

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Ondřej Škoda

Obalové glykoproteiny jednoduchých alfa-, beta- a gamaretrovirů
Envelope glycoproteins of simple alpha-, beta-, and gammaretroviruses

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Kateřina Trejbalová Ph.D.

Praha, 2025

Poděkování

Rád bych upřímně poděkoval Mgr. Kateřině Trejbalové, Ph.D. za její ochotu, vstřícnost a trpělivost, které mi věnovala nejen při vedení této práce, ale i během mého působení v laboratoři. Velké díky také patří Mgr. Martinu Trávníčkovi a Mgr. Kryštofu Štaflovi za jejich cenné rady a zpětnou vazbu. V neposlední řadě děkuji své rodině za veškerou podporu, motivaci a trpělivost.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Umělá inteligence, konkrétně ChatGPT, byla využita pouze pro stylistické úpravy a kontrolu gramatiky.

V Praze, 30.04.2025

Podpis: Ondřej Škoda

Abstrakt

Obalové glykoproteiny retrovirů hrají klíčovou roli při vstupu viru do hostitelské buňky, kdy zprostředkovávají rozpoznání specifického receptoru a fúzi membrán. Ačkoliv sdílejí základní strukturální a funkční charakteristiky, výrazně se liší v mechanismech aktivace a regulace. Tato bakalářská práce se snaží systematicky srovnat jednotlivé typy obalových glykoproteinů a poukázat jak na rozdíly v organizaci jejich podjednotek, tak na rozdíly v procesech spouštějících membránovou fúzi. Cílem je přiblížit, jak tyto odlišnosti ovlivňují vstupní strategii viru. Molekulární znalost těchto procesů zároveň vytváří základ pro budoucí aplikace v oblasti virologie a biomedicínském výzkumu.

Klíčová slova: obalový glykoprotein, retrovirus, receptor, fúze, buněčná membrána

Abstract

Retroviral envelope glycoproteins are essential for mediating viral entry into host cells, facilitating both the recognition of specific cellular receptors and the fusion of viral and cellular membranes. While they share core structural and functional features, they differ significantly in their mechanisms of activation and regulation. This bachelor's thesis seeks to systematically compare the various types of envelope glycoproteins, highlighting distinctions in subunit organization as well as in the molecular events that initiate membrane fusion. The aim is to elucidate how these differences influence the viral entry strategy. Molecular understanding of these processes provides a foundation for future applications in virology and biomedicine.

Key words: envelope glycoprotein, retrovirus, receptor, fusion, cellular membrane

Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	Cíle práce.....	2
2.	Povrchová podjednotka	2
2.1.	Signální peptid.....	4
2.2.	Receptor-vazebná doména.....	6
2.2.1.	RBD gamaretrovirů	6
2.2.2.	RBD betaretrovirů	7
2.2.3.	RBD alfaretrovirů.....	8
2.3.	Sekvence bohatá na prolin.....	8
2.4.	Izomerizační motiv CXXC.....	9
2.5.	Místo štěpení furinovou endoproteázou	9
3.	Transmembránová podjednotka	10
3.1.	Fúzní peptid.....	10
3.2.	Heptádové repetice	11
3.3.	Imunosupresivní doména	13
3.3.1.	Imunosuprese	13
3.3.2.	Regulace izomerizace mezipodjednotkové disulfidické vazby	14
3.4.	Cysteinové motivy.....	14
3.4.1.	CX ₆ CC.....	14
3.4.2.	CX ₄₋₇ C	14
3.4.3.	Klasifikace na základě struktury TM	15
3.5.	Transmembránová oblast.....	15
3.6.	Cytoplazmatická doména	15
3.6.1.	R-peptid.....	15
3.6.2.	Regulace intracelulárního transportu.....	16
3.6.3.	Syncytin-1	17
3.6.4.	JSRV tumorigeneze	17
4.	Membránová fúze	18
4.1.1.	Vazba na receptor	19
4.1.2.	Dvoukroková aktivace.....	19
4.2.	Splynutí membrán	20
5.	Závěr	21
6.	Reference	22

Seznam zkratek

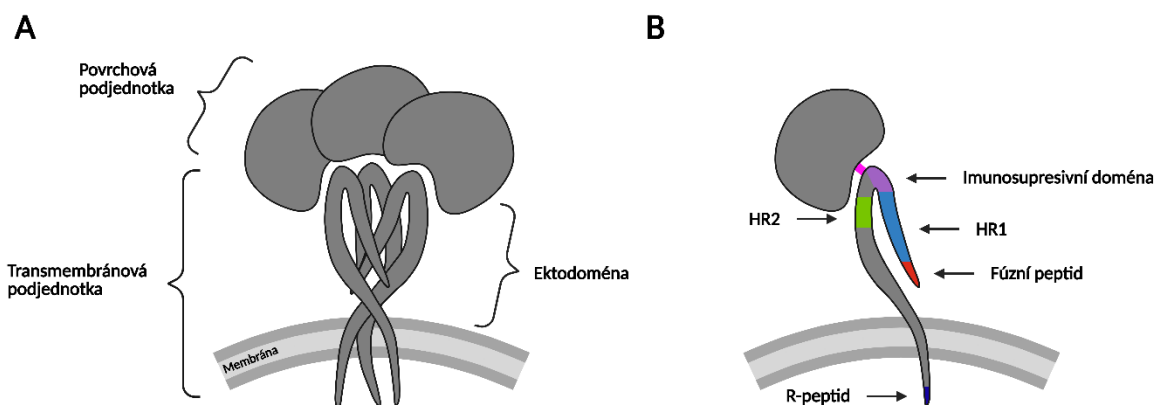
6HB	svazek šesti α -helixů	six-helix bundle
Akt	proteinkináza B	protein kinase B
ALV	virus ptačí leukózy	avian leukosis virus
AMK	aminokyselina	amino acid
cryo-EM	kryoelektronová mikroskopie	cryogenic electron microscopy
CTD	cytoplazmatická doména	cytoplasmic domain
CX₄₋₇C	Cys-X ₄₋₇ -Cys	
CX₆CC	Cys-X ₆ -Cys-Cys	
CXXC	Cys-X-X-Cys	
ENTV	enzootický virus nasálního nádoru	enzootic nasal tumor virus
Env	obalový glykoprotein	envelope glycoprotein
<i>env</i>	gen pro obalový glykoprotein	envelope glycoprotein gene
ER	endoplazmatické retikulum	endoplasmic reticulum
ERV	endogenní retrovirus	endogenous retrovirus
<i>ERVWE1</i>	Gen pro Syncytin-1	Syncytin-1 gene
fp	fúzní peptid	fusion peptide
H8	His8	
HIV-1	virus lidské imunitní nedostatečnosti	human immunodeficiency virus
HR	heptádové repetice	heptad repeats
hr1	hostitelský rozsah 1	host range 1
hr2	hostitelský rozsah 2	host range 2
ISD	imunosupresivní doména	immunosuppressive domain
JSRV	retrovirus ovčí jaagsiekte	jaagsiekte sheep retrovirus
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza	mitogen-activated protein kinase
MLV	virus myši leukémie	murine leukemia virus

MMLV	Moloneyho virus myší leukémie	Moloney murine leukemia virus
MMTV	virus myšího nádoru prsní žlázy	mouse mammary tumor virus
MPMV	Mason-Pfizerův opičí virus	Mason-Pfizer monkey virus
mTOR	savčí cíl rapamycinu	mamalian target of rapamycin
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza	phosphoinositide 3-kinase
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty	negative base 10 logarithm of the acid dissociation constant
PKC	proteinkináza C	protein kinase C
PRR	sekvence bohatá na prolin	proline-rich region
RBD	receptor-vazebná doména	receptor-binding domain
REV	virus retikuloendoteliózy	reticuloendotheliosis virus
RSV	virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
RT	reverzní transkriptáza	reverse transcriptase
RXK/RR	Arg-X-Lys/Arg-Arg	
SP	signální peptid	signal peptide
SPHQ	Ser-Pro-His-Gln	
SRP	signál rozpoznávající částice	signal recognition particle
SU	povrchová podjednotka	surface subunit
TGN	trans-Golgi síť	trans-Golgi network
TM	transmembránová podjednotka	transmembrane subunit
tm	transmembránová oblast	membrane-spanning domain
VFP	virový fúzní protein	viral fusion protein
X	libovolná aminokyselina	any amino acid
YXXM	Tyr-X-X-Met	

1. Úvod

Obalové glykoproteiny (Env) retrovirů představují multifunkční proteinové komplexy lokalizované na povrchu virové membrány, které virus využívá pro vstup do hostitelské buňky. Zásadní rolí Env je interakce se specifickým receptorem na povrchu cílové buňky. Tato interakce spouští sérii konformačních změn v Env, které vyústí ve fúzi virové a buněčné membrány, což vede k vnesení virového genomu do hostitelské buňky.

U retrovirů je Env kódován jediným genem – *env*. Po sestříhu a translaci je zpracován na dvě funkčně i strukturálně odlišné podjednotky: povrchovou (SU) a transmembránovou (TM). Maturovaný Env se skládá ze tří identických heterodimerů SU-TM, a tvoří tak funkční trimerní komplex (viz Obrázek 1). Ten je strukturálně charakteristický pro virové fúzní proteiny (VFP) třídy I.



Obrázek |1| Struktura obalového glykoproteinu. (A) Trimerická struktura obalového glykoproteinu. Povrchová podjednotka se nachází v extracelulárním prostoru na ektodoméně transmembránové podjednotky. Transmembránová podjednotka kotví obalový glykoprotein v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky a udržuje jeho trimerickou strukturu. **(B)** Vyobrazení jednoho z monomerů (typ gama). V transmembránové podjednotce je znázorněn fúzní peptid (červená), heptádové repetice HR1 (modrá) a HR2 (zelená), imunosupresivní doména (fialová) a R-peptid (tmavě modrá) ve vnitro buněčné části. Monomery spolu interagují přes heptádové repetice HR1 a HR2 a tvoří tak trimery. Obalové glykoproteiny typu gama mají povrchovou podjednotku s transmembránovou spojenou disulfidickou vazbou (růžová tenká linka). Vytvořeno v BioRender.com dle Hogan a Johnson (2023).

Retroviry se fylogeneticky rozdělují na základě sekvence genu pro reverzní transkriptázu (RT) do rodů *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* a *Spumavirus*. Zatímco první tři řadíme podle složitosti

genomu mezi retroviry jednoduché, ostatní spadají mezi retroviry komplexní. Jednoduché retroviry lze klasifikovat dvěma způsoby. Tradičně se rozřazují na základě sekvence RT. Alternativně je ale lze třídit i podle struktury jejich Env, což lépe odráží rozdíly v mechanismech vstupu do hostitelské buňky. V tomto pojetí jsou rozlišovány Env typu gama, ptačí Env typu gama a Env typu beta (viz Tabulka 1). Jelikož se tato práce zaměří především na funkční domény Env a jejich úlohu při vstupu viru do buňky, bude využíváno především rozdělení založené na strukturálních vlastnostech Env.

Tabulka |1| Klasifikace nejznámějších druhů jednoduchých retrovirů dle RT a dle typu Env.

Env \ rod	<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Betaretrovirus</i>	<i>Gammaretrovirus</i>
typ gamma		MPMV	MLV, MMLV, REV
typ beta		ENTV, JSRV, MMTV	
ptačí typ gamma	ALV, RSV		

1.1. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bude popsat charakteristiky Env alfa-, beta- a gamaretrovirů. Zaměří se především na aminokyselinové motivy, které jsou klíčové pro jejich funkční vlastnosti – interakci s buněčnými receptory, průběh membránové fúze a mechanismy vstupu viru do hostitelské buňky. Práce bude tematicky rozdělena do dvou hlavních částí. První část popíše konkrétní aminokyselinové motivy, zatímco druhá se zaměří na jejich funkční uplatnění v procesu vstupu retroviru do cílové buňky.

