

Biología molecular de las proteínas accesorias del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)

Guillermo Cervantes Acosta¹

Resumen

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) es un retrovirus complejo que codifica 15 distintas proteínas. Algunas de estas proteínas no son esenciales para la replicación viral. No obstante estas proteínas accesorias participan en diferentes estadios del ciclo viral, incluyendo la regulación de la replicación, la infectividad y la salida viral. Los mecanismos por los cuales estas proteínas accesorias orientan ciertos eventos virales y celulares y su interacción con proteínas celulares se ha convertido en un tópico muy importante en investigación. Esta revisión expone entonces cómo la conformación estructural de las proteínas accesorias del VIH, Nef, Vpr, Vif y Vpu está relacionada con sus fenotipos putativos. Finalmente, nuestros resultados de previos estudios serán también presentados y discutidos a la luz de recientes desarrollos en el área.

Palabras claves: VIH-1, Proteínas accesorias, Nef, Vpr, Vif, Vpu.

Abstract

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a complex retrovirus encoding 15 distinct proteins. Some of these proteins are not essential for viral replication. However, these accessory proteins participate in different stages of the viral cycle, including, regulation of the viral replication, infectivity, and release. The mechanisms by which these accessory proteins drive the viral and cellular events and their interaction with cellular proteins have become a very hot topic in research. Thus, the present review exposes how the structural conformation of the HIV accessory proteins Nef, Vpr, Vif and Vpu is related with their putative phenotypes. Finally, our results from previous studies will also be presented and discussed in the light of the recent developments in the field.

Key words: HIV-1, Accessory proteins, Nef, Vpr, Vif, Vpu.

Fecha de recepción: 8 de abril de 2005
Fecha de aceptación: 12 de mayo de 2005

¹ Profesor del Departamento de Ciencias Básicas Médicas, Universidad del Norte, Barranquilla (Colombia). Dirección: Universidad del Norte, Km. 5 Vía Puerto Colombia, Barranquilla (Colombia). guicerva@uninorte.edu.co

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad caracterizada por el deterioro del sistema inmunitario, de manera que las personas infectadas pueden también ser afectadas por diversas enfermedades causadas por microorganismos llamados oportunistas. El agente causal de esta enfermedad es un retrovirus clasificado dentro del género de los lentivirus conocido como Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Existen dos tipos de VIH: el VIH tipo 1 y el VIH tipo 2.

Los retrovirus en general contienen tres cuadros de lectura abierta (conocidos por sus siglas en inglés ORF) bastante extensos que codifican para las poliproteínas Gag, Pol y Env, las cuales constituyen la estructura del virión y representan el repertorio enzimático viral. Los lentivirus, a diferencia de los otros retrovirus, se caracterizan por poseer ORF adicionales que codifican por una serie de proteínas conocidas como proteínas accesorias. La designación de proteínas accesorias se deriva del hecho que estas proteínas auxiliares no son indispensable para la replicación viral y porque mutaciones que afectan la expresión de estas proteínas no perturban la cinética de replicación viral, al menos *in vitro*. Sin embargo, estas proteínas son capaces de modular eventos importantes de la multiplicación viral, inclusive *in vitro*. De hecho, sus implicaciones a nivel de la patogénesis viral y de la progresión de la enfermedad han sido demostradas. En fin, muchos fenotipos asociados a la expresión de cada una de las proteínas accesorias, Nef, Vpr, Vif y Vpu, han sido reportadas (1). Debido a la complejidad del VIH y a los diferentes niveles de interacción que pueden existir entre estas proteínas, éstas serán presentadas de una forma independiente para comprender mejor sus funciones.

