

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 4: Biologie**

## **Predikce rizika infekce SARS-CoV-2 u savců**

**Vítězslav Havlíček  
Kraj Vysočina**

**Velké Meziříčí 2021**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

**Predikce rizika infekce SARS-CoV-2 u savců**

**Predicting the risk of SARS-CoV-2 infection in mammals**

**Autoři:** Vítězslav Havlíček

**Škola:** Gymnázium Velké Meziříčí, Sokolovská 235/27, 594 01 Velké Meziříčí

**Kraj:** Vysočina

**Konzultant:** Mgr. Markéta Harazim

Velké Meziříčí 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Velkém Meziříčí dne 18. března 2021 .....

Vítězslav Havlíček

## **Poděkování**

Touto cestou bych chtěl velmi poděkovat své konzultantce Mgr. Markétě Harazim za veškerou poskytnutou pomoc, za zasvěcení do překrásného světa bioinformatiky a evoluční biologie a především za neskonalou trpělivost při zpracovávání výsledků. Mé velké díky patří i doc. Mgr. Natálii Martínkové, Ph.D. za předané cenné rady a pomoc s řešením problémů spojených s vypracováním práce.

Rovněž musím poděkovat svým učitelům z Gymnázia Velké Meziříčí, zejména Mgr. Martině Polákové a Mgr. Lukáši Dočkalovi, za velikou podporu, vstřícnost a ochotu mi s čímkoliv pomoci.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také Ústavu biologie obratlovců Akademie věd České republiky za umožnění realizace práce.

## Anotace

Nově identifikovaným betakoronavirem SARS-CoV-2 jsou ohroženi nejen lidé, ale i některé druhy zvířat, zejména z řádu savců (Mammalia). Jejich riziko infekce přitom není pevně určeno. Je tudíž důležité identifikovat ohrožené druhy zvířat a chránit je před potenciálním mezidruhovým přenosem SARS-CoV-2.

Interakce SARS-CoV-2 s receptorem ACE2 a koreceptorem DPP4 jsou důležitými předpoklady pro rozvoj infekce. Ve své práci jsem se zaměřil na porovnávání strukturních vlastností a fylogenetických vztahů ACE2 a DPP4 u různých druhů savců. Prostřednictvím serveru TranslatorX jsem sestavil mnohočetné přiřazení nukleotidových a aminokyselinových sekvencí. Na základě mnohočetného přiřazení jsem srovnal aminokyselinové pozice ACE2 a DPP4 různých druhů savců, které mohou ovlivňovat vazbu na SARS-CoV-2. Predikci proteinových struktur ACE2 a DPP4 jsem provedl přes modelovací software Phyre2. Pomocí webového serveru IQTREE jsem rekonstruoval fylogenetický strom jednotlivých nukleotidových sekvencí savců a pomocí programu DaliLite.v5 jsem posoudil podobnost jednotlivých modelů mezi sebou. Metodu ParaFit jsem využil ke srovnání rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu.

Výsledky mé práce mohou sloužit jako podklad k predikci rizika infekce SARS-CoV-2 u různých druhů savců. Výsledky poukazují na zvýšené riziko infekce SARS-CoV-2 úzkonosých opic (Catarrhini) a na možnou variabilní vnitrodruhovou náchylnost k infekci mezi makaky rhesus (*Macaca mulatta*). Dále potvrzují zvýšenou náchylnost křečkovitých hlodavců (Cricetidae) a identifikují zrychlenou evoluci struktury ACE2 a DPP4 u některých živočichů.

## Klíčová slova

SARS-CoV-2; covid-19; ACE2; DPP4; náchylní hostitelé; receptory virů

## **Annotation**

The novel betacoronavirus SARS-CoV-2 endangers not only humans, but also some animal species, especially from the mammalian order (Mammalia). The risk of infection in mammals is not clearly established. It is therefore important to identify animal species at risk and protect them from potential interspecies transmission of SARS-CoV-2.

Interactions between SARS-CoV-2 and the ACE2 receptor and the DPP4 co-receptor are important prerequisites for the development of infection. In my study, I focused on comparing the structural properties and phylogenetic relationships of ACE2 and DPP4 in different mammalian species. I have compiled multiple alignments of nucleotide and amino acid sequences through the TranslatorX program. Based on multiple alignments, I compared the amino acid positions of ACE2 and DPP4 of different mammalian species that can affect the binding to SARS-CoV-2. I predicted the ACE2 and DPP4 protein structures through the Phyre2 modeling server. Using the web server IQTREE, I built a phylogenetic tree of individual mammalian nucleotide sequences and using the program DaliLite.v5 I assessed the similarity of the different models to each other. I used the ParaFit method to compare the rate of evolution of the DNA sequence and protein structure.

The results of my study can serve as a basis for predicting the risk of SARS-CoV-2 infection in various mammalian species. The results indicate an increased risk of SARS-CoV-2 infection in catarrhine monkeys (Catarrhini) and a possible variable intraspecies susceptibility to infection among rhesus macaques (*Macaca mulatta*). They also confirm the increased susceptibility of hamster rodents (Cricetidae) and identify accelerated evolution of the structure of ACE2 and DPP4 of some animals.

## **Keywords**

SARS-CoV-2; covid-19; ACE2; DPP4; susceptible hosts; viral receptors

# OBSAH

1	Úvod.....	8
1.1	SARS-CoV-2.....	9
1.1.1	Fylogenetická příbuznost SARS-CoV-2.....	9
1.1.2	Struktura viru .....	11
1.1.3	Vstup viru do buněk.....	13
1.2	Buněčné receptory ACE2 a DPP4.....	14
2	Hypotéza a cíle práce .....	16
3	Metodika .....	17
3.1	Vyhledávání sekvencí v databázi .....	17
3.2	Mnohočetné přiřazení sekvencí.....	17
3.3	Predikce možného mezidruhového přenosu.....	18
3.4	Fylogenetická analýza.....	19
3.5	Homologní modelování.....	19
3.6	Srovnání struktur modelů.....	21
3.7	Srovnání rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu .....	22
4	Výsledky .....	24
4.1	Sekvence a jejich mnohočetné přiřazení .....	24
4.2	Srovnání aminokyselinových pozic .....	24
4.2.1	Srovnání aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících vazebnou afinitu .....	24
4.2.2	Srovnání aminokyselinových pozic ACE2 snižujících vazebnou afinitu .....	25
4.2.3	Srovnání aminokyselinových pozic DPP4 účastnících se vazby .....	26
4.3	Fylogenetické stromy .....	26
4.4	Homologní modelování.....	29
4.5	Srovnání struktur modelů.....	29
4.6	Srovnání evoluce DNA a struktury proteinu.....	31
5	Diskuse.....	34
6	Závěr .....	38
7	Použitá literatura .....	39
8	Seznam obrázků a tabulek .....	52

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE2	enzym konvertující angiotensin 2
covid-19	coronavirus disease 2019
DPP4	dipeptidyl peptidáza 4
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NRP1	neuropilin-1
ORF	otevřený čtecí rámec
RBD	receptorová vazebná doména
RBM	motiv vázající se k receptoru
RNA	ribonukleová kyselina
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
TMPRSS2	transmembránová serinová proteáza 2
+ssRNA	jednovláknová ribonukleová kyselina s pozitivní polaritou



# 1 Úvod

V prosinci roku 2019 bylo v čínském městě Wu-chan zaznamenáno několik případů zápalu plic s neznámou příčinou. Izolace viru z epitelu dýchacích cest nakažených jedinců a sekvenční analýza ukázaly, že původcem onemocnění je do té doby nezaznamenaný betakoronavirus (Zhu et al., 2020). Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů oficiálně označil tento virus jako SARS-CoV-2 a Světová zdravotnická organizace pojmenovala jím způsobované onemocnění jako coronavirus disease 2019 (covid-19) (Gorbalenya et al., 2020; World Health Organization, 2020). Během pár měsíců od prvního zaznamenaného výskytu se SARS-CoV-2 stal zdravotní a sociální hrozbou pro miliony lidí po celém světě a opatření proti jeho šíření významně narušily světovou ekonomiku. Od počátku pandemie bylo do 1. března 2021 zaznamenáno přibližně 113,5 milionů případů nákazy a 2,5 milionu lidských úmrtí spojených s onemocněním covid-19 (World Health Organization, 2021).

Ačkoliv jsou virem SARS-CoV-2 postiženi především lidé, infekce tímto virem je prokázána také u domácích a divokých zvířat. Zaznamenané případy nákazy u zvířat naznačují, že došlo k pravděpodobnému přenosu infekce z člověka na zvíře. Potenciální mezidruhový přenos byl zaznamenán u psa domácího (*Canis lupus familiaris*) (Sit et al., 2020), kočky domácí (*Felis catus*) (Zhang et al., 2020b), tygrů (*Panthera tigris*), lvů (*Panthera leo*) (McAloose et al., 2020) a norka amerického (*Neovison vison*) (Oreshkova et al., 2020; Munnink et al., 2021). Experimentální infekce navíc potvrzují vysokou náchylnost určitých zvířat k nákaze SARS-CoV-2. Patří mezi ně například křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*) (Sia et al., 2020), kočka domácí (*Felis catus*) (Bosco-Lauth et al., 2020; Shi et al., 2020), fretka domácí (*Mustela putorius furo*) (Shi et al., 2020; Schlottau et al., 2020), makak rhesus (*Macaca mulatta*) (Munster et al., 2020), kočkodan obecný (*Chlorocebus aethiops*) a někteří další primáti (Lu et al., 2020b; Woolsey et al., 2021).

Z hlediska prevence reverzní zoonózy, tj. přenosu nákazy z lidí na zvířata, je důležité stanovit spektrum možných hostitelů viru a predikovat náchylnost jednotlivých druhů zvířat k infekci.

## 1.1 SARS-CoV-2

Virus SARS-CoV-2 je vedle virů severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) identifikovaným roku 2002 a Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) identifikovaným roku 2012 dalším vysoce patogenním koronavirem, který se šíří v lidské populaci ve 21. století (Shereen et al., 2020). Všechny tři viry se přitom společně řadí do řádu *Nidovirales*, podřádu *Cornidovirineae*, čeledi *Coronaviridae*, podčeledi *Orthocoronavirinae* a rodu *Betacoronavirus*, který zahrnuje obalené RNA viry infikující především savce včetně člověka (Gorbalenya et al., 2020).

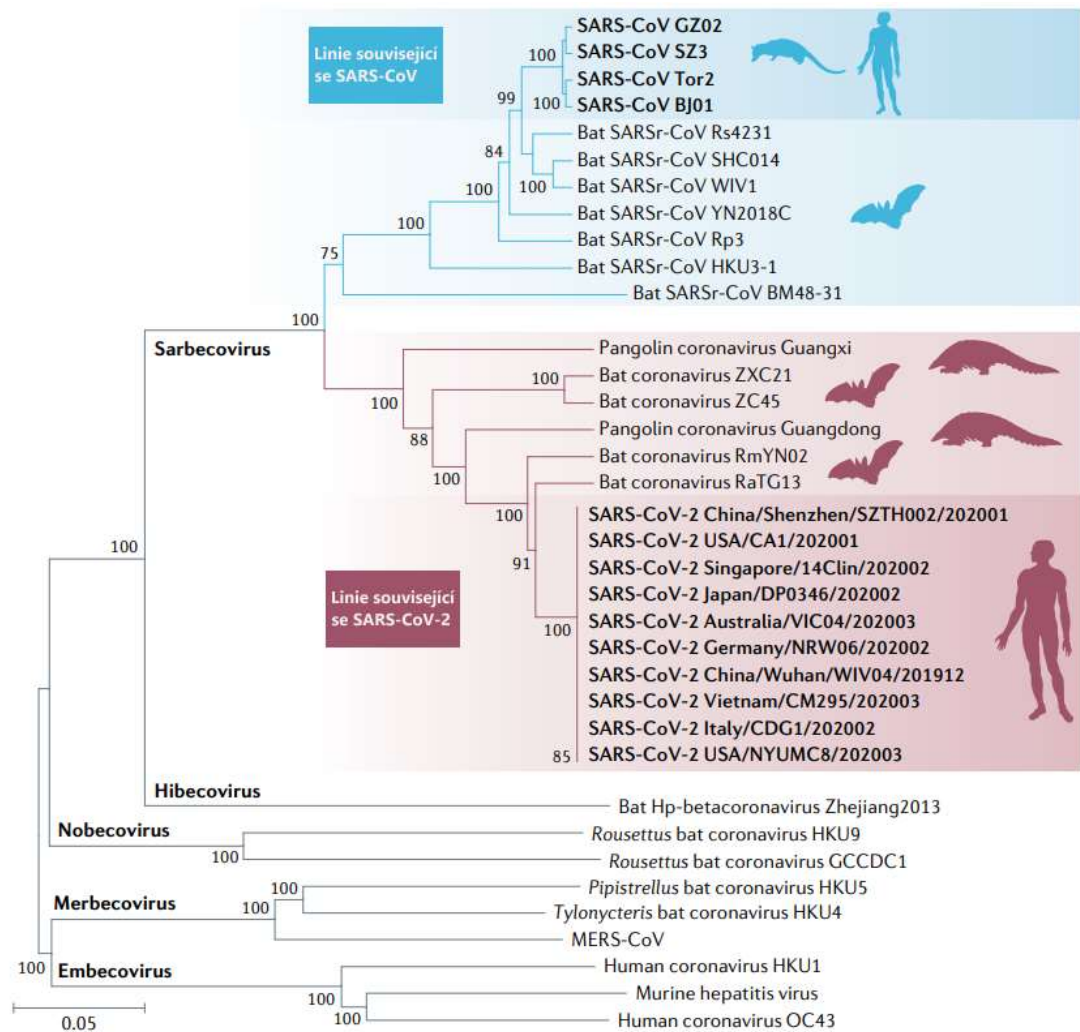
Předpokládá se, že SARS-CoV-2 má díky svým virologickým vlastnostem (viz kapitola 1.1.2) mnohem vyšší infekčnost než SARS-CoV nebo MERS-CoV. Do lidských těl se SARS-CoV-2 nejčastěji dostává inhalací infikovaných kapének při těsném mezilidském kontaktu nebo po kontaktu s infikovaným povrchem, ale pravděpodobně existuje i možnost fekálně-orálního přenosu (Hindson, 2020). Případy přenosu infekce ze zvířat na člověka byly dosud zaznamenány jen ojediněle (Singla et al., 2020).

K infekci virem jsou náchylní všichni lidé bez ohledu na věk (Wu a McGoogan, 2020). Starší lidé nebo lidé s přítomností dalších onemocnění mají větší pravděpodobnost vzniku vážnějších klinických příznaků, zatímco mladí lidé a děti mají spíše mírnější průběh onemocnění nebo jsou zcela bezpříznakoví. Mezi nejčastější příznaky se řadí horečka, suchý kašel nebo únava (Wu a McGoogan, 2020).

### 1.1.1 Fylogenetická příbuznost SARS-CoV-2

Při fylogenetickém zkoumání genomové sekvence SARS-CoV-2 bylo zjištěno, že sdílí nejvyšší podobnost s betakoronaviry z podrodu *Sarbecovirus*. Společně s izolovanými viry z vrápenců (RaTG13, RmYN02, ZC45 a ZXC21) a z luskounů (Guangxi a Guangdong) se SARS-CoV-2 řadí do odlišné vývojové linie od SARS-CoV (Obr. 1) (Hu et al., 2020). Se SARS-CoV sdílí podobnost na úrovni sekvence RNA přibližně ze 79 % a s MERS-CoV z 50 % (Lu et al., 2020a).

Nejvyšší podobnost (asi 96,2 %) sdílí SARS-CoV-2 s RaTG13 izolovaným z vrápence prostředního (*Rhinolophus affinis*) (Zhou et al., 2020b). Receptorová vazebná doména (RBD) se však u RaTG13 podstatně liší, což může znamenat, že se nemusí tak účinně vázat na lidský receptor (Andersen et al., 2020). Dalším známým příbuzným betakoronavirem SARS-CoV-2 je RmYN02, který byl izolován z vrápence malajského (*Rhinolophus malayanus*). Jeho celá genomová sekvence sdílí se SARS-CoV-2 podobnost z 93,3 %, zatímco jeho gen ORF1ab vykazuje podobnost až 97,2 % (Zhou et al., 2020a). Kromě toho byly roku 2015 identifikovány další příbuzné betakoronaviry ZC45 a ZXC21 u vrápence nejmenšího (*Rhinolophus pusillus*), které se rovněž řadí do stejné vývojové linie jako SARS-CoV-2 (Hu et al., 2018). Vzhledem k těmto identifikovaným virům můžeme, obdobně jako u SARS-CoV, hledat pravděpodobný původ SARS-CoV-2 u letounů (Lau et al., 2020).

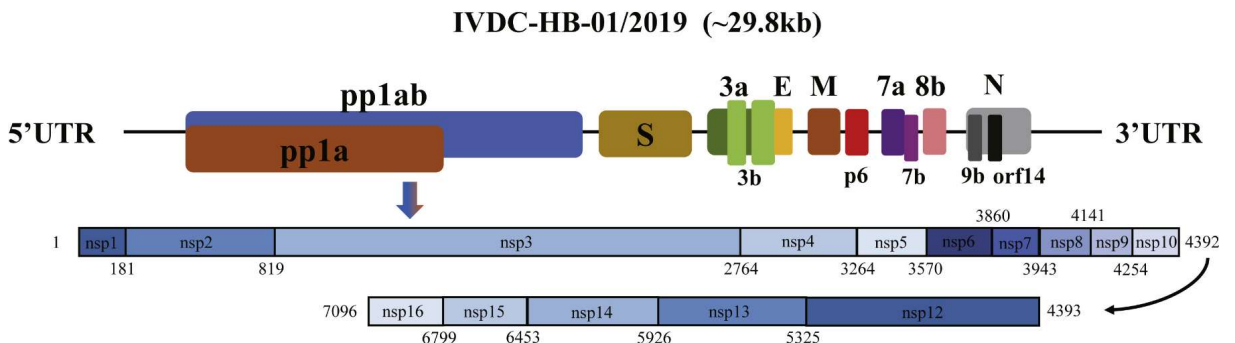


**Obr. 1:** Fylogenetický strom genomových sekvencí některých betakoronavirů. *Upraveno podle Hu et al. (2020).*

Stejně jako byli cibetky a velbloudi pravděpodobnými mezihostiteli u SARS-CoV a MERS-CoV, tak i u SARS-CoV-2 se očekává, že se k lidem dostal přes mezihostitele (Cui et al., 2019). Vedle letounů jsou s viry podobnými SARS-CoV-2 spojeni i luskouni ostrovní (*Manis javanica*). Výzkumnými týmy z čínské provincie Guangdong byly před vypuknutím pandemie izolovány neznámé betakoronaviry z mrtvých luskounů (Liu et al., 2019). Jejich genomové sekvence se až z 91,02 % podobají sekvenci SARS-CoV-2, přičemž jejich RBD sdílí se SARS-CoV-2, na rozdíl od RaTG13, velmi vysokou podobnost a možnou schopnost vázat se na lidský receptor (Zhang et al., 2020c). Po propuknutí pandemie byly výzkumnými týmy z čínské provincie Guangxi nalezeny další betakoronaviry u luskounů, ale podobnost jejich genomových sekvencí se SARS-CoV-2 byla pouze 85,5 % (Lam et al., 2020). V porovnání s letouny, kteří jsou bezpříznakoví a koronaviry je neohrožují na zdraví, se u luskounů projevují symptomy onemocnění (Liu et al., 2019; Lam et al., 2020). To znamená, že luskouni nemohou být rezervoárem viru, ale virus se k nim dostal od přirozeného hostitele (Hu et al., 2020). Jejich role v šíření viru tudíž zůstává prozatím neznámá.

