

MHC - 表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用

王 洪, 周吉军, 王宇明

王洪, 周吉军, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院感染病分院 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30200242
项目负责人: 周吉军, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院感染病分院
电话: 023-68754289
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-24

摘要

可溶性 MHC- I 类分子重链 α 与 $\beta 2$ 微球蛋白在体外组装, 并结合抗原表位肽, 形成一个能够与相应 TCR 特异性结合的单体, 再将 4 个单体组装在一起, 称为四聚体。四聚体用荧光染料标记, 供流式细胞仪检测, 就可以用于具有特定 TCR 的 T 细胞的研究。在病毒性肝炎的研究中, 四聚体技术可以直接检测抗原特异性 CTL 数量, 在感染急性期抗原特异性 CTL 比恢复期高, 肝炎自愈者高于慢性感染, 肝内高于外周血, 但明显低于其他病毒性肝炎。四聚体标记联合其他膜表面分子的标记(或细胞内细胞因子染色), 可以评价抗原特异性 CTL 的功能状态, 还可以联合一些特殊的荧光染料, 评价抗原特异性 CTL 的分裂增殖能力。

王洪, 周吉军, 王宇明. MHC - 表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1432-1436

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1432.asp>

0 引言

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是机体抗肿瘤、抗移植及有效控制各种感染的免疫细胞之一。在乙、丙型肝炎病毒(HBV/HCV)感染时, MHC- I 类分子限制的抗原特异性 CTL 反应是清除病毒、控制病毒复制和播散的主要机制^[1-3]。由于抗原特异性 CTL (antigen-specific CTL)在控制病毒感染和某些肿瘤具有重要的作用, 因此定量检测抗原特异性 CTL 一直是免疫学界努力的目标之一。1996 年, Altman et al^[4]首次报道将 MHC- I 类分子、抗原肽(peptide)和荧光染料标记连接蛋白组成的单体物, 通过亲和素铰链成为四聚体复合物(tetrameric complexes, "Tetramer")来检测 HIV 特异性 CTL 细胞, 从此这项技术在病毒性肝炎^[5-10]包括 SARS 病毒^[11]、肿瘤^[12-14]以及自身免疫性疾病^[15-17]等基础和临床研究中广泛应用。近几年, 四聚体技术在病毒性肝炎领域的研究也取得较大的成绩^[18-19], 本文拟将四聚体技术原理和在病毒性肝炎抗原特异性 CTL 的研究应用介绍如下。

1 可溶性 MHC - 肽四聚体技术作用原理

MHC- I 类分子是由重链 α 与保守的轻链即 $\beta 2$ 微球蛋白组成的同源二聚体, 并形成一个肽结合槽, 具有高度多态性。特异性 CTL 识别的抗原主要是结合 MHC- I 类分子的内源性抗原肽。抗原肽(内源性抗原)是由抗原递呈细胞(antigen present cell, APC)加工合成, 在细胞内质网中结合于由 MHC- I 类分子重链($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 功能区)构成的肽结合槽内。CTL 通过细胞表面 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)识别并结合那些提呈在靶细胞表面 MHC- I 类分子肽结合槽内的特异性抗原表位(epitope), 在共同刺激信号的协助下活化、增生, 形成表位特异性 T 细胞克隆, 活化的 CTL 细胞再通过相同的机制靶细胞结合而发挥生理效应。

