

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Martin Trávníček

Transmembránové proteiny ASCT1 a ASCT2 a jejich interakce
s retrovirovými obalovými glykoproteiny

Interaction of transmembrane proteins ASCT1 and ASCT2 with retroviral envelope glycoproteins

Bakalářská práce

Školitelka: Mgr. Kateřina Trejbalová, Ph.D.

Praha, 2019

Rád bych poděkoval své rodině za veškerou podporu, motivaci a trpělivost, kterých se mi během mého studia dostává. Zejména chci ale poděkovat své školitelce Mgr. Kateřině Trejbalové, Ph.D. za to, že ve mně jako první vzbudila zájem o toto téma a při vypracování práce kriticky připomínkovala její obsah. Velké díky patří i Mgr. Kryštofu Štaflovi za jeho obětavost a nespočet cenných rad.

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.

V Praze, 9. 5. 2019

Podpis

Abstrakt

Transmembránové proteiny ASCT1 a ASCT2 patří mezi rozšířené buněčné transportéry neutrálních aminokyselin. Nezávisle na své transportní roli v metabolicky aktivních buňkách, slouží také jako receptory mnoha retrovirů. Všechny retroviry, které interagují s receptorem ASCT2, popř. ASCT1, sdílí příbuzný obalový glykoprotein. Mezi tyto glykoproteiny patří mimo jiné Syncytin-1, kódovaný lidským endogenním retrovirem typu W, který je produkován v placentárním cytotrofoblastu primátů včetně člověka. Interakce receptor-vazebné domény Syncytinu-1 se specifickou extracelulární oblastí ASCT2 způsobuje fúze sousedních buněk a vznik mnohojaderného syncytiotrofoblastu. Význam syncytiotrofoblastu spočívá v efektivnějším příjmu živin plodem z krve matky a zároveň v modulaci imunitní odpovědi matky vůči plodu. Tyto vlastnosti jsou nezbytné pro správný vývoj nového jedince, poruchy se vznikem syncytiotrofoblastu často vedou ke komplikacím během těhotenství. Charakterizace proteinových domén, zodpovědných za interakci mezi Syncytinem-1 a jeho receptory, je tak důležitým krokem při odhalování genetických příčin těchto patologií. Zároveň nám tyto poznatky pomáhají objasnit mechanismus buněčného vstupu i u dalších retrovirů a vysvětlují nám molekulární podstatu senzitivity nebo rezistence hostitele k těmto retrovirům.

Klíčová slova: ASCT1, ASCT2, ECL2, RDR, receptor, endogenní retrovirus, HERV-W, obalový glykoprotein, Syncytin-1, buněčná fúze, syncytiotrofoblast, imunosuprese

Abstract

Transmembrane proteins ASCT1 and ASCT2 are ubiquitous neutral amino acid transporters. Apart from their transporter function in metabolically active cells, they also serve as receptors for a wide group of retroviruses. All retroviruses recognizing the transmembrane receptor ASCT2/ASCT1 share a similar *env* gene, encoding the envelope glycoprotein. Syncytin-1 is the envelope glycoprotein, encoded by human endogenous retrovirus type W, produced in placental cytotrophoblasts of primates, including human. Interaction of receptor binding domain of Syncytin-1 and specific extracellular region of ASCT2 is responsible for fusion of neighbouring cells and formation of multinucleated syncytiotrophoblast. The importance of syncytiotrophoblast lies in higher efficiency of fetomaternal exchange of nutrients and simultaneously in modulation of immune response of mother towards fetus. Defect in syncytiotrophoblast differentiation often leads to complications during pregnancy and impairs the proper development of embryo. Characterization of protein domains responsible for the interaction between Syncytin-1 and its receptors is important to uncover genetic causes of these pathologies. Furthermore, understanding the interaction helps us to clarify the mechanism of cell entry and explains the molecular basis of host sensitivity or resistance towards retroviruses.

Key words: ASCT1, ASCT2, ECL2, RDR, receptor, endogenous retrovirus, HERV-W, retroviral glycoprotein, Syncytin-1, cell fusion, syncytiotrophoblast, immunosuppression

Obsah

Abstrakt	IV
Obsah	V
Seznam použitých zkratk	VI
1. Úvod	1
2. Transmembránové proteiny ASCT1 a ASCT2	3
2.1. Přenašeče neutrálních aminokyselin a jejich tkáňová exprese.....	3
2.2. Retrovirové receptory	5
2.3. Molekulární struktura ASCT2	6
3. Retroviry RDR interferenční skupiny	9
3.1. Základní charakteristika skupiny RDR.....	9
3.2. Syncytiny	10
3.2.1. HERV-W.....	11
3.2.2. Regulace exprese genu <i>syncytin-1</i>	11
3.2.3. Protein Syncytin-1.....	14
3.2.4. Fúzogenní a imunosupresivní aktivita.....	15
4. Interakce ASCT2 s glykoproteinem Syncytin-1	17
4.1. Mechanismus fúze v syncytiotrofoblastu.....	17
4.2. Receptor ASCT2 – „dokovací“ místo pro Syncytin-1	19
5. Závěr	21
6. Použitá literatura	23

Seznam použitých zkratk

ALV	ptačí leukózní virus	avian leukosis virus
ame-ERV-Fc1	endogenní retrovirus typu Fc1 vyskytující se u pandy velké	<i>A. melanoleuca</i> endogenous retrovirus group Fc1
ASCT1; SLC1A4	přenašeč neutrálních aminokyselin 1; jeho gen	alanine-serine-cysteine transporter 1; solute carrier family 1 member 4
ASCT2; SLC1A5	přenašeč neutrálních aminokyselin 2; jeho gen	alanine-serine-cysteine transporter 2; solute carrier family 1 member 5
BaEV	endogenní retrovirus paviánů	baboon endogenous virus
BeWo	lidská buněčná linie odvozená z placentárního choriokarcinomu	choriocarcinoma-derived cell line
cAMP-PKA	cAMP-závislá proteinkináza A	cyclic adenosine monophosphate-dependent – protein kinase A
CBP	CREB-vazebný protein	CREB-binding protein
cDNA	komplementární DNA	complementary deoxyribonucleic acid
CfERV-Fc1	endogenní retrovirus typu Fc1 vyskytující se u psa domácího	<i>C. familiaris</i> endogenous retrovirus group Fc1
COS	opičí buněčná linie odvozená z fibroblastů ledvin	CV-1 in origin with SV40 genes
CpG	dinukleotid cytosinu a guaninu spojený fosfodiesterovou vazbou	cytosin phosphodiester-bond guanin dinucleotide
CSV	kuřecí syncytiální virus	chicken syncytial virus
CXCL10	interferonem gamma-indukovaný chemokin 10	C-X-C motif chemokine ligand 10
DIAV	virus infekční anémie kachen	duck infectious anemia virus
DnERV	endogenní retrovirus vyskytující se u pásavce devítipásého	<i>D. novemcinctus</i> endogenous retrovirus
DrERV	endogenní retrovirus vyskytující se u upíra obecného	<i>D. rotundus</i> endogenous retrovirus
EC	extracelulární prostor	extracellular
ECL2	extracelulární smyčka 2	extracellular loop 2
Env; env	retrovirový obalový glykoprotein; jeho gen	envelope
ER	endoplasmatické retikulum	endoplasmic reticulum
ERV	endogenní retrovirus	endogenous retrovirus
ERVW1	endogenní retrovirus 1 typu W,	endogenous retrovirus group W member 1
ERVWE1, syncytin-1	gen pro obalový glykoprotein endogenního retroviru 1 typu W	endogenous retrovirus group W member 1, envelope
FP	fúzní peptid	fusion peptide

Gag, gag	retrovirový strukturní protein; jeho gen	group-specific antigen
GCMa	chorion-specifický transkripční faktor	glia cells missing a
GeERV	endogenní retrovirus vyskytující se u galidie proužkované	<i>G. elegans</i> endogenous retrovirus
Glt_{Ph}	glutamátový transportér izolovaný z <i>P. horikoshii</i>	glutamate transporter homologue <i>Pyrococcus horikoshii</i>
Glt_{Tk}	glutamátový transportér izolovaný z <i>T. kodakarensis</i>	glutamate transporter homologue <i>Thermococcus kodakarensis</i>
gPr	glykoprotein, následuje číslo udávající molekulovou hmotnost	glycoprotein
H3, H4	histon 3, histon 4	histone 3, histone 4
H3K27me3	trimethylace lysinu 27 na histonu 3	histone 3 lysine 27 trimethylation
H3K36me3	trimethylace lysinu 36 na histonu 3	histone 3 lysine 36 trimethylation
H3K4me3	trimethylace lysinu 4 na histonu 3	histone 3 lysine 4 trimethylation
H3K9me3	trimethylace lysinu 9 na histonu 3	histone 3 lysine 9 trimethylation
HERV-FRD	lidský endogenní retrovirus typu FRD	human endogenous retrovirus-FRD
HERV-W	lidský endogenní retrovirus typu W	human endogenous retrovirus-W
HIV-1	virus lidské imunodeficiency 1	human immunodeficiency virus 1
HP1, HP2	helikální vlásenka 1, 2	helical hairpin 1, 2
HR1, HR2	heptádová repetice 1, 2	heptade repeat 1, 2
Hyena-Env3	obalový glykoprotein endogenního retroviru vyskytující se u hyeny skvrnitě	hyena-envelope 3
CHO	ovariální linie křečička čínského (<i>Cricetulus griseus</i>)	Chinese hamster ovary
IC	intracelulární prostor	intracellular
IFN-γ	interferon gamma	interferon gamma
<i>in situ</i>	na místě	
<i>in vitro</i>	ve skle, v Petriho misce	
ISD	imunosupresivní doména	immunosuppressive domain
kb	kilobáze	kilobase
kDa	kilodalton	kilodalton
L-	levotočivý izomer, následuje aminokyselina	levorotary
LTR	dlouhá koncová repetice	long terminal repeat
mfuERV	endogenní retrovirus vyskytující se u fretky domácí	<i>M. putorius furo</i> endogenous retrovirus
MLV	virus myši leukémie	murine leukemia virus

MMERV-β6	endogenní retrovirus vyskytující se u myši domácí	<i>M. musculus</i> endogenous retrovirus-β6
mRNA	RNA vznikající transkripcí DNA, předloha translace	messenger ribonucleic acid
ORF	otevřený čtecí rámec	open reading frame
Po-1-Lu	endogenní retrovirus vyskytující se u hulmana tmavého	<i>P. obscurus</i> - 1 - lung
Pol, pol	retrovirová polymeráza; její gen	polymerase
ppm	částic na jeden milion	parts per million
Rabbit Syncytin-ory 1	obalový glykoprotein endogenního retroviru vyskytující se u králíka divokého	rabbit syncytin-ory 1
RBD	vazebná doména pro receptor	receptor binding domain
RD114	endogenní retrovirus vyskytující se u kočky domácí	rhabdomyosarcoma cell line
RDR	RD114 a retroviry typu D	RD114 and D-type retroviruses
REV	virus retikuloendoteliózy	reticuloendotheliosis virus
RIF	rezistenci-indukující faktor	resistance-inducing factor
RSV	virus Rousova sarkomu	Rous sarcoma virus
SIV	virus opičí imunodeficience	simian immunodeficiency virus
SLC1	rodina membránových transportérů	solute carrier family 1
SMRV	exogenní retrovirus napadající kotuly	squirrel monkey retrovirus
SNV	virus slinivkové nekrózy	spleen necrosis virus
SRV-(1-7)	opičí retrovirus sérotypu (1-8)	simian retrovirus (1-8)
SU	povrchová podjednotka	surface subunit
Th1, Th2	subpopulace pomocných lymfocytů	T1/2 helper cells
TM	transmembránová podjednotka fúzních glykoproteinů	transmembrane subunit
TM1-8	transmembránová doména ASCT1/2	transmembrane domain
TNF-α	faktor nádorové nekrózy α	tumor necrosis factor α
TSE	vazebné místo GCMA	trophoblast-specific enhancer
TvERV	endogenní retrovirus vyskytující se u kusu liščího	<i>T. vulpecula</i> endogenous retrovirus
U3	unikátní 3' koncová sekvence retrovirů nesoucí promotor	unique 3' sequence

1. Úvod

Retroviry jsou malé obalené viry, které řadíme do samostatné čeledi *Retroviridae*. Tato skupina RNA virů se od ostatních virových čeledí odlišuje hlavně přítomností enzymu reverzní transkriptázy, který přepisuje jejich genetickou informaci ve formě RNA do cDNA podoby. Genetická informace retrovirů obecně zahrnuje tři základní protein-kódující geny: *gag*, ze kterého se tvoří strukturální proteiny virové kapsidy, matrix či nukleoproteinových struktur; *pol*, který kóduje enzymatickou výbavu viru, tj. reverzní transkriptázu, integrázu a proteázu; a *env*, který poskytuje genetický návod pro syntézu obalových glykoproteinů, které rozpoznávají buněčné receptory.

Další unikátní vlastností retrovirů je jejich schopnost integrovat svoji dědičnou informaci v podobě DNA proviru do hostitelského genomu. U retrovirů zajišťuje tento proces enzym zvaný integráza. Integrovaný provirus zůstává v této formě v genomu hostitelské buňky po celou její existenci.