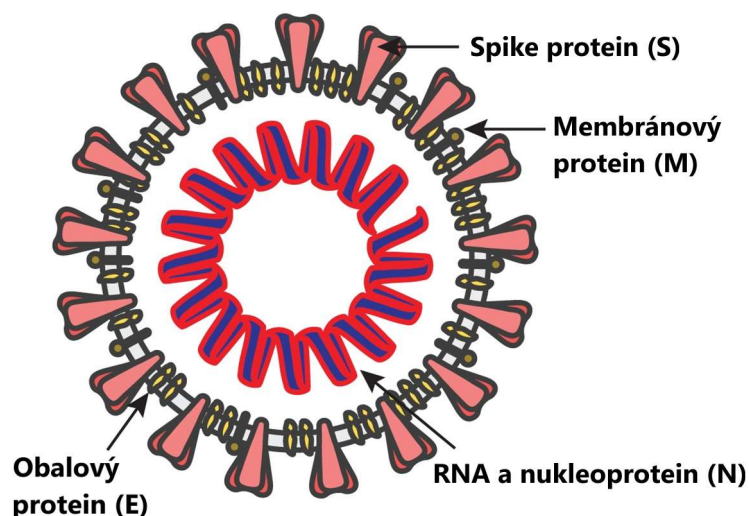
## 1.1.2 Struktura viru

SARS-CoV-2 je obalený RNA virus s jednovláknovým genomem s pozitivní polaritou (+ssRNA). Pro RNA viry je typická vysoká frekvence mutací umožňující přizpůsobení se jiným hostitelům a tedy i vytvoření širokého spektra hostitelů (Woolhouse a Gowtage-Sequeria, 2005). Genomová sekvence SARS-CoV-2 je oproti ostatním RNA virům s délkou okolo 29,9 kbp jednou z nejdelších (Lu et al., 2020a). Genom je na 5'-konci zakončen čepičkou chránící virovou mRNA před imunitním působením buněk a na 3'-konci polyadenylovou skupinou. Genom se celkově skládá ze 14 otevřených čtecích rámců (ORF) kódujících 27 proteinů. Geny ORF1ab a ORF1a na 5'-konci kódují proteiny pp1ab a pp1a, které zahrnují dohromady 15 nestrukturních proteinů potřebných k replikaci (nsp1-nsp10 a nsp12-nsp16). 3' konec genomu obsahuje čtyři strukturální proteiny (S, E, M a N) a osm doprovodných proteinů (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b a ORF14) (Obr. 2) (Wu et al., 2020).



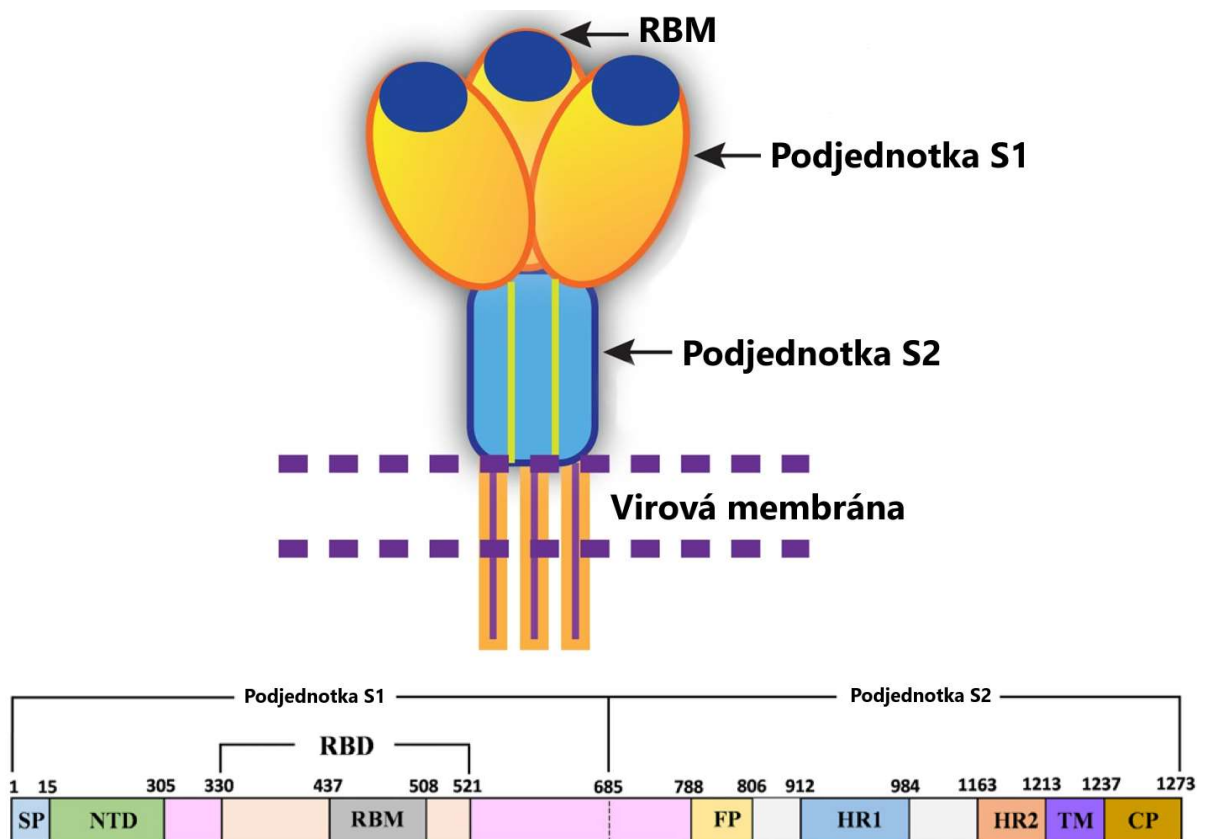
**Obr. 2:** Genom viru SARS-CoV-2. Upraveno podle Wu et al. (2020).

Nukleoprotein (N) je zodpovědný za obalení RNA, se kterou tak vytváří ribonukleový kapsid. „Spike“ protein (S), obalový protein (E) a membránový protein (M) společně vytváří virový obal. S protein dává virionu charakteristickou podobu připomínající sluneční korónu (Obr. 3) (Mittal et al., 2020).



**Obr. 3:** Schematické znázornění struktury SARS-CoV-2. Upraveno podle Mittal et al. (2020).

S protein je homotrimerický transmembránový protein o celkové velikosti 1 273 aminokyselin, který zprostředkovává vstup SARS-CoV-2 do buněk přes primární receptor enzym konvertující angiotensin 2 (ACE2). Jedná se tak o hlavní cíl protilátek (Hu et al., 2020). S protein obsahuje dvě funkční podjednotky (Obr. 4). Podjednotka S<sub>1</sub> je zásadní pro rozpoznání viru na povrchu buňky a za navázání viru na buňku. Svou strukturou tak určuje i specifitu hostitelské buňky. Podjednotka S<sub>2</sub> je zase zodpovědná za fúzi virové a buněčné membrány. Podjednotka S<sub>1</sub> obsahuje signální peptid (SP), N-terminální doménu (NTD) a RBD s motivem vázajícím se k receptoru (RBM), zatímco podjednotka S<sub>2</sub> obsahuje fúzní peptid (FP), opakující se heptózu 1 a 2 (HR1 a HR2), transmembránovou doménu (TM) a cytoplazmatickou doménu (CP) (Lalchhandama, 2020).



**Obr. 4:** Schematické znázornění struktury S proteinu u SARS-CoV-2. Upraveno podle Mittal et al. (2020) a Wang et al. (2020a).

S protein má mezi koronaviry vysoce variabilní strukturu. Podobnost S proteinu mezi SARS-CoV-2 a SARS-CoV je na aminokyselinové úrovni pouze 76% (Jaimes et al., 2020). Rozsáhlé studie ukázaly, že náchylnost hostitelů k infekci koronaviry podobnými SARS-CoV je velmi závislá na vazebné afinitě mezi virovou RBD a hostitelským receptorem ACE2 (Li et al., 2005). U koronavirů podobných SARS-CoV bylo nalezeno celkem šest klíčových aminokyselin v RBM vázajícím se přímo na povrch ACE2. U SARS-CoV-2 se přitom pět z nich odlišuje od SARS-CoV (Y455L, L486F, N493Q, D494S a T501N) a pravděpodobně tak zapříčiňují vyšší vazebnou afinitu mezi RBM a ACE2 a tím pádem i vyšší infekčnost SARS-CoV-2 u některých živočichů včetně člověka (Wan et al., 2020).

S protein SARS-CoV-2 je rovněž neobvyklý v inzerci čtyř aminokyselin, které vytváří sekvenci aminokyselin štěpenou peptidázou furinem (RRAR) na rozhraní mezi podjednotkami S<sub>1</sub> a S<sub>2</sub> (Walls et al., 2020). Tato sekvence aminokyselin je v poddruhu *Sarbecovirus* pro SARS-CoV-2 zcela ojedinělá. Podobná inzerce aminokyselin, ale neúčinná, byla objevena jen u netopýřího viru RmYN02 (Zhou et al., 2020a). Role sekvence aminokyselin štěpenou peptidázou furinem je dosud neobjasněná. Studie naznačují, že by mohla snižovat celkovou stabilitu SARS-CoV-2 a usnadňovat přijetí otevřené konformace pro vazbu na ACE2 (Wrobel et al., 2020).

### 1.1.3 Vstup viru do buněk

Virus nejdříve a nejvíce postihuje epitelové a alveolární buňky dýchací soustavy. Kromě toho ale bylo prokázáno, že může poškozovat také další orgánové soustavy. Mezi ně patří trávicí soustava, urogenitální soustava, centrální nervová soustava nebo oběhová soustava (Zhang et al., 2020d).

Vstup SARS-CoV-2 do buněk závisí především na vazebné afinitě RBD virového S proteinu s primárním receptorem ACE2. Ačkoliv je ACE2 považován za nejdůležitější receptor pro vstup SARS-CoV-2 do buněk (Scialo et al., 2020), studie ukazují, že RBD SARS-CoV-2 má potenciálně vysokou afinitu také k dipeptidyl peptidáze 4 (DPP4) (Vankadari a Wilce, 2020). DPP4 se projevuje jako potenciální koreceptor, který může hrát podstatnou roli při vstupu SARS-CoV-2 do buněk a ovlivňovat průběh infekce (Solerte et al., 2020; Vankadari a Wilce, 2020). Jako další alternativní receptor byl ze začátku pandemie určen i receptor CD147 (Wang et al., 2020b). Následnými výzkumy ale bylo zjištěno, že po jeho odstranění z povrchu plic se náchylnost k infekci nijak nemění. Jeho role tedy zůstává nejasná (Shilts et al., 2021). Vedle CD147 byl v nedávné době zkoumán neuropilin-1 (NRP1), který pravděpodobně usnadňuje vstup viru do buněk. Je totiž schopen vázat substráty štěpené furinem a jeho blokace snižuje virovou infekci v buněčné kultuře. Znalosti o roli NRP1 při infekci SARS-CoV-2 jsou však stále omezené a daná problematika vyžaduje další výzkum (Cantuti-Castelvetri et al., 2020; Daly et al., 2020).

Pro vstup SARS-CoV-2 do buněk je kromě receptoru potřeba i proteolytického štěpení S proteinu, na čemž se podílí některé proteázy. Při aktivaci S proteinu byla například potvrzena důležitost transmembránové serinové proteázy 2 (TMPRSS2), která je hojně vylučována s ACE2 v několika tkáních. Kromě ní závisí aktivace S proteinu i na cysteinových proteázách katepsinu B a L a potenciálně i furinu (viz kapitola 1.1.2) (Hoffmann et al., 2020; Wrobel et al., 2020).

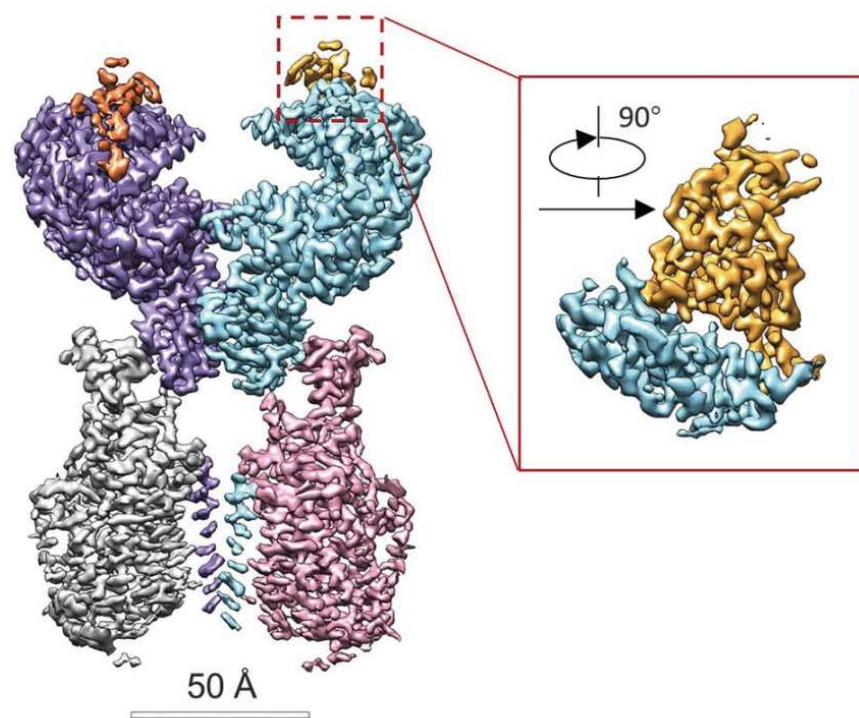
Poté, co se S protein SARS-CoV-2 naváže na ACE2, nastává receptorem zprostředkovaná endocytóza. Vytvoří se endozom, odkud se působením katepsinu B nebo L aktivuje S protein SARS-CoV-2. Tím se usnadní membránová fúze a uvolnění virové +ssRNA z endozomu. Alternativně může dojít k proteolytickému štěpení S proteinu proteázou TMPRSS2 na povrchu hostitelské buňky, což může vyvolat přímou fúzi membrány a uvolnění virové +ssRNA do cytoplazmy (Hoffmann et al., 2020; Mahmoud et al., 2020).

## 1.2 Buněčné receptory ACE2 a DPP4

Struktura a vlastnosti buněčných receptorů jsou důležitými faktory, které ovlivňují spektrum hostitelů a patogenitu SARS-CoV-2 (Cui et al., 2019; Gao a Zhang, 2020).

Transmembránový protein ACE2 je zodpovědný za štěpení angiotenzinu II na angiotenzin 1-7, čímž snižuje krevní tlak v těle. Působí tak proti účinku konvertujícího angiotenzinu (Gheblawi et al., 2020). Kromě toho bylo prokázáno, že ACE2 slouží jako vstupní receptor virů SARS-CoV, HCoV-NL63 a SARS-CoV-2 (Li et al., 2003; Hofmann et al., 2005; Zhang et al., 2020a). ACE2 se nachází na buňkách srdce, tepen, plic, ledvin a střev. Jedná se přitom o vysoce konzervovaný receptor mezi živočichy, zejména mezi savci, což může předurčovat rozsáhlé spektrum potenciálních hostitelů SARS-CoV-2 (Fu et al., 2020).

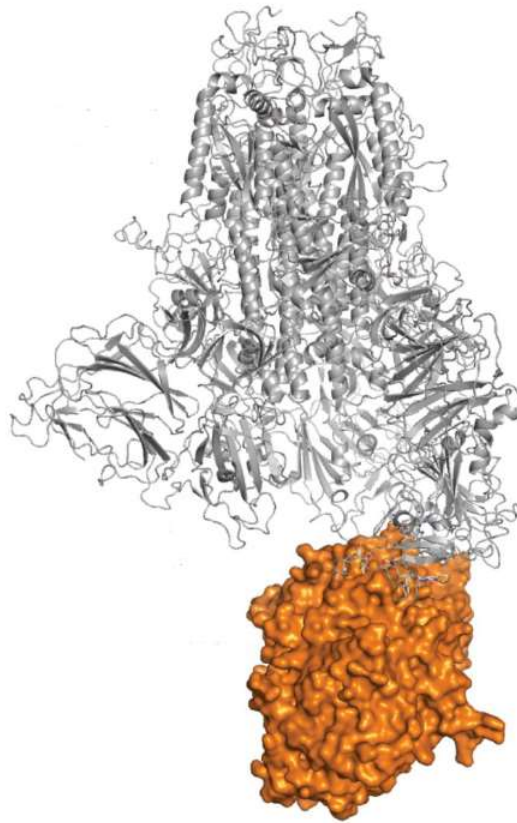
Strukturně je ACE2 homodimer tvořící komplex s transmembránovým přenašečem aminokyselin B0AT1 (Gheblawi et al., 2020). RBD SARS-CoV-2 je rozeznávána peptidázovou doménou ACE2 především pomocí polárních reziduí (Obr. 5) (Yan et al., 2020).



**Obr. 5:** Struktura komplexu RBD-ACE2-B0AT1 (PDB ID: 6M1D). Protomery RBD jsou vyznačeny oranžově a žlutě, ACE2 fialově a modře a B0AT1 růžově a bíle. Převzato z Yan et al. (2020).

DPP4 (též CD26) je transmembránový glykoprotein, který tvoří nedílnou součást metabolismu glukózy a regulace imunitního systému. Štěpením aminoterminálních peptidů totiž sehrává důležitou roli při aktivaci T-lymfocytů. DPP4 je exprimována mnoha endotelními a epitelními tkáněmi. Podobně jako u ACE2 se jedná například o tkáň ledvin, jater, plic a střev (Klemann et al., 2016). Strukturně je DPP4 homodimer.