Proteína Nef

Esta proteína miristilada de 27 kDa se expresa de manera abundante en las etapas tempranas de la infección (2). Nef ha sido asociada al mantenimiento elevado de la carga viral *in vivo*. Esta asociación ha sido detectada tanto para el caso del VIH como para el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) (3). El efecto de Nef es también importante en la multiplicación viral y la patogénesis ya que virus cuyo gen Nef se encuentra defectuoso han mostrado un retardo considerable en el desarrollo de la enfermedad en los individuos infectados (3, 4). El fenotipo asociado a Nef que ha sido mejor caracterizado es la disminución del receptor CD4 a nivel de la superficie celular (5, 6). La endocitosis de CD4 a partir de la superficie celular permite evitar la superinfección de las células por parte de los virus liberados. Por otra parte, puede también aumentar la incorporación de proteínas de la envoltura en los viriones, aumentando en consecuencia la infectividad viral (7). Otra consecuencia de la endocitosis de CD4 es que mediante este mecanismo Nef también puede prevenir el fenómeno de agregación viral resultante de la interacción de CD4 con las glicoproteínas de la envoltura expuestas sobre los virus nacientes (8). El mecanismo de endocitosis de CD4 por parte de Nef es descrito como un reclutamiento de CD4 por Nef en la vía de vesículas de clathrina mediante interacción con el complejo de adaptinas. La internalización de CD4 depende de la presencia en la región C-terminal de la proteína Nef de motivos basados en dileucinas que interactúan con los complejos de adaptinas (9, 10). La sensibilidad de CD4 a la internalización está conferida por un

motivo, igualmente basado en dileucinas localizado en la región citoplásmica de CD4 próxima a la membrana (11). Sin embargo, estudios ulteriores han indicado que este motivo basado en dileucinas localizado en CD4 no es suficiente para la modulación de CD4 por parte de Nef y que una hélice alfa localizada en la cola citoplasmática de CD4 es también requerida (12). El efecto de Nef sobre la infectividad viral parece actuar en sinergia con otra proteína viral, Vpu, ya que virus producidos en ausencia de ambas proteínas presentan una disminución en 20 a 30 veces en su infectividad comparada con ésta del virus salvaje (13). Nef es capaz de interactuar y de unirse en forma específica a proteínas de la familia Src de la proteínas kinasas utilizando el motivo Pro-X-X-Pro. La observación de que este motivo es esencial para lograr una proliferación máxima del VIH en células primarias sugiere que la interacción de Nef con las Src kinasas puede ser responsable del aumento de la replicación y de la infectividad viral (14). Trabajos recientes han demostrado la existencia de una interacción de tipo funcional entre una mutante natural de Nef y la cola intracitoplásmica de la proteína gp41 (15). Nef es capaz también de ejercer una regulación negativa de los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad a nivel de la superficie de la célula infectada, contribuyendo así a los mecanismos de persistencia y de evasión inmunitaria del virus (16, 17, 18). Es importante anotar que Nef modula la activación de los linfocitos tanto positiva como negativamente (19). En fin, la puesta en marcha recientemente de un protocolo de purificación de Nef en las condiciones naturales de la proteína, usando heparina y cromatografía de afinidad, podría permitir futuros estudios moleculares de la función de Nef (20).

Proteína Vpr

Esta proteína con un peso estimado de 14 kDa se localiza en el núcleo de la célula después de la traducción y se ha reportado que hace parte del complejo de pre-integración que importa el ADN viral recientemente sintetizado hacia el núcleo. Por otro lado, la incorporación de esta proteína en la partícula viral a través de su unión con la región p6 del precursor Gag se requiere para infectar a las células que no están en división como es el caso de los macrófagos (21). En efecto, esta proteína hace parte, junto con la integrasa, la matrix, la transcriptasa inversa, y ciertas proteínas celulares, del complejo de preintegración que importa al ADN neosintetizado hacia el núcleo (22). Además, la ausencia de Vpr en la partícula viral reduce la eficacia de infección de las células que no están en división, como los macrófagos (23). Es más, la proteína Vpr incorporada en el virión detiene el ciclo celular en el estadio G2, lo cual favorece la expresión de los genes dependientes del llamado Long Terminal Repeat (LTR) y en consecuencia la replicación viral en las células que entran en división. Otro efecto secundario a la acción del Vpr sobre el LTR es la transactivación debida a Tat (24, 25).