V případě, že se retrovirus integruje do genomu buňky zárodečné linie hostitele (spermie, oocyt) a tato buňka dá po oplození vzniknout novému potomkovi, integrovaný provirus se stane součástí dědičné informace všech buněk tohoto jedince. Virus se pak může šířit vertikálně (z rodiče na potomka) i do dalších generací, aniž by musel znovu infikovat buňky svého hostitele. Tento proces dnes nazýváme jako endogenizace a retroviry, které jím prošly, jako endogenní. Naproti tomu retroviry, které nejsou integrovány ve všech buňkách hostitele a šíří se horizontálně (i mezi nepříbuznými jedinci), označujeme jako exogenní.

Lidské endogenní retroviry (HERV) a jejich pozůstatky zabírají dnes významnou část naší genetické informace. Prvotní analýzy lidského genomu uvádí, že by toto číslo mohlo dosahovat minimálně 8 % sekvence DNA (Lander *et al.* 2001). Během evoluce však u většiny integrovaných endogenních provirů docházelo vlivem genetického driftu a hromadění mutací k nenávratnému poškození genů, které kódují proteiny důležité pro vytváření infekčních částic a dokončení replikačního cyklu retroviru. Navzdory této selekci došlo u malé skupiny zástupců HERV k zachování některých genových sekvencí, které jsou dodnes buněčným aparátem přepisovány a překládány jako funkční proteiny retrovirového původu. Jedním z těchto zástupců je i lidský endogenní retrovirus typu W, lokus umístěný na chromozomu 7, u kterého se dochoval intaktní gen *env*, kódující obalový glykoprotein Syncytin-1 (syn. enverin; Blond *et al.* 1999).

Je pozoruhodné, že genom řady savců obsahuje funkční geny pro obalové glykoproteiny retrovirového původu, které jsou obecně označovány jako syncytiny. Tyto syncytinové geny však nepředstavují orthology, nýbrž jsou odvozeny z nezávislých infekcí různými retroviry. Mají ale stejnou funkci, svým fúzogenním potenciálem umožnily vývoj placenty. Jedná se o velmi ojedinělý příklad získání nové biologické funkce, kdy původem retrovirový protein, jehož prvotním účelem bylo umožnit viru fúzi s membránou buňky, dal vzniknout zcela novému orgánu hostitele, který s sebou přináší řadu užitečných vlastností. Syncytiny jsou tak spjaty s evolucí placentálů (Kim *et al.* 1999; Voisset *et al.* 1999).

Jedinečnou funkcí glykoproteinu Syncytin-1 je tedy to, že se podílí na fúzi buněk v placentárním syncytiotrofoblastu primátů včetně člověka. Syncytiotrofoblast hraje během těhotenství klíčovou roli při vývoji plodu, který díky němu může efektivněji přijímat živiny, plyny a hormony přímo z krve matky (Lager and Powell 2012). Zároveň je díky imunosupresivním vlastnostem této tkáně plod chráněn před nežádoucí imunitní odpovědí matky (Tolosa *et al.* 2012). Aby zmíněná buněčná fúze, vedoucí ke vzniku syncytiotrofoblastu, vůbec nastala, je zapotřebí, aby se v placentě produkovaný fúzní protein Syncytin-1 nejprve setkal se svými specifickými receptory – buněčnými transmembránovými proteiny ASCT1 a ASCT2 (Tailor *et al.* 1999; Rasko *et al.* 1999). Jejich interakce má za následek vytvoření póru mezi buněčnými membránami, což vede ke splnutí buněk.

Přístupnost interakčního místa na receptoru, v tomto případě ASCT1 nebo ASCT2, je tedy zásadní pro fúzi buněk zprostředkovanou Syncytinem-1. Syncytin-1 však není jediným retrovirovým obalovým glykoproteinem, který využívá proteiny ASCT1 a ASCT2 jako své receptory. Ukázalo se, že ke svému vstupu do buňky je vyžaduje i řada dalších exogenních i endogenních retrovirů. Nehledě na několik studií, které se zabývaly charakterizací interakce ASCT2 se Syncytinem-1, nebyly dosud jednoznačně definovány kritické aminokyseliny nebo mechanismus, které zprostředkují vazbu Syncytinu-1 na jeho receptor.

Hlavní náplní této práce bude popsat interakce transmembránových proteinů ASCT1 a ASCT2 (resp. SLC1A4 a SLC1A5) s retrovirovými obalovými glykoproteiny. Prvním cílem bude shrnout dosavadní poznatky o funkci, struktuře a expresi ASCT1 a ASCT2. Druhým cílem této literární rešerše bude podrobně zmapovat interakci proteinů ASCT2 a Syncytin-1. K tomu bude využita i nedávno popsána prostorová struktura proteinu ASCT2, jejíž znalost je klíčová pro pochopení specifických molekulárních interakcí s retrovirovými obalovými glykoproteiny. Neméně důležitá je i struktura Syncytinu-1 a exprese jeho genu, které budou v práci rovněž probrány.

2. Transmembránové proteiny ASCT1 a ASCT2

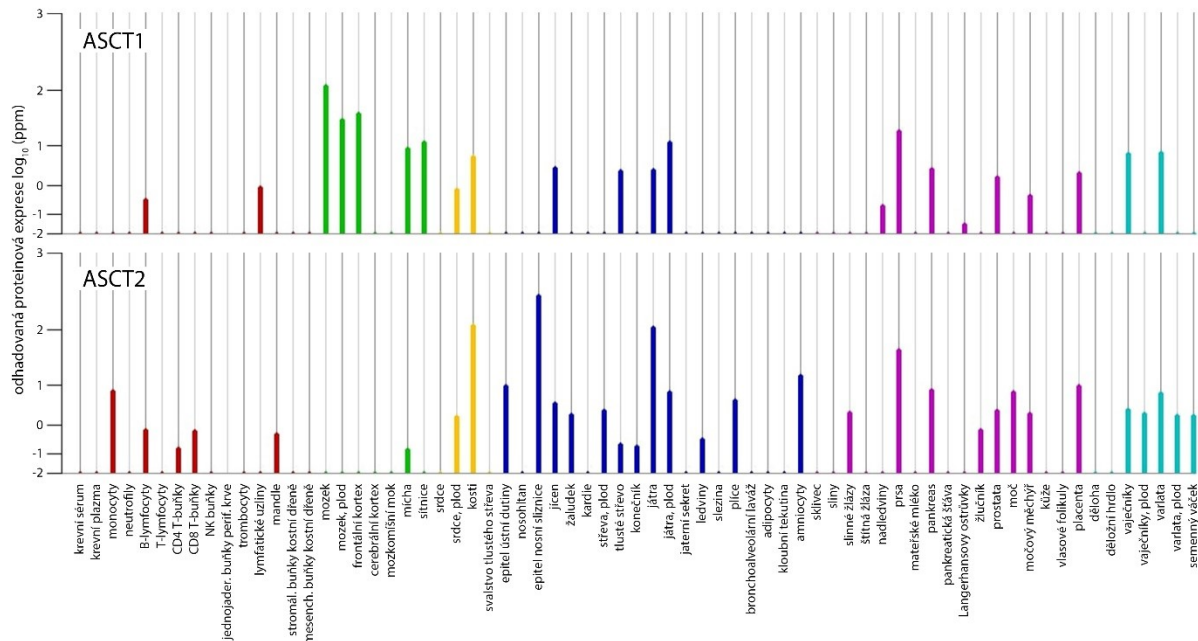
V 90. letech minulého století byla objevena řada proteinů, které společně sdílely funkci Na⁺-dependentních transmembránových přenašečů aminokyselin. Postupně bylo identifikováno celkem pět vysoce afinních glutamátových transportérů SLC1A1-3 a SLC1A6-7 (Storck *et al.* 1992; Danbolt *et al.* 1992; Kanai and Hediger 1992; Fairman *et al.* 1995; Arriza *et al.* 1997) a také dva přenašeče neutrálních aminokyselin nazvané ASCT1 (SLC1A4) a ASCT2 (SLC1A5; Shafqat *et al.* 1993; Arriza *et al.* 1993; Utsunomiya-Tate *et al.* 1996). Původní označení ASCT je akronymem pro jména transportovaných neutrálních aminokyselin – L-alanin, L-serin a L-cystein, písmeno T označuje transportér. Později se však ukázalo, že ASCT1 transportuje také L-threonin a ASCT2 navíc i L-glutamin, L-threonin a L-asparagin, jelikož má prostorově větší vazebné místo pro aminokyseliny s delším postranním řetězcem (Utsunomiya-Tate *et al.* 1996). Všechny zmíněné proteiny byly posléze na základě aminokyselinové sekvenční homologie, která činí 57 % identické sekvence mezi ASCT1 a ASCT2 a 40-44 % mezi ASCT2 a zmíněnými pěti glutamátovými transportéry (Utsunomiya-Tate *et al.* 1996), zařazeny do společné rodiny membránových transportérů aminokyselin, zvané SLC1 (z angl. Solute Carrier Family 1).

Glutamátové transportéry SLC1A1-3 a SLC1A6-7 vyžadují pro svou funkci symport 3 iontů Na⁺, 1 protonu a s ním spřažený antiport 1 iontu K⁺ na každou transportovanou molekulu glutamové kyseliny přes membránu buňky (Zerangue and Kavanaugh 1996a). Naproti tomu ASCT1 a ASCT2, které se podílí na selektivním importu i exportu aminokyselin, využívají obecně pro jejich membránový transport antiport s Na⁺ ionty (Shafqat *et al.* 1993; Arriza *et al.* 1993; Utsunomiya-Tate *et al.* 1996; Bröer *et al.* 2000). Transport substrátu je navíc u všech těchto Na⁺-dependentních přenašečů doprovázen otevřením nezávislých aniontových kanálů, které způsobí vtok halidových (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻) a dalších malých aniontů (NO₃⁻, SCN⁻; Wadiche *et al.* 1995; Zerangue and Kavanaugh 1996b; Broer *et al.* 2000).

2.1. Přenašeče neutrálních aminokyselin a jejich tkáňová exprese

Gen SLC1A4, kódující protein ASCT1, je v lidském genomu lokalizován na chromozomu č. 2 (Shafqat *et al.* 1993). Druhý z přenašečů, protein ASCT2, je kódován genem SLC1A5, který se nachází se na chromozomu č. 19 (Kekuda *et al.* 1996). Oba geny mají orthology u většiny obratlovců. Výjimkou je kur domácí (*Gallus gallus domesticus*), u kterého se nevyskytuje SLC1A5 (Stelzer *et al.* 2016). Proteiny ASCT1 a ASCT2 obecně nachází uplatnění jako transportéry neutrálních aminokyselin v metabolicky velmi aktivních nebo rakovinných buňkách, ve kterých je kvůli vysoké spotřebě či exportu aminokyselin vyžadován jejich rychlý a specifický transport (Warburg *et al.* 1927; DeBerardinis *et al.* 2007; Nicklin *et al.* 2009).

S rozvojem metod, jako je například hmotnostní spektrometrie, došlo v průběhu let k významnému obohacení proteomických databází o konkrétní kvantitativní hodnoty exprese proteinů ASCT1 i ASCT2. Recentní informace o expresním profilu proteinů ASCT1 a ASCT2 ve vybraných tkáních, buňkách a tělních tekutinách ilustruje Obrázek 1.



Obrázek 1 | Expresní profil lidských proteinů ASCT1 a ASCT2 ve vybraných tkáních, buňkách a tělních tekutinách. Grafy demonstrují rozdíly proteinové exprese v hodnotách ppm (parts per million) mezi lidskými proteiny ASCT1 (horní graf) a ASCT2 (spodní graf). Distribuce je rozdělena do pěti barevně odlišených kategorií: krev a imunitní systém (červeně), nervová soustava (zeleně), opěrná soustava (žlutě), vnitřní orgány a tkáně (tmavě modře), sekreční soustava (růžově) a reprodukční soustava (světle modře). Převzato a upraveno z veřejně přístupné databáze GeneCards (Fishilevich *et al.* 2016).

Expresce proteinu ASCT1 byla studována převážně na myších modelech a výskyt tohoto transportéru byl prokázán v gliových buňkách v mozku, kde pravděpodobně hraje klíčovou roli v exportu i importu aminokyseliny L-serinu. Tato aminokyselina je v hojném množství produkována v gliových buňkách a následně transportována přes membránu pomocí ASCT1 ven z buňky k okolním neuronům, kde je důležitou molekulou pro biosyntézu dalších látek (Yamasaki *et al.* 2001; Sakai *et al.* 2003). Vysokou syntetickou aktivitu vykazují i Panethovy buňky, jejichž granula obsahují baktericidní peptidy jako např. lysozymy a α -defenziny (Porter *et al.* 1997), které sloužící k obraně tenkého střeva před mikrobiální infekcí. Předpokládá se, že transport neutrálních aminokyselin, potřebných pro syntézu těchto peptidů, je zajišťován transportérem ASCT1, který je v těchto buňkách exprimován (Hashimoto *et al.* 2004). ASCT1 zřejmě přispívá i k odbourávání amoniaku v játrech tím, že se podílí na přísunu alaninu. Právě tato aminokyselina je při transportu amoniaku v hepatocytech esenciální (Hashimoto *et al.* 2004). Amoniak pak vedle kyseliny glutamové slouží jako substrát glutamin syntetázy při tvorbě glutaminu, čímž se snižuje i obsah volného amoniaku v krvi (Boon *et al.* 1999). Ve vaječnicku by ASCT1 mohl přispívat zásobováním buněk neutrálními aminokyselinami k tvorbě progesteronu v žlutém tělísku (Hashimoto *et al.* 2004). Dále se ASCT1 produkuje v mnoha buňkách trávicí soustavy (acinární buňky slinných žláz, bazální vrstva dlaždicového epitelu ústní dutiny, absorpční epitel tlustého střeva, hladká svalovina

a podslizniční nervová pleteň střevní stěny, acinární buňky pankreatu), v ledvinách (epitel proximálního tubulu a papilárních vývodů), v dřeni nadledvin a v rozmnožovací soustavě (žluté tělísko, bazální vrstva dlaždicového epitelu pochvy; Hashimoto *et al.* 2004).