1980 年代后期至 1990 年代, 已有许多学者根据 T 细胞作用的特点, 应用可溶性 MHC- I 类分子来研究 T 淋巴细胞反应^[20-22], 但是结果并不理想。其主要原因是单价 MHC- I 肽复合物(MHC-Peptide Monomers)与 TCR 结合的亲和力较低($\approx 10^{-5} \mu\text{M}$), 且解离快, 形成的复合物半衰期不到 1 min^[23-24]。而多价 MHC- I 肽复合物能够同时结合多个 TCR, 使其解离速度大大减慢, 从而提高检测的阳性率有研究发现四价的 MHC- I 肽复合物在亲和力, 生物效应等多方面作用都是最佳的^[25]。Altman et al^[4]基于这一原理发明了可溶性 MHC- I 肽四聚复合物(四价 MHC- I 肽复合物), 该方法通过基因工程技术将 BirA 酶底物肽(BSP)的 15 个氨基酸残基的编码基因克隆到质粒中 HLA - A2 重链的羧基端, 表达 HLA - A2 重链 - BSP 融合蛋白。将融合蛋白、 $\beta 2$ 微球蛋白、抗原表位肽(体外合成)折叠复合后与 BirA 酶作用, 产生赖氨酸残基, 再与藻红蛋白(PE)标记的亲合素混合, 形成 HLA - A2 重链、藻红蛋白 - 亲合素、 $\beta 2$ 微球蛋白、表位肽组成的复合物。由一个亲合素连接四个藻红蛋白, 从而形成四价的复合体, 因此一个四聚体复合物可以同时与四个 TCR 结合。四聚体复合物是模仿 CTL 识别靶细胞的“双识别”过程, 四聚体复合物与 TCR 相结合, 从而标记该 HLA 型、特定抗原表位的 CTL 细胞。

四聚体中的亲和素由荧光染料(如: PE, FITC 等)进行标记, 可以供流式细胞仪(FACS)检测。因此, 只要人工合成已知抗原多肽, 就能通过此法迅速定量检出该抗原肽特异性 CTL, 如果在体外给予抗原或分裂原的刺激后, 进行细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2)^[26-28]、趋化因子(如 MIP-1 α)、细胞毒素(如穿孔素/颗粒酶)^[5, 26, 29-30]的染色, 可以评价特异性 CTL 的功能状态, 而且还可以标

记细胞分选以供体外培养扩增和功能分析用^[31-32].

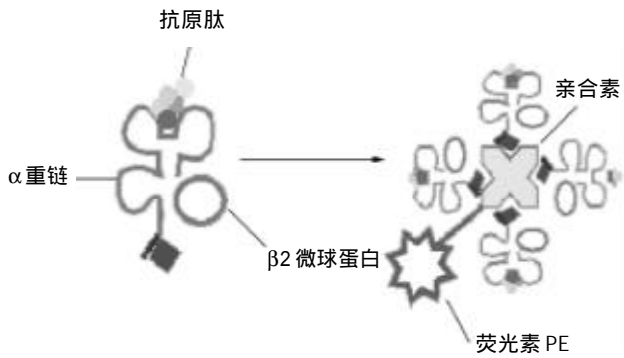


图1 四聚体结构示意图.

2 四聚体检测技术在病毒性肝炎研究中的应用

在病毒性肝炎发病机制的研究中发现, 抗原特异性 CTL 与病毒清除和肝脏病理变化有密切相关^[33], 病毒抗原特异性 CTL 的研究是揭示病毒性肝炎免疫发病机制的关键, 了解抗原特异性 CTL 的数量及功能的变化规律有利于阐明病毒性肝炎的发病机制, 也有利于抗病毒治疗过程中机体免疫状态的检测^[34].

