



Université de Montréal

**Étude du rôle des régions variables 4 et 5 dans les  
changements de conformation de la gp120 du VIH-1**

par  
Mathieu Coutu

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

23 février, 2015

© Mathieu Coutu, 2015



## Résumé

Le VIH infecte les cellules par fusion de sa membrane avec la membrane de la cellule cible. Cette fusion est effectuée par les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) qui sont synthétisées en tant que précurseur, gp160, qui est ensuite clivé en gp120 et gp41. La protéine gp41 est la partie transmembranaire du complexe de l'enveloppe et l'ancre à la particule virale alors que la gp120 assure la liaison au récepteur cellulaire CD4 et corécepteur CCR5 ou CXCR4. Ces interactions successives induisent des changements de conformation d'Env qui alimentent le processus d'entrée du virus conduisant finalement à l'insertion du peptide de fusion de la gp41 dans la membrane de la cellule cible. La sous-unité extérieure gp120 contient cinq régions variables (V1 à V5), dont trois (V1, V2 et V3) étant capables d'empêcher l'adoption spontanée de la conformation liée à CD4. Cependant, le rôle de régions variables V4 et V5 vis-à-vis de ces changements de conformation reste inconnu. Pour étudier leur effet, des mutants de l'isolat primaire de clade B YU2, comprenant une délétion de la V5 ou une mutation au niveau de tous les sites potentiels de N-glycosylation de la V4 (PNGS), ont été générés. L'effet des mutations sur la conformation des glycoprotéines d'enveloppe a été analysé par immunoprécipitation et résonance de plasmon de surface avec des anticorps dont la liaison dépend de la conformation adoptée par la gp120. Ni le retrait des PNGS de la V4 ni la délétion de V5 n'a affecté les changements conformationnels d'Env tels que mesurés par ces techniques, ce qui suggère que les régions variables V1, V2 et V3 sont les principaux acteurs dans la prévention de l'adoption de la conformation liée à CD4 d'Env.

**Mots-clés :** VIH, gp120, régions variables, V4, V5, Changements de conformation

## **Abstract**

HIV infects cells by fusing its membrane with the membrane of the target cell. This fusion is performed by the envelope glycoproteins (Env) which are synthesized as a precursor, gp160, which is later cleaved into gp120 and gp41. The transmembrane protein gp41 anchors the envelope complex to the viral particle whereas the gp120 ensures the binding to the cell receptor CD4 and coreceptor CCR5 or CXCR4. These sequential interactions trigger conformational changes on Env that fuel the viral entry process ultimately leading to the insertion of the gp41-derived-fusion peptide into the target cell membrane. The exterior subunit gp120 contains five variable regions (V1 to V5), of which three (V1, V2 and V3) have been shown to restrain the spontaneous sampling of the CD4-bound conformation by gp120. However, the role of variable regions V4 and V5 in these conformational changes remains unknown. To investigate their effect, mutants of the clade B YU2 primary isolate, comprising a deletion of the V5 or mutating all V4 potential N-linked glycosylation sites (PNGS), have been generated. The effect of mutations on the conformation of the envelope glycoproteins was analyzed by immunoprecipitation with conformation-dependent antibodies and surface plasmon resonance. Neither the removal of the V4 PNGS nor the removal of V5 affected Env conformational changes as measured by these techniques. Thus, suggesting that variable regions V1, V2 and V3 are the major players in preventing Env from spontaneously snapping into the CD4-bound conformation.

**Keywords** : HIV, gp120, variable region, V4, V5, conformational changes

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
1. Le virus d'immunodéficience humaine de type 1.....	1
1.1 L'incidence du VIH-1.....	1
1.2. Nature du virus.....	1
1.2.1 Classification du virus.....	1
1.2.2 Structure du virus.....	2
1.3. Génome Viral du VIH-1.....	3
1.3.1 Gènes essentiels.....	4
1.3.2 Gènes accessoires.....	10
1.4. Cycle de réplication du VIH-1.....	12
1.5. Traitement de l'infection au VIH-1.....	15
2. Glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1.....	16
2.1 Production, clivage et transport de l'enveloppe du VIH-1.....	16
2.2 La gp41.....	17
2.3 La gp120.....	17
2.4 Facteurs influençant les changements de conformation de la protéine Env du VIH-1.....	19
2.1.4.2 Cavité Phe43 et clivage de l'enveloppe.....	19
2.4.1 Domaine interne.....	19
2.4.3 Régions variables.....	20
2.5 L'organisation structurale trimérique de la protéine Env du VIH-1.....	23
2.6 Purification de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1.....	24

Hypothèse et objectif.....	26
Résumé de l'article.....	27
Contribution.....	28
Chapitre I:HIV-1 gp120 dimers decrease the overall affinity of gp120 preparations for CD4-induced ligands.....	29
Abstract.....	30
1. Introduction.....	30
2. Materials and Methods.....	32
3. Results.....	36
4. Discussion.....	40
5. Conclusion.....	41
6. Acknowledgments.....	42
References:.....	42
Discussion.....	55
1. L'effet de V4 et V5 sur les changements de conformation de la gp120.....	55
2. L'importance de l'isolation de monomère dans les tests biochimiques.....	57
3. L'importance d'une méthode simple et efficace pour isoler les monomères.....	58
4. L'effet des dimères sur les préparations vaccinales?.....	59
5. La réforme des dimères.....	59
6. Des préparations sans dimères.....	60
Conclusion.....	61
Annexe.....	62
Contribution pour des articles non-intégrés au mémoire.....	62
Bibliographie.....	64

## Liste des tableaux

- 2.1 SPR characterization of selected HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 variants before FPLC purification (containing gp120 monomers and dimers). 47
- 2.2 SPR characterization of selected HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 variants after FPLC purification (containing monomeric gp120). 48



## Liste des figures

1	Schéma d'une particule virale du VIH-1	3
2	Schéma du génome du VIH-1	4
3	Schéma illustrant les principales étapes du cycle répliatif du VIH-1	14
4	Schéma des sous-unités gp120 et gp41	18
5	Schéma vue de haut d'un trimère d'hétérodimère de gp120 et de gp41	24
2.1	Removal of dimeric gp120 by size-exclusion chromatography	49
2.2	gp120 dimers affect affinity constant calculations, as evaluated by SPR	50
2.3	Comparison of gp120 preparations by SPR analysis before and after size exclusion chromatography purification.	51
2.4	Effect of gp120 dimers on constant affinities, as evaluated by SPR	52
2.5	Recognition of gp120 variants by CD4i ligands	53
2.6	Quantification of dimeric gp120 contamination	54

## Liste des abréviations

ADCC	«Antibody-dependent cell cytotoxicity», cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALIX	« apoptosis-linked gene 2-interacting protein 1/X », protéine 1/X interagissant avec le gène lié à l'apoptose-2
AP-1	«Adaptor protein complex 1», Complexe de protéines adaptatrices 1
AP-2	«Adaptor protein complex 2», Complexe de protéines adaptatrices 2
APOBEC3	«Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3 » Polypeptide 3 d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARV	Antirétroviraux
ATR	«Ataxia telangiectasia and Rad3-related», voie relative à l'Ataxie telangiectasie et Rad3
C1	Région conservé de l'enveloppe 1
C2	Région conservé de l'enveloppe 2
C3	Région conservé de l'enveloppe 3
C4	Région conservé de l'enveloppe 4
C5	Région conservé de l'enveloppe 5
CA	Capside
CCR5	Récepteur de chimiokine CC de type 5
CDK9	«Cyclin-dependent kinase 9», Kinase cycline-dépendante 9
CRT	Complexe de reverse transcriptase

CD4	Cluster de différenciation 4
CD8	Cluster de différenciation 8
CMH-1	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
CRF	«Circulant recombinant form», Forme recombinante circulante
CXCR4	Récepteur de chimiokine CXC de type 4
DCAF1	«DDB1-Cul4-associated factor 1», facteur associé à DDB1-Cul4A
DDB1	«DNA binding protein 1», Protéine de liaison à l'ADN 1
ELISA	«Enzyme-linked immunosorbent assay», méthodes immuno-enzymatiques
Env	Enveloppe
ESCRT	«Endosomal sorting complex required for transport», complexe de triage endosomal requis pour le transport
Gag	Group-specific antigen, Antigène spécifique de groupe
gp41	Glycoprotéine de 41 kDa
gp120	Glycoprotéine de 120 kDa
gp160	Glycoprotéine de 160 kDa
HR1	«Heptad repeat» 1
HR2	«Heptad repeat» 2
IN	Intégrase
Ka	Constante d'association
Kd	Constante de dissociation
KD	Constante d'affinité
kDa	Kilodalton
LLP-1	«Lytic peptide 1», peptide lytique 1
LLP-2	«Lytic peptide 2», peptide lytique 2
LLP-3	«Lytic peptide 3», peptide lytique 3
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MPER	«Membrane External Proximal Region», Région proximale externe à la membrane
NC	Nucléocapside
Nef	«Negative factor», facteur négatif

NK	«Natural Killer cell», cellule tueuse naturelle
NKG2D	« Natural Killer Group 2 D», tueuse naturelle du groupe 2 D
NTB-A	« NK, T and B cell antigen », Antigène des cellules NK, T et B
pH	Potentiel hydrogène
Phe43	Phénylalanine 43
PIC	«Pre-integration complex» Complexe de pré-intégration
PNGS	«potential N-linked glycosylation sites», sites potentiels de N-glycosylation
Pol	Polymérase virale
PR	Protéase
PR55 <sup>gag</sup>	Précurseur de gag de 55 kDa
PR160 <sup>gag-pol</sup>	Précurseur de gag-pol de 160 kDa
p-TEFb	«Positive transcription elongation factor b», facteur positif b d'élongation de la transcription
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	«Regulator of expression virions proteins», régulateur de l'expression des protéines virales
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRE	«Rev-responsive element», Élément de réponse à Rev
RT	Reverse Transcriptase
sCD4	CD4 soluble
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SP1	«Spacer peptid 1», Peptide d'espacement 1
SP2	«Spacer peptid 2», Peptide d'espacement 2
Tat	«Transcriptionnal transactivator», Transactivateur transcriptionnel
TAR	«Transactivator Response Element», élément de réponse au transactivateur
TNF- $\alpha$	«Tumor necrosis factor $\alpha$ », facteur de nécrose des tumeurs $\alpha$
TPNO3	Transportine-3
TSG101	«Tumor susceptibility gene», Gène de susceptibilité aux tumeurs
V1	Région variable de l'enveloppe 1
V2	Région variable de l'enveloppe 2
V3	Région variable de l'enveloppe 3

V4	Région variable de l'enveloppe 4
V5	Région variable de l'enveloppe 5
Vif	«Viral infectivity factor», facteur d'infectivité virale
VIH-1	Virus d'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	Virus d'immunodéficience humaine de type 2
VLM	Virus leucémique murin
Vpr	«Viral protein R», protéine virale R
Vpu	«Viral protein U», protéine virale U
VIS	Virus d'immunodéficience simienne
VIScpz	Virus d'immunodéficience simienne de chimpanzé
VS-40	Virus simien 40

*À mes parents, mon frère et Bridget pour leur  
support et leur dévouement*

## Remerciements

Le travail effectué lors de ces deux dernières années et demi n'aurait jamais pu être effectué sans la contribution de mon directeur de recherche, Andrés Finzi. Malgré les accrocs et les embûches le long du chemin me menant au dépôt de ce mémoire, il a toujours été là pour me guider. Il m'a offert de nombreux conseils autant au niveau scientifique que personnel qui, j'espère, me mèneront vers de nouveaux sommets.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire, présent et passé, pour leur support. Anik Désormeaux et Halima Medjahed pour l'aide apportée au début de ma maîtrise, Nirmin Alsahafi pour son aptitude à me donner un sourire en coin quand ça ne va pas, Olfa Debbeche pour sa bonne humeur et l'effort qu'elle a mis à tout commander pour nous et Jonathan «Johny» Richard pour son esprit scientifique vif et son sens de l'humour. Un merci spécial à Maxime Veillette pour ses soirées au labo au milieu de ma maîtrise où nous passions tous deux de nombreuses heures à travailler à nos projets respectifs et toutes les idées dont nous avons discutés.

Évidemment, merci à mes parents, Johane et Jean-Maurice, et à mon frère David pour tout le support à travers les années. Je ne serais pas là sans eux. Merci à Bridget de m'avoir offert dans ses derniers mois le réconfort dont j'avais besoin.

Merci à tous pour votre aide et votre support.

# **Introduction**

## **1. Le virus d'immunodéficience humaine de type 1**

### **1.1 L'incidence du VIH-1**

Environ 35 millions de personnes vivent avec le virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) mondialement, incluant environ 71 000 au Canada(1). Ce virus cause une infection persistante pouvant mener au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (2, 3). De 1983 à 2012, environ 39 millions de personnes sont décédées de causes reliées à l'infection au VIH-1 (4). Malgré le fait que les traitements antirétroviraux (ARV) ont permis une réduction de la mortalité de 2,5 millions en 2005 à 1,6 millions en 2012 et que le nombre de nouvelles infections a baissé de 33% de 2001 à 2012, aucun traitement actuel ne permet l'éradication du virus. Malgré des années d'effort, la quête pour un vaccin contre le VIH-1 n'a pas encore porté fruit (5, 6).

### **1.2. Nature du virus**

#### **1.2.1 Classification du virus**

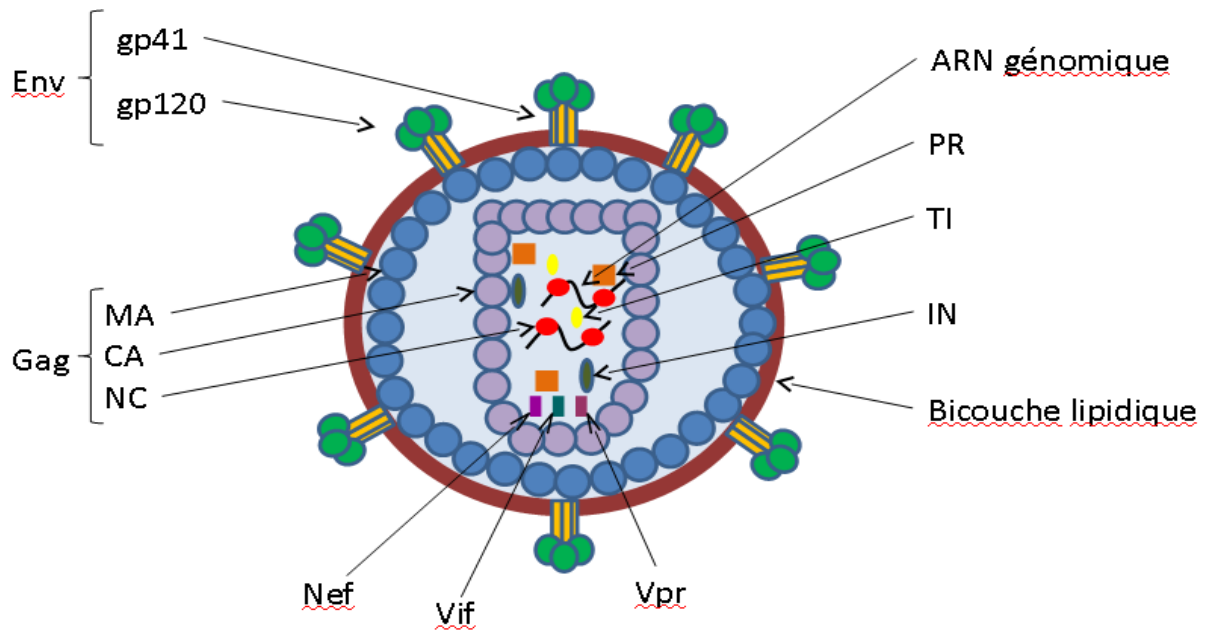
Le VIH-1 est un virus à acide ribonucléique (ARN) possédant deux exemplaires du génome monocaténaire à polarité positive de la famille des rétrovirus (*Retroviridae*). Les rétrovirus ont la capacité de transcrire leur génome ARN en acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire grâce au processus de transcriptase inverse effectué par la reverse transcriptase (RT). La RT est une polymérase peu fiable qui induit un taux de mutations élevées, ce qui explique en partie la grande variabilité de ce virus (7). Suite à ce processus, l'ADN est intégré



au génome de la cellule, ce qui permettra la production des protéines et de l'ARN viral (8). Les rétrovirus ont tous les gènes *gag* («Group-specific antigen»), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe) codant pour les protéines nécessaires à la réplication virale, qu'elles soient structurales, enzymatiques ou de régulation (9, 10). Le génome des rétrovirus complexes, comme le VIH-1, contient aussi des gènes régulateurs et accessoires (11). Le VIH-1 fait partie du genre des lentivirus tout comme le virus d'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) et le virus d'immunodéficience simienne (VIS) (11). Le VIH-2 et le VIS causent un syndrome semblable au SIDA chez l'homme et le singe respectivement (12, 13). Des études phylogénétiques permettent de séparer le VIH-1 en 4 groupes principaux : M, N, O et P (14–17). Le groupe M est le principal, étant composé de 98% des souches de VIH-1, et est composé des sous-groupes A,B,C,D,F,G,H,J,K et de forme recombinante circulante (CRF). Les CRF apparaissent lorsqu'une personne est infectée par plus d'un sous-groupe à la fois et qu'une recombinaison entre les deux se produit. Si le produit de cette recombinaison est viable, transmissible et présent dans au moins 3 individus non-épidémiologiquement liés, il s'agit d'une CRF. Le groupe M proviendrait du VIS de chimpanzé (VIScpz) (18–20). Le sous-groupe C est responsable de la majorité des infections au niveau mondial, alors que le sous-groupe B est le plus présent en Amérique (21). Les lentivirus portent leur nom car leur infection comprend une longue période d'incubation et une production virale persistante (22).

### **1.2.2 Structure du virus**

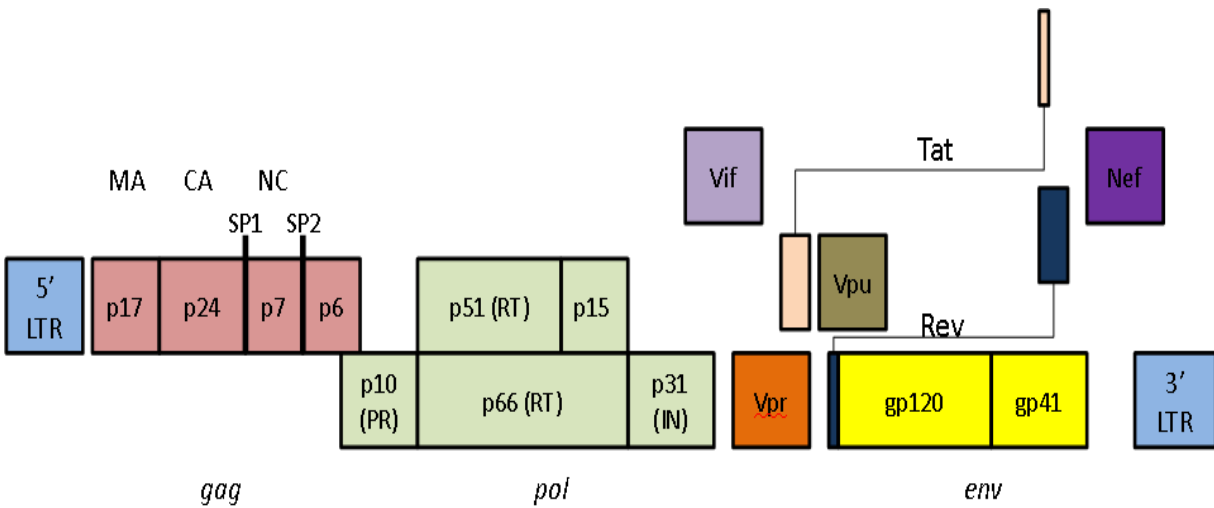
Le VIH-1 est un virus de morphologie hétérogène en forme et taille avec des particules de 80 à 120 nanomètre de diamètre (23–25). Il est enveloppé d'une bicouche lipidique, formée à partir de la membrane de la cellule infectée, sur laquelle on retrouve la protéine de l'enveloppe (Env) (Figure 1). Cette protéine est séparée en deux sous-unités, soit la glycoprotéine 120 (gp120) et la glycoprotéine 41 (gp41). Le côté interne de la membrane du virion est recouvert de la protéine de la matrice (MA) p17. À l'intérieur, la protéine de la capsid (CA) virale se trouve sous forme multimérique et forme le cœur viral conique. À l'intérieur de ce cœur se retrouvent les enzymes nécessaires à l'établissement de l'infection soit la protéase (PR), l'intégrase (IN) et la RT. Il contient aussi la nucléocapside (NC) recouvrant le génome viral (11). En plus des protéines essentielles à l'établissement de l'infection, le virion contient la protéine virale R (vpr), le facteur négatif (Nef) et le facteur d'infectivité viral (Vif) (26–29).



**Figure 1** Schéma d'une particule virale du VIH-1

### 1.3. Génome Viral du VIH-1

Le génome du VIH-1 est composé de deux brins d'ARN à polarité positive identiques de 10kb (30). Les gènes sont contenus entre deux «Long Terminal Repeat» (LTR) en 5' et 3' (Voir Figure 2). On y retrouve évidemment les gènes caractéristiques des rétrovirus *gag*, *pol* et *env*. Les gènes *tat* et *rev* sont aussi essentiels à la réplication du virus. En plus des gènes essentiels, le génome du VIH-1 encode des gènes pour des protéines dites accessoires, soit les gènes *nef*, *vpu*, *vpr* et *vif*. Elles ne sont pas nécessaires à la réplication du virus *in vitro*, mais elles sont connues pour influencer ou contrecarrer plusieurs facteurs cellulaires, ce qui permet une infection efficace *in vivo*.



**Figure 2** Schéma du génome du VIH-1

### 1.3.1 Gènes essentiels

Le gène *gag* encode le précurseur Gag ( $P55^{gag}$ ), qui sera clivé en protéines MA, CA, NC, le peptide d'espacement 1 (SP1), le peptide d'espacement 2 (SP2) et p6 suite au bourgeonnement du virion (11, 31). Le précurseur Gag est essentiel au bourgeonnement des virions et peut d'ailleurs bourgeonner sans l'aide des autres protéines virales (32).

La protéine MA, ou p17 de par son poids de 17 kilodaltons (kDa), contient un site reconnaissant le Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, ce qui lui permet de se diriger vers la membrane plasmique (33, 34). Cette protéine permet l'attachement de Gag à la membrane grâce à des acides myristiques intégrés à sa région N-terminale (35, 36). Il a été démontré que des mutations dans MA ou la queue cytoplasmique de la gp41 peuvent bloquer l'incorporation d'Env dans les virions et que des mutations compensatoires dans l'autre protéine permettent de rétablir l'intégration, suggérant une interaction directe entre Env et MA (37–41). Des études *in vitro* ont démontré que MA se multimérise à la membrane en hexamère de trimère,

ce qui concorde avec les données par cristallographie à rayons X qui montre une structure trimérique alors que la résonance magnétique nucléaire (RMN) montre une structure monomérique (42–44).

La protéine CA (aussi connu sous le nom de p24 dû à son poids de 24 kDa) mature, c'est-à-dire ayant subite le clivage par la protéase virale la séparant du reste du précurseur Gag, s'assemble en une structure de forme conique fullerène de 100 à 120 nanomètre de long et 50 à 60 nanomètre de large composé d'environ 250 hexamères de CA (23, 45, 46). Douze pentamères de CA sont aussi répartis aux extrémités, soit 7 à l'extrémité large et 5 à l'extrémité étroite, ce qui donne à la capsid sa forme (47). Les monomères d'un hexamère sont reliés surtout par l'interaction de leur portion N-terminale, quoiqu'il existe des interactions faibles entre les portions N-terminales et C-terminales, alors que les hexamères sont reliés entre eux par l'interaction des différentes portions C-terminales (48). Au total, la capsid virale est formée d'environ 1500 monomères de CA, ce qui veut dire que la majorité des CA provenant d'environ 2500-5000 Gag de la particule virale ne font pas partie du cœur viral et n'ont pas de fonction connue (49). La capsid joue un rôle très important dans le complexe de reverse transcriptase (CRT) en établissant un environnement propice pour l'activité de la RT (50, 51). La protéine CA est aussi connue pour interagir avec la cyclophiline A, ce qui permet une infection plus efficace (52–58). La capsid semble aussi être impliquée dans l'import nucléaire, notamment par l'interaction avec plusieurs molécules des pores nucléaires tel la transportine-3 (TPNO3) (59, 60). De plus, lorsque CA de VIH-1 est échangé pour CA du virus de la leucémie murine (VLM), le virus devient incapable d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, contrairement au vih-1 de type sauvage (61).