V případě druhého transportéru neutrálních aminokyselin, ASCT2, víme, že se v mozku patrně účastní transportu glutaminu v glutamin-glutamátovém cyklu v gliových buňkách (Bröer *et al.* 1999) a také selektivního transportu L-izoformy kyseliny asparagové přes hematoencefalickou bariéru (Tetsuka *et al.* 2003). Nadměrná exprese ASCT2 byla navíc popsána u mnoha typů nádorového bujení, a to u melanomů (Wang *et al.* 2014), kolorektálního karcinomu (Toda *et al.* 2017), rakoviny plic (Shimizu *et al.* 2014), prostaty (Wang *et al.* 2015), slinivky (Kaira *et al.* 2015) a prsu (Kim *et al.* 2013). V těchto případech je abnormálně velká produkce ASCT2 vysvětlována tím, že rakovinné buňky vyžadují pro svůj metabolismus vysokou koncentraci glutaminu (DeBerardinis *et al.* 2007), který tento protein transportuje. Produkce ASCT2 je v tkáních ještě rozšířenější než v případě ASCT1. Byla detekována v mozku (Bröer *et al.* 1999; Gliddon *et al.* 2009), plicích, kosterním svalstvu, tukové tkáni, tlustém střevě, varlatech (Utsunomiya-Tate *et al.* 1996), ale i v mnoha dalších tkáních a tělních tekutinách (viz Obrázek 1). Kromě transportu aminokyselin se ASCT1 a ASCT2 proteiny účastní i dalšího, zcela nezávislého procesu.

2.2. Retroviróvé receptory

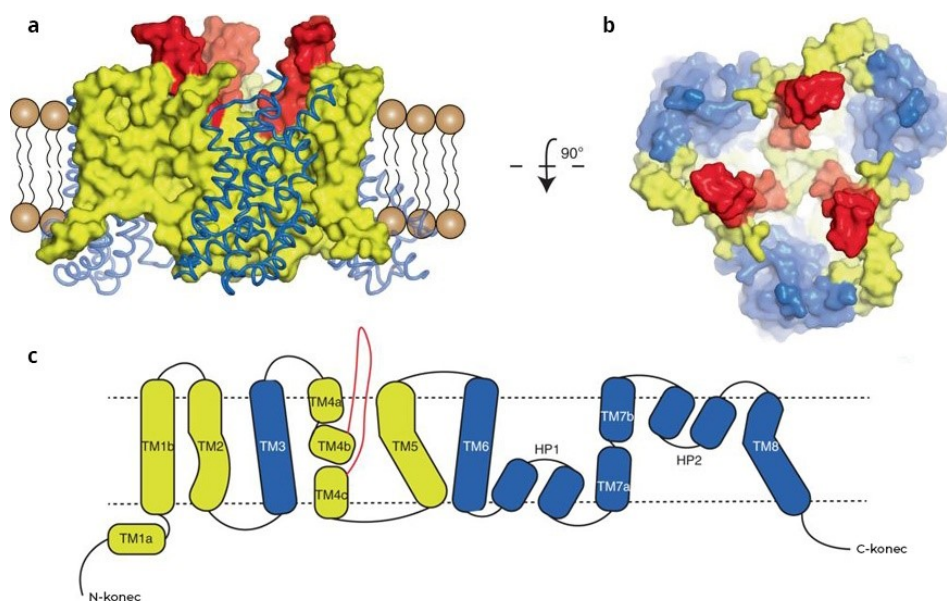
Dvě na sobě nezávislé studie přišly v roce 1999 se zjištěním, že transmembránové přenašeče neutrálních aminokyselin ASCT1 a ASCT2 fungují navíc i jako receptory některých retrovirů (Tailor *et al.* 1999; Rasko *et al.* 1999). Konkrétně se jedná o retroviry interferenční skupiny RDR (zahrnuje RD114 a retroviry typu D), které ke svému vstupu do buňky využívají společný receptor – lidský ASCT2 (Koo *et al.* 1994; Tailor *et al.* 1999; Rasko *et al.* 1999). Paviání endogenní retrovirus (BaEV) a lidský endogenní retrovirus typu W (HERV-W), které jsou také součástí RDR skupiny, dokáží ovšem do buněk vstupovat i přes alternativní lidský receptor ASCT1 (Tailor *et al.* 1999; Lavillette *et al.* 2002). Seznam vybraných retrovirů RDR skupiny, které využívají lidské proteiny ASCT1 a ASCT2 jako receptory, je uveden v Tabulce 1 v podkapitole 3.1 Základní charakteristika skupiny RDR.

Pokusy na savčích modelech nicméně ukázaly, že testovaná zvířata jsou vůči infekci některými RDR retroviry rezistentní, protože nesou na povrchu svých buněk orthology ASCT1 a ASCT2, na které se tyto retroviry nedokážou vázat (Marin *et al.* 2000, 2003; Lavillette *et al.* 2002). Molekulární podstata tohoto chování bude detailněji probrána v podkapitole 4.2 Receptor ASCT2 – „dokovací“ místo pro Syncytin-1.

2.3. Molekulární struktura ASCT2

Získat přesný model prostorové struktury membránových proteinů není ani v dnešní době jednoduchý proces. Extrakce transmembránových proteinů pro krystalografickou analýzu je velice obtížná a často přesahuje i naše technické možnosti. Kryoelektronová mikroskopie se nicméně v posledních letech stala v rukou chemiků a molekulárních biologů mocným nástrojem sloužícím k odhalování struktury a chování biomolekul v téměř atomovém rozlišení. Za objev této revoluční zobrazovací metody získali v roce 2017 Jacques Dubochet, Joachim Frank a Richard Henderson Nobelovu cenu za chemii.

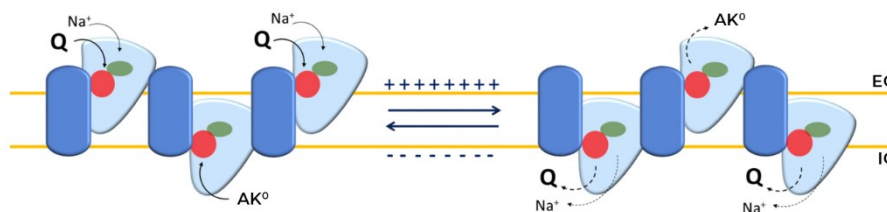
Přesnosti této metody využili i Garaeva *et al.* (2018) při odhalování prostorové struktury proteinu ASCT2. Jejich výsledky potvrdily, že ASCT2, podobně jako některé další známé struktury glutamátových transportérů – SLC1A3 (Canul-Tec *et al.* 2017), Glt_{Ph} (Yernool *et al.* 2004) a Glt_{Tk} (Jensen *et al.* 2013) – tvoří proteinový homotrimer. Každý z protomerů se pak skládá z osmi transmembránových domén TM1-8, které dále rozdělujeme na tzv. scaffold (z angl. „lešení“) a transportní domény, a dvou transmembránových vlásenek HP1 a HP2 (z angl. helical hairpin; viz Obrázek 2). Zatímco scaffold domény TM1, 2, 4 a 5 tvoří statickou centrální oporu a zajišťují oligomerizaci a uchycení proteinu v membráně, pohyblivé transportní domény TM3, 6, 7 a 8 s vlásečkami HP1 a HP2 se vyskytují spíše na vnější straně komplexu, kde dochází k transportu substrátu. Vlásoky HP1 (mezi doménami TM6 a 7) a HP2 (mezi doménami TM7 a 8) slouží jako vstupní brány substrátu do transportéru na obou stranách membrány. HP1 na cytoplasmatické a HP2 na extracelulární straně vpouští substrát do transportních domén s vazebnými místy. Transportní domény substrát posléze translokují na opačnou stranu membrány mechanismem připomínajícím provoz výtahu (angl. elevator-like mechanism), jež byl poprvé popsán u bakteriálního homologu Glt_{Ph} (Lee *et al.* 2013; Akyuz *et al.* 2015).



Obrázek 2 | Strukturní model ASCT2. a – boční pohled na prostorovou strukturu proteinu ukotvenou v membráně, b – pohled shora: smyčka ECL2 (červeně) vyčnívá do extracelulárního prostoru a ohraničuje vstup do jádra proteinu, c – membránová topologie, schéma ilustruje uspořádání jednotlivých domén v jednom ze tří identických protomerů ASCT2. Scaffold domény jsou vyznačeny žlutě, transportní domény modře a místa pravděpodobně interagující s retroviry jsou vyznačena červeně. Převzato a upraveno z Garaeva *et al.* (2018).

Transport substrátu je obousměrný a probíhá v každém protomeru nezávisle a simultánně (viz Obrázek 3). Jsou-li C-konec transportní domény TM6 a vlásenka HP1 vychýleny od scaffold domén směrem do intracelulárního prostoru, mohou se do nich vázat cytoplasmatické neutrální aminokyseliny, které jsou posléze translokovány do extracelulárního prostoru. Vychýlení transportní domény do cytoplasmy buňky je zřejmě stabilizováno solným můstkem, který vzniká mezi Arg101 na scaffold doméně a Glu444 na transportní doméně. Ve stejný okamžik mohou být na jiném protomeru v extracelulární části transportéru analogickým způsobem navázány na transportní doméně TM8 a vlásence HP2 Na^+ ionty společně s glutaminem, které jsou přenášeny opačným směrem do cytoplasmy buňky (Garaeva *et al.* 2018). Tento mechanismus funguje podobně i opačným směrem, kdy je glutamin translokován ven z buňky. Neutrální aminokyseliny alanin, serin, asparagin a threonin mohou být transportovány přes membránu oběma směry a zajišťovat tak vstup i výstup glutaminu. Valin a cystein jsou transportovány pouze dovnitř buňky a zajišťují vtok glutaminu (Scalise *et al.* 2018).

Jak již bylo zmíněno výše (viz podkapitola 2.2. Retrovirové receptory), proteiny ASCT1 a ASCT2 zastávají též funkci receptorů retrovirů interferenční skupiny RDR. V roce 2003 byla u proteinu ASCT2 v oblasti ECL2 identifikována sekvence 21 aminokyselin, která hraje kritickou roli při rozpoznávání receptoru retroviry RDR skupiny (Marin *et al.* 2003). Tato sekvence se ukázala být pro všechny přenašeče SLC1 rodiny variabilní jak svojí délkou, tak zastoupením jednotlivých aminokyselin a přítomností N-glykosylací. Analýza molekulární struktury ASCT2 ve studii Garaeva *et al.* (2018) odhalila, že analogický úsek 28 aminokyselin v oblasti ECL2 na ASCT2 vyběhá do extracelulárního prostoru mezi helikálními segmenty TM4b a TM4c (viz Obrázek 2). Tento úsek autoři označili jako místo interagující s retroviru. Usuzuje se, že podobné prostorové uspořádání ECL2 oblasti by mohlo být v budoucnu nalezeno i u proteinu ASCT1, avšak podrobná struktura tohoto proteinu dosud nebyla vytvořena. Interakcím mezi retrovirovými obalovými glykoproteiny a ECL2 oblastí ASCT2 se bude podrobně věnovat podkapitola 4.2 Receptor ASCT2 – „dokovací“ místo pro Syncytin-1.



Obrázek 3 | Transportní mechanismus homotrimeru ASCT2. Statické scaffold domény (tmavě modrá) ukotvují protein v membráně. Transportní domény (světle modrá) translokují substrát přes membránu v obou směrech. V extracelulární části (EC) se do svých vazebných míst na transportní doméně vážou Na^+ ionty (zelený kruh) s glutaminem (Q; červený kruh), v intracelulární části (IC) se na vazebné místo glutaminu vážou i další neutrální aminokyseliny (AK° ; červený kruh). Substrát je transportován pohybem podobným provozu výtahu. Převzato a upraveno z Scalise *et al.* (2018).

Stručně lze shrnout, že proteiny ASCT1 a ASCT2 představují důležité zástupce transmembránových přenašečů neutrálních aminokyselin, které jsou produkovány v celé řadě tkání, specializovaných buněk a tělních tekutin. Podílí se na selektivním transportu různých neutrálních aminokyselin do místa jejich spotřeby a jsou součástí mnoha buněčných fyziologických procesů. Kromě své transportní funkce slouží

ASCT1 i ASCT2 navíc jako receptory pro vstup retrovirů RDR interferenční skupiny do buněk hostitele. Nedávno popsaná struktura ASCT2 odhalila, že tento protein, stejně jako ostatní zástupci glutamátových transportérů, tvoří homotrimer, kde je každý z protomerů složen z celkem osmi transmembránových podjednotek. Poprvé byla také spatřena struktura oblasti ECL2, na kterou se pravděpodobně vážou zmíněné retroviry.

Další kapitola se bude zabývat obalovými glykoproteiny retrovirů, které pro svůj vstup do buněk využívají receptory ASCT1 a ASCT2. Významná část bude věnována obalovému glykoproteinu Syncytin-1, který je velmi vzácným příkladem toho, že i virové proteiny mohou mít pro hostitele prospěšné vlastnosti.