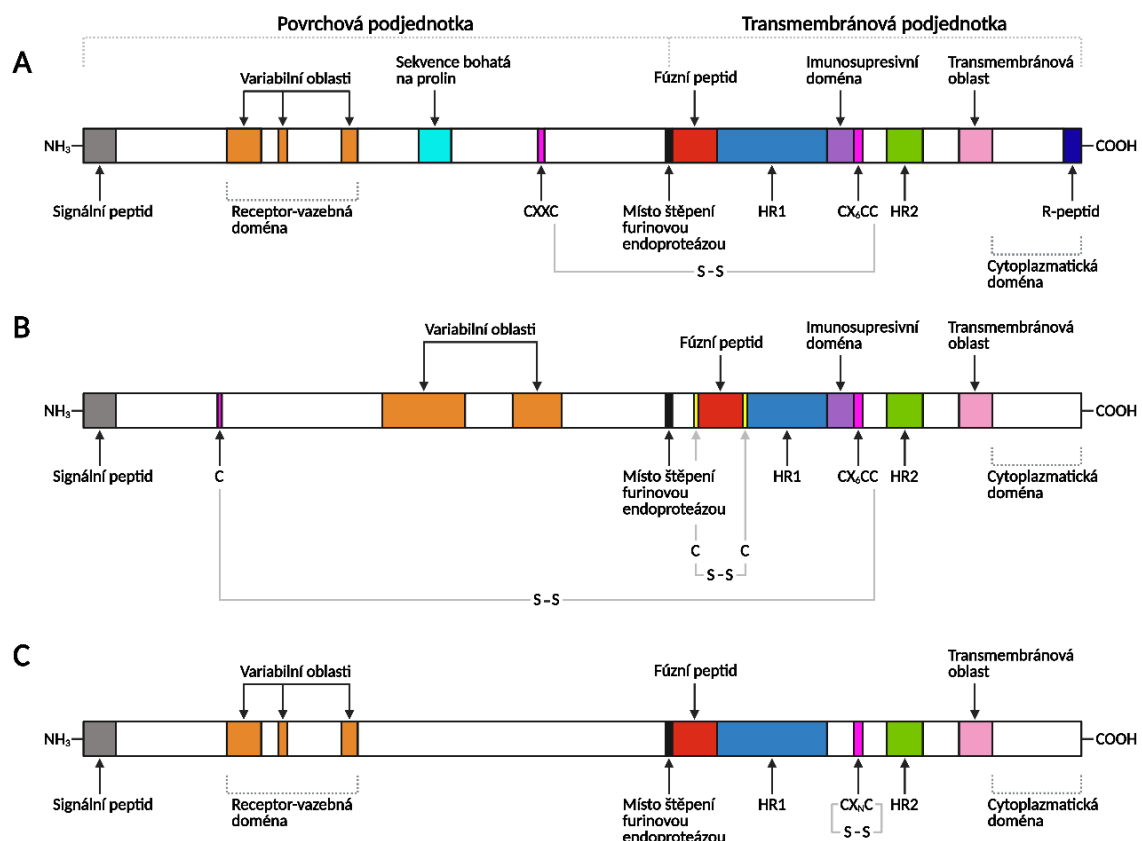
2. Povrchová podjednotka

SU hraje klíčovou roli v počátečních fázích infekce, jelikož zprostředkovává interakci viru s cílovou buňkou. Nachází se na vnější straně Env a je asociovaná s TM, od níž je oddělena proteolytickým štěpením prekurzoru Env. V kontaktu s ní zůstává prostřednictvím disulfidické nebo nekovalentní vazby.

Další významnou funkcí SU je držení Env v tzv. prefúzním metastabilním stavu. Env je v této podobě stabilizován v energeticky nevýhodné konformaci, která se však může po vazbě

na receptor rychle reorganizovat do energeticky výhodné. SU zároveň zakrývá fúzní peptid (fp), který je vysoce hydrofobní a schopný zanoření do membrány. Tím SU zajišťuje, že k expozici fp dojde pouze v reakci na rozpoznání specifického receptoru. Tato regulace je zásadní pro správné načasování fúzního procesu a pro omezení nespecifické aktivace a bezreceptorového vstupu, které by mohly snížit infekčnost viru.

U retrovirů s Env typu gama je SU spojena s TM prostřednictvím disulfidické vazby (viz Obrázek 2), která stabilizuje celý komplex v metastabilním prefúzním stavu. Po navázání na specifický buněčný receptor dochází ke konformačním změnám v SU, jež vedou k izomerizaci této vazby. Izomerizace je zprostředkována izomerizačním motivem CXXC, který katalyzuje přeuspořádání disulfidické vazby (viz podkapitola 2.4. Izomerizační motiv CXXC; Pinter *et al.*, 1997). Tento děj vede k přerušení disulfidické vazby mezi SU a TM, čímž se od sebe podjednotky oddělí. Uvolnění SU je předpokladem pro následné strukturální přestavby TM, které umožňují přiblížení virové a buněčné membrány (Wallin *et al.*, 2003).



Obrázek |2| Schematické porovnání typů obalových glykoproteinů na základě konzervovaných struktur jejich prekurzorů. Barevně jsou vyznačeny jednotlivé aminokyselinové motivy. S-S značí disulfidickou vazbu mezi cysteiny. **(A)** Obalový glykoprotein typu gama. Mezipodjednotková disulfidická vazba je mezi druhým cysteinem motivu CXXC a třetím cysteinem motivu CX₆CX. **(B)**

Ptačí obalový glykoprotein typu gama. Mezipodjednotková disulfidická vazba je mezi volným cysteinem a motivem CX₆CC. **(C)** Obalový glykoprotein typu beta. Podjednotky jsou spojeny nekovalentně. Vytvořeno v BioRender.com dle Hogan a Johnson (2023).

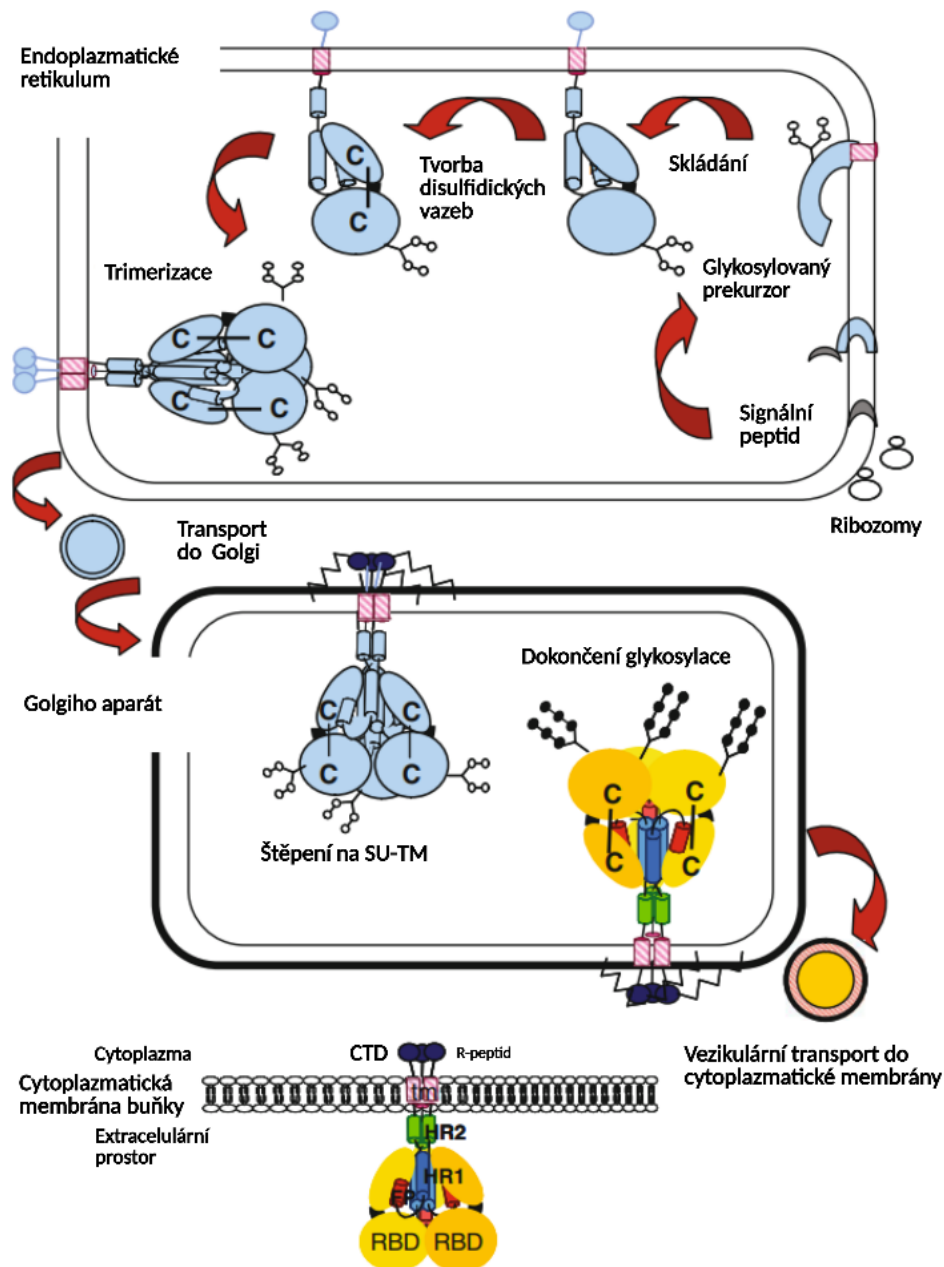
U gamaretrovirů a betaretrovirů se SU dělí na N-koncovou a C-koncovou část. Naproti tomu u alfaretrovirů SU takto rozdělená není a tvoří kompaktní doménu bez zřetelného vnitřního členění (viz podkapitola 2.2. Receptor-vazebná doména; Albritton, 2018).

SU plní řadu klíčových funkcí během vstupu viru do buňky. V následujících podkapitolách budou popsány jednotlivé strukturální a funkční oblasti SU včetně mechanismů, kterými se na vstupu podílejí.

2.1. Signální peptid

Signální peptid (SP) je krátký úsek tvořený zejména hydrofobními aminokyselinami (AMK) nacházející se na N-konci prekurzoru Env (viz Obrázek 2). Hraje klíčovou roli při směřování tohoto proteinu do sekreční dráhy hostitelské buňky. SP mají typickou trojdoménovou strukturu: N-koncovou kladně nabitou oblast (N-region), hydrofobní jádro (H-region) a C-koncovou doménu obsahující štěpné místo (C-region). Ačkoliv tento vzorec zůstává konzervovaný, sekvence SP jsou překvapivě variabilní, dokonce i mezi blízkými příbuznými proteiny (Owji *et al.*, 2018).

Proces směřování prekurzoru Env do sekreční dráhy začíná kotranslační translokací do lumen endoplazmatického retikula (ER), přičemž klíčovým faktorem je signál rozpoznávající částice (SRP). Ta se váže na SP nascentního prekurzoru Env v okamžiku, kdy se SP vynoří z ribozomu. Současně SRP interaguje s ribozomem, čímž dočasně pozastavuje elongaci proteinu. Následně SRP navádí syntetizovaný protein k SRP receptoru na membráně ER, kde je umožněn jeho vstup do sekreční dráhy. Jakmile je translokace dokončena, SP je odstraněn signální peptidázou, čímž dochází k uvolnění Env prekurzoru pro další posttranslační procesy, jako je glykosylace a štěpení mezi SU a TM (viz Obrázek 3). Odštěpený SP je následně degradován peptidázou signálních peptidů (z angl. signal peptide peptidase). Tento mechanismus je společný pro Env téměř všech retrovirů. Avšak u některých retrovirů s Env typu beta, jako jsou retrovirus ovčí jaagsiekte (JSRV; Caporale *et al.*, 2009), virus myšího nádoru mléčné žlázy (MMTV; Feldman *et al.*, 2012) a lidský endogenní retrovirus K (Ruggieri *et al.*, 2009) dochází k částečnému uchování SP, který pak hraje dodatečnou roli v životním cyklu viru.



