminum*, *SgAChE*) was carried out. The rationale for selection of this enzyme is structural similarity to *Anopheles gambiae* AChE.¹³ Moreover, the structure of *SgAChE* is freely available from the RCSB Protein Data Bank as a 3D theoretical model (PDB ID: 2HCP). The crystal structure of *hAChE* (PDB ID: 4EY7) with the well-known Alzheimer's disease drug donepezil was used as the template receptor for docking.^{32,40,41} Donepezil, likewise the intended ligands used in this study, is a dual-binder, *i.e.* a compound capable of simultaneously interacting with both anionic sites of AChE. *MdAChE* enzyme is not freely available from the RCSB Protein Data Bank; hence, this enzyme has been created based on the homology modeling technique and further validated before performing the *in silico* calculations (see the

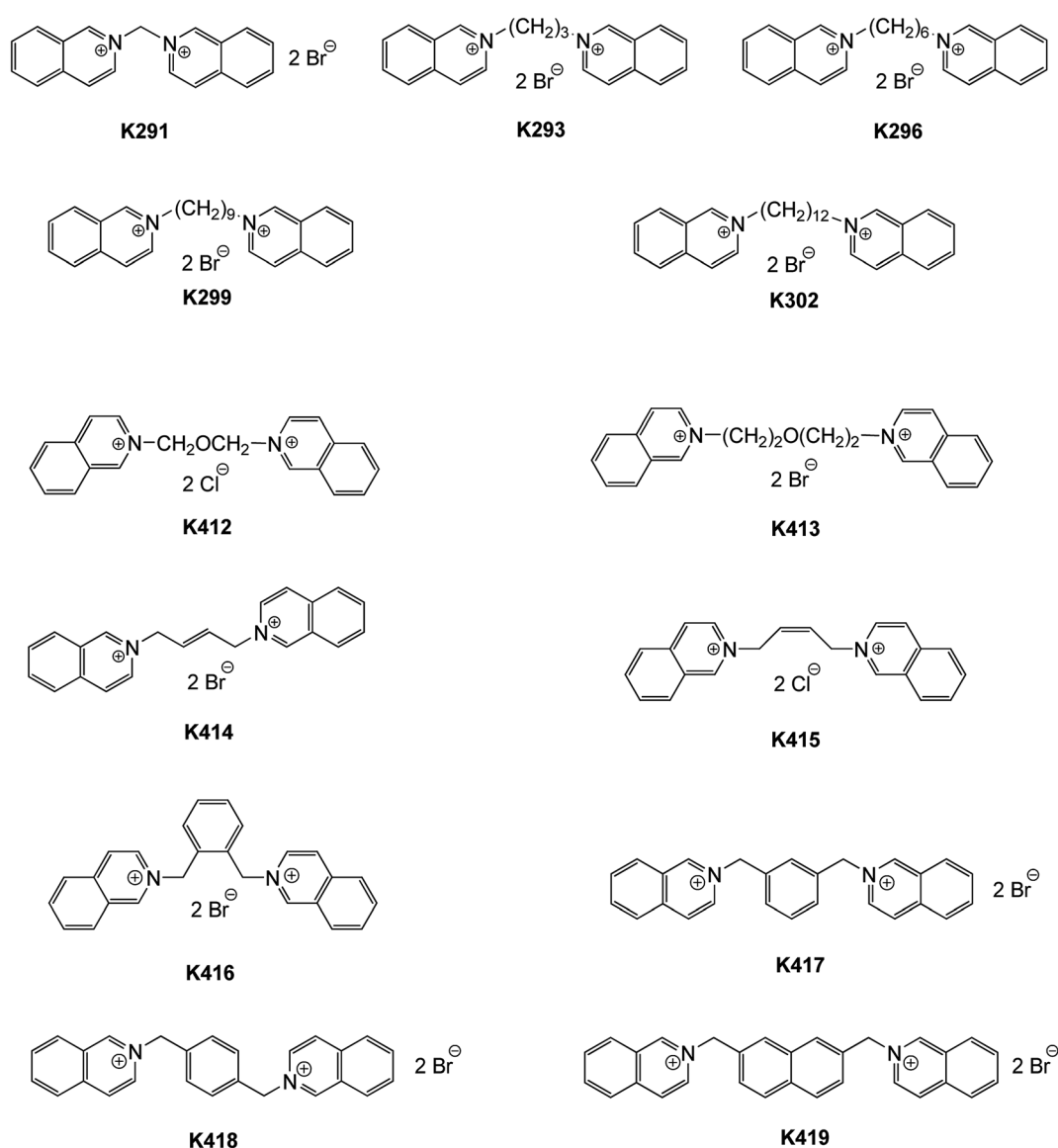


Fig. 2 Structures of the evaluated bis-isoquinolinium compounds with aliphatic and aromatic linkers.



Experimental section). Based on the selectivity and activity profiles, we have chosen **K299**, being the most potent inhibitor of *MdAChE* from the family of bis-isoquinolinium salts, **K416**, having the highest selectivity ratio index for *MdAChE* under this study, **K423**, the highlighted *MdAChE* inhibitor from bis-pyridinium salts, and **K425**, as the highly effective *hAChE* binder with no activity towards *MdAChE* in the tested concentration scale.

Initially, **K299** revealed a dual-binding site character in all three models of *AChE* (Fig. 3), but with several divergences that might explain different enzyme affinity.²² Regarding the *hAChE* enzyme (Fig. 3A and B), the proximal isoquinoline heterocyclic core is engaged in parallel π - π /cation- π interactions with Tyr337 (3.8 Å), T-shaped π - π /cation- π interaction with Trp86 (3.5 Å), and π - π stacking with Phe338 (3.7 Å), whereas the distal isoquinoline moiety is sandwiched between Trp286 (3.6 Å) and Tyr124 (4.1 Å) *via* π - π and/or cation- π stacking. The linker combining both isoquinolines is responsible for weak van der Waals contact to Phe297 and Tyr341. Ser203 from the catalytic triad displayed a hydrophobic interaction to **K299**. On the contrary, His447 demonstrated unfavorable positive-positive repulsion to charged nitrogen from the proximal isoquinoline moiety. The **K299-MdAChE** (Fig. 3C and D) complex is somewhat different from the **K299-hAChE** ternary complex.