2.1 抗原特异性 CTL 细胞数量和功能分析 四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用首先体现在对病毒抗原特异性 CTL 数量的研究^[35-36]. Maini et al^[35]首先将此技术应用于病毒性肝炎的研究, 他们合成了针对核心抗原(C18-27)、衣壳抗原(E335-343)和 DNA 多聚酶(P575-583)肽段的特异性四聚体用于 HBV 感染患者的检测, 从而开始了病毒性肝炎细胞免疫研究的新天地. 目前研究报道很多, 一般认为慢性 HBV 感染外周血中出现频率大概占总 CD8⁺T 细胞的比较低, 而肝内相对较高, 有研究认为他们之间的比值可达 17.4-150 倍^[37]; 而 HBV 感染急性期明显高于慢性感染, 部分患者可以达到 1% 左右. 对 HCV 感染患者外周血中特异性 CTL 数量的研究多家报道差异较大, 在慢性 HCV 感染患者 HCV 表位肽特异性 CTL 占总 CD8⁺T 细胞从 0.05% 到 1.2% 都有报道, 而在急性 HCV 感染, 特异性 CTL 往往很高, 有报道可达 4% 左右^[38]. 总之, 肝炎病毒感染的急性期特异性 CTL 出现频率比慢性感染高出 3-5 倍^[39]. 但与其他病毒(CMV、EBV、流感 A)感染比较^[9, 27, 40], 慢性 HBV、HCV 感染时抗原特异性 CTL 数量非常低, 一般不超过 1%^[33, 35, 41-43, 39]. 因此推测过低的抗原特异性 CTL 反应可能是肝炎病毒感染更容易慢性化的原因之一.

不同的临床表现患者抗原特异性 CTL 数量存在明显差异: 在 HBV 感染时, 特异性 CTL 在感染急性期最高, 其次是感染后自愈者, 最后是慢性感染患者; 在慢性感染患者之间, 低病毒复制、肝损伤轻者比高病毒复制、肝损伤重者高^[44]. 在 HCV 感染时, 特异性 CTL 在感染急性期最高, 其次是慢性感染患者, 最后是感染后自愈者^[39]. 这些发现提示外周血中高抗原特异性 CTL 与病毒清除有关.

研究发现不同抗原肽特异性 CTL 在数量上存在明显的差异; 急性 HBV 感染和感染自愈者, 抗原特异性 CTL 细胞数量从多到少依次为: 核心抗原特异性 CTL 细胞、多聚酶特异性 CTL 细胞、衣壳抗原特异性 CTL 细胞^[35]. 而在慢性 HBV 感染时, 特别是有肝损伤、病毒高复制患者, 衣壳抗原特异性 CTL 数量最高^[44]. 但总体来说, 肝炎病毒感染时, 病毒抗原特异性 CTL 数量很低, 这也给进一步研究带来了困难. 最近有报道^[45], 采用间歇循环刺激法用抗原表位肽体外刺激患者 PBMC, 使特异性 CTL 数量得到增加, 可以提高检出率. 但这样可能会使检测的准确性下降, 有待进一步的研究. 由于肝炎病毒都有多种抗原成分, 而每个抗原成分包含有多个抗原表位, 不同抗原表位肽特异性 CTL 的变化规律以及在免疫发病中的作用的研究还不够. 四聚体技术对特定抗原表位 CTL 细胞进行标记, 可以直接对外周血和肝组织中的特异性 CTL 进行检测. 如果采用多重染色技术, 四聚体联合细胞膜^[46]或细胞内特殊标记的染色, 为特异性 CTL 的研究提供了多种实验参数, 直接或间接的反映特异性 CTL 的功能. 常常使用的细胞膜标记(活化标记、CD 分子、趋化受体)的标记^[47]、T 细胞受体 Vβ 取用(usage)^[48]的标记以及细胞内细胞因子(IFN-γ、IL-2、TNF-α)的标记^[26, 49]. 但由于某些疾病状态时抗原特异性 CTL 数量有限, 这方面的部分研究有很大的难度.