Při propuknutí epidemie způsobené MERS-CoV se zjistilo, že DPP4 slouží jako funkční receptor umožňující vstup MERS-CoV do buněk (Raj et al., 2013). Molekulární interakce S proteinu SARS-CoV-2 s lidským DPP4 (Obr. 6) ukazuje, že i přes rozdílnou RBD má SARS-CoV-2 podobnou interakci s DPP4 jako MERS-CoV. SARS-CoV-2 totiž na rozdíl od SARS-CoV sdílí s MERS-CoV klíčové aminokyseliny, které mu umožňují potenciální vazbu na DPP4 (Li et al., 2020; Vankadari a Wilce, 2020) . Jedná se především o podstatnou inzerci E484 a další přilehlé mutace. Klíčová rezidua DPP4 účastnící se vazby na S protein SARS-CoV-2 jsou vysoce konzervována u mnoha druhů savců (Li et al., 2020).



**Obr. 6:** Predikovaná interakce mezi S proteinem SARS-CoV-2 (bíle) a DPP4 (oranžově). *Upraveno podle Vankadari a Wilce (2020).*



## 2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Má hypotéza je založena na tom, že riziko infekce SARS-CoV-2 u savců a spektrum možných hostitelů lze částečně předurčit na základě srovnání strukturních vlastností a fylogenetických vztahů receptorů ACE2 a DPP4 u různých druhů savců.

Hlavní cíle této práce:

- Srovnat aminokyselinové pozice důležité pro vazbu ACE2 a DPP4 na S protein SARS-CoV-2 mezi jednotlivými sekvencemi savců za účelem predikce možného mezidruhového přenosu.
- Rekonstruovat fylogenetický strom receptorů ACE2 a DPP4 savců.
- Predikovat terciární proteinovou strukturu receptorů ACE2 a DPP4 u savců, srovnat terciární struktury vytvořených modelů a vytvořit jejich dendrogram.
- Srovnat fylogenetický strom s dendrogramem terciárních proteinových struktur za účelem srovnání rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu a identifikace živočichů, u nichž je významně odlišná terciární struktura receptoru od fylogenetického stromu na základě DNA.

## 3 METODIKA

### 3.1 Vyhledávání sekvencí v databázi

K vyhledání nukleotidových sekvencí jsem použil veřejně dostupnou databázi GenBank (Benson et al., 2013) spravovanou Národním centrem pro biotechnologické informace (NCBI). Americká Genbank je společně s databází European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database (EMBL-Bank) (Leinonen et al., 2011) a japonskou DNA Data Bank of Japan (DDBJ) (Mashima et al., 2016) součástí mezinárodního konsorcia (International Nucleotide Sequence Database Collaboration). V rámci této spolupráce si jmenované databáze denně vyměňují veškeré změny v datech, aby zajistili, že bude po celém světě k dispozici jednotná a úplná sbírka sekvenčních dat (Benson et al., 2013).

Nevýhodou těchto databází je, že kvůli velkému objemu procházejících dat musejí být nutně nemonitorované. To znamená, že do nich může přispívat kdokoli, pokud splní minimální kladené požadavky (např. strojově čitelný formát sekvencí), a správce databáze vložená sekvenční data nekontroluje (Cvrčková, 2006). Z toho důvodu je důležité zhodnotit jejich kvalitu před další manipulací.

Prostřednictvím webového uživatelského rozhraní (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) jsem si v databázi GenBank vyhledal všechny dostupné nukleotidové sekvence mRNA genů ACE2 a DPP4 u savců. Kódující sekvence jsem následně stáhl ve formátu FASTA (Obr. 7), což je rozšířený textový formát pro zápis nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí.

```
>NM_021804.3 Homo sapiens
ATGTCAAGCTCTTCCTGGCTCCTTCTCAGCCTTGTTGCTGTAAGTCTGCTCAGTCCACCA
TTGAGGAACAGGCCAAGACATTTTGGACAAGTTTAACCACGAAGCCGAAGACCTGTTCTA
TCAAAGTTCACTTGCTTCTTGGAATTATAACACCAATATTACTGAAGAGA...
```

Obr. 7: Příklad zápisu nukleotidové sekvence ve formátu FASTA.

### 3.2 Mnohočetné přiřazení sekvencí

Mnohočetné přiřazení sekvencí (multiple sequence alignment) patří mezi nejčastěji využívané nástroje v oblasti bioinformatiky. Používá se pro posouzení podobnosti tří a více homologních nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí. Sekvence v něm jsou zapsané tak, aby se na sobě odpovídajících pozicích vyskytovaly, je-li to možné, stejné nebo podobné aminokyseliny. Na základě mnohočetného přiřazení můžeme poté posuzovat funkční význam konkrétních pozic nebo testovat hypotézy o jejich evoluční minulosti (Cvrčková, 2006).

K translaci nukleotidových sekvencí a sestavení mnohočetného přiřazení sekvencí jsem použil webový server TranslatorX (<http://translatorx.co.uk/>) (Abascal et al., 2010). Běžné mnohočetné přiřazení sekvencí srovnává podobnost sekvencí na úrovni nukleotidů. Nukleotidové sekvence kódující proteiny se však vyvíjejí jako kodony a sekvenční podobnost se snižuje rychleji na úrovni nukleotidů než na úrovni aminokyselin. Z toho důvodu jsou pro nukleotidové sekvence

kódující proteiny přesnější mnohočetná přiřazení, která jsou založená na aminokyselinových translacích, čehož využívá TranslatorX. Do vstupních dat jsem vložil list vybraných nukleotidových sekvencí ACE2 a DPP4 ve formátu FASTA. Jako preferovanou metodu výpočtu serveru jsem určil MAFFT (Katoh a Standley, 2013) a použití univerzálního genetického kódu.

Organizaci a analýzu sekvenčních dat jsem provedl v softwaru Geneious Prime 2020.0.4 (Kearse et al., 2012). Kvalitativní zhodnocení sekvencí jsem prováděl na základě jejich původu, posouzení jejich délky s délkou ostatních sekvencí, podobnosti se sekvencemi stejného druhu živočicha a srovnání jejich struktury s umístěním exonů referenčních sekvencí člověka (Gene ID: 1803 u DPP4 a 59272 u ACE2). Nevyhovující sekvence jsem odstranil.

Vytvořená nukleotidová a aminokyselinová mnohočetná přiřazení jsem pomocí softwaru Geneious zkrátil na základě sekvence templátů používaných při predikci trojrozměrných struktur proteinů. Experimentální metody většinou neumožňují sestavit strukturu celé délky receptorů, a proto jsem zkrátil nukleotidové a aminokyselinové sekvence pouze na extracelulární část templátů. Strukturu použitých templátů s PDB ID 6M17 u ACE2 a s PDB ID 2G5TA u DPP4 jsem si stáhl z RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) a zobrazil v softwaru UGENE 36.0.

### **3.3 Predikce možného mezidruhového přenosu**

Z vytvořeného mnohočetného přiřazení aminokyselinových sekvencí ACE2 jsem pro další analýzu extrahoval pozice aminokyselin, u kterých bylo prokázáno, že jejich substituce ovlivňují vazbu S proteinu SARS-CoV-2 na lidský ACE2. Konkrétně jsem se zabýval 36 pozicemi ACE2, u jejichž substitucí byl předurčen vliv na zvýšení vazebné afinity receptoru k S proteinu SARS-CoV-2 (I21V, I21T, E23K, Q24T, A25V, A25T, K26R, K26E, T27A, T27Y, L29F, K31Y, N33D, H34A, E37K, L39R, F40D, Y41R, Q42L, T55A, N64K, W69V, F72Y, E75K, E75G, Q76T, L79T, Q89P, N90Q, L91P, T92I, T92Q, Q102P, T324P, Q325P, N330Y, L351F, H378R, A386L, P389D, R393A a R518G) (Chan et al., 2020; Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021), a 26 pozicemi ACE2, u jejichž substitucí byl předurčen vliv na snížení vazebné afinity receptoru k S proteinu SARS-CoV-2 (I21V, E23K, K26R, K26E, T27A, K31R, N33I, H34R, E35K, E37K, D38V, S43R, Y50F, N51S, N51D, N58H, M62V, K68E, F72V, M82I, Y83F, Y83H, G326E, E329G, G352V, D355N, Q388L, R393A a D509Y) (Hussain et al., 2020; Chan et al., 2020; Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021).

Z vytvořeného mnohočetného přiřazení aminokyselinových sekvencí DPP4 jsem pro další analýzu extrahoval 11 pozic aminokyselin, u nichž bylo predikováno, že se účastní vazby na S protein SARS-CoV-2 (K267, Q286, I287, T288, L294, I295, R317, R336, N338, V341 a Q344) (Vankadari a Wilce, 2020; Li et al., 2020).

Živočichy jsem následně seřadil podle substitucí daných pozic vůči člověku, abych předurčil možnost mezidruhové infekce (Cho a Son, 2019). Čím je počet substitucí vůči člověku nižší, tím je možné větší riziko přenosu infekce z člověka na daného živočicha.

### 3.4 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza se zabývá rekonstrukcí vztahů podobnosti mezi jednotlivými sekvencemi. Zvláštní pozornost se přitom věnuje rekonstrukci fylogenetických stromů. Fylogenetickou analýzu jsem prováděl prostřednictvím IQ-TREE v1.6.12, který provádí analýzy na základě statistické metody maximální věrohodnosti na webovém serveru <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/> (Trifinopoulos et al., 2016).

Do vstupních dat jsem nahrál upravené mnohočetné přiřazení nukleotidových sekvencí ACE2 a DPP4 ve formátu FASTA. Dalším důležitým krokem byl výběr substitučního modelu, který určuje, s jakou frekvencí je na konkrétních pozicích v mnohočetném přiřazení možný výskyt substitucí. IQ-TREE nabízí možnost vyhledání nejvhodnějšího substitučního modelu implementovaným nástrojem ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Při sestavování fylogenetického stromu je rovněž důležité zhodnocení jeho důvěryhodnosti. K tomu se nejběžněji používá vzorkovací metoda bootstrapping (Hoang et al., 2018), která testuje odolnost jednotlivých větví vůči mírné změně vstupních dat (Cvrčková, 2006). Celkově jsem zvolil vygenerování 1 000 mnohočetných přiřazení sekvencí s pozměněnými vstupními daty. U dalších parametrů analýzy jsem nechal výchozí hodnoty. Vytvořený fylogenetický strom ve formátu NEWICK (Obr. 8) jsem si poté zobrazil v programu FigTree v1.4.4.

```
...(XM_016942979_1_Pan_troglodytes:0.0004826701,XM_008974180_2_Pan_paniscus:0.0004826928)96.5/100:0.0019375462)0/87:0.0000023641,XM_019019204_1_Gorilla_gorilla_gorilla_XM_019019204.1_Gorilla_gorilla_gorilla:0.0058378571)99.9/100:0.0058563719,(NM_001131132_2_Pongo_abelii:0.0014472631,XM_024240245_1_Pongo_abelii:0.0000022273)99.6/100:0.0053289656)85.8/100:0.0010053324, ...
```

**Obr. 8:** Příklad zápisu části fylogenetického stromu ve formátu NEWICK, který zaznamenává délku jednotlivých sekvencí a vzájemné propojení uzlů.

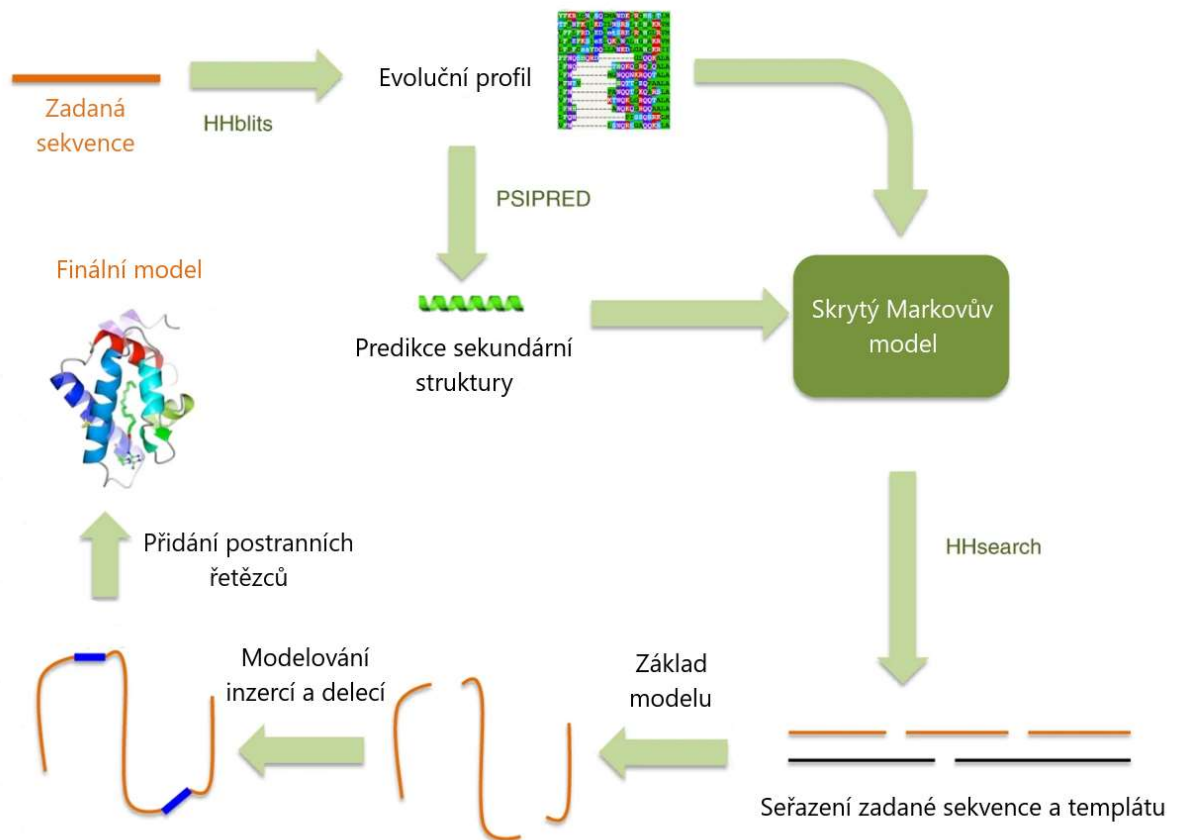
### 3.5 Homologní modelování

Predikce trojrozměrné struktury proteinů představuje na poli bioinformatiky dlouholetý a velmi složitý problém, který dosud není zcela vyřešen. Dříve se předpokládalo, že primární struktura proteinů bezvýhradně určuje jejich trojrozměrnou strukturu. Dnes je ale známo, že při sestavování funkční struktury hrají roli i specifické podmínky v buňce a její typ. Přesto lze však předpokládat, že proteiny o podobné sekvenci budou mít sklon zaujímat podobné prostorové uspořádání. Moderní metody využívají tohoto předpokladu a předpovídají trojrozměrnou strukturu proteinu na základě experimentálně zjištěné struktury proteinu s podobnou sekvencí (tzv. homologní modelování) (Cvrčková, 2006).

Pro homologní modelování proteinů jsem si vybral webový server Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>), který je charakteristický uživatelskou přívětivostí, dostupností pro širokou veřejnost a poměrně vysokou přesností v porovnání s ostatními veřejně přístupnými servery a programy (Kelley et al., 2015).

Phyre2 modeluje proteiny ve dvou módech, módu Normal a módu Intensive. Normal mód se od Intensive módu odlišuje v tom, že k sestavení modelů používá pouze jeden nalezený templát, který je zvolen na základě jeho sekvenční podobnosti se zadanou sekvencí a vypočítané pravděpodobnosti, že se jedná o homologní protein zadané sekvence. Intensive mód se používá pro sekvence, u nichž je krytí nejpodobnějšího templátu se zadanou sekvencí nízké a u nichž je z toho důvodu potřeba více různých templátů k namodelování celé délky sekvence (Kelley et al., 2015). Během modelování jsem využíval mód Normal, aby byly templáty identické u všech modelovaných sekvencí.

Normal mód pracuje v několika fázích (Obr. 9). Nejdříve dochází pomocí metody HHblits (Remmert et al., 2012) k určení evolučního profilu zadané sekvence. Evoluční profil zachycuje preferenci aminokyselinových zbytků v každé poloze. Evoluční profily jsou následně využity metodou PSIPRED (Jones, 1999) k predikci sekundární struktury sekvence. Evoluční profily jsou poté společně s predikovanými sekundárními strukturami konvertovány do skrytého Markovova modelu. Vytvořený skrytý Markovův model je skenován metodou HHsearch (Söding, 2005) proti databázi modelů proteinů o známé struktuře k určení nejpodobnějšího templátu. Nalezený templát tvoří základ, podle kterého je zadaný protein namodelován. Případné delece a inserce jsou modelovány použitím knihovny krátkých aminokyselinových úseků. Posledním krokem homologního modelování Phyre2 je přidání postranních řetězců aminokyselin (Kelley et al., 2015). Výstupním formátem Phyre2 jsou PDB modely.



**Obr. 9:** Schematické znázornění algoritmických fází Normal módu Phyre2. *Upraveno podle Kelley et al. (2015).*

### 3.6 Srovnání struktur modelů

Ke srovnání predikovaných terciárních struktur proteinů a tvorbě jejich dendrogramů jsem použil program DaliLite.v5 (Holm, 2020), který porovnává struktury proteinů na základě matice vzdáleností. K výpočtu matice vzdáleností aminokyselinových zbytků používá metoda DALI trojrozměrné karteziánské souřadnice  $C\alpha$  atomů každého proteinu. Kromě toho vypočítává i skóre strukturní podobnosti mezi jednotlivými strukturami (Z-score) (Holm et al., 2006).

DaliLite nabízí různé možnosti práce s trojrozměrnými strukturami. Já jsem využil způsob all-against-all, který srovnává všechny struktury mezi sebou. Před nahráním jednotlivých souborů s modely je ale nutné upravit názvy těchto souborů na lišící se pětimístné kódy s vyznačeným hlavním řetězcem (A). Zároveň je programem vyžadován seznam obsahující pětimístné kódy souborů s odpovídajícími původními názvy sekvencí (Obr. 10). Tuto úpravu jsem provedl pomocí programovacího jazyka R 4.0.4 ve vývojovém prostředí RStudio 1.3.1093.

```
A100A AB046569_1_Homo_sapiens
A101A AB193259_1_Homo_sapiens
A102A AB193260_1_Homo_sapiens
A103A AB208708_1_Mustela_putorius_furo
A104A AB211997_1_Felis_catus
A105A AB211998_1_Procyon_lotor
A106A AB297479_1_Rhinolophus_ferrumequinum
...
```

Obr. 10: Ukázka seznamu modelů ACE2 potřebného pro spuštění all-against-all srovnání modelů v DaliLite.

