

**PD-1 COMO MARCADOR DE AGOTAMIENTO CLONAL EN INFECCIONES
PERSISTENTES.**

MÓNICA LLANO MURCIA



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
FACULTAD DE CIENCIAS.
BOGOTÁ.
2011.**

**PD-1 COMO MARCADOR DE AGOTAMIENTO CLONAL EN INFECCIONES
PERSISTENTES.**

Mónica Llano Murcia
MÓNICA LLANO MURCIA

Trabajo de grado


ADRIANA CUELLAR AVILA, PhD.
Directora


SANDRA QUIJANO GOMEZ, PhD.
Par evaluador

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
FACULTAD DE CIENCIAS.
BOGOTÁ.
2011**

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN #13 DE 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Justificación	1
3. Introducción	2
4. Objetivos	2
4.1 Objetivo General	2
4.2 Objetivos Específicos	2
5. Metodología	3
6. Marco teórico (Resultados y Discusión)	3
6.1 Generalidades de la respuesta inmune	3
6.2 Activación de Linfocitos T	7
6.3 Agotamiento clonal de Linfocitos	8
6.4 ¿Qué es PD-1 y cómo se comporta en la respuesta linfoide?	10
6.5 Mecanismos de inhibición al LT por PD-1	12
6.6 PD-1 y autoinmunidad	13
6.7 PD-1 en el agotamiento clonal en infecciones persistentes	14
6.8 PD-1 y cáncer	16
7. Conclusiones	18
8. Recomendaciones	19
9. Referencias	19

PD-1 como marcador de agotamiento clonal en infecciones persistentes

1. Resumen

La molécula de muerte programada PD-1 (del inglés *programmed death 1*) regula la respuesta inmune adaptativa, controlando la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos T en una respuesta inmune controlada y además se le ha atribuido un papel muy importante en el mantenimiento de la tolerancia central y periférica (Nishimura, 2000; Okasaki, 2006). Sin embargo, se ha observado un aumento en el nivel de expresión de esta molécula en las células linfoides en modelos animales y humanos de infecciones crónicas y enfermedades tumorales (Dong, 2002; Barber, 2006; Day, 2006; Urbani, 2006; Boni, 2007; Bhadra, 2011; Lu, 2011). Es por esto que se revisó la literatura disponible sobre PD-1, su papel en la respuesta inmune y sobre los niveles de expresión de esta molécula en células de pacientes con enfermedades tumorales e infecciones crónicas.

2. Justificación

El estímulo antigénico persistente en infecciones crónicas, se ha asociado al fenómeno de agotamiento clonal en las células linfoides, el cual se asocia con la expresión de moléculas como PD-1 (Campbell, 2009; Wherry, 2011; Akbar, 2011). Aumento en la expresión de esta molécula ha sido reportado en linfocitos T específicos de pacientes con infección crónica por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus de la hepatitis C (HCV) entre otros (Blackburn, 2009), así como en algunos modelos de cáncer (Waldman, 2006). Teniendo en cuenta que algunos trabajos muestran que el bloqueo de la molécula PD-1 permite la restauración de la función efectora de los linfocitos y una mejor respuesta a los microorganismos (Bhadra, 2011).

Dentro de los grupos de Inmunobiología y Biología Celular y de Enfermedades Infecciosas, existe el interés por estudiar el fenómeno de agotamiento clonal en linfocitos de pacientes con enfermedad de Chagas, causada por la infección persistente con el parásito *Trypanosoma cruzi*. El desarrollo de esta monografía contribuye al conocimiento del estado del arte sobre el papel de la molécula PD-1 en el fenómeno de agotamiento clonal y permite abordar la discusión de los resultados obtenidos a la luz de la literatura científica disponible.

3. Introducción

El Sistema Inmune (SI) cumple con dos funciones de vital importancia en el organismo, la primera consiste en tolerar antígenos propios y antígenos sin potencial patógeno como la flora comensal, los antígenos ambientales y de alimentos. Por otro lado, tiene la función de eliminar los microorganismos patógenos. Para poder llevar estas dos funciones el SI cuenta con múltiples componentes tanto humorales como celulares que le permiten cumplir con esto de una forma correcta, y de esta manera mantener la homeostasis del organismo.

