

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**Fakulta tropického zemědělství**



**Fakulta tropického  
zemědělství**

**Detekce nových zástupců čeledi Hepadnaviridae  
v transkriptomických a metatranskriptomických datech.**

**Bakalářská práce**

Praha 2024

**Vypracoval:**  
Martin Jabůrek

**Vedoucí práce:**  
RNDr. Jiří Černý, Ph.D.



## **Prohlášení**

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma **Detekce nových zástupců čeledi Hepadnaviridae v transkriptomických a metatranskriptomických datech.** vypracoval samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedl v referencích.

V..... dne .....

.....  
Martin Jabůrek

## **Poděkování**

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Jiřímu Černému Ph.D., za možnost vypracování bakalářské práce právě pod jeho dohledem. Konkrétněji však za jeho důležité poznatky a připomínky a nemalou porci trpělivosti.

Dále bych rád poděkoval Martině Hlavsové za velikou podporu nejen při pomoci se stylistickou stránkou mé bakalářské práce.

# Abstrakt

## **Detekce nových zástupců čeledi Hepadnaviridae v transkriptomických a metatranskriptomických datech.**

Hepadnaviridae je rozsáhlá čeleď DNA virů, která se skládá z pěti rodů infikujících zástupce savců, plazů, ryb, ptáků a v neposlední řadě i člověka. Ve své bakalářské práci jsem stručně a výstižně shrnul dostupné poznatky o této čeledi. Od shrnutí samotné historie objevení čeledi Hepadnaviridae, životního cyklu jednotlivých rodů, taxonomických rozdílů v rámci samotné čeledi a možných budoucích hrozeb způsobených mutacemi, a to nejen pro člověka, ale především pro zvířata. Kromě toho jsem se zaměřil také na možnou detekci nových zástupců v rámci databáze transkriptomických dat "Transcriptomic shotgun assembly" (TSA) GenBank. Pomocí nástroje tBlastn a HBV polymerázy jsem vyhledal v datech a následně zpracoval nejpravděpodobnější a nejvíce validní zástupce napříč celým taxidem Animalia. Devět nejspokojivějších výsledků bylo popsáno a klasifikováno jako HEARTH retroelement, nakednavirus či jako zcela nový zástupce čeledi Hepadnaviridae, případně různé kmeny již existujících zástupců známých virů. Ve své práci jsem ovšem našel také tři nové a dosud nepopsané viry, z nichž dva pocházejí ze zástupců Paprskoploutvých ryb a zbylý jeden ze zástupce Paryb. Závěr mé práce uvádí další potenciální kroky k budoucímu možnému zařazení výsledků a jejich případný dopad na působišti vědeckého pole.

**Klíčová slova:** Hepadnaviridae, virus hepatitidy typu B (HBV), BLAST, metatranskriptomická data, detekce nových virů

## **Author's abstract**

### **Detection of new Hepadnaviridae family representatives in transcriptomic and metatranscriptomic data**

Hepadnaviridae is a vast family of DNA viruses consisting of five genera infecting representatives of mammals, reptiles, fish, birds and finally humans. In my bachelor thesis I have briefly but effectively summarized pieces of knowledge available about this family. Following the history of discovering the Hepadnaviridae, life cycle of different genera, taxonomic differences within the family itself and possible future threats caused by the various mutations not just for humans but more importantly for the animals. In addition, I also focused on the detection of a new representatives within the transcriptomic data “Transcriptomic shotgun assembly” (TSA) of the GenBank database. By using the tBlastn tool and HBV polymerase I have sequenced and found the most probable and valid representatives across the whole Animalia taxid. Nine of the most satisfactory results were described and classified as a HEARTH retro-element, nakednavirus, whole new Hepadnaviridae representatives or different strains of already existing ones. In my search I also found three new and undescribed viruses from which two are from the representatives of Actinopterygii fishes and one of Chondrichthyes. The conclusion of my work states the proper steps to acknowledging the results and incorporating them into the field of scientific field.

**Key words:** Hepadnaviridae, hepatitis B virus (HBV), BLAST, metatranscriptomic data, detection of a new viruses

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2. Hepadnaviridae</b>	<b>- 3 -</b>
2.1 Historie	- 3 -
2.2 Evoluční historie Hepadnaviridae	- 4 -
2.3 Taxonomie	- 7 -
2.4 Zvířecí zástupci Hepadnaviridae	- 9 -
2.4.1 Sviščí virus hepatitidy B	- 9 -
2.4.2 Kachní virus hepatitidy B	- 10 -
2.4.3 Virus hepatitidy B u Chápanů (Woolly monkey)	- 10 -
2.4.4 Treeshrew/Tany	- 11 -
2.4.5 Šimpanzi a HBV	- 11 -
2.5 Morfologie	- 12 -
2.5.1 Daneova částice	- 12 -
2.5.2 Proteiny HBV	- 12 -
2.6 Životní cyklus	- 15 -
2.7 Identifikace virů v metatranskriptomických datech	- 17 -
2.7.1 Blast (Basic local alignment search tool)	- 18 -
<b>3. Metodika</b>	<b>- 19 -</b>
3.1 Datábáze GenBank a National centre	- 19 -
3.2 Tblastn (Protein-nucleotide 6-frame translation)	- 19 -
3.3 Vyhledávání v databázi	- 20 -
3.4 Vymezení hledané oblasti databáze	- 20 -
3.5 Jak číst výsledky v databázi	- 21 -
<b>4. Výsledky a diskuze</b>	<b>- 23 -</b>
4.1 Kompletní přehled výsledků	- 23 -
4.2 Nejvíce vyhovující výsledky	- 26 -
<b>5. Závěr</b>	<b>- 29 -</b>

<b>6. Citovaná literatura:</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>7. Přílohy</b> .....	<b>I</b>



## **Seznam obrázků a grafů :**

Obrázek č.1: Genomická organizace lidského hepadna- a nakednavirů (Lauber et al. , 2017).

Obrázek č.2: Fylogenetický rodokmen Hepadnaviridae, nakedvirů a HEART retroelementů (Gong & Han, 2018).

Obrázek č. 3: Geografické rozšíření (sub)genotypů HBV (Gerlich, 2013).

Obrázek č. 4: Organizace jednotlivých morfologických částí ([www.ictv.com](http://www.ictv.com)).

Obrázek č. 5: Životní cyklus HBV (Grimm et al. , 2011).

Obrázek č. 6: Postup zařazování dat pro využití v metatranskriptomických datech (Nakagawa et al., 2023).

Obrázek č. 7 : Deset nejvíce vyhovujících výsledků z tBLASTn databáze (Atschul et al., 1990).

Obrázek č. 8: Genomické uspořádání ACNDV a EENDV (Lauber et al., 2017).

Obrázek č. 9: Genomické uspořádání eJHBV (Lauber et al., 2017).

Obrázek č. 10: Genomické uspořádání odlišného kmene TFHBV (Debat & Ng, 2019).

Graf č. 1: Poměr taxomů napříč sty nejvíce validních výsledků.

Graf č. 2: Poměr tříd napříč sty nejvíce validních výsledků.

## **Seznam zkratek použitých v práci:**

ACDNV – African Cihlid nakednavirus  
ARD – Arginin-rich domain  
ASHV – Arctic squirell Hepatitis B Virus  
Blast - Basic local alignment search tool  
BtHBV – Bat Hepatitis B Virus  
cccDNA - Covalently closed circular DNA  
cDNA – Komplementární DNA  
CTD – Carboxyle terminus domain  
DHBV – Duck Hepatitis B Virus  
EENDV – Eel nakednavirus  
eHBV – Endegenous Hepadnaviruses  
eJHBV – Dark- eyed Junco Hepatitis B Virus  
EVE – Endogenní virové elementy  
GSHV – Ground squirell Hepatitis B Virus  
HBcAg - Hepatitis B Virus core antigen  
HBsAg- Hepatitis B Virus E antigen  
HBV- Hepatitis B Virus  
HCV – Hepatitis C Virus  
HEART – Hepadnavirus-like retro-element  
HHBV – Heron Hepatitis B Virus  
IMDV – icyfish metahepadnavirus  
NCBI – National centre for biotechnology information  
NIH - National Institute of Health  
NTCP - Sodium- taurocholate co-transporting polypeptide  
ORF – Opening reading frame, Otevřený čtecí článek  
pgRNA – pregenomická RNA  
PHBV – Parrot Hepatitis B Virus  
rcDNA – relaxed circular DNA  
RGHV – Ross Goose Hepatitis B Virus  
RT – Reverse transcriptase  
sgRNA – Subgenomická RNA  
STHBV – Stork Hepatitis B Virus

SVP – Sub viral particles

tBLASTn – Protein-nucleotide 6-frame translation BLAST

TFHBV – Tibetan Frog Hepatitis B Virus

TMDV – tetra metahepadnavirus

TSA – Transcriptomic Shotgun Assembly

WHBV – Woodchuck Hepatitis B Virus

WMHBV – Woolly Monkey Hepatitis B Virus

# 1. Úvod

Hepadnaviridae je čeleď DNA virů napadající jaterní hepatocyty, u lidí jsou tak nejčastějším zdrojem příčiny cirhózy jater. Vyjímaje nejznámějšího virusu z této čeledi, kterým je bezpochyby lidský Hepatitida B virus, existuje i široká škála zástupců mající za finální hostitele živočichy z rozličných čeledí.

Samotná historie jejich výzkumu, a především taxonomické řazení, se u této čeledi v průběhu posledních dekad notně proměňovalo s novými vyvstávajícími skutečnostmi. Evoluční historie této čeledi je přitom jednou velkou enigmou ve vědeckém prostředí, jelikož první fosilní nálezy můžeme najít již v dobách druhohor. Právě toto byl důvod volby tématu této práce. Rád bych napomohl ke sběru informací týkajících se výskytu HBV podobných virů napříč celou říší živočichů (Animalia).

Mým záměrem v první části práce, tedy v literární rešerši, byla stručná sumarizace dosavadních informací týkajících se lidského viru HBV v historii. Dále pak popsat možné skutečnosti související s evoluční historií čeledi Hepadnaviridae a zdůraznit důležité zástupce zvířecích virusů, kteří napomohli k popsání a lepšímu pochopení lidského HBV obecně. V neposlední řadě bylo nutné popsat taxonomii této čeledě virů a životní cyklus pro ně charakteristický na modelovém příkladu, tedy lidském HBV. Byly také popsány způsoby, které jsou potřebné k detekci nových zástupců virů v metatranskriptomických datech za využití rozličných nástrojů/prostředků.

V mé praktické části jsem se zabíral samotnou detekcí virů v metatranskriptomických datech, konkrétně za využití volně dostupného nástroje Blast (Basic local alignment search tool). Díky jednoduše dostupným softwarům/nástrojům a databázím s rozličnými možnostmi výzkumů jsou kroky k úspěšnému detekování virů v metatranskriptomických datech v dnešní době velice rychlé a efektivní.

Výsledky byly vyhledávány v rámci databáze GenBank napříč říší Animalia (taxid:33208) za použití polymerázy HBV. Výsledky byly následně dále zpracovány a nejlépe vyhovující (na základě odlišných parametrů) byly prozkoumány. Nejvíce validní výsledky byly buď přiřazeny k již objeveným, ale oficiálně nezařazeným/neuznaným virům. Případně byly uvažovány jako zcela nový a doposud neobjevený virus. Jakýmsi pomyslným cílem této práce byla možnost stanovit výskyt HBV-like virů i v jiných než doposud popsaných zástupcích zvířecí říše a popsat případné podobnosti, které by mohly mít s čeledí Hepadnaviridae.

## 2. Hepadnaviridae

### 2.1 Historie

Ikterus, Sérová nemoc, žloutenka, hepatitida – to vše jsou názvy pro jedno konkrétní onemocnění projevující se již po tisíciletí. Již kosterní nálezy lidských ostatků z doby Bronzové obsahují stopy viru HBV (Kocher A et al. 2021.). Avšak stopy po příbuzných virů dnešní čeledi Hepadnaviridae jsou zjevné již z genetických rozborů fosilií patřících předchůdcům dnešních ptáků, a to již v období druhohor (Suh et al. 2013). Je tedy možné, že právě díky „ptačím předchůdcům“ se virus dostal až do našich věků.

V devatenáctém století bylo poprvé medicínsky potvrzeno, že po opakovaném využívání stejných jehel, nebo transfuzí pomocí použitých jehel se u pacientů objevuje jakési onemocnění projevující se bolestí v oblastech žaludku, malátností, a hlavně zežloutnutím měkkých tkání zejména v oblastech očí.

Na počátku dvacátého století bylo objeveno, že toto onemocnění dokáže projít i filtrační aparaturou tehdy dostupnou. Ta nedosahovala takových kvalit jako dnes, a tedy prozatím dokázala filtrovat pouze bakterie a větší částice nikoli však viry (William S. Robinson 1999).