La protéine NC, aussi connu sous le nom de p7 dû à son poids de 7 kDa, est la protéine recouvrant l'ARN viral dans le virion. Environ 1500-2000 NC recouvrent les deux brins de l'ARN génomique de VIH-1 dans un assemblage d'ARN dimérique (62–64). NC assure la protection du génome ARN notamment par sa capacité à lier et condenser l'ARN (65, 66). La NC contient deux domaines de liaison au zinc, aussi connu sous le nom de doigt de zinc, ayant une composition similaire mais ayant des fonctions distinctes et sont donc tous deux essentiels à la réplication virale (67–70). En plus de lier de façon non-spécifique les acides nucléiques, NC est capable de lier certaines séquences spécifiques, dont la séquence d'encapsidation  $\psi$ , ce qui est essentiel à l'inclusion du génome viral dans les virions (71, 72).

Les peptides SP1 et SP2 sont retrouvés dans le virion et sont donc le résultat du clivage des précurseurs par PR (31). SP1 se retrouve entre CA et NC, alors que SP2 est situé entre NC et p6. Il a été démontré que SP1 est nécessaire à l'assemblage et à l'infectivité de VIH-1, potentiellement par la formation d'une hélice  $\alpha$  à la jonction CA-SP1 (73–75). Les six premiers résidus de SP1 sont particulièrement sensibles et même de minimes changements à cette séquence empêche la maturation appropriée de P55<sup>gag</sup> (76). Il a aussi été postulé que SP1 affecte l'incorporation de l'ARN viral (77). Le peptide SP2 n'a pas encore de fonction définie et il a été démontré qu'il pouvait être retiré sans affecter l'infectivité *in vitro* du virus si le site de clivage entre NC et p6 et la section de changement de cadre était conservé (78).

La protéine p6, notamment le motif PTAP, est essentielle au relâchement des virions (79, 80). Ce motif interagit avec la protéine du gène de susceptibilité aux tumeurs 101 (TSG101) (81–84). Le motif YPX<sub>n</sub>L reconnaît la protéine X interagissant avec le gène lié à l'apoptose-2 (ALIX) avec l'aide de NC (85–87). Ces deux protéines font partie du complexe

de triage endosomal requis pour le transport (ESCRT), un processus cellulaire impliqué dans plusieurs fonctions essentielles telles la séparation des cellules lors de la cytokinèse et qui est détourné par le virus pour le relâchement de ces virions (81, 88).

Le gène *pol* transcrit avec le gène *gag* grâce à un changement de cadre de lecture lors de la transcription de ce dernier dans 5 à 10% de cas (89, 90). Ce changement de cadre permet la production du précurseur Gag-Pol (P160<sup>gag-pol</sup>). La rareté relative de ce changement de cadre permet la conservation d'un ratio P55<sup>gag</sup>/ P160<sup>gag-pol</sup> de 20 pour 1 qui est essentiel à l'assemblage et l'infectivité du virus (91, 92). Le résultat du clivage de P160<sup>gag-pol</sup> sont les protéines PR,RT et IN (11, 93).

La protéine PR, ou p10 dû à son poids de 10 kDa, est la protéase aspartique effectuant la maturation des précurseurs P55<sup>gag</sup> et P160<sup>gag-pol</sup> en les différentes protéines virales et est nécessaire à l'infectivité des virions (93–95). Il a aussi été démontré que PR doit dimériser pour effectuer sa fonction (96, 97). Dû à l'instabilité du dimère lorsque PR est encore contenue dans P160<sup>gag-pol</sup>, la conformation mature étant seulement adoptée dans 2-5% des cas, les premiers clivages sont souvent intramoléculaires (98–100). Par la suite, le dimère clivé de PR se stabilise et permet un clivage plus efficace.

La protéine RT est responsable de la transcription de l'ARN viral en ADN proviral (101, 102). Elle est composée de deux sous-unités nommées p51 et p66 en raison de leur poids moléculaire en kDa (103). La sous-unité p51 est produite par le clivage de p66 par PR, ce qui entraîne aussi la formation de p15 qui montre une activité RNase mais n'a pas de fonction connue (104, 105). La sous-unité p66 effectue les fonctions d'ADN polymérase ARN-dépendante et de RNase, alors que p51 est associée à la conservation de la structure du dimère

ADN/ARN et participe à l'hydrolyse ainsi qu'au positionnement de l'hybride ADN/ARN (106–111). L'activité RNase permet la dégradation de l'ARN dans l'hybride ADN/ARN et la formation d'une amorce ARN sur le brin ADN afin de faciliter la synthèse du brin ADN de polarité positive (111).

La protéine intégrase (IN), p31 de part son poids moléculaire de 31 kDa, a pour fonction d'intégrer l'ADN proviral à l'ADN génomique de la cellule infectée. IN forme des tétramères composés de dimères de dimères et lorsqu'en complexe avec l'ADN viral est appelé intasome (112). Elle possède trois domaines : un domaine N-terminal, un domaine central catalytique et un domaine C-terminal. Le domaine N-terminal contient un motif HHCC liant le zinc qui contribue à la multimérisation d'IN et à la liaison à l'ADN (113). Le domaine central catalytique contient un motif DDX<sub>35</sub>E liant le magnésium et est responsable du processus de transfert de brin et de la réorganisation de l'extrémité 3' (voir la section 1.4 pour plus de détails) en plus de contribuer à la liaison de l'ADN viral et cellulaire et la multimérisation d'IN (114, 115). Le domaine C-terminal adopte une structure en baril  $\beta$  et aide à la multimérisation d'IN ainsi qu'à la liaison de l'ADN cellulaire (116).

Le gène *env* encode la glycoprotéine 160 (gp160) qui est clivé en gp120 et gp41 par une protéase cellulaire de type furine (117–120). Env forme le spicule, constitué d'un trimère d'hétérodimère de gp41 et de gp120, qui est le seul complexe protéique viral exposé à la surface des virions (121). La gp120 est responsable de la liaison du récepteur principal du VIH-1, le récepteur cluster de différenciation 4 (CD4), ainsi qu'un co-récepteur, soit CCR5 ou CXCR4 (122–129). La gp41 est la partie du complexe permettant l'entrée du virus grâce à son peptide de fusion qui peut s'intégrer dans la membrane de la cellule cible lors du processus d'entrée (voir la section 1.4 pour plus de détails sur le processus de fusion) (130, 131). Elle



fait partie des protéines contrôlant l'expression de CD4 à la surface des cellules infectées, notamment en bloquant CD4 dans le réticulum endoplasmique (132, 133). La protéine Env est discutée plus en détail dans la section 2 de ce mémoire.

Le transactivateur transcriptionnel (Tat) est une protéine de 14 kDa qui permet l'activation de la transcription du génome viral grâce à l'élément de réponse au transactivateur (TAR) se trouvant sur l'ARN viral au début du transcrit viral (134–138). Tat permet une augmentation de la transcription après le 59<sup>ème</sup> nucléotide suivant l'initiation qui est dramatiquement réduite sans Tat (139). Tat contient un domaine riche en arginines et nécessaire à la liaison à l'ARN et à la fonction de la protéine *in vitro* (140–143). Afin d'effectuer la transactivation, Tat lie le facteur positif b d'élongation de la transcription (p-TEFb) composé de la cycline T qui recrute la kinase cycline-dépendante 9 (CDK9) (144–146). CDK9 phosphoryle l'ARN polymérase II, ce qui permet l'élongation de la transcription (146).

Finalement, le régulateur de l'expression des protéines virales (Rev) est une protéine de 19 kDa retrouvée principalement dans le noyau (147, 148). Rev permet la sortie d'ARN non-épissé du noyau, ce qui inclut le génome viral, grâce à l'élément de réponse à Rev (RRE) (149, 150). Sa portion N-terminale contient un motif riche en arginine qui agit comme signal de localisation nucléaire et de liaison au RRE (148). Un signal d'inhibition de localisation cellulaire oblige le transport actif plutôt que passif de la protéine et est essentiel à sa fonction (151). La portion C-terminale contient le site actif pour l'exportation des ARN du noyau jusqu'au cytoplasme (152). Afin d'entrer dans le noyau, Rev doit lier l'importine- $\beta$ , Ran-GDP et B23 (153, 154). Suite à l'entrée au noyau, jusqu'à 12 molécules de Rev lient le RRE d'un ARN (155, 156). L'exportation du complexe Rev/ARN se fait grâce à Crm1 qui guide le

complexe à travers les pores nucléaires (157). Une fois de retour au cytoplasme, Rev lie de nouveau l'importine- $\beta$ , ce qui relâche l'ARN et recommence le cycle d'import/export de Rev.

### 1.3.2 Gènes accessoires

En plus des gènes essentiels, le génome du VIH-1 contient les gènes *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* qui encodent pour les protéines du même nom.

Vif est une protéine de 23 kDa qui est essentielle à la réplication dans les cellules non-permissives comme les macrophages et certains types de lymphocytes (158–160). Elle est connue pour sa contre-action de la famille des polypeptide 3 d'apolipoprotéine B catalytique à l'activité d'édition de l'ARNm (APOBEC3) (161). L'absence de Vif permet à APOBEC3G d'induire des hypermutations dans le génome du VIH lors de la rétro-transcription, entraînant l'intégration d'un génome proviral défectueux et une infection non-productive (162, 163). Les 8 tryptophanes de Vif sont importants pour la liaison et donc la contre-action face à APOBEC3G et APOBEC3F (164). Il a aussi été démontré que Vif interagit avec P55<sup>gag</sup>, P160<sup>gag-pol</sup> et l'ARN viral et aurait donc un rôle dans l'assemblage des virions (165–169). Plusieurs résidus de Vif peuvent être phosphorylés et sont liés à l'effet de Vif sur l'infectivité (170, 171). La partie N-terminale de la protéine est associée autant à la liaison aux protéines de la famille APOBEC qu'à la liaison à l'ADN (165, 167, 172). La section centrale de Vif contient un doigt de zinc avec un motif HCCH qui permet le recrutement du complexe de l'ubiquitine ligase E3 (173–175). Ce complexe permet la dégradation des protéines APOBEC3 (175). La partie C-terminale est importante pour l'interaction avec le précurseur Gag, la mutimérisation de Vif et à un plus faible degré la liaison aux protéines APOBEC3 et du complexe de l'ubiquitine ligase E3 (176–178).

Vpr est une protéine de 96 acides aminés particulièrement importante pour l'infection des macrophages (179–181). Elle est intégrée dans les virions grâce à l'interaction d'oligomère de Vpr avec la portion p6 du précurseur Gag (182, 183). Vpr se retrouve dans le cœur viral où elle interagit avec l'ARN viral (184–187). Cette protéine induit un arrêt cellulaire en phase G2 grâce à l'interaction avec la protéine de liaison à l'ADN 1 (DDB1), la Cullin 4A (Cul4A) et le facteur associé à DDB1-Cul4A 1 (DCAF1)(188–193). L'arrêt de cycle est effectué grâce à la voie relative à l'Ataxie telangiectasie et Rad3 (ATR) (194). Vpr est aussi associé à l'induction de l'apoptose même si le mécanisme exact reste à déterminer (195–197). Il a été proposé que Vpr induit l'apoptose chez les lymphocytes Cluster de différenciation 8 (CD8) par le facteur de nécrose des tumeurs  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) suite au contact avec des cellules dendritiques infectées (198). Il a été démontré que Vpr provoque la surexpression de la molécule tueuse naturelle du groupe 2 D (NKG2D) ce qui cause l'activation des cellules tueuses naturelles (NK) et la destruction des cellules cibles (199, 200). Vpr est aussi retrouvé dans le CRT et interagit avec l'ADN proviral (201–205). Cette protéine aurait un rôle dans l'initiation de la rétro transcription et promouvoit la fidélité de la RT (206–208).

La protéine virale U (Vpu) est une protéine de 8 kDa contenant un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et une longue queue cytoplasmique (209, 210). Elle régule négativement l'expression de surface de certaines protéines cellulaires incluant le CD4 nouvellement synthétisé et le facteur de restriction tétherine (209, 211–214). La dégradation de CD4 par Vpu commence par la liaison des deux protéines par leur domaines transmembranaires dans le RE, suivi de la poly-ubiquitination de CD4 qui mènera à sa dégradation par la voie de dégradation associé au RE (215, 216). La protéine Vpu est connue

pour augmenter la relâche virale en dégradant le facteur de restriction tétherine qui ancre les particules virales à la surface de la cellule (211, 217, 218). Ces deux actions de Vpu ont été démontrées comme protectrices contre la réponse de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (219–221). De plus, Vpu est aussi lié à la régulation négative de l'antigène des cellules NK, T et B (NTB-A) (222).

Nef est une protéine virale de 25 kDa (223). Elle est une des grandes responsables de l'antagonisme de CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) (224–226). La protéine Nef interagit avec la queue cytoplasmique de ces deux récepteurs afin de modifier leur trafic cellulaire. L'antagonisme de CD4 s'effectue grâce à l'interaction de Nef avec AP-2 et les puits de clathrine, ce qui permet l'internalisation de CD4 (227, 228). Cette régulation négative permet d'éviter la surinfection des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (229). Ce phénomène a aussi été associé à la protection contre la réponse cytotoxique dépendante des anticorps (221). L'antagonisme du CMH-1 se fait plutôt en le retenant dans l'appareil de Golgi grâce à l'interaction avec AP-1 (230). Cette régulation négative permet de protéger contre la réponse cytolytique des lymphocyte CD8 (231). Afin d'éviter d'être détectée par les cellules NK, Nef s'associe seulement à l'antigène de leucocyte humain (ALH) A et B en laissant ALH-C, F et G à la surface de la cellule (232).

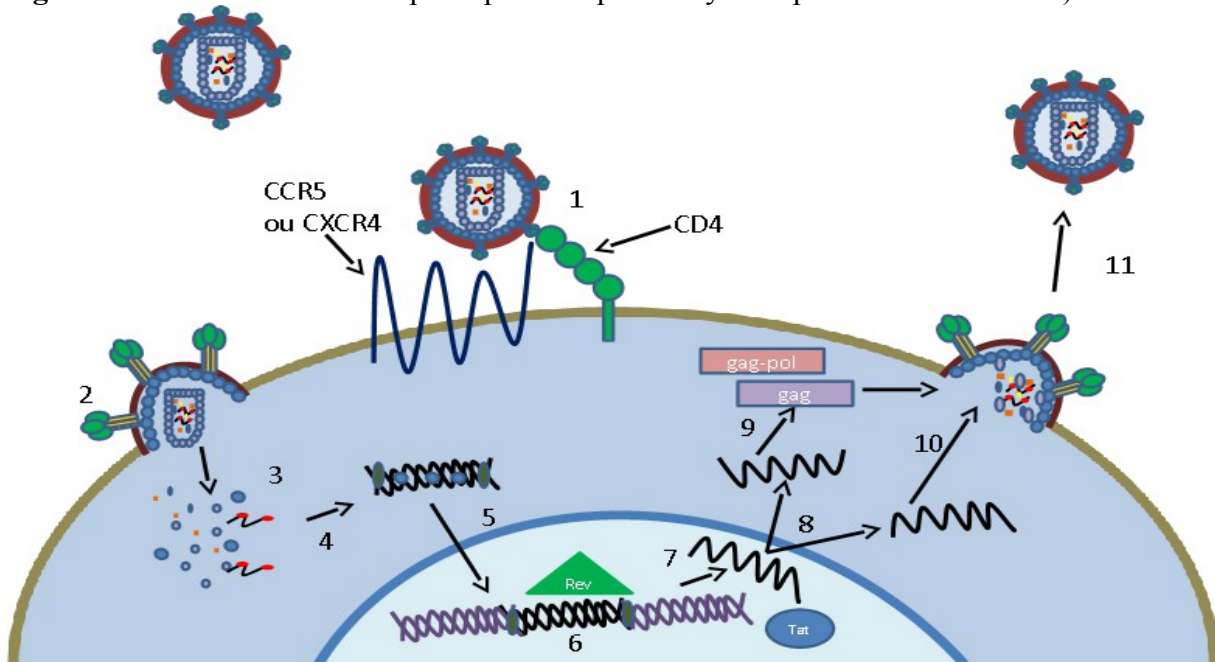
#### **1.4. Cycle de réplication du VIH-1**

Le VIH-1 infecte les cellules cibles grâce à l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4 et son co-récepteur CCR5 ou CXCR4 (122–129). De ce fait, les cellules cibles doivent présenter ces récepteurs pour être susceptibles à l'infection. La cible principale du VIH-1 sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais les macrophages et les cellules dendritiques sont aussi susceptibles à l'infection (11). Le schéma de la figure 3 illustre le cycle de réplication du VIH-1 de l'infection à la production de nouveaux virions. La première étape de l'infection est

l'interaction de la gp120 avec CD4 qui induit des changements de conformation, incluant l'exposition de la région variable 3 (V3), et permet l'interaction avec le corécepteur CCR5 ou CXCR4 (selon le tropisme viral, R5 ou X4, respectivement). Les virus utilisant CCR5 peuvent infecter les macrophages et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CCR5, alors que les virus utilisant CXCR4 peuvent infecter les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CXCR4. Certains virus peuvent aussi utiliser les deux corécepteurs, ce qui leur permet d'infecter autant les macrophages que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CCR5 et/ou CXCR4 (233). Suite à l'interaction avec le corécepteur, des changements de conformation dans la gp41 permettent l'exposition du peptide de fusion (234–236). Le peptide de fusion s'insère dans la membrane cellulaire et les «heptad repeat» 1 et 2 (HR1 et HR2) forment le fagot à six hélices, ce qui finit par rapprocher les membranes virales et cellulaires permettant la fusion (130, 131).

Suite au processus de fusion, le cœur viral est relâché dans le cytoplasme où il est décapsidé (237). Pendant la décapsulation, la RT retro-transcrit le génome viral en ADN. Par la suite le complexe de pré-intégration (PIC), composé de MA, IN, Vpr et de l'ADN viral, migre vers le noyau grâce à la présence de signaux de localisation nucléaires. Une fois à l'intérieur du noyau, IN effectue l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule. L'ADN ainsi intégré sera transcrit en ARN par la machinerie cellulaire avec l'aide de Tat et de son site de liaison dans le LTR, plus précisément le TAR. Les transcrits sont épissés (une forme non-épissée est aussi présente afin d'être intégrée aux particules virales), puis exportés vers le cytoplasme avec l'aide de Rev pour être traduits en protéines ou intégrés aux nouveaux virions. Les précurseurs protéiques Pr55<sup>gag</sup> et Pr160<sup>gag-pol</sup> et le génome viral s'assemblent à la membrane cellulaire (238). Éventuellement, la protéine p6 utilisera la machinerie ESCRT afin de permettre le bourgeonnement de virion immature (81). C'est à ce moment que PR clive les précurseurs (voir section 1.3.1 pour plus de détails) et que les virions adoptent leur forme mature.

**Figure 3** Schéma illustrant les principales étapes du cycle réplcatif du VIH-1 : 1) Liaison de



la gp120 et CD4 2) l'entrée par fusion membranaire 3) le décapsidation 4) la transcription inverse 5) l'import nucléaire 6) l'intégration du génome viral au génome cellulaire 7) la transcription du génome viral 8) l'exportation des ARNm et du génome viral 9) la production des protéines virales 10) l'assemblage 11) le bourgeonnement et la maturation du virion.

### 1.5. Traitement de l'infection au VIH-1

Tel que mentionné précédemment, aucun remède contre le VIH-1 n'a encore été découvert. Cependant, des thérapies antirétrovirales permettent le contrôle de l'infection (239). Les différents types de médicaments incluent les inhibiteurs de PR, d'IN, de RT et d'entrée virale.

La majorité des inhibiteurs de protéases sont des inhibiteurs peptidomimétiques qui lient la protéase avec une haute affinité et empêche le clivage de ses substrats habituels (240–242). Il existe aussi un inhibiteur non-peptidomimétique, le tipranavir, qui est surtout utilisé en cas de résistance aux autres inhibiteurs (243).

Les inhibiteurs d'intégrases inhibent la capacité de l'intégrase d'effectuer le transfert de brin lors de l'intégration du génome viral au génome humain (244).

Les inhibiteurs de rétrotranscriptases existent sous deux formes : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques. Les inhibiteurs nucléosidiques sont des molécules similaires aux nucléosides utilisés par la RT lors de la rétrotranscriptase et bloquent sa progression (245). Les inhibiteurs non- nucléosidiques lient la RT et empêchent de façon allostérique la polymérisation de l'ADN (245).

Les inhibiteurs d'entrée virale s'attaque à la capacité des virions d'effectuer la fusion avec la cellule cible. Maraviroc et enfurtivide (T20) sont les deux inhibiteurs présentement utilisés en clinique (246). Maraviroc se loge dans une pochette hydrophobique de CCR5 et empêche sa liaison à la gp120 (247). Enfurtivide est un peptide basé sur la répétition heptade 2 (HR2) qui va lier la répétition heptade 1 (HR1) et empêcher la formation du fagot à six hélices (248).

## **2. Glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1**

### **2.1 Production, clivage et transport de l'enveloppe du VIH-1**

Les protéines Env sont d'abord exprimées sous forme d'un précurseur gp160 grâce au gène *env*. L'ARN messager (ARNm) est traduit par des ribosomes liés au réticulum endoplasmique (RE) rugueux, ce qui cause l'internalisation de la protéine dans le RE au fur et à mesure de sa synthèse. Peu de temps après sa traduction, la gp160 se trimérise (249). La gp160 se dirige vers la membrane du RE grâce à un signal de localisation qui est coupé par la suite. Une région hydrophobe de la gp160, qui est en fait la partie transmembranaire de la gp41, retient le complexe partiellement dans la membrane du RE (250). C'est à ce moment alors que la queue

cytoplasmique est dans le cytoplasme et que l'autre extrémité, qui est la partie externe du spicule, est dans le lumen du RE que la gp160 est glycosylée (117, 251, 252). Lors de son transport vers la membrane cellulaire transitant par le Golgi, la gp160 est finalement clivé en gp41 et gp120 par des protéases cellulaires de la famille des furines (117–119). Cependant, les deux sous-unités restent liées de façon non-covalente (253, 254). Lorsque présente à la surface de la membrane cellulaire, le complexe d'Env entre dans un cycle d'internalisation rapide grâce au système cellulaire de clathrine (255–258). Ce cycle permet d'éviter une accumulation importante d'Env à la surface des cellules infectées, ce qui représente une stratégie afin d'éviter la détection par le système immunitaire. Cependant cela contribue aussi, avec la perte de la gp120 due à la faible interaction avec la gp41, à la faible quantité d'Env incorporée aux virions (259).