Sin embargo, algunos microorganismos y tumores han encontrado la forma de evadir la respuesta inmune para poder establecer en su hospedero patologías crónicas de base infecciosa o tumoral, uno de estos tantos mecanismos ha sido encontrado en la molécula de PD-1 a la cual se le han atribuido funciones como limitar la respuesta inmune en una infección controlada y ayudar al mantenimiento de la tolerancia tanto central como periférica.

En esta monografía se incluyó la información relevante encontrada en los artículos científicos sobre PD-1 que fueron seleccionados con los criterios de inclusión para poder lograr un entendimiento general de los aspectos de la molécula, asociar sus niveles de expresión con la disfunción linfoide y contribuir al entendimiento del papel de PD-1 en agotamiento clonal en linfocitos de pacientes con enfermedad de Chagas, causada por la infección persistente con el parásito *Trypanosoma cruzi*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Revisar la literatura disponible sobre la molécula PD-1 y su relación con la disfunción linfoide.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la evidencia disponible del papel de la molécula PD-1 en la respuesta inmune.
- Analizar la relación entre los niveles de expresión de la molécula PD-1 y su efecto en la respuesta inmune en cáncer, autoinmunidad e infecciones crónicas.

5. Metodología

La metodología que se utilizó en este trabajo fue la revisión de literatura (artículos científicos) en bases de datos como son PubMed, Science Direct, Ebsco, Annual Reviews, MedLine, Elseiver, ISI, etc.

Las palabras clave usadas para la búsqueda fueron: Agotamiento clonal, Linfocito T, PD-1, Infecciones Persistentes, autoinmunidad, cáncer.

Los artículos incluidos cumplieron con los siguientes requisitos:

- Tener información relevante sobre generalidades de la respuesta inmune, activación de linfocitos T y de PD-1 y su influencia en el agotamiento clonal de linfocitos y en infecciones persistentes.
- Los artículos fueron publicados en revistas de alto impacto en la comunidad científica.
- Estar entre los años 2005 hasta hoy, aunque se incluyeron artículos anteriores ya que contaban con información relevante.

Los artículos escogidos se revisaron, se leyeron y se extrajo lo relevante de cada uno para la monografía. Se pusieron en un orden coherente para lograr un entendimiento general de todos los aspectos de la molécula.

6. Marco teórico (Resultados y Discusión)

6.1. Generalidades de la respuesta inmune

El Sistema Inmune (SI) contribuye a mantener la homeostasis del organismo permitiendo la eliminación de microorganismos patógenos y tolerando aquellos componentes que cumplen funciones benéficas o que no tienen un potencial patogénico tal como la flora comensal, antígenos ambientales o de los alimentos. La respuesta inmune se compone de dos mecanismos de defensa cuya interrelación permite el adecuado funcionamiento de la inmunidad, definidos como inmunidad innata e inmunidad adaptativa. En la inmunidad innata se encuentran las barreras físicas y químicas como el tejido epitelial, el moco, el pH y los cilios epiteliales que evitan el ingreso de los microorganismos (Chaplin, 2010). El componente humoral que está conformado por proteínas del complemento,

citocinas, quimiocinas, reactantes de fase aguda y proteínas de la coagulación con distintas funciones, pero con el fin de promover la inflamación (Sjoberg, 2009). Células como neutrófilos, monocitos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células natural killer (NK), cada una con una función diferente pero con un objetivo común, actuar como primera línea de defensa y favorecer posteriormente el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Estas células se caracterizan porque no tienen la capacidad de generar memoria inmunológica y expresan receptores que están codificados en la línea germinal, que aunque no presentan un alto grado de especificidad, permiten detectar señales de peligro endógenas o provenientes de microorganismos (Chaplin, 2010).

La inmunidad adaptativa se caracteriza por su alto grado de especificidad debido a la expresión de receptores codificados por segmentos génicos que han sufrido recombinación somática y se expresan en las células linfoides. Está compuesta por linfocitos T (LT) y B (LB), los cuales son los responsables de generar y mantener memoria inmunológica por largos periodos de tiempo, permitiendo una respuesta más rápida y eficiente en encuentros posteriores con el antígeno (Chaplin, 2010).