V linuxovém prostředí jsem následně pomocí for cyklu v jazyce BASH importoval všechny PDB soubory modelů do podsložek ACE2 a DPP4 složky DaliLite.v5 (Obr. 11). Importované soubory modelů se převedly do programem čitelného formátu DAT.

```
# import souborů modelů ACE2
for ((a = 100 ; $a-409 ; a = $a+1)); do ./bin/import.pl --pdbfile "ACE2/A"$a$.pdb" --pdbid "A"$a
--dat ACE2 --clean; done

# import souborů modelů DPP4
for ((a = 100 ; $a-335 ; a = $a+1)); do ./bin/import.pl --pdbfile "DPP4/D"$a$.pdb" --pdbid "D"$a
--dat DPP4 --clean; done
```

Obr. 11: Příkazy pro import souborů modelů ACE2 a DPP4 do programu DaliLite.

Do složky DaliLite.v5 jsem přemístil textové soubory se seznamy modelů (ACE2\_seznam.txt, DPP4\_seznam.txt) a následně jsem pomocí příkazů (Obr. 12) spustil all-against-all srovnání všech modelů uvedených v jednotlivých seznamech.

```
# příkaz pro spuštění all-against-all srovnání modelů ACE2
./bin/dali.pl --matrix --query ACE2_seznam.txt --dat1 ACE2 --clean

# příkaz pro spuštění all-against-all srovnání modelů DPP4
./bin/dali.pl --matrix --query DPP4_seznam.txt --dat1 DPP4 --clean
```

**Obr. 12:** Příkazy pro spuštění all-against-all srovnání modelů ACE2 a DPP4.

Z výstupních dat programu jsem se zabýval dendrogramem terciárních struktur modelů ve formátu NEWICK a teplotní mapou ve formátu HTML, která znázorňuje vzájemnou podobnost modelů. Strukturní dendrogramy jsem si zobrazil v programu FigTree v1.4.4 a teplotní mapy jsem si vizualizoval prostřednictvím Pythonu 3.8.8 s nainstalovanou knihovnou plotly 4.14.3.

### 3.7 Srovnání rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu

Srovnání rychlosti evoluce DNA a struktury proteinu jsem provedl prostřednictvím modifikované metody ParaFit (Legendre et al., 2002), což je běžně používaný test k prokázání koevoluce mezi parazity a jejich hostiteli. K nalezení rozdílů v rychlosti evoluce jsem stanovil alternativní nulovou hypotézu, která zní, že sekvence DNA daného živočicha ve fylogenetickém stromu a jeho terciární struktura v dendrogramu není v asociaci.

Pro srovnání jsem použil metodu ParaFit, která je součástí balíčku ape v5.4-1 (Paradis a Schliep, 2019), a pro úpravu fylogenetických stromů jsem použil funkce balíčku phytools v0.7-70 (Revell, 2012). Do prostředí RStudio 1.3.1093 jsem poté načtl tabulku asociací, fylogenetický strom ve formátu NEXUS a dendrogram terciárních struktur modelů ve formátu NEXUS. V předem vytvořené tabulce asociací jsou zaznamenány jednotlivé asociace mezi nukleotidovou sekvencí ve fylogenetickém stromu a jejím příslušným modelem v dendrogramu terciárních struktur modelů. Asociace jsou v tabulce na jednotlivých řádcích oddělené tabulátory.

Z fylogenetického stromu a dendrogramu terciárních struktur modelů byly vypočítány matice vzdáleností a z tabulky asociací byla vypočítána matice hlavních souřadnic. ParaFit zkombinuje všechny tyto matice do jedné čtvercové matice. U jednotlivých asociací následně srovnává hodnoty na jejich hlavní diagonále a vypočítává jejich  $p$ -hodnotu. Vzhledem k mé modifikované nulové hypotéze jsem  $p$ -hodnotu  $p$  upravil pomocí rovnice (1) tak, aby detekovala  $p$ -hodnoty  $p'$  na opačnou stranu než při výchozím testu.

$$p' = 1 - p \quad (1)$$

Na základě vypočítané  $p$ -hodnoty  $p'$  jsem určil pravděpodobnost, zda dané dva prvky jsou, nebo nejsou v asociaci. Je-li  $p$ -hodnota  $p' < 0,05$ , dané prvky nejsou v asociaci a je podpořena modifikovaná nulová hypotéza. Je-li vypočítaná  $p$ -hodnota  $p' > 0,05$ , dané prvky jsou v asociaci a modifikovaná nulová hypotéza je zamítnuta (Obr. 13).

```

#načtení balíčků ape v5.4-1 a phytools v0.7-70
library(ape)
require(phytools)

#načtení dat
aso = read.table("data/asociace.txt", sep="\t", header=F)
fylo = read.nexus(file = "data/phylogen.nex")
mod = read.nexus(file = "data/modely.nex")
mod=collapse.singles(mod)

if(!dir.exists("results")) dir.create("results")

#výpočet matice hlavních souřadnic
aso2 = table(aso)
attributes(aso2)$class <- "matrix"

#výpočet matice vzdáleností z fylogenetického stromu a dendrogramu terciárních struktur modelů
fylo.D = cophenetic.phylo(fylo)
mod.D = cophenetic.phylo(mod)

#spuštění funkce ParaFit a uložení výsledků
aso.parafit = parafit(host.D = fylo.D, para.D = mod.D, HP = aso2, test.links = T, correction = "cailliez")
restab = cbind(aso, aso.parafit$link.table)
write.table(restab,file = "results/aso_parafit_table.txt", sep = "\t")
capture.output(aso.parafit, file = "results/aso.parafit")

```

**Obr. 13:** Skript pro spuštění funkce ParaFit a zapsání výsledků.



## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Sekvence a jejich mnohočetné přiřazení

Po vyhledání sekvencí v databázi GenBank a jejich kvalitativním zhodnocení jsem k dalšímu výzkumu využil celkem 220 nukleotidových mRNA sekvencí receptoru ACE2 a 192 nukleotidových mRNA sekvencí receptoru DPP4. U ACE2 a DPP4 byly zkoumány sekvence příslušící savcům z řádu ptakořitní (Monotremata), kunovci (Dasyuromorphia), vačice (Didelphimorphia), málozubí (Diprotodontia), chudozubí (Xenarthra), tany (Scandentia), zajíci (Lagomorpha), hlodavci (Rodentia), primáti (Primates), hmyzožravci (Eulipotyphla), luskouni (Pholidota), šelmy (Carnivora), lichokopytníci (Perissodactyla), sudokopytníci (Cetartiodactyla) a letouni (Chiroptera). U ACE2 byl navíc zkoumán slon africký (*Loxodonta africana*) z řádu chobotnatci (Proboscidea) a u DPP4 byly zkoumány i sekvence příslušící savcům z řádu letuchy (Dermoptera), bércouni (Macroscelidea), hrabáči (Tubulidentata) a afrosoricidi (Afrosoricida). Konkrétní druhy savců a přístupová identifikační čísla sekvencí jsou zaznamenány v Příloze 1 a 2.

Upravené mnohočetné přiřazení nukleotidových sekvencí ACE2 mělo celkovou délku 2 178 bp. Párová identita nukleotidových sekvencí činila 86,8 %. Mezi sekvencemi bylo 29,9 % nevariabilních pozic. Upravené mnohočetné přiřazení aminokyselinových sekvencí ACE2 mělo celkovou délku 726 aminokyselinových reziduí. Párová identita aminokyselinových sekvencí činila 83,1 % a bylo mezi nimi 29,2 % identických pozic.

Upravené mnohočetné přiřazení nukleotidových sekvencí DPP4 mělo celkovou délku 2 253 bp. Párová identita nukleotidových sekvencí činila 88,5 %. Mezi sekvencemi bylo 32,8 % nevariabilních pozic. Upravené mnohočetné přiřazení aminokyselinových sekvencí DPP4 mělo celkovou délku 751 aminokyselinových reziduí. Párová identita aminokyselinových sekvencí činila 86,3 % a bylo mezi nimi 32,0 % identických pozic.

### 4.2 Srovnání aminokyselinových pozic

#### 4.2.1 Srovnání aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících vazebnou afinitu

Srovnání 36 aminokyselinových pozic ACE2, u jejichž substitucí byl předurčen vliv na zvýšení vazebné afinity k S proteinu SARS-CoV-2, ukázalo, že vůči člověku mají sekvence hmyzožravce (Eulipotyphla) 18 substitucí, sekvence kunovce (Dasyuromorphia) 17 substitucí, sekvence málozubých (Diprotodontia) 16-15 substitucí, sekvence letounů (Chiroptera) 16-10 substitucí, sekvence ptakořitných (Monotremata) 15 substitucí, sekvence chobotnatce (Proboscidea) 13 substitucí, sekvence šelem (Carnivora) 13-6 substitucí, sekvence vačice (Didelphimorphia) 12 substitucí, sekvence tan (Didelphimorphia) 11-10 substitucí, sekvence hlodavců (Rodentia) 11-3 substitute, sekvence chudozubých (Xenarthra) 10 substitucí, sekvence sudokopytníků (Cetartiodactyla) 10-5 substitucí, sekvence primátů (Primates) 10-0 substitucí, sekvence lichokopytníků (Perissodactyla) 7 substitucí, sekvence luskounů (Pholidota) 7 substitucí a sekvence zajíců (Lagomorpha) 6-4 substitucí.

Z šelem vykazovala nejmenší variabilitu čeleď kočkovití (Felidae), která má vůči člověku pouze 7-6 substitucí. U posuzovaných aminokyselinových pozic ostatních šelem bylo identifikováno 13-10 substitucí. U sekvencí hlodavců byl nejmenší počet substitucí vůči člověku (4-3 substituce) identifikován u sekvencí čeledi rypošovití (Bathyergidae), osmákovitých (Octodontidae) a některých sekvencí křečkovitých hlodavců (Cricetidae). Hlodavci z podčeledi pravé myši (Murinae) naopak vykazovaly vysokou variabilitu v posuzovaných aminokyselinových pozicích, tj. 10-8 substitucí. Z 55 sekvencí primátů (Primates) mělo 48 sekvencí úzkonosých opic (Catarrhini) 1-0 substitucí vůči člověku. Ploskonosé opice (Platyrrhini, Ceboidea) měly vůči člověku 4-3 substituce. Zbývající sekvence komby ušaté (*Otolemur garnettii*), nártouna filipínského (*Carlito syrichta*) a sifaky Coquerelova (*Propithecus coquereli*) měly popořadě 10, 7 a 5 substitucí.

Pomocí srovnání konkrétních aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících vazebnou afinitu k S proteinu SARS-CoV-2 jsem navíc identifikoval mutaci K26R, která by mohla zvyšovat náchylnost k infekci gibona stříbrného (*Hylobates moloch*) a gibona bělolícího (*Nomascus leucogenys*). Mutace T27A a H378R některých makaků rhesus (*Macaca mulatta*) by také mohly zvyšovat jejich náchylnost k infekci. Srovnání konkrétních aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících vazebnou afinitu k S proteinu SARS-CoV-2 a součet substitucí u konkrétních sekvencí je zaznamenán v Příloze 3.

#### **4.2.2 Srovnání aminokyselinových pozic ACE2 snižujících vazebnou afinitu**

Srovnání 26 aminokyselinových pozic ACE2, u jejichž substitucí byl předurčen vliv na snížení vazebné afinity k S proteinu SARS-CoV-2, ukázalo, že vůči člověku mají sekvence letounů (Chiroptera) 10-5 substitucí, sekvence chudozubých (Xenarthra) 9 substitucí, sekvence hmyzožravců (Eulipotyphla) 9 substitucí, sekvence kunovce (Dasyuromorphia) 9 substitucí, sekvence chobotnatce (Proboscidea) 8 substitucí, sekvence ptakořitných (Monotremata) 8 substitucí, sekvence málozubých (Diprotodontia) 8 substitucí, sekvence šelem (Carnivora) 8-3 substitucí, sekvence hlodavců (Rodentia) 8-2 substituce, sekvence lichokopytníků (Perissodactyla) 6 substitucí, sekvence tan (Scandentia) 6 substitucí, sekvence sudokopytníků (Cetartiodactyla) 6-4 substitucí, sekvence primátů (Primates) 6-0 substitucí, sekvence luskounů (Pholidota) 5 substitucí, sekvence vačice (Didelphimorphia) 5 substitucí a sekvence zajíců (Lagomorpha) 4-2 substituce.

Z šelem vykazovala nejmenší variabilitu čeleď kočkovití (Felidae), která má vůči člověku pouze 3 substituce. U posuzovaných aminokyselinových sekvencí ostatních šelem bylo identifikováno 8-5 substitucí. U sekvencí hlodavců byl nejmenší počet substitucí vůči člověku (2-3) identifikován u některých sekvencí čeledi tarbíković (Dipodidae), rodu hraboš (*Microtus*) a některých sekvencí křečkovitých zástupců hlodavců (Cricetidae). Z 55 sekvencí primátů (Primates) mělo 48 sekvencí úzkonosých opic (Catarrhini) 1-0 substitucí vůči člověku. Ploskonosé opice (Platyrrhini, Ceboidea) měly vůči člověku 2 substituce. Zbývající sekvence komby ušaté (*Otolemur garnettii*), nártouna filipínského (*Carlito syrichta*) a sifaky Coquerelova (*Propithecus coquereli*) měly popořadě 6, 6 a 2 substituce.

Pomocí srovnání konkrétních aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících vazebnou afinitu k S proteinu SARS-CoV-2 jsem navíc identifikoval mutaci T27A. Ta by mohla snižovat vazebnou afinitu k sekvenci makaka rhesus (*Macaca mulatta*) s přístupovým kódem MT663960.1. Srovnání konkrétních aminokyselinových pozic ACE2 snižujících vazebnou afinitu k S proteinu SARS-CoV-2 a součet substitucí u konkrétních sekvencí je zaznamenán v Příloze 4.

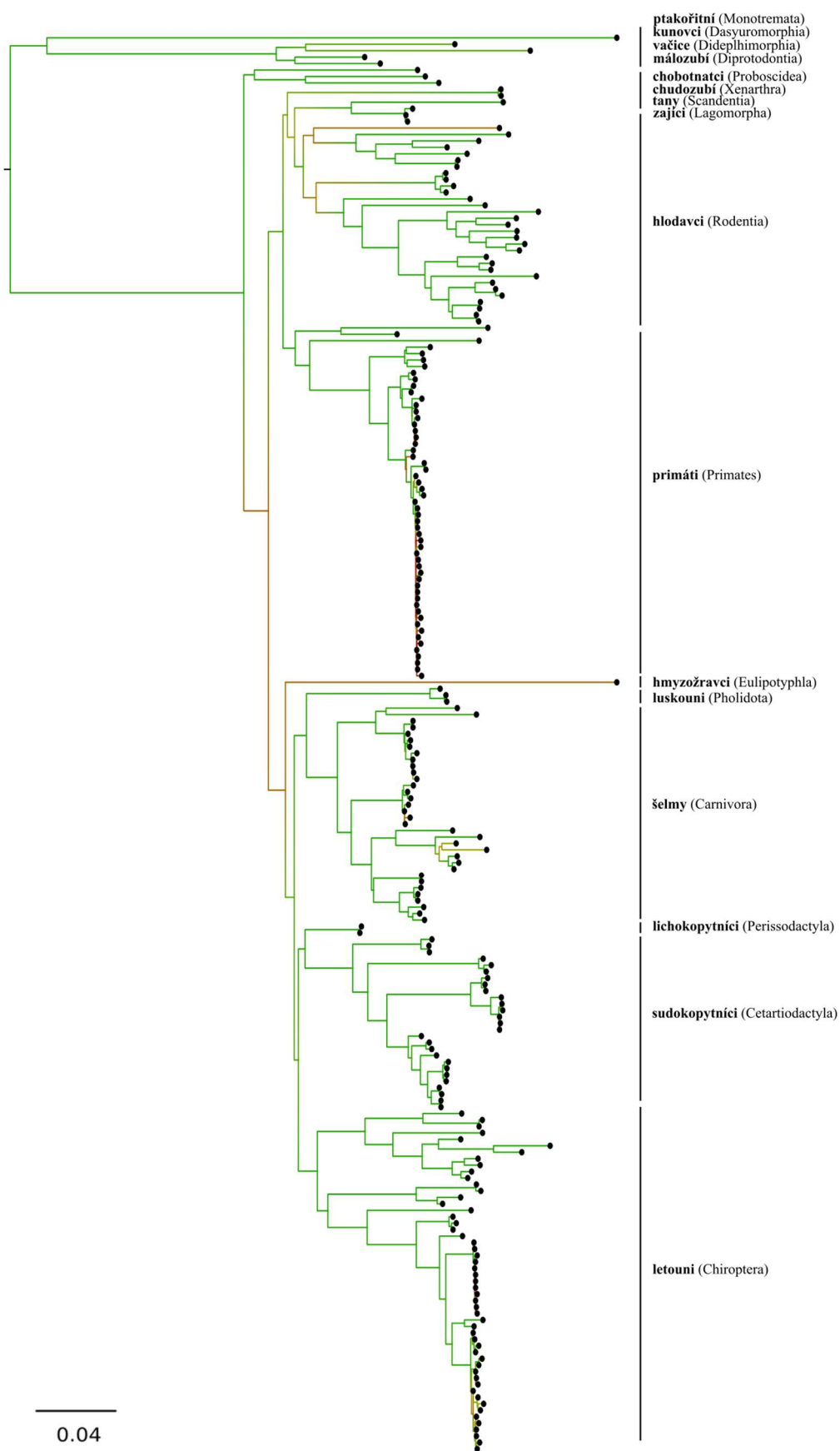
#### 4.2.3 Srovnání aminokyselinových pozic DPP4 účastnících se vazby

Srovnání 11 aminokyselinových pozic DPP4, u kterých byla předurčena účast na vazbě na S protein SARS-CoV-2, ukázalo, že vůči člověku mají sekvence šelem (Carnivora) 8-6 substitucí, sekvence ptakořitných (Monotremata) 7 substitucí, sekvence hlodavců (Rodentia) 7-4 substitucí, sekvence chudozubého (Xenarthra) 6 substitucí, sekvence afrosoricida (Afrosoricida) 4 substituce, sekvence vačice (Didelphimorphia) 4 substituce, sekvence sudokopytníků (Cetartiodactyla) 4-2 substituce, sekvence letounů (Chiroptera) 4-0 substitucí, sekvence tan (Scandentia) 3 substituce, sekvence luskounů (Pholidota) 3 substituce, sekvence bérkouna (Macroscelidea) 2 substituce, sekvence hmyzožravce (Eulipotyphla) 2 substituce, sekvence zajíců (Lagomorpha) 2-1 substitucí, sekvence kunovce (Dasyuromorphia) 2 substituce, sekvence hrabáče (Tubulidentata) 1 substitucí, sekvence letuchy (Dermoptera) 1 substitucí, sekvence lichokopytníků (Perissodactyla) 1 substitucí, sekvence málozubých (Diprotodontia) 1 substitucí a sekvence primátů (Primates) 1-0 substitucí.