Obrázek |3| Schéma syntézy a maturace obalového glykoproteinu typu gama. Během translace je N-konec nascentního precursoru signálním peptidem (šedá) směřován do endoplazmatického retikula. Následně je signální peptid odštěpen signální peptidázou. Dochází ke glykosylaci (bílá kolečka) a tvorbě disulfidických vazeb (C-C). Tři precursory spolu trimerizují přes interakce mezi jejich heptádovými repeticemi HR1 (modrá) a HR2 (zelená). Lomené čáry znázorňují palmitoylované cysteiny, které se podílejí na distribuci obalových glykoproteinů v buňce tím, že napomáhají jejich vazbě s lipidovými rafty. Následně je trimer transportován do Golgiho aparátu, kde jsou od sebe odštěpeny jeho podjednotky a je dokončena glykosylace (černá kolečka). Vezikulární transport z trans-Golgi sítě ho přenese do cytoplazmatické membrány hostiteléské buňky, v níž je ukotven transmembránovou oblastí (tm; světle růžová). Transmembránová oblast zajišťuje kotvení nejen do cytoplazmatické membrány do buňky, ale i do membrány Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula. Z transmembránové oblasti vychází do cytoplazmy buňky cytoplazmatická doména, jejíž součástí je R-peptid (tmavě modrá). Převzato z Pérot *et al.* (2011) a upraveno v BioRender.com.

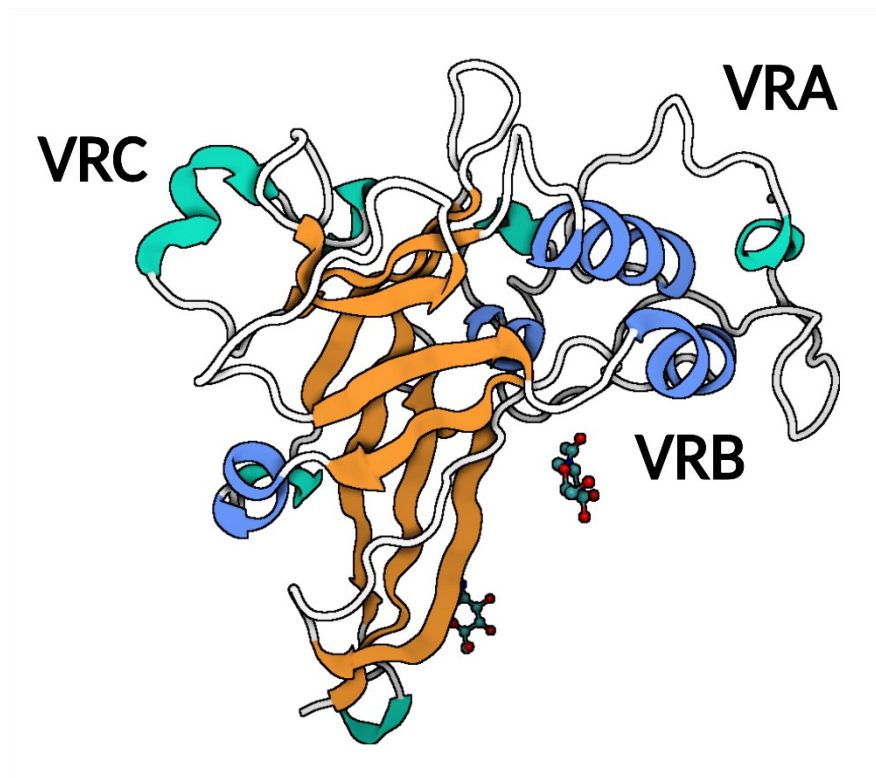
V případě JSRV SP pravděpodobně obsahuje jaderný lokalizační signál a jaderný exportní signál. Odštěpený se nachází nejen v ER, ale také v jádře, kde kolokalizuje s nukleolárními markery. Kromě své základní funkce ve směřování prekurzoru Env do sekreční dráhy má SP JSRV i další významné role v posttranskripčním řízení virové exprese. Podporuje export neštěpených virových mRNA z jádra a zvyšuje uvolňování virových částic. Tento multifunkční charakter SP ukazuje, jak JSRV využívá tento peptid nejen pro správnou lokalizaci Env, ale i pro regulaci virové replikace (Caporale *et al.*, 2009).

2.2. Receptor-vazebná doména

Receptor-vazebná doména (RBD) je klíčovou součástí SU. Hraje zásadní roli ve vstupu viru do buňky – zprostředkovává prvotní interakci mezi virem a receptorem hostitelské buňky, čímž určuje tropismus a specifitu viru. Po navázání na receptor dochází ke konformačním změnám v Env, které vedou k membránové fúzi. Zatímco tyto fundamentální funkce RBD jsou u jednoduchých retrovirů do značné míry zachovány, specifické sekvence a struktury RBD se výrazně liší. SU si sice napříč retroviry udržuje podobné celkové uspořádání, ale právě rozdíly v RBD odrážejí adaptaci jednotlivých virů na specifické hostitelské receptory.

2.2.1. RBD gamaretrovirů

Nejlépe prozkoumané jsou RBD gamaretrovirů, které se nacházejí v N-koncové části jejich SU. Na základě rentgenové krystalografie bylo u viru myší leukémie (MLV) zjištěno, že RBD jeho podtypů sdílí strukturu dvou antiparalelních β -skládaných listů, jež tvoří jejich jádro. Z této struktury vychází dvě smyčky, které tvoří helikální podjednotku zodpovědnou za vazbu receptoru. V rámci této podjednotky se vyskytují 3 variabilní oblasti – VRA, VRB a VRC (viz Obrázek 4). Na rozdíl od beta-sendviče, jehož sekvence je značně konzervovaná, se tyto oblasti u gamaretrovirů s odlišnými tropismy výrazně liší jak svou sekvencí, tak i délkou. Na základě toho se usuzuje, že právě ony jsou zodpovědné za receptorovou specifitu (Battini *et al.*, 1992; Fass *et al.*, 1997).



Obrázek |4| Krystalová struktura receptor-vazebné domény Friendova viru myší leukemie. Z jádra tvořeného dvěma antiparalelními β -skládanými listy (oranžová) vychází dvě smyčky obsahující variabilní oblasti A, B a C (VRA, VRB, VRC). Modře jsou vyznačeny α -helixy, 3_{10} helixy jsou vyznačeny tyrkysově, kuličkovými modely jsou znázorněny N-glukosaminy na N-glykosylačních místech. Vytvořeno v BioRender.com dle Fass *et al.* (1997).

2.2.2. RBD betaretrovirů

Přestože detailní struktura RBD betaretrovirů není dosud tak dobře prozkoumána, jako u gamaretrovirů, předpokládá se, že se RBD rovněž vyskytuje v N-koncové části SU. Ačkoliv RBD MMTV využívá odlišný typ receptoru, je u ní předpovídána přítomnost strukturních prvků podobných těm, které byla popsány u MLV. Konkrétně u ní byla pozorována srovnatelná organizace β -skládaných listů a α -helixů, včetně variabilních oblastí odpovídajících VRA, VRB a VRC. Tyto poznatky naznačují, že navzdory rozdílné receptorové specifitě mohou mít RBD betaretrovirů a gamaretrovirů podobné základní strukturní uspořádání (Zhang *et al.*, 2003). Odlišné informace prezentuje Johnson (2019), který se na problematiku RBD dívá z hlediska klasifikace retrovirů dle struktury Env. Podle něj retroviry s Env typu beta, jako je právě MMTV, postrádají modulární uspořádání RBD a mají vazebné determinanty rozprostřené napříč celou SU.

2.2.3. RBD alfaretrovirů

U alfaretrovirů jsou receptor-vazebné sekvence rozmístěné po celé délce SU – v rámci SU nejsou vymezeny N- a C-koncové části (Albritton, 2018). Strukturně se skládají převážně z β -skládaných listů, mezi nimiž vystupují hydrofilní α -helikální smyčky tvořící dvě výrazně variabilní oblasti – hr1 a hr2 (hostitelský rozsah; neplést s HR1 a HR2 v TM; Bova *et al.*, 1986; Valsesia-Wittmann *et al.*, 1994). Navzdory vysoké sekvenční variabilitě vykazují tyto oblasti konzervaci klíčových AMK (např. cysteiny, proliny či glyciny), které jsou důležité pro správné prostorové uspořádání a stabilitu struktury. Zatímco tyto AMK zachovávají základní konformaci RBD, variabilita ve složení a délce smyček hr1 a hr2 určuje hostitelský rozsah daného viru. Tyto smyčky totiž tvoří vazebné místo pro receptor hostitelské buňky (Dorner *et al.*, 1985). Například RBD podtypu A viru ptačí leukózy (ALV) váže receptor nádorového viru A (z angl. tumor virus A receptor; Young *et al.*, 1993), jenž patří do rodiny receptorů pro nízkodenzitní lipoproteiny (Bates *et al.*, 1993). Naproti tomu podtyp C ALV využívá receptor nádorového viru C (z angl. tumor virus C receptor), který je příbuzný savčím butyrofilinům (Elleder *et al.*, 2005).

2.3. Sekvence bohatá na prolin

Sekvence bohatá na prolin (PRR; z angl. proline-rich region) se nachází mezi N-koncovou a C-koncovou částí SU. Vyskytuje se u retrovirů s Env typu gama a má dva segmenty – konzervovaný C-koncový úsek a hypervariabilní N-koncový úsek. Ačkoliv hypervariabilní úsek není nezbytný pro funkci Env, delece v této oblasti vedou ke snížení hladiny SU a TM ve virových částicích a k hromadění neštěpeného prekurzoru Env. Naproti tomu konzervovaný C-koncový úsek je pro infekčnost viru nezbytný. Jeho delece brání stabilnímu začlenění Env do virových částic a vede ke zvýšenému uvolňování SU od TM (Kayman *et al.*, 1999; Weimin Wu *et al.*, 1998).

Struktura PRR je předpovídána jako polyprolinový β -ohybový helix (z angl. polyproline β -turn helix; Fontenot *et al.*, 1994). Předpokládá se, že reguluje přechod Env z nefúzogenního do fúzogenního stavu. Tato regulace pravděpodobně spočívá v ovlivnění stability celkové struktury Env (Lavillette *et al.*, 1998; Weimin Wu *et al.*, 1998), což vede k izomerizaci mezipodjednotkové disulfidické vazby a následně k aktivaci fúze (Wallin *et al.*, 2005). Tato funkce podtrhuje význam PRR jako klíčového regulátoru, a ne pouhého spojovníku.

2.4. Izomerizační motiv CXXC

Retroviry s Env typu gama mají SU a TM kovalentně spojeny disulfidickou vazbou (viz Obrázek 2). Tato vazba vzniká v ER během zrání Env mezi druhým cysteinem vysoce konzervovaného izomerizačního motivu CXXC (ve většině případů C-koncová část SU; Hogan & Johnson, 2023; Martinez-Molledo *et al.*, 2022) a třetím cysteinem motivu CX₆CC (ektodoména TM; Fass & Kim, 1995; Pinter *et al.*, 1997; Wallin *et al.*, 2003). Takovéto spojení je charakteristickým znakem Env typu gama (Henzy & Johnson, 2013). V důsledku aktivace Env vazbou RBD na receptor dochází k deprotonaci volného thiolu prvního cysteinu CXXC. Aktivovaný thiol následně izomerizuje disulfidickou vazbu mezi SU a TM tvorbou disulfidické vazby mezi cysteiny v rámci CXXC, čímž umožňuje Env vstoupit do další fáze membránové fúze (viz 4.1.1. Vazba na receptor; Wallin *et al.*, 2003). Tento mechanismus zajišťuje přesnou kontrolu fúzní aktivity Env a umožňuje viru efektivní vstup do buňky v reakci na rozpoznání hostitelského receptoru. Pozoruhodné je, že přestože mají retroviry s ptačím Env typu gama rovněž SU a TM kovalentně propojené, v SU izomerizační motiv CXXC postrádají (viz Obrázek 2; Wallin *et al.*, 2003). Disulfidická vazba se u nich vytváří mezi volným cysteinem v SU a CX₆CC motivem v TM, přičemž v důsledku absence izomerizačního motivu nedochází k její izomerizaci při aktivaci ani při průběhu fúze (viz 4.1.2. Dvoukroková aktivace; Pike *et al.*, 2011; Smith & Cunningham, 2007).