Por otro lado, la proteína Vpr puede ser un agente causal de la depleción de las células T CD4 mediante la inducción de apoptosis. Ha sido sugerido que Vpr actúa como un factor soluble secretado por las células infectadas que induce la muerte de las células no infectadas. Algunos estudios muestran que Vpr induce la permeabilización de la membrana mitocondrial con liberación de factores apoptóticos tales como citocromo c y el Factor de Inducción de Apoptosis (AIF). Vpr puede también actuar indirectamente sobre la mitocondria aumentando el

nivel de la caspasa 9 implicada en la cascada apoptótica (26). La permeabilización de la membrana mitocondrial es inducida por una interacción directa de Vpr con el Traslocador del Adenin nucleótido (ANT) (27, 28).

Proteína Vif

Esta proteína con un peso estimado de 23 kDa se requiere para mantener la infectividad de las partículas virales libres (29). No se ha observado que se requiera cuando la infección se da directamente entre células. La importancia de la presencia de Vif depende del tipo de célula en donde los virus son producidos, variando de células no permisivas o semi-permisivas hasta las células llamadas permisivas. Es posible que uno o varios factores al seno de las células permisivas puedan llevar a cabo el rol de Vif (30, 31). Los viriones que se producen en ausencia de Vif presentan alteraciones en su morfología y una disminución de las proteínas Gag y Pol. Lo anterior indica la importancia que juega esta proteína en las etapas de ensamblaje y/o maduración viral (32). Por otra parte, ha sido demostrado que los viriones que no expresan la proteína Vif, si bien ellos contienen cantidades normales de ARN viral, son incapaces de llevar a cabo la síntesis de ADN proviral luego de la infección de las células blanco. Este bloqueo de la síntesis proviral podría ser la consecuencia de un encapsidación anormal de la nucleocápside, afectando en consecuencia la decapsidación y/o la transcripción inversa (33).

Proteína Vpu

Vpu es una proteína de 16 KDa integral de membrana de tipo 1 sintetizada a partir de un ARN bicistrónico y dependiente de Rev. Este mismo ARN codifica también para la proteína de la envoltura viral. La proteína Vpu se encuentra exclusivamente en los virus VIH-1 y en el VIScpz, un aislado de chimpancé, y ningún gen similar ha sido encontrado en el VIH-2 ni en el VIS (34, 35). Esta proteína de 81 aminoácidos posee una región N-terminal transmembranal hidrofóbica y una región C-terminal citoplásmica hidrofílica (36). Esta última región posee dos estructuras en hélice α que tienen una importancia funcional (37). Vpu puede ser fosforilada por la caseína quinasa II a nivel de las serinas 52 y 56 (38).

Vpu posee dos fenotipos bien establecidos, los cuales tienen repercusiones muy importantes en la biología del VIH: inducción de la degradación de la molécula CD4 a nivel del (Retículo Endoplasmático (RE) y aumento de la salida viral a partir de la membrana plasmática de las células infectadas.

Degradación de la proteína CD4

El precursor de la envoltura, la poliproteína gp160, luego de su síntesis en el RE y antes de ser seccionada en las proteínas gp120 y gp41, es casi siempre retenida dentro de este organelo mediante interacción con la molécula CD4. La proteína Vpu induce la degradación de la molécula CD4 que se encuentra asociada a la poliproteína gp160 en el RE y de esta manera libera al gp160 para facilitar su transporte a la membrana celular y su incorporación en la partícula viral (35). Ha sido demostrado que Vpu puede inducir la degradación de CD4 incluso en ausencia de Env y de otras proteínas virales.

La degradación requiere la colocalización de CD4 y Vpu en el RE y exige la presencia de secuencias específicas localizadas en las dos moléculas. El análisis de mutantes de CD4 que presentan diferentes especificidades de unión a Vpu ha demostrado que la sensibilidad de degradación de CD4 depende de su capacidad de ligar a Vpu (39, 40). Ensayos de inmunoprecipitación han revelado que mutaciones que desestabilizan las estructuras en hélices α de CD4, localizadas en la región citoplásmica proximal a la membrana afectan la interacción CD4-Vpu (37). La estimulación de la degradación de CD4 parece requerir también la región transmembranal de CD4 (41).