The overall arrangement in the **K299-MdAChE** complex placed the ligand in proximity of Tyr151, making this amino acid a cornerstone for contacting both isoquinolines as well as nine-methylene linker *via* either π - π /cation- π or hydrophobic interactions. Several other important amino acid residues provided contact to **K299**. In this case, no catalytic triad residue showed contact to **K299**. The last model **K299-SgAChE** in some way combines positive features of the previously mentioned **K299-hAChE** and **K299-MdAChE** ternary complexes. Tyr335 (*SgAChE*) is equal to Tyr151 (*MdAChE*) and hence fulfils the role of the central amino acid in which proximity **K299** lies. The distal isoquinoline core is sandwiched between Trp283 (3.6 Å) and Tyr124 (4.0 Å).

In terms of the balanced selectivity and potency prediction using docking studies, all the abovementioned observations indicate that **K299** can be the lead candidate in the search for a novel pesticide. However, further evaluation is necessarily needed to confirm this statement.

Continuing with the bis-isoquinolinium subset, the compound **K416** (Fig. 4) was preferably selected for docking simulation instead of other aromatically linked bis-isoquinolinium salts (**K417**, **K418**, and **K419**) based on the highest selectivity profile towards *MdAChE*. It is well-known that introduction of a flexible linker in combination with an aromatic moiety leads to activity enhancement.^{32,42} This is in accordance with the aromatic residue-abundant character of the mid-gorge region of the *AChE* enzyme. Indeed, this might be the case for some derivatives from the family of aromatically linked bis-isoquinolinium salts. However, hybrids used in this study combined only the short methylene chain with the aromatic part, which in general did not reach the inhibition potency of alkyl-tethered bis-isoquinolinium salts. This is presumably caused by the insufficient length of aromatically linked bis-

isoquinolinium salts between the catalytic anionic site (CAS) moiety and the peripheral anionic site (PAS) binder, *i.e.* between both isoquinoline cores. The distance between these regions for an ideal inhibitor was found to be around 20 Å.⁴³ Apart from all these, **K416** is specific as compared to other inhibitors inspected in this study because it contains an *o*-disubstituted xylene moiety. This liability is plausibly responsible for less linear properties in **K416** as compared to those in other aromatically linked inhibitors (**K417**, **K418**, and **K419**), thus preserving steric rigidity leading to specific interactions and discrepancies in the binding sites of each *AChE* enzyme. Upon closer observation of the 3D complex of **K416-hAChE** (Fig. 4A and B), it was evident that the distal isoquinoline core was not able to establish favorable π - π /cation- π contact with Trp286, a crucial PAS amino acid residue. This amino acid residue is only involved in very weak hydrophobic contact. On the contrary, the proximal isoquinoline moiety is engaged in face-to-face π - π /cation- π interaction with Tyr341 (3.8 Å). This amino acid residue is also implicated in distorted π - π stacking with the connecting *o*-xylene moiety with the distance of 3.8 Å. At the opposite site, deep in the gorge of *hAChE*, proximal isoquinoline can be found, forming parallel π - π contact with Trp86 (3.9 Å). No direct interaction can be observed between **K416** and the catalytic triad residues of *hAChE*. In contrast, **K416** revealed edge-to-edge ligand anchoring supported by parallel π - π interactions with Tyr151 (3.6 Å) and a sandwich orientation to Tyr447 (4.0 Å) and Trp163 (3.8 Å) in the PAS and CAS regions of *MdAChE*, respectively. Additionally, His557 from the catalytic triad furnished plausible hydrophobic contact with **K416**. Several other interactions can be found as well, *e.g.* σ - π contact between the distal isoquinoline heterocycle and Thr232, alkyl- π interaction with Met231, van der Waals interactions with Tyr407, Trp549, and Glu160, and many others. All the amino acid residues encompassing the **K416** in the cavity of *MdAChE* are highlighted in Fig. 4(C and D). These findings justify the high potency and selectivity of **K416** for *MdAChE* over *hAChE*. The investigation of the predictive model of **K416** in *SgAChE* (Fig. 4E and F) is closely related to that of the **K299-SgAChE** complex with Tyr335 networking both isoquinolines. In this case, a plethora of attractive interactions can be found such as plausible cation- π interactions with Tyr124, Asp75, and Tyr331. The catalytic triad seems to stand aside of enzyme-ligand anchoring.

Via probing **K423**, the most potent and selective *MdAChE* binder from the bis-pyridinium family containing a but-(2*E*)-en-1,4-diyl linker, some structure diversity in the specific *AChE* active sites can be concluded. Considering the **K423-hAChE** complex (Fig. 5A and B), **K423** furnished a typical dual-binding site pattern spanning the cavity gorge from the entrance to the bottom of the deep gorge. Every aromatic part of the ligand revealed face-to-face π - π and/or cation- π interactions with its amino acid counterpart proximally to the enzyme center in the order Trp286 (3.7 Å), Tyr341 (4.0 Å), Tyr337 (3.7 Å), and Trp86 (4.0 Å). Interestingly, all the catalytic triad residues are connected through hydrophobic interaction to **K423**. In contrast to *hAChE*, **K423** mimics a similar spatial orientation in *MdAChE* (Fig. 5C and D), extending from the rim to underneath the gorge. Similarly, each aromatic part of the ligand displayed



