科学通报 2009 年 第 54 卷 第 9 期: 1244 ~ 1249
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

鉴定HIV-1 包膜蛋白gp41 的近膜端外部区与其N端三聚体结构域之间的相互作用：病毒融合相关的潜在机制

李菁[①②], 陆路[①②], 吴凡[①②], 陈曦[①②③], 牛犇[①②], 姜世勃[③*], 陈应华[①②*]

① 清华大学生物科学与技术系分子免疫实验室, 北京 100084;
② 北京蛋白质治疗重点实验室, 北京 100084;
③ Laboratory of Viral Immunology, Lindsley F. Kimball Research Institute, New York Blood Center, NY 10065, USA
* 联系人, E-mail: chenyh@mail.tsinghua.edu.cn, sjiang@nybloodcenter.org

2008-12-26 收稿, 2009-03-17 接受
国家重点基础研究发展计划(编号: 2007CB914402)资助项目

摘要 人类Ⅰ型免疫缺陷病毒(human immunodeficiency class I, HIV-1)包膜蛋白 gp41 的近膜端外部区(membrane proximal external region, MPER)在 HIV-1 的各个分化株之间相当保守, 这暗示 MPER 区对于病毒的生存和侵染均具有十分重要的作用. 目前研究表明, 两个靶向 HIV-1 且具有最广泛中和活性的单抗 2F5 和 4E10, 都特异地识别该区域, 进而有效地抑制包膜蛋白介导的病毒膜融合过程. 我们先前的研究表明, 4E10 抗体表位的抗原性和免疫原性会随着 gp41 融合核心区域的结构调整而发生显著的改变, 提示在 gp41 蛋白的 MPER 区与融合核心区之间很有可能存在某种联系, 并与 gp41 介导的膜融合过程相关. 本研究利用各种不同的 gp41 融合核心区衍生多肽, 检测了 4E10 表位多肽(D4E10P)与它们之间的反应性. 其中, 具有 gp41 蛋白核心区 N-trimer 结构的多肽(N-trimer-6HB)显示出很强的结合活性. 进一步对 N-trimer-6HB 多肽进行噬菌体文库筛选, 发现 4E10 表位上一个短的模体序列(WF)很有可能对 gp41 的 N-trimer 和 MPER 区之间的相互作用发挥了至关重要的作用, 导致 MPER 区以潜在的方式参与病毒包膜和靶细胞膜间的融合过程.

关键词
HIV-1
gp41
N-trimer
MPER
4E10

人类单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb) 4E10, 因其广泛的抗HIV-1 病毒的中和活性[1], 一直为艾滋病疫苗研究所关注. 该抗体特异地识别HIV-1包膜蛋白gp41 上一段富含色氨酸的保守表位, 后者裹嵌于gp41 蛋白的胞外区近膜端(MPER)序列中[2,3]. 突变分析表明, MPER序列对包膜蛋白介导的病毒融合、包膜蛋白整合以及病毒感染都具有极其重要的作用[4~6]. 但是, 对于这一段序列的确切作用, 目前还不十分了解. 有研究表明, MPER区的衍生多肽能够有效地渗透到脂膜中, 提示该区域很有可能参与了病毒破坏脂膜的过程[7,8]. 此外, 还有人认为MPER区能够起到弯曲gp41 分子构象的作用, 从而在融合过程中拉近病毒膜和靶细胞膜的距离[9,10].

我们先前的研究发现, gp41 融合核心区N端七重复结构域(N-terminal heptad repeat, NHR)序列上的点突变(L568P), 能够明显改善MPER区序列中 4E10 相关表位的抗原性和免疫原性[11]. 为了进一步探讨这个现象发生的潜在机制, 我们研究了 4E10 表位多肽(D4E10P)与具有不同构象的gp41 融合核心序列衍生肽之间的反应性, ELISA分析结果表明, D4E10P能够高特异性地与含有gp41 NHR的三聚体结构的重组多肽N-trimer-6HB (即所谓的Nccg-gp41)相结合[12]. 利用后者筛选噬菌体文库, 我们筛选出含有 4E10 表位的噬菌体短序列, 这些噬菌体同样能够特异地识别

引用格式: 李菁, 陆路, 吴凡, 等. 鉴定 HIV-1 包膜蛋白 gp41 的近膜端外部区与其 N 端三聚体结构域之间的相互作用：病毒融合相关的潜在机制. 科学通报, 2009, 54(9): 1244~1249
Li J, Lu L, Wu F, et al. The interaction between the membrane-proximal external region and the N-trimer region of HIV-1 gp41: Involvement in viral fusion. Chinese Sci Bull, 2009, 54(10): 1707−1712, doi: 10.1007/s11434-009-0280-6

N-trimer-6HB结构. 这些结果表明, MPER区很有可能在病毒融合过程中, 与gp41 的N-trimer结构相互作用.