En general, la población de linfocitos T convencionales, se caracteriza por la expresión de un receptor de antígeno de la célula T (TCR), compuesto por dos cadenas (alfa y beta), responsable del reconocimiento del péptido derivado del antígeno presentado en contexto de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Asociado al TCR se encuentra el complejo molecular CD3, que consiste en las cadenas transmembranales CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , y dos cadenas de CD3 ζ , estas últimas con largas colas citoplasmáticas, responsables de la generación de señales intracelulares que contribuyen a la activación de las células linfoides (Bonilla, 2010).

La población de LT se caracteriza por tener subpoblaciones con funciones efectoras como secreción de citocinas y/o actividad citotóxica. Los LT CD4+, también denominados LT Helper – LTh (colaboradores), son la principal fuente de citocinas que contribuyen a la regulación de la activación de LB productores de anticuerpos, a la actividad de células de la inmunidad innata o de los epitelios y además, colaboran con la actividad efectora citotóxica para la eliminación de los microorganismos en LT CD8+ y células NK.

Los LT CD4+ se pueden polarizar en células efectoras o células reguladoras de acuerdo con el tipo de citocinas que secretan. Células efectoras que contribuyen a la amplificación de la respuesta inmune como Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22 y como

células con función reguladora como Tr1 o Th3 (Zheng, 1997; Szabo, 2000; Kaiko, 2007; Chaplin, 2010). La polarización de los LT CD4+ depende de factores como la citocina predominante presente en el microambiente, las moléculas co-estimuladoras, el tipo y la cantidad de antígeno presentado y las cascadas de señalización generadas al interior de las células. Esta polarización esta mediada por mecanismos moleculares como el control de genes por cascadas de señalización, remodelamiento de la cromatina y factores epigenéticos como son la acetilación, fosforilación y metilación del DNA. El proceso por el que las células se polarizan son: 1) activación de los genes de las citocinas presentes en el ambiente, 2) compromiso del LTh a cierto fenotipo efector, 3) supresión de los genes de las otras citocinas y 4) estabilización y potencialización del fenotipo (Kaiko, 2007).

Las células Th1 se caracterizan por la secreción de citocinas como interferón gamma (IFN γ), Factor de Necrosis Tumoral beta (TNF β) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) los cuales permiten que estas células sean efectivas en la protección frente a patógenos intracelulares y células tumorales, es decir las células Th1 median la respuesta inmune celular. La polarización a células Th1 se inicia con la secreción de interleucina 12 (IL-12) y de interferones de tipo 1 (IFN α e IFN β) por parte de los macrófagos y células dendríticas (CD) al ser activadas por algunos microorganismos. La IL-12 induce la producción de IFN γ en las células T, el cual actúa de forma paracrina sobre las CD y los macrófagos como un mecanismo de retroalimentación positiva para la producción de IL-12. Esta citocina tiene la capacidad de activar células NK que se constituyen en otra fuente de IFN γ , contribuyendo al sostenimiento de la producción de IL-12 en las células presentadoras de antígeno (CPA). El IFN γ actúa también como inhibidor de la polarización hacia el fenotipo Th2, actuando como una molécula reguladora de la polarización linfoide (Kaiko, 2007).

Las células Th2 median la respuesta inmune humoral ya que secretan citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, entre otras. Estas citocinas tienen la capacidad de regular la producción de anticuerpos, mediando la activación de linfocitos B (LB) y el cambio de isotipo. Para la polarización al fenotipo Th2, se han descrito citocinas en el microambiente como IL-4, IL-6, IL-10 e IL-11, siendo la IL-4 la principal citocina, dado que las CD no secretan esta citocina, la fuente principal son los eosinófilos, mastocitos o células NK presentes en el microambiente (Kaiko, 2007).

