

장기간 진행하지 않는 인면역결핍바이러스 (Human Immunodeficiency Virus, HIV)-1 감염자로부터 분리한 HIV-1의 전체 염기서열 결정

울산의대 미생물학교실, 하바드의대¹, New England Regional Primate Research Center

조영걸* · 이희정 · Ronald C. Desrosiers¹

=Abstract=

Complete Sequences of HIV-1 in a Korean Long-term Nonprogressor with HIV-1 Infection

Young-Keol Cho*, Hee-Jung Lee, Ronald C. Desrosiers¹

*Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine,
Division of Microbiology and Molecular Genetics¹, New England Regional
Primate Research Center, Harvard Medical School*

To characterize the molecular nature of human immunodeficiency virus (HIV)-1, we determined the full-length HIV-1 sequences from cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a Korean long-term nonprogressor (LTNP). Without antiretroviral therapy, the individual has maintained CD4+ T counts over 500/μl from 1989 to 1999. Plasma viral RNA copy was 992 U/ml in 1998. Culture supernatant showed positive from culture days 9. A series of 9 overlapping PCR products were amplified from cultured PBMC and cloned. About 9.2 kb from R of 5' LTR to R of 3' LTR was determined by automated sequencing. The G-to-A hypermutations were shown throughout the entire region. As a result of G to A hypermutations, premature stop codon was found in integrase coding region. Though there was no recombination between subtypes over all genomes, TATA box in both LTRs was TAAAA which is detected in subtype E instead of TATAA in subtype B. And, there were nucleotide GC insertion between NF-κB I and Sp1 III, and duplication of TCF-1α in LTR. We could not find any deletion of amino acid in *Nef*, *Gag*, *Pol* and *Env* gene. This study is the first report on molecular nature of full genomes of HIV-1 isolated in Korea.

Key Words: HIV-1, Complete sequences, Long-term nonprogressor

서 론

HIV-1 감염자의 대부분은 감염 후 10년 이내에 각종 2차 감염증이나 암 발생을 동반하는 AIDS

환자로 진행되지만 일부는 장기간 동안 증세없이 지낸다. 대부분의 장기간 무증상 생존자 (long-term asymptomatic survivor)는 실제로 CD4+ T 림프구의 감소를 동반하면서 질환의 진행을 보인다. 그러나 아주 드물게 일부에서는 지도부턴 (zido-

접수 : 1999년 5월 25일

* 책임저자명 및 연락처: 조영걸, 서울시 송파구 풍납동 388-1 울산의대 미생물학교실 전화 및 팩스: 02)2224-4283, E-mail: ykcho2@www.amc.seoul.kr

vudine, ZDV) 같은 anti-retroviral agents로 치료를 받지 않고도 증세가 나타나지 않을 뿐만 아니라 CD4+ T 림프구의 수도 일정하게 유지된다 [9, 18]. 이와 같은 감염자들을 장기간 비진행자 (long-term nonprogressor, LTNP) 혹은 장기간 생존자 (long-term survivors, LTS)라 한다. 이러한 LTNP에 대한 구체적인 정의는 없으나 대체로 치료를 받지 않고서 HIV 감염 후 10년 이상 CD4+ T 세포 수가 500/μl 이상을 유지하는 경우를 말하며 전체 감염자의 약 5%가 이와 같은 경과를 보여준다 [1]. 이와 같은 LTNP에 대한 연구는 HIV-1 감염이 어떻게 조절될 수 있을 지를 이해하는 데 큰 도움이 될 수 있다. 따라서 최근 이 분야에 대한 연구가 임상적으로 가장 관심을 갖게 하는 분야의 하나이다.

이러한 비진행 (nonprogression)은 바이러스측 인자, 숙주측 인자 혹은 이들 두 인자의 상호작용으로 결정되는 것으로 추정된다. 특히 숙주측 요인으로는 HIV coreceptor의 하나인 CCR5에서의 32 base pair deletion 유무 [21, 22], 숙주세포의 HIV-1에 대한 감수성 혹은 HLA type에 따른 면역 반응 유발능이 관련이 있는 것으로 최근 보고되고 있다 [2]. 바이러스측 요인으로는 바이러스의 초기 증식에 필수적인 역할을 하는 *Nef* gene의 역할이 중요하게 거론되고 있으며 [16] 실제 LTNP의 극히 일부에서 이 유전자에 gross deletion이 있는 것으로 보고되었다 [9, 18, 20, 25]. 국내에서는 아직 일부 감염자에 대한 *Env*와 *Nef*에 대한 염기서열이 [7, 15, 17] 보고되어 있는 상태이다. 본 연구에서는 LTNP의 특성을 이해하기 위해 처음으로 HIV-1 전체 유전자의 염기서열을 결정하였으며 이러한 자료는 국내 HIV-1의 생물학 (biology)을 이해하는 데 뿐만 아니라 앞으로의 백신개발의 기초자료로써 활용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1. 감염자

1991년 5월 현재 30세였던 감염자는 헌혈을 통해 HIV-1 감염자로 진단되었다. 또한 역학조사상이 감염자가 1989년 10월 헌혈한 혈액을 수혈받은 2명이 모두 HIV-1에 감염된 것이 확인되었다. 그리고 1988년 6월 고열, 오한 및 발한 등으로 일주간 종합병원에 입원한 적이 있어 그 때가 초도 감염시기 (primary HIV infection)였을 것으로 추정

된다. 또한 외국 여행이나 외국인과의 성접촉 경험도 없으므로 국내에서 이성간 성접촉을 통해 감염된 것으로 판단된다. CD4 세포수 측정은 진단 후 매 6개월마다 전회 [4]에서처럼 실시되었으며 1999년 5월 현재 621/μl이다 (Figure 1). 본 연구 대상 감염자는 고려홍삼 분말 (한국담배인삼공사)을 1991년 12월부터 연구 대상으로 선정되어 하루 5.4 g씩 복용하였다 [5]. 총 4,296 g을 제공하였으며 환자 본인이 일 년 이상 사서 복용하였다. 기타 건강식품으로 달팽이 엑기스 (4개월), 녹용 (1개월), 표고균사체 (mycelia)추출물 및 키토산 (12개월) 등을 복용하였으나 ZDV를 포함한 anti-retroviral agents는 복용하지 않았다.

2. 혈장 Viral load의 정량과 HIV-1 배양 분리

혈청에서 ELISA방법으로 immune complex dissociated(ICD) p24 항원 농도는 계속 음성이었다. 따라서 Amplicor HIV-1 Monitor test (Roche Diagnostic Systems, NJ, USA)를 사용하여 제조사의 사용 지침대로 실시하였다. 바이러스 배양은 정상인의 말초혈액단핵구 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 분리하여 RPMI 1640 배지에 10% 우태혈청 (fetal calf serum, FCS)를 첨가하여 PHA aliquot (100 μl)를 9.9 ml의 배지에 1:100으로 희석하여 10⁶개당 1 ml의 배지를 넣어 37°C에서 24시간 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후 DynaBeads M-450 CD8 (Dyna, Norway)를 사용하여 공혈자의 CD8+ T cells을 제거하고 약 5 ml 전혈로부터 분리한 감염자의 PBMC와 함께 배양하였다. 배양은 10% FCS가 포함된 RPMI 1640 배지에 IL-2와 glutamine, penicillin과 streptomycin을 첨가하였으며 일주일에 2회 배지를 완전히 교환하면서 상청액에 대해 p24 항원을 측정하여 배양유무를 확인하였다.