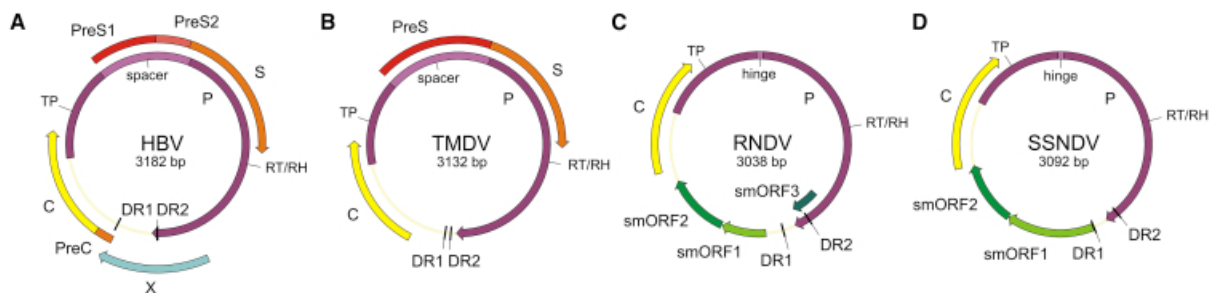
Konečně roku 1964 skupina vědců v čele s Baruch S. Blumbergem, společně Harvey J. Alterem, objevila tzv. „australský antigen“ (nyní znám jako HBsAg- surface antigen) z krevního vzorku australského domorodce (aborigine) (Blumberg BS 1977). Již téhož roku začal BS Blumberg nový virus zkoumat a započal pracovat na vakcíně proti nově zjištěné nemoci, kterou později úspěšně vyvinul. Za svoje zásluhy v této oblasti mu byla udělena Nobelova cena roku 1976. Avšak stejně jako prvotní vakcína je i doposud vynalezena jen vakcína HBV, která dokáže zamezit pouze samotné nové infekci – a tudíž eradikaci nákazy HBV u pozitivních subjektů ať už v chronické nebo akutní formě zatím moderní vakcíny nedokáží zařídit.

## 2.2 Evoluční historie Hepadnaviridae

HBV zanechává v genomu svých hostitelů širokou škálu virových reliktvů a virových elementů (tzv. Endogenní virové elementy, zkráceně EVEs), tedy stop po své přítomnosti. Díky těmto „molekulárním fosiliím“ lze zkoumat dávnou historii a vývoj Hepadnaviridae (Emerman & Malik 2010; Katzourakis 2013). „Endogenous hepadnaviruses“, tedy eHBV, je souhrnný název právě pro vysekvenované viry s podobností ku HBV. V dnešní době shodné sekvence eHBV můžeme nalézt například v plazech nebo ptácích (Gilbert & Feschotte 2010). Analýzou eHBV z plazů, můžeme potvrdit koexistenci hepadnavirů společně s blanatými (Amniota) již v druhohorách (Suh et al. 2014).

Vyjmáme již jmenovaných tříd, můžeme najít důkazy o HBV i v zástupcích dnešního hmyzu. Konkrétně byly nalezeny dvě skupiny retrotranspozonů podobné HBV (hepadnavirus-like retro-element tedy HEART) a to sice HEART1 nalezených v genomech klíštěte obecného (*Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*) a HEART2 v genomech vážky plavé (*Ladon fulva*) a pošvatky žlutozelené (*Isoperia grammatica*) (Gong & Han 2018). Absence HEART elementů v jiných zástupcích hmyzu mohou být zapříčiněny neúplnou celistvostí genových úseků nebo nízký počet dostupných dat. Rozdíl mezi samotnými HEART elementy je hlavně v jejich délce, nicméně oba kódují Reverse transcriptase (RT) doménu a ribonukleázovou H (RH) označovanou jako DNA\_pol\_ciral\_C v hepadnavirech. (Gong & Han 2018). Některé HEART1 elementy obsahují dodatečnou doménu Atrophin-1, která by mohla sloužit jako kompresor transkripce. Nebyla však nalezena Terminal protein (TP) doména ani RT doména, která hraje nepostradatelnou roli v procesu reverzní transkripce u hepadnavirů. Dále v retrotranspozomech chybí povrchové antigeny, X protein, virová DNA polymeráza a Core antigen hepatitidy (Gong & Han 2018). I přesto můžeme říci, že na základě fylogenetické analýzy jsou doposud nejbližší příbuzní Hepadnaviridae HEART retroelementy společně s nově objevenými Nakednaviry viz Obrázek č. 2.

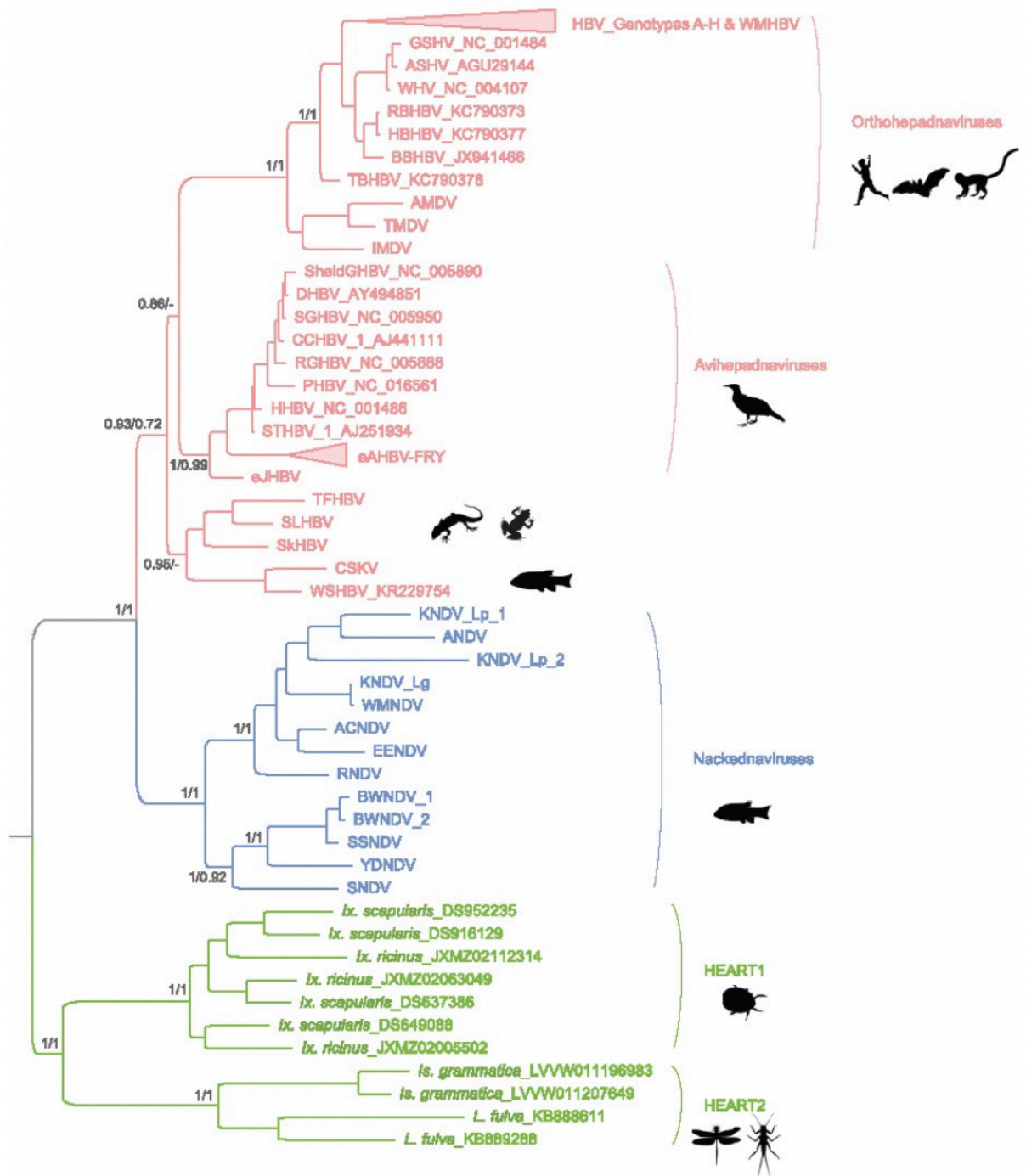
Nackednaviry byli objeveny u kostnatých ryb a svojí stavbou si jsou velice podobné virům HBV. Nejmarkantnějším rozdílem je však úplná absence povrchových proteinů viz Obrázek č.1. Dále pak nevykazují infikovaní jedinci takový jaterní tropismus jako u např. lidského HBV. (Dill et al. 2016; Lauber et al 2017).



Obrázek č.1: Genomická organizace lidského hepadna- a nakednavirů (Lauber et al. 2017).

- A- Lidské HBV
- B- Tetra metahepadnavirus (TMDV)
- C- Rockfish nakednavirus (RNDV)
- D- Sockeye salmon nakednavirus (SSNDV)





Obrázek č.2: Fylogenetický rodokmen Hepadnaviridae, nakednavirů a HEART retroelementů (Gong & Han 2018).

## 2.3 Taxonomie

Hepadnaviridae je relativně obsáhlá čeleď DNA virů rozdělená do pěti základních rodů na základě odlišných sekvencí genomů a cílových hostitelů.

První méně početnou, nicméně mnohem starší skupinou, kterou můžeme nalézt již ve fosilních nálezech z druhohor (Suh A et al. 2013), jsou tzv. *Avihepadnavirusy*. Jejich cíloví hostitelé jsou ptáci např. HBV kachen (DHBV), HBV volavek (HHBV), HBV hus bělostných (RGHV), HBV čápů (STHBV) a HBV papoušků (PHBV) (Locarnini et al. 2013; Pult et al 2001).

Druhou skupinou jsou *Ortohepadnaviry*, které byly izolovány z řádu savců, konkrétně z čeledi hlodavců jako jsou např. HBV sviště lesního (WHV), HBV stromové veverky a polární veverky (GSHV a ASHV). Pro nás jako pro lidi je nejzásadnějším zástupcem tohoto rodu lidský virus HBV. Samotný lidský virus HBV má 8 odlišných genotypů lišících se od sebe zhruba o 8 % (Schaefer 2007). Ukázaly tak fylogenetické analýzy vzorků HBV virů z různých částí světa, konkrétně jich je 8 a to sice A, B, C, D, E, F, G a H viz Obrázek č. 3. Každý genotyp se liší na základě délky genomů (měřené v páru bází- bp), kdy vyjímaje E a G má každý genotyp také svoje subgenotypy (a to nejčastěji 5) (Kramvis & Kew 2005). Avšak díky experimentálním pokusům je dokázáno, že je *in vitro* možné infikovat lidským HBV virem i šimpanze nebo tany (Sureau C 1988).



Obrázek č. 3: Geografické rozšíření (sub)genotypů HBV (Gerlich 2013).

Mezi novější viry zařazené do této skupiny patří tzv. Woolly monkey HBV. V dnešní době je také kladen důraz na netopýří virus BtHBV.

BtHBV postihuje řadu zástupců čeledi letounů, a to sice zhruba 9% známých druhů, kterých je kolem 1100. Míra transmise virů letounů vzhledem k savcům na toto téma zatím není zcela známá, nicméně z hypotéz patrně vyplývá, že by virus mohl napadat i jiné zástupce savců, či dokonce i člověka (Drexler et al. 2013). BtHBV obsahuje sekvenci [NPLGF(F/IL)] (Ni Y et al. 2014). Tato sekvence u HBV umožňuje spojit se s hepatocytovými receptory a infikovat tak buňky jater. Studie *in Vitro* potvrdily, že BtHBV by mohl být hrozbou v oblastech s vysokým výskytem letounů i pro lidský druh, a to z důvodu vysoké koncentrace chronicky napadených jedinců a následné kontaminaci lidského prostoru (nebo dokonce pro případnou konzumaci, například v některých regionech Asie). Nutno však poznamenat, že do dnešního dne byly laboratorně zkoumány vzorky pouze ze čtyř druhů letounů, přičemž odlišnosti ve struktuře těchto virů dosahovaly 39 %. Z toho vyplývá fakt, že by HBV viry mohly být spojeny s řádem letounů již od rané evoluce tohoto druhu (Drexler et al. 2013).

Rody *Parahepadnaviry* a *Metahepadnaviry* si jsou svojí genovou strukturou a cílovými hostiteli velice podobné. Tyto skupiny napadají ryby z čeledi kostnatí, např.: icyfish metahepadnavirus (IMDV), tetra metahepadnavirus (TMDV) (Lauber et al. 2017).

Posledním a nejméně početným rodem jsou *Hepativiridae*, ten má jako cílové hostitele zástupce plazů a žab, např.: HBV tibetských žab (TFHBV).