Los LT CD4+ Th17 fueron recientemente descritos y se ha encontrado que están predominantemente en los pulmones y en la mucosa digestiva y parecen estar involucrados en las enfermedades autoinmunes y en la respuesta a bacterias

extracelulares. Secretan IL-17, IL-6, IL-22 y TNF α , citocinas con actividad directa sobre fibroblastos, macrófagos y células del endotelio y epitelio para aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias. La polarización a esta clase de LT se da en respuesta al factor de crecimiento transformante beta (TGF β) y citocinas pro inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 (Manel, 2008; Yang, 2008). Al igual que las Th17 la población de LT Th9 ha sido descrita recientemente y se caracterizan por la producción de IL-9 (citocina que es también secretada por los linfocitos Th2), esta citocina se ha visto involucrada en alergias y en respuesta a helmintos y se polarizan en respuesta al TGF β y a la IL-4 (Dardalhon, 2008; Veldhoen, 2008). El TGF β es necesario para la polarización de los Th17 y Th9 siempre y cuando este acompañado de otras citocinas, ya que si el TGF β se encuentra solo en el microambiente inducirá la polarización de otra subpoblación de LT CD4+, los LT reguladores (Treg) (Kaiko, 2007; Dardalho, 2008).

Otra subpoblación recientemente caracterizada es la de LT Th22, que tienen la capacidad de infiltrar la epidermis de individuos con desordenes inflamatorios cutáneos y secretar IL-22 y TNF α . La función de la IL-22 no está claramente descrita hasta el momento aunque se ha visto que promueve la respuesta inmune innata en el epitelio (Eyerich, 2009), por ejemplo, se ha mostrado que la IL-22 actúa sinérgicamente con la IL-17 para la producción de citocinas inflamatorias en el epitelio de los bronquios (Aujla, 2008) y en miofibroblastos del colon (Andoh, 2005). La polarización a esta clase de linfocitos está dada por la presencia de IL-6 y TNF α en el medio (Duhén, 2009).

La población de LTreg es muy importante ya que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la auto tolerancia periférica; se ha visto en modelos de ratones y pacientes humanos que la deficiencia en esta subpoblación celular conlleva al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Sakaguchi, 2005), los LTreg también están involucrados en controlar la respuesta inmune contra agentes infecciosos y se ha demostrado que son perjudiciales para la inmunidad antitumoral (Wang, 2004).

Los LTreg se distribuyen en dos subpoblaciones, conocidas como LTreg naturales y LTreg inducidos. Los LTreg naturales desarrollan su función reguladora en el timo y se caracterizan por la expresión de moléculas de membrana como CD4 y CD25 y por la expresión nuclear de la proteína Foxp3, la cual es un factor de transcripción esencial en su desarrollo. La actividad inmunomoduladora de esta subpoblación se debe a la secreción de citocinas como TGF β e IL-10, las cuales pueden actuar en forma paracrina o haciendo contacto célula-célula en donde el TGF β está asociado a la membrana del linfocito T y ejerce su función reguladora

desde la membrana del LTreg. Los LTreg inducidos o adaptativos reciben su nombre ya que su diferenciación se origina en respuesta a un antígeno específico y depende de la presencia de IL-10 en el medio durante su activación; a diferencia de los LTreg naturales, en esta subpoblación, la expresión de Foxp3 es variable y la IL-10 es la citocina prominente acompañada de TGF β (Chaplin, 2010).

6.2. Activación de Linfocitos T

La activación de los LT por las células presentadoras de antígeno (CPA) es un proceso clave para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Bogle, 2010), esta activación ocurre en los tejidos linfoides secundarios y requiere la interacción de receptores de antígeno, moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras.

El reconocimiento del antígeno por parte del LT y su posterior activación (procesos centrales en la respuesta inmune adaptativa) necesita de una interacción física entre el LT y la CPA, ésta interacción tiene como resultado el ensamblaje de una estructura compleja, la cual es conocida como “sinapsis inmunológica”; esta interacción, da como resultado un cambio morfológico en el LT debido al reordenamiento que sufre el citoesqueleto de la célula el cual ocurre casi inmediatamente después del reconocimiento del antígeno; además de los cambios morfológicos, en la sinapsis inmunológica se encuentran interacciones receptor-ligando y moléculas de señalización que juegan un papel importante en el reconocimiento del antígeno los cuales están organizados en dominios distintos o en grupos de activación moleculares (SMACs del inglés *supramolecular activation clusters*) en la interfaz LT-CPA (Thauland, 2010).