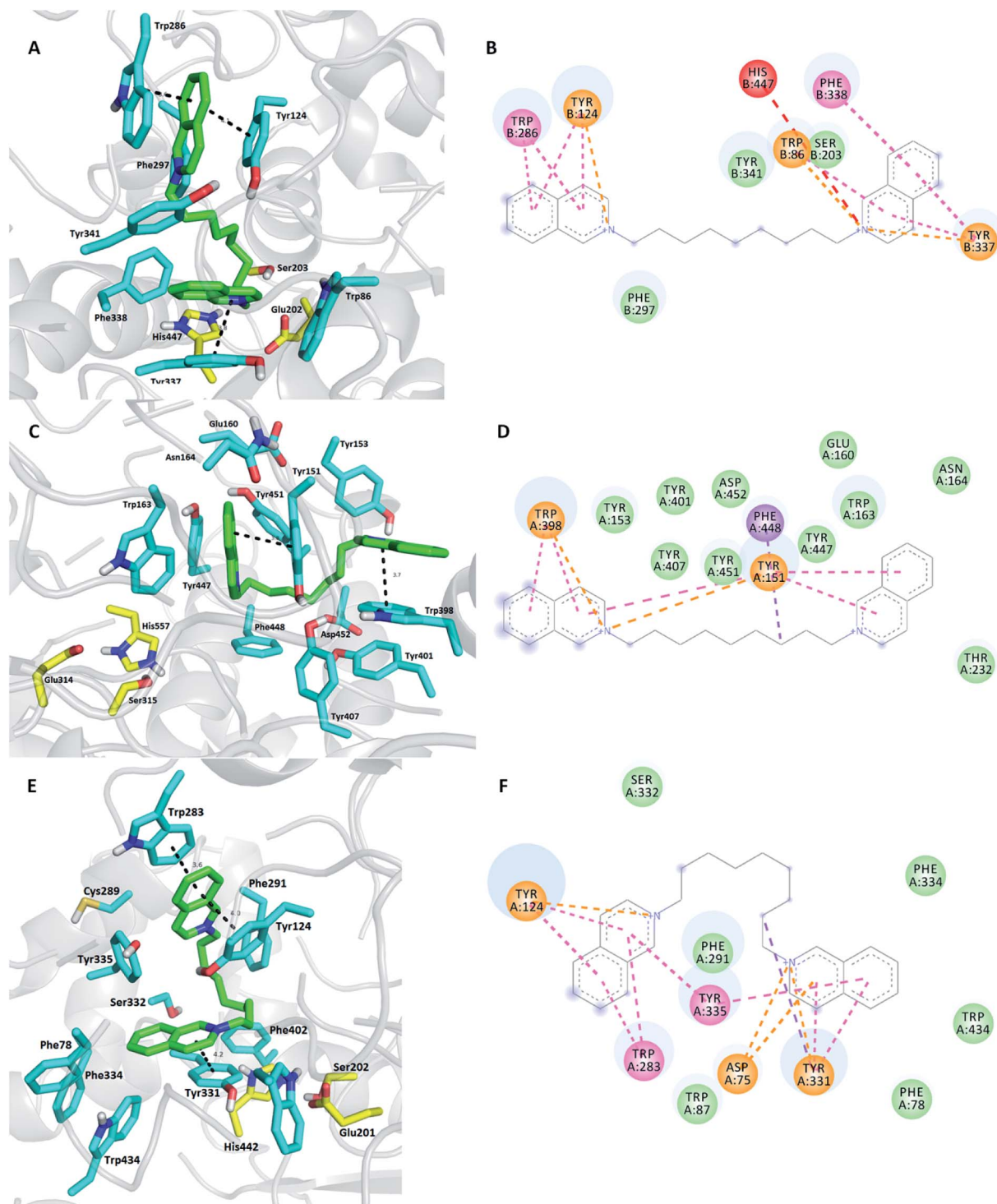


Fig. 3 Superimposition of K299 at hAChE, MdAChE, and SgAChE active sites displayed in figures (A, C, and E), respectively, as 3D ternary complexes. 2D diagrams for K299 in hAChE, MdAChE, and SgAChE are shown in figures (B, D, and F), respectively. The ligand is rendered as green carbon atoms, the amino acid residues involved in the enzyme–ligand interaction are shown as blue carbon atoms, and the catalytic triad is portrayed in yellow (A, C, and E). The rest of the enzyme is depicted as a grey cartoon (A, C, and E). 2D diagrams (figures B, D, and F) were created with Discovery Studio 2016 Client, whereas 3D figures were generated using PyMol 1.5.0.4 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). Legend for 2D diagrams: blue spots on the ligand's carbons designate areas of hydrophobic interaction; orange dashes/residues represent cation- π interactions; pink dashes/residues show π - π stacked or T-shaped contacts; green residues delineate van der Waals contacts; red dashes/residues are for unfavorable positive-positive repulsion.



favorable π - π and/or cation- π contacts with aromatic amino acid residues delineating the cavity enzyme. Stronger affinity of **K423** to *MdAChE* over *hAChE* might be provided by the web of

several cation π interactions, as illustrated in Fig. 4D. The model of **K423-SgAChE** (Fig. 5E and F) gave the worst fit to the active site and thus could be considered as the potential