## 2.4 Zvířecí zástupci Hepadnaviridae

### 2.4.1 Sviščí virus hepatitidy B

Tento druh je vůbec prvním objeveným a uznaným zvířecím virem podobným lidskému HBV. Byl objeven v americké ZOO ve Filadelfii u jednoho z chovaných zástupců sviště lesního (*Marmota monax*). Tento objev umožnil první výzkum *in vivo* hepatitidy u přirozeného hostitele jiného než člověka (Summers et al. 1978). WHBV je velice podobný HBV nejen v charakteristikách viru samotného, tedy v jeho struktuře, expresi proteinů, v nukleotidové sekvenci (podobnost až 70 %) a ve velikosti genomu, ale především v imunologické odezvě následující po infekci virem (Mulrooney-Cousins 2015). Hlavní dva zástupci, kteří jsou zkoumáni kvůli podobným symptomům v oblastech poškození sleziny a jater (stejně jako u člověka) je svišť americký (*Marmota monax*) a svišť čínský (*Marmota himalayana*) (Liu et al. 2016). Subjekty infikované WHBV (Woodchuck Hepatitis B Virus) mají podobný průběh samotné infekce, patogenezi a rozvoj onemocnění jater, zahrnující jak chronické projevy hepatitidy ve formě karcinomů hepatocytů jater ve stejné formě jako u HBV, tak i akutní průběh.

V důsledku těchto skutečností mohou sloužit infikování svišti jako možné modely pro výzkum léčiv, jakými jsou např.: entecavir (Colonna 2001), tenofovir (Fairman et al. 2017) a lamivudin (Mason et al. 1998). Velkou výhodou je i skutečnost, že u mláďat se infekce projevuje převážně v chronické formě, zatímco u dospělců ve formě akutní. To dovoluje provádět výzkum léčiv jak na chronickou, tak na akutní formu. V neposlední řadě na rozdíl od kachen infikovaných virem DHBV, nemají natolik odlišnou odezvu na léky v porovnání s lidskými pacienty.

## 2.4.2 Kachní virus hepatitidy B

Roku 1980 byl detekován nový hepadnavirus u domácích druhů kachen, konkrétněji v jejich krevním séru. Díky tomuto objevu mohl být blíže prozkoumán cyklus hepadnavirů (mechanismy replikace viru, sestavení virové kapsidy, reverzní transkripce a tvorba rcDNA) (Mason et al. 1980). To vše díky dostatečným a dostupným, i oproti primátům eticky méně rozporuplným vzorkům infikovaných hepatocytů a velkému množství chronicky nakažených mláďat. U DHBV (Duck Hepatitis B Virus) probíhá infekce nejčastěji vertikálně, konkrétně *in ovo*, kdy nakažená matka naklade vejce, ve kterých se virus replikuje ve vaječném žloutku. Ten následně infikuje mláďata samotná (Jilbert et al. 2021). Dále byl objev u tohoto druhu novou možností k hodnocení léčiv proti retrovirům a jiných terapeutických strategií (Colledge et al. 2000; Campagna et al. 2013). Avšak DHBV se výrazně liší od lidského viru HBV a jeho podobnost se shoduje pouze ze 40%, jakožto u většiny virů z rodu *Avihepadnavirus* (Schaefer 2007) a díky tomu, že DHBV využívá karboxypeptidázu D jako vstupní receptor na rozdíl od lidského HBV může tedy u vzorků hepatocytů kachen docházet k odlišné odezvě léčiv (Mason et al. 1994).

## 2.4.3 Virus hepatitidy B u Chápanů (Woolly monkey)

Chápan vlnatý (*Lagothrix lagotricha*) je primátem z oddělení ploskonosých opic a také cílovým hostitelem viru WMHBV (Woolly Monkey Hepatitis B Virus). Ten je velice příbuzný lidskému HBV a řadí se do stejného druhu, tedy do druhu Ortohepadnaviridae (Lanford et al. 1998). Samotný virus se liší od lidského DNA nanejvýš kolem 35 % a to sice v proteinu X (Schuster et al. 2002).

Samotný virus u vědců vzbuzuje velký zájem, protože je velice podobný lidskému viru a mohl by tak napomoci k pochopení nejasností, které nejsou u HBV prozatím uspokojivě objasněny. Avšak celý rod *Lagothrix* má status ohrožený nebo minimálně dotčený, jak je tomu např. u tzv. Spider monkey (*Ateles geoffroyi*), která slouží jako substituent rodu *Lagothrix* v *in vitro* výzkumu viru (Barrera, 2005).

#### 2.4.4 Treeshrew/Tany

Tany (Scandentia) jsou malí savci geneticky nejpodobnější hlodavcům, konkrétněji veverkám. (Fan et al. 2013). Tany jsou velice snadno infikovány lidskými viry HBV a HCV. Proto jsou velice vhodné jako tzv. „zvířecími modely“ a v posledních dekádách jsou hojně využívány na laboratorní výzkum. Virus HBV u tan poškozuje jaterní hepatocyty stejným způsobem jako u lidí, a proto jsou získané výsledky vhodné jak pro laboratorní výzkum týkající se viru HBV, tak jako substituent viru WMHBV (Köck et al. 2001).

#### 2.4.5 Šimpanzi a HBV

Šimpanz (*Pan*) je doposud jediným zjištěným organismem, který má naprosto stejný průběh lidského HBV. Bylo zjištěno, že při *in vitro* výzkumu je možné šimpanze infikovat lidskou HBV pozitivně nakaženou krví. Hepatitida se u šimpanze projevuje jak akutně, tak chronicky, a má stejné imunologické a zánětlivé reakce jako u lidských pacientů (Wieland 2015). V raných stádiích výzkumu HBV hráli šimpanzi asi nejdůležitější roli v testování vakcíny vyvíjené pro lidi. Byli testováni na první generaci HBV vakcíny (vyrobené pomocí derivace plazmy), ale i pro pozdější vakcíny, obsahující HBsAg z kvasinek (Gerety et al. 1979; Wieland 2015). Jakožto možný hostitel lidské HBV s nejvíce totožnými projevy jako u člověka, jsou šimpanzi nepostradatelní pro další vývoj výzkumu HBV.

Studie „zvířecích modelů“ šimpanzů odhalily možnou imunologickou modulaci, která by mohla zvýšit imunitu vůči viru a potlačit možnost replikace HBV, konkrétně využitím skrze aktivace antagonisty GS-9620 (Lanford et al. 2013). I přes všechna tato pozitiva ať už v historii výzkumu nebo v jeho přítomnosti, je využití šimpanzů pro výzkum rozporuplné, především z etického hlediska, dostupnosti a také ekonomicky náročných nákladů spojených s chovem a výzkumem.

## 2.5 Morfologie

### 2.5.1 Daneova částice

Virová částice neboli Daneova částice hepatitidy typu B (HBV) má kulovitý tvar o průměru 42-50nm, příležitostně může být až pleomorfního charakteru. Na jejím povrchu se nachází lipidový obal, který je tvořen ze dvou až tří povrchových proteinů, které slouží jako vnější ochrana tvořící ikosaedrický nukleokapsid. Ten chrání jádro samotného viru, který se skládá alespoň z jednoho proteinu a uvnitř sebe skrývá částečně dvouvláknovou DNA polymerázu. Dále obsahuje buněčné proteiny jako jsou např.: proteinkinázy a chaperony, které jsou velice důležité při samotné syntéze virové DNA. U Hepadnaviridae jsou nejčastější dvě velikostní skupiny virionů. To sice majoritní skupina, kde jsou jádra ve formě nukleokapsidů o průměru cca 36nm obsahující kolem 240 podjednotek jádrového proteinu (Bruss 2007). Dále pak minoritní skupina, která dosahuje průměru pouze 32nm a k tomu se skládá jen z 180 podjednotek jádrového proteinu (Beterams et al. 2000).

Hepadnaviry mají vlastnost nadměrné produkce povrchových proteinů, které jsou vylučovány do krve jako pleomorfní částice, takové částice jsou sférického tvaru a jsou velké okolo 17 - 22nm. (Bruss 2007).

### 2.5.2 Proteiny HBV

#### *E antigen*

HBeAg je finálním produktem translačních procesů. Jakožto jeden z proteinů kódovaný skrze genomický transkript, je řízen genetickým promotorem. Je ukazatelem toho, že probíhá replikace. Přesná funkce antigenu HBeAg není zatím zcela objasněna, avšak nejpravděpodobnější hypotéza tvrdí, že by mohl stát za imunoregulačními vlastnostmi HBV (Chen MT et al. 2004).

### ***Povrchové antigeny***

Jak již bylo zmíněno, povrchové proteiny obalují virion a slouží jako jeho obal či jeho ochrana. Antigeny se liší svojí velikostí, tedy Small (24kD), Middle(31kD) a Large(39kD) a také svým složením (Lamontagne JR et al. 2016). V nejvyšších počtech je syntetizován S-HBsAG a tím pádem tvoří většinu obalu, v menších počtech se pak syntetizují M-HBsAG a L-HBsAG. Buňky, které jsou následně infikovány produkují při vytváření povrchových antigenů i tzv. subviral particles (dále SVP), ty jsou generovány v mnohem vyšších počtech než povrchové antigeny, a to sice až v 10 000krát vyšší koncentraci. Jaká je jejich funkce pro vir HBV samotný není zcela jasné, ale pravděpodobně slouží jako „návnady“ pro látky imunitního systému, a tedy pro delší přetrvávání samotné infekce viru HBV (Bruns et al. 1998).

### ***Antigen jádra/core***

HBcAG je antigen nacházející se v jádru virionu. Tvoří částice jádra a je rozpustným dimerem. Nukleokapsidy z izolovaných Daneových částic mají triangulační číslo  $T=4$ , přičemž triangulační číslo popisuje složitost kapsidy. Platí pravidlo, že čím vyšší hodnota cifry je, tím je daný nukleokapsid složitější (Louten & Jennifer 2016). To se týká přibližně 95% plně vyvinutých nukleokapsidů obsahující 120 dimerů. Zbýlých 5% má triangulační číslo  $T=3$  s 90 dimery (Stannard LM & Hodgkiss M 1979). Vyjímaje dokončení nukleokapsidu má core antigen za úkol i započetí reverzní transkripce (Lamontagne et al. 2016). Core antigen má na svém karboxylovém konci (C- terminus domain, CTD) doménu dominující argininem (arginin-rich domain, ARD) a díky fosforelaci v CTD může virus měnit svoje poměry obsahu napříč svým životním cyklem (Li, Hung-Cheng et al. 2010.).

### ***X protein***

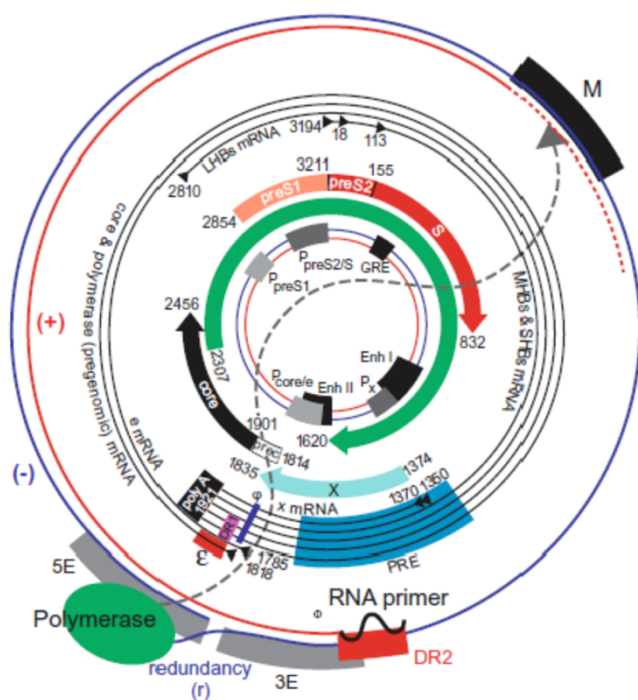
HBx je jediným regulačním proteinem HBV. Jeho hlavní funkce se využívá při transkripci cccDNA (covalently closed circular DNA), kde funguje jako právě regulační protein při samotné replikaci HBV (Lucifora J et al. 2011). HBx má široké spektrum dalších účinností např.: dokáže ovlivňovat hladiny vápníku (Gearhart TL & Bouchard MJ 2010).



Má také transaktivní vlastnosti a dokáže se tak vázat na tumor-supresorové buňky, a tedy ovlivňovat míru maligní proliferaci, přičemž dokáže ovlivňovat i apoptózu (Tanaka Y et al. 2006).

### ***DNA Polymeráza***

Polymeráza je klíčová pro zvětšování počtu virů. Obsahuje tři domény, první doménou je terminal protein (TP) doména, která je důležitá hlavně pro iniciaci replikace genomů. Tato doména je pro Hepadnaviridae unikátní (Radziwill, G et al. 1990). Druhou doménou je reverse transcriptase (RT) doména. Ta má na starosti pro-syntézu (-)ssDNA. Třetí doménou je P doména. Ta je zodpovědná za finální dokončení transkriptázy (-)ssDNA. (Tavis, John E et al. 2013).