## **2.2 La gp41**

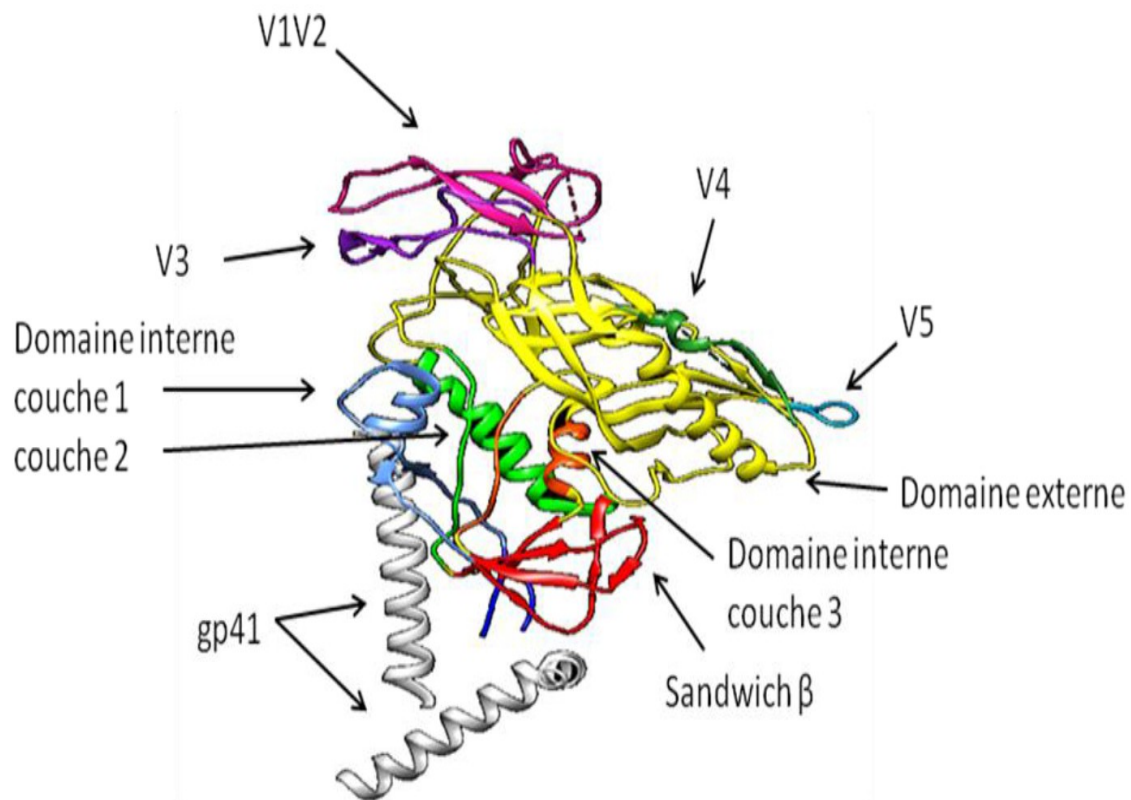
La gp41 est une protéine transmembranaire et ancre le complexe de l'enveloppe à la particule virale. La sous-unité gp41 est composée d'une queue cytoplasmique; une région transmembranaire, une région proximale externe à la membrane (MPER), le peptide de fusion et deux régions de répétition heptade complémentaires (HR1 et HR2) reliées par un pont disulfure (260). La région transmembranaire, qui est composée d'environ 25 acides aminés, ancre la gp41 dans la membrane cytoplasmique (261). Le MPER est composé de 24 acides aminés et est nécessaire à la fusion virale (262, 263).



La queue cytoplasmique contient plusieurs motifs dont un motif d'internalisation YxxL près de la membrane qui permet l'internalisation par le système de clathrine avec le complexe de protéines adaptatrices 2 (AP-2) (264). Un motif dileucine vers la fin de la queue cytoplasmique permet l'internalisation par le complexe de protéines adaptatrices 1 (AP-1) (265). La queue cytoplasmique contient aussi trois segments amphipathiques en hélices  $\alpha$  nommés peptide lytique 1 à 3 (LLP-1, LLP-2 et LLP-3). Ces segments sont liés à la capacité de fusion d'Env, la stabilité de la protéine, la multimérisation, l'expression à la surface des cellule, l'incorporation et la cytolysse (266–272).

### **2.3 La gp120**

La gp120 assure la liaison au récepteur CD4 et aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (124–127). Elle est composée d'extrémités N- et C-terminale, d'un feuillet de pontage, d'un domaine interne et d'un domaine externe (Figure 4) (273). Les extrémités N- et C-terminale sont dirigées vers la gp41 en provenance du domaine interne. Le domaine interne est composé de trois couches topologiques qui émanent d'un sandwich  $\beta$ . Le feuillet de pontage relie le domaine interne au domaine externe. Toutes ces régions sont formées à partir de régions conservées 1 à 5 (C1 à C5) desquelles émanent 5 régions variables (V1 à V5). (273–277)



**Figure 4** Schéma d'une sous-unité de la gp120 et de la gp41 de la construction BG505 SOSIP.664 (PDB: 3J5M) effectué grâce au programme UCSF Chimera 1.10.1 (278). La gp41 est en blanc, les extrémités N- et C- en bleu foncé, le sandwich  $\beta$  en rouge, le domaine externe en jaune, les couches topologiques 1,2 et 3 en bleu pâle, vert pâle et orange respectivement, les régions variables 1 et 2 en rose et les régions variables 3, 4 et 5 en mauve, vert foncé et cyan respectivement.

## **2.4 Facteurs influençant les changements de conformation de la protéine**

### **Env du VIH-1**

#### **2.1.4.2 Cavité Phe43 et clivage de l'enveloppe**

Le site de liaison à CD4 est situé dans une poche nommée la cavité phénylalanine 43 (Phe43) car c'est à cet endroit que la phénylalanine 43 de CD4 s'insère pour entrer en contact avec la gp120. Cette cavité est formée en partie des domaines internes et externes en plus du feuillet de pontage (273). L'asparagine 368, l'acide glutamique 370 et le tryptophane 427 sont les principaux points de contact du site de liaison à CD4 (273). Le changement de la Sérine 375, qui fait partie de la paroi de la cavité Phe43, en tryptophane remplit artificiellement cette cavité ce qui résulte dans un changement spontané de la conformation de la gp120 vers sa forme liée à CD4 (279). Le clivage semble aussi avoir un important effet sur la conformation, car l'affinité pour des anticorps préférant la forme liée à CD4 est augmentée alors que celle pour des anticorps reconnaissant le site de liaison à CD4 diminue (280).

#### **2.4.1 Domaine interne**

Il a été démontré que les couches topologiques 1 et 2 du domaine interne interagissent ensemble après la liaison de la gp120 à CD4 et sont requises au maintien de cette liaison (276). L'interaction entre les deux couches est gouvernée majoritairement par les résidus H66 et W69 de la couche 1 et D107, L111 et P212 de la couche 2. Le remplacement individuel de ces résidus par une alanine, ou une leucine dans le cas de W69, perturbe la capacité de la gp120 de lier CD4 ou des anticorps préférant la forme liée à CD4. L'utilisation d'autres acides aminés, comme l'asparagine, pour remplacer H66 amène un phénotype similaire (281, 282). Il est aussi intéressant de mentionner que la mutation de la cavité Phe43 S375W permet de

rétablir l'interaction avec CD4 pour les mutants des couches 1 et 2 (276). Ce phénomène est due au fait que l'insertion d'un tryptophane dans la cavité Phe43 augmente l'affinité au CD4, ce qui compense la perte d'affinité de la 1ère mutation, et amène la gp120 dans une conformation plus proche de la conformation liée à CD4. Il a été montré qu'en forçant l'interaction entre les couches 1 et 2 en remplaçant les résidus 65 (couche 1) et 115 (couche 2) par des cystéines, la gp120 devient conformationnellement bloquée dans la conformation liée à CD4 et présente une meilleure affinité aux anticorps préférant la forme liée à CD4 (283).

La couche topologique 3 contribue à la transition d'Env à la conformation liée à CD4 en stabilisant la cavité Phe 43 et en interagissant avec la couche 2 (284). Contrairement à la couche 1 et 2, la couche 3 influence l'association de CD4 plutôt que sa dissociation (276, 284). En changeant le résidu W479, conservé dans tous les isolats de VIH-1,2 et VIS, pour une alanine, l'interaction entre les couches 2 et 3 est perturbée, ce qui empêche la transition vers la conformation liée à CD4 (284).

Le sandwich  $\beta$  ne semble pas influencer la conformation, mais est primordial pour la stabilité du trimère d'Env et l'interaction avec la gp41 (253, 276, 285).

### **2.4.3 Régions variables**

Les régions variables sont une partie importante dans le contrôle des changements de conformation. Il a entre autres été démontré qu'en enlevant V1, V2 et V3, la gp120 adoptait la conformation liée à CD4 de façon spontanée (286). Selon les récentes études de microscopie électronique cryogénique et de cristallographie, V1, V2 et V3 se rejoignent au sommet du trimère, ce qui renforce la théorie qu'elles sont essentielles à l'intégrité du trimère (287, 288). De plus, il est possible d'altérer plusieurs phenotypes comme la résistance à l'inactivation par le froid, la neutralisation par du CD4 soluble (sCD4) ou l'amélioration de l'infectivité par Nef,

par un mécanisme encore inconnu, en échangeant les régions V1,V2 ou V3 entre deux souches, ce qui laisse présumer un rôle important dans la conformation de l'enveloppe (289, 290).

Des substitutions d'acides aminés ou des délétions peuvent aussi avoir des effets importants sur la conformation de la gp120. Par exemple, la substitution T132N et la délétion N139INN dans V1 permette le rétablissement de l'association entre la gp120 et la gp41 du mutant du pont disulfure reliant HR1 et HR2, K601D, malgré le fait que V1 est éloignée du site d'interaction de la gp120 et de la gp41. Il est possible que ces mutants effectuent un changement dans le bouclier de glycan de la gp120 ce qui influencerait le site d'interaction gp120/gp41 et rendrait superflus les résidus L593, W596 et K601 (291).

Plusieurs résidus de V2 sont aussi impliqués dans les changements de conformation, comme l'acide aspartique 179 qui est hautement conservé autant dans le VIH que le VIS (292). La substitution D179N rend le virus plus sensible à certains anticorps et certaines drogues qui ciblent des épitopes cachés dans la conformation native de l'enveloppe (292). D'autres mutants, notamment D180N, D167G et N197H, induisent aussi une neutralisation plus grande face à des anticorps reconnaissant des épitopes éloignés comme le site de liaison à CD4 ou celui du corécepteur, ce qui laisse encore penser que V2 est importante pour l'intégrité de la gp120 (293).

D'autres mutations, comme R166K/D167N, influence la liaison d'anticorps contre V3 dans le contexte trimérique, mais pas dans le contexte monomérique, ce qui laisse présumer une interaction entre les différentes sous-unités (294). En enlevant un site de glycosylation (D197S/K/Q), le virus acquiert la capacité d'effectuer la fusion CD4-indépendante et présente une plus grand affinité pour les anticorps reconnaissant la conformation liée à CD4 et le site de

liaison au corécepteur (295). D'autres sites de glycosylation comme N160 affecte, en plus des anticorps contre la V2, la liaison des anticorps contre le site de liaison à CD4, probablement en repositionnant la V2 (296). La sulfation des tyrosines a aussi été liée au changement de conformation. Les tyrosines 173 et 177 de la gp120 de cellules infecté sont sulfatées et imitent les tyrosines de CCR5 qui interagissent avec V3. Les gp120 produites dans des lignées cellulaires qui ne peuvent effectuées la sulfation semble avoir une interaction V2/V3 altérée, ce qui pourrait repositionner le sommet du trimère (297).

Plusieurs mutations de la V3, notamment H308R, R315Q, T319A et E322D, semblent affecter la conformation d'Env, car elles modifient la liaison d'anticorps contre V1 et V2 (298). Il a aussi été démontré que même un seul changement de glycosylation (à la position 295) affecte dramatiquement la position de la V3, ce qui pourrait influencer le tropisme du virus et l'exposition de certains épitopes (299).

Aucune étude n'a été effectué directement sur l'effet de V4 et V5 sur la conformation d'Env. Cependant, V4 et V5 sont cruciales à l'intégrité du spicule, car le remplacement des ces régions par des séquences peptidique de liaison empêche Env d'être incorporé dans les virions et/ou induit la perte d'interaction entre la gp120 et la gp41 (300). De plus, l'interaction des anticorps contre le site de liaison à CD4 comme VRC01 et b12 ou des anticorps reconnaissant la conformation liée à CD4 (X5 et 17b) est perturbé par ces changements (300, 301). La délétion de la V4 est aussi associée à un défaut de clivage (302).

## **2.5 L'organisation structurale trimérique de la protéine Env du VIH-1**

Un facteur important dans la compréhension des changements de conformation est la compréhension des changements structuraux de la protéine. Hors, aucune structure complète à haute résolution du spicule de l'enveloppe du VIH-1 n'a été obtenue et ce malgré près de 22 ans après la première structure partielle la région variable 3, suivi 5 ans plus tard par une structure plus ou moins complète de la gp120 monomérique (273, 303). Il faut attendre en 2013 pour que les premières structures trimériques à haute résolution soient obtenues par cryo-électrotomographie et cristallographie à rayons X à des résolutions de 4,7 et 5,8 Å respectivement (274, 278). Comme on peut le voir dans la figure 5, les régions variables 1,2 et 3 convergent vers le centre du trimère à une grande proximité l'une de l'autre, ce qui aide à comprendre pourquoi ses régions ont un grand effet sur la conformation de l'enveloppe. De façon opposée, les régions variable 4 et 5 font face à l'extérieur du trimère et les régions des différentes sous-unités sont éloignées, ce qui laisse penser que l'effet sur la conformation serait plus subtil. Il est important de mentionner que la V4 possède une section qui reste désordonnée, ce qui diminue les analyses structurales possibles.



**Figure 5** Schéma vue de haut d'un trimère d'hétérodimère de gp120 et de gp41 de la construction BG505 SOSIP.664 (PDB: 3J5M) effectué grâce au programme UCSF Chimera 1.10.1 (278). La gp41 est en noir, la gp120 en beige, les régions variables 1 et 2 en rose et les régions variables 3, 4 et 5 en mauve, vert foncé et cyan respectivement.

## **2.6 Purification de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1**

Depuis plusieurs années, des outils pour étudier les changements de conformation de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 ont été développés afin de comprendre ces changements et leur rôle dans le processus de fusion et l'immunogénicité du VIH-1. Pour faciliter ces études, la production de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 a été effectuée dans plusieurs modèles de surexpression. Il est important de noter que la glycosylation est essentielle à certaines propriétés de l'enveloppe, ce qui exclut sa production en bactérie (304).



Évidemment, elle doit être purifiée avant d'être utilisée. Les premières purifications étaient effectuées grâce à l'électrophorèse sur gel d'acrylamide à partir de culture de cellules H9 infectées, ce qui rend le traitement de grandes quantités difficiles (305). Par la suite, l'utilisation de la chromatographie d'affinité, à partir de résine conjuguée à du sérum de plusieurs patients infectés par le VIH-1, a permis de faciliter l'isolation de la gp120, malgré un très faible rendement de cellules H9 infectées (306). Le premier plasmide basé sur le virus simien 40 (VS-40) codant pour les protéines Tat et Env a permis une expression environ 100 fois plus grande comparé aux cellules H9 (307). La découverte de l'interaction entre la gp120 et certaines lectines a permis le développement de méthodes de purification utilisant de la résine conjuguée à de la lectine afin de purifier la gp120 (308). Suivant l'isolation de plusieurs anticorps monoclonaux contre l'enveloppe du VIH-1, plusieurs groupes ont commencé à utiliser des colonnes contenant ses anticorps pour purifier la gp120/gp140 (309). Une étape importante dans l'évolution du modèle de surexpression a été l'optimisation de l'usage des codons dans les plasmides de gp120, c'est-à-dire changer la séquence nucléotidique pour les codons préférentiels des cellules humaines sans changer la séquence d'acide aminés, ce qui permet une transcription plus rapide et une production accrue (310). Une autre méthode couramment utilisé pour la purification de la gp120 est l'inclusion d'une étiquette d'histidine à la protéine, ce qui permet une purification d'une grande pureté sur une résine couplé à du nickel.(284)

Il a été démontré que la surexpression de la glycoprotéine de l'enveloppe entraîne la formation de dimères de gp120 (311–314). Il a par la suite été démontré que ses dimères ne sont pas bien repliés et n'exposent pas certains épitopes normalement exposés sur la gp120 monomérique(314).

## Hypothèse et objectif

Il a été démontré que les régions V1, V2 et V3 jouent un rôle essentiel dans les changements de conformation de la gp120. Malgré le fait que ces régions soient appelées variables, certains traits sont hautement conservés comme la longueur de la V3 ou certains résidus clés. Ces traits sont déterminants dans les fonctions de ces régions. Les régions V1, V2 et V3 sont hautement caractérisées du côté conformationnel dû à leur position au sommet du trimère d'enveloppe. Cependant, le rôle que pourrait jouer les régions V4 et V5 n'a pas encore été adressé.

Suite aux évidences démontrant un effet des dimères lors des immunoprécipitations, peu de recherche a été effectuée pour vérifier le rôle des dimères dans d'autres tests biochimiques. Effectivement, ces dimères, lorsque non-séparés des monomères, introduisent un biais dans la reconnaissance de la gp120 par certains anticorps (314). Notamment, l'effet que les dimères pourraient avoir sur les calculs d'affinité dans la résonance de plasmons de surface n'a pas été investigué.

Nous avons émis l'hypothèse que les régions V4 et V5 pourraient elles aussi avoir un effet sur la conformation de la gp120. Certaines études démontrent effectivement un effet de la glycosylation dans le cadre du VIH-2 (315, 316). De plus, nous estimons que la chromatographie par exclusion de taille serait suffisante pour séparer les monomères et dimères étant donné leur différence de taille et que les monomères ainsi obtenus auront une affinité supérieure pour certains ligands comparativement aux préparations purifiées de façon standard.

L'objectif de mon projet était donc d'investiguer si V4 et V5 avaient une influence sur la conformation de la gp120 tout en optimisant une méthode permettant d'obtenir des monomères de gp120 pour ensuite investiguer la différence entre les monomères purs et une préparation contenant des dimères et des monomères dans le cadre de la résonance de plasmons de surface afin d'observer si les dimères introduisent un biais dans les résultats.

## **Résumé de l'article**

Depuis plusieurs années, des outils pour étudier les changements de conformation de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 ont été développés afin de comprendre ces changements et leur rôle dans le processus de fusion et l'immunogénicité du VIH-1. Pour faciliter ces études, la production de la gp120 du VIH-1 a été effectuée dans plusieurs modèles de surexpression. Cependant, la surexpression de gp120 du VIH-1 dans des cellules de mammifères conduit à la formation de dimères dû à des liaisons disulfures aberrantes qui peuvent fausser les résultats d'expériences destinées à mesurer la gp120 avec différents ligands d'affinité. La présence de ces dimères de gp120, générés dans un système d'expression de gp120 largement utilisé, affecte l'affinité de ligands pour la gp120 préférant la conformation liée par CD4, comme évaluée par résonance de plasmonsique de surface. Après purification de monomère de gp120, ni l'élimination de sites de glycosylation potentiels sur V4 ni la délétion de la région variable V5 n'affectent l'affinité globale de la gp120 pour les ligands préférant la conformation liée par CD4. L'élimination de dimères de gp120 par chromatographie d'exclusion de taille est suffisante pour rétablir l'affinité globale de la préparation de la gp120 pour ces ligands.

## **Contribution**

Ma contribution a été d'effectuer toutes les expériences d'immunoprécipitations et de résonance de plasmons de surface, en plus de la purification de protéines et de mon apport intellectuel. J'ai contribué à la rédaction de l'article. Andrés Finzi a dirigé l'effort intellectuel, le design des expériences et la rédaction de l'article.

# **Chapitre I: HIV-1 gp120 dimers decrease the overall affinity of gp120 preparations for CD4-induced ligands.**

Mathieu Coutu<sup>1,2</sup> and Andrés Finzi<sup>1,2,3#</sup>

Affiliations:

<sup>1</sup>Centre de Recherche du CHUM and <sup>2</sup>Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

**#Corresponding author:**

**Andrés Finzi**

Centre de recherche du CHUM (CRCHUM)

Address:

900 St-Denis street, Tour Viger, R09.420

Montréal, Québec, Canada

H2X 0A9

**Running Title: gp120 dimers affect overall binding affinity to CD4i ligands**

**Key Words:** HIV, gp120, gp120 dimers, Surface Plasmon Resonance, FPLC, CD4-induced epitopes

**Word Count for Abstract: 177**

**Word Count for Text: 2722**

## **Abstract**

For several years, tools to study the conformational changes of HIV-1 envelope glycoproteins have been developed in order to comprehend those changes and their role in the fusion process and immunogenicity of HIV-1. To facilitate these studies, expression of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein has been done in several over-expression settings. However, over-expression of HIV-1 gp120 in mammalian cells leads to the formation of aberrant disulfide-linked dimers that can bias the results of experiments aimed at measuring gp120 affinity with different ligands. Here we report that the presence of these gp120 dimers, generated in a widely-used gp120 expression system, affects the affinity of gp120 for CD4-induced antibodies, as evaluated by surface plasmon resonance. We also report that when working with purified monomeric gp120, neither the removal of potential glycosylation sites on V4 nor the removal of the V5 variable region affect the overall affinity of gp120 for 17b and A32 CD4 induced ligands. Removal of these aberrantly-linked gp120 dimers by standard size exclusion chromatography is sufficient to restore the overall affinity of gp120 preparations for these ligands.

## **1. Introduction**

The viral spike, formed by the envelope glycoproteins (Env) of human immunodeficiency virus (HIV-1), mediates viral entry through conformational changes following interactions with its receptor CD4 and either of its co-receptors CCR5 or CXCR4 (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Chan et al., 1997; Kwong et al., 1998; Wyatt and Sodroski, 1998). This spike is composed of a trimer of heterodimers of glycoprotein 41 and glycoprotein 120 (gp41 and gp120) which are produced as a precursor gp160 in the endoplasmic reticulum (ER) (Allan et al., 1985; Robey et al., 1985). In the ER, the gp160 is folded and is then cleaved by proteases of the Furin family during its transport to the cell membrane via the Golgi apparatus

(Hallenberger et al., 1992; Li et al., 2000). Upon reaching the plasma membrane, the Env complex is incorporated into nascent viral particles (Rowell et al., 1995; Egan et al., 1996).

A lot of efforts have been invested to produce soluble forms of Env such as gp120 monomers or gp140 composed of the gp120 and part of the extracellular portion of the gp41 (Earl et al., 1990; Sanders et al., 2002, 2013). A recent stabilized version of a soluble trimer has also been described (Sanders et al., 2013). This trimeric gp140, the BG505 SOSIP.664 gp140, is composed of gp120 and gp41 up to residue 664, with a disulfide bond between the gp120/gp41 heterodimer and a stabilizing change of a proline by an isoleucine at position 559 (Julien et al., 2013; Lyumkis et al., 2013). It has previously been reported that producing either gp120 or gp140 in mammalian cells can lead to the formation of a large quantity of unusual dimers. Their formation is influenced by several residues and the variable region 2 of the gp120 (V2) (Schawaller et al., 1989; Doms et al., 1991; Hallenberger et al., 1993; Center et al., 2000; Finzi et al., 2010a). Importantly, it has been previously shown that these gp120 dimers do not fold properly and do not expose several epitopes present in monomeric gp120 (Finzi et al., 2010a). However, the impact of their presence in gp120 preparations on the interaction with several ligands was only tested by immunoprecipitation. The impact of gp120 dimers on affinity kinetics measured by surface plasmon resonance (SPR) was evaluated. Dimers decrease the overall affinity of gp120 preparations for CD4 and CD4-induced (CD4i) antibodies mainly through an on-rate defect. A simple and fast protein liquid chromatography (FPLC) approach allows their removal thus eliminating the bias they engender.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Cell lines**

The 293T human embryonic kidney (American Type Culture Collection) cell line was grown at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 5 % fetal bovine serum (Sigma, St Louis, MO, USA) and 100 µg/ml of penicillin-streptomycin (Mediatech, Inc., Manassas, VA, USA). Expi293F™ (Invitrogen) growth conditions are described in the “Production of recombinant gp120” section below.

### **2.2 Site-directed mutagenesis**

Mutations (N386A, N397A, N406A) were introduced into the codon-optimized pcDNA3.1-HIV-1<sub>YU2</sub> gp120, previously described, using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis protocol (Stratagene, Cedar Creek, TX, USA) (Yang et al., 2004). The codon-optimized pcDNA3.1-HIV-1<sub>YU2</sub> ΔV1V2V3 expression construct, previously described by Kwon *et al.*, was made by replacing the sequence encoding 124-198 from the V1/V2 loop with a sequence encoding a GG linker and the sequence encoding 302-323 from the V3 loop with a sequence encoding a GGSGSG linker (Kwon et al., 2012). The ΔV5 was made by replacing residues 460-465 by a GSG linker. In the ΔV1V2V3V5, the truncations described above were present in combination (Kwon et al., 2012). The presence of the desired mutations was confirmed by Sanger DNA sequencing. All residues are numbered according to the prototypic HXBc2 sequence (Korber et al., 1998).