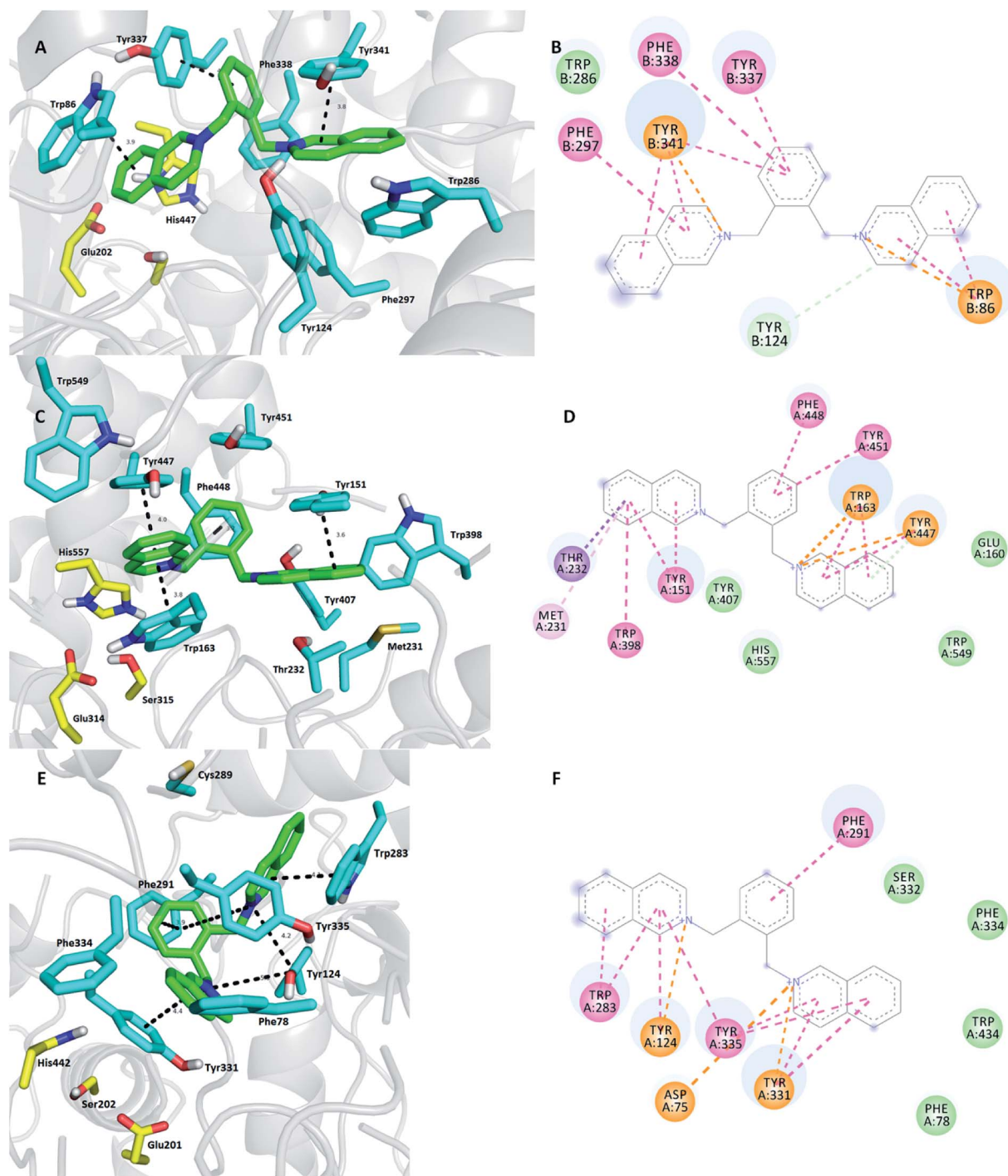


Fig. 4 Superimposition of **K416** at *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* active sites displayed in figures (A, C, and E), respectively, as 3D ternary complexes. 2D diagrams for **K416** in *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* are shown in figures (B, D, and F), respectively. The ligand is rendered as green carbon atoms, the amino acid residues involved in the enzyme-ligand interaction are shown as blue carbon atoms, and the catalytic triad is portrayed in yellow (A, C, and E). The rest of the enzyme is depicted as a grey cartoon (A, C, and E). 2D diagrams (figures B, D, and F) were created with Discovery Studio 2016 Client, whereas 3D figures were generated using PyMol 1.5.0.4 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). Legend for 2D diagrams: blue spots on the ligand's carbons designate areas of hydrophobic interaction; orange dashes/residues represent cation- π interactions; pink dashes/residues show π - π stacked or T-shaped contacts; green residues delineate van der Waals contacts; red dashes/residues are for unfavorable positive-positive repulsion.



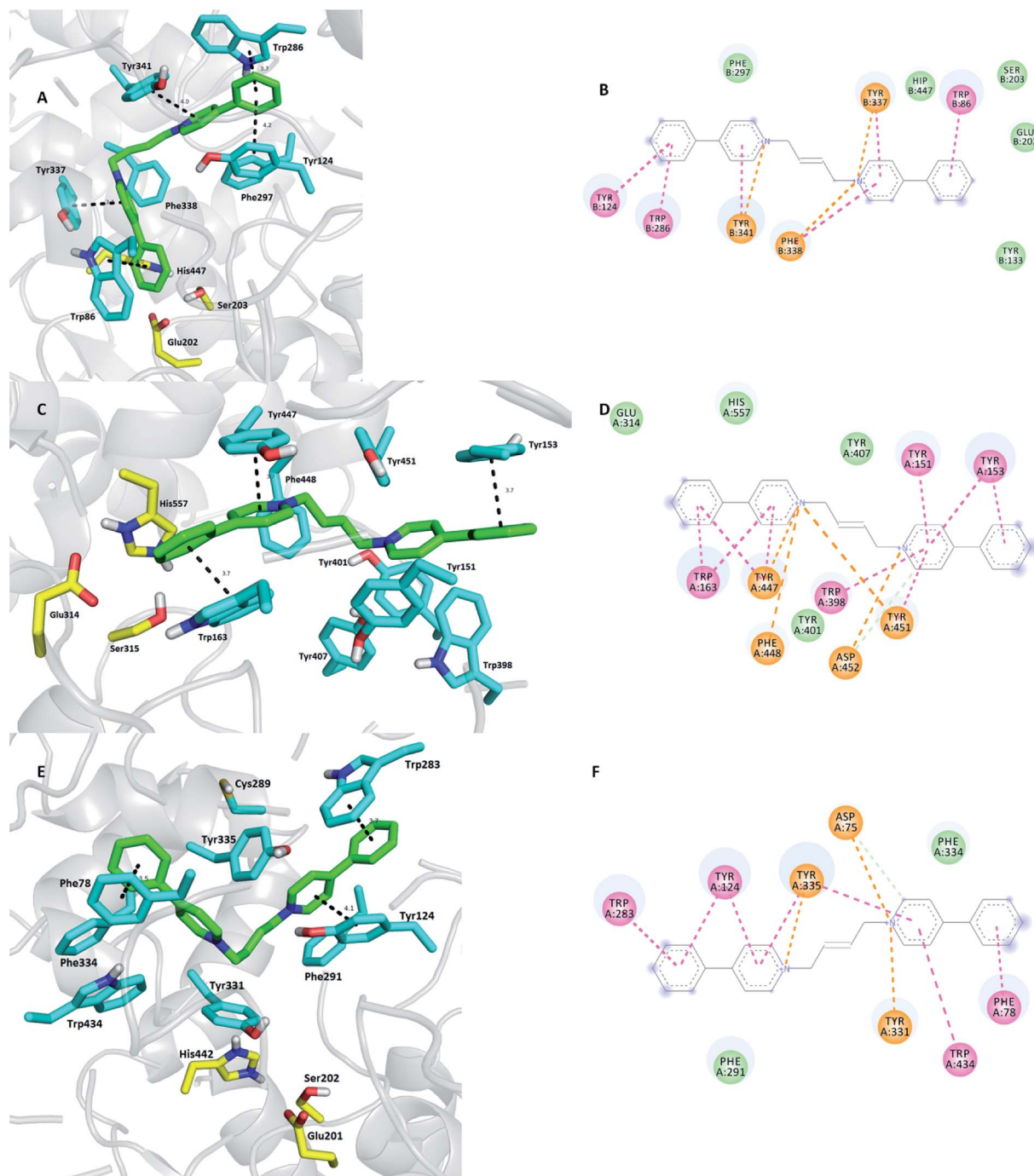


Fig. 5 Superimposition of K423 at *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* active sites displayed in figures (A, C, and E), respectively, as 3D ternary complexes. 2D diagrams for K423 in *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* are shown in figures (B, D, and F), respectively. The ligand is rendered as green carbon atoms, the amino acid residues involved in the enzyme–ligand interaction are shown as blue carbon atoms and the catalytic triad is portrayed in yellow (A, C, and E). The rest of the enzyme is depicted as a grey cartoon (A, C, and E). 2D diagrams (figures B, D, and F) were created with Discovery Studio 2016 Client, whereas 3D figures were generated using PyMol 1.5.0.4 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). Legend for 2D diagrams: blue spots on the ligand's carbons designate areas of hydrophobic interaction; orange dashes/residues represent cation– π interactions; pink dashes/residues show π – π stacked or T-shaped contacts; green residues delineate van der Waals contacts; red dashes/residues are for unfavorable positive–positive repulsion.

pesticide with the lowest interest in this study. This is mainly speculated to be due to the unbeneficial occupation of the cavity of *SgAChE* where some face-to-face π – π stacking is missing and also the density of cation– π interactions is not so high.

