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, 陆路, 吴凡, 陈曦, 牛犇, 姜世勃*, 陈应华*

清华大学生物科学与技术系分子免疫实验室, 北京 100084;

北京蛋白质治疗重点实验室, 北京 100084;

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. <https://engine.scichina.com/doi/10.1360/CSB2009-54-9-1244>

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

( ) 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考文献[13,14].

( ) 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* 和*Xho* 位点克隆至pET28a载体(Novagen, Madison, WI)中, 转化到*E. coli* Rosseta菌株中表达.

( ) 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二巯苏糖醇(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.

( ) 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 NaHCO₃ 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}).

( ) 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 H₂O₂ 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.

( ) 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($[\theta]$, 10⁴ deg·cm²·dmol⁻¹).

( ) 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p 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].

( ) ELISA 检测噬菌体克隆与多肽的结合. 在包被液 0.1 mol/L NaHCO₃(pH 9.6)中稀释多肽至 1

$\mu\text{g/mL}$, 加入 96 孔板中, $50\ \mu\text{L/孔}$, 置于湿盒内, 4 过夜. 控干包被溶液, 每孔用 $5\ \text{mg/mL}$ 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 $50\ \mu\text{L}$, 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 , $1\ \text{mg/mL}$ OPD, 柠檬酸钠缓冲液) 显色, 测量 $450\ \text{nm}$ 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

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

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

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氨基酸突变后, 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 区富含氨基酸的模式对于 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](#)]