3. Genomic DNA preparation

1.5 ml microcentrifuge tube에 든 세포를 녹인 후 약 20초간 spin down하여 상청액을 파이펫으로 버리고 cell pellet을 lysis buffer 500 μl (100 mM Tris 50 μl, 1 M NaCl 200 μl, 100 mM EDTA 10 μl, 및 H₂O 240 μl)에 resuspend한다. 10% SDS 33 μl을 첨가하고 10 mg/ml proteinase K 8.3 μl을 tapping하여 섞은 후, 56°C에 1시간 반 incubate 한다. Saturated NaCl 160 μl을 첨가한 후 15분간 spin down한 후 상청액을 다른 튜브에 옮긴다. Isopropanol

700 μ l을 첨가한 후 5분간 spin한 후 상청액을 버리고 70% 에탄올 800~900 μ l에 1분간 incubate한 후 1분간 spin, 에탄올을 최대한 제거한다. 한 시간 동안 후드에서 말린 후 179 μ l의 증류수를 첨가한 후 실온에서 하룻밤 반응시킨다. T4 DNA ligase (BioLab) 1 μ l와 10x reaction buffer 20 μ l을 넣은 후 1시간 반응시킨다. 그리고 -20 $^{\circ}$ C freezer에 보관한다.

4. Polymerase chain reaction (PCR)

전체 genomes 9.6 kilobases (kb)를 전후 약 200 bases가 증첩되게 1.2 kb짜리 8개와 3.2 kb 1개 모두 9조각의 PCR 산물을 얻었다. 구체적으로는 primer의 끝에 EcoR I restriction site를 넣어 primer를 설계하였다 (Table 1). PCR은 hot start로 80 $^{\circ}$ C에서

시작하여 94 $^{\circ}$ C에서 5초, 70 $^{\circ}$ C에서 1초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분 15초로 75회 반복하였다. 반응은 315 μ l의 H₂O, 180 μ l의 3.3 X XL Buffer II, 48 μ l의 10 mM NTPs (Perkin Elmer Applied Biosystems, NJ, USA), 4.5 μ l의 rTth DNA polymerase, XL (PE)를 premix를 만들어 3개의 튜브에 185 μ l씩 나눈 후 primer pair를 4 μ l씩 넣는다. 10 μ l의 DNA를 넣고 1분간 preheat한 후 8 μ l의 25 mM Mg (OAc)₂와 60 μ l의 mineral oil을 첨가한 후 신속히 heat block으로 옮겼다가 PCR machine으로 옮긴다.

5. Cloning and transformation

PCR 산물 50 μ l을 전기영동하여 single band만을 잘라서 1.5 ml 튜브에 넣고 7 M Guanidine thiocyanate salt (600 μ l, Sigma)와 함께 37 $^{\circ}$ C 수조에서

Table 1. Primer list for PCR amplification

Primers	(5' -> 3') Sequences	Location ^a
CE1	gcgcGAATTCcgagagctgcatccggagtacta	297-319
CE2	gcgcGAATTCtctgcagcttctcattgatggtc	1398-1421
CE3	gcgcGAATTCccaggtcagccaaaattaccctat	1167-1190
CE4	gcgcGAATTCacagtcctgtctatcggctcct	2216-2239
CE5	gcgcGAATTCaaaaattgcaggcccttagga	1997-2017
CE6	gcgcGAATTCcccatccaaaggaatggaggttct	3202-3225
CE7	gcgcGAATTCggatggaaggatcaccagcaata	3003-3026
CE8	gcgcGAATTCtacttctaattcccgaatcctgca	4006-4029
CE9	gcgcGAATTCaataccctcccttagtgaagtta	3801-3824
CE10	gcgcGAATTCccccctgcactgtacc	4806-4822
CE11	gcgcGAATTCctacggttaaggcccgctgtt	4599-4620
CE12	gcgcGAATTCcagtttctaactactagg	5530-5547
CE13	gcgcGAATTCgatatagcacacaagtagacc	5318-5338
CE14	gcgcGAATTCcttcactctcattgccact	6214-6232
CE15	gcgcGAATTCaagcggagacagcgacgaa	5980-5998
CE16	gcgcGAATTCtgccatttaacagcagttgagttg	6981-7004
CE17	gcgcGAATTCtgaacacctcagtcattacacag	6800-6823
CE18	gcgcGAATTCgtctggcctgtaccgtcagcgtca	7818-7841
CE19	gcgcGAATTCcttcagacctggaggaggagatat	7615-7638
CE20	gcgcGAATTCtcttttagttcctgactccaatac	8617-8640
CE21	gcgcGAATTCgacttactcttgattgaacagga	8531-8555
CE22	gcgcGAATTCacttgaagcactcaaggcaagct	9607-9629

Location^a based on HIV-1 NL43; GAATTC, EcoR I site

녹인 후 1000 μ l의 Wizard miniprep resin을 사용하여 정제한 후 증류수 50 μ l로 용출한다. 용출된 DNA 25 μ l를 EcoR I (2 μ l)으로 (total 30 μ l) 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다. Wizard miniprep을 이용하여 200 μ l resin으로 binding한 후 증류수 22 μ l로 elution한다. Elution된 20 μ l DNA를 EcoR I/BAP+ Ligase; Ready To Go kit (RTG) tube에 넣어 실온에서 5분간 방치하였다가 잘 mix한 후 quick spin하고 16 $^{\circ}$ C 수조에서 45분간 ligate한다. Ligate 2 μ l를 30 μ l의 Epicurian Coli XL2-blue MRF⁺ ultracompetent cells (Stratagene)에 넣어 15분간 얼음 위에 방치한 후, 42 $^{\circ}$ C에서 45초간 heat shock을 가한 후, 5분간 얼음 위에 둔다. Transformed bacteria를 X-gal이 든 Luria agar plates에 도말한다. 37 $^{\circ}$ C incubator에 overnight한 후 흰색 colony를 취해 15 ml tube에 LB를 2.0 ml 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양한다.

6. Sequencing reaction

1.2 kb PCR 산물당 3~4조의 internal primer pairs를 이용하여 서로 중첩된 PCR 산물을 얻을 수 있게 제작하였다. Sequence를 위한 PCR 반응은 시약 회사의 지침을 따랐다. Primer 1 μ l, DNA 5 μ l, H₂O 6 μ l 및 AmpliTaq DNA polymerase 8 μ l (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystems)로 20 μ l reaction을 실시한 후 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분으로 25 cycles의 PCR을 실시하였다. ABI 377 automatic sequencer를 이용하였다.