用 HBcAg18-27 表位肽四聚体研究 HBV 感染者抗原特异性 CTL, 发现急性 HBV 感染外周血四聚体阳性细胞胞膜活化标志(HLA-DR)为阳性, 但细胞的增生能力下降. 在 HCV 感染的急性期, 四聚体阳性 CTL 细胞表型为 CD28⁺CD45RA⁻, 但胞质中不含穿孔素, 为记忆型 T 细胞. 有研究认为慢性病毒肝炎患者外周血中, 特异性 CTL 产生细胞因子 IFN-γ 和 TNF-α 的能力下降, 不足以清除病毒. 而另有研究发现^[41, 49], 慢性 HCV 感染患者外周血中特异性 CTL 分泌 IFN-γ 和 TNF-α 的能力存在异质性(heterogeneous), 出现两个明显不同的亚群, 一部分特异性 CTL 接受抗原肽刺激后可以分泌 IFN-γ 并且四聚体染色强度下降, 另一部分不分泌 IFN-γ、四聚体染色不变. 而且在大部分的 HCV 感染者, 特异性 CTL 对抗原肽刺激不产生反应. 这个研究结果提示: 抗原特异性 CTL 是一个不均一的细胞群, 他是由执行不同功能的一群细胞组成.

而最近还有研究显示在急性 HBV 和 HCV 感染患者, 外周血病毒抗原表位肽四聚体染色阳性的 CD8⁺T 细胞都可表现为 CCR7⁻CD45RA⁻^[50], 即效应-记忆细胞亚群; 尽管表型相同, 但其功能有明显的差异. HBV 感染者特异性 CD8⁺T 细胞胞质中含有较多的穿孔素, 并且增生比较旺盛、有较强的细胞毒性作用, 体外抗原肽刺激可产生 IFN-γ, 即使在病毒得到控制时, 四聚体阳性的 CD8⁺T 细胞仍可以检测到; 而在急性 HCV 感染者, 抗原特异性 CD8⁺T 细胞功能是处于抑制状态. 不

过,其细胞功能在其自愈过程中可以逐步得到恢复,而在发展为慢性感染的患者,始终处于抑制状态.因此病毒抗原特异性CTL在HBV、HCV感染时功能状态不完全相同,这种功能上的差异可能是HCV感染时更容易慢性化的原因.

2.2 变异抗原在免疫反应中的作用 抗原特异性CTL抗原表位氨基酸变异引起的逃避变异(escape mutation)在病毒性肝炎十分常见.已经证实病毒性肝炎患者CTL识别的抗原表位肽存在变异,并且其变异可以抑制CTL释放INF- γ 和杀伤感染细胞的功能^[51-52],在慢性化的过程中具有重要的意义.HBV核心抗原18-27(氨基酸FLPSDFPVS)是T细胞识别的常见表位,该区变异可以抑制T细胞对抗原的识别^[53].Maini et al^[54]合成了5个各含有1个氨基酸变异的核心抗原18-27多肽(分别为:M19, A21, E22, Y23, Y24),用变异多肽刺激PBMC,发现变异多肽(A21, E22, Y24)刺激,能够产生INF- γ 的细胞数量不及野生株多肽刺激产生的20%,因此认为核心抗原18-27表位的变异降低了特异性CTL对抗原成分的识别效率.他们还用野生株表位肽四聚体检测不同肽段刺激所产生特异性CTL情况发现,已自愈的急性HBV感染患者PBMC在接受多肽刺激时,多个肽段可以产生四聚体阳性细胞(弱于野生株肽),而慢性HBV感染时(野生株),一般只对少数肽段产生反应,并且刺激产生的特异性CTL数量明显比急性肝炎患者少,结合他们同时对四聚体阳性细胞T细胞受体取用研究资料^[54],他们认为多克隆的针对该抗原表位(18-27)的CTL有利于HBV的清除.另外他们发现1例慢性HBV感染(18-27氨基酸存在T21, Y23变异)患者PBMC接受多肽刺激时,多个变异多肽都能够产生强于野生株肽的刺激效果,他们认为这两个位点的变异尽管还能够刺激机体产生免疫应答,但不能导致病毒的清除.他们的研究是对病毒变异导致免疫逃避观点的直接证明.