### **2.3 Production of recombinant gp120**

The Expi293F™ human cell line was grown to a density of  $2 \times 10^6$  cells/ml at 37 °C and 8 % CO<sub>2</sub> with regular agitation (125 rpm) in Expi293F Expression Medium (Invitrogen) without antibiotics or serum. Cells were transfected with codon-optimized plasmids expressing His(6)-tagged wild-type or mutant HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 using the ExpiFectamine™ reagent (Invitrogen), as directed by the manufacturer. One week later, cells were pelleted and discarded. The supernatants were filtered (0.22-µm pore-size filter), and the gp120 glycoproteins were purified by nickel affinity beads (Invitrogen), as directed by the manufacturer. To assess purity, recombinant proteins were loaded on SDS-PAGE polyacrylamide gels with or without 5% of beta-mercaptoethanol and stained with Coomassie blue. Eluted fractions were then concentrated using Centriprep-30K (EMD Millipore Billerica, MA, USA) centrifugal filter units following the manufacturer instructions. gp120 preparations were dialyzed against PBS using 3,500 MW Spectra/Por dialysis membrane (Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, USA) and stored at 4 °C until FPLC separation.

### **2.4 Purification of gp120 monomer by size exclusion chromatography**

The purification was done with an AKTA Prime Plus (General Electric, Fairfield, CT, USA) FPLC using a Superdex 200 10/300 GL (General Electric) and a HILOAD 16/60 Superdex 200 PG (General Electric) columns installed in series. Before the purification, PBS was run into the FPLC at 0.3 mL/min overnight or until PBS has filled the column and machine and a stable UV signal was attained. Preparations of gp120 were then injected using a 5 mL injection loop following the manufacturer instructions. Fractions were set at 1 mL for 300 minutes. Under these conditions, fractions containing dimers start at around 170 minutes and

the monomer peak is detected around 240-290 minutes. To assess overall quality of the separation, fractions (10-20  $\mu$ l) were loaded on SDS-PAGE without beta-mercaptoethanol (to detect any potential contamination by disulfide-linked gp120 dimers) (Finzi et al., 2010a) and stained with Coomassie blue. All fractions containing monomers were pooled and concentrated with the Centriprep-30K (EMD Millipore) until the desired concentration was achieved.

## **2.5 SPR biosensor analysis.**

Surface Plasmon Resonance biosensor data was acquired on a Biacore 3000 optical biosensor (General Electric). Either CD4-Ig or monoclonal antibodies 17b or A32 were immobilized onto separate flow cells chip (CM5; GE) to a surface density never in excess of 250-500 RU response units (RU), using standard amine coupling chemistry (Johnsson et al., 1991). Flow cells 1 and 3 of each chip were left blank as a control for non-specific binding and refractive index changes. With the instrument operating in a parallel sensing mode, soluble gp120 was injected over all flow cells at different concentrations ranging from 100 to 750 nM (or 10 to 100 nM for high-affinity mutants) at a flow rate of 30  $\mu$ l/min for 3 min. This was followed by a 10 minutes dissociation phase to allow an estimation of off-rates and binding affinities. Sensor data were prepared for kinetic analysis by subtracting binding responses collected from the blank reference surfaces. The association and dissociation phase data were fitted with the BIAevaluation, version 3.2, RC1 software using a 1:1 Langmuir model of binding. The  $K_a$  value represents the rate of association between the ligand and the analyte, while  $K_d$  refers to the dissociation rate of those two molecules. The ratio of these rates enables the calculations of the affinity constant ( $K_D$ ).

## 2.6 Immunoprecipitation of envelope glycoproteins

For pulse-labeling experiments,  $3 \times 10^5$  293T cells were transfected with pcDNA3.1-HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 variants using a standard calcium phosphate method. One day after transfection, cells were metabolically labeled with 55  $\mu\text{Ci/mL}$  [<sup>35</sup>S]-methionine/cysteine ([<sup>35</sup>S] protein labeling mix; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium lacking methionine and cysteine and supplemented with 5 % dialyzed fetal bovine serum. After 48h, cell supernatants were recovered. Precipitation of radiolabeled HIV-1 envelope glycoproteins from supernatant was performed with a mixture of sera from HIV-1-infected individuals. Alternatively, radiolabeled gp120 envelope glycoprotein in the supernatant was precipitated with various amounts of anti-gp120 monoclonal antibodies or the recombinant CD4-Ig protein for 2 hours at 37°C in the presence of 50  $\mu\text{l}$  of 10% Protein A-Sepharose beads (American BioSciences, Blauvelt, NY, USA). The beads were then washed twice with RIPA buffer (140 nM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % NP40, 0.05 % sodium dodecyl sulfate (SDS)). Laemmli buffer without  $\beta$ -mercapto-ethanol was added to the beads before heating them at 100 °C for 5 min and loaded on SDS-PAGE polyacrylamide gels. After migration, gels were dried with a Model 583 gel dryer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and exposed in a storage phosphor cassette. Densitometry data was acquired with a Typhoon Trio Variable Mode Imager (Amersham Biosciences) storage phosphor acquisition mode. Results were analyzed using Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics).

## **2.7 Statistical analysis**

Comparison between groups was performed with either a two-tailed Student T-test or a Mann-Whitney U test using Graph Pad Prism, version 5.0, software. Data were expressed as means standard error of the mean (SEM), and P values of 0.05 were considered to be significant.

## **3. Results**

### **3.1 HIV-1 gp120 dimers can be removed by size exclusion chromatography**

As previously described, expression of gp120 results in the production of a mix of gp120 monomers and dimers that can easily be assessed by migrating protein preparations on SDS-PAGE in absence of  $\beta$ -mercaptoethanol (Finzi et al., 2010a). Accordingly, in absence of  $\beta$ -mercaptoethanol, in addition to the expected band of monomeric gp120, a slow migrating band corresponding to disulfide-linked gp120 dimers can be detected for wt, N386A N397A N406A and  $\Delta$ V5 mutants but not for  $\Delta$ V1V2V3 and  $\Delta$ V1V2V3V5 (Figure 1A). This is in line with previously reported observations that V1V2 and, to a lesser extent, V3 regions are involved in gp120 dimer formation (Center et al., 2000; Finzi et al., 2010a). However, upon addition of  $\beta$ -mercaptoethanol, which reduces disulfide links, all variants migrate as a single band (Figure 1B). Importantly, following size exclusion chromatography purification by FPLC and pooling of the fractions containing only monomeric gp120, a single band was obtained when migrating without  $\beta$ -mercaptoethanol; thus indicating that this simple purification method can remove gp120 dimers from these preparations (Figure 1C).

### 3.2 The presence of gp120 dimers influence SPR analysis

To test the impact of gp120 dimers on SPR analysis, gp120 preparations before and after FPLC separations, were compared using ligands that recognize either the CD4 binding-site (CD4-Ig) or CD4-induced epitopes (A32 and 17b). CD4-Ig is a fusion protein containing the two N-terminal domain of CD4 and the FC portion of an immunoglobulin G (Chowdhury et al., 1991). Monoclonal A32 and 17b antibodies are known as CD4-induced antibodies (CD4-i Abs) since their epitopes are exposed upon interaction of gp120 with its receptor CD4. The A32 epitope is located in the inner domain layers, while the 17b and 48d epitopes overlap with the co-receptor binding site (Karwowska et al., 1992; Robinson et al., 1992; Thali et al., 1993; Moore et al., 1994; Kwon et al., 2012; Veillette et al., 2014). It has previously been shown that removal of variable regions V1, V2 and V3 allows the gp120 to spontaneously sample the CD4-bound conformation (Kwon et al., 2012). Therefore, this variant was used as a positive control for interaction with CD4i ligands. Of note, it is already known that removal of variable regions V1, V2 and V3 increases 17b binding more noticeably than A32 binding (Kwon et al., 2012). Additionally, the N386A N397A N406A,  $\Delta$ V5 and  $\Delta$ V1V2V3V5 gp120 mutants were constructed to investigate the role of V4 and V5 in CD4i ligands interaction. The mutant N386A N397A N406A was designed to remove potential glycosylation sites from the V4, since the complete deletion of V4 leads to a misfolded protein (Yuan et al., 2013 and data not shown).

His(6)-tagged gp120 proteins, purified with nickel beads but before FPLC separation and thus containing a mix of gp120 monomers and dimers were used to conduct SPR analysis using

CD4-Ig, 17b, 48d and A32 (Table 1). As expected, the variants where the V1,V2 and V3 have been removed presented higher affinity for CD4-Ig and CD4i Abs than wt gp120, confirming their role on restraining the gp120 from spontaneously sampling the CD4-bound conformation (Kwon et al., 2012). The N386A N397A N406A and  $\Delta$ V5 variants did not show any significant difference compared to wt. However, deletion of V5 within a  $\Delta$ V1V2V3 variant resulted in a two fold increase in overall affinity for CD4i ligands (Figure 2A), suggesting that V5 could contribute in maintaining gp120 in its unbound conformation (i.e. preventing the gp120 from “snapping” into the CD4-bound conformation). However, dimer exclusion by FPLC indicates that this is not the case (see below). Thus, exemplifying the type of bias that could arise when working with gp120 purified by nickel beads only (i.e., before FPLC separation). Also, in agreement with its role on CD4 binding (Lasky et al., 1987; Cordonnier et al., 1989; Sterjovski et al., 2011), removal of V5 decreased the affinity of wt or  $\Delta$ V1V2V3 gp120s for CD4 (Table 1).

To evaluate whether the results described above were affected by the presence of gp120 dimers in the protein preparation, we removed them by size exclusion chromatography and obtained preparations enriched in monomeric gp120 (Figure 1C). As shown in Table 2, when gp120 dimers were removed from protein preparations, the effect of V5 removal on CD4i ligands dissipated (Figure 2B), suggesting that the effect described above (Table 1) was biased by the presence of gp120 dimers and resulted in an overall decrease of on-rate ( $K_a$ ) kinetics (Figure 3). Indeed, a statistically significant increase for the  $K_a$  of wild-type monomeric gp120 for all ligands was observed (Figure 4A) but not for  $K_d$  kinetics (except for 48d)

(Figure 4B). Overall,  $k_a$  enhancement leads to a significant increase in  $K_D$  affinity (Figure 4C). Thus, stressing the importance of working with homogenous monomeric gp120 preparations. Of note, similar kinetics regarding FPLC-purified monomers versus non-FPLC purified gp120 were observed with different gp120 preparations (not shown).

### **3.3 Immunoprecipitation of gp120 protein preparation**

To confirm the results obtained with preparations enriched in monomeric gp120 by SPR, immunoprecipitations were performed with CD4-Ig and CD4i Abs 17b, 48d and A32. Samples were run on SDS-PAGE in the absence of beta-mercaptoethanol, which allows for dimer visualization, which can then be excluded from the analysis, as reported (Finzi et al., 2010a). Monomeric gp120 amounts were normalized using a mixture of HIV-1 infected patient serum (Figure 5A). The serum from these patients contains a cocktail of antibodies able to recognize the envelope in all its conformations, enabling the binding and precipitation of all available gp120 (i.e. monomeric and dimeric gp120) (Wyatt et al., 1995). This in turn allows the normalization of the total amount of monomeric gp120 for each variant by adjusting the volume used to match the wild type input. When 17b, 48d and A32 CD4i antibodies were used, gp120 dimers were immunoprecipitated less efficiently than monomeric gp120 by these antibodies, confirming that the epitope that they recognize is partially occluded in gp120 dimers, as reported (Finzi et al., 2010a, 2010b). N386A N397A N406A and  $\Delta V5$  presented similar ligand binding relative to the wt, while  $\Delta V1V2V3$  and  $\Delta V1V2V3V5$  presented increased binding compared to wt gp120 for CD4-Ig, 17b and 48d (Figure 5B), corroborating the data obtained by SPR (Table 2) and the role of variable regions V1V2V3 but not V5 in restraining the gp120 from spontaneously assuming the CD4-bound conformation.

Importantly, gp120 dimers contaminations were reproducibly present in five independent gp120 preparations (Figure 6). As previously reported (Finzi et al., 2010a), patient serum recognized efficiently gp120 dimers and monomers while CD4i ligands such as 17b, 48d and A32 preferentially recognized monomeric gp120. Thus, confirming that their epitopes are not efficiently exposed in these aberrant disulfide-linked gp120 dimers (Finzi et al., 2010a).

## **4. Discussion**

As shown previously, aberrant oligomeric Env, either gp160, gp140 or gp120, have been shown to be created through disulfide bond formation during Env maturation (Schawaller et al., 1989; Earl et al., 1990; Owens and Compans, 1990; Doms et al., 1991; Hallenberger et al., 1992; Center et al., 2000; Finzi et al., 2010a, 2010b). These oligomers have also been shown to have some epitopes occluded, affecting the binding of many antibodies, while recognition by polyclonal mixes of antibodies such as patient serum is not (Finzi et al., 2010a).

The negative impact that dimers present in gp120 preparations have on overall gp120 affinity for CD4i ligands, mainly by affecting the on-rate, was addressed in this report. Indeed, when his(6)-tagged gp120 proteins, purified with nickel beads (before FPLC, containing gp120 dimers) were used to measure the effect of V5 on binding affinities for CD4i 17b and A32 antibodies, an important binding enhancement when V5 was removed along with the V1V2V3 variable regions was observed. However, when gp120 dimers were removed by size-exclusion chromatography, these differences disappeared (Table 2), indicating that gp120 dimers can affect the overall affinity of gp120 preparations for different ligands and thus bias gp120-ligands affinities interpretation.

Moreover, not all gp120 variants have the same amount of contaminating dimers; for example, it has been reported that V1, V2 and V3 loops contribute to gp120 dimer formation ((Finzi et



al., 2010a) and Figure 1) thus making impossible to calculate accurate affinity constants by SPR without FPLC purification of monomeric gp120s.

Removal of potential glycosylation sites on V4 nor V5 deletion affect the overall affinity of gp120 monomers for 17b and A32 CD4i ligands, as evidenced by wild-type affinity levels to all tested ligands with these two variants. Removal of the V1,V2 and V3 variable regions dramatically increased the affinity for the same ligands, in agreement with a previous report that showed that these regions prevent the gp120 from spontaneously sampling the CD4-bound conformation (Kwon et al., 2012). It is to be noted that the results presented here were obtained with monomeric gp120 and that the effect of the removal of potential glycosylation sites on V4 or the removal of the V5 variable region on trimeric soluble heterodimers of gp120/gp41 might be different. Together, these results emphasize the importance of using pure monomers while experimenting with soluble Env glycoproteins as aberrant oligomers can affect the affinity calculation for CD4i ligands. These observations must be taken into account when preparing gp120-based immunogens since gp120-dimers have the potential to affect the overall immunogenicity of gp120 preparations.

## **5. Conclusion**

In summary, this manuscript reports that the presence of gp120 dimers can affect SPR analysis and that their removal through FPLC size exclusion chromatography represents an easy and rapid method to obtain a homogenous population of monomeric gp120.

## 6. Acknowledgments

We thank Maxime Veillette for helpful discussions. We thank Dr James Robinson for 17b, 48d and A32 monoclonal antibodies and Dr Joseph Sodroski for the CD4-Ig construct. This work was supported by a Canada Foundation for Innovation Program Leader grant #29866, by CIHR operating grants #119334 and #134117, by a FRQS Establishment of Young Scientist grant #26702 to A.F. A.F. is the recipient of a Canada Research Chair on Retroviral Entry. The authors have no conflicts of interest to report.

## References:

- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H., Essex, M., 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Sci.* 228 , 1091–1094. doi:10.1126/science.2986290
- Center, R.J., Earl, P.L., Lebowitz, J., Schuck, P., Moss, B., 2000. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 V2 Domain Mediates gp41-Independent Intersubunit Contacts. *J. Virol.* 74 , 4448–4455. doi:10.1128/JVI.74.10.4448-4455.2000
- Chan, D., Fass, D., Berger, J., Kim, P., 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263–73.
- Chowdhury, I., Koyanagi, Y., Takamatsu, K., Yoshida, O., Kobayashi, S., Yamamoto, N., 1991. Evaluation of anti-human immunodeficiency virus effect of recombinant CD4-immunoglobulin in vitro: a good candidate for AIDS treatment. *Med. Microbiol. Immunol.* 180, 183–192. doi:10.1007/BF00215247
- Cordonnier, A., Montagnier, L., Emerman, M., 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 340, 571–574.
- Dalglish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., Weiss, R.A., 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767.
- Doms, R., Earl, P., Moss, B., 1991. The Assembly of the HIV-1 Env Glycoprotein into Dimers and Tetramers, in: Düzgüneş, N. (Ed.), *Mechanisms and Specificity of HIV Entry into Host Cells* SE - 13. Springer US, pp. 203–221. doi:10.1007/978-1-4684-5976-0\_13

- Earl, P.L., Doms, R.W., Moss, B., 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 648–52.
- Egan, M.A., Carruth, L.M., Rowell, J.F., Yu, X., 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *Human Immunodeficiency Virus*.
- Finzi, A., Pacheco, B., Zeng, X., Kwon, Y. Do, Kwong, P.D., Sodroski, J., 2010a. Conformational characterization of aberrant disulfide-linked HIV-1 gp120 dimers secreted from overexpressing cells. *J. Virol. Methods* 168, 155–61. doi:10.1016/j.jviromet.2010.05.008
- Finzi, A., Xiang, S.-H., Pacheco, B., Wang, L., Haight, J., Kassa, A., Danek, B., Pancera, M., Kwong, P.D., Sodroski, J., 2010b. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol. Cell* 37, 656–67. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.012
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.-D., Garten, W., 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358–361.
- Hallenberger, S., Tucker, S.P., Owens, R.J., Bernstein, H.B., Compans, R.W., 1993. Secretion of a Truncated Form of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein. *Virology* 193, 510–514. doi:http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1156
- Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., 1991. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal. Biochem.* 198, 268–277. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(91)90424-R
- Julien, J.-P., Cupo, A., Sok, D., Stanfield, R.L., Lyumkis, D., Deller, M.C., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Ward, A.B., Wilson, I. a, 2013. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1477–83. doi:10.1126/science.1245625
- Karwowska, S., Gorny, M., Buchbinder, A., Gianakakos, V., Williams, C., Fuerst, T., Zolla-Pazner, S., 1992. Production of human monoclonal antibodies specific for conformational and linear non-V3 epitopes of gp120. *AIDS Res. ...* 8, 1099–1106.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J.-C., Montagnier, L., 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312, 767–768.
- Korber, B.T., Foley, B.T., Kuiken, C.L., Pillai, S.K., Sodroski, J.G., 1998. Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG.

- Kwon, Y. Do, Finzi, A., Wu, X., Dogo-Isonagie, C., Lee, L.K., Moore, L.R., Schmidt, S.D., Stuckey, J., Yang, Y., Zhou, T., Zhu, J., Vicic, D. a, Debnath, A.K., Shapiro, L., Bewley, C. a, Mascola, J.R., Sodroski, J.G., Kwong, P.D., 2012. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5663–8. doi:10.1073/pnas.1112391109
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W. a, 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–59. doi:10.1038/31405
- Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., Capon, D.J., 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50, 975–985. doi:10.1016/0092-8674(87)90524-1
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D.Y., Kang, C.Y., 2000. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* 272, 417–28. doi:10.1006/viro.2000.0357
- Lyumkis, D., Julien, J.-P., de Val, N., Cupo, A., Potter, C.S., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Carragher, B., Wilson, I. a, Ward, A.B., 2013. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1484–90. doi:10.1126/science.1245627
- Moore, J.P., Willey, R.L., Lewis, G.K., Robinson, J., Sodroski, J., 1994. Immunological evidence for interactions between the first, second, and fifth conserved domains of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 68 , 6836–6847.
- Owens, R.J., Compans, R.W., 1990. The human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor acquires aberrant intermolecular disulfide bonds that may prevent normal proteolytic processing. *Virology* 179, 827–833. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(90)90151-G
- Robey, W.G., Safai, B., Oroszlan, S., Arthur, L.O., Gonda, M.A., Gallo, R.C., Fischinger, P.J., 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Sci.* 228 , 593–595. doi:10.1126/science.2984774
- Robinson, J., Yoshiyama, H., Holton, D., Elliott, S., Ho, D., 1992. Distinct antigenic sites on HIV gp120 identified by a panel of human monoclonal antibodies. *J. Cell. Biochem.* 50.
- Rowell, J.F., Ruff, A.L., Guarnieri, F.G., Staveley-O’Carroll, K., Lin, X., Tang, J., August, J.T., Siliciano, R.F., 1995. Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells. *J. Immunol.* 155 , 1818–1828.

- Sanders, R.W., Derking, R., Cupo, A., Julien, J.-P., Yasmeeen, A., de Val, N., Kim, H.J., Blattner, C., de la Peña, A.T., Korzun, J., Golabek, M., de los Reyes, K., Ketas, T.J., van Gils, M.J., King, C.R., Wilson, I.A., Ward, A.B., Klasse, P.J., Moore, J.P., 2013. A Next-Generation Cleaved, Soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, Expresses Multiple Epitopes for Broadly Neutralizing but Not Non-Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog* 9, e1003618.
- Sanders, R.W., Vesanen, M., Schuelke, N., Master, A., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Paluch, M., Berkhout, B., Maddon, P.J., Olson, W.C., Lu, M., Moore, J.P., 2002. Stabilization of the Soluble, Cleaved, Trimeric Form of the Envelope Glycoprotein Complex of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 76 , 8875–8889. doi:10.1128/JVI.76.17.8875-8889.2002
- Schawaller, M., Smith, G.E., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1989. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology* 172, 367–369. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(89)90142-6
- Sterjovski, J., Churchill, M.J., Roche, M., Ellett, A., Farrugia, W., Wesselingh, S.L., Cunningham, A.L., Ramsland, P. a., Gorry, P.R., 2011. CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120–CD4 interactions and fusogenicity. *Virology* 410, 418–428. doi:10.1016/j.virol.2010.12.010
- Thali, M., Moore, J.P., Furman, C., Charles, M., Ho, D.D., Robinson, J., Sodroski, J., 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* 67, 3978–88.
- Veillette, M., Désormeaux, A., Medjahed, H., Gharsallah, N.-E., Coutu, M., Baalwa, J., Guan, Y., Lewis, G., Ferrari, G., Hahn, B.H., Haynes, B.F., Robinson, J.E., Kaufmann, D.E., Bonsignori, M., Sodroski, J., Finzi, A., 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* 88, 2633–44. doi:10.1128/JVI.03230-13
- Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J., Wyatt, R., Moore, J., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J., Sodroski, J., 1995. Involvement of the V1 / V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding . Involvement of the V1 / V2 Variable Loop Structure in the Exposure of Human Immunodeficiency Virus Type .
- Wyatt, R., Sodroski, J., 1998. The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Sci.* 280 , 1884–1888. doi:10.1126/science.280.5371.1884
- Yang, X., Tomov, V., Kurteva, S., Wang, L., Ren, X., Gorny, M.K., Zolla-pazner, S., Sodroski, J., 2004. Characterization of the Outer Domain of the gp120 Glycoprotein from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Characterization of the Outer Domain of the gp120 Glycoprotein from Human Immunodeficiency Virus Type 1. doi:10.1128/JVI.78.23.12975

Yuan, T., Li, J., Zhang, M.-Y., 2013. HIV-1 envelope glycoprotein variable loops are indispensable for envelope structural integrity and virus entry. PLoS One 8, e69789. doi:10.1371/journal.pone.0069789

**Table 1.** SPR characterization of selected HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 variants before FPLC purification (containing gp120 monomers and dimers).