1 材料与方法

(ⅰ) 试剂与多肽. N36 (546~581 aa)、C34 (628~661 aa)以及D4E10P多肽(CGNWFNITGNWFNIT, 含有 4E10 二重复表位)由标准液相FMOC方法合成. 所合成多肽经高液相色谱方法纯化. 4E10 表位特异的鼠源抗血清, 由BSA偶联的D4E10P多肽免疫获得, 并经Protein G柱材(Pierce, Rockford, IL)纯化. 6HB (N36-L8-C34)和 6HB-L568P的表达与纯化过程参照文献[13,14].

(ⅱ) 构建*E. coli*表达的重组N-trimer-6HB多 肽. 为表达含有N-trimer结构的多肽, 根据Louis等人[12]的报道构建了编码N-trimer-6HB序列的DNA片段, 并将该片段通过*Nco* Ⅰ和*Xho* Ⅰ位点克隆至pET28a载体(Novagen, Madison, WI)中, 转化到*E. coli* Rosseta菌株中表达.

(ⅲ) N-trimer-6HB多肽的表达、纯化及复性. 转化了重组质粒pET28a-N-trimer-6HB的*E. coli* Rosseta菌在LB培养基中 37℃ 220 r/min振荡培养过夜, 第 2 天以 1∶50 转接到新鲜的LB培养基中进行诱导表达. 当细菌生长至A_{600} 约 0.6, 加入IPTG至终浓度为 0.1 mmol/L, 37℃诱导 4 h, 10000×*g*离心收获细菌. 将菌体培养物用 20 mL Buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)重悬后, 4℃条件下超声破碎. 先前的研究表明, N-trimer-6HB的表达产物主要以包涵体存在, 因此我们在裂解细菌后将菌体沉淀进行了变复性处理[12]. 首先, 将所得的裂解沉淀, 用含有 2 mol/L尿素和 1% Triton X-100 的 Buffer A洗涤 2 次, 轻微超声后, 离弃上清(22000×*g*, 4℃, 20 min); 其次, 经过初步除杂的包涵体沉淀用含有 8 mol/L尿素的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液重悬, 依次对尿素-Tris缓冲液进行 6 mol/L→4 mol/L→2 mol/L过夜透析(4℃); 再次, 将 2 mol/L尿素的透析产物离心去沉淀后, 上清过Ni-NTA柱材, 于 50~150 mmol/L咪唑浓度下收集蛋白洗脱峰; 最后, 将所得的蛋白洗脱液对 50 mmol/L NaAc缓冲液(pH 4.0)进行透析. 最后的蛋白样品稀释成 1 mg/mL, 于−20℃保存.

(ⅳ) 夹心 ELISA 检测 D4E10P 多肽与各种 gp41 融合核心区衍生多肽间的反应性. 将浓度为 10 μg/mL 的各种 gp41 融合核心区衍生多肽(0.1 mol/L $NaHCO_3$ 缓冲液, pH 9.6)包被至高结合力的 96 孔板(Greiner, Nürtingen, Germany)上, 每孔 50 μL, 4℃过夜. 用 PBS-0.25% (质量体积比)明胶溶液室温封闭 2 h 后每孔加入 5 μg/mL D4E10P, 50 μL/孔, 37℃温育 1 h. 洗涤 3 次后加入 50 μL 4E10 表位特异的抗血清(1∶100 稀释), 继续 37℃温育 1 h. 随后, 依次加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG (Dako A/S, Denmark)以及显色底物液 OPD (Sigma, St Louis, MO), 于 450 nm 波长下检测吸收光度值(A_{450}).

(ⅴ) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native polyacrylamide gel electrophoresis, N-PAGE). N-trimer-6HB 和 6HB 的 N-PAGE 电泳分析在冰乙酸缓冲溶液条件下进行. 该电泳胶由 30%丙烯酰胺(acrylamide)/0.8%甲叉双丙烯酰胺(bisacrylamide)溶液, 300 mmol/L 亚硫酸钠, 200 mmol/L 乙酸缓冲液(pH 4.5)及 H_2O_2 组成. 多肽样品的上样终浓度为 200 μg/mL, 其电泳条件为 125V 反向电压 4℃恒压 2 h. 电泳胶用考马斯亮蓝染色.