7. CCR 5 receptor genotyping and sequencing

CCR5A: GCGCGAATTCCCAAAAAGAAGGTC-TTCATTACACC, CCR5B: GCGCGAATTCCCCT-GTGCCTCTTCTCATTTTCG를 이용하여 처음 5회 PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1.5분 실시하였다. 그리고 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 40회 PCR을 실시하였다 [12]. PCR reaction은 위의 HIV-1 sequencing을 위한 것과 동일하게 하였다.

8. 염기서열 상동성 비교

각 유전자별로 상동성을 PHYLIP program (Ver. 3.5)으로 비교하였다.

결 과

CD4 T 세포가 처음 측정되기 시작한 1991년부터 1999년 5월까지 CD4+ T세포 (25.9%)수는 624/ μ l으로 500/ μ L 이상을 일정하게 유지하고 있다 (Figure 1). Plasma RNA copy수는 1997년 7월과 1998년 4월에 각각 5,825 copies/ml와 992 copies/ml였다. 바이러스 배양은 1997년 7월 PBMC로 실시하였다. 배양 9일째부터 상청액에서 p24 antigen (0.36 ng/ml)을 탐지할 수 있었으며 배양 19일째 68.5 ng/ml로 증가하여 배양을 중단하고 원심 분리하여 세포를 회수하여 genomic DNA를 extract하였다. Full-length of HIV-1 DNA sequence (pNL43기준으로 position 454부터 9629까지 9.2 kb)가 9개의 PCR products에 의해 결정되었다 (HIV-1_{wk}). 전체 염기서열은 HIV-1 NL43를 기준으로 동일한 base는 소문자로 다른 base는 대문자로 표기하였다 (Figure 2). Gag가 base pair (bp) 790-2292까지 1503 bp (501개의 아미노산; 501aa)이고 Pol은 bp 2085-5096 (1004aa)였다. Protease는 bp 2253-2550까지 (99aa), reverse transcriptase (RT)는 bp 2551-4230 (560aa)이고 integrase는 bp 4231-5096 (288aa)로 NL 43와 동일한 것수였다.

1. 특징적인 염기서열

염기서열의 특징은 5' LTR과 3' LTR을 포함한 전체 sequences에서 NL43기준으로 G가 A로 바뀐 곳이 123곳 중 117곳 (95.1%)으로 소위 G-to-A hypermutation이 있었다. 이로 인해 integrase의 central catalytic domain를 coding하는 bp 4624번재의 TGG가 TAG로 바뀌어 premature stop codon이었다. 5' LTR과 3' LTR의 TATA box의 가운데 T가 A로 바뀌어 TAAAA였다 (Figure 3). 그리고 Nef stop codon 바로 다음 부위인 TCF-1 α 의 duplication으로 21개의 bases (bp 9417-9437 of Figure 2)가 insertion되어 있었으며 NF- κ B I 바로 다음 부위에 GC가 삽입 (insertion)되어 있었다 (Figure 3). Tat-response region (TAR-region)에는 5개의 nucleotides CTGGG (bp 9558-9562)를 포함하는 stem loop가 있으며 염기서열에 있어서 NL-43와 차이가 없었다 (Figure 2).

2. 상동성 비교

표준주 NL43와의 상동성 (homology) 비교에서

Long-Term Nonprogressor with KRG

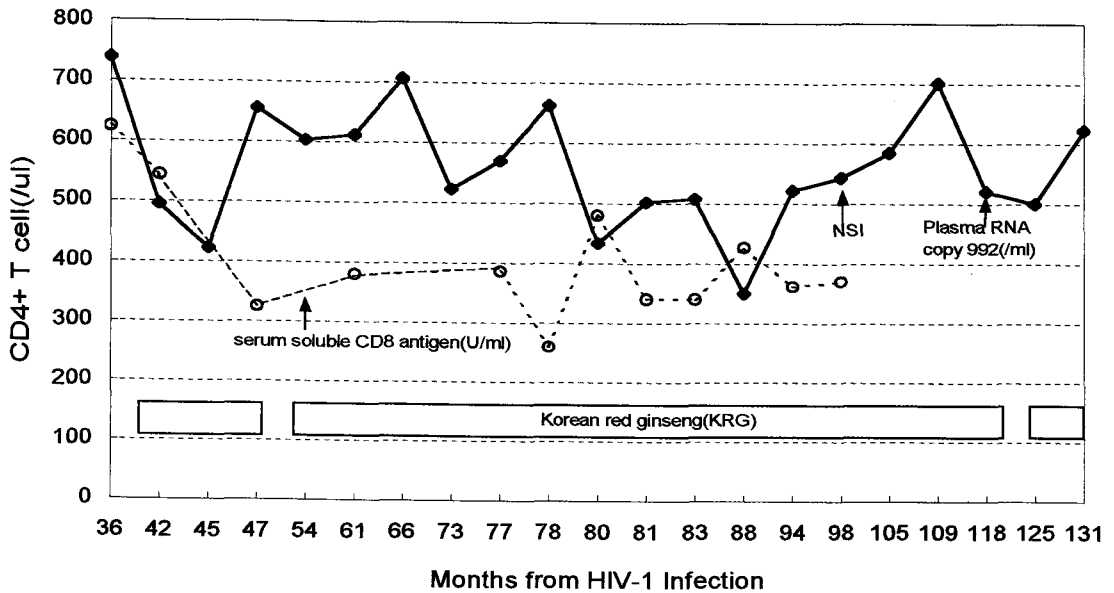


Figure 1. A long-term nonprogressor with HIV-1 infection. Patient had an admission history for fever, chill, and sweat in 1988. However, at that time he was not tested for HIV seropositive. He has taken Korean red ginseng (KRG, daily 5.4 gram) since December 1991. The level of serum soluble CD8 antigen during the intake of KRG was suppressed for prolonged period. Blood sampled at months 118 was positive for ICD p24 antigen from culture days 9. The biological nature of the virus was nonsyncytium inducing type (NSI). Plasma RNA copy number were 5825/ml and 998/ml at months 109 and 118, respectively.

세 개의 구조 유전자 중 *Gag*와 *Pol*은 상대적으로 높은 95.7%와 96.7%의 상동성을 보였으나 *Env*는 81.6%의 낮은 상동성을 보였다. 구체적으로 *Gag* 유전자는 뉴클레오타이드 수준에서 subtype B인 HIV-1 NL43, NY5, LAI, HAN, SF2 및 MN와 각각 95.7%, 95.7%, 94.5%, 93.5%, 95.5% 및 93.2%의 상동성을 보였고, 아미노산 수준에서는 NL43와 약 93.4%의 상동성을 보였다. *Pol* 유전자는 nucleotides 수준에서 NL43, NY5, LAI, SF2, MN, HXB2R, and Consensus-B와 각각 96.5%, 96.2%, 96.0%, 95.9%, 95.6%, 96.3% 및 97.5%의 상동성을 보였고 아미노산 수준에서 NL43와 약 97.7% (차이23/1003)의 상동성을 보였다. *Env*는 NL43와는 81.6%, SF2와는 69.6%의 상동성을 보였다 (Table 2).

