

# 慢性乙型肝炎患者表位特异性CTL定量检测的评价

张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈安, 吴玉章

张静波, 陈安, 吴玉章, 中国人民解放军第三军医大学全军免疫研究所重庆市 400038  
陈思源, 李廷荣, 重庆市传染病医院 重庆市 400030  
杨志清, 中国人民解放军第三军医大学西南医院肝胆科 重庆市 400038  
张静波, 女, 1968-06-03 生, 重庆市人, 第三军医大学全军免疫研究所博士生, 主治医师, 讲师, 主要从事临床免疫学的研究。  
国家重点基础研究发展规划项目(973 计划), No. 2001CB510001  
国家自然科学基金重大项目, No. 11111111  
项目负责人: 吴玉章, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学全军免疫研究所. wuyuzhang@yahoo.com  
电话: 023-68752680 传真: 023-68752789  
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2004-02-03

## Comprehensive analysis of the quantity of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic viral hepatitis B infection

Jing-Bo Zhang, Shi-Yuan Chen, Zhi-Qing Yang, Ting-Rong Li, An Chen, Yu-Zhang Wu

Jing-Bo Zhang, An Chen, Yu-Zhang Wu, Institute of Immunology of Chinese PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Shi-Yuan Chen, Ting-Rong Li, Hospital of Infectious Diseases of Chongqing, Chongqing 400030, China  
Zhi-Qing Yang, Department of Hepatobiliary Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2001CB510001; The Major Programs of the National Natural Science Foundation of China, No. 11111111  
Correspondence to: Yu-Zhang Wu, Institute of Immunology of Chinese PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. wuyuzhang@yahoo.com  
Received: 2003-10-10 Accepted: 2004-02-03

## Abstract

**AIM:** To investigate the function state of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in chronic hepatitis B infection.

**METHODS:** The study was performed to quantify the HBV specific CTL directly *in vitro* by HLA-A2 tetrameric complexes for core 18-27 (Tc 18-27), envelope 183-191 (Te 183-191), envelope 335-343 (Te 335-343), and polymerase 575-583 (Tp 575-583) in active chronic hepatitis patients, and then the correlation of HBV epitope-specific CTL between serum HBV DNA loads or alanine aminotransferase (ALT) levels were analyzed by multiple regression analysis.

**RESULTS:** It was found that there were multiple CTLs responses in active chronic hepatitis patients. The frequency of Tc18-27 response was higher than the other three epitope-specific CTLs. No significant correlation was found either between the frequency of HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells and the viral load, or the frequency of HBV specific CD8<sup>+</sup> T cells and the levels of alanine transaminase.

**CONCLUSION:** The frequencies of HBV-specific T cells are not determinant of immune-mediated protection in HBV infection and the existence of epitope-specific HBV CTLs is not directly correlated to hepatocytic injury.

Zhang JB, Chen SY, Yang ZQ, Li TR, Chen A, Wu YZ. Comprehensive analysis of the quantity of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic viral hepatitis B infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1069-1072

## 摘要

**目的:** 评价慢性乙肝患者体内不同表位特异性细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)的功能状态。

**方法:** 采用MHC/肽四聚体复合物技术,即tetramer技术,定量外周血HLA-A2限制性表位即核心抗原core18-27、被膜抗原env 183-191、335-343、聚合酶抗原pol 575-583 4种表位特异性CTL,通过多元回归分析进行综合评价。

**结果:** 慢性乙肝患者体内存在多克隆CTL反应,core 18-27为优势性表位。4种表位特异性CTL的频率与病毒载量无相关性( $P > 0.05$ );表位特异性CTL与血清转氨酶水平平均无显著相关性( $P > 0.05$ )。

**结论:** 体内存在的CTL数量并不能代表机体的保护性免疫状态。

张静波, 陈思源, 杨志清, 李廷荣, 陈安, 吴玉章. 慢性乙型肝炎患者表位特异性CTL定量检测的评价. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1069-1072

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1069.asp>

## 0 引言

细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)在清除细胞内乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)的同时,也不可避免地造成宿主肝细胞的损伤<sup>[1-2]</sup>。随着生物学和免疫病理学的发展,保护性免疫的观点也发生了深刻的变化。近年来的研究表明,不同表位特异性CTL在清除胞内病毒感染和对宿主细胞损害的贡献不同。如何明确不同表位特异性CTL的功能状态,对设计更为合理而有效的治疗性疫苗将是关键。慢性HBV感染中CTL的数量十分微弱,我们采用全新的MHC/肽四聚体复合物(tetramer)技术<sup>[3-5]</sup>,对慢性HBV感染患者外周血CTL进行准确定量,通过与病毒载量及肝功能状态的综合分析,达到对不同表位特异性CTL的功能评价,为进一步分析表位特异性CTL的效应机制及设计更为合理的免疫性治疗方案奠定基础<sup>[6]</sup>。