2.3 病毒抗原特异性CTL反应动力学研究 由于四聚体阳性细胞的检测直接使用感染者PBMC,不需要体外扩增,直接进行数量和功能分析,避免了外来因素的干扰,可以准确反映病毒感染时特异性CTL的变化规律.在急性HBV感染潜伏期(至少在出现临床症状和ALT升高前4 wk)^[55],HBV特异的CD8⁺T细胞就可以出现,并且逐步升高.Maini et al^[33]发现急性HBV感染时,病毒特异性CTL数量在急性期最高,其高峰与血清ALT升高平行,但细胞功能受到损害;随着病情的恢复,四聚体阳性CD8⁺T细胞数量逐步下降,而细胞功能逐步恢复.在整个恢复期特异性CD8⁺T细胞逐步降低,但临床完全恢复后仍保持低水平的特异性CD8⁺T细胞存在.慢性HBV急性发作(flare, exacerbation)患者^[56],血清转氨酶(ALT)的升高与核心抗原18-27的特异性CTL(Tc18-27)的增生密切相关,并且在急性发作时Tc18-27细胞表面HLA-DR和CCR5高表达;而在静止期则为低表达.

HCV急性感染早期特异性CTL比例高,自限性感染者特异性CTL出现早、持续时间长.而不能清除病毒者则下降快、持续时间短.特异性CTL的短寿命可能是HCV持续感染的原因之一.因此抗原特异性CTL的动态变化与病毒性肝炎的发展有着密切的关系,更加强烈的支持CTL在病毒性肝炎发病中起关键作用的观点.

2.4 抗原特异性CTL增生能力的研究 T细胞增生是细胞活化的主要结果之一,对抗原特异性CD8细胞增生能力的研究可以更好的理解T细胞反应的动力学变化规律,长期以来,这方面的研究都是依靠³H标记的胸腺嘧啶核苷参与实验来完成.该方法费时、费力,并且有放射性污染的危险,实际应用有很大的局限性.CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)是一种荧光物质,对细胞无毒性,他可以进入细胞内与蛋白结合,并且随着细胞的分裂而等量分配给子代细胞,已分裂细胞的荧光强度下降,利用CFSE的这个特性,可以研究细胞的增生能力^[57].有研究者将四聚体技术与CFSE相结合,用于抗原特异性CTL增生能力的研究^[58-59].Wedemeyer et al^[39]将HCV感染患者PBMC进行CFSE染色后,用CTL识别的HCV表位肽进行体外刺激培养7d,然后用四聚体进行CFSE和该表位肽四聚体的检测,CFSE荧光强度降低的四聚体阳性细胞就是已经分裂的抗原特异性CTL.他们发现慢性HCV患者抗原特异性CTL的增生能力低下,最高也不超过40%,而HCV感染自愈者抗原特异性CTL的增生旺盛,往往大于80%.如果结合CTL反应动力学研究,更能反映疾病状态下,抗原特异性CTL的变化与疾病转归的规律.

3 讨论

HLA-表位肽四聚体技术可以同时直接对特异性CTL进行定性、定量分析,具有灵敏度高、特异性强,不需要体外增生、对细胞无损伤等优点,他克服了⁵¹Cr释放分析、LDA、PCR等方法的局限性.而且在部分研究中的应用是其他方法所不能够完成的,比如对抗原特异性CTL动力学的研究以及抗原特异性CTL增生能力的研究.然而,四聚体技术也有他自身的局限:(1)他必须具有明确的抗原表位,而且他所使用的抗原表位为单一的表位,难以反映整个抗原的全貌.(2)由于各种疾病状态都有多种抗原成分,并且每个抗原成分又有多个T细胞识别抗原表位,在免疫发病机制的研究中,需要对每个抗原表位进行仔细研究,工作量非常大.(3)四聚体染色是以特定细胞结构为研究对象,客观上还需要对这些细胞进行进一步的分群和功能方面的研究.(4)由于HLA-I类分子的多样性决定一种HLA-表位肽四聚体只能适用于该种HLA型,在研究中需要根据研究对象制备不同HLA亚型的四聚体,使前期工作难度加大.