2.5. Místo štěpení furinovou endoproteázou

Proteolytické štěpení prekurzoru Env furinovou endoproteázou hostitelské buňky představuje klíčovou událost v maturaci retrovirových Env. Tento proces probíhá v konzervovaném motivu, typicky RXK/RR, který se nachází mezi SU a TM (viz Obrázek 2; Hosaka *et al.*, 1991). Štěpení, k němuž dochází v Golgiho aparátu (viz Obrázek 3), je nezbytné pro vznik fúzně kompetentní formy Env, složené z SU a TM asociovaných pomocí kovalentních či nekovalentních vazeb. Přestože tímto krokem vzniká N-konec TM, obsahující fp, fp zůstává ukryt pod SU. Teprve aktivace fúze, vedoucí ke konformační změně SU, zajistí jeho odhalení. Samotné proteolytické štěpení však umožňuje zásadní konformační reorganizaci trimerní struktury Env. Kryoelektronovou mikroskopií (cryo-EM) Moloneyho viru myší leukémie (MMLV) bylo zjištěno, že C-koncová podjednotka SU je před štěpením asociována s N-koncovou podjednotkou, zatímco po štěpení se přesouvá do periferní oblasti trimeru (Sjöberg *et al.*, 2014). Tato konformační

změna umožňuje aktivaci izomerizačního motivu po navázání receptoru (Sjöberg *et al.*, 2006). Štěpení furinovou endoproteázou tak představuje nezbytný předpoklad pro vznik infekčních virionů.

3. Transmembránová podjednotka

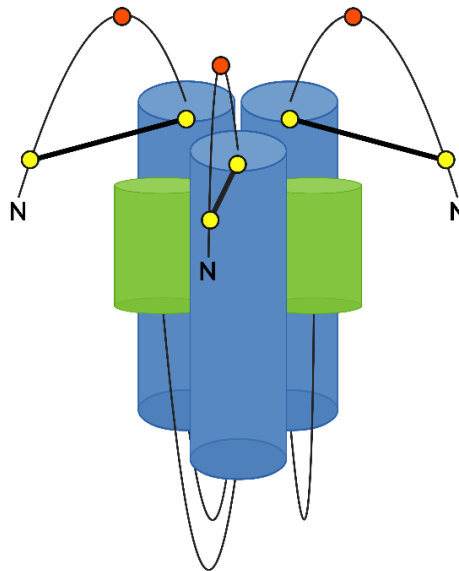
TM je integrální součástí retrovirového Env. Nejenže je klíčová pro ukotvení Env ve virové membráně, ale především hraje klíčovou roli při splynutí virové membrány s membránou hostitelské buňky. TM se skládá z několika funkčních domén, z nichž každá sehraje specifickou roli v průběhu virového vstupu. Významnou částí TM je ektodoména, extracelulární úsek, který směřuje do prostoru mimo virion a zahrnuje klíčové motivy jako jsou např. fp, heptádové repetice 1 (HR1) a 2 (HR2) či imunosupresivní doména (ISD; viz Obrázek 1). Ektodoména je zodpovědná za iniciaci a propagaci fúzního procesu, ale také za interakce s imunitním systémem hostitele, které mohou napomáhat viru unikát imunitní odpovědi. Za ektodoménou následuje transmembránová oblast (tm), která zajišťuje ukotvení TM v lipidové dvojvrstvě, a cytoplazmatická doména (CTD), jež hraje důležitou roli v regulaci fúzní aktivity a intracelulárním transportu Env.

3.1. Fúzní peptid

Env všech jednoduchých retrovirů se řadí mezi VFP třídy I. Kritickou roli ve fúzi membrán u nich hraje fp – vysoce hydrofobní extracelulární struktura, která se vsouvá mezi alifatické řetězce lipidů membrány hostitelské buňky, což je nezbytný krok pro virový vstup. Nachází se na N-konci TM a většinou se skládá z 20 až 30 AMK. Vzhledem ke své hydrofobicitě jsou fp obecně bohaté na alanin, valin, leucin, ale i glycin a aromatické AMK (Lozada *et al.*, 2021; White *et al.*, 2008).

Od ostatních retrovirů se odlišují retroviry s ptačím Env typu gama. Ty se vyznačují interním fp, lokalizovaným v blízkosti N-konce TM. Tento typ fp je obklopen dvěma cysteiny, které spolu tvoří disulfidickou vazbu stabilizující strukturu smyčky, na které je fp umístěn (viz Obrázek 5; Delos & White, 2000; Gallaher, 1996). Ta umožňuje Env efektivně zprostředkovat míchání lipidů v počáteční fázi fúze membrán během virového vstupu (Delos *et al.*, 2008; Delos & White, 2000). Významnou roli ve funkci této smyčky hraje centrálně lokalizovaný prolin, který je klíčový pro správné proteolytické zpracování prekursoru Env. Tento proces je nezbytný pro vznik metastabilního stavu složeného z SU a

TM, který je zásadní pro infekčnost viru (viz podkapitola 2.5. Místo štěpení furinovou endoproteázou). Prolin indukuje obrat v peptidovém řetězci, čímž správně nastavuje štěpné místo pro furinovou endoproteázu. Střední hydrofobicita prolinu je navíc optimální pro interakci s membránou cílové buňky, což je klíčové pro efektivní fúzi (Delos *et al.*, 2000).



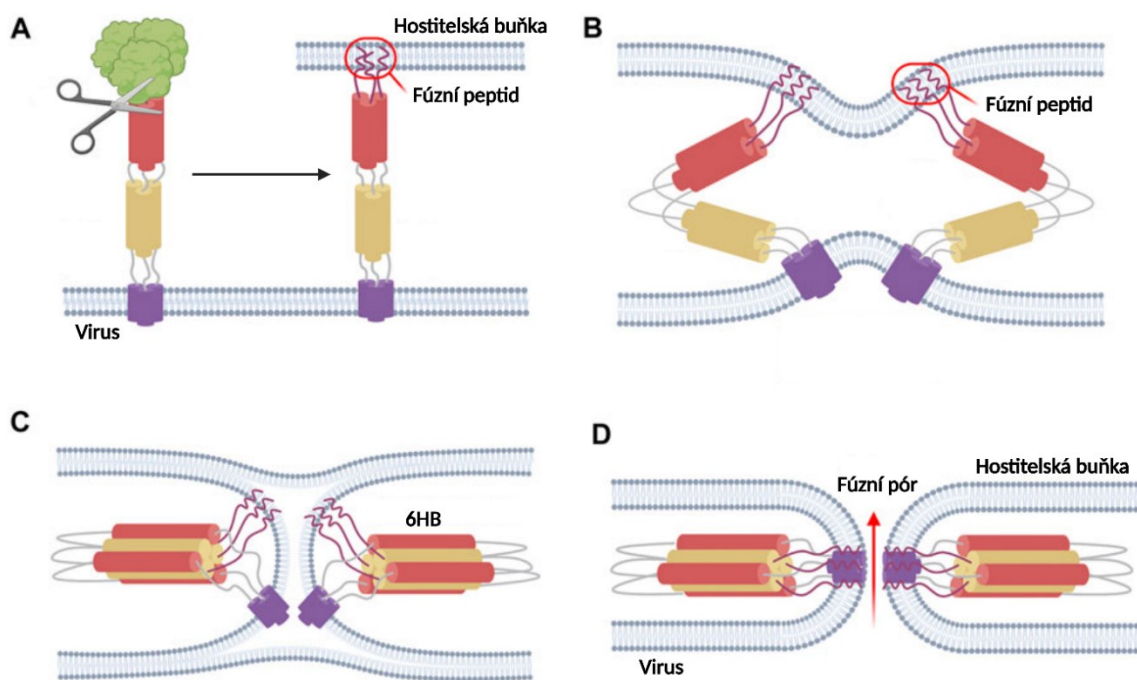
Obrázek |5| Model fúzně aktivního stavu ptačího obalového glykoproteinu typu gama. Několik aminokyselin od N-konce (N) transmembránové podjednotky se nachází fúzní peptid. Ten obklopují dva cysteiny (žlutá), tvořící spolu disulfidickou vazbu (znázorněno tlustou čarou). Vzniklá smyčka obsahuje na svém vrcholu prolin (oranžová), který hraje roli v proteolytickém zpracování prekursoru obalového glykoproteinu. Fúzní smyčku následují heptádové repetice HR1 (modrá) a HR2 (zelená), tvořící jádro trimeru obalového glykoproteinu. Vytvořeno v BioRender dle Delos a White (2000).

3.2. Heptádové repetice

Mezi další charakteristické rysy VFP třídy I patří HR. Jedná se o opakující se strukturní motiv sedmi AMK následujících vzorec *a-b-c-d-e-f-g*, kdy pozice *a* a *d* zaujímají AMK hydrofobní (valin, leucin, isoleucin). Těmito repeticemi jsou tvořené dvě konzervované oblasti, HR1 a HR2, které zabírají většinu sekvence ektodomény (viz Obrázek 2). Strukturně se jedná o α -helixy, které obklopují cysteinový motiv a případně ISD (Cohen & Parry, 1986; Chambers *et al.*, 1990). Delší HR1 navazuje na C-konec fp a kratší HR2 C-koncem přechází v tm. Tyto α -helixy dvou TM spolu interagují prostřednictvím hydrofobních leucinů. Ty jsou rozmístěny podél vnější strany helixu v intervalech 7 AMK, což vede k uspořádání připomínající leucinový zip. Od klasického leucinového zipu se ten retrovirový ale liší tím, že se v pozici leucinu někdy vyskytuje asparagin (Delwart *et al.*, 1990). Toto opakující se uspořádání je charakteristické pro α -helixovou coiled-coil

strukturu – šroubovici, která vzniká stáčením dvou nebo více α -helixů kolem sebe (Cohen & Parry, 1986; O’Shea *et al.*, 1989). Ta je klíčová pro stabilizaci homotrimerní organizace Env (X. Li *et al.*, 1996).

Při vstupu virionu do hostitelské buňky hrají HR1 a HR2 klíčovou roli v procesu membránové fúze. Po aktivaci Env dochází k přeskupení struktury trimeru, což umožňuje interakci HR1 a HR2 a následnou tvorbu svazku šesti α -helixů (6HB). Tato konformační změna je nezbytná pro přiblížení virové a buněčné membrány, čímž se vytvoří podmínky pro jejich splnutí a následnou infekci hostitelské buňky (viz Obrázek 6; viz kapitola 4. Membránová fúze; Albritton, 2018).



Obrázek [6] Schéma membránové fúze. (A) Vazba na receptor (značená jako nůžky) indukuje konformační změnu v povrchové podjednotce (zelená), což vede k uvolnění fúzního peptidu a k jeho zanoření do membrány hostitelské buňky. Obalový glykoprotein se nachází ve stavu předvláskového intermediátu (z. angl. prehairpin intermediate), fialově je vyznačena transmembránová oblast. **(B)** Heptádové repetice HR1 (červená) a HR2 (žlutá) se přibližují k sobě procesem tzv. „chain-reversal“ a táhnou k sobě virovou a buněčnou membránu. **(C)** HR1 jsou antiparalelně navázané k HR2 a vzniká svazek šesti α -helixů (6HB). Dochází k hemifúzi. **(D)** Napětí v membráně vede ke vzniku fúzního póru, umožňujícího přenos virové nukleokapsidy do cytoplazmy buňky. Fúzní peptid se nachází v těsné blízkosti transmembránové oblasti a trimer tak zaujímá postfúzní konformaci. Převzato z Lozada *et al.* (2021) a upraveno v BioRender.com.