(ⅵ) 圆二色谱分析(circular dichroism spectroscopy, CD). N-trimer-6HB 多肽的 CD 图谱由 Jasco spectropolarimeter (Model J-715, Jasco Inc., Japan)仪器在 20℃条件下测得. 蛋白样品用 PBS 缓冲液(pH 7.2)稀释到 10 μmol/L, 置于 0.1 cm 光径的 CD 杯中测量, 步长为 1 nm, 波长范围 50 nm. 每个样品扫描 3 次, 取平均值, 扣除缓冲液本底并进行平滑后, 转换成摩尔椭圆率($[\theta]$, 10^4 deg·cm^2·dmol^{-1}).

(ⅶ) 噬菌体肽库筛选. 以N-trimer-6HB多肽为诱饵筛选了噬菌体 7 肽库(New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA), 这个肽库将随机的 7 肽整合至M13 噬菌体包膜蛋白pⅢ的N末端. 概括地说, 就是将 100 μg/mL N-trimer-6HB多肽包被至微孔板, 用以捕捉与之相互作用的噬菌体克隆. 为了获得高亲合力的噬菌体, 我们进行了 3 轮筛选, 并将淘洗液中的Triton X-100 浓度逐级增强(0.1%→0.3%→0.5%). 3 轮淘洗后的噬菌体终产物, 转染至ER2738 细菌中, 挑单斑于 10 mL NZY Tet/IPTG中扩增. 所选噬菌体克隆经PEG/NaCl进一步纯化后, DNA测序, 并用于随后的ELISA分析[14].

(ⅷ) ELISA 检测噬菌体克隆与多肽的结合. 在包被液 0.1 mol/L $NaHCO_3$(pH 9.6)中稀释多肽至 1

μg/mL, 加入 96 孔板中, 50 μL/孔, 置于湿盒内, 4℃过夜. 控干包被溶液, 每孔用 5 mg/mL BSA-TBS 封闭液加满, 室温孵育 2 h. 用 0.5% Tween-TBS 洗 3 次, 每次 1 min. 在不同包被孔中, 加入等量的噬菌体克隆, 每孔 50 μL, 室温孵育 1~2 h. 弃去含有噬菌体克隆的溶液, 充分洗涤 6 次, 加入 1∶5000 稀释的 HRP 偶联的抗噬菌体抗体(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 室温孵育 1 h. 再次充分洗涤 6 次, 加入底物液(0.03% (体积比) H_2O_2, 1 mg/mL OPD, 柠檬酸钠缓冲液)显色, 测量 450 nm 时的吸收光度值.

2 实验结果

2.1 N-trimer-6HB 和 6-HB 多肽的理化性质比较

我们先前研究发现, NHR 上的 L568P 突变能够明显改善 4E10 表位在细胞表面的抗原性和免疫原性, 而这个突变可导致融合核心六螺旋束构象(six helix bundle, 6HB)的不稳定性. 因此, 我们怀疑在gp41-6HB融合核心区与 4E10 表位序列之间是否存在某种联系. 为了进一步确证这种相关性, 我们用化学合成或表达纯化了一系列的gp41-6HB融合核心序列衍生肽, 这其中包括N-trimer-6HB多肽. 该多肽根据Louis等人[12]先前的报道进行构建, 首先将一段NHR序列(N35)连接到N34(L6)C28 序列的N端, 并在N35 和N34 之间引入"CCG"短序列, 利用该连接短序列中半胱氨酸(C)之间形成的二硫键, 将单链分子交连成三聚体, 从而确保在 6HB结构的N端形成稳定的N-trimer结构. 同时, 我们还构建表达了N36-L8-C34多肽, 该多肽能够在生理条件下自发形成稳定的6HB结构[14]. 两者的结构如图 1(a)所示.