1 材料和方法

1.1 材料 重庆市传染病医院住院患者 35 例, 男 18 例, 女 17 例. 平均年龄 26.5 岁. 诊断符合第五次全国传染病寄生虫病学术会议讨论修订标准. 排除 HCV, HDV, HIV 病毒混合感染. 肝脏 B 超证实有慢性炎症. HLA-A2<sup>-</sup> 慢性活动性乙肝患者及 HLA-A2<sup>+</sup> 健康献血员 5 名为对照组. 淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)为天津 TDB 生物技术发展中心产品, 比重 1.077 g/L; RPMI1640 培养基 (Gibico); R-PE 标记的 rMHC tetramer HLA-A\*0201/FLPSDFFPSV(Tc18-27), HLA-A\*0201/FLLTRILT1 (Te183-191), HLA-A\*0201/WLSLLVPFV (Te335-343), HLA-A\*0201/FLLSLGIHL (Tp575-583) 购自英国 Proimmune 公司; R-PE 标记的亲合素购自美国 Sigma 公司; Cy-Chrome™ 标记的鼠抗人 CD8mAb 购自美国 BD PharMingen 公司; Cy-Chrome™ 标记的鼠 IgG<sub>1</sub>, κmAb 同型对照购自美国 BD PharMingen 公司; 红细胞裂解液购自美国 BD PharMingen 公司; FACS 洗涤液(含 1 g/L BSA, 0.1 g/L 叠氮钠的 PBS); HLA-A2 鼠抗人 mAb(来源于 BB7.2 小鼠杂交瘤细胞株, ATCC); FITC-羊抗小鼠 IgG 购自北京中山生物技术有限公司. TDGC2J 超净工作台(苏州); TGL-16B 台式离心机(上海); FACstar Plus 流式细胞仪/FCM(Becton-Dickinson); 定量 PCR 仪; 7150 全自动生化分析仪

1.2 方法 血清转氨酶水平测定采用 7150 全自动生化分析仪. 血清 HBV DNA 定量检测(定量 PCR, Roche 公司)按说明书进行. 采集肝素抗凝的外周静脉血 2 mL, 淋巴细胞分离液密度梯度法分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 用 HLA-A2 鼠抗人 mAb (BB7.2, ATCC)为一抗, FITC-羊抗小鼠 IgG 为二抗进行间接免疫荧光染色, 流式细胞仪检测 HLA-A2 表型. Tetramer 染色参照 Proimmune 公司说明书. PBMCs 1×10<sup>9</sup>/L 加入 tetramer 1 μg, 20 μL PE-Cy5 标记的 CD8 抗体, 混匀, 避光, 室温孵育 30 min 后 PBA 液(5 g/L 牛血清白蛋白, 0.5 g/L 叠氮钠, 0.01 mol/L PBS)洗涤 2 次; 10 g/L 多聚甲醛固定后上机检测; 或肝素抗凝的全血 0.25 mL 加 PBS 2 mL 稀释后, 500 g 离心 5 min; 用吸管小心移弃上清; 加入 tetramer 1 μg, PE-Cy5 20 μL 标记的 CD8 抗体于全血细胞中, 混匀; 室温孵育 30 min, 避光; PBA 液洗涤 1 次; 加 5 mL FACS 裂解液, 室温 10 min; 待细胞悬液变成真性溶液后 PBA 液洗涤 2 次; 10 g/L 多聚甲醛固定, FACstar Plus 流式细胞仪检测, BD FACS 专用 CELLQuest™ 软件分析.

统计学处理 本研究计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示. 分别以病毒载量(以病毒拷贝数表示)和血清转氨酶水平为因变量(depend), 以 Tc18-27、Te183-191、Te335-343、Tp575-583 为自变量(independ), 采用多元逐步回归分析(multiple stepwise regression analysis). 显著性检验用 t 检验, 单相关分析用线性相关. 整个统计过程用 SPSS 8.0 统计软件进行. P <0.05 为有显著性意义.