Z šelem vykazuje nejmenší variabilitu čeledě kočkovití (Felidae) a medvědovití (Ursidae), které mají 6 variabilních pozic. U sekvencí hlodavců (Rodentia) byl nejmenší počet substitucí vůči člověku (4 substituce) identifikován u sekvencí čeledi veverkovití (Sciuridae), bobrovití (Castoridae), slepcovití (Spalacidae), podčeledi křečci praví (Cricetinae), u pískomila mongolského (*Meriones unguiculatus*), kuru dlouhoocasé (*Grammomys surdaster*) a krysy malé (*Mastomys coucha*). Z letounů mají se 4-3 substitucemi nejvariabilnější pozice kaloni (Megachiroptera). Netopýři (Microchiroptera) mají vůči člověku sekvence s 3-0 substitucemi, přičemž 0 substitucí má netopýr hnědý (*Eptesicus fuscus*). Srovnání konkrétních aminokyselinových pozic DPP4 účastnících se na vazbě k S proteinu SARS-CoV-2 a součet substitucí u konkrétních sekvencí je zaznamenán v Příloze 5.

#### 4.3 Fylogenetické stromy

Rekonstruované fylogenetické stromy mnohočetného přiřazení nukleotidových sekvencí ACE2 a DPP4 byly sestaveny podle substitučního modelu GTR+G6. Vytvořené fylogenetické stromy nevykazují žádné větší odchylky a přibližně odpovídají známé fylogenezi savců (Obr. 14 a 15).



**Obr. 14:** Fylogenetický strom sekvencí ACE2. Jednotlivé větve jsou barevně odlišeny podle procentuální podpory bootstrapu – červeně (0% podpora) až zeleně (100% podpora). *Fylogeneze určena podle IQ-TREE v1.6.12. Zobrazeno ve FigTree v1.4.4.*



**Obr. 15:** Fylogenetický strom sekvencí DPP4. Jednotlivé větve jsou barevně odlišeny podle procentuální podpory bootstrapu – červeně (0% podpora) až zeleně (100% podpora). Fylogeneze určena podle IQ-TREE v1.6.12. Zobrazeno ve FigTree v1.4.4.

#### 4.4 Homologní modelování

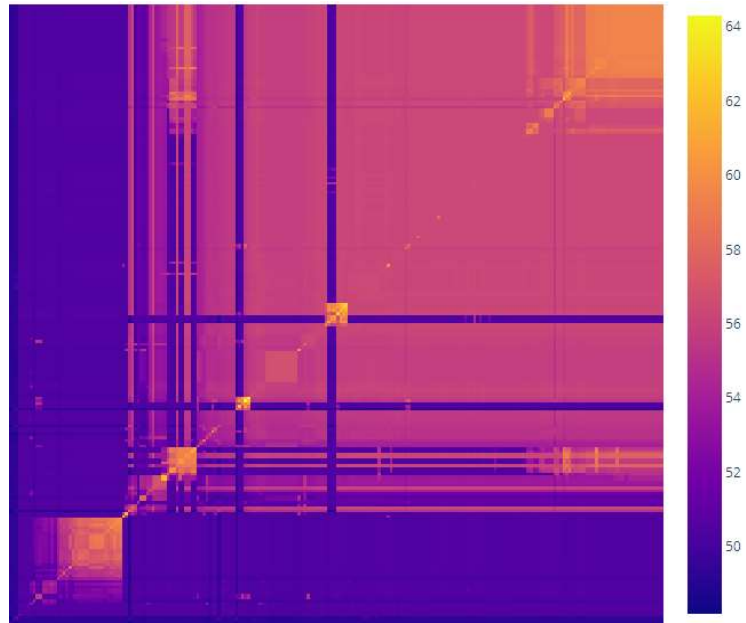
Všechny upravené aminokyselinové sekvence ACE2 byly namodelovány podle řetězce B templátu PDB ID: 6M1D. Pravděpodobnost, že zadaná sekvence je homologní s templátem, byla u všech aminokyselinových sekvencí 100 %. Podobnost sekvencí s templátem se vzhledem k jejich podobnosti v mnohočetném přiřazení sekvencí pohybovala mezi 70-100 %.

Všechny upravené aminokyselinové sekvence DPP4 byly namodelovány podle řetězce A templátu PDB ID: 2G5T. Pravděpodobnost, že zadaná sekvence je homologní s templátem, byla u všech aminokyselinových sekvencí 100 %. Podobnost sekvencí s templátem se vzhledem k jejich podobnosti v mnohočetném přiřazení sekvencí pohybovala mezi 72-100 %.

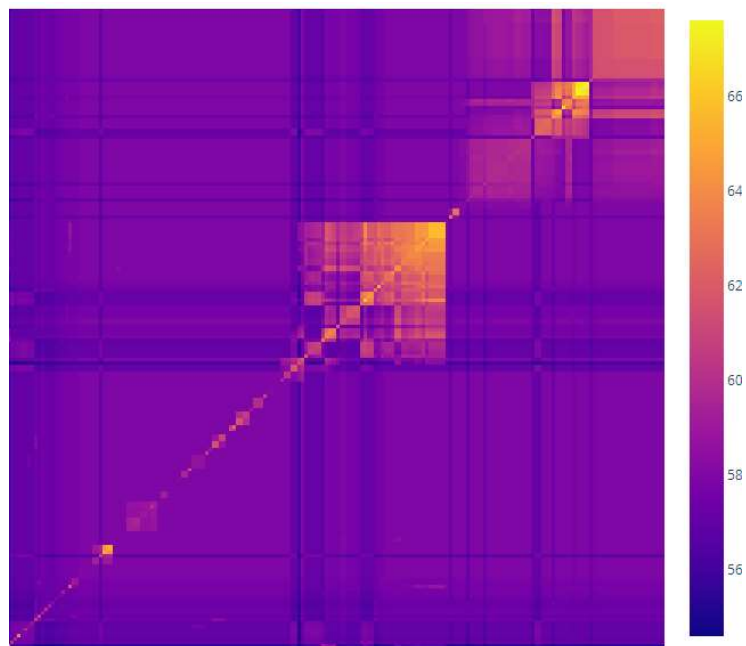
#### 4.5 Srovnání struktur modelů

Na teplotních mapách vytvořených programem DaliLite.v5 je znázorněna podobnost terciární struktury mezi jednotlivými modely ACE2 a DPP4. Vyšší podobnost terciárních struktur ACE2 byla zaznamenána mezi modely vrápence čínského (*Rhinolophus sinicus*), mezi modely hraboše preriového (*Microtus ochrogaster*), vrápence čínského (*Rhinolophus sinicus*) a lachtana medvědího (*Callorhinus ursinus*), mezi modely mirikiny loretské (*Aotus nancymae*), tarbika egyptského (*Jaculus jaculus*) a rypoše damarského (*Fukomys damarensis*) a mezi modely některých primátů (Primates) a křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*) (Obr. 16). Vyšší podobnost terciárních struktur u DPP4 byla zaznamenána mezi modely sudokopytníků (Cetartiodactyla), mezi modely některých netopýrů (Microchiroptera) a mezi modely vydry severoamerické (*Lontra canadensis*), pištuchy piky (*Ochotona princeps*) a pandy velké (Ailuropoda melanoleuca) (Obr. 17). Interaktivní HTML teplotní mapy jsou zahrnuty v Příloze 6.

V dendrogramu terciárních struktur ACE2 jsou k terciární struktuře modelu člověka vzhledem ke znalostem o náchylnosti SARS-CoV-2 savců významně podobnější například terciární struktury modelů čeledi kočkovití (Felidae), křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*), fretky domácí (*Mustela putorius furo*) a lasice hranostaj (*Mustela erminea*). Zajímavá je i rozdílnost terciárních struktur ACE2 makaků rhesus (*Macaca mulatta*). V dendrogramu DPP4 jsou k terciární struktuře modelu člověka vzhledem k znalostem o náchylnosti SARS-CoV-2 u savců významně podobné například terciární struktury modelů čeledi kočkovití (Felidae), fretky domácí (*Mustela putorius furo*) a lasice hranostaj (*Mustela erminea*). Vytvořené dendrogramy terciárních struktur modelů jsou zahrnuty v Příloze 7.



**Obr. 16:** Teplotní mapa podobnosti modelů ACE2. Zobrazeno v HTML pomocí knihovny plotly 4.14.3 implementované v Pythonu 3.8.8.



**Obr. 17:** Teplotní mapa podobnosti modelů DPP4. Zobrazeno v HTML pomocí knihovny plotly 4.14.3 implementované v Pythonu 3.8.8.

## 4.6 Srovnání evoluce DNA a struktury proteinu

Prostřednictvím modifikované metody ParaFit byly srovnávány rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu a na základě  $p'$ -hodnoty určení živočichové, u nichž je fylogeneticky významně odlišná struktura receptoru, která může ovlivnit jejich náchylnost k infekci SARS-CoV-2. U ACE2 se jedná o mývala severního (AB211998.1\_Procyon\_lotor), lamu alpaku (XM\_006212647.3\_Vicugna\_pacos), člověka (AB046569.1\_Homo\_sapiens) a kočku domácí (AB211997.1\_Felis\_catus) (Tab. 1 a Obr. 18). Znázornění významných asociací mezi fylogenetickým stromem a dendrogramem terciárních struktur modelů ACE2 je dostupné v plném rozlišení v Příloze 8.

**Tab. 1:** Významné  $p'$ -hodnoty živočichů u ACE2.

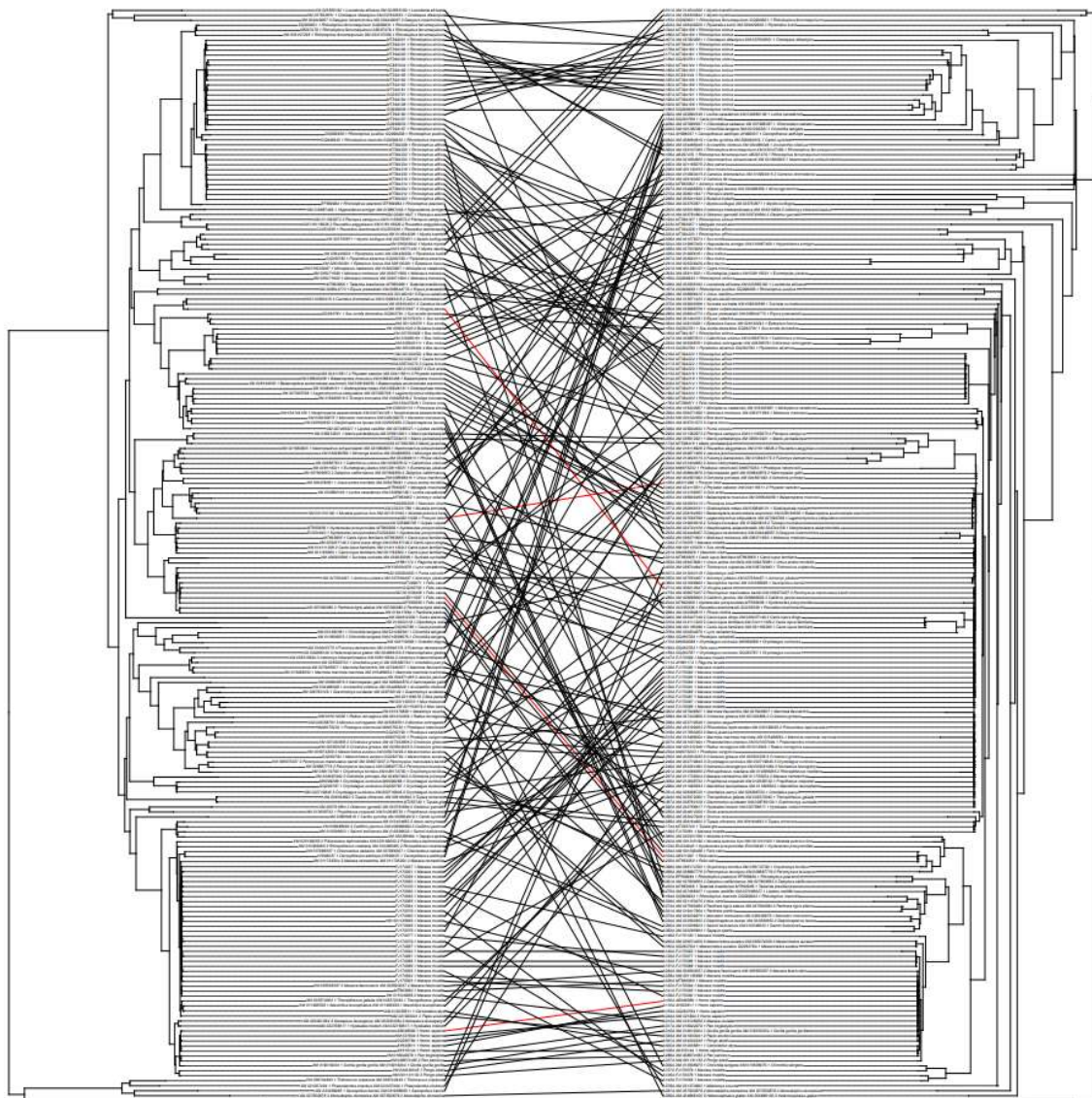
Sekvence	$p'$ -hodnota
AB211998.1 Procyon lotor	0,020
XM_006212647.3 Vicugna pacos	0,034
AB046569.1 Homo sapiens	0,037
AB211997.1 Felis catus	0,047

U DPP4 se jedná o 5 letounů (Chiroptera), 5 primátů (Primates), 2 šelmy z čeledi kočkovití (Felidae), 2 luskouny (Pholidota), 2 hlodavce (Rodentia) a 2 kytovce (Cetacea) (Tab. 2 a Obr. 19). Znázornění významných asociací mezi fylogenetickým stromem a dendrogramem terciárních struktur modelů ACE2 je dostupné v plném rozlišení v Příloze 8.

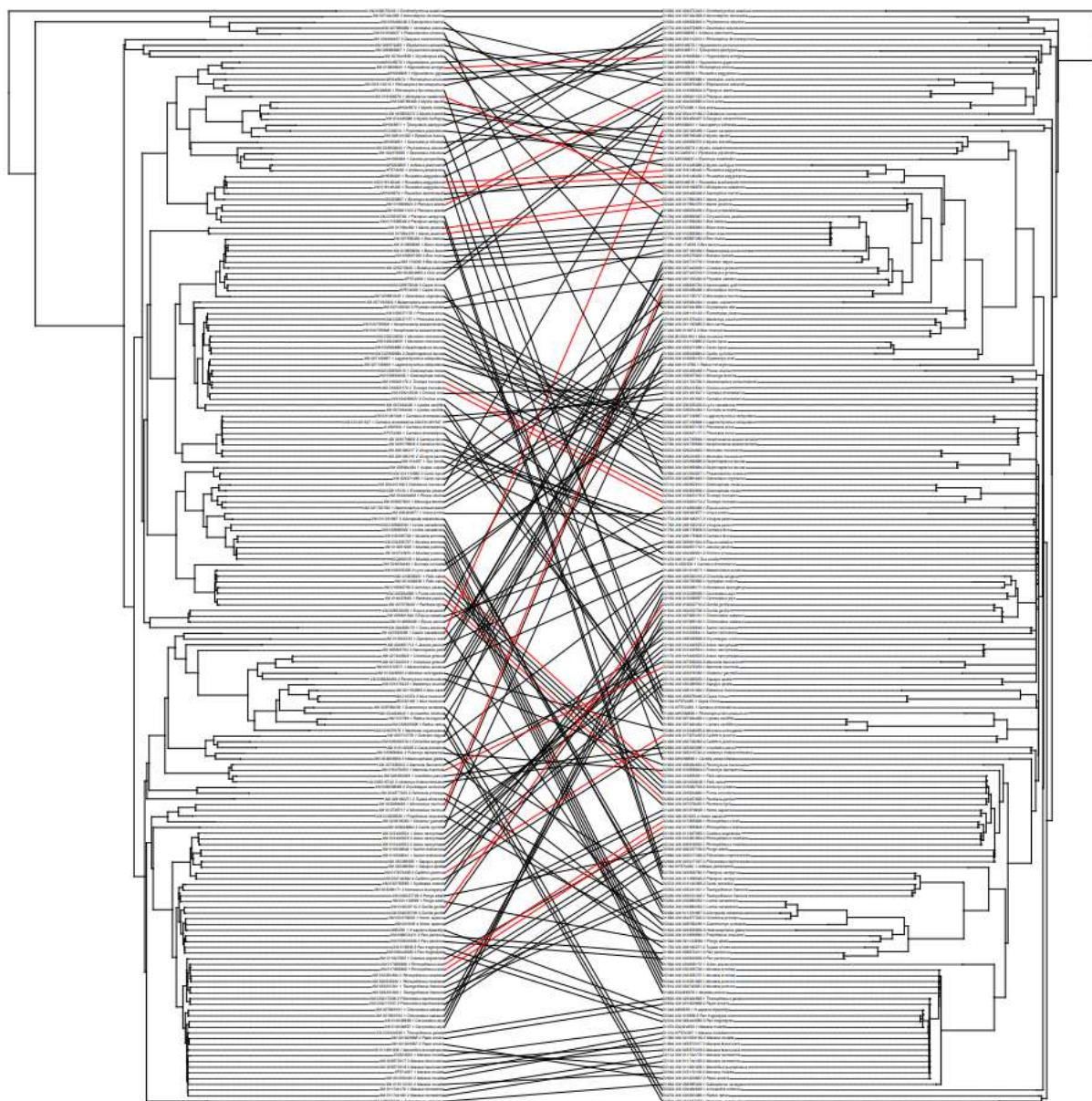
**Tab. 2:** Významné  $p'$ -hodnoty živočichů u DPP4.

Sekvence	$p'$ -hodnota
XM_015479253.1 Marmota marmota	0,001
XM_016196976.1 Miniopterus natalensis	0,001
XM_017855806.1 Rhinopithecus bieti	0,001
XM_017973435.2 Callithrix jacchus	0,001
XM_019457695.1 Panthera pardus	0,001
XM_019636841.1 Hipposideros armiger	0,001
XM_019835951.1 Felis catus	0,001
XM_015596624.2 Pteropus alecto	0,001
XM_017664383.1 Manis javanica	0,001
XM_017855805.1 Rhinopithecus bieti	0,001
XM_019022710.2 Gorilla gorilla gorilla	0,001
XM_016146439.1 Rousettus aegyptiacus	0,002
XM_016146440.1 Rousettus aegyptiacus	0,002
XM_017664375_1 Manis javanica	0,002
XM_020180286.1 Castor canadensis	0,002
XM_020288496.1 Microcebus murinus	0,007
XM_019923175.2 Tursiops truncatus	0,010
XM_019923174.2 Tursiops truncatus	0,017





**Obr. 18:** Znáznornění významných asociací (červeně) mezi fylogenetickým stromem (vlevo) a dendrogramem terciárních struktur modelů (vpravo) ACE2. Sestaveno pomocí metody ParaFit.