4 参考文献

- 1 Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis

- of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1997;4(Suppl 2): 31-41
- 2 Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60
 - 3 Cerny AC, Hisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30:595-601
 - 4 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274: 94-96
 - 5 Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Kuroda M, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Phenotype and functional characteristics of HIV-specific cytotoxic CD8+ T cells in chronically infected patients: dual effects of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34: 255-266
 - 6 Radaelli A, Nacsa J, Tsai WP, Edghill-Smith Y, Zanutto C, Elli V, Venzon D, Trynieszewska E, Markham P, Mazzara GP, Panicali D, De Giuli MC, Franchini G. Prior DNA immunization enhances immune response to dominant and subdominant viral epitopes induced by a fowlpox-based SIVmac vaccine in long-term slow-progressor macaques infected with SIVmac251. *Virology* 2003;312:181-195
 - 7 Hel Z, Nacsa J, Kelsall B, Tsai WP, Letvin N, Parks RW, Trynieszewska E, Picker L, Lewis MG, Edghill-Smith Y, Moniuszko M, Pal R, Stevceva L, Altman JD, Allen TM, Watkins D, Torres JV, Berzofsky JA, Belyakov IM, Strober W, Franchini G. Impairment of Gag-specific CD8(+) T-cell function in mucosal and systemic compartments of simian immunodeficiency virus ma. *J Virol* 2001;75:11483-11495
 - 8 Falco DA, Nepomuceno RR, Krams SM, Lee PP, Davis MM, Salvatierra O, Alexander SR, Esquivel CO, Cox KL, Frankel LR, Martinez OM. Identification of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T lymphocytes in the circulation of pediatric transplant recipients. *Transplantation* 2002;74:501-510
 - 9 Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L, Manjunath N, Lieberman J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001;98:156-164
 - 10 Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik PLieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000;96:3094-3101
 - 11 Wang B, Chen H, Jiang X, Zhang M, Wan T, Li N, Zhou X, Wu Y, Yang F, Yu Y, Wang X, Yang R, Cao X. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein. *Blood* 2004;[Epub ahead of print]
 - 12 Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004;10:828-839
 - 13 Zerbini A, Pilli M, Soliani P, Ziegler S, Pelosi G, Orlandini A, Cavallo C, Uggeri J, Scandroglio R, Crafa P, Spagnoli GC, Ferrari C, Missale G. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+ cells in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;40: 102-109
 - 14 Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9358-9363
 - 15 Wolf M, Schalk S, Hellmich M, Huster KM, Busch DH, Berthold F. Quantitation of MHC tetramer-positive cells from whole blood: evaluation of a single-platform, six-parameter flow cytometric method. *Cytometry* 2004;57A:120-130
 - 16 Kosor E, Gagro A, Drazenovic V, Kuzman I, Jeren T, Rakusic S, Rabatic S, Markotic A, Gotovac K, Sabioncello A, Cecuk E, Kerhin-Brkljacic V, Gjenero-Margan I, Kaic B, Mlinaric-Galinovic G, Kastelan A, Dekaris D. MHC tetramers: tracking specific immunity. *Acta Med Croatica* 2003;57:255-259
 - 17 Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8384-8388
 - 18 Lopez-Labrador FX, He XS, Berenguer M, Cheung RC, Gonzalez-Candelas F, Wright TL, Greenberg HB. Genetic variability of hepatitis C virus non-structural protein 3 and virus-specific CD8+ response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2004;72:575-585
 - 19 Nakamoto Y, Kaneko S, Takizawa H, Kikumoto Y, Takano M, Himeda Y, Kobayashi K. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A*2402 peptide tetramers. *J Med Virol* 2003;70: 51-61
 - 20 Sarkar AK, Tortolero-Luna G, Nehete PN, Arlinghaus RB, Mitchell MF, Sastry KJ. Studies on in vivo induction of cytotoxic T lymphocyte responses by synthetic peptides from E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16. *Viral Immunol* 1995;8:165-174
 - 21 Delon J, Gregoire C, Malissen B, Darce S, Lemaitre F, Kourilsky P, Abastado JP, Trautmann A. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* 1998;9:467-473
 - 22 Abastado JP, Lone YC, Casrouge A, Boulout G, Kourilsky P. Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J Exp Med* 1995; 182:439-447
 - 23 Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell AL, Margulies DH. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265:946-949
 - 24 Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 1992; 356:793-796
 - 25 Xu XN, Screation GR. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods* 2002;268:21-28
 - 26 Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce anti-viral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75
 - 27 Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 1998; 187:1395-1402
 - 28 Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8:177-187
 - 29 Haridas V, McCloskey TW, Pahwa R, Pahwa S. Discordant expression of perforin and granzyme A in total and HIV-specific CD8 T lymphocytes of HIV infected children and adolescents. *AIDS* 2003;17:2313-2322
 - 30 Marchant A, Appay V, Van Der SM, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, Kaye S, Ojuola O, Gillespie GM, Vargas Cuero AL, Cerundolo V, Callan M, McAdam KP, Rowland-Jones SL, Donner C, McMichael AJ, Whittle H. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 2003;111:1747-1755
 - 31 Dunbar PR, Ogg GS, Chen J, Rust N, van der BP, Cerundolo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 1998;8:413-416
 - 32 Rubio V, Stuge TB, Singh N, Betts MR, Weber JS, Roederer M, Lee PP. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 2003;9:1377-1382