Lastly, our *in silico* study disclosed **K425** as the ligand with no activity towards *MdAChE* and high affinity to the *hAChE* enzyme in the tested concentration scale (Fig. 6).²⁸ Taking into account all the findings, no clear results or SAR data can be drawn based on



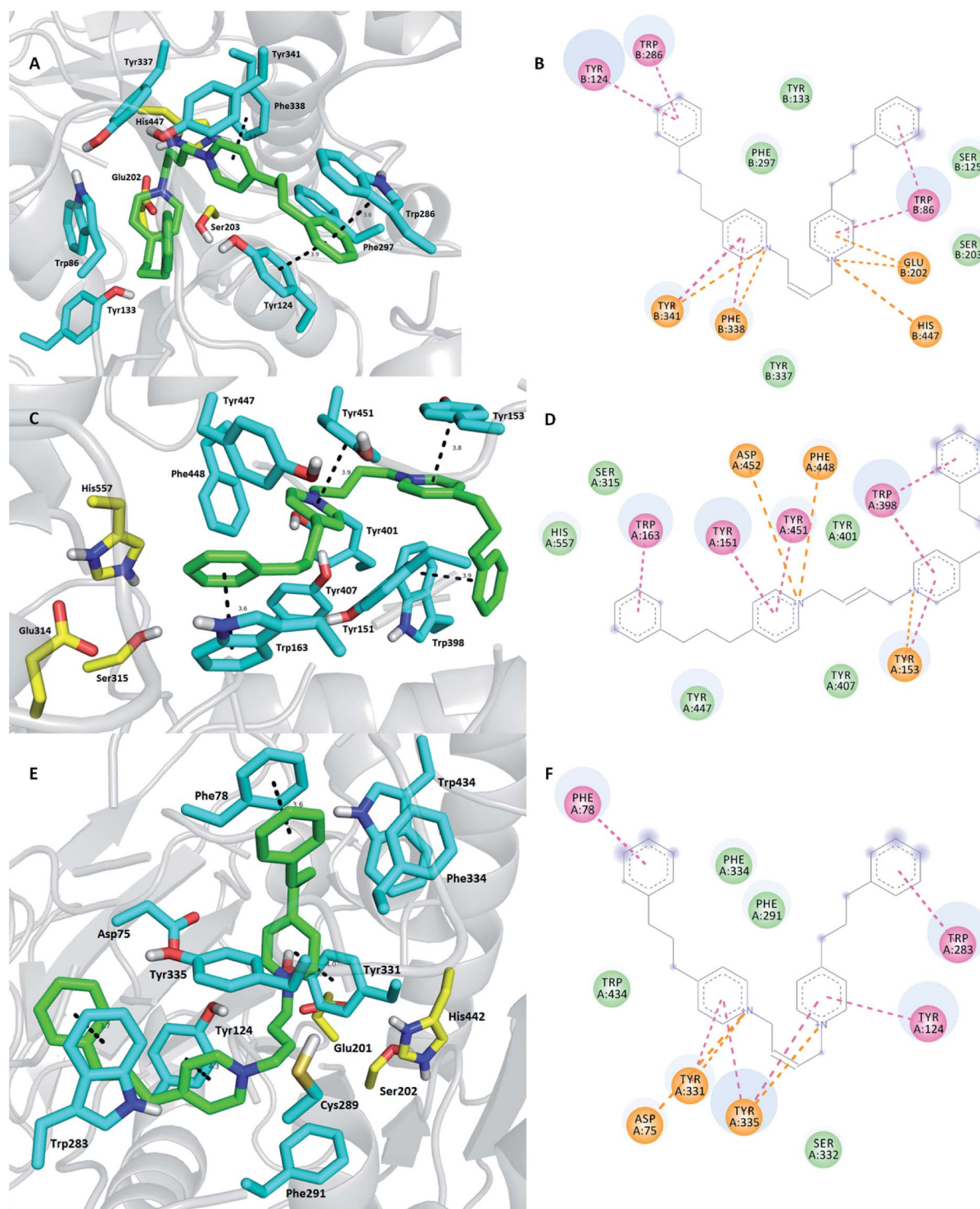


Fig. 6 Superimposition of K425 at *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* active sites displayed in figures (A, C, and E), respectively, as 3D ternary complexes. 2D diagrams for K425 in *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE* are shown in figures (B, D, and F), respectively. The ligand is rendered as green carbon atoms, the amino acid residues involved in the enzyme–ligand interaction are shown as blue carbon atoms and the catalytic triad is portrayed in yellow (A, C, and E). The rest of the enzyme is depicted as a grey cartoon (A, C, and E). 2D diagrams (figures B, D, and F) were created with Discovery Studio 2016 Client, whereas 3D figures were generated using PyMol 1.5.0.4 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). Legend for 2D diagrams: blue spots on the ligand's carbons designate areas of hydrophobic interaction; orange dashes/residues represent cation- π interactions; pink dashes/residues show π - π stacked or T-shaped contacts; green residues delineate van der Waals contacts; red dashes/residues are for unfavorable positive-positive repulsion.



the molecular level of the enzyme–ligand interaction. This is indeed true for all three cases of **K425** *hAChE*, **K425** *MdAChE*, and **K425** *SgAChE* where no clear differences can be observed in the ligand lodging. Presumably, more definite results might be generated *via* molecular dynamics or Monte Carlo methods; however, these techniques are beyond the scope of this study.^{44,45} The docking score calculated by the Vina score (hybrid scoring function combining empirical and knowledge-based scoring) for **K425** *hAChE*, **K425** *MdAChE*, and **K425** *SgAChE* complexes was -12.7 kcal mol⁻¹, -12.4 kcal mol⁻¹, and -13.0 kcal mol⁻¹, respectively, which slightly correlated with the obtained *in vitro* results. Moreover, the energetic balance obtained for the **K425** *SgAChE* complex does not discriminate this ligand from further development as a selective pesticide. Note that further biological assays towards *SgAChE* or related enzymes are necessarily needed to make any clear conclusion.