Durante la sinapsis inmunológica, el TCR transmite señales hacia el núcleo para activar factores de transcripción a través del complejo CD3; todas las cadenas que componen el complejo CD3 tienen en su región citoplasmática motivos denominados ITAMS (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) que al ser fosforiladas por las quinasas Lck y Fyn se activan y desencadenan una cascada de señalización que involucra gran cantidad de proteínas quinasas como son ZAP-70, LAT y SLP-76. Estas cascadas de señalización estimulan la activación de la fosfolipasa C, las proteínas G, Rag, Ras, proteína quinasa C y las proteínas quinasas asociadas a mitógenos; esta señalización celular permite la activación de genes que controlan la proliferación y la diferenciación de los LT. La interacción del complejo CD3/TCR con el péptido presentado en el CMH de la CPA produce una señal parcial para la activación, siendo necesaria la participación de señales coestimuladoras, proporcionadas por moléculas como CD28 y CD80 presentes en el LT y CD86 presentes en la CPA. Si sólo se da la

primera señal (TCR-CMH) sin la coestimulación el LT quedará anérgico por tanto no podrá generar respuesta efectora (Nurieva, 2009; Chaplin, 2010).

La sinapsis inmunológica y las señales coestimuladoras activan diversas cascadas de señalización que dirigirán la proliferación de los LT gracias a la transcripción de diversos genes como el de la IL-2. La IL-2 es sintetizada y secretada por el LT activado ejerciendo una actividad autocrina gracias a los receptores de IL-2 que expresa el LT cuya expresión también es inducida por activación y tiene la capacidad de controlar la proliferación y la diferenciación de los LT que han sido activados. Cuando la IL-2 se une a su receptor se induce la división del LT siendo esta fase de vital importancia en la respuesta a un antígeno ya que estimula al LT a proliferar y generar células efectoras específicas de un antígeno logrando contribuir a combatir la infección (Chaplin, 2010).

Cuando los LT son activados adquieren funciones efectoras como citotoxicidad mediada por granzimas y perforinas y producción de citocinas tales como IFN γ , TNF α , e IL-2 (Kaech, 2002). Al eliminar la infección aguda, el 90-95% de células efectoras mueren por apoptosis, y las células que sobreviven adquieren el fenotipo de memoria (Williams, 2007), con propiedades como la habilidad de reactivar sus funciones efectoras, la capacidad proliferativa tras un segundo encuentro con el antígeno, la readquisición de receptores para la migración a los órganos linfoides secundarios, y la habilidad de mantenerse en un tiempo muy prolongado sin la estimulación antigénica debido a la presencia de IL-7 e IL-5 (Kaech, 2002; Schluns 2003; Wherry, 2004).

6.3. Agotamiento clonal de linfocitos

A diferencia de lo que ocurre en infecciones que inducen inmunidad esterilizante, se ha descrito que la población de células de memoria se ve afectada por la persistencia de un estímulo antigénico constante como ocurre en las infecciones crónicas y en cáncer (Anichini, 2004; Wherry, 2011), esto hace que ocurra una pérdida progresiva de las funciones del LT, fenómeno conocido como “agotamiento clonal”, entrando en un estado de disfunción celular (Jin, 2011).

El agotamiento clonal fue descrito por primera vez en el modelo murino de infección por el Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV), donde se observó la pérdida gradual de funciones efectoras de LT específicos frente al estímulo antigénico persistente (Zajac, 1998). Desde este momento el agotamiento ha sido demostrado en una gran variedad de infecciones crónicas de varios modelos animales y humanos como son el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

(Day, 2006), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) (Velu 2009), virus de la hepatitis B (HBV) (Das, 2008), virus de la hepatitis C (HCV) (Urbani, 2006), infecciones bacterianas y parasitarias (Virgin, 2009), así como en cáncer (Lee, 1999). El grado de disfunción difiere según el modelo y el agente infeccioso, por ejemplo los LT específicos para HIV agotados presentan defectos en la citotoxicidad pero tienen la capacidad de producir IFN γ (Betts, 2006), a diferencia de los LT específicos para HCV que han perdido esta función (Lechner, 2000).