Ligand	gp120	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	KD fold increase <sup>1</sup>
<b>CD4</b>	Wild Type	4.51E+03	1.25E-04	2.78E-08	1.0000
	N386A N397A N406A	2.50E+03	9.68E-05	3.88E-08	1.3957
	ΔV5	2.87E+03	1.74E-04	6.06E-08	2.1799
	ΔV1V2V3	2.16E+04	3.13E-05**	1.45E-09***	0.0522
	ΔV1V2V3V5	5.32E+04***	2.03E-04	3.81E-09**	0.1371
<b>17b</b>	Wild Type	3.97E+03	1.45E-04	3.65E-08	1.0000
	N386A N397A N406A	4.33E+03	1.16E-04	2.67E-08	0.7315
	ΔV5	5.12E+03	8.35E-05	1.63E-08	0.4466
	ΔV1V2V3	1.64E+06***	7.81E-05	4.75E-11***	0.0013
	ΔV1V2V3V5	3.35E+06***	7.08E-05	2.11E-11***	0.0006
<b>48d</b>	Wild Type	1.92E+04	6.02E-04	3.15E-08	1.0000
	N386A N397A N406A	1.40E+05*	1.20E-03**	8.55E-09	0.2714
	ΔV5	1.20E+05**	1.03E-03*	8.58E-09*	0.2723
	ΔV1V2V3	1.24E+06***	1.30E-03***	1.05E-09***	0.0333
	ΔV1V2V3V5	1.39E+06***	1.32E-03***	9.52E-10***	0.0302
<b>A32</b>	Wild Type	4.15E+03	8.04E-05	1.96E-08	1.0000
	N386A N397A N406A	1.63E+04	2.39E-04	1.46E-08	0.7449
	ΔV5	1.06E+03	9.20E-05	8.66E-08	4.4184
	ΔV1V2V3	8.09E+05**	6.19E-05	1.20E-10*	0.0061
	ΔV1V2V3V5	9.50E+05 ***	5.30E-05	5.72E-11 **	0.0029

<sup>1</sup>Fold increase is calculated as the variant ka, kd or KD over the wt ka, kd or KD, respectively. p-value is expressed as \* (p<0.05), \*\* (p<0.001), \*\*\* (p<0.0001)

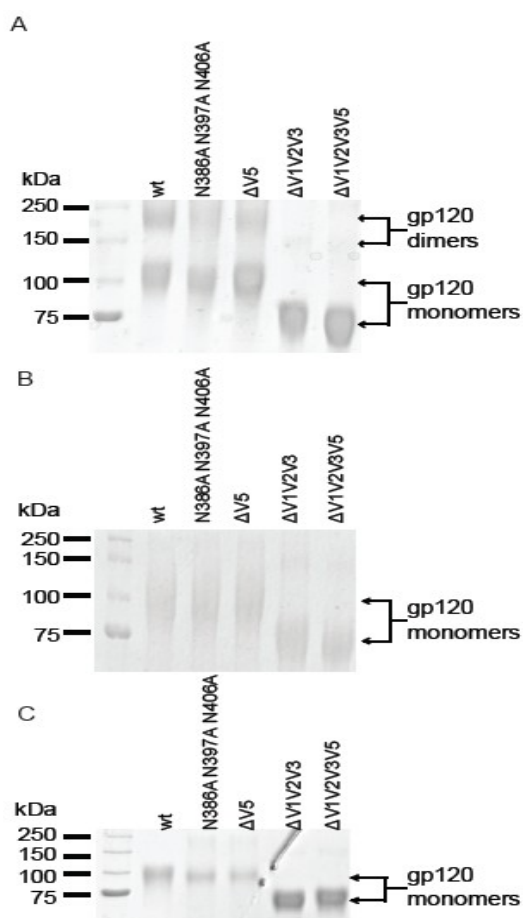
**Table 2.** SPR characterization of selected HIV-1<sub>YU2</sub> gp120 variants after FPLC purification (containing monomeric gp120).

Ligand	gp120	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	KD increase <sup>1</sup>	fold
<b>CD4</b>	Wild Type	6.32E+04	2.25E-04	3.57E-09	1.0000	
	N386A N397A N406A	3.05E+04	3.33E-04	1.09E-08	3.0532	
	ΔV5	8.78E+04	3.63E-04	4.13E-09	1.1569	
	ΔV1V2V3	4.73E+05***	5.77E-05***	1.22E-10***	0.0342	
	ΔV1V2V3V5	5.99E+05***	2.37E-04	3.95E-10***	0.1106	
<b>17b</b>	Wild Type	2.06E+04	1.75E-04	8.50E-09	1.0000	
	N386A N397A N406A	5.28E+04	1.75E-04	3.31E-09	0.3894	
	ΔV5	4.97E+04	1.39E-04	2.80E-09	0.3294	
	ΔV1V2V3	3.18E+06**	1.47E-04	4.64E-11**	0.0055	
	ΔV1V2V3V5	3.36E+06**	1.41E-04	4.19E-11**	0.0049	
<b>48d</b>	Wild Type	7.68E+04	8.70E-04	1.13E-08	1.0000	
	N386A N397A N406A	2.32E+04	7.21E-04	3.11E-08	2.7522	
	ΔV5	4.33E+05	9.99E-04	2.31E-09	0.2044	
	ΔV1V2V3	1.20E+07**	1.44E-03***	1.20E-10**	0.0106	
	ΔV1V2V3V5	1.28E+07**	1.46E-03***	1.14E-10**	0.0102	
<b>A32</b>	Wild Type	2.69E+05	8.19E-05	3.05E-10	1.0000	
	N386A N397A N406A	9.69E+04	7.72E-05	7.97E-10	2.6131	
	ΔV5	3.78E+05	6.79E-05	1.80E-10	0.5902	
	ΔV1V2V3	1.71E+06*	1.31E-04	7.70E-11**	0.2525	
	ΔV1V2V3V5	2.82E+06*	1.57E-04	5.55E-11**	0.1820	

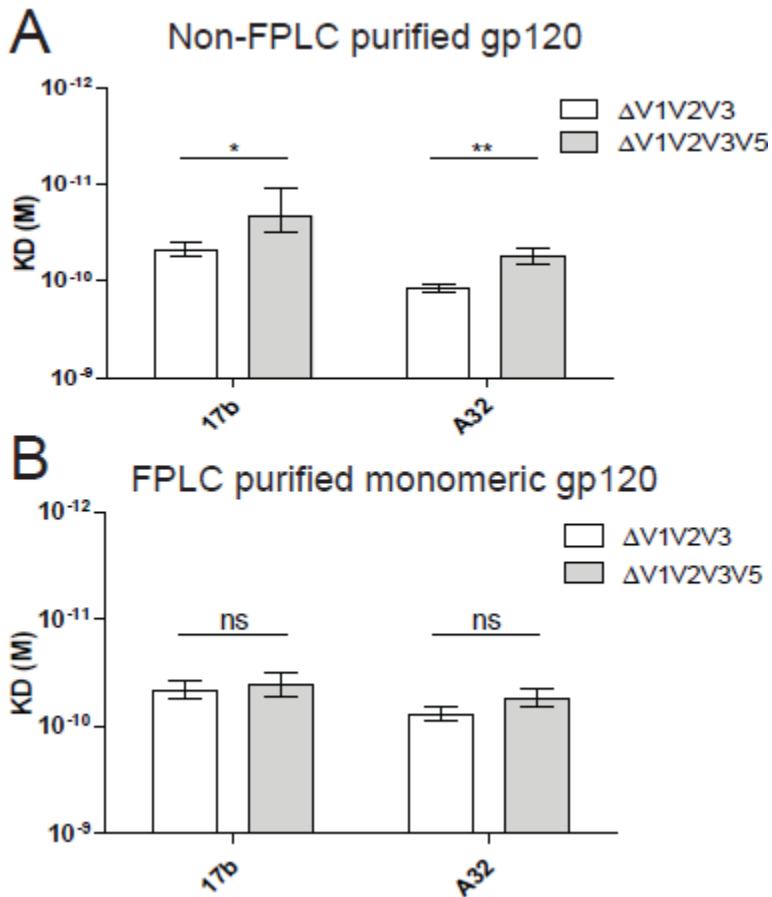
<sup>1</sup>Fold increase is calculated as the variant ka, kd or KD over the wt ka, kd or KD, respectively. p-value is expressed as \* (p<0.05), \*\* (p<0.001), \*\*\* (p<0.0001)



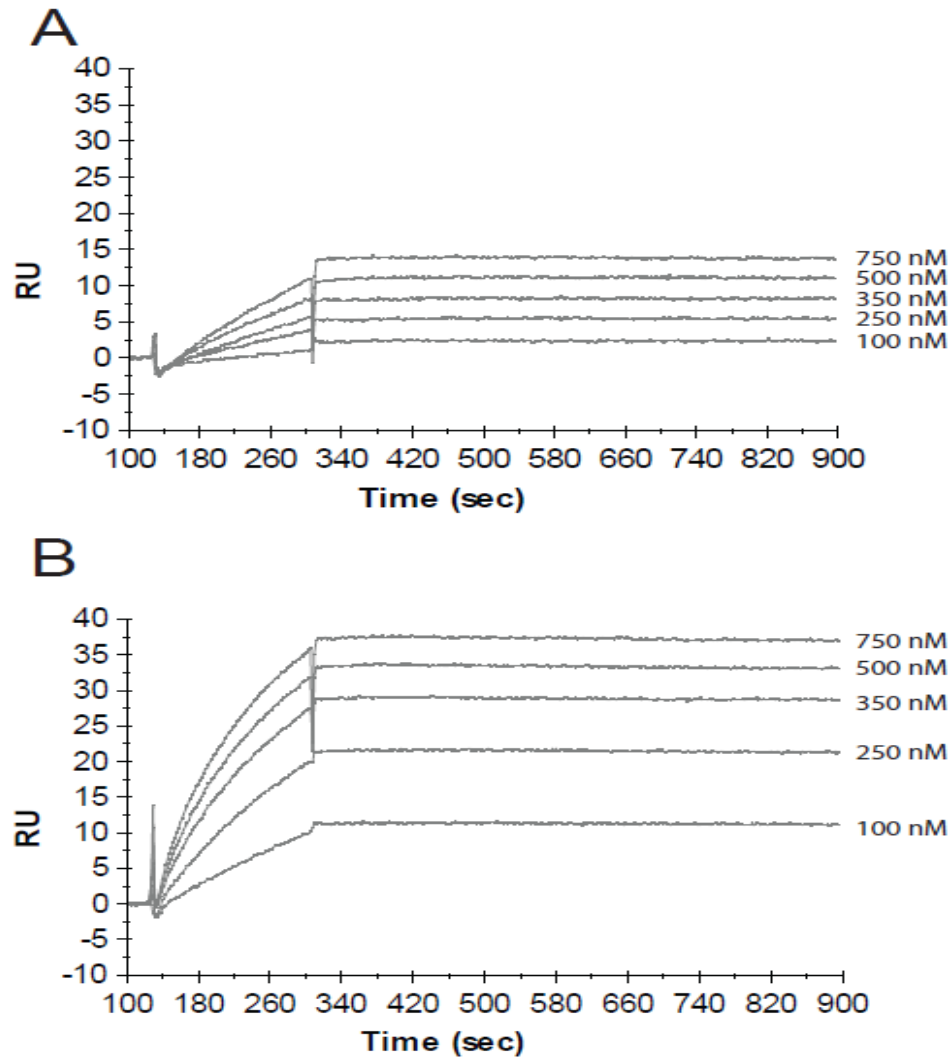
## Figures Legend



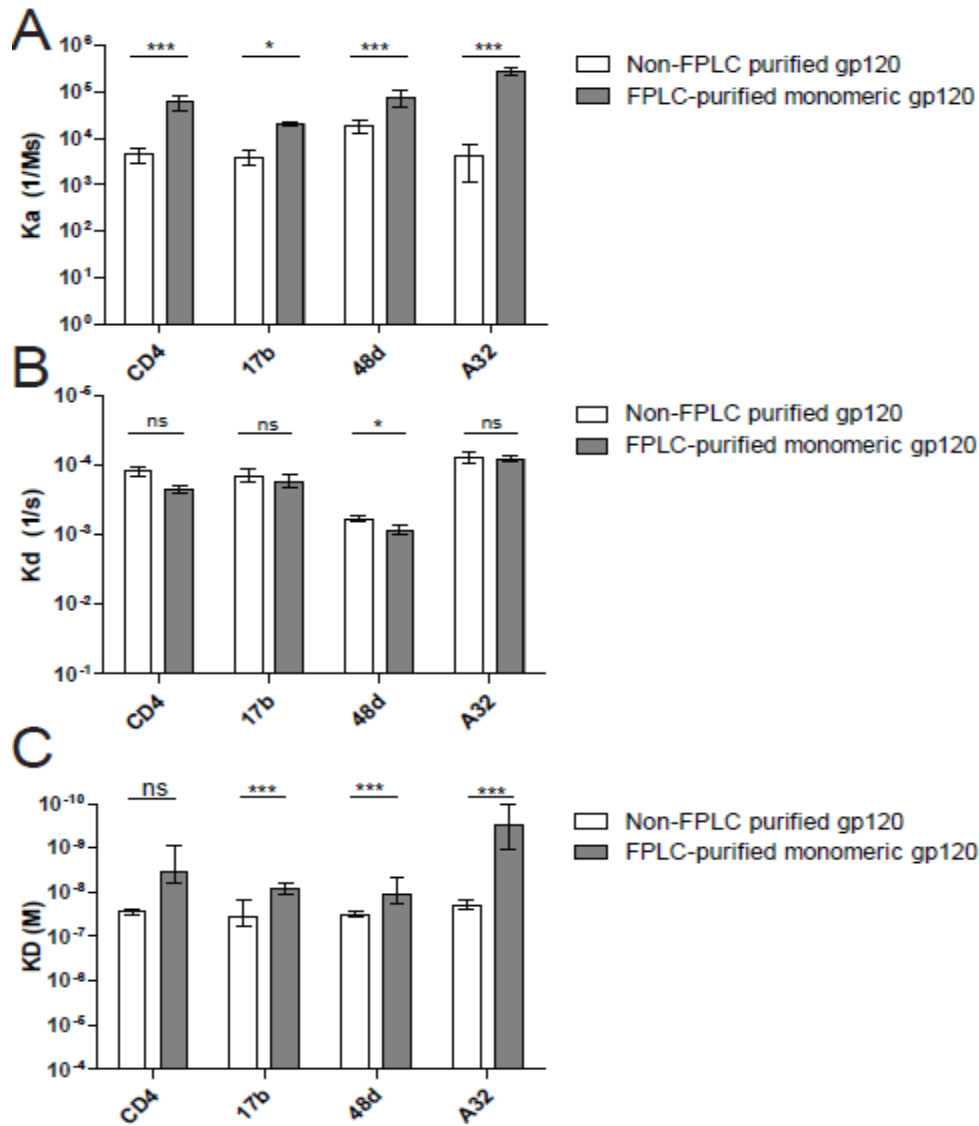
**Figure 2.1. Removal of dimeric gp120 by size-exclusion chromatography.** Five ug of wild-type (wt) and gp120 variants were migrated on SDS-PAGE gels. **(A)** SDS-PAGE of gp120 preparations before size-exclusion chromatography and migrated in absence of β-mercaptoethanol (which enables dimeric gp120 visualization). **(B)** Same protein preparation as in **A** but run in presence of β-mercaptoethanol (which disrupts disulfide bonds). **(C)** SDS-PAGE of gp120 preparations after purification by size exclusion chromatography migrated in absence of β-mercaptoethanol. Gels were stained with Coomassie Blue.



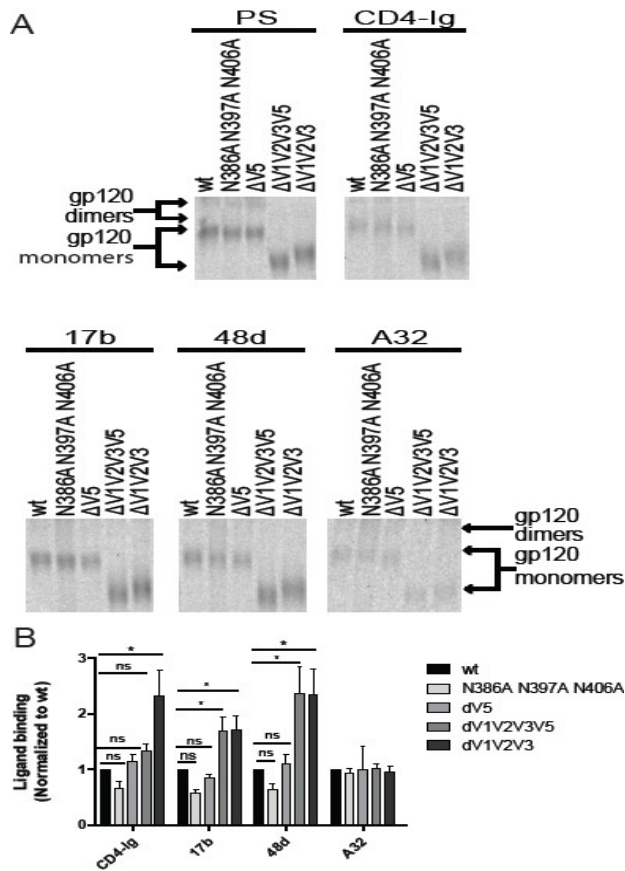
**Figure 2.2. gp120 dimers affect affinity constant calculations, as evaluated by SPR. (A)** Comparison of the KD between the  $\Delta V1V2V3$  and  $\Delta V1V2V3V5$  variants purified by a standard nickel beads protocol. **(B)** Comparison of the KD between the  $\Delta V1V2V3$  and  $\Delta V1V2V3V5$  variants purified by a standard nickel beads protocol followed by FPLC monomer purification. Data were expressed as means standard error of the mean (SEM) from at least 3 independent experiments. Statistical significance was tested using a Mann-Whitney U test and p-value is expressed as ns ( $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).



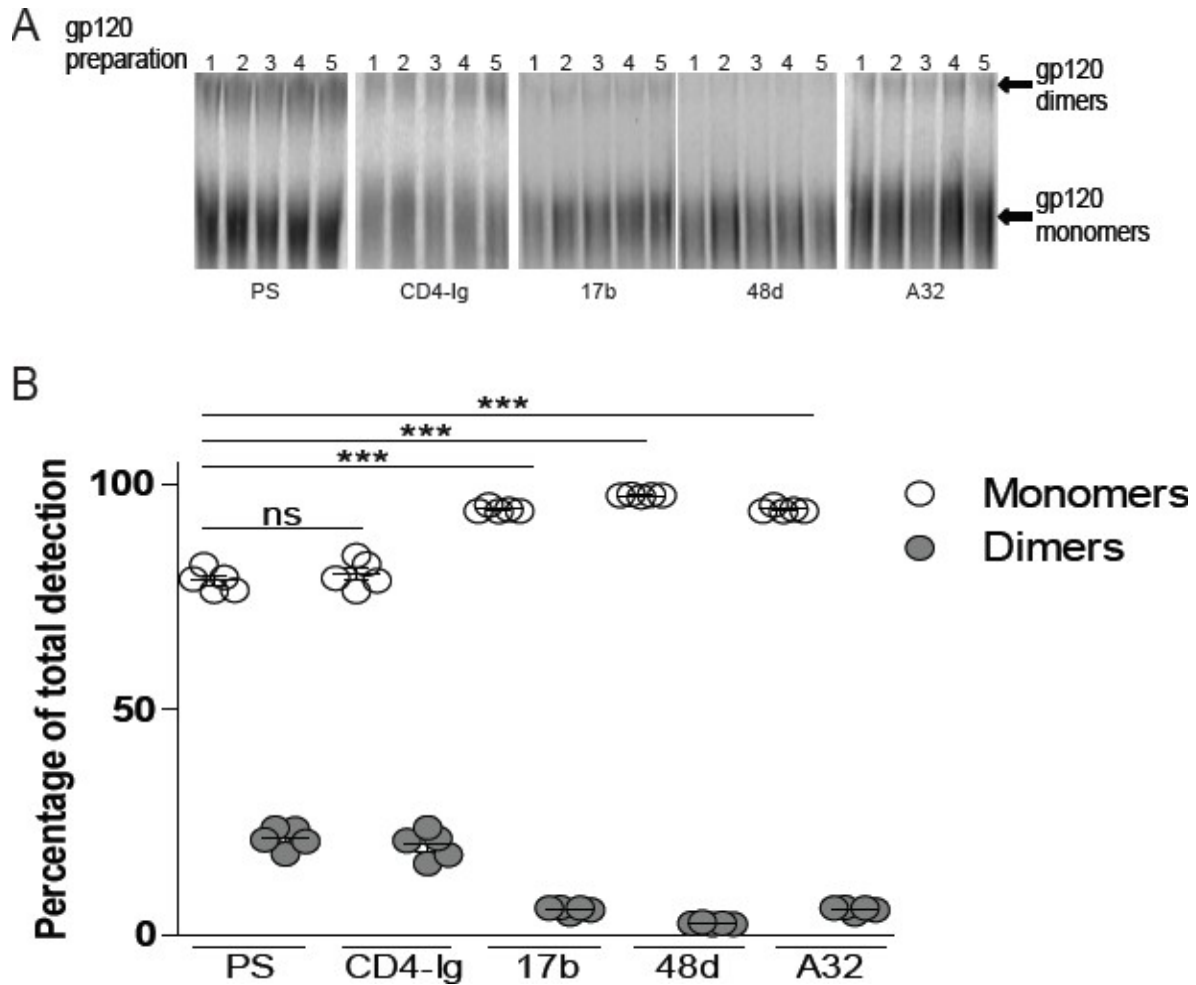
**Figure 2.3. Comparison of gp120 preparations by SPR analysis before and after size exclusion chromatography purification.** Wild-type (wt) gp120 before (A) and after (B) size-exclusion chromatography were run at concentrations ranging from 100-750 nM on an A32 CM5-immobilized chip at 200-500 RU. The sensorgram is representative of at least 3 independent experiments.



**Figure 2.4. Effect of gp120 dimers on constant affinities, as evaluated by SPR .** (A) The association constant ( $K_a$ ) determined by SPR was compared between before and after FPLC preparations for the wild type protein. The dissociation constant,  $K_d$ , (B) and affinity constant,  $K_D$ , (C) were also compared. Data were expressed as means standard error of the mean (SEM). Statistical significance was tested using a Mann-Whitney U test and p-value is expressed as ns ( $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 2.5. Recognition of gp120 variants by CD4i ligands.** (A) gp120 variants were immunoprecipitated with sera from HIV-1 infected patients, CD4-Ig, 17b, 48d and A32. The immune-precipitates were migrated on SDS-PAGE in absence of beta-mercaptoethanol and monomeric gp120 quantified with a phosphorimager. Results shown are representative of at least 3 independent experiments. (B) Fold increase in the binding of gp120 variants to CD4i ligands normalized to wt binding. Data are representative of at least 3 independent experiments (mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)). Statistical significance was tested using a two-tailed Student T-test and p-value is expressed as ns ( $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 2.6. Quantification of dimeric gp120 contamination.** (A) Five independent gp120 preparations were immunoprecipitated with sera from HIV-1 infected patients (PS), CD4-Ig, 17b, 48d and A32. The immune-precipitates were migrated on SDS-PAGE in absence of beta-mercaptoethanol. Monomeric and dimeric gp120 were quantified with a phosphorimager. (B) The percentage of contribution to the total signal of monomeric and dimeric gp120 was compared for each ligand. Data were expressed as means standard error of the mean (SEM). Statistical significance was tested using a two-tailed Student T-test and p-value is expressed as ns ( $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.001$ ), \*\*\* ( $p < 0.0001$ ).