Obrázek č. 4: Organizace jednotlivých morfologických částí ([www.ictv.com](http://www.ictv.com)).

## 2.6 Životní cyklus

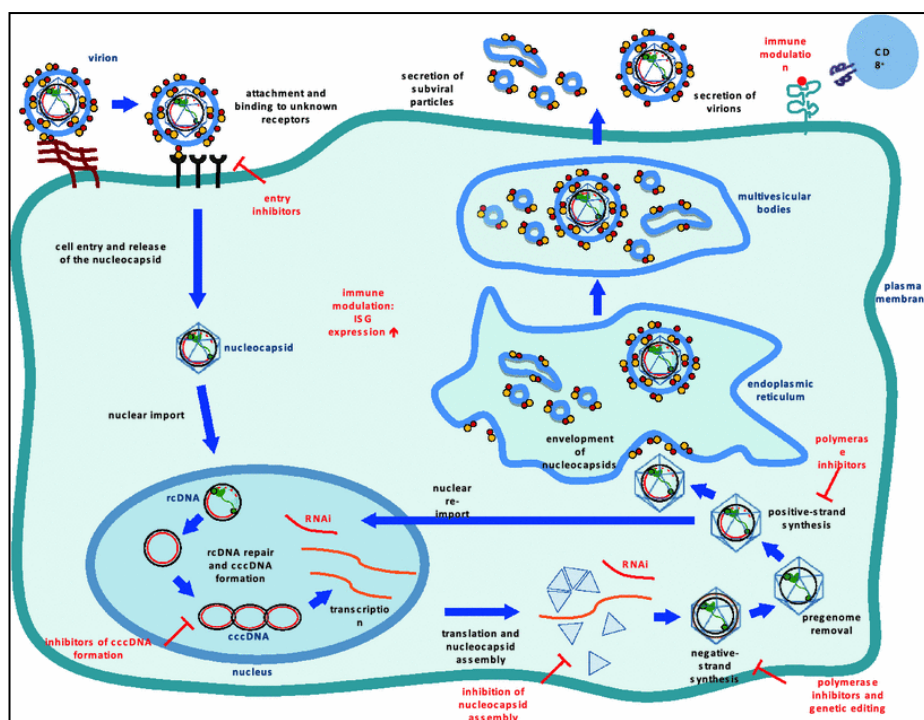
Po vniknutí Daneovi částice do těla hostitele na membránu buněk nacházející se v jaterních hepatocytech virus HBV pronikne skrze hepatocyty, a to díky specifickému NTCP (Sodium- taurocholate co-transporting polypeptide) proteinu. Doposud není známo, jaký je přesný způsob pro „vchod“ do buněk, avšak nejpravděpodobnější je endocytóza anebo přímá fúze. Po vniknutí do cytoplazmy buňky se virový kapsid přepravuje až k jádru buňky. Tam se uvolní virová rcDNA (relaxed circular DNA) a její (+) konec je dokončen virovou polymerázou. Následně jsou RNA-primery odňaty z (+) konce celulárními enzymy. Tak je vyrobena kompletní cccDNA na obou koncích (Nassal M 2008). Dokončená cccDNA dále slouží jako předloha (template) pro syntézu RNA viru.

Pro úspěšné splnění veškerých funkcí je nezbytnou nutností syntéza jednotlivých morfologických částí viru. Ty se syntetizují v jednotlivých otevřených čtecích článcích (ORF).

Virová DNA obsahuje 4 hlavní ORF:

1. ORF P kóduje polymerázu pro reverzní transkripci, a zároveň je také největším článkem
2. ORF S kóduje nukleoproteinový kapsid (primárně jejich velikosti povrchových proteinů, M/L/S-HBsAg), kóduje také domény pre-S1 a pre-S2, které mají na starosti lokalizaci pro receptor hepatocytů
3. ORF C kóduje povrchové proteiny kapsidy (S-gen, PreS1/L–a PreS2/M)
4. ORF X kóduje regulační X-protein (Urban S et al. 2010.; Stránský 2001)

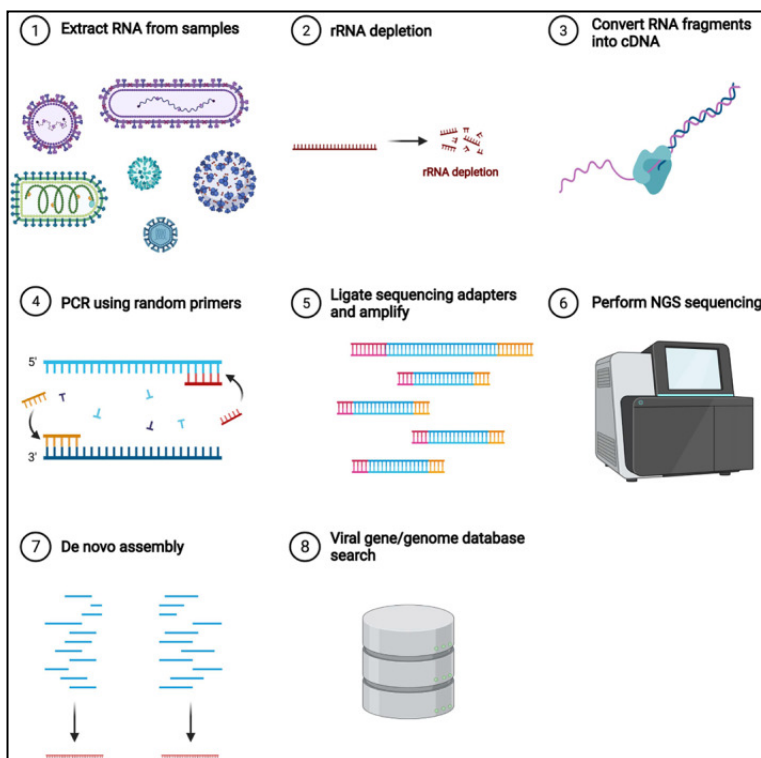
Zakuklené viriony se spojí s hostitelskou buňkou preS1-reeptorem, dále rcDNA která je obsažena v nukleokapsidě, se uvolní do cytoplazmy hostitelské buňky a putuje až k jejímu jádru. V jádře se rcDNA přetvoří na cccDNA. Ta je transkripcí přetvořena na subgenomickou RNA (sgRNA) a pregenomickou RNA (pgRNA). V nukleokapsidu je pgRNA společně s polymerázou reverzně transkribována na negativní vlákno DNA. Poté je pgRNA translatována do core/jádrového proteinu a virové polymerázy. Nukleokapsidy jsou dále v cytoplazmě ponechány pgDNA, která díky reverzní transkripci dokončí buňky. Tato reverzní transkripce pozbývá jakýchkoli opravných faktorů, a tak bývá primárním zdrojem případných mutací. HBV Nukleokapsidy s kompletní DNA mají dvě možné finální cesty. Buď jsou re-importovány zpátky do jádra, kde vytvoří tzv. „virovou rezervu“, nebo jsou importovány do endoplazmatického retikula. V endoplazmatickém retikulu jsou pak buňky obaleny povrchovými proteiny (Summers J et al. 1990). Buď jako SVP – tedy neinfekční, nebo jako daneovi částice – tedy infekční a tyto zcela dospělé částice poté mohou být vypuštěny z buňky pryč do těla hostitele (Grimm D et al.).



Obrázek č. 5: Životní cyklus HBV (Grimm et al. 2011).

## 2.7 Identifikace virů v metatranskriptomických datech

Viry ať už DNA či RNA jsou v dnešní době nejčastěji identifikovány s pomocí tzv. metatranskriptomických dat. Postup začíná vhodným extrahováním vzorku. Poté se vyjmou ribosomální geny (RNA) a reverzní transkriptázou se vygeneruje komplementární DNA (cDNA). Následovně jsou sekvence cDNA doplněny PCR s využitím nahodilých primerů. Tyto sekvence jsou následně sekvenovány za použití tzv. „next-generation sequencers“. Sekvenovaná data jsou doplněna a seřazena do „contigů“ což jsou sekvence DNA, které mezi sebou mohou mít určité mezery. Nicméně pokud se spojí sousedící sekvence, které jsou vyhovující, dokážou tak dohromady vytvořit ucelenou sekvenci (genome.gov). Každý contig je porovnáván s virovými/hostitelskými genomy. Na základě výsledků, můžeme určit, zdali vzorek obsahoval i virové sekvence, nebo nikoli. Velkou výhodou dnešní doby je pokrok v oblasti sekvenování dat a počítačové technologie samotné. Díky snadnému přístupu ke genetickým databázím a softwarům určeným pro metatranskriptomické sekvenování je velice snadné, rychlé a levné využívat metatranskriptomické metody pro identifikaci virů z různých vzorků (Nakagawa et al.2023).



Obrázek č. 6: Postup zařazování dat pro využití v metatranskriptomických datech (Nakagawa et al. 2023).

### 2.7.1 Blast (Basic local alignment search tool)

Vybraný program je jedním z nejvíce využívaných nástrojů pro seřazování podobností sekvencí na základě námi zadaných parametrů. Lze ho využít skrze internetovou doménu spravovanou NCBI (National centre for biotechnology information), či jako samostatný software, který je dostupný zdarma na stránkách NCBI. BLAST dokáže dle našeho zadání komparovat různé sekvence jako jsou např. sekvence proteinů, proteinových bází, jejich kombinaci a mnoho dalšího. Díky tzv. „hotspotům“ dokáže BLAST na základě jejich výskytu/protnutí seřadit důležitost nalezených sekvencí, a tudíž sám dokáže působit jako jakési statistické medium, které nám velice přehlednou formou vyjádří validitu/důležitost nalezených úseků sekvencí vykazující podobnost. Samotný algoritmus BLAST byl navržen skupinou vědců pod institucí NIH (National Institute of Health) v USA již roku 1990 (Altschul et al. 1990). Od té doby prošel notnými změnami a rozšířeními a samotná databáze GenBank, ze které čerpá se updatuje každé dva měsíce.

## **3. Metodika**

### **3.1 Datábáze GenBank a National centre**

NCBI je instituce sídlící v USA, spravující genovou databázi GenBank. Ta je veřejně přístupnou a obsahuje anotované databáze nukleotidových sekvencí/proteinů. Tato databáze je součástí společenství International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC), do kterého můžeme zahrnout také DNA DataBank of Japan (DDBJ) a databáze European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Benson et al. 2007). V prostředí právě této databáze GenBank byly sekvence proteinu HBV vyhledávány a díky programu tBLASTn jsem lokalizoval vhodné výsledky napříč říší Metazoa/Animalia (taxid:33208).

Databáze je volně přístupná skrze tento odkaz:

„<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>“

### **3.2 Tblastn (Protein-nucleotide 6-frame translation)**

Je jedna z verzí samotného programu BLAST. Tato konkrétní verze porovnává námi určený sekvenovaný úsek aminokyselin (proteinů) s databází GenBank. V tomto případě nám dovoluje nastavení BLAST pracovat s námi dotazovanou sekvencí aminokyseliny (proteinu), která je porovnávána s databází nukleotidových sekvencí, které jsou často fragmenty genomu či cDNA. Ta představuje exprimované geny v databázi tBLASTn a porovnává sekvenci v rámci šesti čtecích rámců (Gertz EM et al 2006).

### 3.3 Vyhledávání v databázi

Pro moje účely byla nejvíce vhodná polymeráza HBV: YP\_009173866.1: polymerase, dohledaná skrze již zmíněnou databázi GenBank. V databázi byl vyhledán genom HBV a z něj unikátní kód pro jeho protein. Ten mohl posloužit jako genom, díky kterému jsem mohl určit zadání, tedy dotazovanou sekvenci. Dále jsem z databáze Genbank zůžil své vyhledání pouze v rámci specializované databáze Transcriptomic Shotgun Assembly (TSA) viz Obrázek č. 7.

Databáze TSA obsahuje výpis mRNA sekvencí, které jsou sbírány z jednotlivých vzorků (většinou nejsou nijak dodatečně upravované). Finálním krokem bylo vhodně definovat ohraničení parametrů pro vyhledané sekvence, v mém případě to byl taxid Metazoa/Animalia (taxid:33208). Pro nejvyšší validitu mých výsledků jsem se rozhodl omezit výsledky pouze na prvních sto nejvíce podobných s mnou zadanou HBV polymerázou.

### 3.4 Vymezení hledané oblasti databáze

V databázích NCBI jsem se pro v rámci své praktické části rozhodl pro hledání HBV proteinů napříč říší Metazoa/Animalia (taxid:33208), obsahujících veškeré heterotrofní buněčné organismy (Sebé-Pedrós & Ruiz-Trillo 2017). Domnívám se, že pro mé účely nebylo vhodné do svého výzkumu začlenit i houby a prvoky, a zahrnout taktéž skupinu Opisthokonta. Hlavním důvodem je lepší vypracování nejvíce relevantních výsledků a také faktorů žádných či velice nevyhovujících výsledků v říši hub a prvoků. Tento výrok je založen na vykonání odlišných BLASTů pro jednotlivě jmenované říše.