2 结果

在 35 例慢性乙肝患者有 16 例为 HLA-A2<sup>+</sup>, 经流式细胞仪检测 HLA-A2<sup>+</sup> 阳性的平均荧光强度大于 90%. 通过对照 HLA-A2<sup>+</sup> 患者的 Tc18-27 染色发现, 以 CD8 阳性细胞设门, tetramer 阳性细胞频率在两种方法的检测中无明显差异. 在慢性乙肝患者中, HLA-A2<sup>+</sup> 组和 HLA-A2<sup>-</sup> 组之间无明显差异(P >0.05), 但和正常健康 HLA-A2<sup>+</sup> 组有显著性差异(P <0.05).

2.1 不同表位特异性 CTL 的表达频率 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组及 HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝患者组 tetramer<sup>+</sup> 细胞未超过 0.03%. 所有 HLA-A2<sup>+</sup> 患者的 tetramer<sup>+</sup> 细胞频率(图 1). 16 例 HLA-A2<sup>+</sup> 乙肝患者外周血中, Tc 18-27 有 12 例有 tetramer 阳性细胞存在, 频率为 0.01-3.52%, 其中在 9 例患者呈优势性表达. Te 183-191 在 8 例患者的阳性频率为 0.02-1.37%, 其中 3 例为优势性表达. Te 335-343 在 4 例患者的阳性频率为 0.02-0.79%, 无优势性表达. Tp 575-583 在 5 例患者中阳性表达频率为 0.01-1.01%, 无优势性表达. HLA-A2<sup>+</sup> 慢性乙肝感染组的 tetramer 阳性细胞频率与 HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝感染组及 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较有显著性差异(P <0.05), HLA-A2<sup>-</sup> 慢性乙肝患者组与 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较无显著性差异(P >0.05, 图 2).

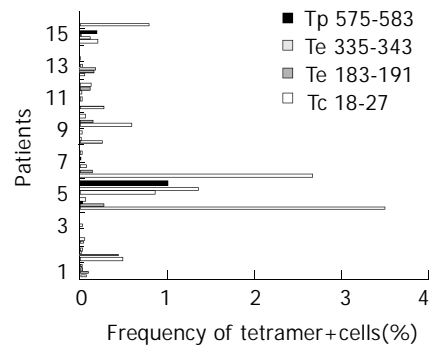


图 1 HLA-A2<sup>+</sup> 慢性乙肝感染患者外周血 tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的表达频率. 全血(0.25 mL)经 PE 标记的 tetramer 染色(Tc18-27、Te183-191、Te335-343、Tp575-583)和 PE-Cy5 标记的 CD8 单克隆抗体进行双标染色, 在流式细胞仪上进行分析, 以 CD8 阳性细胞设门, 计数 50 000 个细胞, 双阳性细胞为 tetramer 细胞频率(以 % 表示).

2.2 特异性 CTL 表达频率与病毒感染的关系 以病毒载量为因变量; Tc18-27, Te183-1-91, Te335-343, Tp575-583 为自变量, 进行逐步回归分析, 得出线性模型如下: 病毒载量 = -111.7+331.7 (Tc18-27)+4 929.1 (Te183-191)+3 388.9 (Te335-343)-7 098.0 (Tp575-583). 回归方程的整体性检验: 决定系数(r square)= 0.928, F 值为 7.003, P =0.005, 有统计学意义. 4 个自变量对病毒载量的影响依次为 Tc18-27> Tp575-583> Te183-191> Te335-343. 但 4 种表位特异性 CTL 和病毒载量相关性无显著意义(P >0.05). 以血清转氨酶水平为因变量; Tc18-27, Te183-1-91, Te335-343, Tp575-583 为

自变量, 进行逐步回归分析, 得出的回归方程无统计学意义( $P > 0.05$ ), 转氨酶水平和四种表位特异性 CTL 均无显著相关性( $P > 0.05$ ). 病毒载量和血清转氨酶水平无线性相关( $P > 0.05$ ).