3.3. Imunosupresivní doména

ISD je 17 AMK dlouhá sekvence, tvořící s přilehlým CX₆CC motivem oblast mezi HR1 a HR2 (viz Obrázek 2). Dohromady s CX₆CC tvoří vysoce konzervovaný úsek, který je poznávacím znamením retrovirů s kovalentně vázanými SU a TM. Skutečnost, že je tento úsek vysoce konzervovaný, dokládá jeho přítomnost v exogenních i endogenních retrovirech (ERV), vyskytujících se napříč širokým spektrem hostitelů, které zahrnuje savce, ptáky, obojživelníky a ryby (Hogan *et al.*, 2024). V souvislosti s tím ale vyvstává otázka, jakou důležitou funkci ISD ve virovém cyklu plní.

3.3.1. Imunosuprese

Dřívější studie přisuzují ISD podíl na imunosupresivní aktivitě TM, což vedlo k jejímu pojmenování. Jedna z prvních studií využila homologie v této oblasti k přípravě syntetického, 17 AMK dlouhého peptidu CKS-17, reprezentujícího ISD, který *ex vivo* vykazoval inhibiční účinky na proliferaci cytotoxických T-lymfocytů (Cianciolo *et al.*, 1985). V navazujících pracích byl CKS-17 využíván pro studium dalších imunomodulačních aktivit – např. inhibice tumoricidních účinků lidských monocytů inaktivací interleukinu 1 (Kleinerman *et al.*, 1987), potlačení cytolytické aktivity NK buněk (Harris *et al.*, 1987), inhibice aktivace katalytické podjednotky proteinkinázy C (PKC; Gottlieb *et al.*, 1990). Nicméně definitivní molekulární mechanismus vysvětlující všechny experimentální fenotypy spojené s ISD zůstává neobjasněn. Je obzvláště náročné navrhnout takový mechanismus, který by fungoval napříč tak širokým rozsahem hostitelů, a zároveň byl relevantní pro viry s odlišnými tkáňovými tropismy a projevy nemocí (Hogan & Johnson, 2023). S možným vysvětlením přicházejí Haraguchi *et al.* (1997), kteří navrhnou, že ISD ovlivňuje intracelulární signalizaci zvyšováním intracelulárních hladin cyklických adenosinmonofosfátů (aktivací adenylátkinázy) a potlačením aktivity PKC. Tím moduluje aktivitu jaderných transkripčních faktorů, což vede k narušení rovnováhy mezi produkcí cytokinů typu 1 a 2. Produkce cytokinů typu 1, které antivirovou imunitní odpověď buňky podporují, je snížena, zatímco produkce cytokinů typu 2, které tuto odpověď potlačují, je naopak zvýšena. Výsledná nerovnováha oslabuje buněčnou imunitu a vede k progresi imunitních poruch spojených s retrovirovými infekcemi.

3.3.2. Regulace izomerizace mezipodjednotkové disulfidické vazby

Na příkladu MLV Hogan *et al.* (2024) představují teorii, podle které ISD přispívá k funkci Env tím, že zabraňuje předčasné izomerizaci disulfidické vazby mezi SU a TM. Pomocí bodových substitučních mutací v sekvenci ISD připravili mutanty, které vykazovaly sníženou infektivitu. Dále předvedli, že tuto sníženou infektivitu zapříčinila ztráta SU, která byla důsledkem předčasné izomerizace disulfidické vazby. Na základě těchto pozorování dále usuzují, že mimořádná konzervace ISD je výsledkem její klíčové role při regulaci izomerizace disulfidické vazby mezi podjednotkami během vstupu virů obsahujících Env typu gama.

3.4. Cysteinové motivy

3.4.1. CX₆CC

Motiv CX₆CC je rigidně konzervovaná, na cystein bohatá sekvence navazující na ISD, která se vyskytuje u retrovirů s kovalentně vázanými SU a TM. První dva cysteiny spolu tvoří disulfidickou vazbu v rámci ektodomény. Oproti retrovirům s Env typu beta se zde vyskytuje ještě třetí, přilehlý cystein. Tento dodatečný cystein umožňuje vznik mezipodjednotkové disulfidické vazby mezi SU a TM, což je charakteristický znak těchto retrovirů (Henzy & Coffin, 2013). U Env typu gama se tato vazba formuje s druhým cysteinem motivu CXXC a její izomerizace vede k oddělení SU od TM (Pinter *et al.*, 1997).

3.4.2. CX₄₋₇C

Env typu beta postrádají třetí cystein vyskytující se v cysteinovém motivu u retrovirů s kovalentně vázanými SU a TM. Místo CX₆CC obsahují motiv CX₄₋₇C, kde počet AMK vyskytujících se mezi nimi nabývá hodnot 4 až 7 (Henzy & Coffin, 2013). Dva přítomné cysteiny spolu tvoří disulfidickou vazbu, avšak třetí volný cystein potřebný pro mezipodjednotkovou disulfidickou vazbu chybí. V důsledku absence třetího cysteinu jsou SU a TM Env typu beta spolu asociovány nekovalentně, což umožňuje snadnější uvolňování SU. Uvolněná SU se může vázat na odpovídající, receptor a bránit tak interakci Env s receptorem hostitelské buňky, čímž napomáhá efektivnímu uvolnění virionů (Henzy & Coffin, 2013).

3.4.3. Klasifikace na základě struktury TM

Neobyčejná míra konzervace sekvencí cysteinových motivů a ISD (u Env typu beta ISD chybí) umožňuje tvorbu retrovirového fylogenetického stromu na základě analýzy sekvencí TM (Bénit *et al.*, 2001). Tento přístup prezentuje alternativu k tradiční fylogenetické analýze, která se obvykle soustředí na RT (viz Tabulka 1). Díky vysokému stupni konzervace těchto sekvencí je lze navíc využít jako markery pro efektivní detekci ERV v genomech různých organismů. Kromě toho umožňují identifikaci genů s klíčovými fyziologickými rolemi, a to i v případech, kdy nejsou součástí proviru obsahujícího kompletní RT (Bénit *et al.*, 2001).

3.5. Transmembránová oblast

Doména tm (neplést s transmembránovou podjednotkou TM) retrovirového Env plní dvojí funkci – slouží jako membránová kotva a zároveň reguluje proces fúze membrán (Ragheb & Anderson, 1994; Taylor & Sanders, 1999). U MMLV tvoří tm ohnutý amfipatický α -helix, přičemž roli ve fúzi hraje konzervovaný prolin ve středu této domény. Mutace v této oblasti mohou narušit účinnost fúze, což potvrzuje její zásadní význam jak pro kotvení proteinu ve virové membráně, tak pro vstup viru do buňky (Taylor & Sanders, 1999).

3.6. Cytoplazmatická doména

CTD je klíčovou strukturální doménou Env, která se nachází na cytoplazmatické straně buněčné membrány infikované buňky a po sestavení virionu na vnitřní straně virové membrány. CTD navazuje na tm (viz Obrázek 2) a vykazuje značnou variabilitu jak v délce, tak v sekvenci, a to i mezi retroviry stejného rodu. U většiny retrovirů je sekvence CTD relativně krátká, typicky mezi 20 až 40 AMK, zatímco virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV-1) má CTD výrazně delší, dosahující přibližně 150 AMK (Evans *et al.*, 2002). CTD hraje klíčovou roli v několika aspektech virového cyklu, zejména při inkorporaci Env do virionu a regulaci jeho fúzogenních vlastností (Januszski *et al.*, 1997). Pro studium těchto funkcí je jako modelový virus nejčastěji využíván MLV.

3.6.1. R-peptid

Charakteristickým rysem CTD retrovirů s Env typu gama je R-peptid, což je u MLV 16 AMK dlouhý segment C-konce CTD (viz Obrázek 2). V pozdní fázi maturace viru je tento

segment odštěpen virovou proteázou během pučení viru (Green *et al.*, 1981) Odstranění R-peptidu je nezbytné pro aktivaci fúzogenních vlastností Env. Předpokládá se, že odstranění tohoto segmentu uvolňuje konformační omezení, které jinak udržuje Env ve fúzně nekompetentním stavu do doby, dokud virus neopustí buňku (Kubo *et al.*, 2019; M. Li *et al.*, 2001; Rein *et al.*, 1994).

Strukturní analýzy naznačují, že sekvence CTD v blízkosti tm pravděpodobně tvoří amfipatický α -helix, který může hrát roli ve stabilizaci Env ve výše zmíněné neaktivní podobě (Epanand *et al.*, 2008; Yang & Compans, 1996). I další studie ukazují, že se Env vyskytují ve stavech fúzně kompetentních a nekompetentních. Před sestavením a během pučení viru převažují Env v nekompetentním stavu. Tento stav je stabilizován trimerickou coiled-coil strukturou CTD, která je tvořena výše zmíněnými amfipatickými α -helixy s charakteristickými heptádovými repeticemi (Taylor & Sanders, 2003). Proteolytické odstranění R-peptidu během maturace viru tento stabilizační mechanismus narušuje, což vede k přechodu Env do aktivní, fúzně kompetentní formy, umožňující infekci nových buněk (Taylor & Sanders, 2003). Tuto teorii dále podporují výsledky Löving *et al.* (2012), kteří pomocí cryo-EM analyzovali strukturu MLV Env. Zjistili, že trimerizace sekvence R-peptidu udržuje monomery TM pohromadě, čímž zabraňuje konformačním změnám potřebným pro receptorem vyvolanou fúzi. Naopak ve zralých Env, kde byl R-peptid proteolyticky odštěpen, pozorovali monomery výrazně oddělené. Tato konformační změna se pravděpodobně přenáší na ektodoménu, ovlivňuje její strukturu a může oslabovat disulfidickou vazbu mezi SU a TM (Aguilar *et al.*, 2003). Tento mechanismus ukazuje, jakým způsobem R-peptid reguluje strukturu Env. Zajišťuje tak, že v hostitelské buňce nebude docházet k předčasným fúzím.

3.6.2. Regulace intracelulárního transportu

Regulace intracelulárního transportu Env představuje další důležitý mechanismus, kterým CTD ovlivňuje funkčnost Env. Studie Blot *et al.* (2006) ukázala, že retroviry MLV a Mason-Pfizerův opičí virus sdílejí schopnost regulovat intracelulární transport svého Env. Tento transport probíhá v cyklické smyčce mezi trans-Golgi sítí (TGN) a endozomy. Klíčovou roli v tomto procesu hrají dva konzervované motivy v CTD Env – dileucinový motiv a tyrosinový motiv. Dileucinový motiv řídí transport Env z TGN do endozomálních kompartmentů, zatímco tyrosinový motiv kontroluje následný transport Env zpět do TGN. Díky těmto motivům Env interaguje s klatrinovými adaptory a využívá transportní

mechanismy hostitelské buňky. Tento dynamický transportní cyklus má zásadní význam nejen pro správnou lokalizaci Env, ale také reguluje jeho expresi na buněčném povrchu. Omezení množství Env na membráně mimo míst pučení je pro virus výhodné, neboť to pomáhá uniknout imunitnímu systému hostitele. Kromě toho může transport Env v rámci endozomálních drah usnadnit jeho interakci s Gag polyproteiny, což je klíčové pro sestavení a pučení virionů (Blot *et al.*, 2006). Přítomnost CTD ale není nezbytná pro všechny retroviry – např. virus Rousova sarkomu, retrovirus s ptačím Env typu gama, může být i po delecii 22 AMK z CTD stále efektivně inkorporován do virionů a vykazovat téměř nezměněnou infekčnost (Perez *et al.*, 1987).