## **Discussion**

### **1. L'effet de V4 et V5 sur les changements de conformation de la gp120**

Les travaux précédents ont établi un lien entre les régions variables et les changements de conformation. L'étude effectuée par Do Kwon et al a permis de mettre en lumière le rôle essentiel des régions variables 1,2 et 3 dans l'équilibre conformationnel de la gp120 (286). Effectivement, lorsque ces régions sont tronquées, on observe une affinité plus grande pour les ligands préférant la conformation liée à CD4, en plus d'une structure différente de celle possédant ces 3 régions variables. Ces résultats ont permis de démontrer que les régions variables 1,2 et 3 agissent comme barrière afin de retenir les changements de conformation jusqu'à l'engagement du récepteur CD4. Ce fait rend ces régions particulièrement attrayantes pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques qui pourraient cibler leur capacité à retenir les changements de conformation. L'amélioration de notre compréhension des changements de conformation, qui sont un mécanisme nécessaire à la fusion virale, pourrait mener à des nouvelles approches thérapeutiques, notamment bloquer ou déclencher prématurément ces changements afin d'inactiver le virus. Il existe déjà des molécules capables soit de bloquer les changements de conformation (18A) ou de les accélérer (NBD-556 et ses dérivés). (317, 318) Dans les deux cas, l'infection virale est inhibée, car l'énergie libérée (et la capacité de la libérer) est essentielle au processus de fusion. Dans l'optique de mieux comprendre les changements de conformation de la gp120, nous avons investigué les régions V4 et V5 pour voir si elles ont un impact sur la conformation.

Les résultats amassés au cours de mes études de maîtrise ne semblent pas montrer d'effet de V4 ou V5 sur la conformation de la gp120. Pour ce qui est de la V4, il est important de noter certains problèmes. Effectivement, il est impossible de savoir avec certitude si la V4 a un effet sur la conformation, car il est impossible de l'enlever complètement, même en la remplaçant par une séquence ligatrice de la même longueur (300, 301). Même avec les mutants enlevant les sites de glycosylation potentiels, l'effet pourrait ne pas être apparent, car même si plusieurs sites de glycosylation ont été liés à des effets spécifiques, il est impossible de savoir avec certitude si l'effet potentiel de la V4 est complètement dépendant des glycanes. Il a récemment été démontré que les glycanes ont un impact sur la transmission du virus et il serait intéressant de caractériser l'effet des glycanes de V4 sur la transmission (319). Pour ce qui est de la V5, le seul effet observé par résonance de plasmons de surface est la diminution de l'affinité pour CD4, qui a déjà été rapporté et pourrait être dû à la proximité de la V5 et le site de liaison au CD4 (320–323).

Il est important de considérer que les résultats ont été obtenus avec un monomère de gp120. Or, il a été démontré qu'il y a des différences entre les formes monomériques et trimériques. (324–326) Il serait donc intéressant de tester ces mutations dans le contexte trimériques, grâce à la méthode immuno-enzymatique (ELISA) sur base cellulaire que j'ai aidé à mettre au point au laboratoire (327). Pour ce faire, il faudrait effectuer les mutations dans un plasmide codant pour la gp160. Une difficulté additionnelle serait de trouver un anticorps permettant la détection de l'enveloppe indépendamment de la conformation et de la présence des régions variables, ce qui n'est pas le cas de 2G12 et PGT121 qui sont les anticorps utilisés habituellement (328, 329). Cependant, les nouveaux anticorps reconnaissant l'interface entre la gp41 et la gp120, 35O22 et PGT151, pourraient être testés (330, 331). En utilisant des



anticorps reconnaissant des conformations particulières comme 17b qui reconnaît la forme liée à CD4, il est possible de déterminer la conformation adoptée par les différents mutants. De plus, les travaux ont été effectués sur la souche YU2 qui est un isolat primaire de clade B. Il n'est pas impossible que d'autres souches démontrent des effets différents, même si les résultats pour les régions 1, 2 et 3 sont applicables à tous les clades testés (286). Par exemple, le nombre de sites potentiels de glycosylation de la V4 varie énormément de souche en souche et les effets pourraient donc varier entre celles-ci (315, 316).

## **2. L'importance de l'isolation de monomère dans les tests biochimiques**

Les résultats obtenus mettent aussi en évidence l'importance d'isoler les monomères de gp120 lors de la surexpression d'Env. En effet, lorsque nous comparons les constantes d'association ( $K_a$ ) obtenues entre les monomères purifiés et la purification standard (Figure 2.4.A), on observe une différence significative entre les deux, ce qui se traduit par une différence significative au niveau de la constante d'affinité ( $K_D$ ) (Figure 2.4.C). Toutefois, la constante de dissociation ( $K_d$ ) ne semble pas être affectée (Figure 2.4.B). Le biais est évident lorsqu'on compare  $\Delta V1V2V3$  et  $\Delta V1V2V3V5$  avec le monomère purifié ou la purification standard qui contient des monomères et des dimères (Figure 2). On voit que les deux mutants ont probablement des niveaux de dimères différents, car la différence observée entre les deux est inexistante avec le monomère, mais est près de deux fois avec le mélange de monomère et de dimère (purification standard). Il est connu depuis longtemps que des dimères se forment lors de la surexpression de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1, mais depuis peu se soucie-t-on des conséquences de leur présence (249, 311–314, 332, 333). Les recherches précédentes ont mis en évidence le biais que les dimères peuvent poser sur les immunoprécipitations, mais

ce biais peut facilement être contourné en évitant l'utilisation d'un agent réducteur comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui défait le pont disulfure des dimères et les rend indifférenciables des monomères sur gel (314). Cependant, lorsque les préparations de gp120 sont utilisées dans des tests ne pouvant discriminer entre monomère et dimère, il devient impossible d'éviter ce biais. On peut donc s'imaginer que des biais existent dans la majorité des tests utilisant des préparations d'Env, tel les ELISA.

### **3. L'importance d'une méthode simple et efficace pour isoler les monomères**

Afin d'éviter d'inclure les dimères dans les analyses biochimiques, il est crucial d'isoler les monomères des préparations de gp120 avec une méthode simple, rapide et relativement peu coûteuse pour le faire. En utilisant des simples colonnes de sépharose, on évite l'utilisation de colonnes d'anticorps qui nécessitent des quantités importantes d'anticorps qui sont normalement difficiles à acquérir étant donné que malheureusement, beaucoup d'entre eux ne sont pas disponibles commercialement. La chromatographie d'exclusion de masse peut s'effectuer dans n'importe quel tampon compatible avec le système utilisé et ne nécessite pas d'élution avec des gradients de potentiel hydrogène (pH) ou de substances qui pourraient réduire la qualité de la préparation de protéines. Cette méthode offre aussi l'avantage de pouvoir séparer les différents stades d'oligomérisation et permet une analyse plus détaillée des différents états de la gp120 en solution. En séparant les fractions avec précision, il serait aussi théoriquement possible d'isoler les différents états de glycosylation du monomère qui pourrait par la suite être caractérisés.

#### **4. L'effet des dimères sur les préparations vaccinales?**

Il a été démontré en immunisant des lapins avec différents immunogènes que l'incapacité des immunogènes à interagir avec CD4 modifie le profil d'anticorps ce qui semble abaisser leur capacité de neutralisation (334). Connaissant l'impact des dimères sur l'affinité de la gp120 pour différents anticorps et CD4, il est intéressant de postuler sur l'effet que ces dimères pourraient avoir sur l'élicitation d'anticorps (314). Est-ce que les dimères pourraient agir en tant que distraction pour le système immunitaire et nuire à la production d'anticorps efficaces contre l'enveloppe trimérique. Le seul essai vaccinal ayant montré un effet protecteur est l'essai RV144 avec 31,2% (335, 336). Les anticorps correspondant potentiellement à cette protection sont blocables par A32, un anticorps qui reconnaît moins bien les dimères. Il serait intéressant d'investiguer la production de dimère par le vecteur viral utilisé et si cette production a un impact sur l'élicitation des anticorps. Il serait important de prendre en compte ces informations lors d'essais vaccinaux subséquent afin d'éviter la présence de dimères qui pourraient nuire au succès de l'essai.

#### **5. La réforme des dimères**

Les dimères forment de 20 à 30% d'une préparation de gp120 (Figure 6) (314). En plus de représenter une perte d'efficacité significative, la perte est augmentée davantage par la nécessité d'utiliser la chromatographie d'exclusion de masse. Une possibilité envisagée serait d'utiliser un agent réducteur afin de réduire le pont disulfure reliant les deux gp120. Évidemment, si trop d'agent réducteur est utilisé, les ponts disulfure seront tous réduits, ce qui rendrait la protéine non-fonctionnelle (337). En utilisant le bon agent à la bonne concentration,

il pourrait être possible de réduire les dimères tout en gardant la majorité des autres ponts intacts afin de favoriser la reoxydation en monomères fonctionnels. Cette technique pourrait permettre de récupérer une partie significative de la production qui est habituellement perdue.

## **6. Des préparations sans dimères**

Une autre possibilité à étudier serait de créer un mutant de gp120 ne s'assemblant pas en dimère tout en conservant sa conformation. Des études antérieures ont démontré que 4 des ponts disulfure de la gp120 n'étaient pas indispensables au repliement et que 2 n'étaient pas indispensables à l'infectivité (337). Il serait intéressant de vérifier s'il serait possible d'enlever un de ces ponts par mutagenèse dirigée et vérifier l'effet sur les dimères et la conformation adoptée par le monomère.

## **Conclusion**

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre le VIH est un défi colossal. Les travaux présentés dans cet ouvrage permettent d'avancer les connaissances sur les changements de conformations de la gp120. Nous savons maintenant que V4 et V5 ne semblent pas jouer de rôle dans ces changements. Ses régions ne seraient donc pas des cibles attrayantes pour les molécules influençant la conformation de la gp120. Nous avons également démontré l'importance d'utiliser des monomères purifiés dans des tests biochimiques comme la résonance de plasmons de surface. De plus, nous avons publié une méthode simple et efficace pour se débarrasser des dimères. En conclusion, l'ensemble de ces travaux permet d'avancer la quête vers de nouvelles cibles thérapeutiques et un immunogène efficace.

# Annexe

## Contribution pour des articles non-intégrés au mémoire

1- Désormeaux, A., **Coutu, M.**, Medjahed, H., Pacheco, B., Herschhorn, A., Gu, C., Xiang, S.-H., Mao, Y., Sodroski, J., Finzi, A., **2013**. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *J. Virol.* 87, 2549–62.

J'ai purifié des mutants de l'enveloppe virale afin de mesurer par résonance de plasmons de surface leur affinité à des ligands reconnaissant des conformations spécifiques de l'enveloppe.

2- Veillette, M., Désormeaux, A., Medjahed, H., Gharsallah, N.-E., **Coutu, M.**, Baalwa, J., Guan, Y., Lewis, G., Ferrari, G., Hahn, B.H., Haynes, B.F., Robinson, J.E., Kaufmann, D.E., Bonsignori, M., Sodroski, J., Finzi, A., **2014**. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* 88, 2633–44.

Dans cette publication, j'ai effectué la production et la purification de l'anticorps A32.

3- Richard, J., Veillette, M., Batraverse, L.-A., **Coutu, M.**, Chapleau, J.-P., Bonsignori, M., Bernard, N., Tremblay, C., Roger, M., Kaufmann, D.E., Finzi, A., **2014**. Flow cytometry-based assay to study HIV-1 gp120 specific antibody-dependent cellular cytotoxicity responses. *J. Virol. Methods* 208, 107–114.

Dans cette publication, j'ai effectué la production et la purification de l'anticorps A32 et de la gp120.

4- Maxime Veillette, **Mathieu Coutu**, Jonathan Richard, Laurie-Anne Batraverse, Anik Désormeaux, Michel Roger, Andrés Finzi, **2014**. Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-based ELISA Assay. *Journal of Visualized Experiment (JoVe)*, 91, e51995-e51995.

Dans cette publication, j'ai effectué les ELISA sur base cellulaire avec plusieurs mutants de l'enveloppe et divers anticorps.

5- Veillette, M., **Coutu, M.**, Richard, J., Batrville, L. A., Dagher, O., Bernard, N., ... & Finzi, A. **2015**. The HIV-1 gp120 CD4-Bound Conformation Is Preferentially Targeted by Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Mediating Antibodies in Sera from HIV-1-Infected Individuals. *J. Virol.*, 89, 545-551.

Dans cette publication, j'ai effectué la mutagenèse dirigée sur les plasmides de gp120 en plus de la production et la purification des divers mutants de la gp120.

## Bibliographie

1. **UNAIDS**. 2013. GLOBAL REPORT UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013.
2. **Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L**. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Sci.* **220** :868–871.
3. **Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, et al.** 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Sci.* **224** :500–503.
4. **UNAIDS**. 2013. The Gap Report.
5. **Lewis GK, DeVico AL, Gallo RC**. 2014. Antibody persistence and T-cell balance: Two key factors confronting HIV vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1–8.
6. **Kawalekar OU, Shedlock DJ, Weiner DB**. 2010. Current strategies and limitations of HIV vaccines. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **11**:192–202.
7. **Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA**. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Sci.* **242** :1171–1173.
8. **Craigie R, Bushman FD**. 2012. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**:a006890.
9. **Vogt P**. 1997. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor (NY).
10. **Goff SP**. 2013. *Retroviridae* Fields Virology 6th edition. Lippington Williams and Wilkins.
11. **Freed EO, Martin MA**. 2013. *Human Immunodeficiency Viruses: Replication* Fields Virology 6th edition. Lippington Williams and Wilkins.



12. **Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC.** 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Sci.* **228** :1201–1204.
13. **Clavel F, Guetard D, Chamaret S, Rey M, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL.** 1986. Isolation of a New Human Retrovirus African Patients with AIDS from West **248**.
14. **De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, Bernaerts R, Saman E, Nijs P, Willems B.** 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* **64** :1207–1216.
15. **Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L.** 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68** :1581–1585.
16. **Simon F, Mauclore P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F.** 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* **4**:1032–1037.
17. **Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F.** 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* **15**:871–872.
18. **Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**:436–441.
19. **Keele BF, Van Heuerswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain L V, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JFY, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH.** 2006. Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Sci.* **313** :523–526.
20. **Heuerswyn F Van, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, Keele BF, Shaw KS, Takehisa J, Kraus MH, Loul S, Butel C, Liegeois F, Yangda B, Sharp PM, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M.** 2007. Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* **368**:155–171.
21. **Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM.** 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J. Virol.* **81**:10209–19.

22. **Kuritzkes DK, Koup RA.** 2013. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment Fields Virology 6th edition. Lippington Williams and Wilkins.
23. **Briggs JAG, Wilk T, Welker R, Kra H, Fuller SD.** 2003. Structural organization of authentic , mature HIV-1 virions and cores **22**:1707–1715.
24. **Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, Haas FDE, Boulanger P, Welker R, Kra H.** 2001. Organization of Immature Human Immunodeficiency Virus Type 1 **75**:759–771.
25. **Fuller SD, Wilk T, Gowen BE, Kräusslich H, Vogt VM.** Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle 729–738.
26. **Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. J. Virol. **64**.
27. **WELKER R, KOTTLER H, KALBITZER HR, KRÄUSSLICH H-G.** 1996. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Protein Is Incorporated into Virus Particles and Specifically Cleaved by the Viral Proteinase. Virology **219**:228–236.
28. **Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC.** 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. J. Virol. **70** :4283–4290.
29. **Karczewski M, Strebel K.** 1996. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. J. Virol. **70**:494–507.
30. **Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, Ivanoff L, Petteway SR, Pearson ML, Lautenberger JA, Papas TS, Ghayeb J, Chang NT, Gallo RC, Wong-Staal F.** 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature **313**:277–284.
31. **Henderson LE, Bowers MA, Ii RCS, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW, Arthur L, Bryant DK, Fenselau C.**1992. Gag Proteins of the Highly Replicative MN Strain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 : Posttranslational Modifications , Proteolytic Processings , and Complete Amino Acid Sequences. J. Virol. **66**:1856–1865.
32. **Sundquist WI, Kräusslich H-G.** 2012. HIV-1 assembly, budding, and maturation. Cold Spring Harb. Perspect. Med. **2**:a006924.
33. **Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO.** 2004. HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane **101**:2–7.
34. **Chukkapalli V, Ono A.** 2011. Molecular determinants that regulate plasma membrane association of HIV-1 Gag. J. Mol. Biol. **410**:512–24.

35. **Yuan XIN, Yu X, Lee T, Essex MAX.** 1993. Mutations in the N-Terminal Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Protein Block Intracellular Transport of the Gag Precursor **67**:6387–6394.
36. **Zhou W, Parent L, Wills J, Resh M.** 1994. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic. *J. Virol.* **68**:2556–2569.
37. **Tedbury PR, Ablan SD, Freed EO.** 2013. Global Rescue of Defects in HIV-1 Envelope Glycoprotein Incorporation : Implications for Matrix Structure **9**.
38. **Brandano L, Stevenson M.** 2012. A Highly Conserved Residue in the C-Terminal Helix of HIV-1 Matrix Is Required for Envelope Incorporation into Virus Particles. *J. Virol.* **86** :2347–2359.
39. **Murakami T, Freed EO.** 2000. Genetic Evidence for an Interaction between Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix and  $\alpha$ -Helix 2 of the gp41 Cytoplasmic Tail. *J. Virol.* **74** :3548–3554.
40. **Freed EO, Martin MA.** 1995. Virion Incorporation of Envelope Glycoproteins with Long but Not Short Cytoplasmic Tails Is Blocked by Specific , Single Amino Acid Substitutions in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix **69**:1984–1989.
41. **Freed EO.** 1997. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 matrix revertants : effects on virus assembly , Gag processing , and Env incorporation into virions . Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Revertants : Effects on Virus Asse.
42. **Alfadhli A, Lid Barklis R, Barklis E.** 2009. HIV-1 Matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing PHOSPHATIDYLINOSITOL-(4,5)-BISPHOSPHATE. *Virology* **387**:466–472.
43. **Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI.** 1996. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein : Implications for membrane association and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:3099–3104.
44. **Christensen AM, Massiah MA, Turner BG, Sundquist WI, Summers MF, Medical HH.** 1996. Three-Dimensional Structure of the HTLV-II Matrix Protein and Comparative Analysis of Matrix Proteins from the Different Classes of Pathogenic Human Retroviruses. *J. Mol. Biol.* 1117–1131.
45. **Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M.** 2014. Structure of Full-Length HIV-1 CA: A Model for the Mature Capsid Lattice. *Cell* **131**:70–79.

46. **Ganser BK, Li S, Klishko VL, Finch JT, Sundquist WI.** 1999. Assembly and Analysis of Conical Models for the HIV-1 Core. *Science* (80-. ). **283**:80–83.
47. **Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Yeager M.** 2011. Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* **469**:424–7.
48. **Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, Yeager M.** 2009. X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell* **137**:1282–1292.
49. **Briggs J a G, Simon MN, Gross I, Kräusslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC.** 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:672–5.
50. **KARAGEORGOS L, LI P, BURRELL C.** 1993. Characterization of HIV Replication Complexes Early after Cell-to-Cell Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:817–823.
51. **Fassati A, Goff SP.** 2001. Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 **75**.
52. **Franke EK, Chen B, Tatsis I, Diamanduros A, Erlanger BF, Luban J.** 1995. Cyclophilin Binding to the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Polyprotein Is Mimicked by an Anti-Cyclosporine Antibody **69**:5821–5823.
53. **Franke EK, Yuan HEH, Luban J.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359–362.
54. **Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwlrth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363–365.
55. **Braaten D, Luban J.** 2001. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity , as demonstrated by gene targeting in human T cells **20**.
56. **Li Y, Kar AK, Sodroski J.** 2009. Target cell type-dependent modulation of human immunodeficiency virus type 1 capsid disassembly by cyclophilin A. *J. Virol.* **83**:10951–62.
57. **Hatzioannou T, Perez-caballero D, Bieniasz PD, Cowan S.** 2005. Cyclophilin Interactions with Incoming Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsids with Opposing Effects on Infectivity in Human Cells Cyclophilin Interactions with Incoming Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsids with Opposing Effects on Infectivity .

58. **Sokolskaja E, Sayah DM, Luban J.** 2004. Target Cell Cyclophilin A Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity Target Cell Cyclophilin A Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity **78**.
59. **Lee K, Ambrose Z, Martin TD, Oztop I, Julias JG, Vandegraaff N, Baumann JG, Wang R, Takemura T, Shelton K, Taniuchi I, Li Y, Littman DR, Coffin JM, Hughes SH, Unutmaz D, Kewalramani VN.** 2010. Flexible Use of Nuclear Import Pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe.* **7**:221–233.
60. **De Iaco A, Luban J.** 2011. Inhibition of HIV-1 infection by TNPO3 depletion is determined by capsid and detectable after viral cDNA enters the nucleus. *Retrovirology* **8**:98.
61. **Yamashita M, Emerman M.** 2004. Capsid Is a Dominant Determinant of Retrovirus Infectivity in Nondividing Cells Capsid Is a Dominant Determinant of Retrovirus Infectivity in Nondividing Cells **78**.
62. **Temin HM.** 1990. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle : Pseudodiploidy and high rate of genetic recombination **87**:1556–1560.
63. **Paillart J-C, Shehu-Xhilaga M, Marquet R, Mak J.** 2004. Dimerization of retroviral RNA genomes: an inseparable pair. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:461–72.
64. **Chen J, Nikolaitchik O.** 2009. High efficiency of HIV-1 genomic RNA packaging and heterozygote formation revealed by single virion analysis. *Proc. ...* **106**:13535–13540.
65. **Tanchou V, Gabus C, Rogemond V, Luc Darlix J.** 1995. Formation of Stable and Functional HIV-1 Nucleoprotein Complexes in Vitro. *J. Mol. Biol.* **252**:563–571.
66. **Krishnamoorthy G, Roques B, Darlix J, Mély Y.** 2003. DNA condensation by the nucleocapsid protein of HIV-1: a mechanism ensuring DNA protection. *Nucleic Acids Res.* **31**:5425–5432.
67. **Levin JG, Guo J, Rouzina Ioulia, Musier-Forsyth K.** 2005. Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism, p. 217–286. *In* Biology, KMBT-P in NAR and M (ed.), Academic Press.
68. **Thomas JA, Gorelick RJ.** 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* **134**:39–63.

69. **Ottmann M, Gabus C, Darlix JL, Ottmann LE, Gabus C.** 1995. The central globular domain of the nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus type 1 is critical for virion structure and infectivity . The Central Globular Domain of the Nucleocapsid Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Critical fo. *J. Virol.* **69**.
70. **Morellet N, de Rocquigny H, Mély Y, Jullian N, Déméné H, Ottmann M, Gérard D, Darlix JL, Fournie-Zaluski MC, Roques BP.** 1994. Conformational behaviour of the active and inactive forms of the nucleocapsid NCp7 of HIV-1 studied by 1H NMR. *J. Mol. Biol.* **235**:287–301.
71. **Lever A, Gottlinger H.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**.
72. **Aldovini A, Young R.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**:1920–1926.
73. **Accola MA, Ho S.** 1998. A Putative alpha-Helical Structure Which Overlaps the Capsid-p2 Boundary in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Precursor Is Crucial for Viral Particle Assembly. *J. Virol.* **72**:2072–2078.
74. **Kräusslich HG, Fäcke M, Heuser AM, Konvalinka J, Fa M, Konvalinka JAN, Zentgraf H.** 1995. The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity . The Spacer Peptide between Human Immunodeficiency Virus Capsid and Nucleocapsid Proteins Is Essential for Or. *J. Virol.* **69**:3407–3419.
75. **Guo X, Roldan A, Hu J, Wainberg MA, Liang C.** 2005. Mutation of the SP1 Sequence Impairs both Multimerization and Membrane-Binding Activities of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Mutation of the SP1 Sequence Impairs both Multimerization and Membrane-Binding Activities of Human Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* **79**:1803–1812.
76. **Datta S a K, Temeselew LG, Crist RM, Soheilian F, Kamata A, Mirro J, Harvin D, Nagashima K, Cachau RE, Rein A.** 2011. On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J. Virol.* **85**:4111–21.
77. **Kaye JF, Lever AML.** 1998. Nonreciprocal Packaging of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 RNA: a Possible Role for the p2 Domain of Gag in RNA Encapsidation. *J. Virol.* **72** :5877–5885.
78. **De Marco A, Heuser A-M, Glass B, Kräusslich H-G, Müller B, Briggs J a G.** 2012. Role of the SP2 domain and its proteolytic cleavage in HIV-1 structural maturation and infectivity. *J. Virol.* **86**:13708–16.