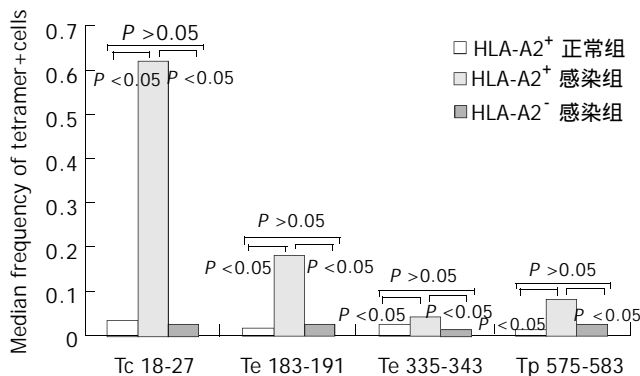


图2 tetramer+ 细胞频率和病毒载量之间的关系. HLA-A2<sup>+</sup> 感染组的 tetramer 阳性细胞频率与 HLA-A2<sup>-</sup> 感染组及 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), HLA-A2<sup>-</sup> 感染组与 HLA-A2<sup>+</sup> 正常健康组的 tetramer 阳性细胞频率比较无显著性差异( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

HBV 作为嗜肝细胞病毒, 病毒本身及其在体内的复制并不引起宿主肝细胞的损伤. HBV 感染通常被认为是宿主细胞免疫的结果<sup>[1,7-11]</sup>. 由于 HBV 不能在体外组织培养中生长, 而黑猩猩是惟一能被感染的动物, 这些缺陷一直阻碍了 HBV 感染免疫病理的研究<sup>[11-12]</sup>. 既往研究表明, 急性自限 HBV 感染患者体内出现强烈而多克隆的 CTL 反应, 同时伴随血清转氨酶升高等肝脏病理损害, 进而引起 HBV 的清除. 而在慢性乙肝患者体内 CTL 反应非常微弱甚至检测不到<sup>[12]</sup>. MHC/肽四聚体复合物技术为检测表位特异性 CTL 提供了定量标准<sup>[3-5]</sup>, 为进一步了解表位特异性 CTL 与病毒复制及肝脏损害之间的相关关系提供了可能性. 全血染色法因所需样本量少, 无需进行淋巴细胞分离等烦琐的离心步骤, 并因更接近体内环境而日益受到重视<sup>[3-5,13]</sup>. 我们尝试了全血法对乙肝患者外周血的 tetramer 检测, 以 CD8 阳性细胞设门, 计算 tetramer<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的双阳性细胞, 结果两种方法检测的 tetramer<sup>+</sup> 细胞频率无显著性差异. 表明全血法检测是一种简单可行的方法. 通过慢性活动性乙肝患者, 发现病毒载量与血清转氨酶水平无明显相关性, 支持既往关于病毒本身并不引起肝细胞损害的观点<sup>[12]</sup>. 在慢性活动性乙肝患者体内出现多克隆的 CTL 反应, 其中 Tc18-27 为优势性表达. 但通过对 4 种不同表位特异性 CTL 与病毒载量的关系发现, 4 种表位特异性 CTL 和病毒复制水平并不相关, 表明这些多克隆存在的 CTL 并不能代表机体的保护性反应. 这些反应状态的不同差异以及与病毒载量的相关性差异, 其可能的原因为: (1) HBV 不同抗原可能具有不同的免疫原性和耐受原性<sup>[14]</sup>. Yang et al<sup>[15]</sup> 在 HBV 质粒转染诱导的小鼠急性感染模型中, 并没有检测到针对核心抗原的 CTL, 可能与小鼠的遗传背景

有关; (2) Kakimi et al<sup>[14]</sup> 发现, 被膜抗原(envelope, ENV) 特异性 CTL 处于耐受状态, 而针对聚合酶(polymerase, POL) 的 CTL 虽然存在, 但对乙肝病毒的复制和肝细胞的损伤均没有作用; 而 Reignat et al<sup>[16]</sup> 发现, 针对 ENV 的耐受并不是经典的耐受. 需结合如 Elispot 技术进行或统计分析的方法进行综合评价<sup>[17]</sup>, 这可能是本实验中 Te183-191、Te335-343 及 Tp575-583 与病毒载量之间无相关性的原因; (3) tetramer 技术的定量检测并不能反应 CTL 在体内的功能状态<sup>[16,18-20]</sup>. 这些病毒特异性 CTL 能和体内高载量的病毒抗原共存而不具有杀伤靶细胞和分泌细胞因子的功能; (4) 我们仅选择了 4 个具有代表性针对 HLA-A2 限制性的优势性表位. 新近在 HIV 的研究表明, 单纯针对优势性表位的检测并不能反映机体的整个病毒感染的参数, 而应该由所有具有免疫潜能的表位特异性 CTL 来反映<sup>[21-24]</sup>.