3.6.3. Syncytin-1

Zajímavostí mezi retrovirovými Env je lidský Syncytin-1 (produkt genu *ERVWE1*), který vznikl endogenizací retroviru a byl adaptován k fyziologickým funkcím v placentě. Na rozdíl od ostatních Env typu gama, jejichž fúzní aktivita je regulována proteolytickým odštěpením R-peptidu, Syncytin-1 tuto regulaci postrádá. V CTD *ERVWE1* chybí štěpné místo pro virovou proteázu, což naznačuje, že je jeho fúzní aktivita řízena jiným mechanismem (Blond *et al.*, 2000). Sekvenční analýzy provedené Bonnaud (2004) odhalily, že *ERVWE1* v CTD obsahuje delecii 4 AMK, která nejenže vedla ke ztrátě štěpného místa, ale také narušila strukturu α -helixu v této oblasti. Namísto klasické regulace proteolytickým štěpením je fúzní aktivita Syncytinu-1 řízena prvními 16 AMK CTD, které obsahují konzervovaný α -helix klíčový pro buněčnou fúzi. Experimentální mutace ukázaly, že odstranění celé CTD dramaticky snižuje fúzogenicitu, zatímco jeho zkrácení na prvních 16 AMK aktivitu zachovává. To naznačuje, že oblast od 16. AMK dál představuje pozůstatek R-peptidového regionu, který ale postrádá svou původní inhibiční funkci (Cheynet *et al.*, 2005).

3.6.4. JSRV tumorigeneze

CTD Env JSRV, původce ovčího adenokarcinomu plic, se významně podílí na jeho tumorigenní schopnosti aktivací několika buněčných signálních drah (Hull & Fan, 2006). Za klíčový prvek této oblasti byl považován konzervovaný motiv YXXM. Tento motiv, vyskytující se u transformujících kmenů JSRV a chybějící u netransformujících endogenních retrovirů příbuzných JSRV (Palmarini *et al.*, 2000), byl spojován s aktivací fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a jejím následným efektem proteinkinázou B (Akt;

Palmarini *et al.*, 2001). Pokud je tyrosin fosforylován, může tato sekvence potenciálně fungovat jako vazebné místo pro regulační podjednotku PI3K (Zhou, 1993). PI3K je klíčovým regulátorem růstu a přežití buněk, hrajícím zásadní roli v tumorigenezi. Aktivuje dráhu Akt/mTOR, což podporuje nekontrolovatelnou proliferaci buněk a rezistenci vůči apoptóze. Přestože přímá interakce mezi PI3K a CTD JSRV byla později vyloučena, CTD Env JSRV zřejmě aktivuje PI3K nepřímo, což vede k aktivaci Akt dráhy (Allen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2003). Kromě toho existují důkazy, že Akt může být aktivován i nezávisle na PI3K, což naznačuje přítomnost alternativní signální dráhy (Maeda *et al.*, 2003). Inhibice PI3K pomocí specifických inhibitorů vede ke snížení fosforylace Akt v transformovaných buňkách, což potvrzuje význam signální dráhy závislé na PI3K (Alberti *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2003; Zavala *et al.*, 2003). Navíc byla pozorována transformace JSRV i bez aktivace Akt, což naznačuje, že se na transformaci podílí další klíčový mechanismus (Zavala *et al.*, 2003). Oním dalším mechanismem JSRV transformace je aktivace dráhy mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). Důležitost této signální dráhy byla potvrzena inhibicí jedné z jejích složek, což vedlo ke snížení transformace. Tento výsledek zdůrazňuje význam dráhy MAPK v tumorigenezi indukované JSRV (Maeda *et al.*, 2005).

Lze říct, že JSRV Env k transformaci buněk využívá více signálních drah současně, přičemž přesné mechanismy některých těchto procesů dosud nejsou plně objasněny. CTD hraje klíčovou roli v aktivaci těchto drah, zejména PI3K/Akt a MAPK, jejichž vzájemná propojenost a alternativní cesty aktivace jsou stále předmětem výzkumu.

4. Membránová fúze

4.1. Aktivace fúze

Retroviry využívají pro vstup do hostitelských buněk Env, který zprostředkovává vazbu na receptor a fúzi virové membrány s buněčnou. Přestože sdílejí společný mechanismus fúzního procesu, samotná aktivace fúze se u různých retrovirů zásadně liší. Základním spouštěcím signálem může být buď samotná vazba na buněčný receptor (fúze na úrovni cytoplazmatické membrány) nebo její kombinace s krokem vyžadujícím nízké pH endozómů (fúze s membránou endozómů). Na základě těchto rozdílů lze sledované retroviry rozdělit do dvou skupin dle mechanismu spuštění fúze.

4.1.1. Vazba na receptor

Tento typ mechanismu aktivace je charakteristický pro retroviry nesoucí Env typu gama. Přítomnost disulfidické vazby mezi podjednotkami udržuje Env v metastabilním, prefúzním stavu, který je sice připraven k aktivaci, ale sám o sobě fúzi nespustí. Aby mohla být fúze aktivována, musí být tato disulfidická vazba izomerizována (Wallin *et al.*, 2003). Všechny kroky, vedoucí od vazby receptoru po izomerizaci, nejsou zatím plně vysvětleny. Jednou z hypotéz je, že vazbou RBD na receptor jsou uvolněny vápenaté ionty, které jinak stabilizují nativní konformaci komplexu Env (Wallin *et al.*, 2003, 2005). Současně dochází k strukturální reorganizaci RBD, čímž se odhalí CXXC motiv (Wallin *et al.*, 2003). V rámci tohoto procesu dochází k výrazné změně chemického prostředí, zejména ke snížení hodnoty záporného dekadického logaritmu disociační konstanty (pKa) volného thiolu prvního z cysteinů, což umožňuje jeho aktivaci. Přesný mechanismus této změny pKa není dosud zcela jasný, ale předpokládá se, že v něm hraje klíčovou roli H8 v konzervovaném motivu SPHQ přítomném v RBD (Bae *et al.*, 1997; K. Li *et al.*, 2007). Dojde k deprotonaci thiolu a vzniklý thiolát izomerizuje mezipodjednotkou disulfidickou vazbu vytvořením disulfidické vazby s druhým cysteinem motivu CXXC (Wallin *et al.*, 2003). V důsledku izomerizace dochází k disociaci SU od TM.

4.1.2. Dvoukroková aktivace

Některé retroviry, jako ALV (Mothes *et al.*, 2000) a JSRV (Bertrand *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2009), využívají unikátní dvoukrokový mechanismus aktivace fúze. Na rozdíl od většiny retrovirů, u kterých je fúze spuštěna vazbou na buněčný receptor, tyto využívají vazbu na receptor a následně k tomu ještě nízkého pH v endozómech.

Prvním krokem je vazba RBD na specifický buněčný receptor za neutrálního pH. Tato interakce vyvolá konformační změny v SU, které připraví TM na další krok aktivace. Výsledkem je vystavení fp, který se zasune do cílové membrány hostitelské buňky, čímž vzniká předvláskový intermediát (z angl. prehairpin intermediate) – stále nereaktivní stav. Druhá fáze nastává po endocytóze viru. V kyselém prostředí endozómu se spustí konformační změny v TM, které vedou ke vzniku 6HB a splynutí virové a buněčné membrány endozómu (viz podkapitola 4.2. Splynutí membrán; Markosyan *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004). Klíčové je, že žádný z těchto dvou kroků není sám o sobě dostačující. Vazba na receptor sice připraví Env na další změny, ale bez následného snížení pH k fúzi nedojde. Stejně tak nízké pH samo o sobě nestačí. Bez

předchozí receptorové aktivace zůstává Env neaktivní – tyto retroviry vyžadují oba podněty v přesně daném pořadí. Tento dvoukrokový model vysvětluje, proč byl ALV dříve mylně považován za virus s pH-nezávislou aktivací fúze – nízké pH bylo v experimentech neúčinné, neboť chyběla předchozí receptorová aktivace (Mothes *et al.*, 2000).

Ačkoliv ALV (ptačí Env typu gama) i JSRV (Env typu beta) oba využívají dvoukrokový mechanismus aktivace fúze, liší se ve způsobu, jakým zapojují vazbu na receptor a nízké pH k jejímu spuštění (Côté *et al.*, 2009). Zajímavé je, že podobná dvoukroková aktivace byla naznačena i pro MMTV (Ross *et al.*, 2002) a enzootický virus nasálního nádoru (z angl. enzootic nasal tumor virus; Côté *et al.*, 2008). U těchto retrovirů jsou, stejně jako u JSRV, podjednotky Env spojeny nekovalentně. Tyto souvislosti naznačují, že by jednoduché retroviry s Env typu beta mohly sdílet společný mechanismus aktivace fúze. Zatím se však jedná pouze o hypotézu, kterou by bylo třeba dále experimentálně ověřit.

4.2. Splynutí membrán

Po aktivaci Env dochází k sérii konformačních změn v TM, které vedou ke splynutí virové a buněčné membrány. Vzhledem k tomu, že Env retrovirů jsou VFP třídy I, probíhá samotná fúze podle obecného modelu známého ze studia hemaglutininu viru chřipky.

Prvním krokem je expozice hydrofobního fp, který byl v prefúzním stavu chráněn před okolním prostředím. Po spuštění fúzního mechanismu dochází k jeho vnoření do cílové membrány hostitelské buňky. Vzniká tak předvlásečkový intermediát, což je konformace, ve které jsou membrány viru a buňky spojeny, ale stále vzdáleny (viz Obrázek 6A). Následuje zásadní konformační přeskupení známé jako „chain reversal“, při němž se HR1 antiparalelně naváže na HR2 a vzniká stabilní struktura 6HB (viz Obrázek 6B). Tento krok k sobě mechanicky přibližuje virovou a buněčnou membránu. Dochází při něm k přeměně energie uložené v metastabilním prefúzním stavu na pohyb, který překonává repulzní hydratační síly mezi membránami. „Chain reversal“ tak představuje hlavní hnací mechanismus fúze (Lozada *et al.*, 2021).

Přechod do energeticky výhodné postfúzní konformace je spojen s mechanickým tahem, který přitahuje lipidové dvojvrstvy k sobě a umožňuje jejich splynutí. Důležitou roli v této přestavbě sehrává tzv. „chain reversal region“ – krátká oblast, která obsahuje cysteinový motiv a potenciálně ISD a propojuje HR1 a HR2. Tento region umožňuje fyzické ohnutí TM a interakci HR1 s HR2 (Lozada *et al.*, 2021).

Za této situace dochází k hemifúzi – sloučení vnějších listů obou membrán, přičemž vnitřní listy zatím zůstávají oddělené (viz Obrázek 6C). V důsledku napětí v membráně způsobeného přibližováním lipidových vrstev a strukturální reorganizací proteinů dochází nakonec k protržení hemifúzní přepážky a vytvoření fúzního póru. To je konečným krokem fúze – membrány jsou spojeny do jedné souvislé lipidové dvouvrstvy (viz Obrázek 6D). Tím je umožněn přenos virové nukleokapsidy do cytoplazmy hostitelské buňky. Postfúzní konformace TM je vysoce stabilní a Env v ní setrvává. Tato nevratnost je klíčovým rysem VFP třídy I, které mohou katalyzovat fúzi pouze jednou (Lozada *et al.*, 2021).

5. Závěr

Env jednoduchých retrovirů představují komplexní a strukturálně rozmanité proteiny, jejichž studium odhaluje klíčové aspekty virové infekce a tropismu. Přehled strukturálních a funkčních charakteristik Env ukazuje, že přestože sdílí základní mechanismus fúze membrán VFP třídy I, jejich detailní molekulární strategie se výrazně liší.