79. **Gottlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:3195–3199.
80. **Huang M, Orenstein JANM, Martin MA, Freed EO.** 1995. p6 Gag Is Required for Particle Production from Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Molecular Clones Expressing Protease. *J. Virol.* **69**:6810–6818.
81. **Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI.** 2001. Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding. *Cell* **107**:55–65.
82. **Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz P.** 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.*
83. **VerPlank L, Bouamr F.** 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55Gag. *Proc. ...* **98**:2–7.
84. **Demirov D, Ono A.** 2002. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc. ...* **99**:955–960.
85. **Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger H.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689–699.
86. **Popov S, Popova E, Inoue M, Göttlinger HG.** 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* **82**:1389–98.
87. **Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin J a, de La Cruz J, Nagashima K, Bouamr F.** 2009. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog.* **5**:e1000339.
88. **Carlton JG, Martin-serrano J.** Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding : A Role for the ESCRT Machinery.
89. **Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280–283.

90. **Dulude D, Baril M, Brakier-Gingras L.** 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed  $\pm 1$  ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res.* **30**:5094–5102.
91. **Karacostas V, Wolffe EJ, Nagashima K, Gonda MA, Moss B.** 1993. Overexpression of the HIV-1 Gag-Pol Polyprotein Results in Intracellular Activation of HIV-1 Protease and Inhibition of Assembly and Budding of Virus-like Particles. *Virology* **193**:661–671.
92. **Park J, Morrow CD.** 1991. Overexpression of the gag-pol Precursor from Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Genomes Results in Efficient Proteolytic Processing in the Absence of Virion Production. *J. Virol.* **65**:5111–5117.
93. **Debouck C, Gorniak J.** 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc. ...* **84**:8903–8906.
94. **Kohl N, Emini E.** 1988. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. ...* **85**:4686–4690.
95. **Loeb DD, Swanstrom R, Everitt L, Manchester M, Stamper SE, Hutchison CA.** 1989. Complete mutagenesis of the HIV-1 protease. *Nature* **340**:397–400.
96. **Wlodawer A, Miller M, Jaskolski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB.** 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Sci.* **245** :616–621.
97. **Babe L, Rose J, Craik C.** 1995. Trans-dominant inhibitory human immunodeficiency virus type 1 protease monomers prevent protease activation and virion maturation. *Proc. Natl. ...* **92**:10069–10073.
98. **Louis J, Clore G, Gronenborn A.** 1999. Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding. *Nat. Struct. Mol. ...* **6**.
99. **Pettit S, Gulnik S, Everitt L, Kaplan A.** 2003. The dimer interfaces of protease and extra-protease domains influence the activation of protease and the specificity of GagPol cleavage. *J. Virol.* **77**:366–374.
100. **Ludwig C, Leiherer A, Wagner R.** 2008. Importance of protease cleavage sites within and flanking human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6\* for spatiotemporal regulation of protease activation. *J. Virol.* **82**:4573–84.
101. **Lightfoote M, Coligan J, Folks T.** 1986. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J. Virol.*



102. **Di Marzo Veronese F, Copeland TD, DeVico AL, Rahman R, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG.** 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Sci.* **231** :1289–1291.
103. **Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA.** 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Sci.* **256** :1783–1790.
104. **Schulze T, Nawrath M, Moelling K.** 1991. Cleavage of the HIV-1 p66 reverse transcriptase/RNase H by the p9 protease in vitro generates active p15 RNase H. *Arch. Virol.* **118**:179–188.
105. **Szilvay A, Nornes S, Kannapiran A, Haukanes BI, Endresen C, Helland DE.** 1993. Characterization of HIV-1 reverse transcriptase with antibodies indicates conformational differences between the RNase H domains of p 66 and p 15. *Arch. Virol.* **131**:393–403.
106. **Harris D, Lee R, Misra H, Pandey P, Pandey V.** 1998. The p51 subunit of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is essential in loading the p66 subunit on the template primer. *Biochemistry* **2960**:5903–5908.
107. **Tasara T, Amacker M, Hübscher U.** 1999. Intramolecular chimeras of the p51 subunit between HIV-1 and FIV reverse transcriptases suggest a stabilizing function for the p66 subunit in the heterodimeric. *Biochemistry* 1633–1642.
108. **Chung S, Miller JT, Johnson BC, Hughes SH, Le Grice SFJ.** 2012. Mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase p51 subunit defines residues contributing to vinylogous urea inhibition of ribonuclease H activity. *J. Biol. Chem.* **287**:4066–75.
109. **Chung S, Miller JT, Lapkouski M, Tian L, Yang W, Le Grice SFJ.** 2013. Examining the role of the HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit in positioning and hydrolysis of RNA/DNA hybrids. *J. Biol. Chem.* **288**:16177–84.
110. **Grice S Le, Naas T.** 1991. Subunit-selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated p51 HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**:3905–3911.
111. **Hostomsky Z, Hostomska Z, Fu T, Taylor J.** 1992. Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1: functionality of subunits of the heterodimer in DNA synthesis. *J. Virol.* **66**:3179–3182.
112. **Guiot E, Carayon K, Delelis O, Simon F, Tauc P, Zubin E, Gottikh M, Mouscadet J-F, Brochon J-C, Deprez E.** 2006. Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **281**:22707–19.

113. **Zheng R, Jenkins T, Craigie R.** 1996. Zinc folds the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc. ...* **93**:13659–13664.
114. **Kulkosky J, Jones K, Katz R.** 1992. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2331–2338.
115. **Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, Davies DR.** 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Sci.* **266** :1981–1986.
116. **Eijkelenboom A, Lutzke R.** 1995. The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nat. Struct. Biol.* **2**:807–810.
117. **Allan JS, Coligan JE, Barin F, McLane MF, Sodroski JG, Rosen CA, Haseltine WA, Lee TH, Essex M.** 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Sci.* **228** :1091–1094.
118. **Robey WG, Safai B, Oroszlan S, Arthur LO, Gonda MA, Gallo RC, Fischinger PJ.** 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Sci.* **228** :593–595.
119. **Li Y, Luo L, Thomas DY, Kang CY.** 2000. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**:417–28.
120. **Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk H-D, Garten W.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**:358–361.
121. **Wyatt R, Sodroski J.** 1998. The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Sci.* **280** :1884–1888.
122. **Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763–767.
123. **Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman J-C, Montagnier L.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767–768.
124. **Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.** 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Sci.* **272** :1955–1958.

125. **Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Marzio PD, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661–666.
126. **Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1996. The  $\beta$ -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates. *Cell* **85**:1135–1148.
127. **Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.** 1996. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Sci.* **272** :872–877.
128. **Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP.** 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**:184–187.
129. **Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J.** 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179–183.
130. **Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426–430.
131. **Chan D, Fass D, Berger J, Kim P.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263–73.
132. **Jabbar MA, Nayak DP.** 1990. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J. Virol.* **64**:6297–6304.
133. **Crise B, Buonocore L, Rose JK.** 1990. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. *J. Virol.* **64**:5585–5593.
134. **Sodroski J, Rosen C, Wong-Staal F, Salahuddin SZ, Popovic M, Arya S, Gallo RC, Haseltine WA.** 1985. Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Sci.* **227** :171–173.
135. **Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F.** 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Sci.* **229** :69–73.

136. **Tong-Starksen S.** 1987. Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proc. ...* **84**:6845–6849.
137. **Feng S, Holland E.** 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* **334**:165–167.
138. **Dingwall C, Ernberg I.** 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. ...* **86**:6925–6929.
139. **Kao S, Calman A, Luciw P, Peterlin B.** 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**:489–493.
140. **Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, Steitz TA, Crothers DM.** 1990. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. *Sci.* **249** :1281–1285.
141. **Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD.** 1991. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science (80-. )*. **252**:1167—1171.
142. **Frankel A.** 1989. Activity of synthetic peptides from the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. ...* **86**:7397–7401.
143. **Kuppuswamy M, Subramaniam T, Srinivasan A, Chinnadurai G.** 1989. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic acids ...* **17**.
144. **Mancebo HSY, Lee G, Flygare J, Tomassini J, Luu P, Zhu Y, Peng J, Blau C, Hazuda D, Price D, Flores O.** 1997. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev.* **11**:2633–2644.
145. **Zhu Y, Pe'ery T, Peng J, Ramanathan Y, Marshall N, Marshall T, Amendt B, Mathews MB, Price DH.** 1997. Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* **11**:2622–2632.
146. **Wei P, Garber ME, Fang S-M, Fischer WH, Jones KA.** 1998. A Novel CDK9-Associated C-Type Cyclin Interacts Directly with HIV-1 Tat and Mediates Its High-Affinity, Loop-Specific Binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451–462.
147. **Malim MH, Böhnlein S, Hauber J, Cullen BR.** 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator—Derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* **58**:205–214.
148. **Cochrane AW, Perkins ANN, Rosen CA.** 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev : relevance of Identification of Sequences Important in the Nucleolar Localization of Human Immunodeficiency Virus Rev : Relevance of Nucleolar Localiz. *J. Virol.* **64**:881–885.

149. **Malim MH, Hauber J, Le S-Y, Maizel J V, Cullen BR.** 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254–257.
150. **Cochrane A.** 1990. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc. ...* **87**:1198–1202.
151. **Kubota S, Pomerantz R.** 1998. A cis-acting peptide signal in human immunodeficiency virus type I Rev which inhibits nuclear entry of small proteins. *Oncogene* **15**.
152. **Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattajt LW, Lührmann R.** 1995. The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**:475–483.
153. **Fankhauser C, Izaurralde E.** 1991. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol. Cell. Biol.* **11**:2567–2575.
154. **Henderson BR, Percipalle P.** 1997. Interactions between HIV rev and nuclear import and export factors: the rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin- $\beta$ . *J. Mol. Biol.* **274**:693–707.
155. **Mann DA, Mikaélian I, Zimmel RW, Green SM, Lowe AD, Kimura T, Singh M, Jonathan P, Butler G, Gait MJ, Karn J.** 1994. A Molecular Rheostat: Co-operative Rev Binding to Stem I of the Rev-response Element Modulates Human Immunodeficiency Virus Type-1 Late Gene Expression. *J. Mol. Biol.* **241**:193–207.
156. **Zapp M, Hope T.** 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. ...* **88**:7734–7738.
157. **Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW.** 1997. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell* **90**:1051–1060.
158. **Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F.** 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Sci.* **237** :888–893.
159. **Madani N, Kabat D.** 1998. An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *J. Virol.* **72** : 10251–10255.

160. **Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, Sodroski J.** 1992. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**:6489–6495.
161. **Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH.** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**:646–650.
162. **Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **99**–103.
163. **Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance A.** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science (80-. )*. **300**:2003.
164. **Tian C, Yu X, Zhang W, Wang T, Xu R, Yu X.** 2006. Differential requirement for conserved tryptophans in human immunodeficiency virus type 1 Vif for the selective suppression of APOBEC3G and APOBEC3F. *J. Virol.* **80**:3112–3115.
165. **Dettenhofer M, Cen S, Carlson BA, Kleiman L, Yu X.** 2000. Association of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif with RNA and Its Role in Reverse Transcription Association of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif with RNA and Its Role in Reverse Transcription. *J. Virol.* **74**:8938–8945.
166. **Bardy M, Gay B.** 2001. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag–Pol precursors: co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag. *J. Gen. ...* **82**:2719–2733.
167. **Zhang H, Pomerantz R, Dornadula G, Sun Y.** 2000. immunodeficiency virus type 1 Vif protein is an integral component of an mRNP complex of viral RNA and could be involved in the viral RNA folding and packaging. *J. Virol.* **74**:8252–8261.
168. **Akari H, Fujita M, Kao S, Khan M a, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K.** 2004. High level expression of human immunodeficiency virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/nucleocapsid processing site. *J. Biol. Chem.* **279**:12355–62.
169. **Lee Y, Liu B, Yu X.** 1999. Formation of Virus Assembly Intermediate Complexes in the Cytoplasm by Wild-Type and Assembly-Defective Mutant Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Their Association with Membranes Formation of Virus Assembly Intermediate Complexes in the Cytoplasm by. *J. Virol.* **73**:5654–5662.
170. **Yang X, Gabuzda D.** 1998. Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates and Regulates the HIV-1 Vif Protein. *J. Biol. Chem.* **273**:29879–29887.

171. **Goncalves J.** 1996. Phosphorylation of Vif and Its Role in HIV-1 Replication. *J. Biol. Chem.* **271**:10121–10129.
172. **Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix J-L, Marquet R, Tisné C, Paillart J-C.** 2012. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res.* **169**:361–376.
173. **Mehle A, Thomas ER, Rajendran KS, Gabuzda D.** 2006. A zinc-binding region in Vif binds Cul5 and determines cullin selection. *J. Biol. Chem.* **281**:17259–65.
174. **Xiao Z, Ehrlich E, Luo K, Xiong Y, Yu X-F.** 2007. Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *FASEB J.* **21**:217–22.
175. **Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, Yu X-F.** 2003. Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Sci.* **302** :1056–1060.
176. **Yang S, Sun Y, Zhang H.** 2001. The multimerization of human immunodeficiency virus type I Vif protein: a requirement for Vif function in the viral life cycle. *J. Biol. Chem.* **276**:4889–93.
177. **Donahue J, Vetter M, Mukhtar N, D'Aquila R.** 2008. The HIV-1 Vif PPLP motif is necessary for human APOBEC3G binding and degradation. *Virology* **377**:49–53.
178. **Bouyac LE, Courcoul M, Bertoia G, Baudat Y, Gabuzda D, Blanc D, Chazal N, Sire P, Vigne R, Boulanger P.** 1997. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein Binds to the Pr55 Gag Precursor. *J. Virol.* **71**:9358–9365.
179. **Wong-Staal F, Chanda P, Ghrayeb J.** 1987. Human immunodeficiency virus: the eighth gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**:33–39.
180. **Ogawa K, Shibata R, Kiyomasu T, Higuchi I, Kishida Y, Adachi A.** 1989. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading Mutational Analysis of the Human Immunodeficiency Virus vpr Open Reading Frame. *J. Virol.* **63**:4110–4114.
181. **Connor R, Chen B, Choe S, Landau N.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology.*
182. **Bachand F, Yao X-J, Hrimech M, Rougeau N, Cohen E a.** 1999. Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires a Direct Interaction with the p6 Domain of the p55 Gag Precursor Incorporation of Vpr into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Requires a Direct Interaction with the p6 Domain of the p. *J. Biol. Chem.* **274**:9083–9091.

183. **Selig L, Pages J, Tanchou V, Prévéral S, Liu LX, Erdtmann L, Darlix J, Benichou S.** 1999. Interaction with the p6 Domain of the Gag Precursor Mediates Incorporation into Virions of Vpr and Vpx Proteins from Primate Lentiviruses Interaction with the p6 Domain of the Gag Precursor Mediates Incorporation into Virions of Vpr and Vpx Proteins from. *J. Virol.*
184. **Zhang S, Pointer D, Singer G, Feng Y, Park K, Zhao L-J.** 1998. Direct binding to nucleic acids by Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* **212**:157–166.
185. **Accola MA, Öhagen Å, Göttlinger HG.** 2000. Isolation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cores : Retention of Vpr in the Absence of p6 gag Isolation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cores : Retention of Vpr in the Absence of p6 gag. *J. Virol.* **74**.
186. **Rocquigny H De.** 2000. Interactions of the C-terminus of viral protein R with nucleic acids are modulated by its N-terminus. *Eur. J. ...* **3660**:3654–3660.
187. **Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Tessmer UWE, Huckhagel C.** 2000. Biochemical and Structural Analysis of Isolated Mature Cores of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Biochemical and Structural Analysis of Isolated Mature Cores of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.*
188. **Belzile J-P, Duisit G, Rougeau N, Mercier J, Finzi A, Cohen E a.** 2007. HIV-1 Vpr-mediated G2 arrest involves the DDB1-CUL4AVPRBP E3 ubiquitin ligase. *PLoS Pathog.* **3**:e85.
189. **Le Rouzic E, Belaïdouni N, Estrabaud E, Morel M, Rain J-C, Transy C, Margottin-Goguet F.** 2007. HIV1 Vpr Arrests the Cell Cycle by Recruiting DCAF1/VprBP, a Receptor of the Cul4-DDB1 Ubiquitin Ligase. *Cell Cycle* **6**:182–188.
190. **Schröfelbauer B.** 2007. HIV-1 Vpr function is mediated by interaction with the damage-specific DNA-binding protein DDB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
191. **DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Monteiro-Filho CMR, Argañaraz ER, Planelles V.** 2007. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol. J.* **4**:57.
192. **Wen X, Duus KM, Friedrich TD, de Noronha CMC.** 2007. The HIV1 protein Vpr acts to promote G2 cell cycle arrest by engaging a DDB1 and Cullin4A-containing ubiquitin ligase complex using VprBP/DCAF1 as an adaptor. *J. Biol. Chem.* **282**:27046–57.
193. **Tan L, Ehrlich E, Yu X-F.** 2007. DDB1 and Cul4A are required for human immunodeficiency virus type 1 Vpr-induced G2 arrest. *J. Virol.* **81**:10822–30.



194. **Belzile J-P, Richard J, Rougeau N, Xiao Y, Cohen E a.** 2010. HIV-1 Vpr induces the K48-linked polyubiquitination and proteasomal degradation of target cellular proteins to activate ATR and promote G2 arrest. *J. Virol.* **84**:3320–30.
195. **Jacotot E, Ferri K, Hamel C El.** 2001. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. *J. ...* **193**.
196. **Jacotot E, Ravagnan L, Loeffler M.** 2000. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J. ...* **191**.
197. **Andersen JL, DeHart JL, Zimmerman ES, Ardon O, Kim B, Jacquot G, Benichou S, Planelles V.** 2006. HIV-1 Vpr-induced apoptosis is cell cycle dependent and requires Bax but not ANT. *PLoS Pathog.* **2**:e127.
198. **Majumder B, Venkatachari NJ, Schafer E a, Janket ML, Ayyavoo V.** 2007. Dendritic cells infected with vpr-positive human immunodeficiency virus type 1 induce CD8<sup>+</sup> T-cell apoptosis via upregulation of tumor necrosis factor alpha. *J. Virol.* **81**:7388–99.
199. **Ward J, Davis Z, DeHart J, Zimmerman E, Bosque A, Brunetta E, Mavilio D, Planelles V, Barker E.** 2009. HIV-1 Vpr triggers natural killer cell-mediated lysis of infected cells through activation of the ATR-mediated DNA damage response. *PLoS Pathog.* **5**:e1000613.
200. **Richard J, Sindhu S, Pham T, Belzile J-P, Cohen ÉA.** 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* **115**:1354–1363.
201. **Farnet C, Haseltine W.** 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* **65**:1910–1915.
202. **Miller M, Farnet C, Bushman F.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* **71**:5382–5390.
203. **Bukrinsky M, Sharova N, McDonald T, Pushkarskaya T, Tarpley W, Stevenson M.** 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. ...* **90**:6125–6129.
204. **Nermut M V, Fassati A.** 2003. Structural Analyses of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Intracellular Reverse Transcription Complexes *77*:8196–8206.

205. **Fassati A, Goff SP.** 2001. Characterization of Intracellular Reverse Transcription Complexes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 **75**:3626–3635.
206. **Mansky LM.** 1996. The Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Influenced by the vpr Gene **140**:391–400.
207. **Mansky LM, Temin HM.** 1995. Lower In Vivo Mutation Rate of Human Immunodeficiency Virus Type 1 than That Predicted from the Fidelity of Purified Reverse Transcriptase † **69**:5087–5094.
208. **Stark LA, Hay RT.** 1998. Human Immunodeficiency Virus Type 1 ( HIV-1 ) Viral Protein R ( Vpr ) Interacts with Lys-tRNA Synthetase : Implications for Priming of HIV-1 Reverse Transcription **72**:3037–3044.
209. **Strebel K, Klimkait T, Martin MA.** 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Sci.* **241** :1221–1223.
210. **Maldarelli F, Chen M, Willey R, Strebel K.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is an oligomeric type I integral membrane protein. *J. Virol.* **67**:5056–5061.
211. **Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD.** 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**:425–430.
212. **Cohen EA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**:532–534.
213. **Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K.** 1992. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Induces Rapid Degradation of CD4 **66**:7193–7200.
214. **Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson M, Stephens EB, Guatelli J.** 2008. The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu. *Cell Host Microbe* **3**:245–252.
215. **Magadán JG, Pérez-Victoria FJ, Sougrat R, Ye Y, Strebel K, Bonifacino JS.** 2010. Multilayered Mechanism of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu Involving Distinct ER Retention and ERAD Targeting Steps. *PLoS Pathog.* **6**:e1000869.
216. **Magadán JG, Bonifacino JS.** 2012. Transmembrane Domain Determinants of CD4 Downregulation by HIV-1 Vpu. *J. Virol.* **86**:757–772.
217. **Terwilliger EF, Cohen E a, Lu YC, Sodroski JG, Haseltine W a.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**:5163–7.

218. **Neil SJD, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* **2**:354–367.
219. **Arias JF, Heyer LN, von Bredow B, Weisgrau KL, Moldt B, Burton DR, Rakasz EG, Evans DT.** 2014. Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**:6425–30.
220. **Alvarez R a, Hamlin RE, Monroe A, Moldt B, Hotta MT, Rodriguez Caprio G, Fierer DS, Simon V, Chen BK.** 2014. HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells. *J. Virol.* **88**:6031–46.
221. **Veillette M, Désormeaux A, Medjahed H, Gharsallah N-E, Coutu M, Baalwa J, Guan Y, Lewis G, Ferrari G, Hahn BH, Haynes BF, Robinson JE, Kaufmann DE, Bonsignori M, Sodroski J, Finzi A.** 2014. Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Virol.* **88**:2633–44.
222. **Shah AH, Sowrirajan B, Davis ZB, Ward JP, Campbell EM, Planelles V, Barker E.** 2010. Degranulation of Natural Killer Cells Following Interaction with HIV-1-Infected Cells Is Hindered by Downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe* **8**:397–409.
223. **Guy B, Kieny MP, Riviere Y, Peuch C Le, Dott K, Girard M, Montagnier L, Lecocq J-P.** 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**:266–269.
224. **Chen BK, Gandhi RT.** 1996. CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of CD4 Down-Modulation during Infection of Human T Cells with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Involves Independent Activitie.
225. **Haller C, Muller B, Fritz J V., Lamas-Murua M, Stolp B, Pujol F, Keppler OT, Fackler OT.** 2014. HIV-1 Nef and Vpu are Functionally Redundant Broad-Spectrum Modulators of Cell Surface Receptors Including Tetraspanins. *J. Virol.*
226. **Roeth JF, Collins KL.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:548–563.
227. **Ren X, Park SY, Bonifacino JS, Hurley JH.** 2014. How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *Elife* **2014**:1–19.

228. **Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J.** 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* **16**:6964–6976.
229. **Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, Cullen BR.** 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* **177**:1561–1566.
230. **Roeth JF, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL.** 2004. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **167**:903–913.
231. **Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D.** 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397–401.
232. **Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, Mandelboim O, Chen BK, Strominger JL, Baltimore D.** 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**:661–671.
233. **Berger EA, Doms RW, Fenyo E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA.** 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* **391**:240.
234. **Koshiha T, Chan DC.** 2003. The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions. *J. Biol. Chem.* **278**:7573–9.
235. **He Y, Vassell R, Zaitseva M, Nguyen N, Yang Z, Weng Y, Weiss CD.** 2003. Peptides Trap the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Fusion Intermediate at Two Sites Peptides Trap the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Fusion Intermediate at Two Sites.
236. **Si Z, Madani N, Cox JM, Chruma JJ, Klein JC, Schön A, Phan N, Wang L, Biorn AC, Cocklin S, Chaiken I, Freire E, Smith AB, Sodroski JG.** 2004. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **101** :5036–5041.
237. **Forshey BM, Schwedler U Von, Sundquist WI, Aiken C.** 2002. Formation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core of Optimal Stability Is Crucial for Viral Replication Formation of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core of Optimal Stability Is Crucial for Viral Replication.
238. **Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen E a.** 2007. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J. Virol.* **81**:7476–90.