Con respecto a Vpu, la región necesaria para unirse a CD4 e inducir su degradación se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína. Dos hélices α localizadas dentro de esta región son esenciales para la degradación de CD4 pero solamente la localizada en posición próxima a la membrana (hélice α I) está implicada en la interacción entre Vpu y CD4 (37). Por otra parte, proteínas mutantes en uno u otro de los dos sitios de fosforilación (Ser52 y/o Ser56) son incapaces de inducir la degradación de CD4 a pesar de que su capacidad de interactuar con la región citoplásmica de CD4 reste intacta (40, 37). Estos resultados sugieren que la interacción Vpu-CD4 es esencial pero no suficiente para inducir la degradación de CD4. Finalmente, ha sido propuesto que la inducción de la degradación de CD4 por Vpu requiere la participación de la vía citosólica ubiquitina-proteasoma ya que ella puede ser bloqueada por inhibidores del proteasoma (42). Margotin y colaboradores han propuesto un modelo para la degradación de CD4 basados sobre trabajos realizados por este grupo y sobre observaciones precedentes. La retención de CD4 dentro del RE, debida a la formación de complejos estables con el precursor gp160, permite la interacción de Vpu expresado dentro del RE con el dominio próximo a la membrana de la región citoplásmica de CD4. Vpu ligada a CD4 recluta a la proteína celular β TrCP hacia la membrana formando un complejo que a su vez recluta la proteína Skp1p, un factor de inducción hacia la proteólisis mediado por la ubiquitinación. La interacción con Skp1p conlleva la ubiquitinación y la degradación subsecuente de CD4 por la vía del proteasoma. β TrCP y Skp1p son, entonces, componentes importantes de una nueva vía de degradación asociada al RE e implicada en la proteólisis de CD4. Las secuencias de β TrCP implicadas en la interacción con Vpu y Skp1p son, respectivamente, los motivos denominados WD y F-box. La secuencia de Vpu requerida para la interacción con β TrCP comprende las fosfoserinas 52 y 56 (43).

La inducción de la degradación de CD4 por Vpu implica consecuencias importantes para la biología del Virus: trabajos realizados sugieren fuertemente que Vpu es capaz de aumentar la infectividad viral mediante disminución de la cantidad de CD4 expresada a nivel de la superficie de la célula infectada y/o incorporada dentro del virión. Esto favorecería la incorporación de Env dentro de la partícula viral (8). Sin embargo, trabajos realizados más recientemente en los cuales se sugiere un efecto positivo de la degradación de CD4 por Vpu sobre la infectividad viral reportaron no encontrar ninguna diferencia en la cantidad total de Env asociada al virión entre los virus que no expresan Vpu y los Vpu-positivos. Se indicó que la acumulación de CD4 a nivel de la superficie de la membrana celular y su reclutamiento dentro de viriones que no expresaban Vpu podría ejercer un efecto negativo sobre la

infectividad viral debido a que estimula la formación de complejos gp120-CD4 no funcionales en la superficie del virión. La degradación de CD4 liberaría a la glicoproteína Env de dichos complejos aumentando los niveles de glicoproteína Env funcional en la superficie del virión y por ende la infectividad (10).

Por otra parte, esta función de Vpu podría contrarrestar un efecto de inhibición de CD4 sobre la salida viral dependiente de Vpu. La inhibición de la salida viral por CD4, es la resultante de una disrupción de la estructura oligomérica de Vpu por parte de CD4 localizada en la superficie celular (44).