Job Title **YP\_009173866:polymerase [Hepatitis B virus]**

RID [1GGRTDY2016](#) Search expires on 04-13 04:07 am [Download All](#) ▼

Program TBLASTN [Citation](#) ▼

Database tsa (6586 databases) [See details](#) ▼

Query ID [YP\\_009173866.1](#)

Description polymerase [Hepatitis B virus]

Molecule type amino acid

Query Length 832

Other reports [?](#)

**Filter Results**

Percent Identity  to  E value  to  Query Coverage  to

[Filter](#) [Reset](#)

**Descriptions** Graphic Summary Alignments

**Sequences producing significant alignments** Download ▼ Manage columns ▼ Show  [?](#)

select all 10 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Rhipicephalus microplus TRINITY_DN24968_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	600	600	42%	0.0	82.95%	1059	<a href="#">GIZL01125498.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Schizopygopsis younghusbandi strain adult GYL_TRINITY_DN147671_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	344	644	87%	2e-94	34.20%	6827	<a href="#">GHYL01057506.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Anguilla anguilla TRINITY_DN131480_c0_g10_i1.transcribed RNA sequence</a>	303	405	73%	2e-82	42.50%	3175	<a href="#">GHAH01192767.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Gymnocypris namensis strain adult NMC_TRINITY_DN67651_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	293	293	52%	7e-81	41.48%	2225	<a href="#">GHYH01004595.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Chiloscyllium griseum TRINITY_DN107679_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	290	756	81%	4e-76	40.52%	5883	<a href="#">GJPK01277877.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Spodoptera littoralis TRINITY_DN202294_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	259	259	15%	6e-76	96.90%	388	<a href="#">GHFD01009412.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Ginglymostoma cirratum c26330_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	223	223	20%	2e-61	63.47%	574	<a href="#">GIWU01009655.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Exilianus exitiosus isolate multiple pooled insects TRINITY_DN45458_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	224	224	20%	3e-61	63.47%	716	<a href="#">GJYH01004203.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Mamestra brassicae TRINITY_DN31433_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	224	224	20%	6e-60	63.47%	1004	<a href="#">GHNQ01247469.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">TSA: Achaea janata TRINITY_DN40191_c0_g1_i1.transcribed RNA sequence</a>	203	203	12%	2e-55	93.07%	309	<a href="#">GIKQ01060000.1</a>

Obrázek č. 7 : Deset nejvíce vyhovujících výsledků z tBLASTn databáze (Atschul et al. 1990).

### 3.5 Jak číst výsledky v databázi

Max Score – Je nejvyšší možné číslo vyhovujících bází, které se shodují s námi dotazovaným Parametrem. Obecně platí, že čím vyšší číselná hodnota, tím lepší.

Total Score – Je číslo, které se vztahuje výhradně k jedné určité sekvenci. Popisuje nakolik se shoduje námi vyhledaná sekvence s Max Score parametrem. Obecně platí, že čím vyšší číselná hodnota, tím validnější výsledek.

Query cover – Vyjadřuje procentuální hodnotu podílu podobnosti nalezené sekvence ve vztahu k námi zadané. Obecně platí, že čím vyšší číselná hodnota, tím lepší.



E value – Je statistická míra, která vyjadřuje, jaká je možnost, že námi najitá sekvence neodpovídá zadané sekvenci. Obecně platí, že čím nižší číselná hodnota, tím lepší – ideálně by pak měla dosahovat 0.0, to znamená, že námi vyhledaná sekvence se shoduje ze sta procent s námi zadanou sekvencí.

Per. Identity – Vyjadřuje procentuální hodnotu vypovídající o vztahu dvou proteinových sekvencí, konkrétně o shodě residuí v řadě za sebou. Obecně platí, že čím vyšší číselná hodnota, tím lepší.

Acc. Len. – Vyjadřuje konkrétní počet nukleotidů, které program zvolil jako validní pro naše potřeby.

Accession – Internetový odkaz, který dokáže přesměřovat uživatele na každý jeden konkrétní vzorek (Fassler & Cooper 2011).

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Kompletní přehled výsledků

Ze sta nejvíce vyhovujících výsledků vygenerovaných programem tBLASTn se skládají výsledky ze dvou hlavních kmenů. A to sice z kmene Strunatců, kteří tvoří přesně polovinu výsledků, tedy 50 % a dále pak z kmene členovců tvořících 46 % vyhledaných vyhovujících výsledků a zbylá 4 % tvořená dvěma kmeny. Konkrétně se jedná o kmeny žahavců (3 %) a vířníků (1 %) viz Graf č.1.

Z kmene strunatců bylo nejvíce pozitivních nálezů detekováno u zástupců z třídy paprskoploutvých ryb (Actinopterygii). Nejpočetnější a nejvalidnější výsledky vykazuje úhoř říční (*Anguilla anguilla*) a tuňák žlutoploutvý (*Thunnus albacares*). Dalšími zástupci jsou endemické ryby v oblasti Tibetu a Číny konkrétně *Gymnocypris namensis* a *Schizopygopsis younghusbandi* a endemický zástupce africké cihlidy žijící v jezeře Tanganika *Ophthalmotilapia ventralis*.

Dále pak jsou zastoupeni hlodavci (Rodentia), konkrétně křečik čínský (*Cricetulus griseus*), dlouhoststá travní myš (*Abrothrix longipilis*) a křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*).

Další zastoupenou třídou jsou ptáci (Aves), konkrétně strnavec zimní (*Junco hyemalis*), který byl nalezen v osmi různých hitech blastu, poté čečetka zimní (*Acanthis flammea*) a čečetka bělavá (*Acanthis hornemanni*). Z obojživelníků (Amphibia) jsou to pouze ojedinělí zástupci z řádu žab. Jsou jimi *Odorrana tormota* vyskytující se v Číně a *Oreobates cruralis* vyskytující se v jižní Americe konkrétněji v Bolívii a Peru.

Mezi velice neočekávané výsledky lze uvažovat zástupce třídy paryb (Chondrichthyes), a to sice konkrétněji z čeledě žralůčkovití (Hemyscillidae), konkrétně u zástupců žralok bambusového šedého (*Chiloscyllium griseum*) a žralůčka vouskatého (*Ginglymostoma cirratum*).

U kmene členovců jsou majoritně zastoupeni zástupci z třídy pavoukoců (Arachnia). Široké zastoupení mají endemičtí zástupci čeledě slíd'ákovití (Lycosidae), *Arctosa depectinata*, dále *Wadicosa okinawensis*, *Menosira ornata* a v neposlední řadě i u nás více rozšířený slíd'ák mokřadní (*Pardosa amentata*). Z australských pavouků byly

vyhovující výsledky dohledány i v zástupcích *Lampona murina* a *Apricia jovialis*. Mezi výsledky jsou i dva doposud nepojmenované druhy pavouků, jeden z čeledi Čelistnatkovití (Tetragnathidae), kam patří i jeskynní druh *Metellina merianae* a druhý z čeledi Skákavkovitých, druhové jméno *Ocrisiona*.

Z řádu klíšťat se objevil ve výsledcích pouze piják tropický (*Rhipicephalus microplus*), přitom však převyšuje svojí kvalitou drtivou většinu zbylých výsledků.

Druhou majoritní skupinou výsledků, jsou výsledky třídy Hmyz (Insecta).

Nejmarkantnější zastoupení mají druhy z čeledi můrovití (Noctuidae). Spodoptera littoralis, můra zelená (*Mamestra brassicae*), můra východní smrková (*Choristoneura fumiferana*), *Planotortrix excessana*, *Achaea janata* a kovolesklec cizokrajný (*Trichoplusia ni*).

Dalšími čeleděmi jsou cikádovití (Cicadellidae), konkrétně zástupci *Exitianus exitiosus* a *Xestocephalus desertorum*, dále pak čeleď blanokřídlí (Hymenoptera) a to sice *Leptopilina boulardi* a v neposlední řadě dvojkřídlí, (Diptera) konkrétně *Anastrepha ludens*.

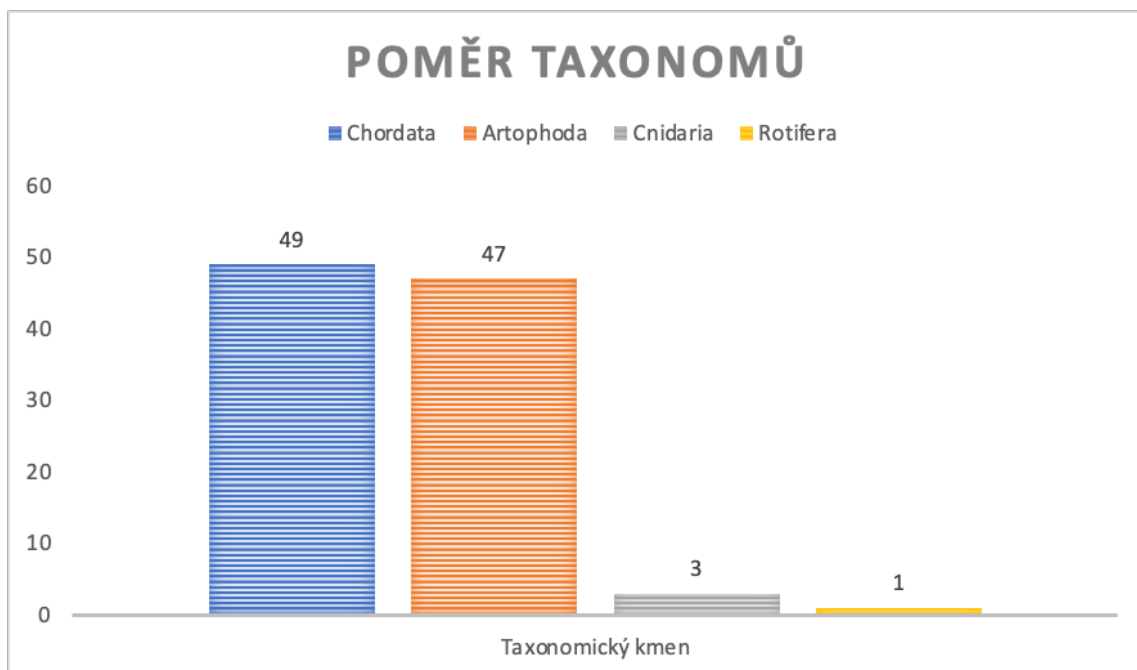
Ze zástupců brouků jsou to pak čeledě vrubounovití (Scarabaeidae) - *Dichotomius satanas* a *Onthophagus curvicornis* a mandelinkovití (Chrysomelidae) - *Phaedon cochleariae*.

S uspokojivými výsledky je zastoupena i čeleď strašilek, konkrétně strašilka obrovská (*Heteropteryx dilatata*), pakobylka Brandova (*Bacillus grandis*) a *Bacillus atticus*.

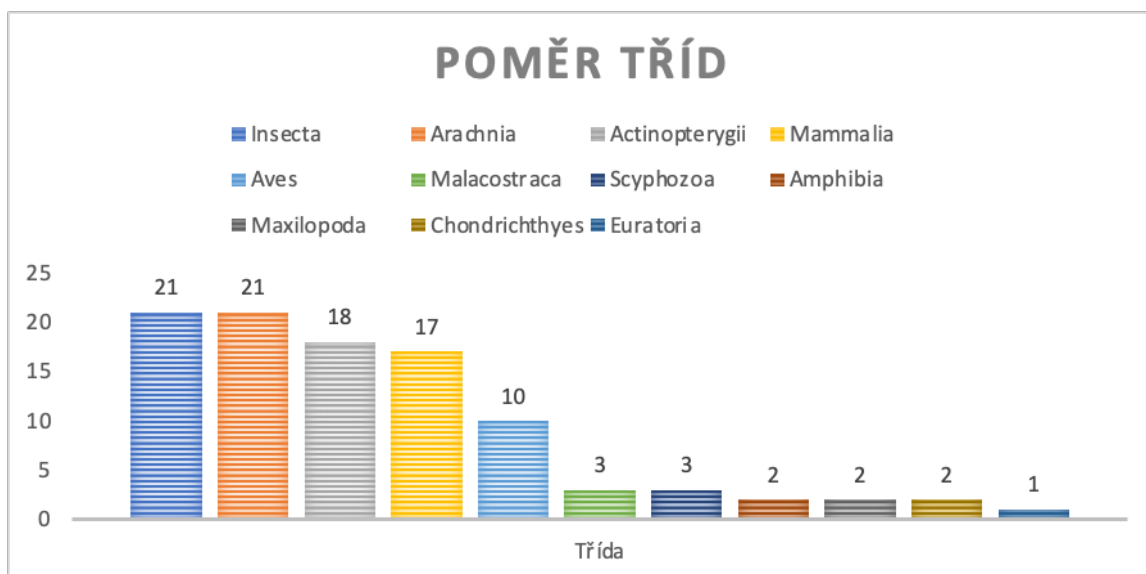
V malých počtech jsou ve výsledcích zastoupeny i druhy korýšů (Malacostraca) konkrétně blešivec obecný (*Gammarus fossarum*) a orientální říční kreveta (*Macrobrachium nipponense*). Dále zde najdeme zástupce třídy Maxilopoda, z podtřídy klanonožci (Copepoda) konkrétněji zástupce žijící v polárních oblastech *Calanus propinquus* a *Rhincalanus gigas*.