3. Retroviry RDR interferenční skupiny

V 60. letech minulého století Rubinova práce zkoumala rezistenci kuřecích embryonálních buněk vůči infekci virem Rousova sarkomu (RSV). Experimenty odhalily v buňkách agens, Rubinem pojmenované jako RIF (rezistenci-indukující faktor), jehož přítomnost inhibovala infekci RSV (Rubin 1960). Agens bylo nakonec identifikováno jako kongenitálně přenosný ptačí leukózní virus (ALV, angl. avian leukosis virus), který měl afinitu ke stejnému receptoru jako RSV a jeho obalové glykoproteiny kompetičně blokovaly přístup RSV k receptorům (Rubin 1961; Steck and Rubin 1966a; b). Jev, kdy retrovirus inhibuje superinfekci buňky dalšími retroviry, které využívají stejný receptor, dnes nazýváme jako retroviróvá superinfekční interference.

Z praktických důvodů se proto viry začaly rozdělovat do tzv. receptorových interferenčních skupin, jelikož stejný receptor mohou ke vstupu do buněk využívat i navzájem nepříbuzné druhy virů. Jednou z těchto skupin jsou i retroviry RDR interferenční skupiny.

3.1. Základní charakteristika skupiny RDR

RDR (angl. RD114 and D-type retrovirus interference group) je dosud největší identifikovanou interferenční skupinou retrovirů. Tato skupina čítá minimálně 23 zástupců, které všechny pro svůj vstup do buněk využívají lidský transmembránový přenašeč neutrálních aminokyselin – protein ASCT2 (Tailor *et al.* 1999; Rasko *et al.* 1999). Další znaky, kterými jsou například forma výskytu nebo samotné rodové zařazení retroviru, se už v rámci skupiny mezi jednotlivými zástupci liší (viz Tabulka 1). Najdeme zde endo- i exogenní formy retrovirů z rodů *Beta-* a *Gammaretrovirus*, ale i jejich rekombinantní varianty (Sommerfelt and Weiss 1990; Kewalramani *et al.* 1992). Mezi jejich hostitele patří převážně savci včetně člověka a také některé druhy ptáků. O roli receptoru v určování hostitelské specifity bude pojednávat podkapitola 4.2. Receptor ASCT2 – „dokovací“ místo pro Syncytin-1. Retroviróvý obalový glykoprotein je interakčním partnerem receptoru a je neméně důležitý pro rozpoznání citlivého hostitele.

Významnou roli v evoluci RDR skupiny sehrály mezidruhové výměny retroviróvého genu *env*, který se nejvíce podobá *env* sekvenci zástupců rodu *Gammaretrovirus*. Gen *env* je u všech zástupců interferenční skupiny RDR homologní, a proto všechny tyto retroviry vstupují do buněk přes společný receptor – ASCT2. Protože RDR skupinu tvoří velmi různorodí a navzájem nepříbuzní zástupci z různých rodin retrovirů (viz Tabulka 1), tento jev je připisován rekombinačním událostem, ke kterým docházelo v průběhu evoluce. Pokud buňku současně napadlo více druhů retrovirů, mohlo u nich vlivem rekombinace dojít k výměně genů nebo jejich částí a vzniku zcela nového druhu. V případě, že retrovirus touto cestou získal například heterologní *env*, změnilo se i jeho využití receptoru pro vstup do buňky (Sinha and Johnson 2017).

Tabulka 1 | Přehled vybraných retrovirů RDR interferenční skupiny. Tabulka prezentuje rozdíly v hostitelské specifitě, formě výskytu a rodové klasifikaci mezi zástupci RDR skupiny. Jediným společným znakem zůstává receptor pro vstup do buňky – protein ASCT2. Někteří zástupci (BaEV, HERV-W) mohou využívat jako alternativní receptor i protein ASCT1. Převzato a upraveno z Funk *et al.* (2019) a Sinha and Johnson (2017).

Druh	Rod ^b	Forma	Hostitel/genom	Receptor
SRV-1	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak rhesus	ASCT2
SRV-2	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak jávský, makak vepří	ASCT2
SRV-3/M-PMV	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak rhesus	ASCT2
SRV-4	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak jávský	ASCT2
SRV-5	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak rhesus	ASCT2
Po-1-Lu	Betaretrovirus ^a	Endogenní	Languři	^c
SRV-6	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Languři	ASCT2
SRV-7	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Makak rhesus	ASCT2
SMRV	Betaretrovirus ^a	Exogenní	Kotul veverovitý	ASCT2
RD114	Gammaretrovirus	Endogenní	Kočka	ASCT2
REV/CSV/SNV/DIAV	Gammaretrovirus	Exogenní	Slepice, kachny	ASCT2
BaEV	Gammaretrovirus	Endogenní	Pavián	ASCT2/ASCT1
DnERV	Betaretrovirus ^{a,b}	Endogenní	Pásovcovití	ASCT2
HERV-W/Syncytin-1	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Člověk	ASCT2/ASCT1
ame-ERV-Fc1	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Panda velká	^c
Rabbit Syncytin-ory 1	^c	Endogenní	Králík	ASCT2
TvERV	Betaretrovirus ^{a,b}	Endogenní	Vačice	^c
DrERV	Betaretrovirus ^{a,b}	Endogenní	Netopýr	^c
MMERV-β6	Betaretrovirus ^{a,b}	Endogenní	Myš	^c
CfERV-Fc1	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Pes	^c
mFuERV	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Fretka	^c
GeERV	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Galidie proužkovaná	^c
Hyena-Env3	Gammaretrovirus ^b	Endogenní	Hyena	ASCT2

^a Beta/gamma rekombinantní.

^b Neklasifikovaný ERV, uveden je pouze pravděpodobný rod.

^c Není známo.

Mezi známé *env* geny retrovirů RDR skupiny patří *syncytin-1*, kódující stejnojmenný fúzní glykoprotein. Syncytiny zásadním způsobem ovlivnily dosavadní vývoj největší skupiny savců – placentálů. Bude se jimi zabývat následující podkapitola.

3.2. Syncytiny

Syncytiny představují obalové glykoproteiny endogenních retrovirů, které umožňují fúzi buněk v placentě. *Env* geny, kódující tyto proteiny, si navzdory velkému selekčnímu tlaku během evoluce udržely transkripčně aktivní otevřený čtecí rámec a jsou dodnes exprimovány v placentárním syncytiotrofoblastu savců včetně člověka (Malassiné *et al.* 2005, 2007; Muir *et al.* 2006). Mnoho placentálních savců si v genomu nese své vlastní druhy syncytinů, které během evoluce nezávisle na sobě získaly stejnou funkci. U člověka tuto skupinu představují dva zástupci, a to Syncytin-1 (skupina HERV-W; Mi *et al.* 2000; Blond *et al.* 2000) a Syncytin-2 (skupina HERV-FRD; Blaise *et al.* 2003). Protože Syncytin-2 využívá ke své interakci s buňkou jako receptor karbohydrátový transportér MFSD2 (Esnault *et al.* 2008), pozornost bude v této práci zaměřena na protein Syncytin-1, který interaguje s receptory ASCT1 a ASCT2.

3.2.1. HERV-W

První ze dvojice lidských syncytinů, Syncytin-1, patří mezi lidské endogenní retroviry typu W (HERV-W), které přibližně před 25–40 miliony let vstoupily ještě jako aktivní exogenní viry do germinální linie našich předků a integrovaly se do jejich genomu (Kim *et al.* 1999; Voisset *et al.* 1999). Tyto prastaré retroviry jsou podobné dnešním zástupcům rodu *Gammaretrovirus* (Blond *et al.* 1999).

Integrované sekvence odvozené od HERV-W jsou náhodně rozmístěny po celém lidském genomu a v odborné literatuře se často setkáváme s jejich odlišnými počty. Podle veřejně přístupné databáze Dfam, tato čísla přesahují více jak 4000 DNA sekvencí HERV-W na lidský genom (Hubley *et al.* 2016). Komplexní analýza 216 vybraných HERV-W elementů přinesla aktualizované informace o distribuci těchto sekvencí. Celkem 80 HERV-W sekvencí je vloženo v nějakém lidském genu. Z tohoto počtu jich je 55 vloženo do protein-kódujících a 25 do protein-nekódujících genů. Identifikováno bylo celkem 16 téměř celých nebo zcela neporušených a 10 zkrácených *env* sekvencí (Grandi *et al.* 2016).

Ačkoliv integrované proviry skupiny HERV-W dnes již netvoří žádné infekční částice, došlo navzdory milionům let evolučního vývoje k úplnému zachování ORF provirového *env* genu *syncytin-1* (synonymně také ERVWE1). Gen *syncytin-1* (lokus ERVW-1) se nachází na chromozomu 7, konkrétně v lokusu 7q21-7q22 (Mi *et al.* 2000). Právě tento gen kóduje stejnojmenný fúzní glykoprotein Syncytin-1.

3.2.2. Regulace exprese genu *syncytin-1*

Expese genu *syncytin-1* je významně regulována epigenetickými mechanismy. Jedná se například o metylaci DNA v promotorové oblasti U3, která je součástí 5' LTR sekvence proviru ERVW1. Promotor U3 obsahuje celkem pět CpG dinukleotidů, které mohou být dle potřeby methylovány a tím znepřístupnit transkripčním faktorům iniciaci transkripce (Obrázek 4A). Hypermethylace U3 byla pozorována v neplacentárních tkáních, kde je produkce proteinu Syncytin-1 nežádoucí a jeho syntéza je zde proto zastavena už ve fázi transkripce. Naproti tomu v placentárním syncytiotrofoblastu jsou promotory hypometylované a transkripčně aktivní (Matoušková *et al.* 2006). Methylační profil U3 promotoru však není fixní, může se v čase měnit a odpovídat na intra- a interbuněčnou signalizaci. Příkladem je fúze buněk v syncytiotrofoblastu, která musí být pro správný vývoj placenty vhodně načasovaná. V prvním trimestru těhotenství je proto U3 promotor výrazně hypometylován, dochází k proteosyntéze Syncytinu-1 a k fúzi buněk v mnohojaderné syncytium. V pokročilém těhotenství je U3 postupně methylován a produkce proteinu se snižuje (Gimenez *et al.* 2009).

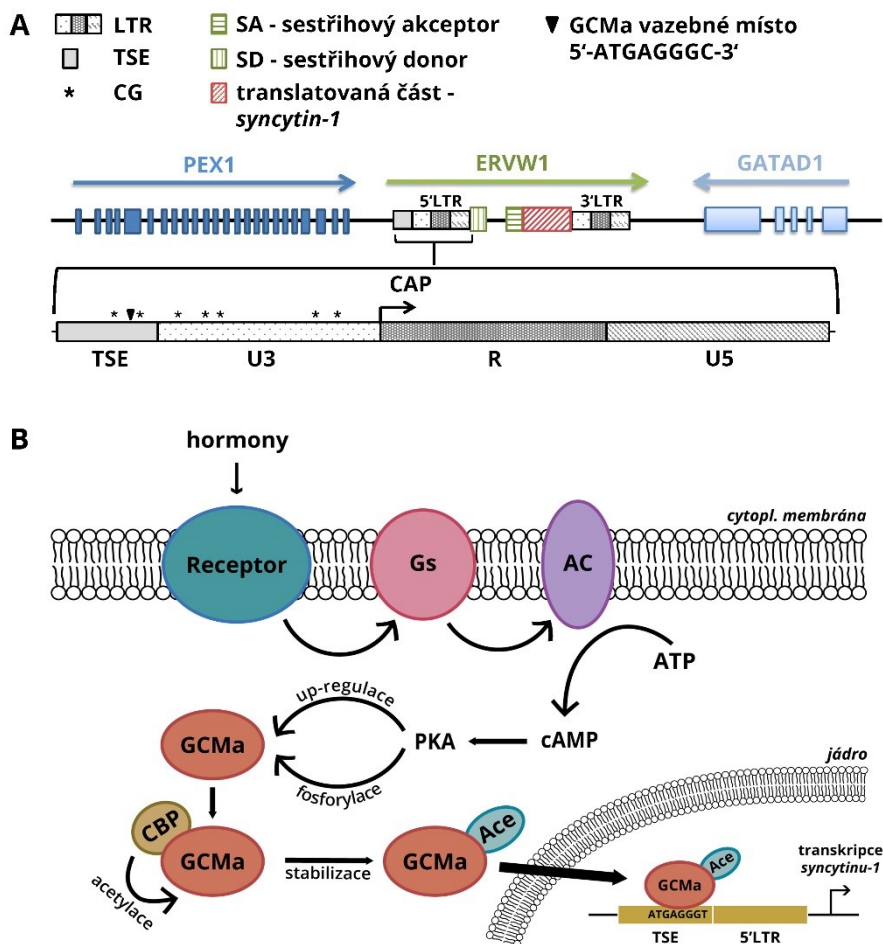
Důležitou úlohu v epigenetické regulaci exprese *syncytinu-1* hrají i posttranslační modifikace histonů. Histony jsou silně bazické proteiny, které společně s DNA vytváří kompaktní nukleoproteinový komplex zvaný nukleozom. Kromě kondenzace genomové DNA histony modulují také transkripci genů. Mezi transkripci-aktivující modifikace histonů řadíme mimo jiné acetylace histonů 3 a 4 (H3 a H4) nebo trimethylaci lysinu 4 na histonu 3 (H3K4me3). Transkripci naopak deaktivují modifikace, jako jsou trimethylace H3K9me3 a H3K27me3.