**Obr. 19:** Znáznornění významných asociací (červeně) mezi fylogenetickým stromem (vlevo) a dendrogramem terciárních struktur modelů (vpravo) DPP4. Sestaveno pomocí metody ParaFit.

## 5 DISKUSE

Tropismus koronavirů je závislý na schopnosti S proteinu vázat se na buněčné receptory hostitele (Zhou et al., 2020b). Predikci rizika infekce a spektra hostitelů SARS-CoV-2 u savců jsem proto prováděl pomocí srovnávání strukturních vlastností a fylogenetických vztahů savčích sekvencí receptorů ACE2 a DPP4, které usnadňují vstup SARS-CoV-2 do buněk. ACE2 je přitom považovaný za primární receptor (Scialo et al., 2020), zatímco DPP4 pravděpodobně slouží spíše jako koreceptor, který může do určité míry ovlivnit průběh infekce (Solerte et al., 2020). V rámci výzkumu jsem srovnával strukturní podobnosti receptorů různých živočichů, což je hojně využívaná metoda k predikci rizika mezidruhové infekce (Cho a Son, 2019; Damas et al., 2020). U upravených aminokyselinové sekvencí ACE2 a DPP4 savců jsem srovnával aminokyselinová rezidua, jejichž substituce mohou zvyšovat nebo snižovat vazebnou afinitu receptorů k S proteinu SARS-CoV-2 u člověka (Chan et al., 2020; Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021). Tato rezidua byla určena pomocí různých metod – *in vitro* pomocí vytvoření mutantních variant ACE2 (Chan et al., 2020) a *in silico* na základě molekulárního dockingu (Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021). U DPP4 jsem posuzoval substituce aminokyselinových reziduí, u nichž je prokázána interakce s S proteinem SARS-CoV-2 (Li et al., 2020; Vankadari a Wilce, 2020). Srovnáním evoluce sekvence DNA a trojrozměrné struktury proteinu jsem určil živočichy, u nichž docházelo k rozdílné rychlosti evoluce sekvence DNA a struktury proteinu, což může mít souvislost s předchozím selekčním tlakem. Takové sekvence mohou i přes fylogenetickou příbuznost k sekvencím ostatních živočichů vykazovat odlišnosti při vazbě na S protein SARS-CoV-2.

Náchylnost jednotlivých zvířat byla v předchozích studiích určována především pomocí experimentálních infekcí několika druhů domácích, laboratorních a divokých zvířat a jejich modelů (Munster et al., 2020; Shi et al., 2020; Schlottau et al., 2020; Sia et al., 2020; Woolsey et al., 2021). Rovněž byla používána simulace interakcí mezi klíčovými rezidui S proteinu a receptoru ACE2 vybrané skupiny živočichů (Luan et al., 2020). Damas et al. (2020) určovali spektrum hostitelů a jejich náchylnost k infekci na základě konzervačních vlastností 25 aminokyselinových reziduí ACE2 u obratlovců. Živočichy následně rozdělili do pěti rizikových kategorií od nejohroženějších po nejméně ohrožené podle předpokládané vazebné afinity. Součástí jejich studie bylo i určení náznaků zrychlené evoluce kódujících sekvencí ACE2 napříč celou třídou savců (Mammalia), zejména napříč letouny (Chiroptera).

Na rozdíl od předchozích studií zahrnuji do analýzy i koreceptor DPP4, který může potenciálně rozšiřovat spektrum hostitelů (Solerte et al., 2020). Zaměřuji se pouze na sekvence savců, v jejichž třídě jsou zaznamenány a popsány případy infekce. Používám také více sekvencí jednoho druhu savců, na jejichž základě jsem schopen odhadovat variabilní vnitrodruhovou náchylnost k infekci. Riziko infekce navíc potvrzuji vzdáleností terciárních struktur v dendrogramu terciárních struktur modelů.

Mnozí zástupci z řádu primátů (Primates), zejména z ploskonosých opic (Catarrhini) byli na základě předešlých výzkumů označeni za nejrizikovější skupinu (Damas et al., 2020; Munster et al., 2020; Woolsey et al., 2021). Vzhledem k vysoké strukturální podobnosti a sdíleným vazebným reziduí jejich receptorů s lidskými receptory ACE2 a DPP4 výsledky mé práce podporují zvýšenou náchylnost těchto živočichů. V analýze jsem používal sekvence ACE2 makaka rhesus (*Macaca mulatta*) (FJ170076-FJ170101), u kterého byla předtím zkoumána rozdílná náchylnost kvůli variabilní sekvenci ACE2 (Chen et al., 2008). V rámci svých výsledků jsem zaznamenal rozdílnou vzdálenost trojrozměrných struktur modelů ACE2 u makaků rhesus (Příloha 7) a identifikoval dvě mutace ovlivňující vazbu na S protein SARS-CoV-2 (T27A a H378R), což by stejně jako u SARS-CoV mohlo znamenat variabilní vnitrodruhovou náchylnost makaků k SARS-CoV-2. Důvod identifikace stejné mutace T27A u aminokyselinových pozic ACE2 zvyšujících a snižujících vazebnou afinitu je rozdílnost ve výsledcích jednotlivých článků (Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021). Rozdíly v náchylnosti k infekci SARS-CoV-2 kvůli aminokyselinovým substitucím ACE2 byly určeny a predikovány i u lidí (Chan et al., 2020; Rehman a Tabish, 2020; Stawiski et al., 2020; Calcagnile et al., 2021).

U šelem (Carnivora) byly zaznamenány symptomatické infekce u kočkovitých šelem - kočky domácí (*Felis catus*), tygrů (*Panthera tigris*) a lvů (*Panthera leo*) (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Shi et al., 2020; Zhang et al., 2020b), což signalizuje určitou míru náchylnosti kočkovitých šelem k infekci. Případy přirozené či experimentální infekce psa domácího (*Canis lupus familiaris*) potvrzují přítomnost protilátek v organismu, ale průběh infekce virem je u nich většinou asymptomatický (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Bosco-Lauth et al., 2020; Shi et al., 2020; Sit et al., 2020). Psovité šelmy (Canidae) většinou vykazovaly při porovnávání struktury a vazebných reziduí ACE2 a DPP4 oproti kočkovitým šelmám větší vzdálenost a vyšší variabilitu (Příloha 3, 4, 5 a 7), což může znamenat, že jejich receptory se nevážou tak účinně k S proteinu SARS-CoV-2. U fretek domácích (*Mustela putorius furo*) a norků amerických (*Neovison vison*) byla zjištěna mírná náchylnost k infekci a v některých státech Evropy byly dokonce zaznamenány případy reverzní zoonózy a masivního vnitrodruhového šíření těchto šelem (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Kim et al., 2020; Oreshkova et al., 2020; Hammer et al., 2021; Munnink et al., 2021). Předchozí studie přitom hodnotily jejich vazebnou afinitu S proteinu SARS-CoV-2 k receptoru ACE2 jako nízkou (Damas et al., 2020). Lasicovité šelmy sice vykazovaly poměrně vysokou variabilitu ve srovnání vazebných reziduí (Příloha 3, 4, 5), jejich terciární struktura ACE2 a DPP4 však byla v dendrogramu terciárních struktur modelů (Příloha 7) evolučně velice blízká lidským strukturám receptorů ACE2 a DPP4, což může ovlivňovat vazebnou afinitu.

Letouni (Chiroptera) jsou označováni jako potenciální rezervoár virů, z nichž se vyvinul SARS-CoV-2 (Andersen et al., 2020; Lau et al., 2020). Náchylnost letounů k SARS-CoV-2 byla experimentálně testována u kaloňů egyptských (*Rousettus aegyptiacus*), kteří vykazovali minimální klinické příznaky a vysoký potenciál v šíření viru mezi jednotlivci (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Schlottau et al., 2020). Letouni se tak projevují jako přirozený rezervoár viru. Výsledky studie Damas et al. (2020) a mé výsledky ukazují, že letouni mají vysoce variabilní vazebná rezidua ACE2. Nedávné výzkumy ukazují, že u letounů je různá náchylnost

k SARS-CoV-2 a receptory ACE2 některých z nich ani nejsou schopny uskutečnit vazbu na S protein SARS-CoV-2 (Yan et al., 2021). Variabilita vazebných reziduí DPP4 je zato u jednotlivých druhů letounů různá a nemusí být tolik variabilní vůči člověku (Příloha 5).

Jako možní hostitelé byli na začátku pandemie navrhováni luskouni (Pholidota) (Zhang et al., 2020c). Kvůli projevovaným symptomům při infekci virem podobnými SARS-CoV-2 je však nelze považovat za přirozený rezervoár SARS-CoV-2 (Liu et al., 2019; Lam et al., 2020). Předchozí studie určila u luskounů pouze nízké skóre vazebné afinity mezi ACE2 a S proteinem SARS-CoV-2 (Damas et al., 2020). U zkoumaných receptorů luskounů jsem rovněž nenašel žádnou bližší podobnost s lidskými receptory, a proto lze vzhledem k omezeným informacím o infekcích luskounů SARS-CoV-2 jen stěží určit jejich náchylnost.

Riziko infekce hlodavců (Rodentia) se napříč celým řádem liší. Experimentální infekce potvrzují náchylnost křečků zlatých (*Cricetulus griseus*) (Sia et al., 2020), zatímco náchylnost divokého typu myši je jen velmi omezená (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Dinnon et al., 2020; Damas et al., 2020). Mé výsledky potvrzují zvýšenou náchylnost křečkovitých hlodavců (Cricetidae). Křečkovití hlodavci jsou ve struktuře ACE2 většinou velmi blízké k primátům (Příloha 3, 4 a 7), zatímco například zástupci podčeledi pravé myši (Murinae) jsou velmi vzdálené a občas se svou terciární strukturou blíží spíše letounům (Příloha 7). Vazebná aminokyselinová rezidua a trojrozměrná struktura DPP4 hlodavců jsou od primátů poměrně variabilní (Příloha 5). U SARS-CoV byla u některých hlodavců zjištěna snížená náchylnost k infekci SARS-CoV kvůli mutacím v oblasti vazby na ACE2. Po změně histidinu 353 a úpravě glykosylačního místa ACE2 potkanů však byl převeden ACE2 potkanů na funkční receptor (Li et al., 2005). Podčeď pravé myši (Murinae) rovněž obsahuje z řádu hlodavců ojedinělé mutace (Příloha 3 a 4), které by mohly vést ke snížené vazebné afinitě k SARS-CoV-2. Jejich význam ale musí být dále zkoumán.

Experimentální infekce byly provedeny pouze u omezeného počtu sudokopytníků (Cetartiodactyla) a ukazují, že prasata domácí (*Sus scrofa domestica*) a tur domácí (*Bos taurus*) nemohly být infikovány SARS-CoV-2 (Abdel-Moneim a Abdelwhab, 2020; Schlottau et al., 2020; Ulrich et al., 2020). Mé výsledky ukazují, že vazebná rezidua ACE2 a DPP4 jsou mezi jednotlivými druhy sudokopytníků různě variabilní a jejich terciární struktura je i v rámci dendrogramu terciárních struktur modelů různě vzdálená (Příloha 3, 4, 5 a 7), což může signalizovat rozdílnou náchylnost živočichů z řádu sudokopytníků. Ta ale musí být potvrzena dalšími experimentálními infekcemi.

U ostatních živočichů nejsou známy provedené experimentální infekce a jejich náchylnost můžeme určovat pouze na základě variability vazebných reziduí ACE2 a DPP4 a prostřednictvím vzdálenosti jejich trojrozměrných struktur receptorů od lidských receptorů ACE2 a DPP4 (Příloha 3, 4, 5 a 7).

U ACE2 byla identifikována zrychlená evoluce u struktur mývala severního (*Procyon lotor*), lamy alpaky (*Vicugna pacos*), člověka (*Homo sapiens*) a kočky domácí (*Felis catus*) (Tab. 1 a Obr. 18), což může naznačovat, že receptory těchto variant mohly být v minulosti pod selekčním tlakem a mohou tak nyní vykazovat odlišnou reakci při infekci SARS-CoV-2.

U DPP4 se jedná o struktury několika letounů, primátů, luskounů, kočkovitých šelem, hlodavců a kytovců (Tab. 2 a Obr. 19). Ačkoliv jsou kytovci vodní živočichové a kontakt s koronaviry se u nich zdá být nepravděpodobný, byly u nich identifikované gamakoronaviry, které by mohly způsobovat potenciální selekční tlak (Woo et al., 2014; Nabi a Khan, 2020).

Přestože je struktura ACE2 a jeho vazebná afinita k S proteinu SARS-CoV-2 důležitým faktorem pro mezidruhový přenos infekce SARS-CoV-2, riziko infekce závisí i na mnoha dalších faktorech. Skutečné riziko infekce a rozsah hostitelů SARS-CoV-2 u savců záleží i na množství exprese ACE2 (Sun et al., 2020) a DPP4 v jednotlivých tkání, sociální struktuře a imunitě jednotlivých druhů zvířat. V budoucích studiích je možné se zabývat právě těmito faktory a upřesnit tak riziko infekce SARS-CoV-2 u savců.

## 6 ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo predikovat riziko infekce SARS-CoV-2 u savců na základě vazebné afinity receptoru ACE2 a koreceptoru DPP4 k S proteinu SARS-CoV-2. Tohoto cíle se mi podařilo dosáhnout pomocí srovnávání aminokyselinových pozic ACE2 a DPP4, které mohou mít vliv na vazebnou afinitu k S proteinu SARS-CoV-2, a podpoření výsledků dendrogramem terciárních proteinových struktur. Zvýšené riziko infekce SARS-CoV-2 jsem stanovil u úzkonosých opic (Catarrhini) s tím, že jsem určil možnou variabilní vnitrodruhovou náchylnost k infekci mezi makaky rhesus (*Macaca mulatta*). Zvýšené riziko infekce SARS-CoV-2 navíc potvrzují i u určitých křečkovitých hlodavců (Cricetidae).

Dalším cílem mé práce bylo i určení zrychlené evoluce struktur ACE2 a DPP4 u savců, které by tak mohly mít odlišnou reakci při infekci SARS-CoV-2. Tohoto cíle jsem dosáhl pomocí srovnání fylogenetického stromu ACE2 a DPP4 s dendrogramem terciárních struktur modelů. Identifikoval jsem tak několik savců, u nichž je možné, že jejich receptory byly v minulosti pod selekčním tlakem.

Na základě výsledků mé práce, která byla provedena *in silico*, lze odhadovat riziko jednotlivých zvířat k infekci a rozsah potenciálních hostitelů SARS-CoV-2. V budoucích studiích je možné při určování rizika brát v potaz i další faktory ovlivňující riziko infekce SARS-CoV-2 (např.: množství exprese ACE2 a DPP4 v tkáních, sociální strukturu a imunitu jednotlivých živočichů).

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- ABASCAL, Federico, Rafael ZARDOYA a Maximilian J. TELFORD, 2010. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Research* [online]. **38**(2), W7–W13. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq291
- ABDEL-MONEIM, Ahmed S. a Elsayed M. ABDELWHAB, 2020. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts. *Pathogens* [online]. **9**(7), 529. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens9070529
- ANDERSEN, Kristian G., Andrew RAMBAUT, W. Ian LIPKIN, Edward C. HOLMES a Robert F. GARRY, 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* [online]. **26**(4), 450–452. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-020-0820-9
- BENSON, Dennis A., Mark CAVANAUGH, Karen CLARK, Ilene KARSCH-MIZRACHI, David J. LIPMAN, James OSTELL a Eric W. SAYERS, 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research* [online]. **41**(D1), D36–D42. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1195
- BOSCO-LAUTH, Angela M., Airn E. HARTWIG, Stephanie M. PORTER, Paul W. GORDY, Mary NEHRING, Alex D. BYAS, Sue VANDEWOUDE, Izabela K. RAGAN, Rachel M. MAISON a Richard A. BOWEN, 2020. Experimental infection of domestic dogs and cats with SARS-CoV-2: Pathogenesis, transmission, and response to reexposure in cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **117**(42), 26382–26388. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2013102117
- CALCAGNILE, Matteo, Patricia FORGEZ, Antonio IANNELLI, Cecilia BUCCI, Marco ALIFANO a Pietro ALIFANO, 2021. Molecular docking simulation reveals ACE2 polymorphisms that may increase the affinity of ACE2 with the SARS-CoV-2 Spike protein. *Biochimie* [online]. **180**, 143–148. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2020.11.004
- CANTUTI-CASTELVETRI, Ludovico, Ravi OJHA, Liliana D. PEDRO, Minou DJANNATIAN, Jonas FRANZ, Suvi KUIVANEN, Franziska van der MEER, Katri KALLIO, Tuğberk KAYA, Maria ANASTASINA, Teemu SMURA, Lev LEVANOV, Leonora SZIROVICZA, Allan TOBI, Hannimari KALLIO-KOKKO, Pamela ÖSTERLUND, Merja JOENSUU, Frédéric A. MEUNIER, Sarah J. BUTCHER, Martin Sebastian WINKLER, Brit MOLLENHAUER, Ari HELENIUS, Ozgun GOKCE, Tambat TEESALU, Jussi HEPOJOKI, Olli VAPALAHTI, Christine STADELMANN, Giuseppe BALISTRERI a Mikael SIMONS, 2020. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* [online]. **370**(6518), 856–860. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.abd2985



- CUI, Jie, Fang LI a Zheng-Li SHI, 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **17**(3), 181–192. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0118-9
- CVRČKOVÁ, Fatima, 2006. *Úvod do praktické bioinformatiky*. 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-1360-1.
- DALY, James L., Boris SIMONETTI, Katja KLEIN, Kai-En CHEN, Maia Kavanagh WILLIAMSON, Carlos ANTÓN-PLÁGARO, Deborah K. SHOEMARK, Lorena SIMÓN-GRACIA, Michael BAUER, Reka HOLLANDI, Urs F. GREBER, Peter HORVATH, Richard B. SESSIONS, Ari HELENIUS, Julian A. HISCOX, Tambat TEESALU, David A. MATTHEWS, Andrew D. DAVIDSON, Brett M. COLLINS, Peter J. CULLEN a Yohei YAMAUCHI, 2020. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* [online]. **370**(6518), 861–865. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.abd3072
- DAMAS, Joana, Graham M. HUGHES, Kathleen C. KEOUGH, Corrie A. PAINTER, Nicole S. PERSKY, Marco CORBO, Michael HILLER, Klaus-Peter KOEPFLI, Andreas R. PFENNING, Huabin ZHAO, Diane P. GENEREUX, Ross SWOFFORD, Katherine S. POLLARD, Oliver A. RYDER, Martin T. NWEI, Kerstin LINDBLAD-TOH, Emma C. TEELING, Elinor K. KARLSSON a Harris A. LEWIN, 2020. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **117**(36), 22311–22322. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2010146117
- DINNON, Kenneth H., Sarah R. LEIST, Alexandra SCHÄFER, Caitlin E. EDWARDS, David R. MARTINEZ, Stephanie A. MONTGOMERY, Ande WEST, Boyd L. YOUNT, Yixuan J. HOU, Lily E. ADAMS, Kendra L. GULLY, Ariane J. BROWN, Emily HUANG, Matthew D. BRYANT, Ingrid C. CHOONG, Jeffrey S. GLENN, Lisa E. GRALINSKI, Timothy P. SHEAHAN a Ralph S. BARIC, 2020. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature* [online]. **586**(7830), 560–566. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2708-8
- FU, Jiewen, Baixu ZHOU, Lianmei ZHANG, Kyathgowdanadoddi Srinivasa BALAJI, Chunli WEI, Xiaoyan LIU, Hanchun CHEN, Jiangzhou PENG a Junjiang FU, 2020. Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Molecular Biology Reports* [online]. 1–10. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-020-05478-4
- GAO, Shan a Leiliang ZHANG, 2020. ACE2 partially dictates the host range and tropism of SARS-CoV-2. *Computational and Structural Biotechnology Journal* [online]. **18**, 4040–4047. ISSN 2001-0370. Dostupné z: doi:10.1016/j.csbj.2020.11.032
- GHEBLAWI, Mahmoud, Kaiming WANG, Anissa VIVEIROS, Quynh NGUYEN, Jiu-Chang ZHONG, Anthony J. TURNER, Mohan K. RAIZADA, Maria B. GRANT a Gavin Y.