Conclusions

In summary, 34 compounds were evaluated for their inhibition ability to human and insect AChE. Their potency to inhibit *hAChE* and *MdAChE* was tested *in vitro*, and SI values were calculated to establish their selectivity. The most promising compounds in terms of selectivity were **K299**, **K416**, and **K423**, being more selective than the approved carbamates for controlling vector-borne disease. Consequently, the promising selectivity of these screened compounds was determined *via* docking study with *hAChE*, *MdAChE*, and *SgAChE*. The apparent interactions of π – π or π –cationic origin were described with several discrepancies indicating the binding differences. The docking study highlighted **K299** and **K416** as the candidates for lead structures in novel pesticides. However, further evaluation is needed to confirm this proof-of-concept.

Acknowledgements

The authors would like to thank Jitka Turanova for her technical assistance. The work was financially supported by the by Ministry of Health of the Czech Republic (No. 16-34390A) and by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (No. SV/UHK2109 and No. SV/FVZ201601). Computational resources were provided by the CESNET LM2015042 and the CERIT Scientific Cloud LM2015085, provided under the programme “Projects of Large Research, Development, and Innovations Infrastructures”. The experiments were performed in compliance with the Czech legislation and institutional guidelines of the Faculty of Military Health Sciences, University of Defence. The institutional ethical committee of the Faculty of Military Health Sciences, University of Defence approved the experiment. The informed consents were obtained from all human subjects who provided the blood samples.

Notes and references

1 WHO/WHOPES, WHO Pesticides Evaluation Scheme, WHO, cited 2015 May 15, <http://www.who.int/whopes/questions/en/>.

- WHO/Fact Sheet, World Malaria Report 2015, WHO, cited 2016 Sep 21, <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2015/en/>.
- WHO/Zika virus, WHO, cited 2016 Feb 3, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>.
- C. Boase, Bedbugs – back from the brink, *Pestic. Outlook*, 2001, **12**(4), 159–162.
- D. W. Ragsdale, B. P. McCornack, R. C. Venette, B. D. Potter, I. V. MacRae, E. W. Hodgson, *et al.*, Economic threshold for soybean aphid (Hemiptera: Aphididae), *J. Econ. Entomol.*, 2007, **100**(4), 1258–1267.
- Y.-P. Pang, Chapter Six – Insect Acetylcholinesterase as a Target for Effective and Environmentally Safe Insecticides, in *Advances in Insect Physiology*, ed. E. Cohen, Academic Press, 2014, vol. 46, p. 435–494, available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124170100000069>.
- Y.-P. Pang, Novel acetylcholinesterase target site for malaria mosquito control, *PLoS One*, 2006, **1**, e58.
- Y.-P. Pang, S. K. Singh, Y. Gao, T. L. Lassiter, R. K. Mishra, K. Y. Zhu, *et al.*, Selective and irreversible inhibitors of aphid acetylcholinesterases: steps toward human-safe insecticides, *PLoS One*, 2009, **4**(2), e4349.
- Y.-P. Pang, Species marker for developing novel and safe pesticides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**(1), 197–199.
- S. B. Walsh, T. A. Dolden, G. D. Moores, M. Kristensen, T. Lewis, A. L. Devonshire, *et al.*, Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance, *Biochem. J.*, 2001, **359**(1), 175–181.
- Y. Lu, Y. Park, X. Gao, X. Zhang, J. Yao, Y.-P. Pang, *et al.*, Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*, *Sci. Rep.*, 2012, **2**, 288.
- Y. H. Kim, J. Y. Choi, Y. H. Je, Y. H. Koh and S. H. Lee, Functional analysis and molecular characterization of two acetylcholinesterases from the German cockroach, *Blattella germanica*, *Insect Mol. Biol.*, 2010, **19**(6), 765–776.
- Y.-P. Pang, S. Brimijoin, D. W. Ragsdale, K. Y. Zhu and R. Suranyi, Novel and viable acetylcholinesterase target site for developing effective and environmentally safe insecticides, *Curr. Drug Targets*, 2012, **13**(4), 471–482.
- R. N'Guessan, F. Darriet, P. Guillet, P. Carnevale, M. Traore-Lamizana, V. Corbel, *et al.*, Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase, *Med. Vet. Entomol.*, 2003, **17**(1), 19–25.
- J. M. Mutunga, T. D. Anderson, D. T. Craft, A. D. Gross, D. R. Swale, F. Tong, *et al.*, Carbamate and pyrethroid resistance in the akron strain of *Anopheles gambiae*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2015, **121**, 116–121.
- T. S. Awolola, O. A. Oduola, C. Strode, L. L. Koekemoer, B. Brooke and H. Ranson, Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae sensu stricto* from Nigeria, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2009, **103**(11), 1139–1145.