Mimo kmen členovců a strunatců se zde objevili i zástupci kmene žahavců (Cnidaria), konkrétněji z třídy medúzovci (Scyphozoa) - jedná se o *Chrysaora quinquecirrha* a *Alatina alata*.

Dalším nalezeným kmenem jsou vířníci (Rotifera) - konkrétně zástupce z třídy Pijavenek (Bdelloidea), a to sice *Rotaria tardigrada* viz Graf č. 2.



Graf č. 1: Poměr taxomů napříč sty nejvíce validních výsledků.



Graf č. 2: Poměr tříd napříč sty nejvíce validních výsledků.

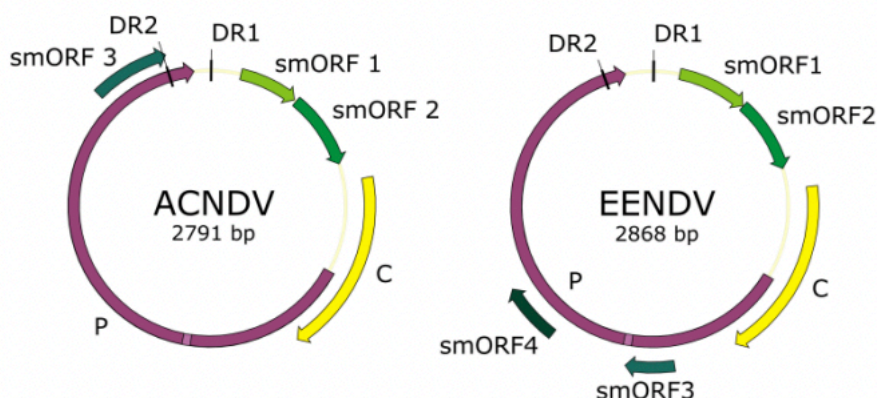
## 4.2 Nejvíce vyhovující výsledky

Validita výsledků byla určena na základě poměrů hodnot E value, Query cover a Total score. Ze 100 výsledků bylo vybráno 8 nejvalidnějších vykazující nadprůměrnou podobnost se zadanou HBV polymerázou.

Nejvíce vyhovujícím výsledkem byl Piják tropický (*Rhipicephalus microplus*), tento odebraný vzorek dosahoval hodnoty E Value 0.0, což je nejmenší možné číslo, které tato hodnota může nabývat, další důležitý parametr je 0 Gaps, Gaps vyjadřují počet mezer vyplňované námi nevyhovujícími/odlišnými Nukleonovými kyselinami než je zadáno. Tyto dva výsledné parametry značí že polymeráza HBV je v tomto vzorku přímo přítomna. Vzorek byl odebrán roku 2021 v rámci projektu „Characterization of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Sialotranscriptome Profile in Response to *Theileria equi* Infection“ (Paulino et al. 2001). Přítomnost sekvence polymerázy HBV v tomto vzorku může být zapříčiněna možným předešlým nasátím kontaminované krve lidským HBV, nebo možnou kontaminací vzorku nesprávnou manipulací. Další možnost je již zmíněná možnost existence HEART retro-elementů č. 1 obvykle vysekvenovaných právě ze zástupců klíšat (*Ixodia*) (Gong & Han, 2018).

Dalšími vyhovujícími výsledky byli zástupci paprskoploutvých ryb, u kterých je výskyt Hepadnaviridae potvrzen. A to v zástupci *Ophthalmotilapia ventralis*, což je druh cichlidy endemické v jezeře Tanganika, a dále ve vzorku úhoře říčního (*Anguilla anguilla*) byly nalzeny sekvence, které jsou velice podobné hepadnavirům. Tito zástupci by měli náležet k již dříve zmíněným neobaleným nakednavirům.

Nalezené viry nesou názvy ACNDV a EENDV viz Obrázek č.8 (Lauber et al. 2017).

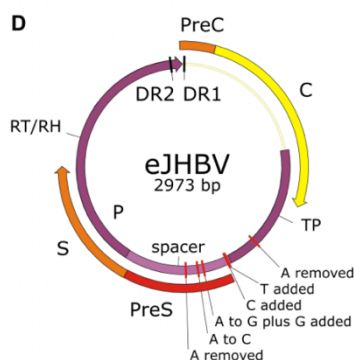


Obrázek č. 8: Genomické uspořádání ACNDV a EENDV (Lauber et al. 2017).

Dalšími dvěma zástupci jsou endemické ryby *Schizopygopsis younghusband* (Tibet) a *Gymnocypris namensis* (Čína). U těchto dvou druhů doposud není žádný záznam o výskytu HBV-like virusu, a proto lze předpokládat, že jde o zcela nový druh HBV-like virů.

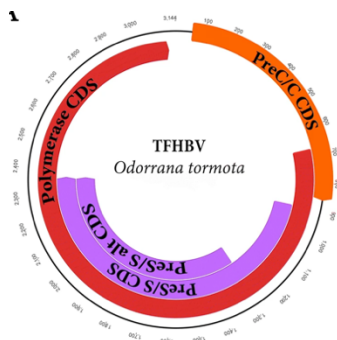
Dalším validním výsledkem byl zástupce paryb, a to sice žralok bambusový šedý (*Chiloscyllium griseum*). Doposud byly popsány pouze výsledky u jiných zástupců paryb, konkrétně rejnoků (Chen & Xin-Xin 2021). Můžeme tedy tvrdit, že tento virus je zcela nový a doposud nepopsaný.

I zástupce z třídy ptáku strnavec zimní (*Junco hyemalis*) vykazuje vysoké hodnoty, a navíc se vzorky tohoto druhu objevují vícekrát (konkrétně 8 vzorků). U tohoto ptáka hojně se vyskytujícího v Severní Americe byl ovšem již popsán virový element a pojmenován jako eJHBV viz Obrázek č. 9 (Lauber et al. 2017).



Obrázek č. 9: Genomické uspořádání eJHBV (Lauber et al. 2017).

Posledním druhem je *Odorrana tormota* v anglických pramenech zmiňována jako Concave-eared torrent frog z třídy obojživelníků (Amphibia). Konkrétně jde o žábu žijící v Čínských pralesích v okolí toků. Nalezená sekvence možného HBV-like viru vykazuje značné podobnosti s již popsaným TFHBV a uvažuje se, že půjde o jiný kmen viz Obrázek č. 10 (Debat & Ng 2019).



Obrázek č. 10: Genomické uspořádání odlišného kmene TFHBV (Debat & Ng 2019).

Samotný výsledek tBLASTn přikládám jakožto přílohu č.1.

## 5. Závěr

Byla vypracována literární rešerše popisující historii objevů třídy Hepadnaviridae s velkým důrazem na lidský virus HBV. Dále byla popsána možná evoluční historie ve vztahu k nově popsaným retro-elementům (HEART 1&2), dále pak ve vztahu s viry s chybějícími obalovými proteiny, tedy nakednaviruses. Byly také popsány konkrétní význační zástupci Hepadnaviridae, kteří značně napomohly, a doposud napomáhají k lepšímu pochopení fungování této čeledě. Především však jejich porozumění pomáhá k boji proti nákaze s lidským HBV virem.

V rámci literární rešerše byla popsána taxonomie Hepadnaviridae, a to včetně jednotlivých genotypů lidské HBV. Byla podrobně popsána morfologie, konkrétně typologicky charakteristickým lidským HBV, doplněna popisem životního cyklu od vniknutí Daneovi částice do buňky až po opuštění zcela nově zhotovené virové částice do těla hostitele. V neposlední řadě byl popsán postup identifikace virů v metatranskriptomických datech za pomoci volně přístupného softwaru BLAST.

Ve své praktické části jsem se zabýval samotným detekováním virů v metatranskriptomických datech. Ta byla zprostředkována skrze databázi GenBank spravovanou NCBI. Za využití tBLASTn a polymerázy lidského HBV mi bylo umožněno vyhledat možné výsledky obsahující shodnou sekvenci.

Napříč sto výsledky jsem vyseletoval devět nejvíce vyhovujících. Po zpracování výsledků mohu konstatovat, že byly nalezeny tři možné nové viry, které vykazují velké podobnosti s třídou Hepadnaviridae. Zbylých šest bylo popsáno v již existujících publikacích, a to sice jako HEART retroelementy, nakednavirusy, nebo jakožto nový kmen již existujícího zástupce Hepadnaviridae.

Výsledky z této práce mohou sloužit jako možné potvrzení již předem nalezených faktů vyplývajících z teoretických prací, které pracují s možností daleko širšího výskytu virů podobných Hepadnaviridae, než je doposud předpokládáno.



Dále bakalářská práce odhaluje možný výskyt HBV podobných virů i v doposud neuvažovaných/nepopsaných zástupcích z rozličných tříd napříč celou zvířecí říší, a tudíž popisuje ještě vyšší diverzitu hostitelských organismů, než tomu bylo doposud. Tím dochází k celkovému doplnění/rozšíření zaznamenaných informací o čeledi Hepadnaviridae.

Možné rozšíření mé práce by spočívalo v navržení fylogenetického vývoje jednotlivých nalezených virů. Případně by bylo velice hodnotné získat více vzorků z klíčových zástupců pro možné celkové doplnění genomu virusů.

## 6. Citovaná literatura:

Allison R. Jilbert, Georget Y. Reaiche-Miller, Catherine A. Scougall, Avian Hepadnaviruses (Hepadnaviridae), 2021, Encyclopedia of Virology (Fourth Edition), Academic Press, Pages 100-111, ISBN 9780128145166, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20980-1>.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990, Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology, **Volume 215**, Issue 3, Strany 403-410

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. 2007. GenBank. Nucleic Acids **Res.** **35**(Database issue):D21-5. doi: 10.1093/nar/gkl986

Beterams G, Böttcher B, Nassal M. 2000. Packaging of up to 240 subunits of a 17 kDa nuclease into the interior of recombinant hepatitis B virus capsids. FEBS Lett. **481(2)**:169-76. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01927-x.

Blumberg BS , 1977. Australia Antigen and the Biology of Hepatitis B. *Science***197**,17-25. DOI:[10.1126/science.325649](https://doi.org/10.1126/science.325649)

Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. 1998. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. J Virol **72(2)**:1462-8. doi: 10.1128/JVI.72.2.1462-1468.1998.

BRUSS V. 2007. Hepatitis B virus morphogenesis. World J Gastroenterol. **13(1)**, 65-73, doi: 10.3748/wjg.v13.i1.65.

Campagna MR, Liu F, Mao R, Mills C, Cai D, Guo F, Zhao X, Ye H, Cuconati A, Guo H, Chang J, Xu X, Block TM, Guo JT ,2013. Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids. J Virol;**87(12)**:6931-42. doi: 10.1128/JVI.00582-13. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23576513; PMCID: PMC3676120.

Colledge D, Civitico G, Locarnini S, Shaw T. 2000, *In vitro* antihepadnaviral activities of combinations of penciclovir, lamivudine, and adefovir. Antimicrob Agents Chemother. ;**44(3)**:551-60. doi: 10.1128/AAC.44.3.551-560.2000. PMID: 10681317; PMCID: PMC89725.

Colonna RJ, Genovesi EV, Medina I, Lamb L, Durham SK, Huang ML, Corey L, Littlejohn M, Locarnini S, Tennant BC, Rose B, Clark JM. 2001. Long-term entecavir treatment results in sustained antiviral efficacy and prolonged life span in the woodchuck model of chronic hepatitis infection. *J Infect Dis* **184**(10):1236-45. doi: 10.1086/324003.

Debat, H.J., Ng, T.F.F. 2019. Complete genome sequence of a divergent strain of Tibetan frog hepatitis B virus associated with a concave-eared torrent frog (*Odorrana tormota*). *Arch Virol* **164**, 1727–1732 <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04227-8>

Dill JA, Camus AC, Leary JH, Di Giallonardo F, Holmes EC, Ng TF. Distinct Viral Lineages from Fish and Amphibians Reveal the Complex Evolutionary History of Hepadnaviruses. *J Virol.* **90**(17):7920-33. doi: 10.1128/JVI.00832-16. doi: 10.1073/pnas.1308049110.

Drexler JF, Geipel A, König A, Corman VM, van Riel D, Leijten LM, Bremer CM, Rasche A, Cottontail VM, Maganga GD, Schlegel M, Müller MA, Adam A, Klose SM, Carneiro AJ, Stöcker A, Franke CR, Gloza-Rausch F, Geyer J, Annan A, Adu-Sarkodie Y, Oppong S, Binger T, Vallo P, Tschapka M, Ulrich RG, Gerlich WH, Leroy E, Kuiken T, Glebe D, Drosten C. 2013. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**(40):16151-6.