Z rešerše zároveň vyplývá, že současné poznatky o Env jednoduchých retrovirů nejsou rovnoměrně rozloženy. Zatímco retroviry s Env typu gama jsou poměrně dobře prozkoumány, u typu beta přetrvávají mezery ve znalostech. Chybí především detailní popis konformačních změn SU po navázání RBD na buněčný receptor a také přesné vysvětlení mechanismu, kterým dochází k disociaci SU od TM. Většina dostupné literatury buď tento proces zcela opomíjí, nebo jej zjednodušeně popisuje jako důsledek konformačních změn SU po vazbě na specifický buněčný receptor. Jiné studie zase vychází z analogií s komplexním retrovirem HIV-1, který rovněž disponuje Env s nekovalentně asociovanými podjednotkami. Takový přístup však může vést k nepřesným nebo zavádějícím zobecněním vzhledem k rozdílům ve struktuře a mechanismech aktivace fúze Env, které jsou u jednoduchých retrovirů od HIV-1 odlišné jak svou dynamikou, tak mírou regulační kontroly.

Hlubší porozumění struktuře a funkci Env jednoduchých retrovirů je nejen vědecky přínosné, ale otevírá také nové směry pro aplikovaný výzkum. Zvláště důležité je detailní objasnění mechanismu vstupu viru do buňky, včetně konformačních změn vedoucích k aktivaci fúze. Tyto poznatky mohou vytvořit základ pro vývoj molekulárních nástrojů schopných cíleně narušit tento proces a tím zabránit infekci. Inhibitory virového vstupu představují slibnou strategii jak pro vývoj antivirotik, tak pro optimalizaci retrovirových

vektorů využívaných v genové terapii. Systematické studium těchto mechanismů je proto klíčové pro další pokrok v oblasti virové biologie a biomedicínského inženýrství.

6. Reference

- Aguilar, H. C., Anderson, W. F., & Cannon, P. M. (2003). Cytoplasmic Tail of Moloney Murine Leukemia Virus Envelope Protein Influences the Conformation of the Extracellular Domain: Implications for Mechanism of Action of the R Peptide. *Journal of Virology*, 77(2), 1281–1291. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.2.1281-1291.2003>
- Alberti, A., Murgia, C., Liu, S.-L., Mura, M., Cousens, C., Sharp, M., Miller, A. D., & Palmarini, M. (2002). Envelope-Induced Cell Transformation by Ovine Betaretroviruses. *Journal of Virology*, 76(11), 5387–5394. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5387-5394.2002>
- *Albritton, L. M. (2018). Retrovirus Receptor Interactions and Entry. In *Retrovirus-Cell Interactions* (s. 1–49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811185-7.00001-7>
- Allen, T. E., Sherrill, K. J., Crispell, S. M., Perrott, M. R., Carlson, J. O., & DeMartini, J. C. (2002). The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. *Journal of General Virology*, 83(11), 2733–2742. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2733>
- Bae, Y., Kingsman, S. M., & Kingsman, A. J. (1997). Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70. *Journal of Virology*, 71(3), 2092–2099. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2092-2099.1997>
- Bates, P., Young, J. A. T., & Varmus, H. E. (1993). A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell*, 74(6), 1043–1051. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90726-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90726-7)
- Battini, J. L., Heard, J. M., & Danos, O. (1992). Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *Journal of Virology*, 66(3), 1468–1475. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.3.1468-1475.1992>
- Bénit, L., Dessen, P., & Heidmann, T. (2001). Identification, Phylogeny, and Evolution of Retroviral Elements Based on Their Envelope Genes. *Journal of Virology*, 75(23), 11709–11719. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11709-11719.2001>
- Bertrand, P., Côté, M., Zheng, Y.-M., Albritton, L. M., & Liu, S.-L. (2008). Jaagsiekte Sheep Retrovirus Utilizes a pH-Dependent Endocytosis Pathway for Entry. *Journal of Virology*, 82(5), 2555–2559. <https://doi.org/10.1128/JVI.01853-07>
- Blond, J.-L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F., & Cosset, F.-L. (2000). An Envelope Glycoprotein of the Human Endogenous Retrovirus HERV-W Is Expressed in the Human Placenta and Fuses Cells Expressing the Type D Mammalian Retrovirus Receptor. *Journal of Virology*, 74(7), 3321–3329. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3321-3329.2000>
- Blot, V., Lopez-Vergès, S., Breton, M., Pique, C., Berlioz-Torrent, C., & Grange, M.-P. (2006). The conserved dileucine- and tyrosine-based motifs in MLV and MPMV envelope glycoproteins are both important to regulate a common Env intracellular trafficking. *Retrovirology*, 3(1), 62. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-62>

- Bonnaud, B. (2004). Evidence of Selection on the Domesticated *ERVWE1 env* Retroviral Element Involved in Placentation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(10), 1895–1901. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh206>
- Bova, C. A., Manfredi, J. P., & Swanstrom, R. (1986). *env* Genes of avian retroviruses: Nucleotide sequence and molecular recombinants define host range determinants. *Virology*, 152(2), 343–354. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90137-6)
- Caporale, M., Arnaud, F., Mura, M., Golder, M., Murgia, C., & Palmarini, M. (2009). The Signal Peptide of a Simple Retrovirus Envelope Functions as a Posttranscriptional Regulator of Viral Gene Expression. *Journal of Virology*, 83(9), 4591–4604. <https://doi.org/10.1128/JVI.01833-08>
- Cianciolo, G. J., Copeland, T. D., Oroszlan, S., & Snyderman, R. (1985). Inhibition of Lymphocyte Proliferation by a Synthetic Peptide Homologous to Retroviral Envelope Proteins. *Science*, 230(4724), 453–455. <https://doi.org/10.1126/science.2996136>
- *Cohen, C., & Parry, D. A. D. (1986). α -Helical coiled coils — a widespread motif in proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(6), 245–248. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(86\)90186-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(86)90186-6)
- Côté, M., Kucharski, T. J., & Liu, S.-L. (2008). Enzootic Nasal Tumor Virus Envelope Requires a Very Acidic pH for Fusion Activation and Infection. *Journal of Virology*, 82(18), 9023–9034. <https://doi.org/10.1128/JVI.00648-08>
- Côté, M., Zheng, Y.-M., & Liu, S.-L. (2009). Receptor Binding and Low pH Coactivate Oncogenic Retrovirus Envelope-Mediated Fusion. *Journal of Virology*, 83(22), 11447–11455. <https://doi.org/10.1128/JVI.00748-09>
- Delos, S. E., Brecher, M. B., Chen, Z., Melder, D. C., Federspiel, M. J., & White, J. M. (2008). Cysteines Flanking the Internal Fusion Peptide Are Required for the Avian Sarcoma/Leukosis Virus Glycoprotein To Mediate the Lipid Mixing Stage of Fusion with High Efficiency. *Journal of Virology*, 82(6), 3131–3134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02266-07>
- Delos, S. E., Gilbert, J. M., & White, J. M. (2000). The Central Proline of an Internal Viral Fusion Peptide Serves Two Important Roles. *Journal of Virology*, 74(4), 1686–1693. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.4.1686-1693.2000>
- Delos, S. E., & White, J. M. (2000). Critical role for the cysteines flanking the internal fusion peptide of avian sarcoma/leukosis virus envelope glycoprotein. *Journal of virology*, 74(20), 9738–9741. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.20.9738-9741.2000>
- Delwart, E. L., Mosialos, G., & Gilmore, T. (1990). Retroviral Envelope Glycoproteins Contain a „Leucine Zipper“-like Repeat. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 6(6), 703–706. <https://doi.org/10.1089/aid.1990.6.703>
- Dorner, A. J., Stoye, J. P., & Coffin, J. M. (1985). Molecular basis of host range variation in avian retroviruses. *Journal of Virology*, 53(1), 32–39. <https://doi.org/10.1128/jvi.53.1.32-39.1985>
- Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D. C., Šenigl, F., Geryk, J., Pajer, P., Plachý, J., Hejnar, J., Svoboda, J., & Federspiel, M. J. (2005). The Receptor for the Subgroup C Avian Sarcoma and Leukosis Viruses, Tvc, Is Related to Mammalian Butyrophilins, Members of the Immunoglobulin Superfamily. *Journal of Virology*, 79(16), 10408–10419. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10408-10419.2005>
- Epand, R. F., Zhang, Y.-L., Mirzabekov, T., Kagan, B., Silberstein, A., Hubbell, W. L., Epand, R. M., Chakraborti, S., Dimitrov, D. S., Anderson, W. F., & Rozenberg-Adler, Y. (2008). Membrane activity of an amphiphilic α -Helical membrane-proximal cytoplasmic domain of the MoMuLV

- envelope glycoprotein. *Experimental and Molecular Pathology*, 84(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2007.11.003>
- Evans, D. T., Tillman, K. C., & Desrosiers, R. C. (2002). Envelope Glycoprotein Cytoplasmic Domains from Diverse Lentiviruses Interact with the Prenylated Rab Acceptor. *Journal of Virology*, 76(1), 327–337. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.1.327-337.2002>
- Fass, D., Davey, R. A., Hamson, C. A., Kim, P. S., Cunningham, J. M., & Berger, J. M. (1997). Structure of a Murine Leukemia Virus Receptor-Binding Glycoprotein at 2.0 Angstrom Resolution. *Science*, 277(5332), 1662–1666. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1662>
- Fass, D., & Kim, P. S. (1995). Dissection of a retrovirus envelope protein reveals structural similarity to influenza hemagglutinin. *Current Biology*, 5(12), 1377–1383. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(95\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(95)00275-2)
- Feldman, D., Roniger, M., Bar-Sinai, A., Braitbard, O., Natan, C., Love, D. C., Hanover, J. A., & Hochman, J. (2012). The Signal Peptide of Mouse Mammary Tumor Virus-Env: A Phosphoprotein Tumor Modulator. *Molecular Cancer Research*, 10(8), 1077–1086. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0581>
- Fontenot, J. D., Tjandra, N., Ho, C., Andrews, P. C., & Montelaro, R. C. (1994). Structure and Self Assembly of a Retrovirus (FeLV) Proline Rich Neutralization Domain. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 11(4), 821–836. <https://doi.org/10.1080/07391102.1994.10508035>
- Gallaher, W. R. (1996). Similar Structural Models of the Transmembrane Proteins of Ebola and Avian Sarcoma Viruses. *Cell*, 85(4), 477–478. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81248-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81248-9)
- Gottlieb, R. A., Kleinerman, E. S., O'Brian, C. A., Tsujimoto, S., Cianciolo, G. J., & Lennarz, W. J. (1990). Inhibition of protein kinase C by a peptide conjugate homologous to a domain of the retroviral protein p15E. *The Journal of Immunology*, 145(8), 2566–2570. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.145.8.2566>
- Green, N., Shinnick, T. M., Witte, O., Ponticelli, A., Sutcliffe, J. G., & Lerner, R. A. (1981). Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), 6023–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6023>
- *Haraguchi, S., Good, R. A., Cianciolo, G. J., Engelman, R. W., & Day, N. K. (1997). Immunosuppressive retroviral peptides: Immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(6), 654–666. <https://doi.org/10.1002/jlb.61.6.654>
- Harris, D. T., Cianciolo, G. J., Snyderman, R., Argov, S., & Koren, H. S. (1987). Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *The Journal of Immunology*, 138(3), 889–894. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.138.3.889>
- Henzy, J. E., & Coffin, J. M. (2013). Betaretroviral Envelope Subunits Are Noncovalently Associated and Restricted to the Mammalian Class. *Journal of Virology*, 87(4), 1937–1946. <https://doi.org/10.1128/JVI.01442-12>
- *Henzy, J. E., & Johnson, W. E. (2013). Pushing the endogenous envelope. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1626), 20120506. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0506>