239. **Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm a, Emini E a, Chodakewitz J a.** 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **337**:734–739.
240. **Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge C a, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP.** 1995. ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:2484–2488.
241. **Koh Y, Nakata H, Maeda K, Bilcer G, Devasamudram T, Kincaid F, Boross P, Wang Y, Tie Y, Volarath P, Gaddis L, Harrison RW, Weber T, Ghosh AK, Mitsuya H, Ogata H, Kincaid JF, Weber IT.** 2003. Novel bis Nonpeptidic Protease Inhibitor ( PI ) UIC-94017 ( TMC114 ) with Potent Activity against Multi-PI-Resistant Human Immunodeficiency Virus In Vitro Novel bis -Tetrahydrofuranylurethane-Containing Nonpeptidic Protease Inhibitor ( PI ) UIC-94017 ( TM **94017**:3123–3129.
242. **Craig JC, Duncan IB, Hockley D, Grief C, Roberts NA, Mills JS.** 1991. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Res.* **16**:295–305.
243. **Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Aristoff PA, Johnson PD, Skulnick HI, Dolak LA, Seest EP, Tomich PK, Bohanon MJ, Horng MM, Lynn JC, Chong KT, Hinshaw RR, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Thaisrivongs S.** 1998. Tipranavir (PNU-140690): a potent, orally bioavailable nonpeptidic HIV protease inhibitor of the 5,6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone sulfonamide class. *J. Med. Chem.* **41**:3467–3476.
244. **Marchand C, Maddali K, Metifiot M, Pommier Y.** 2009. HIV-1 IN Inhibitors: 2010 Update and Perspectives. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**:1016–1037.
245. **Das K, Arnold E.** 2013. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Curr. Opin. Virol.* **3**:111–118.
246. **Haqqani AA, Tilton JC.** 2013. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* **98**:158–170.
247. **Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M.** 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4721–4732.

248. **Kilby JM, Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C, Arduino RC, Goodgame JC, Gallant JE, Volberding P, Murphy RL, Valentine F, Saag MS, Nelson EL, Sista PR, Dusek A.** 2002. The Safety, Plasma Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of Subcutaneous Enfuvirtide (T-20), a Peptide Inhibitor of gp41-Mediated Virus Fusion, in HIV-Infected Adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**:685–693.
249. **Earl PL, Doms RW, Moss B.** 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**:648–52.
250. **Berman PW, Nunes WM, Haffar OK.** 1988. Expression of Membrane-Associated and Secreted Variants of gp160 of Human Immunodeficiency Virus Type 1 In Vitro and in Continuous Cell Lines.
251. **Leonard K, Thomas JN, Gregory TJ, Spellman W, Harris RJ, Thomas N.** 1990. and characterization of potential Assignment of Intrachain Disulfide Bonds and Characterization of Potential Glycosylation Sites of the Type 1 Recombinant Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein ( gp120 ) Expressed in Chinese Hamster Ovary Cell.
252. **Bernstein HB, Tucker SP, Hunter E, Schutzbach JS, Compans RW.** 1994. envelope glycoprotein is modified by O-linked Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Is Modified by O-linked Oligosaccharides.
253. **Helseth E, Olshevsky UDY, Furman C, Sodroski J.** 1991. Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Envelope Glycoprotein Regions Important for Association with the gp41 Transmembrane Glycoprotein.
254. **Binley JM, Sanders RW, Clas B, Master A, Guo Y, Kajumo F, Anselma DJ, Maddon PJ, Olson WC, Moore JP, Schuelke N.** 2000. A Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Complex Stabilized by an Intermolecular Disulfide Bond between the gp120 and gp41 Subunits Is an Antigenic Mimic of the Trimeric Virion-Associated Structure A Recombinant Human Immuno.
255. **Egan MA, Carruth LM, Rowell JF, Yu X.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein . *Human Immunodeficiency Viru.*
256. **Wyss S, Berlioz-torrent C, Boge M, Blot G, Höning S, Benarous R, Thali M, Wyss P.** 2001. The Highly Conserved C-Terminal Dileucine Motif in the Cytosolic Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Is Critical for Its Association with the AP-1 Clathrin Adapter The Highly Conserved C-Terminal Dileucine Motif in the .

257. **Cervantes-Acosta G, Lodge R, Lemay G, Cohen EA.** 2001. Influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein functions. *J. Hum. Virol.* **4**:249–259.
258. **Deschambeault J, Lalonde J, Lodge R, Cohen ÉA, Cervantes-acosta G, Cohen RICA, Lemay GUY.** 1999. Polarized Human Immunodeficiency Virus Budding in Lymphocytes Involves a Tyrosine-Based Signal and Favors Cell-to-Cell Viral Transmission Polarized Human Immunodeficiency Virus Budding in Lymphocytes Involves a Tyrosine-Based Signal and Favors Cell-to-Cel.
259. **Zhu P, Chertova E, Bess J.** 2003. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc. ....*
260. **Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, Weissenhorn W.** 2010. Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog.* **6**:e1000880.
261. **Checkley MA, Luttfge BG, Freed EO.** 2011. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J. Mol. Biol.* **410**:582–608.
262. **Salzwedel K, West JT, Hunter E.** 1999. 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 **73**:2469–2480.
263. **Munoz-Barroso I, Salzwedel K, Hunter E.** 1999. Role of the Membrane-Proximal Domain in the Initial Stages of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein-Mediated Membrane Fusion **73**:6089–6092.
264. **Boge M.** 1998. A Membrane-proximal Tyrosine-based Signal Mediates Internalization of the HIV-1 Envelope Glycoprotein via Interaction with the AP-2 Clathrin Adaptor. *J. Biol. Chem.* **273**:15773–15778.
265. **Wyss S, Berlioz-torrent C, Boge M, Blot G, Höning S, Benarous R, Thali M, Wyss P.** 2001. The Highly Conserved C-Terminal Dileucine Motif in the Cytosolic Domain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Is Critical for Its Association with the AP-1 Clathrin Adapter The Highly Conserved C-Terminal Dileucine Motif in the .
266. **Miller MA, Cloyd MW, Liebmann J, Rinaldo Jr. CR, Islam KR, Wang SZS, Mietzner TA, Montelaro RC.** 1993. Alterations in Cell Membrane Permeability by the Lentivirus Lytic Peptide (LLP-1) of HIV-1 Transmembrane Protein. *Virology* **196**:89–100.
267. **Piller SC, Dubay JW, Derdeyn CA, Hunter E.** 2000. Mutational Analysis of Conserved Domains within the Cytoplasmic Tail of gp41 from Human

Immunodeficiency Virus Type 1 : Effects on Glycoprotein Incorporation and Infectivity  
Mutational Analysis of Conserved Domains within the Cytoplasmic Tail of gp41 from.

268. **Cosson P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1 1:5783–5788.
269. **Bültmann A, Muranyi W, Seed B, Bu A, Pettenkofer-institut M Von, Universita LM.** 2001. Identification of Two Sequences in the Cytoplasmic Tail of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein That Inhibit Cell Surface Expression Identification of Two Sequences in the Cytoplasmic Tail of the Human Immunodeficiency Virus Type .
270. **Lee SF, Wang CT, Liang JY, Hong SL, Huang CC, Chen SS.** 2000. Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41. *J. Biol. Chem.* **275**:15809–19.
271. **Lee S-F, Ko C-Y, Wang C-T, Chen SS-L.** 2002. Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability. *J. Biol. Chem.* **277**:15363–75.
272. **Kalia V, Sarkar S, Gupta P, Montelaro C, Montelaro RC.** 2003. Rational Site-Directed Mutations of the LLP-1 and LLP-2 Lentivirus Lytic Peptide Domains in the Intracytoplasmic Tail of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Indicate Common Functions in Cell-Cell Fusion but Distinct Roles in Virion Envelope Incorporation.
273. **Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson W a.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648–59.
274. **Lyumkis D, Julien J-P, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse P-J, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Carragher B, Wilson I a, Ward AB.** 2013. Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1484–90.
275. **Julien J-P, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse P-J, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson I a.** 2013. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1477–83.
276. **Finzi A, Xiang S-H, Pacheco B, Wang L, Haight J, Kassa A, Danek B, Pancera M, Kwong PD, Sodroski J.** 2010. Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol. Cell* **37**:656–67.



277. **Pancera M, Majeed S, Ban YA, Chen L, Huang C, Kong L.** 2010. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility **107**:1–6.
278. **Julien J-P, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse P-J, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson I a.** 2013. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**:1477–83.
279. **Xiang S, Kwong PD, Gupta R, Carlo D, Casper DJ, Wyatt R, Wang L, Hendrickson WA, Doyle ML, Rizzuto CD, Sodroski J.** 2002. Mutagenic Stabilization and / or Disruption of a CD4-Bound State Reveals Distinct Conformations of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Envelope Glycoprotein Mutagenic Stabilization and / or Disruption of a CD4-Bound State Reveals Distinct Confor.
280. **Haim H, Salas I, Sodroski J.** 2013. Proteolytic processing of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein precursor decreases conformational flexibility. *J. Virol.* **87**:1884–9.
281. **Kassa A, Finzi A, Pancera M, Courter JR, Smith AB, Sodroski J.** 2009. Identification of a human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein variant resistant to cold inactivation. *J. Virol.* **83**:4476–88.
282. **Kassa A, Madani N, Schön A, Haim H, Finzi A, Xiang S-H, Wang L, Princiotta A, Pancera M, Courter J, Smith AB, Freire E, Kwong PD, Sodroski J.** 2009. Transitions to and from the CD4-bound conformation are modulated by a single-residue change in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 inner domain. *J. Virol.* **83**:8364–78.
283. **Kassa A, Dey AK, Sarkar P, Labranche C, Go EP, Clark DF, Sun Y, Nandi A, Hartog K, Desaire H, Montefiori D, Carfi A, Srivastava IK, Barnett SW.** 2013. Stabilizing exposure of conserved epitopes by structure guided insertion of disulfide bond in HIV-1 envelope glycoprotein. *PLoS One* **8**:e76139.
284. **Désormeaux A, Coutu M, Medjahed H, Pacheco B, Herschhorn A, Gu C, Xiang S-H, Mao Y, Sodroski J, Finzi A.** 2013. The highly conserved layer-3 component of the HIV-1 gp120 inner domain is critical for CD4-required conformational transitions. *J. Virol.* **87**:2549–62.
285. **Yang X, Mahony E, Holm GH, Kassa A, Sodroski J.** 2003. Role of the gp120 inner domain  $\beta$ -sandwich in the interaction between the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein subunits. *Virology* **313**:117–125.
286. **Kwon Y Do, Finzi A, Wu X, Dogo-Isonagie C, Lee LK, Moore LR, Schmidt SD, Stuckey J, Yang Y, Zhou T, Zhu J, Vicic D a, Debnath AK, Shapiro L, Bewley C a,**

- Mascola JR, Sodroski JG, Kwong PD.** 2012. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:5663–8.
287. **Mao Y, Wang L, Gu C, Herschhorn A, Xiang S-H, Haim H, Yang X, Sodroski J.** 2012. Subunit organization of the membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein trimer. *Nat Struct Mol Biol* **19**:893–899.
288. **Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S.** 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**:109–13.
289. **Usami Y, Göttinger H.** 2013. HIV-1 Nef responsiveness is determined by Env variable regions involved in trimer association and correlates with neutralization sensitivity. *Cell Rep.* **5**:802–12.
290. **Medjahed H, Pacheco B, Désormeaux A, Sodroski J, Finzi A.** 2013. The HIV-1 gp120 major variable regions modulate cold inactivation. *J. Virol.* **87**:4103–11.
291. **Drummer HE, Hill MK, Maerz AL, Wood S, Ramsland PA.** 2013. Allosteric Modulation of the HIV-1 gp120-gp41 Association Site by Adjacent gp120 Variable Region 1 ( V1 ) N-Glycans Linked to Neutralization Sensitivity **9**.
292. **O'Rourke SM, Schweighardt B, Phung P, Fonseca DP a J, Terry K, Wrin T, Sinangil F, Berman PW.** 2010. Mutation at a single position in the V2 domain of the HIV-1 envelope protein confers neutralization sensitivity to a highly neutralization-resistant virus. *J. Virol.* **84**:11200–9.
293. **O'Rourke SM, Schweighardt B, Phung P, Mesa K a, Vollrath AL, Tatsuno GP, To B, Sinangil F, Limoli K, Wrin T, Berman PW.** 2012. Sequences in glycoprotein gp41, the CD4 binding site, and the V2 domain regulate sensitivity and resistance of HIV-1 to broadly neutralizing antibodies. *J. Virol.* **86**:12105–14.
294. **Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Koito A, Murakami T, Matsushita S.** 2007. Impact of V2 mutations on escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J. Virol.* **81**:3757–68.
295. **Kolchinsky P, Kiprilov E, Bartley P, Rubinstein R.** 2001. Loss of a Single N-Linked Glycan Allows Immunodeficiency Virus Type 1 Infection by Altering the Position of the gp120 V1 / V2 Variable Loops Loss of a Single N-Linked Glycan Allows CD4-Independent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection by Altering .
296. **Wibmer CK, Bhiman JN, Gray ES, Tumba N, Abdool Karim SS, Williamson C, Morris L, Moore PL.** 2013. Viral escape from HIV-1 neutralizing antibodies drives

increased plasma neutralization breadth through sequential recognition of multiple epitopes and immunotypes. *PLoS Pathog.* **9**:e1003738.

297. **Cimbro R, Gallant TR, Dolan M a, Guzzo C, Zhang P, Lin Y, Miao H, Van Ryk D, Arthos J, Gorshkova I, Brown PH, Hurt DE, Lusso P.** 2014. Tyrosine sulfation in the second variable loop (V2) of HIV-1 gp120 stabilizes V2-V3 interaction and modulates neutralization sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**:3152–7.
298. **Salomon A, Krachmarov C, Lai Z, Honnen W, Zingman BS, Sarlo J, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Robinson JE, Pinter A.** 2014. Specific sequences commonly found in the V3 domain of HIV-1 subtype C isolates affect the overall conformation of native Env and induce a neutralization-resistant phenotype independent of V1/V2 masking. *Virology* **448**:363–74.
299. **Wood NT, Fadda E, Davis R, Grant OC, Martin JC, Woods RJ, Travers S a.** 2013. The influence of N-linked glycans on the molecular dynamics of the HIV-1 gp120 V3 loop. *PLoS One* **8**:e80301.
300. **Yuan T, Li J, Zhang M-Y.** 2013. HIV-1 envelope glycoprotein variable loops are indispensable for envelope structural integrity and virus entry. *PLoS One* **8**:e69789.
301. **Li Y, Yang D, Wang J, Yao Y, Zhang W, Wang L, Cheng D, Yang F, Zhang F, Zhuang M, Ling H.** 2014. Critical Amino Acids within the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein V4 N- and C-Terminals Contribute to Virus Entry **9**:1–10.
302. **Wyatt R, Sullivan N, Thali M, Repke H, Ho D, Robinson J, Posner M, Sodroski J.** 1993. Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J. Virol.* **67**:4557–65.
303. **Rini JM, Stanfield RL, Stura EA, Salinas PA, Profy AT, Wilson IA.** 1993. Crystal structure of a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop peptide antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:6325–6329.
304. **Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY.** 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J. Virol.* **67**:584–588.
305. **Robey WG, Arthur LO, Matthews TJ, Langlois a, Copeland TD, Lerche NW, Oroszlan S, Bolognesi DP, Gilden R V, Fischinger PJ.** 1986. Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:7023–7027.

306. **Pyle SW, Bess JW, Robey WG, Fischinger PJ, Gilden R V, Arthur LO.** 1987. Purification of 120,000 dalton envelope glycoprotein from culture fluids of human immunodeficiency virus (HIV)-infected H9 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**:387–400.
307. **Rekosh D, Nygren a, Flodby P, Hammarskjöld ML, Wigzell H.** 1988. Coexpression of human immunodeficiency virus envelope proteins and tat from a single simian virus 40 late replacement vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:334–338.
308. **Jones DH, McBride BW, Roff M a., Farrar GH.** 1995. Efficient purification and rigorous characterisation of a recombinant gp120 for HIV vaccine studies. *Vaccine* **13**:991–999.
309. **Zhang CWH, Chishti Y, Hussey RE, Reinherz EL.** 2001. Expression, purification, and characterization of recombinant HIV gp140: The gp41 ectodomain of HIV or simian immunodeficiency virus is sufficient to maintain the retroviral envelope glycoprotein as a trimer. *J. Biol. Chem.* **276**:39577–39585.
310. **Gao F, Li Y, Decker JM, Peyerl FW, Bibollet-Ruche F, Rodenburg CM, Chen Y, Shaw DR, Allen S, Musonda R, Shaw GM, Zajac AJ, Letvin N, Hahn BH.** 2003. Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**:817–823.
311. **Hallenberger S, Tucker SP, Owens RJ, Bernstein HB, Compans RW.** 1993. Secretion of a Truncated Form of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein. *Virology* **193**:510–514.
312. **Doms R, Earl P, Moss B.** 1991. The Assembly of the HIV-1 Env Glycoprotein into Dimers and Tetramers, p. 203–221. *In* Düzgüneş, N (ed.), *Mechanisms and Specificity of HIV Entry into Host Cells* SE - 13. Springer US.
313. **Center RJ, Earl PL, Lebowitz J, Schuck P, Moss B.** 2000. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 V2 Domain Mediates gp41-Independent Intersubunit Contacts. *J. Virol.* **74** :4448–4455.
314. **Finzi A, Pacheco B, Zeng X, Kwon Y Do, Kwong PD, Sodroski J.** 2010. Conformational characterization of aberrant disulfide-linked HIV-1 gp120 dimers secreted from overexpressing cells. *J. Virol. Methods* **168**:155–61.
315. **Kong R, Li H, Georgiev I, Changela A, Bibollet-Ruche F, Decker JM, Rowland-Jones SL, Jaye A, Guan Y, Lewis GK, Langedijk JPM, Hahn BH, Kwong PD, Robinson JE, Shaw GM.** 2012. Epitope mapping of broadly neutralizing HIV-2 human monoclonal antibodies. *J. Virol.* **86**:12115–28.

316. **Kong R, Li H, Bibollet-Ruche F, Decker JM, Zheng NN, Gottlieb GS, Kiviat NB, Sow PS, Georgiev I, Hahn BH, Kwong PD, Robinson JE, Shaw GM.** 2012. Broad and potent neutralizing antibody responses elicited in natural HIV-2 infection. *J. Virol.* **86**:947–60.
317. **Madani N, Princiotta AM, Schön A, LaLonde J, Feng Y, Freire E, Park J, Courter JR, Jones DM, Robinson J, Liao H-X, Moody MA, Permar S, Haynes B, Smith AB, Wyatt R, Sodroski J.** 2014. CD4-Mimetic Small Molecules Sensitize Human Immunodeficiency Virus to Vaccine-Elicited Antibodies. *J. Virol.* **88**:6542–55.
318. **Herschhorn A, Gu C, Espy N, Richard J, Finzi A, Sodroski JG.** 2014. A broad HIV-1 inhibitor blocks envelope glycoprotein transitions critical for entry. *Nat Chem Biol* **10**:845–852.
319. **Shen R, Raska M, Bimczok D, Novak J, Smith PD.** 2014. HIV-1 Envelope Glycan Moieties Modulate HIV-1 Transmission. *J. Virol.*
320. **Cordonnier A, Montagnier L, Emerman M.** 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* **340**:571–574.
321. **Lasky LA, Nakamura G, Smith DH, Fennie C, Shimasaki C, Patzer E, Berman P, Gregory T, Capon DJ.** 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**:975–985.
322. **Sterjovski J, Churchill MJ, Roche M, Ellett A, Farrugia W, Wesselingh SL, Cunningham AL, Ramsland P a., Gorry PR.** 2011. CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120–CD4 interactions and fusogenicity. *Virology* **410**:418–428.
323. **Pace CS, Fordyce MW, Franco D, Kao CY, Seaman MS, Ho DD.** 2013. Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope. *J Acquir Immune Defic Syndr* **62**:1–9.
324. **Yuan W, Bazick J, Sodroski J.** 2006. Characterization of the Multiple Conformational States of Free Monomeric and Trimeric Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins after Fixation by Cross-Linker **80**:6725–6737.
325. **Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt S a, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PWIH, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson W a, Arthos J.** 2002. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**:678–682.

326. **Kovacs JM, Nkolola JP, Peng H, Cheung A, Perry J, Miller C a, Seaman MS, Barouch DH, Chen B.** 2012. HIV-1 envelope trimer elicits more potent neutralizing antibody responses than monomeric gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:12111–6.
327. **Veillette M, Coutu M, Richard J, Batrville L-A, Désormeaux A, Roger M, Finzi A.** 2014. Conformational Evaluation of HIV-1 Trimeric Envelope Glycoproteins Using a Cell-based ELISA Assay e51995.
328. **Julien JP, Sok D, Khayat R, Lee JH, Doores KJ, Walker LM, Ramos A, Diwanji DC, Pejchal R, Cupo A, Katpally U, Depetris RS, Stanfield RL, McBride R, Marozsan AJ, Paulson JC, Sanders RW, Moore JP, Burton DR, Poignard P, Ward AB, Wilson I a.** 2013. Broadly Neutralizing Antibody PGT121 Allosterically Modulates CD4 Binding via Recognition of the HIV-1 gp120 V3 Base and Multiple Surrounding Glycans. *PLoS Pathog.* **9**.
329. **Murin CD, Julien J-P, Sok D, Stanfield RL, Khayat R, Cupo A, Moore JP, Burton DR, Wilson I a, Ward AB.** 2014. Structure of 2G12 Fab2 in complex with soluble and fully glycosylated HIV-1 Env by negative-stain single particle electron microscopy. *J. Virol.* **88**:10177–10188.
330. **Blattner C, Lee J, Slieden K, Derking R, Falkowska E, delaPeña A, Cupo A, Julien JP, vanGils M, Lee PS, Peng W, Paulson JC, Poignard P, Burton DR, Moore JP, Sanders RW, Wilson I a., Ward AB.** 2014. Structural delineation of a quaternary, cleavage-dependent epitope at the gp41-gp120 interface on intact HIV-1 env trimers. *Immunity* **40**:669–680.
331. **Huang J, Kang BH, Pancera M, Lee JH, Tong T, Feng Y, Georgiev IS, Chuang G-Y, Druz A, Doria-Rose N a., Laub L, Slieden K, van Gils MJ, de la Peña AT, Derking R, Klasse P-J, Migueles S a., Bailer RT, Alam M, Pugach P, Haynes BF, Wyatt RT, Sanders RW, Binley JM, Ward AB, Mascola JR, Kwong PD, Connors M.** 2014. Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41–gp120 interface. *Nature.*
332. **Owens RJ, Compans RW.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor acquires aberrant intermolecular disulfide bonds that may prevent normal proteolytic processing. *Virology* **179**:827–833.
333. **Schwallier M, Smith GE, Skehel JJ, Wiley DC.** 1989. Studies with crosslinking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology* **172**:367–369.
334. **Forsell M, McKee K, Feng Y, Mascola J, Wyatt RT.** 2014. HIV-1 envelope glycoprotein trimer immunogenicity elicited in the presence of human CD4 alters the neutralization profile. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*

335. **Haynes B, Gilbert P, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, Evans DT, Montefiori DC, Kim JH, et al.** 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *New Engl. J. Med.* 1275–1286.
336. **Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang K-K, Gilbert PB, Huang Y, Gurley TC, Kozink DM, Marshall DJ, Whitesides JF, Tsao C-Y, Kaewkungwal J, Nitayaphan S, Pitisuttithum P, Rerks-Ngarm S, Kim JH, Michael NL, Tomaras GD, Montefiori DC, Lewis GK, DeVico A, Evans DT, Ferrari G, Liao H-X, Haynes BF.** 2012. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. *J. Virol.* **86**:11521–32.
337. **Anken E Van, Sanders RW, Liscaljet IM, Land A, Bontjer I, Tillemans S, Nabatov AA, Paxton WA, Berkhout B, Braakman I.** 2008. Only Five of 10 Strictly Conserved Disulfide Bonds Are Essential for Folding and Eight for Function of the HIV-1 Envelope Glycoprotein **19**:4298–4309.