Aumento de la salida viral

Además de su rol en la degradación del receptor CD4, la molécula Vpu puede también estimular la salida viral a partir de las células infectadas. Una consecuencia bien conocida de esta función de Vpu es la reducción de los efectos citopáticos del virus, debido a una reducción de la tasa de formación de sincitia (45, 46). Si bien el dominio transmembranal de Vpu es considerado como el determinante principal del aumento de la salida viral, las bases moleculares para esta actividad son aún controvertidas. El aumento de la salida viral por parte de Vpu ha sido relacionado con su multimerización y con su capacidad de formar canales iónicos. Las primeras hipótesis están basadas en la analogía con la proteína M2 de del virus de la Influenza, la cual presenta una topología transmembranal similar. La proteína M2 del virus de la Influenza es el modelo de canal iónico de origen viral más estudiado (47, 48). Los estudios preliminares que muestran la formación de canales iónicos por parte de Vpu han sido efectuados *in vitro* mediante incorporación de la proteína purificada en bicapas lipídicas e *in vivo* mediante expresión en la *E. Coli*. En estos experimentos fue demostrado también que Vpu era capaz de formar canales selectivos para cationes tanto en las bicapas lipídicas como en la membrana plasmática de *E. Coli* (49). Experiencias paralelas con expresión de Vpu en oocitos de *Xenopus* han permitido obtener informaciones adicionales (50). De otra parte, la utilización de una proteína Vpu que contiene alteraciones en la secuencia correspondiente a la región transmembranal elimina su capacidad de aumentar la conducción, y un péptido correspondiente a esta región mostró una actividad de canal iónico (51). Además, estudios de simulación estructural fueron utilizados para determinar las configuraciones más probables adoptadas por las hélices transmembranales (52). Un modelo sugerido para la formación del canal iónico es la adopción de conformaciones en hélices α por parte del segmento transmembranal, que serán luego agrupados en hélices paralelas alrededor de un poro central (53). La asociación de la capacidad de Vpu para formar canales iónicos con su función de aumento de la salida viral está aún por confirmar. Es posible que Vpu o la interacción de Vpu con otros factores celulares asociados a la membrana ejerzan este efecto de una manera indirecta alterando el medio intracelular cerca de la membrana del retículo endoplásmico o de la vía de excreción (51). De otra parte, Vpu podría aumentar u orientar el ensamblaje de los componentes de la estructura viral dentro de microdominios de la membrana celular donde es optimizado el proceso de ensamblaje. Recientes evidencias indican que microdominios membranales resistentes a los detergentes, llamados balsas lipídicas, podrían actuar como puntos convergentes para la envoltura viral y la proteína Gag (54).

La acción de Vpu parece ser relativamente no específica, ya que Vpu es también capaz de promover la salida de otros retrovirus, además del VIH (36, 55). El aumento de la salida viral es un mecanismo que no requiere la presencia de Env ni de CD4. En cambio, este efecto es bloqueado cuando Vpu es retenido en el retículo endoplásmico. Estos resultados sugieren que las dos funciones biológicas de Vpu (inducción de la degradación de CD4 y aumento de la salida) son independientes y tienen lugar dentro de compartimientos diferentes de la célula (56, 38). De otra parte, ha sido demostrado que la función de la salida viral es dependiente de la línea celular utilizada (57) y del estatus de proliferación celular. De hecho, ha sido sugerido que una salida viral eficaz en células que no estén en crecimiento requieren la presencia de Vpu, mientras que en células en proliferación activa esta función de Vpu no es observada (58). En ensayos realizados por nosotros hemos determinado que el efecto de Vpu sobre la promoción de la salida viral no solamente es dependiente de la línea celular sino que puede ser diferente en clones celulares de stocks de células derivadas de la misma línea celular. En tres clones celulares derivados de la línea linfocitaria humana Jurkat observamos un efecto de Vpu diferente en cada uno de ellos, yendo de un efecto apenas observable hasta un incremento en más de tres veces en la producción viral, pasando por un fenotipo intermedio en el tercer clon estudiado (59). Finalmente, análisis estructurales y funcionales de la región transmembranal de Vpu demostraron que ésta contiene secuencias responsables del aumento de la salida viral (60).

De nuestra parte, hemos determinado la existencia de una interacción de tipo funcional entre la proteína Vpu y las señales de polarización/endocitosis localizadas en la región intracitoplasmática de la glicoproteína gp41 que determinan la salida basolateral del virus a partir de las células epiteliales infectadas y hacia un polo determinado en linfocitos infectados. Esta interacción es puesta en evidencia gracias a la modulación diferencial de la infectividad viral por la señal de polarización/endocitosis según la presencia o ausencia de Vpu. Esta modulación se manifiesta por un aumento de la infectividad viral por parte de Vpu en aquellos viriones que poseen una mutación en la señal de polarización/endocitosis. En aquellos virus que poseían la misma mutación pero que no expresaban Vpu no se observó este aumento de la infectividad comparados con el virus salvaje. El aumento de la infectividad se encontró asociado con un aumento de la incorporación de las glicoproteínas de la envoltura en los viriones (61).