为了比较两者的生物物理特性, 我们分别在还

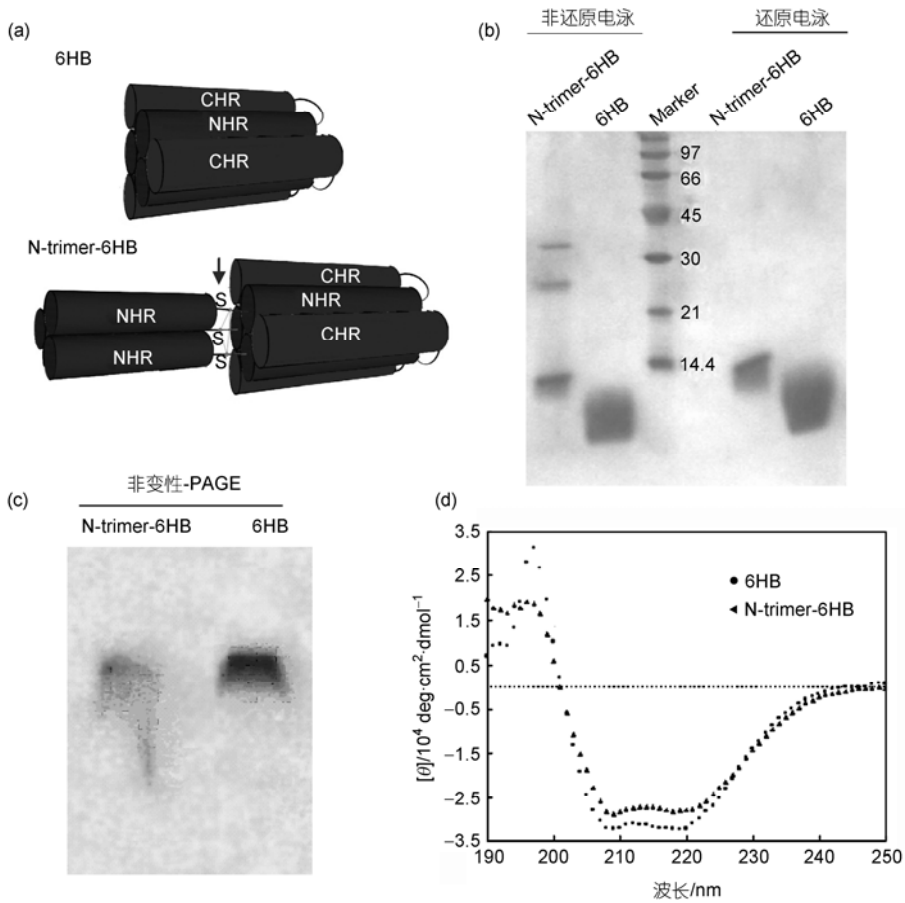

图 1 N-trimer-6HB 和 6HB 多肽的理化性质分析

(a) N-trimer-6HB 和 6HB 的结构示意图, 在 N-trimer-6HB 中, 单链间利用二硫键相互交联(箭头所示); (b) 还原条件及非还原条件下 N-trimer-6HB 与 6HB 的 SDS-PAGE 电泳图谱. (c) N-trimer-6HB 和 6HB 的 Native-PAGE 电泳图谱; (d) N-trimer-6HB 和 6HB 的 CD 图谱

原和非还原条件下对两者进行了 SDS-PAGE 分析. 在非还原条件下, N-trimer-6HB 多肽存在三聚体、二聚体和单体的多种形式, 而 6HB 则仅以单体形式存在. 但是, 当加入 DTT 破坏链间二硫键时, 不论 N-trimer-6HB还是 6HB都在电泳中呈现单一的单体带(图 1(b)). 该结果与Louis 等人[15]的报道一致. 另外, 我们检测了N-trimer-6HB和 6HB在Native-PAGE 中的迁移状况, 两者均在电泳中呈现单一条带, 说明 N-trimer-6HB和 6HB很可能在溶液中以单一的构象存在(图 1(c)). 进一步CD图谱分析的结果表明, 这些蛋白样品均在室温条件下呈现α-helix构象, 因为两者都在 208 和 222 nm波长处出现α-helix构象的典型峰(图 1(d)).