3. Deletion과 addition 비교

NL43와 비교하여 아미노산의 결손 (deletion)이나 추가 (addition)는 *Gag*, *Pol*, *Vif*, *Vpr*, *Tat*, *Rev* 및 *Nef* 유전자에서는 없었고 *Env*와 *Vpu*에서만 있었다. *Env*에서는 본 LTNP의 경우 4군데의 결손과

5군데의 추가가 있었다. 추가된 부위는 C1 region 시작부위의 bp 6233-6241 (아미노산 GIR)의 9개, bp 6665-6698까지 33개, bp 7184-7186까지 3개, bp 7400-7405 (아미노산 QR)까지 6개 및 bp 7610-7618 (아미노산 NGT)까지 9개로 총 60개였다. 결손된 부위는 bp 6262-6273 (아미노산 WKWG) 12개를 포함하여 총 27개였다. *Vpu*에서는 bp 6074-6076번째와 *Env*의 시작부위에 해당하는 bp 6235-6243까지의 추가가 있었고 *Env*와 겹치는 부위인 반복되는 6262-6273 (아미노산 VEMG)이 결손되어 있었다.

4. CCR 5

HIV coreceptor인 CCR5의 32 base pair의 결손이 없는 wild type였다.

고 찰

HIV-1 감염자 중 LTNP 감염자에서 분리된 바이러스의 *Nef* 유전자가 일부 결손되었다는 보고

조영걸 등: HIV-1 전체 염기서열

```

454          |----- R
          |----- U5
521 agcctcaata aagcttgcc t gagtgtctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggttaacta gagatccctc
601 agaccAtttt agtcagtggt gaaaatctct agcagtggtg cccgaacagg gacttgaaaA cgaagtaGa AccGgaggag
681 Ctctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat
          |----- GAG
761 ttgactagc ggaggctaga aggagagaga tgggtgagc agcgtcAAta ttaagcgggg gagaattaga tCaatgggaa
841 aaaattcggg taagccagg Aggaaagaaa AaatataGGT taaacatCt agtatgggca agcagggagc tagaaAgGtt
921 cgcagttaat cctggcctGt tagaAacatc agaaggTgt agacaaataT tgggacagc acaaccatcc cttcagacag
1001 gatcagaaga acttaAatca ttatTtaatG caGtagcagt cctctattgt gtAcatcaaa ggatagaGAT aaaagacacc
1081 aaggaagcTt tagaGaaAat agaggaagag caaaGcaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa gcaAcagctg acacaggaaG
1161 caGcagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac cttcaggggc aatggtaca tcagCccata tcacctagaa
1241 ctttaaagc aCgggtaaaa gtaAtagaag agaaggctt cagcccagaG gtaataccca tgtttcagc attatcagaa
1321 ggGgcccccc cacaagattt aaaCaccatg Ttaaacacag tggggggaca tcaagcagcT atgcaaatgt taaagagac
1401 catcaatgag gaagctgcag aCtgggatag attgcatcca gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac
1481 caaggggag tgacatagca ggaactacta gtacccttca ggaacaaaata ggatggatga caAataatcc acctatccca
1561 gtaggagaaa tctataaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat agccctGcca gcattctgga
1641 cataagcaaa ggaccaaagg aaccctttag agcatatgta gaccgGttct ataaaactct aagagccgag caagcGtcac
1721 aGgaggtaaa aaatgggatg acagaaacct tgttggcca aaatgcAaac ccTgattgta agactatttt aaaagcattg
1801 ggaccaggag cTactactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg AggaccAgc cataaagcaa gagttttggc
1881 tgaagcaatg agccaagCaa caaatCtag Caccataatg atGcagaGag gcaattCag gaaccaaaga aGgactgtta
1961 agtgtttcaa ttgtggcaaa gaagggcaca tagccaaaaa ttgagggcc cctaggaaaa agggAtgttg gaaatgtgga
          |----- POL
2041 aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg cCaatttttt agggaagatc tggccttccc acaaggggag
2121 gccaggggat ttCcttcaga gcagaccaga gccatCagcc ccGccagaag agagcttcag gttgggggaa gagacaacaa
2201 ctcccttca gaagcaggag ccAatagaca aggaactgta tccttagct tcctcagat cactctttgg caAcgacccc
          |----- GAG
2281 tcgtGcaat aaagataggg gggcaaCtaa aggaagctct attagataga ggagcagatg atacagtatt agaagaaatg
2361 aGtttAccag gGagatggaa accaaaaatg atagggggaa ttggaggtt tatcaaagta Agacagtatg atcagGtaGC
2441 catagaaatc tgTggacata aagctatagg tacagtatta Ataggaccta cacctgtcaa cataattgga agaactctgt
2521 tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgaAact gtaccagtaa aattaaagcc aggaatggat
2601 ggTccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa taaaGcatt agtagaatt tgtacagaaa tggaaaagga
2681 aggaaaaatt tcaaaaatg ggcctgaaaa tccataTaGt actccagtat ttgcTataaa gaaaaaagac agtactaat
2761 ggagaaaatt agtagattc agagaactta ataagagaac tcaagattc tgggaagttc aattaggaat accacatCCA
2841 gcaggggtaa aaAagaaaaa atcagtaaca gtactggatg tgggTgatgc atattttca gttcccttag atGaGgactt
2921 cagAaagtat actgcattta ccataacctag taCaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttccac
3001 agggGtggaagg aggatcGcca gcGatattcc aAGgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt ttagaaaaaca aaatccagac
3081 atagtTatct atcaatacat ggatgatttA tatgtaggat ctgacttaga aataggAcag catagaaTaa aaatagagga
3161 actgagacaa catctgttga ggtggggGtt taccacacca gacaaaaaac atcagaagaa Gcctccattc ctttggatgg
3241 gttatgaact ccatctgat aaatggacag tacagcctat agtgcTAcca gaaaaAgaTa gctggactgt caatgacata
3321 cagaaGttag tgggaaaaCt gaattgggca agtcagattt atgcaggCat taagtaaAg caattatgta aactCcttag
3401 ggaaccaaG gcactaacag aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gaAatcttaa
3481 aagaaccAgc acatggagtg tattatgacc caGcaaaaaga cttaatagca gaGatacaga agcaggggca aggccaatgg
3561 acatatcaaa tttatcaaga gccatttaa aatctAaaaa caggaaaaata tgcaagaatg aGgggtgccc acactaatga

```

Figure 2. Complete sequences of HIV-1 in a Korean long-term nonprogressor with HIV-1 infection. Sequences are shown from R of 5' LTR to R of 3' LTR. The numbering of nucleotides is shown for the sequence of HIV-1 NL43. The different sequences compared to HIV-1 NL43 are shown with capital letter. And, dashes and tilted letters mean deletion and insertion, respectively. Bold letter means start or start codon of each gene.