En fin, muchas son las características y comportamientos de las proteínas accesorias del VIH-1 que aún no han sido dilucidadas y que merecen ser estudiadas más de cerca con el fin de utilizar esta información para dirigir esfuerzos en la implementación de terapias contra la progresión de la enfermedad.

Financiación

Universidad del Norte.

Intereses de conflicto

Ninguno

Referencias

1. Subbramanian R, y Cohen EA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.* 1994; 68:6831-6835.
2. Goldsmith MA, Warmerdam MT, Atchison RE, Miller MD, Greene WC. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement function of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol* 1995; 69:4112-4121.
3. Kestler III HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65:651-662.
4. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sidney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med* 1999; 340:1715-1722.
5. Mariani R, Skowronski J. CD4 downregulation by nef alleles isolated from HIV-1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90:5549-5553.
6. Mangasarian A, Trono D. The multifaceted role of HIV Nef. *Res. Virol* 1997; 148:30-33.
7. Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol* 1999; 9:622-631.
8. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of viral Nef protein. *Curr. Biol* 1999; 9:613-621.
9. Bresnahan PA, Yonemoto W, Ferrell S, Williams-Herman D, Geleziunas R, Greene WC. 1998. A dileucine motif in HIV- Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.* 5:1235-1238.
10. Greenberg M, DeTulleo L, Rapoport I, Skowronski J, Kirchhausen T. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr. Biol.* 1998; 5:1239-1242.
11. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76:853-864.
12. Levesque K, Zhao YS, Cohen ÉA. 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem.* 278:28346-28353.
13. Gratton S, Yao X-J, Sundararajan S, Cohen ÉA, Sékaly R-P. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4. Overlapping but noncompetitive requirement for Ick association and down-regulation by Nef. *J. Immunol* 1996; 157:3305-3311.
14. Saksela K, Cheng G, Baltimore D. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J* 1995; 14:484-491.
15. Olivetta E, Pugliese K, Bona R, D'Aloja P, Ferrantelli F, Santarcangelo AC, Mattia G, Verani P, Federico M. cis Expression of the F12 human immunodeficiency virus (HIV) Nef allele transforms the highly productive NL4-3 HIV type 1 to a replication-defective strain: involvement of both Env gp41 and CD4 intracytoplasmic tails. *J. Virol* 2000; 74:483-492.
16. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med* 1996; 2:338-342.
17. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391:397-401.
18. Stumptner-Cuvelette, Morchoisne PS, Dugast M, Le-Gall S, Raposo G, Schwartz O, Bena-roch P. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98:12144-12149.

19. Baur AS, Sawai ET, Dazin P, Fantl WJ, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* 1994; 1:373-384.
20. Finzi A, Cloutier J, Cohen ÉA. Two-step purification of His-tagged Nef protein in native condition using heparin and immobilized metal ion affinity chromatographies. *J. Virol* 2003; 111:69-73.
21. Paxton W, Connor RI, Landau NR. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol* 1993; 67:7229-7237.
22. Nie Z, Bergeron D, Subbramanian RA, Yao XJ, Checroune F, Rougeau N, Cohen ÉA. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol* 1998. 72:4104-4115.
23. Connors RI, Chen BK, Choe S, Landau NR. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 1995; 206:935-944.
24. He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrest cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol* 1995; 69:6705-6711.
25. Hrimech M, Yao XJ, Bachand F, Rougeau N, Cohen ÉA. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J. Virol* 1999; 73:4101-4109.
26. Yang JS, Moon HS. Role of HIV Vpr as a Regulator of Apoptosis and an Effector on By-stander Cells. *Mol Cells* 2006 ; 21: 7-20.
27. Sabbah EN, Druillennec S, Morellet N, Bouaziz S, Kroemer G, Roques BP. 2006. Interaction between the HIV-1 Protein Vpr and the Adenine Nucleotide Translocator. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67:145-54.
28. Deniaud A, Brenner C, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr. *Mitochondrion* 2004; 4:223-233.
29. Fan L, Peden K. 1992. Cell free transmission of vif-mutants of HIV-1. *Virology* 1992;190:19-29.
30. Fisher AG, Ensoli B, Ivanoff L, Chamberlain M, Petteway S, Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F. The *src* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 1987; 237:888-893.
31. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, Sodroski J. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol* 1992; 66:6489-6495.
32. Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K, Gabuzda D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994; 201:349-355.
33. Sova P, Volsky DJ. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and non permissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* 1993; 67:6322-6326.
34. Cohen ÉA, Terwilliger EF, Sodroski JG, Haseltine WA. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* 1998; 334:532-534.
35. Cohen ÉA, Subbramanian RA, Gottlinger HG. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214:219-235.
36. Maldarelli F, Chen MY, Willey RL, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu is an oligomeric type 1 integral membrane proteine. *J. Virol* 1996;67:5056-5061.
37. Tiganos E, Yao X-J, Friberg J, Daniel N, Cohen ÉA. Putative α -helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J. Virol* 1997; 71:4452-4460
38. Schubert U, Strebel K. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J. Virol* 1994;68:2260-2271.