2.2 4E10 表位多肽(D4E10P)与 N-trimer-6HB 的亲合能力很强, 而与 6HB 和 N36 结合较弱

为了检测 gp41 融合核心区域与 MPER 区 4E10 表位的相关性, 我们分别比较了 D4E10P 与 6HB, N-trimer-6HB, N36 以及 C34 多肽之间的亲合力. 在所有被检测的多肽中, N-trimer-6HB 显现出与 D4E10P 多肽强烈的结合活性, 而 6HB 和 N36 明显弱得多(图 2(a)). 接着, 我们将等量的 D4E10P 包被于微孔板中, 分别加入系列稀释的 N-trimer-6HB 和 6HB 多肽, 并以 6HB 特异的单抗 2G8 来检测后两者对于 D4E10P 的结合特性. N-trimer-6HB 和 6HB 两者都与固化的 D4E10P 多肽呈剂量依赖的结合模式, 但是 N-trimer-6HB 的结合远远强于 6HB (图 2(b)). 该结果提示, 4E10 表位多肽更倾向于结合 N-trimer-6HB 多肽中的 N-trimer 结构. 这种倾向性被 6HB 突变体多肽(6HB-L568P)的结合分析实验进一步证明. 在该突变体中, NHR 上关键性的残基 L568 为脯氨酸所取代, 从而导致 N-trimer 的构象不稳定. 相较于 6HB, 6HB-L568 多肽与 4E10 表位多肽的结合活性明显下降(图 3).

2.3 通过筛选噬菌体 7 肽库鉴定 4E10 表位上与 N-trimer 结合相关的模体

为了鉴定 4E10 表位上与 N-trimer 结构结合相关的的模体, 我们用 N-trimer-6HB 多肽对噬菌体 7 肽库进行了筛选. 经过 3 轮淘选, 20 个噬菌体克隆被随机挑选出来并测序. 有趣的是, 我们发现其中两株克隆 7P-4 和 7P-16 与 N-trimer-6HB 表位多肽之间存在很强的结合活性, 并且该两株克隆均携带有与 4E10 表位相同的“WF”模体(图 4(a)). 进一步比较该两株噬菌体克隆与 N-trimer-6HB, 6HB, N36 及 C34 多肽间的亲和活性, 我们发现两者均与 N-trimer-6HB 多肽有很

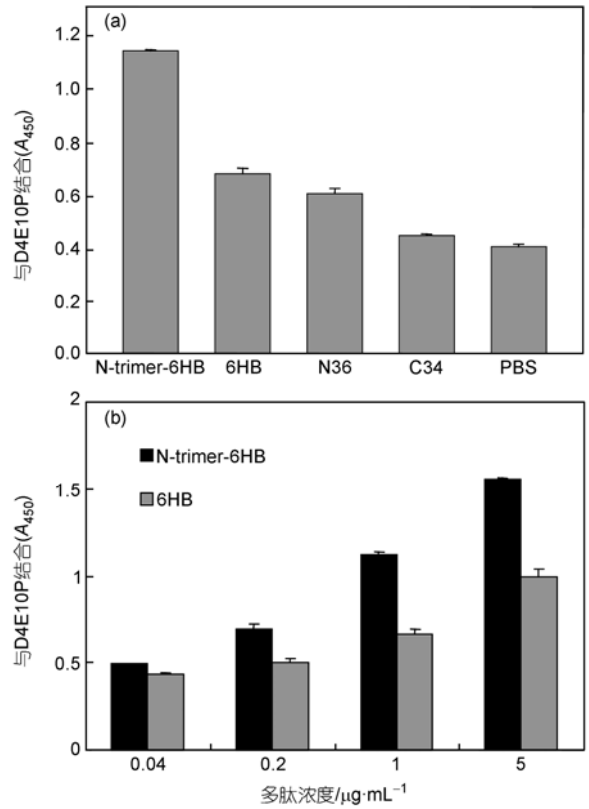

图 2 D4E10P 多肽与 gp41 融合核心区衍生多肽间的相互作用

(a) 等量的 D4E10P 多肽被加至各种固化的 gp41 融合核心衍生肽中, 结合活性由 4E10 表位特异的抗血清(1∶100)进行检测; (b) 系列稀释的 N-trimer-6HB 或 6HB 多肽分别加至包有等量 D4E10P 多肽的微孔板中, 结合活性由 6HB 特异的单抗 2G8 进行检测