Figure 2. Continued

3641 tgtAaaacaa ttaacagagg cTgtGcaaaa aGtagccaTa gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaaaC
 3721 taccataca aaaAgaaca tgggaagcat ggtagcaga gtattggcaa gccacTtggg ttcctgagtg ggagtttgc
 3801 aataccctc ccttagtgaa gttatggtac cagtagaga aagaacccat aGtaggagca gaaactttct atgtagatgg
 3881 ggcagcTaat agggaaacta aattagggaa agcaggatat gtTactgaca gaggaagaca aaaGgttgc ccctaacgg
 3961 acacaacaaa tcAgaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcAggat tagaagtaaa catagtAaca
 4041 gactcacaat atgcattAgg aatcattcaa gcacaaccag ataaAagtga atcagagtta gtcagCcaaa taatCgagca
 4121 gttaataaaa aeggaaaaGg tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagatAAAA
 4201 tAgtcagtg tggaaacagg aaagtactGt **ttCtagatgg** aatagataag gcccagaag aGcatgaAaa atatcacagt
 4281 aattggagag caatggctGg tgattttaac ctGccacctg tGtagcaaa agaaatagta gccTgctgtg ataaatgtca
 4361 gctaaaaggA gaagccatgc atggacaagt agactgtagT ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa
 4441 aagttatCt ggtagcagtt catgtagcca gtggatata agaagcagaa gtTattccag cagagacagg gcaGgaacaa
 4521 gcatactTc tcttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa aaacaAtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtaA
 4601 tacagttaag gccgcctgtt **ggTAggcgAg** gatcaagcag gaatttggca ttcctacaa tccccaaagt caaggagtaG
 T V K A A C W Z A R I K Q E F G I P Y N P Q S Q G V
 4681 tagaatctat gaataagaa ttaaagaaa ttataggaca ggtaagagat caAgctgaac atcttaagac agcagtacaa
 4761 atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga ttgggggta cagtgCaggg gaaagGataA tagacataat
 4841 agcaacagac atacaGacCa aagaaCtaca aaaacaaGtt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca
 4921 gagatccaCt ttgaaagga ccagcaaac tTctctggaa aggtgaaggg gcagtagtGa tacaagataa tagtgacata
 5001 aaagtagtgc caagaagaaa agcaaaagtc atTagggatt **atggaaaaca** gatggcaggt gatgattgtg tggcaagta **VIF**
 POL _____
 5081 acaggatgag gattaaAaca tggaaaagTt tagtaaaaca ccatatgtat atttcaaAga aagctaagga AtggGtCtat
 5161 agacatcact atgaaagCac tAtccaaGa ataagttcag aagtacacat ccactaggg gatgctaata tagtaataac
 5241 aacatattgg ggtctgcata caggagaaaag agaAtggcat Ctgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat
 5321 ataATacaca agtagaccct gacctagcag acAaactaat CcaCctgcaT tattttgatt gttttcaga Ctctgtata
 5401 agaCatGcca tattaggacA taGagttagG cctaAgtgtg aatatcaagc aggacataac aaggtaggGt ctctacagta
 VPR _____
 5481 cttggcacta Acagcattaa taaCaccaa aAagataaag ccacctttgc ctagtgttag gaaactAaca gaggaTagat
 VIF _____
 5541 ggaacaagcc ccagaagacc aagggccaca gaggagcca tacaatgaat ggacactaga gctCtCagag gaacttaaga
 5641 gtgaagctgt tagacatttt cctaggCCat ggctccataG cttaggacaa catatctatg aaacttaTgg ggatacttgg
 5721 AcaggagtAg aagccataat aagaattctg caacaactgc tgtttatTca tttcagaatt ggAtgtcACc atagcagGTt
 VPR _____ TAT _____
 5801 agcAttaTt cgacagagga gagcaagGaa **tgagccagt** agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag
 5881 cctaaGactC cttgtaccaa Atgctattgt aaaaagtgtt gcCttcattg TcaagtttgC tcatgacaa aagGcttagg
 5961 catAtcctat **ggcaggaaga** agcggagaca ggcaggaaga gctcCttagG acaAtAagaA tcatcaagTt tctctatcaa
 TAT/REV _____ VPU _____
 6041 **agcagtaagt** aAtacGtgtG **atgcaacTtT** taGCAAtaTt agcaatagta gGattagtag tagcaGCaat aTtagcaata
 6118 gttgtgtggt TcatagtaTt catagaatat aAgaaaatat taaAacaaaA aaaaatagac aggttaattg atagaAtaaG
 6198 aga _____ ENV _____
 6201 aagagcagaa gacagtggca **atgagagtga** agGGATCAG gaagAatTAT cagcactGgt ggagatgggg -----
 VPU _____
 6274 --caTcatgc tccttgggat GtGgatgac **tgtagtctG** cagaaaaatt gtgggtcaca gtctattatg ggttacctgt
 6352 gtgaaAGaa gcaaccacca cCtattCtg tgcatacagC gctaaagcat atgaCacaga ggtacataat gtttggcca
 6432 cacatgccctg tgtaccataTa gacccaacc cacaagaagt aTtTtggAa aatgtgacag aaaaatttaa catgtggaaa
 6512 aatAacatgg tagaacagat catgaggat ataatcagtt tatgggatca aagcctaagc ccatgtgtaa aaCtaacTcc
 6592 actctgtgtt aCtttaaagt gcactgattt g---aatgat actaatacca ataAtagtag TACTTCGGAA aATAACTACTA
 ATCCACTAT TAGTGGTGGG GAAGGAtg GgGaaggaga gatGaaaaac tgcctttca atGtTaCcac aaAcataaga
 6719 gataaggtgc agaaagaata tgcTtTttC tataaacttg atataAtacc aatagataat acAagctatG CATtgaGaCA
 6799 ttgtaacacc tcagtcatta cacaggctg tccaaagta tcctttgaAc caattcccat acattattgt gccccgctg