39. Willey RL, BucklerWhite A, Strebel K. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J. Virol* 1994; 68:1207-1212.
40. Bour S, Schubert U, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol* 1995; 69:1510-1520.
41. Buonocore L, Turi TG, Crise B, Rose JK. Stimulation of heterologous protein degradation by the Vpu protein of HIV-1 requires the transmembrane and cytoplasmic domain of CD4. *Virology* 1994; 204:482-486.
42. Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orłowski M, Strebel K, Yewdell JW. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J. Virol* 1998; 72:2280-2288.
43. Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* 1998; 1:565-574.
44. Bour S, Perrin C, Strebel K. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J. Biol. Chem* 1999; 274:33800-33806.
45. Terwilliger EF, Cohen ÉA, Lu Y, Sodroski JG, Haseltine WA. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1998; 86:5163-5167.
46. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol* 1990. 64:621-629.
47. Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 1992; 69:517-528.
48. Wang C, Lamb RA, Pinto LH. Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. *Virology* 1994; 205:133-140.
49. Ewart GD, Shuterland T, Gage PW, Cox GB. The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J. Virol* 1996; 70:7108-7115.
50. Coady MJ, Daniel NG, Tiganos E, Allain B, Friberg J, Lapointe J-Y, Cohen ÉA. Effects of Vpu on *Xenopus* oocyte membrane conductance. *Virology* 1998; 244:39-49.
51. Schubert U, Ferrier-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1 infected cells. *FEBS Letters* 1996; 398:12-18.
52. Fisher WB, Forrest LR, Smith GR, Sansom MSP. Transmembrane domains of viral ion channel proteins: a molecular dynamics simulation study. *Biopolymers* 2000; 53:529-538.
53. Grice AL, Kerr ID, Sansom MSP. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study. *FEBS Letters* 1997; 405:299-304.
54. Pickl WF, Pimentel-Muñíos FX, Seed B. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol* 2001; 75:7175-7183.
55. Göttlinger HG, Dorfman T, Cohen ÉA, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus type 1 enhances the production of capsids from widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1993; 90:7381-7385.
56. Yao XJ, Göttlinger H, Haseltine WA, Cohen ÉA. Envelope glycoprotein y CD4 independence of *vpu*-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol* 1992; 66:5119-5126.
57. Sakai H, Tokunaga K, Kawamura M, Adachi A. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J. Gen. Virol* 1995; 76:2717-2722.
58. Deora A, Ratner L. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of Human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J. Virol* 2001. 75:6714-6718.

59. Cervantes-Acosta G, Cohen ÉA, Lemay G. Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication. *J Virol Meth* 2001; 92:207-213.
60. Tiganos E, Friborg J, Allain B, Daniel NG, Yao X-J, Cohen ÉA. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology* 1998; 251:96-107.
61. Cervantes-Acosta G, Lodge R, Lemay G, Cohen ÉA. Influence of Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis /polarization signal on viral accessory proteins functions. *J Human Virol* 2001; 4:249-259.