- 33 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 34 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
- 35 Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-1396
- 36 Wu Y, Zhang J, Chen S, Chen A, Wang L, Li J, Zhao T, Zou L, Tang Y, Tingrong L, Wang F. Frequencies of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in active chronic viral hepatitis B infection by using MHC class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2004;92:253-258
- 37 Lee CK, Suh JH, Cho YS, Han KH, Chung JB, Chon CY, Moon YM. Direct Analysis of HBV-Specific CD8+ Lymphocyte By Tetrameric HLA-A2/core 18-27 Complex in chronic hepatitis B. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8:139-148
- 38 Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000;30:2479-2487
- 39 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458
- 40 Belz GT, Xie W, Doherty PC. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza A virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2001;166:4627-4633
- 41 He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis M, MGreenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5692-5697
- 42 Lauer GM, Nguyen TN, Day CL, Robbins GK, Flynn T, McGowan K, Rosenberg ES, Lucas M, Klenerman P, Chung RT, Walker BD. Human immunodeficiency virus type 1-hepatitis C virus coinfection: intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 2002;76:2817-2826
- 43 Tsai SL, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Huang HC, Chuang YL, Lee TH, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci* 2003;10:120-135
- 44 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
- 45 Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo G, CLiaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8+ 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
- 46 Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78
- 47 Grabowska AM, Lechner F, Klenerman P, Tighe PJ, Ryder S, Ball JK, Thomson BJ, Irving WL, Robins RA. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2388-2394
- 48 Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Goulder PJ, Kelleher A, Sewell AK, O'Callaghan CA, Rowland-Jones SL, Callan MF, McMichael AJ. Oligoclonal expansions of CD8(+) T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J Exp Med* 1998;188:785-790
- 49 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+ T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* 2001;14:59-69
- 50 Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423-12434
- 51 Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Levrero M, De Carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994;369:407-410
- 52 Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991;354:453-459
- 53 Bertoletti A, Southwood S, Chesnut R, Sette A, Falco M, Ferrara GB, Penna A, Boni C, Fiaccadori F, Ferrari C. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 1997;26:1027-1034
- 54 Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F, Bertoletti GJ, Bertoletti A. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000;30:3067-3078
- 55 Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertoletti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000;32:1117-1124
- 56 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 57 Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000;243:147-154
- 58 Turner SJ, Cross R, Xie W, Doherty PC. Concurrent naive and memory CD8(+) T cell responses to an influenza A virus. *J Immunol* 2001;167:2753-2758
- 59 Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 2002;168:834-838