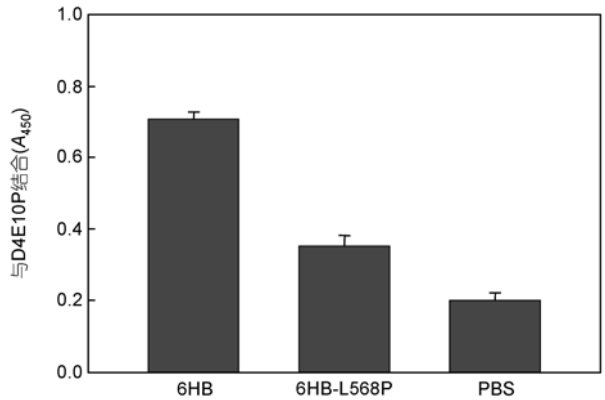

图 3 6HB 多肽和 6HB-L568 突变体与 D4E10P 多肽间的相互作用

强的结合作用，并且与 N36 多肽的作用明显加强，而与 6HB 和 C34 多肽几乎没有结合(图 4(b))．以上这些结果提示，4E10 表位很可能是通过“WF”位点与 gp41 NHR 三聚体结构相互作用，但是对于这种结合作用在 HIV 病毒感染过程中所起到的具体作用仍有待深入的研究．

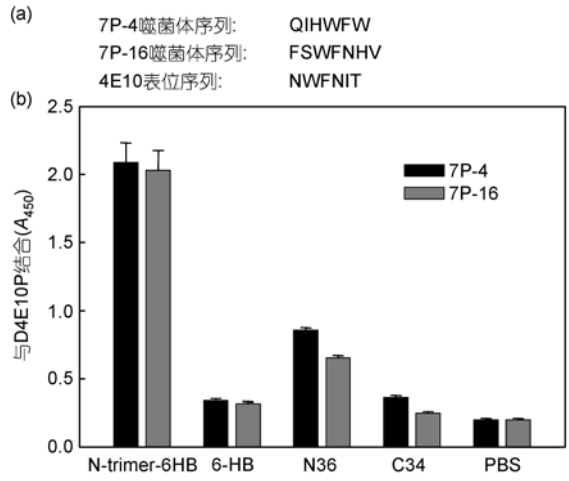

图 4

(a) 噬菌体克隆展示序列以及 4E10 表位相关序列. (b) 筛选出来的噬菌体克隆 7P-4 和 7P-16，与 gp41 融合核心衍生肽之间的相互作用

3 讨论

HIV-1 包膜蛋白gp41 的MPER区，作为该病毒广泛中和抗体 2F5 和 4E10 的重要靶点，无疑在病毒感染的过程中发挥着积极的作用[2,3,16,17]．Salzwedel等人[4]的研究表明，将MPER区的 4E10 表位缺失突变，或是将该序列上的几个重要的色氨酸突变后，会导致HIV病毒的细胞融合能力以及感染力的丢失．Munoz-Barroso等人[5]的研究表明，HIV病毒融合过程能够在小的融合孔形成之后被阻断．以上这些研究结果暗示我们，MPER区富含色氨酸的模体对于CD4 受体分子结合后的病毒融合过程具有至关重要的作用．然而，该作用的具体形式目前仍不十分清楚．

我们之前的研究发现，gp41-6HB核心区NHR上的突变，能够显著地影响MPER区 4E10 表位在细胞表面暴露的程度．因此，我们猜测在gp41 融合核心区与 4E10 表位序列之间可能存在某种联系[11]．鉴于此，在本项研究中，我们检测了 4E10 表位多肽与各种gp41-6HB核心区衍生多肽间的反应性．结果发现，4E10 表位多肽能够特异地识别NHR三聚体结构(N-trimer)，而与 6HB和N36 的结合作用则相对很弱．接着，通过N-trimer-6HB多肽筛选噬菌体短肽库，我们发现，4E10 表位上的“WF”两个氨基酸也许对于这种相互作用起着至关重要的作用．而“WF”模体几乎在所有HIV-1 病毒株中的保守性，也进一步强化了该模体对于HIV病毒健康状况的重要意义．此外，“WF”模体对于 4E10 抗体是否能够有效地识别原始病毒株也十分重要[16]．W672 和F673 残基的Ala突变，几乎导致 4E10 抗体不能识别其相应的表位[18]．Nakowitsch等人[19]证明，即便是处于 2F5，4E10 及 2G12 三种中和抗体联合的高选择压环境下，77 d后，4E10 表位中的“WF”残基仍然在患者体内的各个病毒株间相当保守，这也就是说“WF”残基对于病毒的感染十分地重要．