Emerman M, Malik HS. 2010. Paleovirology—modern consequences of ancient viruses. *PLoS Biol.* **8**(2):e1000301.

Fairman J, Liu KH, Menne S. 2017. Prevention of liver tumor formation in woodchucks with established hepatocellular carcinoma by treatment with cationic liposome-DNA complexes. *BMC Cancer* **17**(1):172. doi: 10.1186/s12885-017-3163-2.

Fan Y, Huang ZY, Cao CC, Chen CS, Chen YX, Fan DD, He J, Hou HL, Hu L, Hu XT, Jiang XT, Lai R, Lang YS, Liang B, Liao SG, Mu D, Ma YY, Niu YY, Sun XQ, Xia JQ, Xiao J, Xiong ZQ, Xu L, Yang L, Zhang Y, Zhao W, Zhao XD, Zheng YT, Zhou JM, Zhu YB, Zhang GJ, Wang J, Yao YG. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. *Nat Commun.*;4:1426. doi: 10.1038/ncomms2416. PMID: 23385571.

Fassler J, Cooper P. 2011. BLAST Glossary, BLAST® Help [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US)

Gearhart TL, Bouchard MJ. 2010. Replication of the hepatitis B virus requires a calcium-dependent HBx-induced G1 phase arrest of hepatocytes. *Virology*. **407(1)**:14-25. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.042.

Gerety RJ, Tabor E, Purcell RH, Tyeryar FJ. 1979. Summary of an international workshop on hepatitis B vaccines. *J Infect Dis* **140(4)**:642-8. doi: 10.1093/infdis/140.4.642.

Gerlich, W.H. 2013. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virol J* **10**, 239 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-239>

Gertz EM, Yu YK, Agarwala R, Schäffer AA, Altschul SF. 2006. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. *BMC Biol*. **4**:41. doi: 10.1186/1741-7007-4-41.

Gilbert C, Feschotte C. 2010. Genomic fossils calibrate the long-term evolution of hepadnaviruses. *PLoS Biol*. **8(9)**:e1000495.

Gong Z, Han GZ. Insect Retroelements Provide Novel Insights into the Origin of Hepatitis B Viruses. *Mol Biol Evol*. **35(9)**:2254-2259. doi: 10.1093/molbev/msy129.

Grimm D, Thimme R, Blum HE. 2011. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int* **5**, 644–653 . <https://doi.org/10.1007/s12072-011-9261-3>

Hung-Cheng Li ,Er-Yi Huang , Pei-Yi Su, Szu-Yao Wu, Ching-Chun Yang, Young-Sun Lin, Wen-Chang Chang, Chiaho Shih. 2010. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS pathogens* vol. **6**,10 (e1001162.) 28, doi:10.1371/journal.ppat.1001162

Chen CY, Winer BY, Chavez D, Guerra B, Brasky KM, Eng S, Salas E, Tam D, Simmons JH, Abee CR, Delaney WE, Ploss A, Lanford RE, Voitenleitner C. 2020. Woolly Monkey-HBV Infection in Squirrel Monkeys as a Surrogate Nonhuman Primate Model of HBV Infection. *Hepatol Commun* **4(3)**:371-386. doi: 10.1002/hep4.1471.

Chen MT, Billaud JN, Sällberg M, Guidotti LG, Chisari FV, Jones J, Hughes J, Milich DR. 2004. A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci* **101(41)**:14913-8. doi: 10.1073

Chen, Xin-Xin, Wei-Chen Wu, and Mang Shi. 2021. Discovery and Characterization of Actively Replicating DNA and Retro-Transcribing Viruses in Lower Vertebrate Hosts Based on RNA Sequencing *Viruses* 13, no. 6: 1042. <https://doi.org/10.3390/v13061042> *J Gen Virol* **45(2)**:509-14. doi: 10.1099/0022-1317-45-2-509.

Katzourakis A. 2013. Paleovirology: inferring viral evolution from host genome sequence data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **368(1626)**:20120493.

Köck J, Nassal M, MacNelly S, Baumert TF, Blum HE, von Weizsäcker F. 2001. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol.* ;**75(11)**:5084-9. doi: 10.1128/JVI.75.11.5084-5089.2001.

Kocher A, Papac L, Barquera R, Key FM, Spyrou MA, Hübler R, Rohrlach AB, Aron F, Stahl R, Wissgott A, van Bömmel F, Pfefferkorn M, Mitnik A, Villalba-Mouco V, Neumann GU, Rivollat M, van de Loosdrecht MS, Majander K, Tikhbatova RI, Musralina L, Ghalichi A, Penske S, Sabin S, Michel M, Gretzinger J, Nelson EA, Ferraz T, Nägele K, Parker C, Keller M, Guevara EK, Feldman M, Eisenmann S, Skourtanioti E, Giffin K, Gneccchi-Ruscione GA, Friederich S, Schimmenti V, Khartanovich V, Karapetian MK, Chaplygin MS, Kufterin VV, Khokhlov AA, Chizhevsky AA, Stashenkov DA, Kochkina AF, Tejedor-Rodríguez C, de Lagrán ÍG, Arcusa-Magallón H, Garrido-Pena R, Royo-Guillén JI, Nováček J, Rottier S, Kacki S, Saintot S, Kaverzneva E, Belinskiy AB, Velemínský P, Limburský P, Kostka M, Loe L, Popescu E, Clarke R, Lyons A, Mortimer R, Sajantila A, de Armas YC, Hernandez Godoy ST, Hernández-Zaragoza DI, Pearson J, Binder D, Lefranc P, Kantorovich AR, Maslov VE, Lai L, Zoledziewska M, Beckett JF, Langová M, Danielisová A, Ingman T, Atiénzar GG, de Miguel Ibáñez MP, Romero A, Sperduti A, Beckett S, Salter SJ, Zilivinskaya ED, Vasil'ev DV, von Heyking K, Burger RL, Salazar LC, Amkretz L, Navruzbekov M, Rosenstock E, Alonso-Fernández C, Slavchev V, Kalmykov AA, Atabiev BC, Batieva E, Calmet MA, Llamas B, Schultz M, Krauß R, Jiménez-Echevarría J, Francken

M, Shnaider S, de Knijff P, Altena E, Van de Vijver K, Fehren-Schmitz L, Tung TA, Lösch S, Dobrovolskaya M, Makarov N, Read C, Van Twest M, Sagona C, Ramsel PC, Akar M, Yener KA, Ballesterio EC, Cucca F, Mazzarello V, Utrilla P, Rademaker K, Fernández-Domínguez E, Baird D, Semal P, Márquez-Morfin L, Roksandic M, Steiner H, Salazar-García DC, Shishlina N, Erdal YS, Hallgren F, Boyadzhiev Y, Boyadzhiev K, Käßner M, Sayer D, Onkamo P, Skeates R, Rojo-Guerra M, Buzhilova A, Khussainova E, Djansugurova LB, Beisenov AZ, Samashev Z, Massy K, Mannino M, Moiseyev V, Mannermaa K, Balanovsky O, Deguilloux MF, Reinhold S, Hansen S, Kitov EP, Dobeš M, Ernée M, Meller H, Alt KW, Prüfer K, Warinner C, Schiffels S, Stockhammer PW, Bos K, Posth C, Herbig A, Haak W, Krause J, Kühnert D. 2021. Ten millennia of hepatitis B virus evolution. *Science***374**,182-188. DOI:10.1126/science.abi5658

Kramvis A, Kew MC. 2005. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat.* ;12(5):456-64. doi: 10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x.

Lamontagne RJ, Bagga S, Bouchard MJ. 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Res.*;2:163-186. doi: 10.20517/2394-5079.2016.05.

Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, Fosdick A, Frey CR, Zheng J, Wolfgang G, Halcomb RL, Tumas DB. 2013. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. *Gastroenterology*. **144(7)**:1508-17, 1517.e1-10. doi: 10.1053/j.gastro.2013.02.003.

Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns RB 3rd, Rico-Hesse R. 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95(10)**:5757-61. doi: 10.1073/pnas.95.10.5757. PMID: 9576957; PMCID: PMC20452.

Lauber C, Seitz S, Mattei S, Suh A, Beck J, Herstein J, Börold J, Salzburger W, Kaderali L, Briggs JAG, Bartenschlager R. 2017. Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. *Cell Host Microbe* **22(3)**:387-399.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.019.

Lauber C, Seitz S, Mattei S, Suh A, Beck J, Herstein J, Börold J, Salzburger W, Kaderali L, Briggs JAG, Bartenschlager R. 2017. Deciphering the Origin and Evolution of Hepatitis B Viruses by Means of a Family of Non-enveloped Fish Viruses. *Cell Host Microbe* **22(3)**:387-399.e6. doi: 10.1016/j.chom.2017.07.019.

Liu Y, Wang B, Wang L, Vikash V, Wang Q, Roggendorf M, Lu M, Yang D, Liu J. 2016. Transcriptome Analysis and Comparison of *Marmota monax* and *Marmota himalayana*. *PLoS One*. **2**;11(11):e0165875. doi: 10.1371/journal.pone.0165875.

Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. 2013. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol.* **23(6 Pt B)**:561-75. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.006..

Louten J. 2016. Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology*. 2016:19–29. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8.

Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, Zoulim F, Hantz O, Protzer U. 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* **55(5)**:996-1003. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.015.

Mason WS, Cullen J, Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Tennant B, Frick L, Averett D, Condreay LD, Jilbert AR. 1998. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* **245(1)**:18-32. doi: 10.1006/viro.1998.9150.

Mason WS, Cullen J, Saputelli J, Wu TT, Liu C, London WT, Lustbader E, Schaffer P, O'Connell AP, Fourel I, et al., 1994. Characterization of the antiviral effects of 2' carbodeoxyguanosine in ducks chronically infected with duck hepatitis B virus. *Hepatology*; **19(2)**:398-411. PMID: 8294097.

Mason WS, Seal G, Summers 1980, J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol.* ;**36(3)**:829-36. doi: 10.1128/JVI.36.3.829-836.1980. PMID: 7463557; PMCID: PMC353710.

Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. 2015. Asymptomatic Hepadnaviral Persistence and Its Consequences in the Woodchuck Model of Occult Hepatitis B Virus Infection. *J Clin Transl Hepatol* **3(3)**:211-9. doi: 10.14218/JCTH.2015.00020. Epub 2015 Sep 15.

Nakagawa S, Sakaguchi S, Ogura A, Mineta K, Endo T, Suzuki Y, Gojobori T. 2023. Current trends in RNA virus detection through metatranscriptome sequencing data. *FEBS Open Bio* **13(6)**:992-1000. doi: 10.1002/2211-5463.13626.

Nassal M. 2008. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.*; **134(1-2)**:235-49. doi: 10.1016/j.virusres.2007.12.024.

Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, Stindt J, Königer C, Nassal M, Kubitz R, Sülthmann H, Urban S. 2014. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology*. **146(4)**:1070-83. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.024.

Paulino P, Vitari G, Rezende A, Couto J, Antunes S, Domingos A, Peckle M, Massard C, Araújo F, Santos H. 2001. Characterization of the *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* Sialotranscriptome Profile in Response to *Theileria equi* Infection. *Pathogens*. **10(2)**:167. doi: 10.3390/pathogens10020167.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(41):14913-8. doi: 10.1073/pnas.0406282101.

Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H, Chang SF, Frölich K, Krone O, Kaleta EF, Will H. 2001. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology*. **289(1)**:114-28. doi: 10.1006/viro.2001.1115.

Radziwill, G, Tucker W, Schaller H. 1990. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *Journal of virology* vol. **64**, 613-20. doi:10.1128/JVI.64.2.613-620.1990

Sebé-Pedrós, Ruiz-Trillo. 2017. The origin of Metazoa: a unicellular perspective. *Nat Rev Genet.* **(8)**:498-512. doi: 10.1038/nrg.2017.21

Schaefer S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* **13(1)**:14-21. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.14.



Schaefer S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*; **13(1)**:14-21. doi: 10.3748/wjg.v13.i1.14. PMID: 17206751; PMCID: PMC4065870.

Schuster R, Hildt E, Chang SF, Terradillos O, Pollicino T, Lanford R, Gerlich WH, Will H, Schaefer S. 2002. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral X protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene* **21(43)**:6606-13. doi: 10.1038/sj.onc.1205916. PMID: 12242658.

Stannard LM, Hodgkiss. 1979. M. Morphological irregularities in Dane particle cores. *J Gen Virol* **45(2)**:509-14. doi: 10.1099/0022-1317-45-2-509. PMID: 541667.

Suh A, Brosius J, Schmitz J, Kriegs JO. 2013. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nature Comunnications*. **4(1)**, doi: 10.1038/ncomms2798.