Figure 2. Continued

```

6879 gttttgcat tctaCaatgt aatGataaga Agttcaatgg aacaggacca tgtTcaaatg tcagcacagt acaatgtaca
6959 catggaatTa ggccagtagt atcaactcaa ctgctgtaa atggcagtct agcagaagaa gaGAtagtaC ttagatctgA
7039 Aaatttcaca Aacaatgcta aaaccataat agtacagctg aaTGcatctg tagaaattaa ttgtacaaga cTcaacaaca
7119 atacaagGaa aagtatAAGg atA-----g gaccaggAag cacttttAtG caaCaggaGC CataATAgga GatatAaga
      N T R K S I R I      G P G S T F Y A T G A I I G D I R
7196 caagcacatt gtaacattag tagagAaaaa tggaaatGaca ctttaaaaca gCtagTtaTA aaattaGgag aGcaatttgg
7276 GaataGtaac ---aTaataG tctttaaAca atcctcagga ggggacccag aGattgtaaT gcacagtttt aTttgtggag
7353 ggggGttttt ctactgtaat Acaacacaac tgtCtaatag tactttggCAG AGGtCtGatG gtacttggaA taGAActgGa
7424 gggTaaaT- --gaaACTAa AGaAaatATc acactcccat gcagaataaa acaaAttata aacaGgtggc aggaagtggg
7507 aaaagcaatg tatgccctc ccatcagtg acTaattaga tgttcatcaa atattacAgg gctgctattaa caagagatgg
7588 GggGaatGaG aacaatgggA ccAATGGGAC TGAGAcCttc agacctgAGg gaggAAaat gaAggacaat tggagaagt
7658 Aaattatata aatataaagt agtaaGaatt gaGccattag gGAtagcacc caccaGggca aGgagaagag tgggtcagag
7738 agaaaaaaga gcagtAACaT tCggagctCt gttccttggg ttccttgggag cagcaggaag cactatgggc tgcacgtcaa
7818 tcacgtgac ggtacaggcc agacTattat tgtctgGtat agtGcaAcag cagaaTaat tgcTgagAgc tattgaggcg
7898 caacagcatc tgttgcaact cacagtctgg ggcatacaGc agctAcaggc aagaGtccctg gctgtggaaa gGtacctaaG
7978 Agatcaacag ctctcgggga tttggggAtg ctctggaaaG ctcAtCtgca ccactAAtgt gccttggaaT ActagtTgga
8058 gtaataaatc tGAgAaTgag atCtggGata acatgaccctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaaActta
8138 ataTacGAc taCttgaaAa atcgcgaGaac caAcaagaaa aAaatgaaca GgaaCtattg gaattGgata aatgggcaag
8218 tttgtGAaat tggTTaaca taacaaaAtg gctgtggtat ataaaaAtat tcataatgat agtaggaggc ttAgtaggtt
      TAT/REV
8298 taagaataAt tttCTTgta ctttctatag tgaatagagt taggcagga taCtcacat tatcgtttca gaccacTtc
8378 ccGaGcccga ggggaccga caggccAgGa ggaatCgaag Gagaaggtgg agaAGgagac agTgGTGgat ccaGtCACtt
8458 agtgGatGga tTcttaAcac tCatctgggT cgaCctgcgg agcctgtgcc tcttcagta ccaccTctg agagacttac
8538 tcttgattgt aacgaggaGt gtggaacttc tgggacTcag ggggtgggaa ATcctcaaat aCtTgtggaa tctctGcag
      REV -----
8618 tattggagtc aggaactaaa gaatagtgt gttAGTttgc tTaatgccac agcTGtagca gtagctgagg ggacagatag
8698 gAttatagaa AtattacaaA Gagcttatag agctattcTc Aacataccta gaagaataag acagggcttg gaaaggCtt
      ENV -----
8778 tgcataaaga tgggtggcaa gtggTcaaaa CgtagtgtG CAggGtggAA tActAtaagg Aaaagaatga gacgagctga
8858 gccagcagca gaAggggtgg gagcagCatc tcgagacctG gaaCaacGtg gagcaatcac aaCtagTaat acagcaAGta
8938 acaatgctgc ttgtgcctgg cAGgaagcac aagaggagga Ggaggtgggt tttccagtca Gacctcaggt accCttaaga
      3' LTR
9018 ccaatgactt acaagTcagc tTtagatctC agccactttt taaaagaaaa ggggggGctg gaagggcTaG ttTactccca
9098 aaAaagacaa gatatccttg atctgtggGt ctaccacaca caaggctTct tcctgattg gcagaactac acaccagggc
9178 cagggACcag atTtccactg acctCggGt ggtgctTcaa gctagtacca gttgagccag aAaaggtaga agagggccaCt
9258 GTaggaAaAa acaAcTgctt gttacacccc AtgaAcctgc atggaatgga tgaccAgag Ggagaagtgt tagTgtggag
      NEF -----
9338 Atttgacagc cgcctagcat ttcatcacAt ggcccagag AAAcatccgg agtactAcaa gGactgctga catcgagctA
      -plication-
      AGGACTGCTG ACATCGAACT tttacaagg gactttccgc tggggacttt ccGCagggag gcgtggActg ggcgggactg
      -Sp11-
      TATA1
9475 gggagtggcg agccctcaga tgctgcataA aagcagctgc ttttgcctg tactgggtct ctctggttag accgatctg
      TAR region
9555 agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttggc ttgagtgtt caagt 9629
    
```

가 1995년에 처음 제기된 후 [18] 계속 보고되고 있으나 [9, 26] 이러한 성적은 LTNP의 극히 일부에서만 확인되는 현상임에는 틀림이 없다. 한편 우리나라에서도 외국의 보고처럼 감염 후 10년

이 경과하였음에도 CD4+T 세포수가 감소하지 않고 일정하게 유지되어 관심을 갖게 하는 환례가 있으나 아직 이들에 대한 분자 수준에서의 연구가 미진하다. 연구자들에 의한 *Nef*와 *Env*에 대한

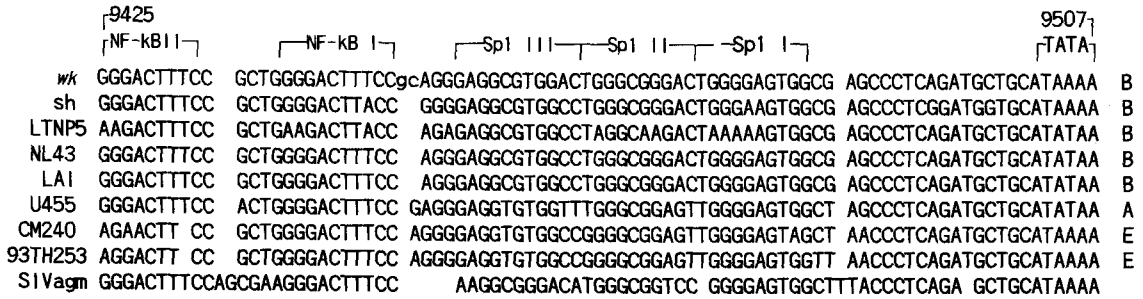


Figure 3. Nucleotide sequence alignment of the enhancer region of HIV and SIV LTRs. Sequence numbering is shown for HIV-1 NL43 nucleotides (9425-9507). Blank spaces represent gaps introduced to optimize alignment. The letter on the right column means HIV-1 subtype.

Table 2. Relatedness of Korean HIV-1_{wk} nucleotide sequences to other representative HIV-1 sequences

Reference	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>	<i>vif</i>	<i>vpv</i>	<i>vpr</i>	<i>tat</i>	<i>rev</i>	<i>nef</i>	LTR
NY5	95.7	96.2	81.4	94.8	91.0	96.2	88.6	89.5	-	77.8
NL43	95.7	96.5	81.6	94.6	-	-	-	-	-	76.7
HXB2R	-	96.3	80.9	94.0	84.6	92.5	89.6	88.9	90.2	-
SF2	95.5	95.9	69.6	94.6	89.7	94.5	-	87.8	88.3	77.5
LAI	94.5	96.0	81.5	94.0	84.6	92.5	89.6	88.9	90.2	-
HAN	93.5	-	-	92.2	88.2	93.8	87.7	86.4	81.9	68.0
MN	93.2	95.6	71.0	94.3	90.1	93.4	86.6	87.4	87.5	76.7
NLACH	-	-	-	93.3	91.4	93.5	88.9	89.8	90.0	-

염기서열 분석에서 외국에 보고된 바 없는 특정 아미노산 구조가 국내 감염자들에서 나타나 [7, 15, 17] 장차 우리 나라에 적용할 백신개발을 위해서는 우리 나라에서 전파되고 있는 HIV 전체 유전정보에 대한 자료 확보가 필수적이다. 본 연구에서는 우선 국내에서 가장 흔한 아형인 HIV-1 아형B에 감염된 여러 명의 LTNPs의 전체 유전정보를 밝히고자 하였으나 본고에서 제시된 환례를 제외하고는 11개의 PCR 산물 중 몇 개씩은 PCR 산물을 얻을 수 없었다.