- 17 D. J. Im, W. T. Kim and K. S. Boo, Purification and Partial cDNA Sequence of Acetylcholinesterase from a Korean Strain of the Housefly, *Musca domestica*, *J. Asia-Pac. Entomol.*, 2004, **7**(1), 81–87.
- 18 J. Jeyaratnam, Acute pesticide poisoning: a major global health problem, *World Health Stat. Q. Rapp. Trimest. Stat. Sanit. Mond.*, 1990, **43**(3), 139–144.
- 19 T. Satoh and R. C. Gupta, *Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*, John Wiley & Sons, 2011. p. 645.
- 20 K. Musilek, R. Pavlikova, J. Marek, M. Komloova, O. Holas, M. Hrabnova, *et al.*, The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2E)-en-1,4-diyl connecting linkage, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2011, **26**(2), 245–253.
- 21 K. Musilek, M. Komloova, O. Holas, M. Hrabnova, M. Pohanka, V. Dohnal, *et al.*, Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage – Implications for early Myasthenia gravis treatment, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**(2), 811–818.
- 22 K. Musilek, M. Komloova, V. Zavadova, O. Holas, M. Hrabnova, M. Pohanka, *et al.*, Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage—initial study for Myasthenia gravis implications, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**(5), 1763–1766.
- 23 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 88–95.
- 24 M. Pohanka, J. Z. Karasova, K. Kuca, J. Pikula, O. Holas, J. Korabecny, *et al.*, Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX, *Talanta*, 2010, **81**(1–2), 621–624.
- 25 F. Worek, G. Reiter, P. Eyer and L. Szinicz, Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates, *Arch. Toxicol.*, 2002, **76**(9), 523–529.
- 26 O. Soukup, D. Jun, J. Zdarova-Karasova, J. Patocka, K. Musilek, J. Korabecny, *et al.*, A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine, *Curr. Alzheimer Res.*, 2013, **10**(8), 893–906.
- 27 F. Zemek, L. Drtinova, E. Nepovimova, V. Sepsova, J. Korabecny, J. Klimes, *et al.*, Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2014, **13**(6), 759–774.
- 28 M. Komloova, K. Musilek, A. Horova, O. Holas, V. Dohnal, F. Gunn-Moore, *et al.*, Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical bis-quinolinium cholinesterase inhibitors—implications for early Myasthenia gravis treatment, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**(8), 2505–2509.
- 29 WHO/WHO Pesticide Evaluation Scheme, “WHOPES”, WHO, cited 2016 Sep 21, <http://www.who.int/whopes/en/>.
- 30 Y. Jiang, D. Swale, P. R. Carlier, J. A. Hartsel, M. Ma, F. Ekström, *et al.*, Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2013, **106**(3), 156–161.
- 31 D. R. Swale, P. R. Carlier, J. A. Hartsel, M. Ma and J. R. Bloomquist, Mosquitocidal carbamates with low toxicity to agricultural pests: an advantageous property for insecticide resistance management, *Pest Manage. Sci.*, 2015, **71**(8), 1158–1164.
- 32 WHO, Insecticide resistance, WHO, 2016 Sep 20, http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticide_resistance/en/.
- 33 J. A. Hartsel, D. M. Wong, J. M. Mutunga, M. Ma, T. D. Anderson, A. Wysinski, *et al.*, Re-engineering aryl methylcarbamates to confer high selectivity for inhibition of *Anopheles gambiae* versus human acetylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**(14), 4593–4598.
- 34 A. Ring, B. O. Strom, S. R. Turner, C. M. Timperley, M. Bird, A. C. Green, *et al.*, Bispyridinium Compounds Inhibit Both Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Human Cell Lines, *PLoS One*, 2015, **10**(8), e0135811.
- 35 V. Sepsova, J. Krusek, J. Zdarova Karasova, F. Zemek, K. Musilek, K. Kuca, *et al.*, The interaction of quaternary reversible acetylcholinesterase inhibitors with the nicotinic receptor, *Physiol. Res.*, 2014, **63**(6), 771–777.
- 36 E. Nepovimova, J. Korabecny, R. Dolezal, K. Babkova, A. Ondrejicek, D. Jun, *et al.*, Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**(22), 8985–9003.
- 37 J. Korabecny, R. Dolezal, P. Cabelova, A. Horova, E. Hrubá, J. Rícný, *et al.*, 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **82**, 426–438.
- 38 J. Korabecny, M. Andrs, E. Nepovimova, R. Dolezal, K. Babkova, A. Horova, *et al.*, 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment, *Molecules*, 2015, **20**(12), 22084–22101.
- 39 S. K. Lee, M. K. Park, H. E. Jhang, J. Yi, K. Nahm, D. W. Cho, *et al.*, Preparation of 7-Methoxy Tacrine Dimer Analogs and Their In vitro/In silico Evaluation as Potential Cholinesterase Inhibitors, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2015, **36**(6), 1654–1660.
- 40 J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, *et al.*, Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**(22), 10282–10286.
- 41 M. Harel, G. Kryger, T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, T. Lewis, R. J. Fletcher, *et al.*, Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors, *Protein Sci.*, 2000, **9**(6), 1063–1072.
- 42 J. Korabecny, L. Janovec, K. Musilek, F. Zemek, A. Horova, E. Nepovimova, *et al.*, Comparison of Novel Tacrine and 7-



- MEOTA Derivatives with Aromatic and Alicyclic Residues: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies, *Lett. Org. Chem.*, 2013, **10**(4), 291–297.
- 43 K. Musilek, O. Holas, J. Misik, M. Pohanka, L. Novotny, V. Dohnal, *et al.*, Monooxime-monocarbamoyl Bispyridinium Xylene-Linked Reactivators of Acetylcholinesterase-Synthesis, In vitro and Toxicity Evaluation, and Docking Studies, *ChemMedChem*, 2010, **5**(2), 247–254.
- 44 J. D. Durrant and J. A. McCammon, Molecular dynamics simulations and drug discovery, *BMC Biol.*, 2011, **9**, 71.
- 45 E. Paquet and H. L. Viktor, Molecular dynamics, monte carlo simulations, and langevin dynamics: a computational review, *BioMed Res. Int.*, 2015, **2015**, 183918.



Příloha č. 5

Supporting information

Bis-isoquinolinium and bis-pyridinium acetylcholinesterase inhibitors: in vitro screening of probes for novel selective insecticides

Veronika Hrabcova^{a,b}, Jan Korabecny^{b,c}, Brigita Manyova^{b,d}, Lenka Matouskova^{b,d}, Tomas Kucera^b, Rafael Dolezal^{a,c}, Kamil Musilek^{a,b,c}, Lukas Gorecki^{b,c}, Eugenie Nepovimova^{b,c}, Kamil Kuca^{a,b,c}, Daniel Jun^{b,c*}

^a *University Hradec Kralove, Faculty of Science, Department of Biology, Rokitanskeho 62, 50003 Hradec Kralove, Czech Republic*

^b *University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Toxicology and Military Pharmacy, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic*

^c *University Hospital, Biomedical Research Centre, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic*

^d *Charles University, Faculty Of Pharmacy, Department of Pharmacology and Toxicology, Akademika Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic*

* Corresponding author: Daniel Jun; address: University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Toxicology and Military Pharmacy, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic.; E-mail: daniel.jun@unob.cz; phone: 00 420 973 255 193

1. Homogenate preparation from Musca domestica

The housefly larvae were bought at specialized store. Larvae were kept in the dark under the room temperature until the adult house flies hatched out. Adult flies were frozen and keep under -80 °C at least for two weeks. 30 fly's heads were homogenized at 4 °C in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1% (w/v) Triton X-100 by using Bandelin Sonoplus 2070. The homogenates containing AChE from *Musca domestica* (MdAChE) were centrifuged for 15 minutes (4 °C, 5000 RPM). The supernatants were filtrated through 0.2 µm PVDF filters and used for studying acetylcholine inhibitors.