血清转氨酶水平升高是肝脏损害的标志<sup>[25]</sup>. 我们发现 4 种表位特异性 CTL 与血清转氨酶水平无显著性相关. 可能一些未选择的亚优势表位发挥了肝细胞损害的功能<sup>[16]</sup>; CTL 可能通过非细胞毒机制发挥控制和清除 HBV 病毒的作用<sup>[26]</sup>. 如果 HBV 特异性效应 CD8<sup>+</sup>T 细胞应答不能控制病毒复制, 则会直接或通过吸引其他非病毒抗原特异性 T 细胞聚集而造成肝病理损害<sup>[19,26]</sup>. Sitia et al<sup>[27-30]</sup> 研究表明, 通过阻滞趋化因子的作用可减少抗原非特异性细胞在肝细胞的浸润, 从而降低肝细胞的损害程度. 表位特异性 CTL 在慢性活动性乙肝患者体内的存在并不直接引起宿主肝细胞的损害, 而可能通过“募集”更多的抗原非特异性细胞间接地对肝细胞进行损伤. 这样可设计新型抗原分子, 诱导 HLA-I 类分子限制性的 HBV 特异性效应 CD8<sup>+</sup>T 细胞表达, 在无肝细胞病理性损害的基础上, 籍抗原特异性 CTL 作用而抑制 HBV 复制、清除胞内病毒.

### 4 参考文献

- Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:395-403
- Guidotti LG. The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 2002;20(Suppl 4):A80-82
- Appay V, Rowland-Jones SL. The assessment of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J Immunol Methods* 2002;268:9-19
- He XS, Rehermann B, Boisvert J, Mumm J, Maecker HT, Roederer M, Wright TL, Maino VC, Davis MM, Greenberg HB. Direct functional analysis of epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* 2001;14:59-69
- Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8<sup>+</sup> T cells with MHC-peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. *J Immunol Methods* 2004;285:71-87
- Shi TD, Wu YZ, Jia ZC, Zhou W, Zou LY. Therapeutic polypeptides based on HBcAg (18-27) CTL epitope can induce antigen-specific CD8 (+) CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2 transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004;10:1222-1226
- Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and

- viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003;10:159-167
- 8 Liaw YF. Hepatitis flares and hepatitis Be antigen seroconversion: implication in anti-hepatitis B virus therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:246-252
- 9 Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8 (+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:68-76
- 10 Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003;39(Suppl 1):S36-42
- 11 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2129-2134
- 12 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50
- 13 Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-385
- 14 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
- 15 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13825-13830
- 16 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- 17 Welsh RM. Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen. *J Exp Med* 2001;193:F19-22
- 18 Langhans B, Schweitzer S, Nischalke HD, Braunschweiger I, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus-derived lipopeptides differentially induce epitope-specific immune responses in vitro. *J Infect Dis* 2004;189:248-253
- 19 Webster G, Bertoletti A. Quantity and quality of virus-specific CD8 cell response: relevance to the design of a therapeutic vaccine for chronic HBV infection. *Mol Immunol* 2001;38:467-473
- 20 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971
- 21 Rehermann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 2000;191:1263-1268
- 22 Betts MR, Casazza JP, Patterson BA, Waldrop S, Trigona W, Fu TM, Kern F, Picker LJ, Koup RA. Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8 (+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype. *J Virol* 2000;74:9144-9151
- 23 Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 (+) and CD8 (+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 2001;75:11983-11991
- 24 Addo MM, Yu XG, Rathod A, Cohen D, Eldridge RL, Strick D, Johnston MN, Corcoran C, Wurcel AG, Fitzpatrick CA, Feeney ME, Rodriguez WR, Basgoz N, Draenert R, Stone DR, Brander C, Goulder PJ, Rosenberg ES, Altfeld M, Walker BD. Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 2003;77:2081-2092
- 25 Perrillo RP, Lai CL, Liaw YF, Dienstag JL, Schiff ER, Schalm SW, Heathcote EJ, Brown NA, Atkins M, Woessner M, Gardner SD. Predictors of HBeAg loss after lamivudine treatment for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;36:186-194
- 26 Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65-91
- 27 Sitia G, Isogawa M, Kakimi K, Wieland SF, Chisari FV, Guidotti LG. Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13717-13722
- 28 Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1755-1766
- 29 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001;167:6701-6705
- 30 Wieland SF, Vega RG, Muller R, Evans CF, Hilbush B, Guidotti LG, Sutcliffe JG, Schultz PG, Chisari FV. Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 2003;77:1227-1236