Trejbalová *et al.* (2011) objevili v buněčné linii BeWo, odvozené od lidského choriokarcinomu, bohatě acetylované histony H3 v oblasti 5' LTR ERVW1 a pouze zanedbatelné množství trimethylovaných H3K9me3. Přesně naopak tomu bylo u lidské linie HeLa, která je odvozena od karcinomu děložního hrdla, a na rozdíl od BeWo nevykazuje expresi *syncytinu-1*. HeLa buňky měly ve stejné oblasti zvýšený výskyt trimethylovaných H3K9me3, které transkripci umlčují, a téměř žádné zastoupení transkripci-aktivujících acetylací histonu H3.

Mimo výše zmíněných epigenetických modifikací DNA se na regulaci tkáňově specifické transkripce *syncytinu-1* podílí i transkripční faktor GCMA (angl. Glia Cells Missing a; Yu *et al.* 2002). Protein GCMA je produkován striktně v placentě a jeho hlavní funkcí je zajistit kontrolovanou diferenciaci buněk placentárního trofoblastu (Anson-Cartwright *et al.* 2000). GCMA se na enhancer *syncytinu-1* váže do dvou sekvenčních motivů, které leží upstream od 5' LTR v úseku označovaném jako TSE (angl. trophoblast-specific enhancer), a spouští transkripci (Yu *et al.* 2002). Samotný transkripční faktor GCMA musí být pravděpodobně ještě před navázáním na promotor aktivován acetylací lysinů (K367, 406, 409) pomocí enzymu CBP (CREB-binding protein), který je součástí cAMP-PKA dráhy (Chang *et al.* 2005). Dráhu schematicky ilustruje Obrázek 4B.

Na rozdílnou tkáňovou expresi *syncytinu-1* má vliv i alternativní sestřih. Transkribovaný gen lze v buňkách nalézt ve třech různě sestřižených izoformách mRNA (8,0; 3,1; 1,3 kb). Všechny tyto transkripty byly pozorovány již v práci Blond *et al.* (1999), která jako první charakterizovala nově objevenou skupinu endogenních retrovirů HERV-W. Pouze sestřižená 3,1kb forma však obsahuje otevřený čtecí rámec a je translatována ve funkční protein Syncytin-1 (Obrázek 4A, zeleně a červeně šrafované oblasti). Výsledky kvantitativní analýzy sestřihu provirového genomu ERVW1 ukázaly na rozdílné množství všech tří izoform v placentárních a neplacentárních liniích. BeWo buňky obsahovaly až šestkrát vyšší koncentraci 3,1kb izoformy s ORF než nesestřižených mRNA (8,0 kb). V HeLa buňkách byly naproti tomu naměřeny velmi nízké koncentrace 8,0kb mRNA a žádné stopy po výskytu 3,1kb transkriptu. Jako možné vysvětlení se jeví zjištění, že se u BeWo na intronu a rozhraní intron/exon v ERVW1 nalézá vyšší množství trimethylací H3K36me3, které slouží jako pozitivní regulátory transkripce a podílí se pravděpodobně i na pre-mRNA sestřihu protein-kódující 3,1kb izoformy – *syncytinu-1* (Trejbalová *et al.* 2011).

Z uvedených příkladů regulace *syncytinu-1* je patrné, že v buňkách existuje více mechanismů, jak lze expresi tohoto genu kontrolovat. Tato kontrola probíhá jak na úrovni epigenetické, tak i transkripční a posttranskripční. Zahrnuje ale i základní dráhy buněčné signalizace, jako je například aktivace transkripčního faktoru GCMA pomocí cAMP-PKA dráhy. Syntéza genového produktu –proteinu Syncytin-1 – musí být v těle přísně regulována kvůli jeho vysoké fúzogenní a zřejmě i imunosupresivní aktivitě, které jsou žádoucí pouze v určitých tkáních placenty. To je důležité zejména v případech, kdy je exprese jeho receptoru ubikvitní.



Obrázek 4 | A | Regulační a sestřihové oblasti *syncytinu-1*. Provirus ERVW1, kódující *env* gen *syncytinu-1*, je na chromozomu 7 obklopen geny PEX1 (5' konec) a GATAD1 (3' konec). ERVW1 ohraničují na obou koncích LTR sekvence. Před 5' LTR se nachází úsek TSE s vazebným motivem pro GCMA. 5' U3 slouží jako promotor. Hvězdičky označují CpG dinukleotidy, které mohou být methylovány (2x v TSE, 5x v 5' U3). Exprese mRNA *syncytinu-1* (červeně) začíná od počátku repetice R. Zeleně jsou vyznačena místa alternativního sestřihu (SA a SD). Převzato a upraveno z Huang *et al.* (2014).

B | Aktivace transkripce genu *syncytinu-1* přes cAMP-PKA dráhu v placentě. Tato signální dráha dokáže reagovat na vnější hormonální podněty přes receptory spřažené s G-proteiny. G-proteiny (Gs) vzápětí aktivují adenylát cyklázu (AC), která začne syntetizovat cAMP z ATP. Vysoká koncentrace cAMP způsobí aktivaci protein-kinázy A (PKA), která katalyzuje fosforylaci GCMA. Pouze fosforylovaný GCMA může být acetylován (Ace) proteinem CBP, který poté vstupuje do jádra, váže se na sekvenci motiv ATGAGGGT v oblasti TSE a spouští transkripci *syncytinu-1* (Chang *et al.* 2005). Upraveno podle Huang *et al.* (2014).

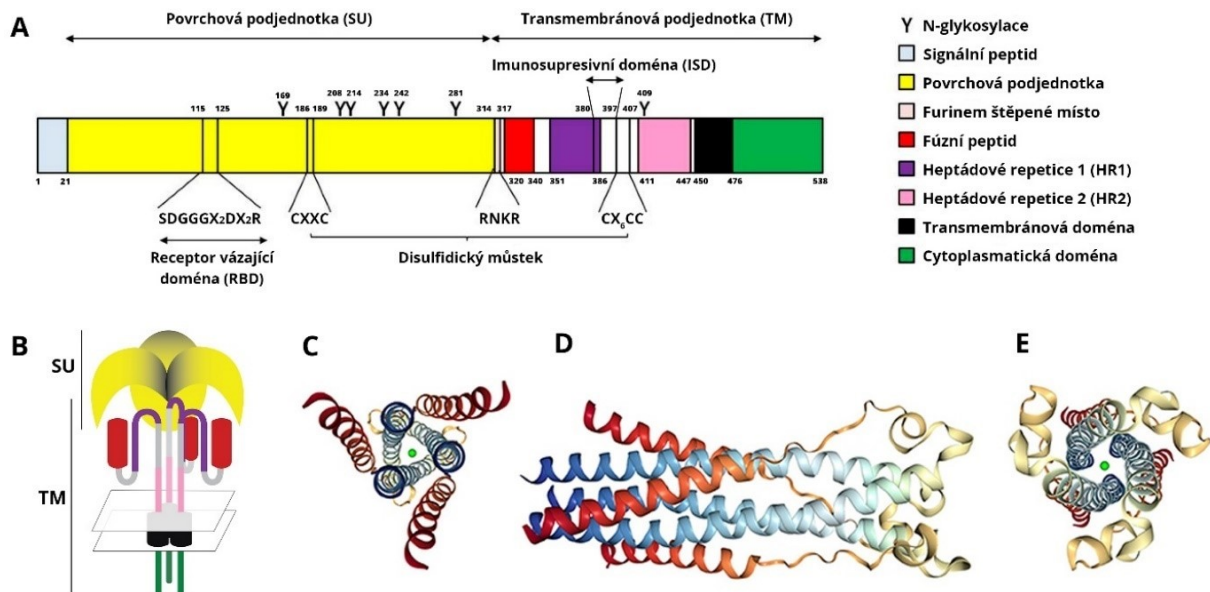
3.2.3. Protein Syncytin-1

Protein Syncytin-1 byl nezávisle na sobě poprvé popsán v několika studiích (Blond *et al.* 1999, 2000; Mi *et al.* 2000). Americká skupina ho objevila, když v rámci jiné práce analyzovala transkriptom lidských varlat. Jedna z jimi izolovaných cDNA vykazovala podle databáze GenBank 100% sekvenční shodu s *env* genem nedávno objevené skupiny lidských endogenních retrovirů, HERV-W, a gen byl pojmenován ERVWE1. Kvantifikace RNA transkriptů pomocí northern blotu ukázala na vysokou expresi tohoto genu v placentě, slabší expresi v původně analyzovaných varlatech a žádnou produkci v ostatních tkáních. Další experimenty se již zaměřily přímo na expresi ERVWE1 v placentě. S využitím metody *in situ* hybridizace bylo zjištěno, že je produkce transkriptů soustředěna v placentárním syncytiotrofoblastu, tkáni tvořené obrovskými mnohojadernými buňkami, tzv. syncytiem. Transfekce opičích COS buněk vektorem obsahujícím gen ERVWE1 způsobila, že buňky začaly mezi sebou fúzovat a vytvořily stejně jako v placentě syncytium s desítkami jader. Protein byl pro své vysoce fúzogenní vlastnosti pojmenován Syncytin-1 (Mi *et al.* 2000).

Syntéza a vlastnosti Syncytinu-1 jsou velmi obdobné jako u jiných virových fúzních proteinů třídy I (např. u HIV-1, SIV, MLV, Eboly, viru chřipky). Syntéza proteinu začíná translací prekurzoru gPr73 (73 kDa, 538 aminokyselin) do lumen endoplasmatického retikula (ER), kam je vznikající protein „adresován“ svým N-koncovým signálním peptidem. Syncytinový prekurzor je v ER kotranslačně glykosylován a vzniká zde i disulfidický můstek mezi povrchovou (SU, angl. surface subunit) a transmembránovou (TM, angl. transmembrane subunit) podjednotkou (Obrázek 5A). Maturace proteinu se odehrává až v Golgiho aparátu, kde dochází k asociaci tří molekul gPr73 v homotrimer, který je stabilizován interakcemi mezi heptádovými repeticemi 1 a 2. Všechny prekurzory jsou v motivu RNKR štěpeny furinovou buněčnou endoproteázou na dvě části – 50kDa SU (gp50) a 24kDa TM podjednotku (gp24). Maturovaný oligomer je tedy tvořen třemi heterodimery z SU a TM podjednotek, v ER je začleněn membrány a spolu s ní je transportován na cytoplasmatickou membránu buňky (Cheynet *et al.* 2005; Gong *et al.* 2005).

Na SU se kromě signálního peptidu nalézá vazebná doména pro receptor (RBD, angl. receptor binding domain), důležitá pro interakci s receptory ASCT1 a ASCT2, a celkem šest glykosylací. TM je naproti tomu glykosylována pouze v jednom místě a obsahuje celou řadu domén a sekvenčních motivů. Najdeme zde fúzní peptid, který se přímo podílí na procesu fúze s membránou cizí buňky, heptádové repetice 1 (HR1) a 2 (HR2), které tvoří strukturní motiv provázaných alfa-helixů (tzv. coiled coil; Obrázek 5C,D,E), imunosupresivní doménu (ISD) a nakonec transmembránovou a cytoplasmatickou doménu. Obě podjednotky obsahují také sekvenční motiv bohatý na aminokyselinu cystein (na SU podjednotce motiv CXXC, na TM podjednotce motiv CX₆CC). Mezi těmito cysteiny vzniká v ER kovalentní vazba, tzv. disulfidický můstek, který vytvoří stabilní spojení mezi SU a TM (Cheynet *et al.* 2005). Trimerní

coiled-coil struktura fúzní podjednotky (aminokyselinová pozice 343-435) je navíc stabilizována chloridovým aniontem Cl⁻, který se elektrostatickými interakcemi váže na asparaginy ve vnitřní části protomerů (Lamb *et al.* 2011). Strukturu proteinu Syncytin-1 schematicky ilustruje Obrázek 5A,B.



Obrázek 5 | A| Schematická struktura protomeru v proteinu Syncytin-1. Směrem od N-konce proteinu se nachází signální peptid (světle modře), za kterým následují dvě hlavní strukturální podjednotky. První je povrchová podjednotka (SU, žlutě), která obsahuje receptor vázající doménu (RBD) a CXXC motiv. Na ni navazuje transmembránová podjednotka (TM), kterou tvoří fúzní peptid (červeně), heptádové repetice 1 (HR1, fialově) a 2 (HR2, růžově), imunopresivní doména (ISD), transmembránová doména (černě), cytoplasmatická doména (zeleně) a CX₆CC motiv. Podjednotky SU a TM jsou odděleny sekvencí RNKR, která je štěpena buněčnou furinovou endoproteázou. Mezi motivy CXXC (na SU) a CX₆CC (na TM) vzniká disulfidický můstek, spojující obě podjednotky. Čísla udávají pořadí aminokyselin v proteinu (1-538). N-glykosylace jsou vyznačeny znakem Y. Převzato a upraveno z Bastida-Ruiz *et al.* (2016).

B| Membránová topologie Syncytinu-1. Obrázek ilustruje uspořádání jednotlivých domén v trimerní uskupení ukotveném v membráně. Barevné označení odpovídá schématu v Obrázku 5A. Cytoplasmatická membrána je znázorněna bílými obdélníky. Převzato a upraveno z Schlecht-Louf *et al.* (2010).