OUDIT, 2020. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circulation Research* [online]. **126**(10), 1456–1474. ISSN 1524-4571. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317015

GORBALENYA, Alexander E., Susan C. BAKER, Ralph S. BARIC, Raoul J. DE GROOT, Christian DROSTEN, Anastasia A. GULYAEVA, Bart L. HAAGMANS, Chris LAUBER, Andrey M. LEONTOVICH, Benjamin W. NEUMAN, Dmitry PENZAR, Stanley PERLMAN, Leo L. M. POON, Dmitry V. SAMBORSKIY, Igor A. SIDOROV, Isabel SOLA, John ZIEBUHR, a CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus : classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology* [online]. **5**(4), 536–544. ISSN 2058-5276. Dostupné z: doi:10.1038/s41564-020-0695-z

HAMMER, Anne Sofie, Michelle Lauge QUADE, Thomas Bruun RASMUSSEN, Jannik FONAGER, Morten RASMUSSEN, Karin MUNDBJERG, Louise LOHSE, Bertel STRANDBYGAARD, Charlotte Sværke JØRGENSEN, Alonzo ALFARO-NÚÑEZ, Maiken Worsøe ROSENSTIERNE, Anette BOKLUND, Tariq HALASA, Anders FOMSGAARD, Graham J. BELSHAM a Anette BØTNER, 2021. SARS-CoV-2 Transmission between Mink (Neovison vison) and Humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **27**(2), 547–551. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2702.203794

HINDSON, Jordan, 2020. COVID-19: faecal–oral transmission? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* [online]. **1**. ISSN 1759-5045. Dostupné z: doi:10.1038/s41575-020-0295-7

HOANG, Diep Thi, Olga CHERNOMOR, Arndt VON HAESELER, Bui Quang MINH a Le Sy VINH, 2018. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **35**(2), 518–522. ISSN 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msx281

HOFFMANN, Markus, Hannah KLEINE-WEBER, Simon SCHROEDER, Nadine KRÜGER, Tanja HERRLER, Sandra ERICHSEN, Tobias S. SCHIERGENS, Georg HERRLER, Nai-Huei WU, Andreas NITSCHKE, Marcel A. MÜLLER, Christian DROSTEN a Stefan PÖHLMANN, 2020. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* [online]. **181**(2), 271-280.e8. ISSN 0092-8674, 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.02.052

HOFMANN, Heike, Krzysztof PYRC, Lia van der HOEK, Martina GEIER, Ben BERKHOUT a Stefan PÖHLMANN, 2005. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **102**(22), 7988–7993. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0409465102

- HOLM, Liisa, 2020. DALI and the persistence of protein shape. *Protein Science* [online]. **29**(1), 128–140. ISSN 1469-896X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/pro.3749>
- HOLM, Liisa, Sakari KÄÄRIÄINEN, Chris WILTON a Dariusz PLEWCZYNSKI, 2006. Using Dali for Structural Comparison of Proteins. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]* [online]. **Chapter 5**, Unit 5.5. ISSN 0471250953. Dostupné z: doi:[10.1002/0471250953.bi0505s14](https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0505s14)
- HU, Ben, Hua GUO, Peng ZHOU a Zheng-Li SHI, 2020. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 1–14. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:[10.1038/s41579-020-00459-7](https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7)
- HU, Dan, Changqiang ZHU, Lele AI, Ting HE, Yi WANG, Fuqiang YE, Lu YANG, Chenxi DING, Xuhui ZHU, Ruicheng LV, Jin ZHU, Bachar HASSAN, Youjun FENG, Weilong TAN a Changjun WANG, 2018. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerging Microbes & Infections* [online]. **7**(1), 1–10. ISSN null. Dostupné z: doi:[10.1038/s41426-018-0155-5](https://doi.org/10.1038/s41426-018-0155-5)
- HUSSAIN, Mushtaq, Nusrat JABEEN, Fozia RAZA, Sanya SHABBIR, Ayesha A. BAIG, Anusha AMANULLAH a Basma AZIZ, 2020. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Medical Virology* [online]. **92**(9), 1580–1586. ISSN 1096-9071. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jmv.25832>
- CHAN, Kui K., Danielle DOROSKY, Preeti SHARMA, Shawn A. ABBASI, John M. DYE, David M. KRANZ, Andrew S. HERBERT a Erik PROCKO, 2020. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science* [online]. **369**(6508), 1261–1265. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:[10.1126/science.abc0870](https://doi.org/10.1126/science.abc0870)
- CHEN, Yunxin, Li LIU, Qiang WEI, Hua ZHU, Hong JIANG, Xinming TU, Chuan QIN a Zhiwei CHEN, 2008. Rhesus angiotensin converting enzyme 2 supports entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus in Chinese macaques. *Virology* [online]. **381**(1), 89–97. ISSN 0042-6822. Dostupné z: doi:[10.1016/j.virol.2008.08.016](https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.016)
- CHO, Myeongji a Hyeon Seok SON, 2019. Prediction of cross-species infection propensities of viruses with receptor similarity. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **73**, 71–80. ISSN 1567-1348. Dostupné z: doi:[10.1016/j.meegid.2019.04.016](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.016)
- JAIMES, Javier A., Nicole M. ANDRÉ, Joshua S. CHAPPIE, Jean K. MILLET a Gary R. WHITTAKER, 2020. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *Journal of Molecular Biology* [online]. **432**(10), 3309–3325. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jmb.2020.04.009](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.009)

- JONES, David T, 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices 11 Edited by G. Von Heijne. *Journal of Molecular Biology* [online]. **292**(2), 195–202. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1999.3091
- KALYAANAMOORTHY, Subha, Bui Quang MINH, Thomas K. F. WONG, Arndt VON HAESELER a Lars S. JERMIIN, 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* [online]. **14**(6), 587–589. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.4285
- KATOH, Kazutaka a Daron M. STANDLEY, 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **30**(4), 772–780. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/mst010
- KEARSE, Matthew, Richard MOIR, Amy WILSON, Steven STONES-HAVAS, Matthew CHEUNG, Shane STURROCK, Simon BUXTON, Alex COOPER, Sidney MARKOWITZ, Chris DURAN, Tobias THIERER, Bruce ASHTON, Peter MEINTJES a Alexei DRUMMOND, 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* [online]. **28**(12), 1647–1649. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- KELLEY, Lawrence A, Stefans MEZULIS, Christopher M YATES, Mark N WASS a Michael J E STERNBERG, 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* [online]. **10**(6), 845–858. ISSN 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2015.053
- KIM, Young-Il, Seong-Gyu KIM, Se-Mi KIM, Eun-Ha KIM, Su-Jin PARK, Kwang-Min YU, Jae-Hyung CHANG, Eun Ji KIM, Seunghun LEE, Mark Anthony B. CASEL, Jihye UM, Min-Suk SONG, Hye Won JEONG, Van Dam LAI, Yeonjae KIM, Bum Sik CHIN, Jun-Sun PARK, Ki-Hyun CHUNG, Suan-Sin FOO, Haryoung POO, In-Pil MO, Ok-Jun LEE, Richard J. WEBBY, Jae U. JUNG a Young Ki CHOI, 2020. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host & Microbe* [online]. **27**(5), 704-709.e2. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2020.03.023
- KLEMANN, C., L. WAGNER, M. STEPHAN a S. von HÖRSTEN, 2016. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clinical & Experimental Immunology* [online]. **185**(1), 1–21. ISSN 1365-2249. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/cei.12781
- LALCHHANDAMA, Kholhring, 2020. The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. *Science Vision* [online]. **20**, 78–92. Dostupné z: doi:10.33493/scivis.20.02.03
- LAM, Tommy Tsan-Yuk, Na JIA, Ya-Wei ZHANG, Marcus Ho-Hin SHUM, Jia-Fu JIANG, Hua-Chen ZHU, Yi-Gang TONG, Yong-Xia SHI, Xue-Bing NI, Yun-Shi LIAO, Wen-Juan LI, Bao-Gui JIANG, Wei WEI, Ting-Ting YUAN, Kui ZHENG, Xiao-Ming CUI, Jie LI,

Guang-Qian PEI, Xin QIANG, William Yiu-Man CHEUNG, Lian-Feng LI, Fang-Fang SUN, Si QIN, Ji-Cheng HUANG, Gabriel M. LEUNG, Edward C. HOLMES, Yan-Ling HU, Yi GUAN a Wu-Chun CAO, 2020. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* [online]. **583**(7815), 282–285. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2169-0

LAU, Susanna K. P., Hayes K. H. LUK, Antonio C. P. WONG, Kenneth S. M. LI, Longchao ZHU, Zirong HE, Joshua FUNG, Tony T. Y. CHAN, Kitty S. C. FUNG a Patrick C. Y. WOO, 2020. Possible Bat Origin of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **26**(7), 1542–1547. ISSN 1080-6059. Dostupné z: doi:10.3201/eid2607.200092

LEGENDRE, Pierre, Yves DESDEVISES a Eric BAZIN, 2002. A Statistical Test for Host–Parasite Coevolution. *Systematic Biology* [online]. **51**(2), 217–234. ISSN 1063-5157. Dostupné z: doi:10.1080/10635150252899734

LEINONEN, Rasko, Ruth AKHTAR, Ewan BIRNEY, Lawrence BOWER, Ana CERDENO-TÁRRAGA, Ying CHENG, Iain CLELAND, Nadeem FARUQUE, Neil GOODGAME, Richard GIBSON, Gemma HOAD, Mikyung JANG, Nima PAKSERESHT, Sheila PLAISTER, Rajesh RADHAKRISHNAN, Kethi REDDY, Siamak SOBHANY, Petra TEN HOOPEN, Robert VAUGHAN, Vadim ZALUNIN a Guy COCHRANE, 2011. The European Nucleotide Archive. *Nucleic Acids Research* [online]. **39**(suppl\_1), D28–D31. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq967

LI, Wenhui, Michael J. MOORE, Natalya VASILIEVA, Jianhua SUI, Swee Kee WONG, Michael A. BERNE, Mohan SOMASUNDARAN, John L. SULLIVAN, Katherine LUZURIAGA, Thomas C. GREENOUGH, Hyeryun CHOE a Michael FARZAN, 2003. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* [online]. **426**(6965), 450–454. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature02145

LI, Wenhui, Chengsheng ZHANG, Jianhua SUI, Jens H KUHN, Michael J MOORE, Shiwen LUO, Swee-Kee WONG, I-Chueh HUANG, Keming XU, Natalya VASILIEVA, Akikazu MURAKAMI, Yaqing HE, Wayne A MARASCO, Yi GUAN, Hyeryun CHOE a Michael FARZAN, 2005. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO Journal* [online]. **24**(8), 1634–1643. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7600640

LI, Yu, Ziding ZHANG, Li YANG, Xianyi LIAN, Yan XIE, Shen LI, Shuyu XIN, Pengfei CAO a Jianhong LU, 2020. The MERS-CoV Receptor DPP4 as a Candidate Binding Target of the SARS-CoV-2 Spike. *iScience* [online]. **23**(6), 101160. ISSN 2589-0042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2020.101160

LIU, Ping, Wu CHEN a Jin-Ping CHEN, 2019. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). *Viruses* [online]. **11**(11) [vid. 2021-02-06]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v11110979

- LU, Roujian, Xiang ZHAO, Juan LI, Peihua NIU, Bo YANG, Honglong WU, Wenling WANG, Hao SONG, Baoying HUANG, Na ZHU, Yuhai BI, Xuejun MA, Faxian ZHAN, Liang WANG, Tao HU, Hong ZHOU, Zhenhong HU, Weimin ZHOU, Li ZHAO, Jing CHEN, Yao MENG, Ji WANG, Yang LIN, Jianying YUAN, Zhihao XIE, Jinmin MA, William J. LIU, Dayan WANG, Wenbo XU, Edward C. HOLMES, George F. GAO, Guizhen WU, Weijun CHEN, Weifeng SHI a Wenjie TAN, 2020a. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* [online]. **395**(10224), 565–574. ISSN 0140-6736, 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- LU, Shuaiyao, Yuan ZHAO, Wenhai YU, Yun YANG, Jiahong GAO, Junbin WANG, Dexuan KUANG, Mengli YANG, Jing YANG, Chunxia MA, Jingwen XU, Xingli QIAN, Haiyan LI, Siwen ZHAO, Jingmei LI, Haixuan WANG, Haiting LONG, Jingxian ZHOU, Fangyu LUO, Kaiyun DING, Daoju WU, Yong ZHANG, Yinliang DONG, Yuqin LIU, Yingqiu ZHENG, Xiaochen LIN, Li JIAO, Huanying ZHENG, Qing DAI, Qiangmin SUN, Yunzhang HU, Changwen KE, Hongqi LIU a Xiaozhong PENG, 2020b. Comparison of SARS-CoV-2 infections among 3 species of non-human primates. *bioRxiv* [online]. 2020.04.08.031807. Dostupné z: doi:10.1101/2020.04.08.031807
- LUAN, Junwen, Yue LU, Xiaolu JIN a Leiliang ZHANG, 2020. Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **526**(1), 165–169. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.047
- MAHMOUD, Ismail Sami, Yazun Bashir JARRAR, Walhan ALSHAER a Said ISMAIL, 2020. SARS-CoV-2 entry in host cells-multiple targets for treatment and prevention. *Biochimie* [online]. **175**, 93–98. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2020.05.012
- MASHIMA, Jun, Yuichi KODAMA, Takehide KOSUGE, Takatomo FUJISAWA, Toshiaki KATAYAMA, Hideki NAGASAKI, Yoshihiro OKUDA, Eli KAMINUMA, Osamu OGASAWARA, Kousaku OKUBO, Yasukazu NAKAMURA a Toshihisa TAKAGI, 2016. DNA data bank of Japan (DDBJ) progress report. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(D1), D51–D57. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkv1105
- MCALOOSE, Denise, Melissa LAVERACK, Leyi WANG, Mary Lea KILLIAN, Leonardo C. CASERTA, Fangfeng YUAN, Patrick K. MITCHELL, Krista QUEEN, Matthew R. MAULDIN, Brittany D. CRONK, Susan L. BARTLETT, John M. SYKES, Stephanie ZEC, Tracy STOKOL, Karen INGERMAN, Martha A. DELANEY, Richard FREDRICKSON, Marina IVANČIĆ, Melinda JENKINS-MOORE, Katie MOZINGO, Kerrie FRANZEN, Nichole Hines BERGESON, Laura GOODMAN, Haibin WANG, Ying FANG, Colleen OLMSTEAD, Colleen MCCANN, Patrick THOMAS, Erin GOODRICH, François ELVINGER, David C. SMITH, Suxiang TONG, Sally SLAVINSKI, Paul P. CALLE, Karen TERIO, Mia Kim TORCHETTI a Diego G. DIEHL, 2020. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo. *mBio* [online]. **11**(5) [vid. 2021-01-25]. ISSN 2150-7511. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.02220-20

- MITTAL, Anshumali, Kavyashree MANJUNATH, Rajesh Kumar RANJAN, Sandeep KAUSHIK, Sujeet KUMAR a Vikash VERMA, 2020. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLOS Pathogens* [online]. **16**(8), e1008762. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1008762
- MUNNINK, Bas B. Oude, Reina S. SIKKEMA, David F. NIEUWENHUIJSE, Robert Jan MOLENAAR, Emmanuelle MUNGER, Richard MOLENKAMP, Arco van der SPEK, Paulien TOLSMA, Ariene RIETVELD, Miranda BROUWER, Noortje BOUWMEESTER-VINCKEN, Frank HARDERS, Renate Hakze-van der HONING, Marjolein C. A. WEGDAM-BLANS, Ruth J. BOUWSTRA, Corine GEURTSVANKESSEL, Annemiek A. van der EIJK, Francisca C. VELKERS, Lidwien A. M. SMIT, Arjan STEGEMAN, Wim H. M. van der POEL a Marion P. G. KOOPMANS, 2021. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science* [online]. **371**(6525), 172–177. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.abe5901
- MUNSTER, Vincent J., Friederike FELDMANN, Brandi N. WILLIAMSON, Neeltje VAN DOREMALEN, Lizzette PÉREZ-PÉREZ, Jonathan SCHULZ, Kimberly MEADE-WHITE, Atsushi OKUMURA, Julie CALLISON, Beniah BRUMBAUGH, Victoria A. AVANZATO, Rebecca ROSENKE, Patrick W. HANLEY, Greg SATURDAY, Dana SCOTT, Elizabeth R. FISCHER a Emmie DE WIT, 2020. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature* [online]. **585**(7824), 268–272. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2324-7
- NABI, Ghulam a Suliman KHAN, 2020. Risk of COVID-19 pneumonia in aquatic mammals. *Environmental Research* [online]. **188**, 109732. ISSN 0013-9351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2020.109732
- ORESHKOVA, Nadia, Robert Jan MOLENAAR, Sandra VREMAN, Frank HARDERS, Bas B. Oude MUNNINK, Renate W. Hakze-van der HONING, Nora GERHARDS, Paulien TOLSMA, Ruth BOUWSTRA, Reina S. SIKKEMA, Mirriam GJ TACKEN, Myrna MT de ROOIJ, Eefke WEESENDORP, Marc Y. ENGELSMA, Christianne JM BRUSCHKE, Lidwien AM SMIT, Marion KOOPMANS, Wim HM van der POEL a Arjan STEGEMAN, 2020. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* [online]. **25**(23), 2001005. ISSN 1560-7917. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005
- PARADIS, Emmanuel a Klaus SCHLIEP, 2019. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* [online]. **35**(3), 526–528. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty633
- RAJ, V. Stalin, Huihui MOU, Saskia L. SMITS, Dick H. W. DEKKERS, Marcel A. MÜLLER, Ronald DIJKMAN, Doreen MUTH, Jeroen A. A. DEMMERS, Ali ZAKI, Ron A. M. FOUCHIER, Volker THIEL, Christian DROSTEN, Peter J. M. ROTTIER, Albert D. M. E. OSTERHAUS, Berend Jan BOSCH a Bart L. HAAGMANS, 2013. Dipeptidyl peptidase 4

is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* [online]. **495**(7440), 251–254. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature12005