Suh A, Brosius J, Schmitz J, Kriegs JO. 2013. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nat Commun* **4**, 1791  
.https://doi.org/10.1038/ncomms2798

Suh A, Weber CC, Kehlmaier C, Braun EL, Green RE, Fritz U, Ray DA, Ellegren H. 2014. Early mesozoic coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. *PLoS Genet*. **10(12)**:e1004559.

Summers J, Smith PM, Horwich AL. 1990 Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *Journal of virology* vol. **64,6** :2819-24. doi:10.1128/JVI.64.6.2819-2824.

Summers J, Smolec JM, Snyder R. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; **75(9)**:4533-7. doi: 10.1073/pnas.75.9.4533.

Sureau C, Eichberg JW, Hubbard GB, Romet-Lemonne JL, Essex M. 1988. A molecularly cloned hepatitis B virus produced *in vitro* is infectious in a chimpanzee. *J Virol* **62(8)**:3064-7. doi: 10.1128/JVI.62.8.3064-3067.1988.

Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Imamura J, Ikenoue T, Ijichi H, Kawabe T, Isobe T, Omata M. 2006. The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. *Oncogene* **25(4)**:633-42. doi: 10.1038/sj.onc.1209093.

Tavis JE, Cheng X, Hu Y, Totten M, Cao F, Michailidis E, Aurora R, Meyers MJ, Jacobsen EJ, Parniak MA, Sarafianos SG. 2013. The hepatitis B virus ribonuclease H is sensitive to inhibitors of the human immunodeficiency virus ribonuclease H and integrase enzymes. *PLoS pathogens* vol. **9**:e1003125. doi:10.1371/journal.ppat.1003125

Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. 2010. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol* **52(2)**:282-4. doi: 10.1016/j.jhep.2009.10.031.

Wieland SF. 2015. The chimpanzee model for hepatitis B virus infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5(6)**:a021469. doi: 10.1101/cshperspect.a021469.

William S. Robinson, 1999. HEPATITIS B VIRUSES | General features, *Encyclopedia of Virology* (Second Edition), Pages 640-644, <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0116>.

## **7. Přílohy**

### **Seznam příloh:**

**Příloha č. 1 : Přehled výsledků z databáze TSA - tBLASTn.**

## Příloha 1: Přehled výsledků z databáze TSA - tBLASTn.

Species	Phylum	Class	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Artophoda	Arachnia	600	600	42 %	0.0	82.95	1059
<i>Schizopygopsis younghusbandi</i>	Chordata	Actinopterygii	344	644	87 %	2.00E-94	34.20	6827
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	303	405	73 %	2.00E-82	42.50	3175
<i>Gymnocypris namensis</i>	Chordata	Actinopterygii	293	293	52 %	7.00E-81	41.48	2225
<i>Chiloscyllium griseum</i>	Chordata	Chondrichthyes	290	756	81 %	4.00E-76	40.52	5883
<i>Spodoptera littoralis</i>	Artophoda	Insecta	259	259	15 %	6.00E-76	96.90	388
<i>Ginglymostoma cirratum</i>	Chordata	Chondrichthyes	223	223	20 %	2.00E-61	63.47	574
<i>Exitianus exitiosus</i>	Artophoda	Insecta	224	224	20 %	3.00E-61	63.47	716
<i>Mamestra brassicae</i>	Artophoda	Insecta	224	224	20 %	6.00E-60	63.47	1004
<i>Achaea janata</i>	Artophoda	Insecta	203	203	12 %	2.00E-55	93.07	309
<i>Spodoptera littoralis</i>	Artophoda	Insecta	189	189	14 %	6.00E-49	78.86	543
<i>Thunnus albacares</i>	Chordata	Actinopterygii	176	176	27 %	1.00E-43	42.92	687
<i>Trichoplusia ni</i>	Artophoda	Insecta	166	166	14 %	2.00E-41	65.85	411
<i>Spodoptera littoralis</i>	Artophoda	Insecta	161	161	10 %	3.00E-40	82.02	269
<i>Achaea janata</i>	Artophoda	Insecta	155	155	9 %	3.00E-38	89.87	240
<i>Thunnus albacares</i>	Chordata	Actinopterygii	138	138	24 %	9.00E-31	43.41	582
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	145	216	44 %	4.00E-29	34.01	2592
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	145	216	44 %	4.00E-29	34.01	2592
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	44 %	7.00E-29	34.69	2592
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	44 %	7.00E-29	34.69	2592
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	53 %	1.00E-28	34.01	2886
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	53 %	1.00E-28	34.01	2886
<i>Chrysaora quinquecirrha</i>	Cnidaria	Scyphozoa	128	128	10 %	1.00E-28	69.32	266
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	53 %	1.00E-28	34.69	2886
<i>Junco hyemalis</i>	Chordata	Aves	144	216	53 %	1.00E-28	34.69	2886
<i>Ophthalmotilapia ventralis</i>	Chordata	Actinopterygii	130	130	41 %	1.00E-24	29.59	2178
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Artophoda	Arachnia	116	116	6 %	2.00E-24	94.55	254
<i>Leptopilina boulardi</i>	Artophoda	Insecta	117	117	12 %	2.00E-24	60.58	312
<i>Calanus propinquus</i>	Artophoda	Maxilopoda	118	118	11 %	2.00E-23	54.17	641
<i>Onthophagus curvicornis</i>	Artophoda	Insecta	109	109	8 %	5.00E-22	78.38	258
<i>Dichotomius satanas</i>	Artophoda	Insecta	104	104	6 %	3.00E-20	96.15	248
<i>Gammarus fossarum</i>	Artophoda	Malacostraca	115	115	51 %	1.00E-19	24.77	2223
<i>Odorrana tormota</i>	Chordata	Amphibia	106	462	69 %	1.00E-16	37.06	7988
<i>Gymnocypris namensis</i>	Chordata	Actinopterygii	98.6	98.6	14 %	1.00E-15	39.84	979
<i>Macrobrachium nipponense</i>	Artophoda	Malacostraca	87.8	87.8	10 %	5.00E-14	55.29	340
<i>Oreobates cruralis</i>	Chordata	Amphibia	93.2	93.2	23 %	1.00E-13	29.21	1106
<i>Rhincalanus gigas</i>	Artophoda	Maxilopoda	85.5	85.5	9 %	2.00E-13	55.56	292
<i>Rotaria tardigrada</i>	Rotifera	Bdelloidea	92.0	92.0	34 %	3.00E-12	27.33	3418
<i>Gammarus fossarum</i>	Artophoda	Malacostraca	87.8	87.8	33 %	4.00E-11	24.39	2102
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	80.5	80.5	12 %	7.00E-11	44.95	506
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	80.5	80.5	12 %	8.00E-11	44.95	506
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	80.5	80.5	12 %	8.00E-11	44.95	507

<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	80.5	80.5	12 %	8.00E-11	44.95	506
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Anguilla anguilla</i>	Chordata	Actinopterygii	79.7	79.7	12 %	5.00E-10	44.95	665
<i>Thunnus albacares</i>	Chordata	Actinopterygii	75.9	75.9	12 %	7.00E-08	40.57	1104
<i>Acanthis hornemanni</i>	Chordata	Aves	64.3	162	30 %	0.001	43.33	4355
<i>Acanthis flammea</i>	Chordata	Aves	64.3	162	30 %	0.001	43.33	4355
<i>Xestocephalus desertorum</i>	Artophoda	Insecta	75.5	75.5	26 %	5.00E-07	27.93	6114
<i>Lampona murina</i>	Artophoda	Arachnia	73.2	73.2	25 %	1.00E-06	28.18	1537
<i>Lampona murina</i>	Artophoda	Arachnia	73.2	73.2	25 %	1.00E-06	28.18	1537
<i>Lampona murina</i>	Artophoda	Arachnia	73.2	73.2	25 %	2.00E-06	28.18	5458
<i>Lampona murina</i>	Artophoda	Arachnia	73.2	73.2	25 %	2.00E-06	28.18	5461
<i>Mesocricetus auratus</i>	Chordata	Mammalia	72.8	72.8	13 %	3.00E-06	33.33	3549
<i>Bacillus atticus</i>	Artophoda	Insecta	72.4	72.4	32 %	4.00E-06	25.60	3087
<i>Mesocricetus auratus</i>	Chordata	Mammalia	72.4	72.4	13 %	4.00E-06	33.33	4908
<i>Abrothrix longipilis</i>	Chordata	Mammalia	68.9	68.9	12 %	2.00E-05	33.33	1357
<i>Heteropteryx dilatata</i>	Artophoda	Insecta	69.7	69.7	32 %	2.00E-05	26.26	3913
<i>Abrothrix longipilis</i>	Chordata	Mammalia	68.6	68.6	12 %	2.00E-05	33.33	1323
<i>Abrothrix longipilis</i>	Chordata	Mammalia	68.9	68.9	12 %	2.00E-05	33.33	1708
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	68.6	68.6	12 %	2.00E-05	33.01	1408
<i>Heteropteryx dilatata</i>	Artophoda	Insecta	69.7	69.7	32 %	3.00E-05	26.26	7445
<i>Peromyscus californicus</i>	Chordata	Mammalia	67.0	67.0	12 %	3.00E-05	33.98	838
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	69.3	69.3	12 %	3.00E-05	33.98	6068
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	69.3	69.3	12 %	3.00E-05	33.98	7248
<i>Galloisiana yuasai</i>	Artophoda	Insecta	69.3	69.3	29 %	3.00E-05	26-Apr	4561
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	69.3	69.3	12 %	3.00E-05	33.98	7758
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	68.9	68.9	12 %	3.00E-05	33.01	2583
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	69.3	69.3	12 %	3.00E-05	33.98	8456
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	69.3	69.3	12 %	4.00E-05	33.98	7445
<i>Choristoneura fumiferana</i>	Artophoda	Insecta	68.9	68.9	36 %	4.00E-05	23.26	4569
<i>Bacillus grandii</i>	Artophoda	Insecta	68.9	68.9	32 %	4.00E-05	24.31	2976
<i>Cricetulus griseus</i>	Chordata	Mammalia	68.9	68.9	12 %	5.00E-05	33.98	7803
<i>Menosira ornata</i>	Artophoda	Arachnia	66.2	66.2	25 %	5.00E-05	27.52	877
<i>Tetragnathidae gen. sp.</i>	Artophoda	Arachnia	68.2	68.2	25 %	5.00E-05	27.73	2479
<i>Metellina merianae</i>	Artophoda	Arachnia	67.4	67.4	25 %	1.00E-04	27.80	2743
<i>Pardosa amentata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	29 %	1.00E-04	26-May	2906
<i>Anastrepha ludens</i>	Artophoda	Insecta	66.6	66.6	36 %	1.00E-04	22.54	1695
<i>Pardosa amentata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	29 %	1.00E-04	26-May	3089
<i>Arctosa depectinata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	25 %	1.00E-04	27.68	3038
<i>Arctosa depectinata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	25 %	1.00E-04	27.68	3038
<i>Arctosa depectinata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	25 %	1.00E-04	27.68	3043
<i>Pardosa amentata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	29 %	1.00E-04	26-May	4959
<i>Pardosa amentata</i>	Artophoda	Arachnia	67.0	67.0	29 %	1.00E-04	26-May	4972

<b>Wadicosa okinawensis</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Arachnia</b>	67.0	67.0	25 %	2.00E-04	27.73	3249
<b>Wadicosa okinawensis</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Arachnia</b>	67.0	67.0	25 %	2.00E-04	27.73	3249
<b>Peromyscus californicus</b>	<b>Chordata</b>	<b>Mammalia</b>	60.5	60.5	10 %	2.00E-04	35.63	313
<b>Alatina alata</b>	<b>Cnidaria</b>	<b>Scyphozoa</b>	66.6	66.6	31 %	2.00E-04	24.82	4624
<b>Alatina alata</b>	<b>Cnidaria</b>	<b>Scyphozoa</b>	66.6	66.6	31 %	2.00E-04	24.82	4814
<b>Phaedon cochleariae</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Insecta</b>	66.2	66.2	33 %	2.00E-04	24.21	2194
<b>Peromyscus californicus</b>	<b>Chordata</b>	<b>Mammalia</b>	64.7	64.7	11 %	3.00E-04	33.68	1029
<b>Ocrisiona sp.</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Arachnia</b>	66.2	66.2	25 %	3.00E-04	28.64	3183
<b>Apricia jovialis</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Arachnia</b>	65.9	65.9	25 %	3.00E-04	27.73	2694
<b>Ocrisiona sp.</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Arachnia</b>	66.2	66.2	25 %	3.00E-04	28.64	3172
<b>Peromyscus californicus</b>	<b>Chordata</b>	<b>Mammalia</b>	65.5	65.5	12 %	3.00E-04	33.65	1975
<b>Planotortrix excessana</b>	<b>Artophoda</b>	<b>Insecta</b>	65.1	65.1	31 %	3.00E-04	22.18	1614