본고의 연구 대상자가 1989년 헌혈한 혈액을 수혈 받은 감염자가 두 명인데 한 명은 훨씬 어린 나이 (당시 16세)와 1993년부터 ZDV를 하루 800 mg씩 지속적으로 복용하고 있었음에도 불구하고 1998년 12월 CD4 세포수가 200/μl 이하로 감소하였고, ZDV를 복용하지 않은 다른 한 명 (당시 6세)은 1999년 5월 현재 274/μl이다 (김대곤 교수와 교신). 이러한 경과와는 본 연구 대상자에서의 경과와는 뚜렷한 대조를 보이는 데 이는 아마

도 기왕에 보고한 바와 같이 [3-7] 장기간에 걸친 고려홍삼 복용이 soluble CD8 antigen을 지속적으로 감소시키는 등 환자의 예후에 positive하게 영향을 주었을 것으로 사료된다.

약 1.2 kb짜리 PCR 산물을 약 200 bp씩 overlap 되게 하였으나 국내 HIV에 대한 유전정보가 *Nef*와 C2/V3에 한정되어 있어 NL43를 기준으로 제작된 primers를 사용하였기에 primer pair CE9/10, CE11/12 및 CE13/CE14로는 PCR 산물을 얻을 수 없어 CE9/CE14을 한 조로 사용하여 약 3.2 kb의 PCR 산물을 얻었다. 그리고 CE5/CE6을 사용하여 다른 환자들을 대상으로 하였으나 10명 중 3명 정도에서만 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 실제로 같은 실험실에서 같은 조건으로 미국 LTNPs 5명의 HIVs에 대해서는 primers가 잘 작용하였다. 이는 국내 분리주가 미국 등 외국에서 분리된 reference주와의 염기서열 차이가 Table 1에서 보는 바와 같이 커서 장차 국내에서 사용할 백신을 개발하기 위해서는 각 아형별로 유전정보를 얻는

것이 필요하다는 것을 의미한다.

1997년 11월까지 보고된 HIV-1의 complete sequences가 보고된 것은 63개이며 LTR를 대상으로 전체 유전정보가 밝혀진 경우가 매우 드물어 [19] 결론을 내릴 수는 없으나 외국에서 보고된 것과 같은 *Nef* 유전자의 gross deletion [9, 18]은 지금까지 얻은 40여명의 국내 HIV-1 감염자로부터 얻은 자료에서 3~5개 정도의 아미노산 결손 외에는 없었다 [15].

본 연구에서 밝혀진 염기서열의 특징은 5' LTR과 3' LTR을 포함한 전체에서 NL43와 비교시 G가 A로 바뀐 소위 G-to-A hypermutations이 관찰되었는데 이러한 현상은 Huang [13]과 Zhang [27] 등이 각각 보고한 LTNP 9명 중 1명에서 보고된 바 있으며 이러한 현상으로 인해 결국 *Pol* integrase의 central catalytic domain를 coding하는 bp 4624번째가 모두 G로부터 A로 바뀌어 TGG가 TAG로 stop codon(Z)이 되었다. 그러나 바이러스가 배양 9일째부터 탐지되고 혈장내에서 RNA copy 수가 992/ml로 측정되어 바이러스의 증식은 상당한 정도로 이루어졌음을 의미한다. 따라서 stop codon의 정확한 의미는 앞으로 시간을 두고 여러 시기로부터 얻어진 바이러스에 대한 조사가 이루어져야 보다 분명해 질 것이다. 그리고 LTR의 TATA box가 모두 TAAAA였는데 이는 다른 한국인 LTNP (LSH, Figure 2)에서도 확인되었으며 심지어는 아형 B가 아닌 감염자에서도 확인되었다. 이는 HIV-1에서는 subtype E에서만 보고된 것인데 [11] 이 환자의 *Env* C2/V3나 *Nef* 유전자 부위는 모두 아형 B로 분석되었으며 [7, 15, 17] 이번에도 모두 아형 B로 확인되었으며 Figure 2에서 보는 바와 같이 TATA box 부위를 제외하고는 아형 E보다는 아형 B와 유사함을 볼 수 있다. 그리고 NF- κ B I와 Sp1 III사이가 대개 AGG, GGG, AGA중 하나거나 AGGG 등으로 최고 4개의 nucleotides가 위치하는데 [19] 본 환자의 경우 GCAGG로 GC 혹은 아형 E의 U455와 비교하더라도 C가 삽입(insertion)되어 있었다. 이는 지금까지 보고된 적이 없는 novel strain이다. LTNP의 *Nef* 유전자에서 가장 기대되는 아미노산의 deletion은 전혀 없었고 138번째 cysteine인 경우도 아니었다. Cys-138인 경우는 드물지만 LTNP에서 나타나고 AIDS로 진행하지 않는 침팬지에서 분리된 SIVcpz에서도 나타나는 현상이다 [25]. *Env* C5의 NGT의 duplication은 NSI를 가진 두 환자에서만 보고된 바 있다 [11].

641번째 아미노산의 stop codon은 지금까지 한 명의 감염자로부터 분리된 바 있다 [24]. *Vpu*에서는 4번째와 60~62번째 아미노산(각각 A와 DQE)의 insertion이 있었고 VEMGVEMG의 repeat부위 하나가 결손되어 있었다. 이는 HIV-1 SF2에서 나타나는 것으로 Zhang이 보고한 LTNP 9명의 결과 [27]와 동일한 현상으로 저자들이 가지고 있는 다른 두 명의 CD4/CD8 ratio가 1.00이 넘는 LTNP에서도 공통적으로 관찰되었으나 (미발표). *Pol*의 integrase coding region에서의 아미노산 WW는 conserved region으로 이 부위를 포함하여 integrase coding region 전체에서 stop codon은 아직 보고된 바 없다.

3번 염색체의 단완에 있는 두 가닥 모두에서 CCR5 gene의 32 bp deletion이 있으면 HIV-1에 노출되어도 감염되기도 어려우며 감염되더라도 heterozygote deletion보다 예후가 좋으며 또한 heterozygote deletion인 경우도 wild type보다는 예후가 좋다 [22]. CCR5는 지금까지의 보고 [21]대로 백인이 아닌 동양인과 흑인에서는 두 가닥 중 한 가닥에서 32 bp가 deletion된 heterozygotes조차도 나타나지 않았는데 본 감염자 뿐만 아니라 다른 LTNP도 CCR5 wild type으로 우리 나라에서는 CCR 5 coreceptor의 32 bp deletion이 LTNP의 한 요인으로 작용하지 않음을 확인할 수 있었다.

본 연구는 국내 HIV-1의 전체 염기서열에 대한 첫 보고로 국내 HIV-1 molecular nature를 이해하고 나아가 백신개발을 위한 기초자료로써 활용될 수 있을 것이다.