- Hogan, V. A., Harmon, J., Cid-Rosas, M., Hall, L. R., & Johnson, W. E. (2024). Conserved residues of the immunosuppressive domain of MLV are essential for regulating the fusion-critical SU-TM disulfide bond. *Journal of Virology*, *98*(11). <https://doi.org/10.1128/jvi.00989-24>
- *Hogan, V. A., & Johnson, W. E. (2023). Unique Structure and Distinctive Properties of the Ancient and Ubiquitous Gamma-Type Envelope Glycoprotein. *Viruses*, *15*(2), 274. <https://doi.org/10.3390/v15020274>
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., & Nakayama, K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *266*(19), 12127–12130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98867-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98867-8)
- Hull, S., & Fan, H. (2006). Mutational Analysis of the Cytoplasmic Tail of Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Protein. *Journal of Virology*, *80*(16), 8069–8080. <https://doi.org/10.1128/JVI.00013-06>
- Chambers, P., Pringle, C. R., & Easton, A. J. (1990). Heptad Repeat Sequences are Located Adjacent to Hydrophobic Regions in Several Types of Virus Fusion Glycoproteins. *Journal of General Virology*, *71*(12), 3075–3080. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-12-3075>
- Cheyne, V., Ruggieri, A., Oriol, G., Blond, J.-L., Boson, B., Vachot, L., Verrier, B., Cosset, F.-L., & Mallet, F. (2005). Synthesis, Assembly, and Processing of the Env *ERVWE1*/Syncytin Human Endogenous Retroviral Envelope. *Journal of Virology*, *79*(9), 5585–5593. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5585-5593.2005>
- Janusz, M. M., Cannon, P. M., Chen, D., Rozenberg, Y., & Anderson, W. F. (1997). Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein. *Journal of Virology*, *71*(5), 3613–3619. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3613-3619.1997>
- *Johnson, W. E. (2019). Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(6), 355–370. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0189-2>
- Kayman, S. C., Park, H., Saxon, M., & Pinter, A. (1999). The Hypervariable Domain of the Murine Leukemia Virus Surface Protein Tolerates Large Insertions and Deletions, Enabling Development of a Retroviral Particle Display System. *Journal of Virology*, *73*(3), 1802–1808. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.1802-1808.1999>
- Kleinerman, E. S., Lachman, L. B., Knowles, R. D., Snyderman, R., & Cianciolo, G. J. (1987). A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *The Journal of Immunology*, *139*(7), 2329–2337. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.139.7.2329>
- Kubo, Y., Izumida, M., Togawa, K., Zhang, F., & Hayashi, H. (2019). Cytoplasmic R-peptide of murine leukemia virus envelope protein negatively regulates its interaction with the cell surface receptor. *Virology*, *532*, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.04.005>
- Lavillette, D., Maurice, M., Roche, C., Russell, S. J., Sitbon, M., & Cosset, F.-L. (1998). A Proline-Rich Motif Downstream of the Receptor Binding Domain Modulates Conformation and Fusogenicity of Murine Retroviral Envelopes. *Journal of Virology*, *72*(12), 9955–9965. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.12.9955-9965.1998>
- Li, K., Zhang, S., Kronqvist, M., Ekström, M., Wallin, M., & Garoff, H. (2007). The conserved His8 of the Moloney murine leukemia virus Env SU subunit directs the activity of the SU–TM disulfide bond isomerase. *Virology*, *361*(1), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.013>

- Li, M., Yang, C., & Compans, R. W. (2001). Mutations in the Cytoplasmic Tail of Murine Leukemia Virus Envelope Protein Suppress Fusion Inhibition by R Peptide. *Journal of Virology*, 75(5), 2337–2344. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2337-2344.2001>
- Li, X., McDermott, B., Yuan, B., & Goff, S. P. (1996). Homomeric interactions between transmembrane proteins of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology*, 70(2), 1266–1270. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.2.1266-1270.1996>
- Liu, S.-L., Lerman, M. I., & Miller, A. D. (2003). Putative Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Binding Motifs in Ovine Betaretrovirus Env Proteins Are Not Essential for Rodent Fibroblast Transformation and PI3K/Akt Activation. *Journal of Virology*, 77(14), 7924–7935. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.14.7924-7935.2003>
- Löving, R., Wu, S.-R., Sjöberg, M., Lindqvist, B., & Garoff, H. (2012). Maturation cleavage of the murine leukemia virus Env precursor separates the transmembrane subunits to prime it for receptor triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), 7735–7740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118125109>
- *Lozada, C., Barlow, T. M. A., Gonzalez, S., Lubin-Germain, N., & Ballet, S. (2021). Identification and Characteristics of Fusion Peptides Derived From Enveloped Viruses. *Frontiers in Chemistry*, 9, 689006. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.689006>
- Maeda, N., Fu, W., Ortin, A., de las Heras, M., & Fan, H. (2005). Roles of the Ras-MEK-Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-mTOR Pathways in Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Induced Transformation of Rodent Fibroblast and Epithelial Cell Lines. *Journal of Virology*, 79(7), 4440–4450. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4440-4450.2005>
- Maeda, N., Inoshima, Y., Fruman, D. A., Brachmann, S. M., & Fan, H. (2003). Transformation of Mouse Fibroblasts by Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Does Not Require Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Virology*, 77(18), 9951–9959. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9951-9959.2003>
- Markosyan, R. M., Bates, P., Cohen, F. S., & Melikyan, G. B. (2004). A Study of Low pH-Induced Refolding of Env of Avian Sarcoma and Leukosis Virus into a Six-Helix Bundle. *Biophysical Journal*, 87(5), 3291–3298. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047696>
- Martinez-Molledo, M., Nji, E., & Reyes, N. (2022). Structural insights into the lysophospholipid brain uptake mechanism and its inhibition by syncytin-2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 29(6), 604–612. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00786-8>
- Matsuyama, S., Delos, S. E., & White, J. M. (2004). Sequential Roles of Receptor Binding and Low pH in Forming Prehairpin and Hairpin Conformations of a Retroviral Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, 78(15), 8201–8209. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8201-8209.2004>
- Mothes, W., Boerger, A. L., Narayan, S., Cunningham, J. M., & Young, J. A. T. (2000). Retroviral Entry Mediated by Receptor Priming and Low pH Triggering of an Envelope Glycoprotein. *Cell*, 103(4), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00170-7)
- O’Shea, E. K., Rutkowski, R., & Kim, P. S. (1989). Evidence That the Leucine Zipper Is a Coiled Coil. *Science*, 243(4890), 538–542. <https://doi.org/10.1126/science.2911757>
- *Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *European Journal of Cell Biology*, 97(6), 422–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.06.003>

- Palmarini, M., Hallwirth, C., York, D., Murgia, C., de Oliveira, T., Spencer, T., & Fan, H. (2000). Molecular Cloning and Functional Analysis of Three Type D Endogenous Retroviruses of Sheep Reveal a Different Cell Tropism from That of the Highly Related Exogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus. *Journal of Virology*, *74*(17), 8065–8076. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.17.8065-8076.2000>
- Perez, L. G., Davis, G. L., & Hunter, E. (1987). Mutants of the Rous sarcoma virus envelope glycoprotein that lack the transmembrane anchor and cytoplasmic domains: analysis of intracellular transport and assembly into virions. *Journal of Virology*, *61*(10), 2981–2988. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.10.2981-2988.1987>
- *Pérot, P., Montgiraud, C., Lavillette, D., & Mallet, F. (2011). A Comparative Portrait of Retroviral Fusogens and Syncytins. In *Cell Fusions* (s. 63–115). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9772-9_4
- Pike, G. M., Madden, B. J., Melder, D. C., Charlesworth, M. C., & Federspiel, M. J. (2011). Simple, Automated, High Resolution Mass Spectrometry Method to Determine the Disulfide Bond and Glycosylation Patterns of a Complex Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17954–17967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229377>
- Pinter, A., Kopelman, R., Li, Z., Kayman, S. C., & Sanders, D. A. (1997). Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *Journal of Virology*, *71*(10), 8073–8077. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.8073-8077.1997>
- Ragheb, J. A., & Anderson, W. F. (1994). Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. *Journal of Virology*, *68*(5), 3207–3219. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.5.3207-3219.1994>
- Rein, A., Mirro, J., Haynes, J. G., Ernst, S. M., & Nagashima, K. (1994). Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *Journal of Virology*, *68*(3), 1773–1781. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.3.1773-1781.1994>
- Ruggieri, A., Maldener, E., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Meese, E., Fackler, O. T., & Mayer, J. (2009). Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) encodes a stable signal peptide with biological properties distinct from Rec. *Retrovirology*, *6*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-17>
- Sjöberg, M., Wallin, M., Lindqvist, B., & Garoff, H. (2006). Furin Cleavage Potentiates the Membrane Fusion-Controlling Intersubunit Disulfide Bond Isomerization Activity of Leukemia Virus Env. *Journal of Virology*, *80*(11), 5540–5551. <https://doi.org/10.1128/JVI.01851-05>
- Sjöberg, M., Wu, S.-R., Löving, R., Rantalainen, K., Lindqvist, B., & Garoff, H. (2014). Furin cleavage of the Moloney murine leukemia virus Env precursor reorganizes the spike structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(16), 6034–6039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317972111>
- Smith, J. G., & Cunningham, J. M. (2007). Receptor-Induced Thiolate Couples Env Activation to Retrovirus Fusion and Infection. *PLoS Pathogens*, *3*(12), e198. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030198>
- Smith, J. G., Mothes, W., Blacklow, S. C., & Cunningham, J. M. (2004). The Mature Avian Leukosis Virus Subgroup A Envelope Glycoprotein Is Metastable, and Refolding Induced by the Synergistic

- Effects of Receptor Binding and Low pH Is Coupled to Infection. *Journal of Virology*, 78(3), 1403–1410. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.3.1403-1410.2004>
- Taylor, G. M., & Sanders, D. A. (1999). The Role of the Membrane-spanning Domain Sequence in Glycoprotein-mediated Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 10(9), 2803–2815. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.9.2803>
- Taylor, G. M., & Sanders, D. A. (2003). Structural criteria for regulation of membrane fusion and virion incorporation by the murine leukemia virus TM cytoplasmic domain. *Virology*, 312(2), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00297-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00297-6)
- Valsesia-Wittmann, S., Drynda, A., Deléage, G., Aumailley, M., Heard, J. M., Danos, O., Verdier, G., & Cosset, F. L. (1994). Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *Journal of Virology*, 68(7), 4609–4619. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4609-4619.1994>
- Wallin, M., Ekström, M., & Garoff, H. (2003). Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *The EMBO Journal*, 23(1), 54. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600012>
- Wallin, M., Ekström, M., & Garoff, H. (2005). The Fusion-Controlling Disulfide Bond Isomerase in Retrovirus Env Is Triggered by Protein Destabilization. *Journal of Virology*, 79(3), 1678–1685. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1678-1685.2005>
- Weimin Wu, B., Cannon, P. M., Gordon, E. M., Hall, F. L., & Anderson, W. F. (1998). Characterization of the Proline-Rich Region of Murine Leukemia Virus Envelope Protein. *Journal of Virology*, 72(7), 5383–5391. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.5383-5391.1998>
- *White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 189–219. <https://doi.org/10.1080/10409230802058320>
- Yang, C., & Compans, R. W. (1996). Analysis of the cell fusion activities of chimeric simian immunodeficiency virus-murine leukemia virus envelope proteins: inhibitory effects of the R peptide. *Journal of Virology*, 70(1), 248–254. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.1.248-254.1996>
- Young, J. A., Bates, P., & Varmus, H. E. (1993). Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *Journal of Virology*, 67(4), 1811–1816. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1811-1816.1993>
- Zavala, G., Pretto, C., Chow, Y.-H. J., Jones, L., Alberti, A., Grego, E., De las Heras, M., & Palmarini, M. (2003). Relevance of Akt phosphorylation in cell transformation induced by Jaagsiekte sheep retrovirus. *Virology*, 312(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00205-8)
- Zhang, Y., Rassa, J. C., deObaldia, M. E., Albritton, L. M., & Ross, S. R. (2003). Identification of the Receptor Binding Domain of the Mouse Mammary Tumor Virus Envelope Protein. *Journal of Virology*, 77(19), 10468–10478. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.19.10468-10478.2003>
- Zhou, S. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72(5), 767–778. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90404-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90404-E)