早期研究证明，HIV-1 进入靶细胞时，gp41 的融合肽会插入靶细胞膜中，而其NHR区和CHR区则分别形成N-trimer和C-helices，后两者通过借助某种未知的分子机制相互靠近，形成 6HB结构，最终导致病毒包膜和靶细胞膜的接近、融合[20,21]．我们的研究提示，gp41 的MPER区也许可以通过与gp41 预融合中介体状态下的N-trimer结构相互作用，促进N-trimer和C-helices间的结合以形成融合活性的 6HB核心结构，从而推动病毒的膜融合进程．因此，深入地探索本项工作，将可能为HIV融合抑制剂研究领域提供新的靶位点．

致谢 非常感谢美国纽约研究中心的 Veronica Kuhlemann 女士对本文英文版的校对和编辑．

参考文献

1 Binley J M, Wrin T, Korber B, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. J Virol, 2004, 78(23): 13232—13252[doi]

2 Cardoso R M, Zwick M B, Stanfield R L, et al. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a

highly conserved fusion-associated motif in gp41. Immunity, 2005, 22(2): 163—173[doi]
3 Zwick M B, Labrijn A F, Wang M, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. J Virol, 2001, 75(22): 10892—10905[doi]
4 Salzwedel K, West J T, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. J Virol, 1999, 291(73): 2469—2480
5 Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E, et al. Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. J Virol, 1999, 73(7): 6089—6092
6 Day J R, Munk C, Guatelli J C. The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. J Virol, 2004, 78(3): 1069—1079[doi]
7 Suarez T, Gallaher W R, Agirre A, et al. Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. J Virol, 2000, 74(17): 8038—8047[doi]
8 Vishwanathan S A, Hunter E. Importance of the membrane-perturbing properties of the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to viral fusion. J Virol, 2008, 82(11): 5118—5126[doi]
9 Yu H, Tudor D, Alfsen A, et al. Peptide P5 (residues 628—683), comprising the entire membrane proximal region of HIV-1 gp41 and its calcium-binding site, is a potent inhibitor of HIV-1 infection. Retrovirology, 2008, 5(1): 93[doi]
10 Dimitrov A S, Rawat S S, Jiang S, et al. Role of the fusion peptide and membrane-proximal domain in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. Biochemistry, 2003, 42(48): 14150—14158[doi]
11 Li J, Chen X, Jiang S, et al. Deletion of fusion peptide or destabilization of fusion core of HIV gp41 enhances antigenicity and immunogenicity of 4E10 epitope. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376(1): 60—64[doi]
12 Louis J M, Bewley C A, Clore G M. Design and properties of N(CCG)-gp41, a chimeric gp41 molecule with nanomolar HIV fusion inhibitory activity. J Biol Chem, 2001, 276(31): 29485—29489[doi]
13 Li J, Chen X, Huang J H, et al. Identification of critical antibody-binding sites in the HIV-1 gp41 six-helix bundle core as potential targets for HIV-1 fusion inhibitors. Immunobiology, 2009, 214(1): 51—60,[doi]
14 Huang J H, Liu Z Q, Liu S, et al. Identification of the HIV-1 gp41 core-binding motif--HXXNPF. FEBS Lett, 2006, 580(20): 4807—4814[doi]
15 Louis J M, Bewley C A, Gustchina E, et al. Characterization and HIV-1 fusion inhibitory properties of monoclonal Fabs obtained from a human non-immune phage library selected against diverse epitopes of the ectodomain of HIV-1 gp41. J Mol Biol, 2005, 353(5): 945—951[doi]
16 Zwick M B, Jensen R, Church S, et al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. J Virol, 2005, 79(2): 1252—1261[doi]
17 Cardoso R M, Brunel F M, Ferguson S, et al. A Structural basis of enhanced binding of extended and helically constrained peptide epitopes of the broadly neutralizing HIV-1 antibody 4E10. J Mol Biol, 2007, 365: 1533—1544[doi]
18 Brunel F M, Zwick M B, Cardoso R M, et al. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. J Virol, 2006, 80(4): 1680—1687[doi]
19 Nakowitsch S, Quendler H, Fekete H, et al. HIV-1 mutants escaping neutralization by the human antibodies 2F5, 2G12, and 4E10: *in vitro* experiments versus clinical studies. AIDS, 2005, 19(17): 1957—66
20 Chan D C, Kim P S. HIV entry and its inhibition. Cell, 1998, 93(5): 681—684[doi]
21 Weissenhorn W, Dessen A, Harrison S C, et al. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. Nature, 1997, 387(6631): 426—430[doi]