C,D,E| Prostorová uspořádání α-helixů HR1 a HR2 v rámci TM podjednotky Syncytinu-1 (aminokyselinová pozice 343-435). Trimerní uskupení hydrofóbních α-helixů HR1 a HR2 (červeně a modře) se uplatňuje při průniku fúzního peptidu do membrány cílové buňky. Část C zobrazuje pohled shora, část D pohled z boku a část E pohled zespoda. Trimerní struktura je stabilizována chloridovým aniontem (zeleně). Převzato a upraveno z Grandi and Tramontano (2018).

3.2.4. Fúzenní a imunopresivní aktivita

Jak již bylo zmíněno výše, Syncytiny hrají důležitou roli ve správném vývoji placenty. Jejich schopnost navozovat buněčné fúze se uplatňuje při vzniku syncytiotrofoblastu, tkáně zodpovědné za fetomaternální přenos živin, hormonů a plynů.

V případě člověka se již v počáteční fázi těhotenství diferencují z plodového vnějšího trofoblastu dvě vrstvy buněk, a to cytotrofoblast a syncytiotrofoblast. Syncytiotrofoblast se formuje fúzí buněk cytotrofoblastu a je v přímém kontaktu s oběhovým systémem matky. Díky rozsáhlému povrchu syncytia dochází k efektivnější výměně živin, hormonů, plynů a dalších molekul mezi matkou a plodem (Lager and Powell 2012). Poruchy související se vznikem nebo omezenou funkcí syncytiotrofoblastu jsou proto často spojovány s řadou patologií, jako je například preeklampsie (Vargas *et al.* 2011).

Fúze buněk cytotrofoblastu zajišťují glykoproteiny retrovirového původu. U člověka jsou jimi Syncytin-1 a Syncytin-2. Zatímco produkce Syncytinu-1 je soustředěna převážně ve vilózním a extravilózním syncytiotrofoblastu (Malassiné *et al.* 2005; Muir *et al.* 2006), protein Syncytin-2 se vyskytuje pouze ve vilózním cytotrofoblastu (Malassiné *et al.* 2007). Samotnému mechanismu fúze zprostředkované proteinem Syncytin-1 se bude podrobněji věnovat kapitola 4. Interakce ASCT2 s glykoproteinem Syncytin-1.

Kromě fúzogenních vlastností mají syncytiny také schopnost modulovat imunitní odpověď matky vůči plodu. Protože potomek dědí vždy polovinu genů od otce, které imunitní systém matky rozeznává, je specifická suprese imunitní odpovědi v těhotenství zásadní pro zdárný vývoj plodu. Schopnost vyvolat imunosupresi je dána přítomností imunosupresivní domény (ISD), vyskytující se v obalových glykoproteinech řady virů. ISD představuje u mnoha retrovirových Envů včetně Syncytinů vysoce konzervovaná 17 aminokyselinová sekvence na TM podjednotce. Již mnohokrát bylo dokázáno, že samotná exprese ISD peptidu vyvolává imunosupresi různých typů imunitních buněk (Cianciolo *et al.* 1985; Nelson *et al.* 1989; Haraguchi *et al.* 1995).

U Syncytinu-1 bylo *in vitro* prokázáno, že inhibuje cytokinovou odpověď stimulovanou lipopolysacharidy (LPS) a fytohemaglutininem (PHA). Po přidání těchto imunitních stimulantů a Syncytinu-1 v různých koncentracích do lidského séra byla oproti kontrole naměřena významná inhibice cytokinů TNF- α (až 50 % inhibice), IFN- γ (až 35 % inhibice) a chemokinu CXCL10 (až 65 % inhibice; Tolosa *et al.* 2012). TNF- α a IFN- γ patří mezi Th1 skupinu cytokinů, které jsou produkovány aktivovanými Th1 lymfocyty za účelem vybuzení makrofágů a B-lymfocytů. Tento typ cytotoxické imunitní odpovědi je však nežádoucí během těhotenství kvůli možnému poškození plodu, a proto nastává v tomto období k tzv. přepnutí na bezpečnější Th2 odpověď. V té dochází k aktivaci B-lymfocytů, což vyústí v produkci protilátek namířených hlavně proti extracelulárním patogenům. V experimentech provedených ve studii Haraguchi *et al.* (1995) bylo popsáno, že imunosupresivní doména retrovirů je schopna přepnutí z Th1 na Th2 navozovat. Dle zjištění Tolosa *et al.* (2012) Syncytin-1 znatelně inhibuje Th1 imunitní odpověď, a proto se nabízí otázka, zda účelem není právě změna Th1 za Th2 odpověď, která je v těhotenství upřednostněna.

Syncytin-1 má tedy během vývoje placenty imunosupresivní a fúzogenní úlohu. Zatímco imunosupresivní schopnost vychází z přítomnosti ISD, fúzogenní schopnost je závislá na vazbě s receptorem. Další kapitola bude detailně pojednávat o interakcích proteinu Syncytin-1 s jeho receptorem ASCT2.

4. Interakce ASCT2 s glykoproteinem Syncytin-1

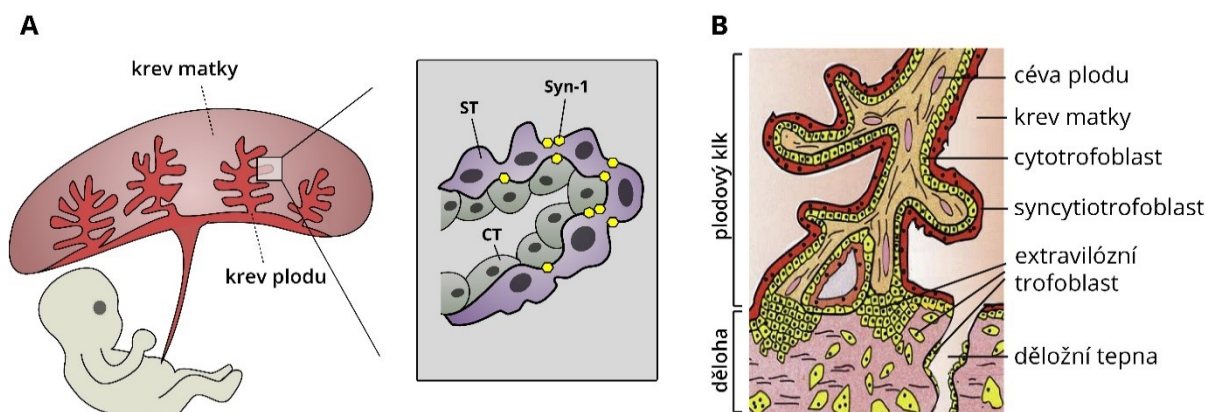
Významným milníkem ve studiu fúzogenních vlastností glykoproteinu Syncytin-1 bylo zjištění, že interakce Syncytinu-1 s jeho receptory ASCT1 a ASCT2 způsobuje buněčnou fúzi v placentárním syncytiotrofoblastu (Blond *et al.* 2000). Jednalo se o velmi ojedinělý příklad exaptace, kde původem retrovirový protein, jehož prvotní funkcí bylo umožnit fúzi virové částice s membránou napadené buňky, dal vzniknout zcela novému orgánu hostitele, který s sebou přináší řadu prospěšných vlastností. Tato kapitola se bude věnovat převážně Syncytinem-1 zprostředkované fúzi, neboť ta je v současné době nejlépe zmapována.

4.1. Mechanismus fúze v syncytiotrofoblastu

Buněčná fúze je složitě koordinovaný a energeticky náročný proces, ke kterému samovolně za běžných fyziologických podmínek v těle prakticky nedochází. Přesto se v organismech setkáváme s nejrůznějšími příklady orgánů a tkání, které vznikly na základě splynutí mnoha okolních buněk. V lidském těle se kromě zmíněného placentárního syncytiotrofoblastu dále jedná například o myoblasty tvořící mnohojaderná vlákna kosterního svalstva, kostní osteoklasty, ale i splynutí pohlavních gamet na samém počátku života organismu. Fúzi buněk musí zajišťovat vysoce specializované proteiny, které interagují se svými vazebnými partnery v cílové membráně jiné buňky. Výsledkem této interakce bývá často konformační změna vedoucí k fúzi membrán obou buněk a vzniku vícejaderného syncytia.

Přesně tak tomu je i v placentě, kde dochází k fúzi vrstvy cytotrofoblastových buněk v syncytiotrofoblast. Vznik syncytiotrofoblastu je výsledkem interakce mezi fúzním proteinem Syncytin-1 a jeho receptorem ASCT2. Syncytin-1 je produkován buňkami cytotrofoblastu a je exponován na povrch jejich cytoplasmatických membrán (Obrázek 6A). Jakmile se takováto buňka setká s buňkou exprimující transmembránový protein ASCT2, iniciuje se buněčná fúze a vzniká nová vrstva trofoblastu zvaná syncytiotrofoblast.

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, Syncytin-1 se řadí mezi virové fúzní proteiny třídy I. Molekulární struktura a mechanismus fungování těchto proteinů byly podrobně zmapovány zejména u obalových proteinů viru chřipky a HIV-1. Výsledky těchto studií jsou dnes považovány za obecný model fungování fúzních proteinů třídy I a můžeme je proto aplikovat i na případ Syncytinu-1.

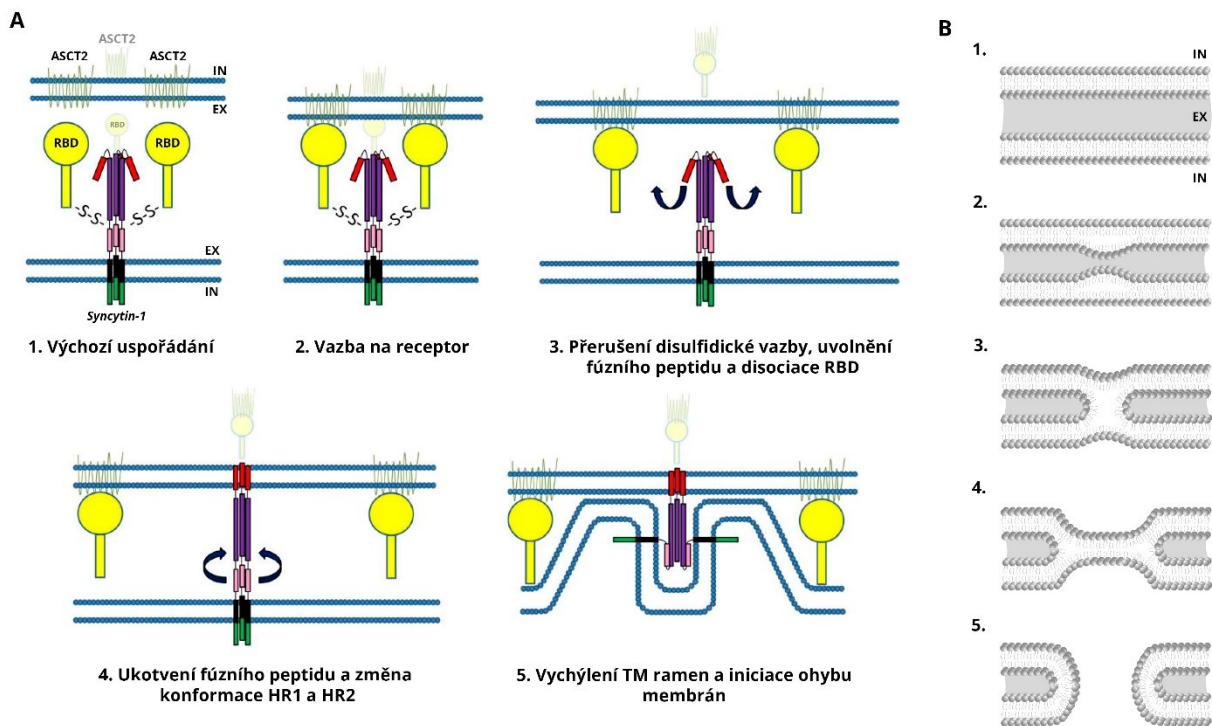


Obrázek 6 | A | Spojení plodu s placentou (vlevo) a detail plodového klku (vpravo). Buňky cytotrofoblastu (CT) mezi sebou fúzí díky interakci fúzního glykoproteinu Syncytinu-1 (Syn-1) s jeho receptorem ASCT2. Na vnější straně klku se formuje mnohojaderné syncytium (ST), které je omýváno krví matky. Převzato a upraveno z Chuong (2018).

B | Schéma fetomaternálního rozhraní. Převzato a upraveno z Dupressoir *et al.* (2012).

Proces fúze buněk cytotrofoblastu (Obrázek 7A) začíná vazbou trimeru Syncytinu-1 k jeho receptoru – ASCT2 (případně i ASCT1), který je lokalizován v membráně cílové buňky. Syncytin-1 má na své SU podjednotce receptor vázající doménu (RBD), která přes SDGGGX₂DX₂R motiv zprostředkovává vazbu pravděpodobně s extracelulární oblastí ECL2 v ASCT2 (Cheynet *et al.* 2006; Garaeva *et al.* 2018). Vazba na receptor je doprovázena konformační změnou Syncytinu-1, při které se přerušuje disulfidická vazba mezi SU a TM podjednotkami a SU z proteinu ireverzibilně disociují. Konformaci mění i α -helikální struktura v oblasti HR1, která se přiblíží k HR2 helixům a společně vytváří stabilní coiled-coil strukturu (Chambers *et al.* 1990; Bullough *et al.* 1994). Tato změna vede ke vnoření hydrofóbních fúzních peptidů (FP) do membrány cílové buňky. Jakmile jsou všechna ramena trimeru ukotvená pomocí FP v cílové buňce, začnou se TM podjednotky od sebe vzdalovat a iniciují ohyb membrán směrem k sobě (Gallaher *et al.* 1989; Chambers *et al.* 1990; Bullough *et al.* 1994).