결 론

HIV-1 감염 진단 후 CD4+ T 세포수가 감소하지 않은 한 명의 long-term nonprogressor에게서 분리 배양한 HIV-1의 full genomes 염기서열을 분석한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 전체적으로 G-to-A hypermutation이 있었으며 이로 인해 *Pol*의 integrase coding 부위에 premature stop codon이 하나 관찰되었다.
2. 전체 유전자가 subtype B임에도 LTR의 TATA box가 subtype E에서 나타나는 TAAAA였고 NF- κ B I 바로 다음 부위에 GC가 insertion되어 있었고 TCF-1 α 의 duplication이 있었다.
3. *Gag*, *Pol*, *Vif*, *Vpu*, *Vpr*, *Tat*, *Rev* 및 *Nef*에서는 deletion이나 insertion은 없었다. Insertion은 NL43를

기준으로 *Env*에서 4군데 (아미노산 기준으로 각각 3개, 11개, 2개와 3개) *Vpu*에서 2군데 (1개 및 3개)에서 있었다.

4. NL43 표준주와의 nucleotides수준에서 homology 비교시 *Gag*와 *Pol*은 각각 95.7% 및 96.5%로 높았으나 *Env*는 81.6%로 다소 낮았다.

이는 장차 백신개발을 위해서는 국내에서 전파되고 있는 각 subtypes에 대한 전체 유전정보의 확보가 필요함을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 1997년 후반기 해외 Post-doc. 연수지원으로 수행되었으며, 기술적으로 많은 도움을 준 Louis Alexander와 Robert E. Means 박사께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, O'Malley PM, Holmberg SD: Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 8: 1123-1128, 1994.
- 2) Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kistner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ: HLA and HIV-1: Heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283: 1748-1752, 1999.
- 3) Cho YK, Kim YB, Choi BS, Cho YJ, Suh IS and Shin YO: The increase of T cell by Korean red ginseng in HIV-infected individuals. *J Korean Soc Microbiol* 29: 371-379, 1994.
- 4) Cho YK, Kim YB, Choi BS, Kim YK, Choi MH, Jang YS and Shin YO: Effect of Korean red ginseng on the level of serum p24 antigen β_2 -microglobulin, and CD4+ T cell counts in HIV infected patients treated with AZT (I). *J Korean Soc Microbiol* 28: 409-417, 1993.
- 5) Cho YK, Kim YK, Lee I, Choi MH, Shin YO: The effect of Korean red ginseng (KRG), zidovudine, and the combination of KRG and ZDV on HIV-infected individuals. *J Korean Soc Microbiol* 31: 353-360, 1996.
- 6) Cho YK, Lee HJ, Hur SJ, Nam JH, Oh WI, Maeng SH, Shin YO, Won YH, Kim NS, Cho GJ, Nam KY: Preventive effect of Korean red ginseng on cancers in AIDS patients. *J Korean Association Cancer Prevention* 2: 45-52, 1997.
- 7) Cho YK, Lee HJ, Kim YB, Oh WI, Kim YK: Sequence analysis of C2/V3 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and its correlation with clinical significance; the effect of long-term intake of Korean red ginseng on env gene variation. *J Korean Soc Microbiol* 32: 611-623, 1997.
- 8) Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC: Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science* 258: 1938-1941, 1992.
- 9) Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellet A, Chatfield C, Lawson VA, Crowe S, Maerz A, Sonza S, Learmont J, Sullivan JS, Cunningham A, Dwyer D, Dowton D, Mills J: Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 270: 988-991, 1995.
- 10) Du Z, Lang SM, Sasseville VG, Lackner AA, Ilyinskii PO, Daniel MD, Jung JU, Desrosiers RC: Identification of a *nef* allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys. *Cell* 82: 665-674, 1995.
- 11) Gao F, Morrison SG, Robertson DL, Thornton CL, Craig S, Karlsson G, Sodroski J, Morgado M, Galvao-Castro B, von Briesen H, Beddows S, Weber J, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH: Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. *J Virol* 70: 1651-1657, 1996.
- 12) Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA: The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* 2: 1240-1243, 1996.
- 13) Huang Y, Zhang L, Ho DD: Characterization of *gag* and *pol* sequences from long-term sur-

- vivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **240**: 36-49, 1998.
- 14) **Huang Y, Zhang L, Ho DD**: Characterization of *nef* sequences in long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **69**: 93-100, 1995.
 - 15) **Kang MR, Cho YK, Chun JS, Kim YB, Lee IS, Lee HJ, Kim SH, Kim YK, Yoon K, Yang JM, Kim JM, Shin YO, Kang C, Lee JS, Choi KW, Kim DG, Fitch WM, Kim S**: Phylogenetic analysis of the *nef* gene reveals a distinctive monophyletic clade in Korean HIV-1 cases. *J AIDS Hum Retrovirol* **17**: 58-68, 1998.
 - 16) **Kestler III HW, Ringler DJ, Mori Kazuyasu, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RG**: Importance of the *nef* gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**: 651-662, 1991.
 - 17) **Kim YB, Cho YK, Lee HJ, Kim CK, Kim YK, Yang JM**: Molecular Phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains obtained from Korean patients: *Env* Gene Sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**: 303-307, 1999.
 - 18) **Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC**: Brief report: absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with non progressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* **332**: 228-232, 1995.
 - 19) **Korber B, Foley B, Hahn B, Leitner T, McCutchan F, Mellors JW, Myers G, Kuiken C**: Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1997.
 - 20) **Mariani R, Kirchhoff F, Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC, Skowronski J**: High frequency of defective *nef* alleles in a long-term survivor with nonprogressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **70**: 7752-7764, 1996.
 - 21) **McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T**: Host genes and HIV: The role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele ($\Delta 32$ CCR5). *Emerging Infectious Diseases* **3**: 261-271, 1997.
 - 22) **Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW**: The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Medicine* **3**: 38-340, 1997.
 - 23) **Montano MA, Novitsky VA, Blackard JT, Cho NL, Katzenstein DA, Essex M**: Divergent transcriptional regulation among expanding human immunodeficiency virus type 1 subtypes. *J Virol* **71**: 8657-8665, 1997.
 - 24) **Oram JD, Downing RG, Roff M, Clegg JC, Serwadda D, Carswell JW**: Nucleotide sequence of an Ugandan HIV-1 provirus reveals genetic diversity from other HIV-1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**: 1073-1078, 1990.
 - 25) **Premkumar DR, Ma XZ, Maitra RK, Chakrabarti BK, Salkowitz J, Yen-Lieberman B, Hirsch MS, Kestler HW**: The *nef* gene from long-term HIV type 1 nonprogressor. *AIDS Res Hum Retroviruses* **197**: 357-361, 1996.
 - 26) **Salvi R, Garbuglia AR, Caro AD, Pulciani S, Montella F, Benedetto A**: Grossly defective *nef* gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term non-progressor. *J Virol* **72**: 3646-3657, 1998.
 - 27) **Zhang L, Huang Y, Yuan H, Tuttleton S, Ho DD**: Genetic characterization of *vif*, *vpr*, and *vpu* sequences from long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Virology* **228**: 340-349, 1997.