REHMAN, Sayeed ur a Mohammad TABISH, 2020. Alternative splicing of ACE2 possibly generates variants that may limit the entry of SARS-CoV-2: a potential therapeutic approach using SSOs. *Clinical Science* [online]. **134**(10), 1143–1150. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20200419

REMMERT, Michael, Andreas BIEGERT, Andreas HAUSER a Johannes SÖDING, 2012. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods* [online]. **9**(2), 173–175. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.1818

REVELL, Liam J., 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* [online]. **3**(2), 217–223. ISSN 2041-210X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x

SCIALO, Filippo, Aurora DANIELE, Felice AMATO, Lucio PASTORE, Maria Gabriella MATERA, Mario CAZZOLA, Giuseppe CASTALDO a Andrea BIANCO, 2020. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* [online]. **198**(6), 867–877. ISSN 1432-1750. Dostupné z: doi:10.1007/s00408-020-00408-4

SHEREEN, Muhammad Adnan, Suliman KHAN, Abeer KAZMI, Nadia BASHIR a Rabeea SIDDIQUE, 2020. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research* [online]. **24**, 91–98. ISSN 2090-1232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jare.2020.03.005

SHI, Jianzhong, Zhiyuan WEN, Gongxun ZHONG, Huanliang YANG, Chong WANG, Baoying HUANG, Renqiang LIU, Xijun HE, Lei SHUAI, Ziruo SUN, Yubo ZHAO, Peipei LIU, Libin LIANG, Pengfei CUI, Jinliang WANG, Xianfeng ZHANG, Yuntao GUAN, Wenjie TAN, Guizhen WU, Hualan CHEN a Zhigao BU, 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science* [online]. **368**(6494), 1016–1020. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.abb7015

SHILTS, Jarrod, Thomas W. M. CROZIER, Edward J. D. GREENWOOD, Paul J. LEHNER a Gavin J. WRIGHT, 2021. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *Scientific Reports* [online]. **11**(1), 413. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-80464-1

SCHLOTTAU, Kore, Melanie RISSMANN, Annika GRAAF, Jacob SCHÖN, Julia SEHL, Claudia WYLEZICH, Dirk HÖPER, Thomas C. METTENLEITER, Anne BALKEMA-BUSCHMANN, Timm HARDER, Christian GRUND, Donata HOFFMANN, Angele BREITHAUPT a Martin BEER, 2020. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *The Lancet. Microbe* [online]. **1**(5), e218–e225. ISSN 2666-5247. Dostupné z: doi:10.1016/S2666-5247(20)30089-6



- SIA, Sin Fun, Li-Meng YAN, Alex W. H. CHIN, Kevin FUNG, Ka-Tim CHOY, Alvina Y. L. WONG, Prathanporn KAEWPREEDDEE, Ranawaka A. P. M. PERERA, Leo L. M. POON, John M. NICHOLLS, Malik PEIRIS a Hui-Ling YEN, 2020. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* [online]. **583**(7818), 834–838. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2342-5
- SINGLA, Rubal, Abhishek MISHRA, Rupa JOSHI, Sonali JHA, Amit Raj SHARMA, Sujata UPADHYAY, Phulen SARMA, Ajay PRAKASH a Bikash MEDHI, 2020. Human animal interface of SARS-CoV-2 (COVID-19) transmission: a critical appraisal of scientific evidence. *Veterinary Research Communications* [online]. 1–12. ISSN 0165-7380. Dostupné z: doi:10.1007/s11259-020-09781-0
- SIT, Thomas H. C., Christopher J. BRACKMAN, Sin Ming IP, Karina W. S. TAM, Pierra Y. T. LAW, Esther M. W. TO, Veronica Y. T. YU, Leslie D. SIMS, Dominic N. C. TSANG, Daniel K. W. CHU, Ranawaka A. P. M. PERERA, Leo L. M. POON a Malik PEIRIS, 2020. Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature* [online]. **586**(7831), 776–778. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2334-5
- SÖDING, Johannes, 2005. Protein homology detection by HMM–HMM comparison. *Bioinformatics* [online]. **21**(7), 951–960. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bti125
- SOLERTE, Sebastiano Bruno, Antonio DI SABATINO, Massimo GALLI a Paolo FIORINA, 2020. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibition in COVID-19. *Acta Diabetologica* [online]. 1–5. ISSN 0940-5429. Dostupné z: doi:10.1007/s00592-020-01539-z
- STAWISKI, Eric W., Devan DIWANJI, Kushal SURYAMOCHAN, Ravi GUPTA, Frederic A. FELLOUSE, J. Fah SATHIRAPONGSASUTI, Jiang LIU, Ying-Ping JIANG, Aakrosh RATAN, Monika MIS, Devi SANTHOSH, Sneha SOMASEKAR, Sangeetha MOHAN, Sameer PHALKE, Boney KURIAKOSE, Aju ANTONY, Jagath R. JUNUTULA, Stephan C. SCHUSTER, Natalia JURA a Somasekar SESHAGIRI, 2020. Human ACE2 receptor polymorphisms predict SARS-CoV-2 susceptibility. *bioRxiv* [online]. 2020.04.07.024752. Dostupné z: doi:10.1101/2020.04.07.024752
- SUN, Kun, Liuqi GU, Li MA a Yunfeng DUAN, 2020. Atlas of ACE2 gene expression in mammals reveals novel insights in transmission of SARS-Cov-2. *bioRxiv* [online]. 2020.03.30.015644. Dostupné z: doi:10.1101/2020.03.30.015644
- TRIFINOPOULOS, Jana, Lam-Tung NGUYEN, Arndt VON HAESLER a Bui Quang MINH, 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* [online]. **44**(W1), W232–W235. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkw256
- ULRICH, Lorenz, Kerstin WERNIKE, Donata HOFFMANN, Thomas C. METTENLEITER a Martin BEER, 2020. Experimental Infection of Cattle with SARS-CoV-2. *Emerging*

*Infectious Diseases* [online]. **26**(12), 2979–2981. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid2612.203799

VANKADARI, Naveen a Jacqueline A. WILCE, 2020. Emerging WuHan (COVID-19) coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Emerging Microbes & Infections* [online]. **9**(1), 601–604. ISSN 2222-1751. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2020.1739565

WALLS, Alexandra C., Young-Jun PARK, M. Alejandra TORTORICI, Abigail WALL, Andrew T. MCGUIRE a David VEESLER, 2020. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* [online]. **181**(2), 281-292.e6. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.02.058

WAN, Yushun, Jian SHANG, Rachel GRAHAM, Ralph S. BARIC a Fang LI, 2020. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology* [online]. **94**(7) [vid. 2021-02-09]. ISSN 0022-538X, 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.00127-20

WANG, Dongliang, Jinhui MAI, Wenfeng ZHOU, Wanting YU, Yang ZHAN, Naidong WANG, Neal D. EPSTEIN a Yi YANG, 2020a. Immunoinformatic Analysis of T- and B-Cell Epitopes for SARS-CoV-2 Vaccine Design. *Vaccines* [online]. **8**(3), 355. Dostupné z: doi:10.3390/vaccines8030355

WANG, Ke, Wei CHEN, Yu-Sen ZHOU, Jian-Qi LIAN, Zheng ZHANG, Peng DU, Li GONG, Yang ZHANG, Hong-Yong CUI, Jie-Jie GENG, Bin WANG, Xiu-Xuan SUN, Chun-Fu WANG, Xu YANG, Peng LIN, Yong-Qiang DENG, Ding WEI, Xiang-Min YANG, Yu-Meng ZHU, Kui ZHANG, Zhao-Hui ZHENG, Jin-Lin MIAO, Ting GUO, Ying SHI, Jun ZHANG, Ling FU, Qing-Yi WANG, Huijie BIAN, Ping ZHU a Zhi-Nan CHEN, 2020b. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv* [online]. 2020.03.14.988345. Dostupné z: doi:10.1101/2020.03.14.988345

WOO, Patrick C. Y., Susanna K. P. LAU, Carol S. F. LAM, Alan K. L. TSANG, Suk-Wai HUI, Rachel Y. Y. FAN, Paolo MARTELLI a Kwok-Yung YUEN, 2014. Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *Journal of Virology* [online]. **88**(2), 1318–1331. ISSN 1098-5514. Dostupné z: doi:10.1128/JVI.02351-13

WOOLHOUSE, Mark E. J. a Sonya GOWTAGE-SEQUERIA, 2005. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **11**(12), 1842–1847. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid1112.050997

WOOLSEY, Courtney, Viktoriya BORISEVICH, Abhishek N. PRASAD, Krystle N. AGANS, Daniel J. DEER, Natalie S. DOBIAS, John C. HEYMANN, Stephanie L. FOSTER, Corri B. LEVINE, Liana MEDINA, Kevin MELODY, Joan B. GEISBERT, Karla A. FENTON, Thomas W. GEISBERT a Robert W. CROSS, 2021. Establishment of an African green

monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. *Nature Immunology* [online]. **22**(1), 86–98. ISSN 1529-2908. Dostupné z: doi:10.1038/s41590-020-00835-8

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report - 22 [online]. [vid. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. Weekly Operational Update on COVID-19, 1 March 2021 [online]. [vid. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>

WROBEL, Antoni G., Donald J. BENTON, Pengqi XU, Chloë ROUSTAN, Stephen R. MARTIN, Peter B. ROSENTHAL, John J. SKEHEL a Steven J. GAMBLIN, 2020. SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. **27**(8), 763–767. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/s41594-020-0468-7

WU, Aiping, Yousong PENG, Baoying HUANG, Xiao DING, Xianyue WANG, Peihua NIU, Jing MENG, Zhaozhong ZHU, Zheng ZHANG, Jiangyuan WANG, Jie SHENG, Lijun QUAN, Zanxian XIA, Wenjie TAN, Genhong CHENG a Taijiao JIANG, 2020. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe* [online]. **27**(3), 325–328. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:10.1016/j.chom.2020.02.001

WU, Zunyou a Jennifer M. MCGOOGAN, 2020. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* [online]. **323**(13), 1239–1242. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2020.2648

YAN, Huan, Hengwu JIAO, Qianyun LIU, Zhen ZHANG, Qing XIONG, Bing-Jun WANG, Xin WANG, Ming GUO, Lin-Fa WANG, Ke LAN, Yu CHEN a Huabin ZHAO, 2021. ACE2 receptor usage reveals variation in susceptibility to SARS-CoV and SARS-CoV-2 infection among bat species. *Nature Ecology & Evolution* [online]. 1–9. ISSN 2397-334X. Dostupné z: doi:10.1038/s41559-021-01407-1

YAN, Renhong, Yuanyuan ZHANG, Yaning LI, Lu XIA, Yingying GUO a Qiang ZHOU, 2020. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* [online]. **367**(6485), 1444–1448. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.abb2762

ZHANG, Haibo, Josef M. PENNINGER, Yimin LI, Nanshan ZHONG a Arthur S. SLUTSKY, 2020a. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine* [online]. **46**(4), 586–590. ISSN 1432-1238. Dostupné z: doi:10.1007/s00134-020-05985-9

- ZHANG, Qiang, Huajun ZHANG, Kun HUANG, Yong YANG, Xianfeng HUI, Jindong GAO, Xinglin HE, Chengfei LI, Wenxiao GONG, Yufei ZHANG, Cheng PENG, Xiaoxiao GAO, Huanchun CHEN, Zhong ZOU, Zhengli SHI a Meilin JIN, 2020b. SARS-CoV-2 neutralizing serum antibodies in cats: a serological investigation. *bioRxiv* [online]. 2020.04.01.021196. Dostupné z: doi:10.1101/2020.04.01.021196
- ZHANG, Tao, Qunfu WU a Zhigang ZHANG, 2020c. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology* [online]. **30**(7), 1346-1351.e2. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2020.03.022
- ZHANG, Yuhao, Xiuchao GENG, Yanli TAN, Qiang LI, Can XU, Jianglong XU, Liangchao HAO, Zhaomu ZENG, Xianpu LUO, Fulin LIU a Hong WANG, 2020d. New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. **127**, 110195. ISSN 0753-3322. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2020.110195
- ZHOU, Hong, Xing CHEN, Tao HU, Juan LI, Hao SONG, Yanran LIU, Peihan WANG, Di LIU, Jing YANG, Edward C. HOLMES, Alice C. HUGHES, Yuhai BI a Weifeng SHI, 2020a. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. *Current biology: CB* [online]. **30**(11), 2196-2203.e3. ISSN 1879-0445. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2020.05.023
- ZHOU, Peng, Xing-Lou YANG, Xian-Guang WANG, Ben HU, Lei ZHANG, Wei ZHANG, Hao-Rui SI, Yan ZHU, Bei LI, Chao-Lin HUANG, Hui-Dong CHEN, Jing CHEN, Yun LUO, Hua GUO, Ren-Di JIANG, Mei-Qin LIU, Ying CHEN, Xu-Rui SHEN, Xi WANG, Xiao-Shuang ZHENG, Kai ZHAO, Quan-Jiao CHEN, Fei DENG, Lin-Lin LIU, Bing YAN, Fa-Xian ZHAN, Yan-Yi WANG, Geng-Fu XIAO a Zheng-Li SHI, 2020b. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [online]. **579**(7798), 270–273. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2012-7
- ZHU, Na, Dingyu ZHANG, Wenling WANG, Xingwang LI, Bo YANG, Jingdong SONG, Xiang ZHAO, Baoying HUANG, Weifeng SHI, Roujian LU, Peihua NIU, Faxian ZHAN, Xuejun MA, Dayan WANG, Wenbo XU, Guizhen WU, George F. GAO a Wenjie TAN, 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* [online]. **382**(8), 727–733. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2001017

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<b>Obr. 1:</b> <i>Fylogenetický strom genomových sekvencí některých betakoronavirů. Upraveno podle Hu et al. (2020).</i> .....	10
<b>Obr. 2:</b> <i>Genom viru SARS-CoV-2. Upraveno podle Wu et al. (2020).</i> .....	11
<b>Obr. 3:</b> <i>Schematické znázornění struktury SARS-CoV-2. Upraveno podle Mittal et al. (2020).</i> .....	11
<b>Obr. 4:</b> <i>Schematické znázornění struktury S proteinu u SARS-CoV-2. Upraveno podle Mittal et al. (2020) a Wang et al. (2020a).</i> .....	12
<b>Obr. 5:</b> <i>Struktura komplexu RBD-ACE2-B0AT1 (PDB ID: 6M1D). Protomery RBD jsou vyznačeny oranžově a žlutě, ACE2 fialově a modře a B0AT1 růžově a bíle. Převzato z Yan et al. (2020).</i> .....	14
<b>Obr. 6:</b> <i>Predikovaná interakce mezi S proteinem SARS-CoV-2 (bíle) a DPP4 (oranžově). Upraveno podle Vankadari a Wilce (2020).</i> .....	15
<b>Obr. 7:</b> <i>Příklad zápisu nukleotidové sekvence ve formátu FASTA.</i> .....	17
<b>Obr. 8:</b> <i>Příklad zápisu části fylogenetického stromu ve formátu NEWICK, který zaznamenává délku jednotlivých sekvencí a vzájemné propojení uzlů.</i> .....	19
<b>Obr. 9:</b> <i>Schematické znázornění algoritmických fází Normal módu Phyre2. Upraveno podle Kelley et al. (2015).</i> .....	20
<b>Obr. 10:</b> <i>Ukázka seznamu modelů ACE2 potřebného pro spuštění all-against-all srovnání modelů v DaliLite.</i> .....	21
<b>Obr. 11:</b> <i>Příkazy pro import souborů modelů ACE2 a DPP4 do programu DaliLite.</i> .....	21
<b>Obr. 12:</b> <i>Příkazy pro spuštění all-against-all srovnání modelů ACE2 a DPP4.</i> .....	22
<b>Obr. 13:</b> <i>Skript pro spuštění funkce ParaFit a zapsání výsledků.</i> .....	23
<b>Obr. 14:</b> <i>Fylogenetický strom sekvencí ACE2. Jednotlivé větve jsou barevně odlišeny podle procentuální podpory bootstrapu – červeně (0% podpora) až zeleně (100% podpora). Fylogeneze určena podle IQ-TREE v1.6.12. Zobrazeno ve FigTree v1.4.4.</i> .....	27
<b>Obr. 15:</b> <i>Fylogenetický strom sekvencí DPP4. Jednotlivé větve jsou barevně odlišeny podle procentuální podpory bootstrapu – červeně (0% podpora) až zeleně (100% podpora). Fylogeneze určena podle IQ-TREE v1.6.12. Zobrazeno ve FigTree v1.4.4.</i> .....	28
<b>Obr. 16:</b> <i>Teplotní mapa podobnosti modelů ACE2. Zobrazeno v HTML pomocí knihovny plotly 4.14.3 implementované v Pythonu 3.8.8.</i> .....	30
<b>Obr. 17:</b> <i>Teplotní mapa podobnosti modelů DPP4. Zobrazeno v HTML pomocí knihovny plotly 4.14.3 implementované v Pythonu 3.8.8.</i> .....	30
<b>Obr. 18:</b> <i>Znázornění významných asociací (červeně) mezi fylogenetickým stromem (vlevo) a dendrogramem terciárních struktur modelů (vpravo) ACE2. Sestaveno pomocí metody ParaFit.</i> .....	32
<b>Obr. 19:</b> <i>Znázornění významných asociací (červeně) mezi fylogenetickým stromem (vlevo) a dendrogramem terciárních struktur modelů (vpravo) DPP4. Sestaveno pomocí metody ParaFit.</i> .....	33
<b>Tab. 1:</b> <i>Významné <math>p'</math>-hodnoty živočichů u ACE2.</i> .....	31
<b>Tab. 2:</b> <i>Významné <math>p'</math>-hodnoty živočichů u DPP4.</i> .....	31