Předpokládá se, že membrány buněk cytotrofoblastu společně splývají mechanismem tzv. hemifúze. Tento druh fúze se odehrává v několika krocích – ohýbání membrán, vznik membránové „stopky“, hemifúze a vznik fúzního póru (Obrázek 7B; Kozlovsky and Kozlov 2002; Yang and Huang 2002). Po vytvoření fúzního póru spolu membrány splývají a fúze membrán je dokončena. Celý proces fúze se však ještě mnohokrát opakuje u okolních buněk a postupně vzniká mnohojaderné syncytium.



Obrázek 7 |A| Interakce fúzního glykoproteinu Syncytinu-1 s receptorem ASCT2. 1. Výchozí uspořádání Syncytinu-1 a ASCT2; 2. Vazba RBD domény Syncytinu-1 (žlutě) na receptor ASCT2 (světle zeleně), který je lokalizován v membráně cílové buňky; 3. Konformační změna po navázání na receptor způsobí zánik disulfidické vazby, uvolnění fúzního peptidu (červeně) a disociaci RBD z proteinu; 4. Fúzní peptid se ukotvuje v membráně cílové buňky, HR2 (růžově) se ohýbá směrem k HR1 (fialově) a vytváří spolu stabilní coiled-coil strukturu; 5. TM ramena s cytoplasmatickou (zeleně) a transmembránovou (černě) doménou se vychylují do stran a iniciují ohyb membrán k sobě. IN/EX značí intracelulární/extracelulární prostor. Převzato a upraveno z Bastida-Ruiz *et al.* (2016).

B| Mechanismus membránové hemifúze. 1. Výchozí uspořádání membrán; 2. Iniciace ohybu membrán; 3. Vznik membránové „stopky“; 4. Hemifúze; 5. Vznik fúzního póru a spojení cytoplasmy obou buněk. IN/EX značí intracelulární/extracelulární prostor. Převzato a upraveno z Gerbaud and Pidoux (2015).

4.2. Receptor ASCT2 – „dokovací“ místo pro Syncytin-1

Jak již bylo zmíněno v předešlé podkapitole, Syncytin-1 rozpoznává svůj receptor ASCT2 (popř. ASCT1) pomocí RBD domény uložené na SU podjednotce. V této části bude pozornost věnována doménám na receptoru ASCT2, které pravděpodobně fungují jako „dokovací“ místa pro Syncytin-1, ale i další obalové glykoproteiny retrovirů RDR interferenční skupiny.

Obecně platí, že všechny retroviry RDR skupiny využívají jako receptor pro vstup do buňky transmembránový přenašeč neutrálních aminokyselin ASCT2. Vedle lidského ASCT2 byla studována ještě řada jiných druhově specifických orthologů, mimo jiné i myši, krysí a křeččí (*Cricetulus griseus*) ASCT2.

Experimenty provedené na myších buňkách (Swiss NIH) ukázaly, že tyto buňky jsou sice citlivé pro BaEV a HERV-W, ale pro ostatní zástupce RDR skupiny nikoliv. Příčina byla připisována druhově specifickým glykosylacím na myším ASCT2, které zřejmě brání navázání některých RDR zástupců. Nicméně ani cílená mutagenese těchto glykosylací citlivost buněk nezměnila. Později se u myši začalo uvažovat o alternativním receptoru, myším ASCT1, který se v membráně vyskytuje vedle svého paralogu ASCT2. Tato hypotéza byla skutečně potvrzena. Samotný myší ASCT1 umožnil vstup BaEV

a HERV-W a po přidání tunikamycinu, inhibitoru N-glykosylací, do média se buňky staly senzitivními i pro všechny ostatní testované retroviry RDR skupiny (Marin *et al.* 2000; Lavillette *et al.* 2002). Tyto výsledky však vyvolaly otázku, jaké konkrétní domény a glykosylace jsou v proteinu ASCT2 zodpovědné za vazbu retrovirových obalových glykoproteinů. Protože bylo známo, že deglykosylace myšího ASCT1 vede k aktivaci tohoto receptoru i pro ostatní retroviry RDR skupiny a myší ASCT1 obsahuje pouze dvě takovéto modifikace na C-konci domény ECL2, pozornost byla zaměřena právě na tuto oblast (Marin *et al.* 2000; Lavillette *et al.* 2002).

Marin *et al.* (2003) se věnovali studiu ECL2 domény jak u proteinu ASCT1, tak i ASCT2. Podařilo se jim zkonstruovat rekombinantní chimérické varianty myšího a lidského ASCT2 a tyto proteiny podrobili vazebné studii s retroviry RDR skupiny. Ukázalo se, že pouze varianty obsahující 21 aminokyselin z C-terminální části ECL2 lidského ASCT2 umožnily vstup všech těchto retrovirů do buňky. Studie se dále zabývala citlivostí ovariální linie křečička čínského (*Cricetulus griseus*) CHO, která je rezistentní vůči všem RDR retrovirům. Křeččí ASCT1 je specifický tím, že obsahuje celkem tři glykosylace na ECL2 doméně. Po cíleném odstranění glykosylace v pozici N194 se však receptor stal aktivním a umožnil vstup do buňky všem retrovirům RDR skupiny.

Z těchto výsledků vyplývá že citlivost buněk k retrovirům RDR skupiny je podmíněna jak druhově specifickými glykosylacemi, které prostorově brání navázání retrovirů, tak 21 aminokyselinovou sekvencí na C-terminální části domény ECL2. Tato doména je pravděpodobně oním kritickým místem pro vazbu retrovirových obalových glykoproteinů skupiny RDR, které zahrnují také Syncytin-1 (Marin *et al.* 2003). Tyto závěry částečně podporuje i nedávno zveřejněná proteinová struktura homotrimeru ASCT2, ve které všechny tři ECL2 jasně vyčnívají z proteinu do extracelulárního prostoru a mohou sloužit jako první kontaktní místo mezi receptorem a retrovirem (viz podkapitola 2.3 Molekulární struktura ASCT2; Garaeva *et al.* 2018). Doména RBD na povrchové podjednotce Syncytinu-1 se tak v ASCT2 váže pravděpodobně k C-terminální části ECL2 domény. Interakce s receptorem má za následek konformační změny v Syncytinu-1 a uvolnění fúzního peptidu, který se vnoří do membrány cílové buňky a iniciuje buněčnou fúzi. Tato interakce je předpokladem také pro splynutí buněk cytotrofoblastu v placentě.

5. Závěr

Transmembránové proteiny ASCT1 a ASCT2 slouží v buňkách jako přenašeče neutrálních aminokyselin. Selektivní a obousměrný charakter tohoto transportu zajišťuje metabolicky velmi aktivním buňkám rychlý import nebo export konkrétních aminokyselin až do místa jejich spotřeby. Exprese obou proteinů je v těle značně rozšířená. Za zmínku stojí významná produkce proteinu ASCT1 v mozku, ale i dalších orgánech nervové soustavy. Vysokou expresi ASCT2, který má v tkáních ještě vyšší abundanci než ASCT1, najdeme například v trávicí, sekreční a reprodukční soustavě. Schopnost ASCT2 transportovat L-glutamin může být zneužita některými rakovinnými buňkami, které vyžadují vysokou koncentraci této aminokyseliny pro svůj růst. Tyto poznatky by mohly v budoucnu vést k vývoji inhibitorů ASCT2, které by v případě lokálního působení nechaly tyto nádorové buňky „vyhladovět“.

Kromě své participace v metabolismu aminokyselin slouží ASCT1 i ASCT2 jako receptory retrovirů dosud největší objevené interferenční skupiny – RDR. Všichni zástupci této velmi různorodé skupiny navzájem nepříbuzných retrovirů kódují homologní Env protein, který interaguje s proteinem ASCT2 a zajišťuje vstup retrovirů do buňky. Dva retroviry, endogenní retrovirus paviánů a lidský endogenní retrovirus typu W, rozpoznávají jako alternativní receptor i lidský ASCT1.

Lidský endogenní retrovirus typu W se ukázal být jedinečný také tím, že kóduje stále funkční obalový glykoprotein, zvaný Syncytin-1. Exprese Syncytinu-1 se potvrdila v placentě, což naznačovalo, že tento protein bude hrát v těle fyziologickou roli. Tato teorie se potvrdila ve chvíli, kdy Syncytinem-1 transfekované opičí COS buňky spolu začaly fúzovat za vzniku mnohojaderného syncytia. Přesně tento proces se odehrává i v placentárním syncytiotrofoblastu většiny savců, kde Syncytin-1 interaguje se svými receptory ASCT1 a ASCT2 a navozuje buněčnou fúzi. Splynutí buněk pak usnadňuje příjem živin, hormonů a také výměnu plynů mezi plodem a krví matky. Syncytin-1 navíc obsahuje imunosupresivní doménu, která může mít vliv na modulaci imunitní odpovědi matky vůči plodu. Tento ojedinělý příklad prospěšných vlastností původně retrovirového proteinu tak částečně boří zažitou představu, že viry jsou pouze patogenní agens znepříjemňující život svým hostitelům.

Interakce mezi Syncytinem-1 a jeho receptory byla hojně studována na savčích modelech. U myších buněk se ukázalo, že jsou citlivé k HERV-W, který k infekci buněk využívá myší ortholog ASCT1. V myším ASCT1 byly objeveny dvě glykosylace na doméně ECL2. Odstranění těchto glykosylací cílenou mutagenezí zpřístupnilo receptor pro všechny testované RDR retroviry. Pozornost byla tedy zaměřena převážně na doménu ECL2. Vytvoření série chimérických proteinů, poskládaných z domén lidského a myšího orthologu ASCT2, vedlo k identifikaci 21 aminokyselin na C-terminální části ECL2 lidského ASCT2, které jsou přímo zodpovědné za citlivost buněk ke všem RDR retrovirům. Obdobné pokusy proběhly i na křeččím ASCT1, který nese na ECL2 tři glykosylace. Odstranění glykosylace v pozici N194 umožnilo RDR retrovirům infikovat původně zcela rezistentní buňky. Ukazuje se, že

vstup retrovirů RDR skupiny do buněk je podmíněn aminokyselinovou sekvencí na C-konci ECL2 a zároveň specifickými glykosylacemi, které se oboje mezi zvířecími orthology receptorů ASCT1 a ASCT2 liší. Interakci obalových glykoproteinů s ECL2 doménou podporuje i nedávno zveřejněná prostorová struktura ASCT2. Doména ECL2 totiž znatelně vyběhá do extracelulárního prostoru a je tak zřejmě první částí receptoru, se kterou se vazebné domény retrovirových glykoproteinů setkají.

Základním předpokladem pro pochopení interakcí mezi Syncytinem-1 a jeho receptory je nepochybně znalost primární a prostorové struktury těchto proteinů. Ačkoliv jsou jejich aminokyselinové sekvence dnes již známé, strukturní model byl dosud vytvořen pouze u transportéru ASCT2. Přesto nám zatím výzkum interakcí mezi Syncytinem-1 a jeho receptory ASCT1 a ASCT2 poodhalil některé skryté funkce původně retrovirového proteinu, který nám a dalším savcům usnadňuje vývoj ještě před narozením. Důležitým tématem pro budoucí práce bude proto hledání genetických příčin různých patologií syncytiotrofoblastu, jako je například preeklampsie.

Cílem navazující magisterské práce bude vytvořit a optimalizovat luciferázový test, který by usnadnil kvantifikaci Syncytinem-1 navozených buněčných fúzí. Pomocí této metody bude otestována fúzogenní aktivita různých mutantních variant proteinů ASCT2 a Syncytin-1. Středem zájmu bude definovat ne-synonymní mutace Syncytinu-1 a jeho receptoru, které se vyskytují v lidské populaci a snižují fúzogenní schopnosti interagujících partnerů.

6. Použitá literatura

- Akyuz N, Georgieva ER, Zhou Z, Stolzenberg S, Cuendet MA, Khelashvili G, Altman RB, Terry DS, Freed JH, Weinstein H, *et al.* 2015. Transport domain unlocking sets the uptake rate of an aspartate transporter. *Nature* **518**: 68–73.
- Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC. 2000. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nature genetics* **25**: 311–4.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4155–4160.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG. 1993. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *The Journal of biological chemistry* **268**: 15329–32.
- Bastida-Ruiz D, Van Hoesen K, Cohen M. 2016. The Dark Side of Cell Fusion. *International journal of molecular sciences* **17**.
- Blaise S, de Parseval N, B nit L, Heidmann T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13013–8.
- Blond JL, Bes me F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, Mandrand B, Mallet F. 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of virology* **73**: 1175–85.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL. 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**: 3321–9.
- Boon L, Geerts WJ, Jonker A, Lamers WH, Van Noorden CJ. 1999. High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules. *Histochemistry and cell biology* **111**: 445–452.
- Br er A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, Br er S. 1999. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *Journal of neurochemistry* **73**: 2184–94.
- Br er A, Wagner C, Lang F, Br er S. 2000. Neutral amino acid transporter ASCT2 displays substrate-induced Na⁺ exchange and a substrate-gated anion conductance. *The Biochemical journal* **346 Pt 3**: 705–10.
- Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**: 37–43.
- Canul-Tec JC, Assal R, Cirri E, Legrand P, Brier S, Chamot-Rooke J, Reyes N. 2017. Structure and allosteric inhibition of excitatory amino acid transporter 1. *Nature* **544**: 446–451.

- Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. 1990.** Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *The Journal of general virology* **71** (Pt 12: 3075–80.
- Chang C-W, Chuang H-C, Yu C, Yao T-P, Chen H. 2005.** Stimulation of GCMA transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMA. *Molecular and cellular biology* **25**: 8401–14.
- Cheyne V, Oriol G, Mallet F. 2006.** Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-I fusogenic glycoprotein. *Retrovirology* **3**: 41.
- Cheyne V, Ruggieri A, Oriol G, Blond JL, Boson B, Vachot L, Verrier B, Cosset FL, Mallet F. 2005.** Synthesis, assembly, and processing of the Env ERVWE1/syncytin human endogenous retroviral envelope. *Journal of virology* **79**: 5585–93.
- Chuong EB. 2018.** The placenta goes viral: Retroviruses control gene expression in pregnancy. *PLoS biology* **16**: e3000028.
- Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R. 1985.** Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science (New York, N.Y.)* **230**: 453–5.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. 1992.** An [Na⁺ + K⁺]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* **51**: 295–310.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. 2007.** Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 19345–50.
- Dupressoir A, Lavielle C, Heidmann T. 2012.** From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* **33**: 663–71.
- Esnault C, Priet S, Ribet D, Vernochet C, Bruls T, Lavielle C, Weissenbach J, Heidmann T. 2008.** A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 17532–7.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. 1995.** An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**: 599–603.
- Fishilevich S, Zimmerman S, Kohn A, Iny Stein T, Olender T, Kolker E, Safran M, Lancet D. 2016.** Genic insights from integrated human proteomics in GeneCards. *Database: the journal of biological databases and curation* **2016**.
- Funk M, Cornelis G, Vernochet C, Heidmann O, Dupressoir A, Conley A, Glickman S, Heidmann T. 2019.** Capture of a Hyena-Specific Retroviral Envelope Gene with Placental Expression Associated in Evolution with the Unique Emergence among Carnivorans of Hemochorial Placentation in Hyaenidae. *Journal of virology* **93**.
- Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC. 1989.** A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS research and human retroviruses* **5**: 431–40.
- Garaeva AA, Oostergetel GT, Gati C, Guskov A, Paulino C, Slotboom DJ. 2018.** Cryo-EM structure of the human neutral amino acid transporter ASCT2. *Nature structural & molecular biology* **25**: 515–521.

- Gerbaud P, Pidoux G. 2015.** Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* **36 Suppl 1**: S35-42.
- Gimenez J, Montgiraud C, Oriol G, Pichon J-P, Ruel K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Frendo J-L, Evain-Brion D, Mallet F. 2009.** Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **16**: 195-211.
- Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM. 2009.** Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *Journal of neurochemistry* **108**: 372-83.
- Gong R, Peng X, Kang S, Feng H, Huang J, Zhang W, Lin D, Tien P, Xiao G. 2005.** Structural characterization of the fusion core in syncytin, envelope protein of human endogenous retrovirus family W. *Biochemical and biophysical research communications* **331**: 1193-200.
- Grandi N, Cadeddu M, Blomberg J, Tramontano E. 2016.** Contribution of type W human endogenous retroviruses to the human genome: characterization of HERV-W proviral insertions and processed pseudogenes. *Retrovirology* **13**: 67.
- Grandi N, Tramontano E. 2018.** HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in microbiology* **9**: 462.
- Haraguchi S, Good RA, James-Yarish M, Cianciolo GJ, Day NK. 1995.** Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 3611-5.
- Hashimoto Y, Sadamoto Y, Konno A, Kon Y, Iwanaga T. 2004.** Distribution of neutral amino acid transporter ASCT 1 in the non-neuronal tissues of mice. *The Japanese journal of veterinary research* **52**: 113-24.
- Huang Q, Chen H, Li J, Oliver M, Ma X, Byck D, Gao Y, Jiang S-W. 2014.** Epigenetic and non-epigenetic regulation of syncytin-1 expression in human placenta and cancer tissues. *Cellular signalling* **26**: 648-56.
- Hubley R, Finn RD, Clements J, Eddy SR, Jones TA, Bao W, Smit AFA, Wheeler TJ. 2016.** The Dfam database of repetitive DNA families. *Nucleic acids research* **44**: D81-9.
- Jensen S, Guskov A, Rempel S, Hänelt I, Slotboom DJ. 2013.** Crystal structure of a substrate-free aspartate transporter. *Nature structural & molecular biology* **20**: 1224-6.
- Kaira K, Arakawa K, Shimizu K, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Takeyoshi I. 2015.** Relationship between CD147 and expression of amino acid transporters (LAT1 and ASCT2) in patients with pancreatic cancer. *American journal of translational research* **7**: 356-63.
- Kanai Y, Hediger MA. 1992.** Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**: 467-71.
- Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V. 1996.** Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter B(o) from a human placental choriocarcinoma cell line. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 18657-18661.
- Kewalramani VN, Panganiban AT, Emerman M. 1992.** Spleen necrosis virus, an avian immunosuppressive retrovirus, shares a receptor with the type D simian retroviruses. *Journal of virology* **66**: 3026-31.

- Kim S, Kim DH, Jung W-H, Koo JS. 2013.** Expression of glutamine metabolism-related proteins according to molecular subtype of breast cancer. *Endocrine-related cancer* **20**: 339–48.
- Kim HS, Takenaka O, Crow TJ. 1999.** Isolation and phylogeny of endogenous retrovirus sequences belonging to the HERV-W family in primates. *The Journal of general virology* **80 (Pt 10)**: 2613–9.
- Koo HM, Parthasarathi S, Ron Y, Dougherty JP. 1994.** Pseudotyped REV/SRV retroviruses reveal restrictions to infection and host range within members of the same receptor interference group. *Virology* **205**: 345–51.
- Kozlovsky Y, Kozlov MM. 2002.** Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis. *Biophysical journal* **82**: 882–95.
- Lager S, Powell TL. 2012.** Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of pregnancy* **2012**: 179827.
- Lamb D, Schüttelkopf AW, van Aalten DMF, Brighty DW. 2011.** Charge-surrounded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLoS pathogens* **7**: e1001268.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. 2001.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
- Lavillette D, Marin M, Ruggieri A, Mallet F, Cosset FL, Kabat D. 2002.** The Envelope Glycoprotein of Human Endogenous Retrovirus Type W Uses a Divergent Family of Amino Acid Transporters/Cell Surface Receptors. *Journal of Virology* **76**: 6442–6452.
- Lee C, Kang HJ, von Ballmoos C, Newstead S, Uzdavinyas P, Dotson DL, Iwata S, Beckstein O, Cameron AD, Drew D. 2013.** A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport. *Nature* **501**: 573–7.
- Malassiné A, Blaise S, Handschuh K, Lalucque H, Dupressoir A, Evain-Brion D, Heidmann T. 2007.** Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells. *Placenta* **28**: 185–191.
- Malassiné A, Handschuh K, Tsatsaris V, Gerbaud P, Cheynet V, Oriol G, Mallet F, Evain-Brion D. 2005.** Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta* **26**: 556–62.
- Marin M, Lavillette D, Kelly SM, Kabat D. 2003.** N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions. *Journal of virology* **77**: 2936–45.
- Marin M, Tailor CS, Nouri A, Kabat D. 2000.** Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus. *Journal of virology* **74**: 8085–93.
- Matoušková M, Blažková J, Pajer P, Pavlíček A, Hejnar J. 2006.** CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Experimental cell research* **312**: 1011–20.
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, et al. 2000.** Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* **403**: 785–9.

- Muir A, Lever AML, Moffett A. 2006.** Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations. *The Journal of general virology* **87**: 2067–71.
- Nelson M, Nelson DS, Cianciolo GJ, Snyderman R. 1989.** Effects of CKS-17, a synthetic retroviral envelope peptide, on cell-mediated immunity in vivo: immunosuppression, immunogenicity, and relation to immunosuppressive tumor products. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **30**: 113–8.
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, et al. 2009.** Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* **136**: 521–534.
- Porter EM, Liu L, Oren A, Anton PA, Ganz T. 1997.** Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules. *Infection and immunity* **65**: 2389–95.
- Rasko JEJ, Battini J-L, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD. 1999.** The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 2129–2134.
- Rubin H. 1960.** A Virus in Chick Embryos Which Induces Resistance in Vitro to Infection with Rous Sarcoma Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **46**: 1105–19.
- Rubin H. 1961.** The nature of a virus-induced cellular resistance to Rous sarcoma virus. *Virology* **13**: 200–6.
- Sakai K, Shimizu H, Koike T, Furuya S, Watanabe M. 2003.** Neutral amino acid transporter ASCT1 is preferentially expressed in L-Ser-synthetic/storing glial cells in the mouse brain with transient expression in developing capillaries. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 550–60.
- Scalise M, Pochini L, Console L, Losso MA, Indiveri C. 2018.** The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology. *Frontiers in cell and developmental biology* **6**: 96.
- Schlecht-Louf G, Renard M, Mangeney M, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, Bouallaga I, Heidmann T. 2010.** Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 3782–7.
- Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadano-Ferraz A, Fremeau RTJ. 1993.** Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters. *The Journal of biological chemistry* **268**: 15351–15355.
- Shimizu K, Kaira K, Tomizawa Y, Sunaga N, Kawashima O, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, Kanai Y, Yamada M, et al. 2014.** ASC amino-acid transporter 2 (ASCT2) as a novel prognostic marker in non-small cell lung cancer. *British journal of cancer* **110**: 2030–9.
- Sinha A, Johnson WE. 2017.** Retroviruses of the RDR superinfection interference group: ancient origins and broad host distribution of a promiscuous Env gene. *Current Opinion in Virology* **25**: 105–112.
- Sommerfelt MA, Weiss RA. 1990.** Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells. *Virology* **176**: 58–69.

- Steck FT, Rubin H. 1966a.** The mechanism of interference between an avian leukosis virus and rous sarcoma virus: I. Establishment of interference. *Virology* **29**: 628–641.
- Steck FT, Rubin H. 1966b.** The mechanism of interference between an avian leukosis virus and Rous sarcoma virus. II. Early steps of infection by RSV of cells under conditions of interference. *Virology* **29**: 642–53.
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, et al. 2016.** The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current protocols in bioinformatics* **54**: 1.30.1-1.30.33.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. 1992.** Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10955–10959.
- Tailor CS, Nouri A, Zhao Y, Takeuchi Y, Kabat D. 1999.** A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses. *Journal of virology* **73**: 4470–4.
- Tetsuka K, Takanaga H, Ohtsuki S, Hosoya K, Terasaki T. 2003.** The l-isomer-selective transport of aspartic acid is mediated by ASCT2 at the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* **87**: 891–901.
- Toda K, Nishikawa G, Iwamoto M, Itatani Y, Takahashi R, Sakai Y, Kawada K. 2017.** Clinical Role of ASCT2 (SLC1A5) in KRAS-Mutated Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**: 1632.
- Tolosa JM, Schjenken JE, Clifton VL, Vargas A, Barbeau B, Lowry P, Maiti K, Smith R. 2012.** The endogenous retroviral envelope protein syncytin-1 inhibits LPS/PHA-stimulated cytokine responses in human blood and is sorted into placental exosomes. *Placenta* **33**: 933–41.
- Trejbalová K, Blažková J, Matoušková M, Kučerová D, Pecnová L, Vernerová Z, Heráček J, Hirsch I, Hejnar J. 2011.** Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic acids research* **39**: 8728–39.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. 1996.** Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *The Journal of biological chemistry* **271**: 14883–90.
- Vargas A, Toufaily C, LeBellego F, Rassart É, Lafond J, Barbeau B. 2011.** Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **18**: 1085–91.
- Voisset C, Blancher A, Perron H, Mandrand B, Mallet F, Paranhos-Baccalà G. 1999.** Phylogeny of a novel family of human endogenous retrovirus sequences, HERV-W, in humans and other primates. *AIDS research and human retroviruses* **15**: 1529–33.
- Wadiche JI, Amara SG, Kavanaugh MP. 1995.** Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* **15**: 721–8.
- Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, Font J, Bailey CG, Van Geldermalsen M, Sharp DM, Tiffen JC, Ryan RM, Jormakka M, et al. 2014.** Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *International Journal of Cancer* **135**: 1060–1071.

- Wang Q, Hardie RA, Hoy AJ, Van Geldermalsen M, Gao D, Fazli L, Sadowski MC, Balaban S, Schreuder M, Nagarajah R, et al. 2015.** Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *Journal of Pathology* **236**: 278–289.
- Warburg O, Wind F, Negelein E. 1927.** The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology* **8**: 519–30.
- Yamasaki M, Yamada K, Furuya S, Mitoma J, Hirabayashi Y, Watanabe M. 2001.** 3-Phosphoglycerate dehydrogenase, a key enzyme for l-serine biosynthesis, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage and olfactory ensheathing glia in the mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: 7691–704.
- Yang L, Huang HW. 2002.** Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science (New York, N.Y.)* **297**: 1877–9.
- Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E. 2004.** Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **431**: 811–8.
- Yu C, Shen K, Lin M, Chen P, Lin C, Chang G-D, Chen H. 2002.** GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *The Journal of biological chemistry* **277**: 50062–8.
- Zerangue N, Kavanaugh MP. 1996a.** Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**: 634–7.
- Zerangue N, Kavanaugh MP. 1996b.** ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *The Journal of biological chemistry* **271**: 27991–27994.