2. Preparation of AChE from human blood

Haemoglobine-free erythrocyte ghosts were prepared according to Worek et al.¹ with minor modifications. Heparinised human blood was centrifuged for 20 minutes (4 °C, 5000 RPM) by Hettich Universal 320R centrifuge. The plasma was separated, buffy coat was removed and erythrocytes were washed three times by 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Washed erythrocytes were centrifuged 5 minutes at 5000 RMP at 4 °C. Then, the packed erythrocytes were hemolyzed by dilution in the 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 and the process was accelerated by storage at -80 °C. Haemoglobine was removed by process of dilution and ultracentrifugation. Erythrocytes were washed two times with 0.01 mM phosphate buffer, pH 7.4 and centrifuged for 30 minutes (4 °C, 20 800 RPM) by Beckman Coulter, Optima L-90K centrifuge. Then, the sediment was resuspended by 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 and centrifuged for the last time under the constant conditions. The haemoglobine-free erythrocyte ghosts containing AChE were collected and storage at -80 °C.

3. Biological evaluation of AChE activity

In order to investigate the selectivity of AChE inhibitors to the insect enzyme we used modified Ellman protocol.^{2,3} The assay mixture (200 µl) contained 1 mM acetylthiocholine iodide as substrate and 0.25 mM DTNB as chromogen in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The activity was determined by measuring of the increase in absorbance at 412 nm at 37°C in 2 min intervals using Multi-mode microplate reader Synergy 2 (Vermont, USA).

4. Inhibition and selectivity to insect AChE

The IC₅₀ values were expressed as a concentration of compound required for 50% reduction in cholinesterase activity. Homogenate from *Musca domestica* fly heads was used as a source of the insect AChE and the heaemoglobine-free erythrocyte ghosts as a source of human AChE. Assays were handled parallel on human and insect enzyme. Assayed solutions of target compounds (10^{-3} – 10^{-10} M) were preincubated at 96-well plate for 5 min at 37°C. Each concentration was assayed

in triplicate. Software Microsoft Excel (Redmont, WA, USA) and GraphPad Prism version 5.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) were used for the statistical data evaluation. Selectivity index (SI) was calculated as a ratio of IC50 value of human AChE/IC50 value of fly AChE.

5. *In silico studies*

Two structures of AChE were gained from RCSB Protein Data Bank – PDB ID: 4EY7 (crystal structure of *hAChE*) and 2HCP (theoretical model of Greenbug AChE provided by Pang, Y.P.; *Schizaphis graminum*, *SgAChE*).⁴ Structure of *MdAChE* was built by homology modeling. The model was based on the sequence ID Q7YWJ9 from UniProt database. The 3D structure of *Drosophila melanogaster* AChE was chosen as the template (PDB ID 1DX4, X-ray structure, resolution 2.7 Å, complex with tacrine derivative 9-(3-phenylmethylamino)-1,2,3,4-tetrahydroacridine, overall sequence identity 88.32 %).⁵ The model was built by Swiss-model software (ProMod3 v. 1.0.0; QMQE 0,74, QMEAN4), inspected (one Ramachandran outlier outside of binding cavity) and found suitable for docking.⁶⁻⁸ All receptor structures were prepared by DockPrep function of UCSF Chimera (version 1.4) and converted to pdbqt-files by AutodockTools (v. 1.5.6).^{9,10} Flexible residues selection was based on previous experience (*hAChE*) or spherical region around the binding cavity.¹¹⁻¹³ Three-dimensional structures of ligands were built by Open Babel (v. 2.3.1), minimized by Avogadro (v 1.1.0) and converted to pdbqt-file format by AutodockTools.¹⁴ The docking calculations were done by Autodock Vina (v. 1.1.2) with the exhaustiveness of 8.¹⁵ Calculation was repeated ten times for each ligand and receptor and the best-scored result was selected for manual inspection. The visualization of enzyme-ligand interactions was prepared using 1.5.0.4 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). 2D diagrams were created with Discovery Studio 2016 Client.

Notes and references

- 1 W. F., R. G., E. P. and S. L., *Arch. Toxicol.*, 2002, **76**, 523–529.
- 2 G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres and R. M. Feather-Stone, *Biochem. Pharmacol.*, 1961, **7**, 88–95.
- 3 M. Pohanka, J. Z. Karasova, K. Kuca, J. Pikula, O. Holas, J. Korabecny and J. Cabal, *Talanta*, 2010, **81**, 621–624.
- 4 J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin and J. J. Height, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 10282–10286.
- 5 M. Harel, G. Kryger, T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, T. Lewis, R. J. Fletcher, J. M. Guss, I. Silman and J. L. Sussman, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 2000, **9**, 1063–1072.
- 6 K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, 2006, **22**, 195–201.
- 7 M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, W252-258.
- 8 L. Bordoli, F. Kiefer, K. Arnold, P. Benkert, J. Battey and T. Schwede, *Nat. Protoc.*, 2009, **4**, 1–13.
- 9 E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1605–1612.
- 10 G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**, 2785–2791.
- 11 E. Nepovimova, J. Korabecny, R. Dolezal, K. Babkova, A. Ondrejicek, D. Jun, V. Sepsova, A. Horova, M. Hrabanova, O. Soukup, N. Bukum, P. Jost, L. Muckova, J. Kassa, D. Malinak, M. Andrs and K. Kuca, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 8985–9003.
- 12 J. Korabecny, R. Dolezal, P. Cabelova, A. Horova, E. Hrubá, J. Ricny, L. Sedlacek, E. Nepovimova, K. Spilovska, M. Andrs, K. Musilek, V. Opletalova, V. Sepsova, D. Ripova and K. Kuca, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **82**, 426–438.
- 13 J. Korabecny, M. Andrs, E. Nepovimova, R. Dolezal, K. Babkova, A. Horova, D. Malinak, E. Mezeiova, L. Gorecki, V. Sepsova, M. Hrabanova, O. Soukup, D. Jun and K. Kuca, *Mol. Basel Switz.*, 2015, **20**, 22084–22101.
- 14 N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch and G. R. Hutchison, *J. Cheminformatics*, 2011, **3**, 33.
- 15 O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2010, **31**, 455–461.