El fenómeno de agotamiento se da como resultado de factores tanto intrínsecos como extrínsecos de los LT (Jin, 2011), factores extrínsecos como la persistencia antigénica, anomalías o pérdidas de los LT CD4 $^{+}$ (Brooks, 2005), presentación de antígeno deficiente, presencia de células T reguladoras y la presencia de citocinas inmunoregulatoras como interleucina 10 (IL-10) (Maris, 2007) y como factor intrínseco está la expresión de receptores inmunorreguladores como PD-1 y CTLA-4, entre otros (Barber, 2006; Virgin, 2009).

Los LT CD4 $^{+}$ activan las células dendríticas las cuales son fundamentales para que el LT CD8 $^{+}$ reconozca su antígeno y además secretan citocinas como IL-2 e IL-21 que le permiten al LT CD8 $^{+}$ cumplir con sus funciones efectoras (Nakanishi, 2009). Cuando existen defectos en esta población celular, se encuentran alteraciones en la generación de respuesta efectora y de los LT CD8 $^{+}$ de memoria (Bevan, 2004), por ejemplo, la presencia de IL-21 producida por los LT CD4 $^{+}$ es muy importante en las infecciones crónicas ya que la ausencia de esta conlleva a que el LT CD8 $^{+}$ pierda la capacidad de producción de IFN γ , TNF α e IL-2 y a un incremento en la expresión de PD-1 (Elssaeser, 2009; Frolich, 2009; Yi, 2009).

Las citocinas inmunoregulatoras tienen un efecto antiinflamatorio, pues afectan los LB, bloquean las funciones de las CPA, moderan las respuestas efectoras de los LT y disminuyen la producción de citocinas inflamatorias (Moore, 2001; Pestka, 2004), la IL-10 es un ejemplo de este tipo de citocinas y se ha encontrado que está sobre-expresada en el modelo crónico de la infección por LCMV en ratón. En este mismo modelo, se mostró que el bloqueo de IL-10 se asocia con la disminución en la carga viral, en la expresión de PD-1 y una mejora de la respuesta inmune del hospedador (Brooks, 2006; Ejrnaes, 2006; Maris, 2007). Sin embargo, la relación existente entre los efectos directos entre IL-10 y PD-1 en el agotamiento no está clara y se cree que estas moléculas participan de manera independiente en la disfunción celular (Brooks, 2008).

En condiciones normales los LT activados expresan receptores inhibitorios para

limitar la respuesta inmune, cuando la infección es resuelta, posterior a la formación de LT de memoria, el nivel de expresión de estos receptores disminuye. Un ejemplo de estos receptores es la molécula PD-1 la cual tiene además un papel fisiológicamente importante en el mantenimiento de la tolerancia central y periférica (Wherry, 2007; Blackburn, 2009) Sin embargo, en modelos de infección crónica persistente se ha mostrado que las moléculas inhibitorias no disminuyen su nivel de expresión (especialmente PD-1) sino que por el contrario, estos niveles van aumentando y se mantienen expresados constantemente, lo cual está directamente relacionado con el agotamiento clonal (Barber, 2006; Wherry, 2007; Jin, 2011). Para soportar la relación de la expresión constante de PD-1 con el agotamiento clonal, se evidenció que el bloqueo de PD-1 en el modelo de infección crónica por LCMV restaura las funciones del LT y se disminuye la carga viral (Barber, 2006).

Existen otros receptores inhibitorios que se han visto asociados al agotamiento como LAG-3 (del inglés *Lymphocyte-activated gene-3*) (Blackburn, 2009), CTLA-4 (del inglés *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) (Kaufmann, 2007; Nakamoto, 2009) y TIM-3 (del inglés *T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3*) (Jones, 2008; Golden-Mason, 2009), pero hasta el momento el receptor inhibitorio mejor caracterizado para el agotamiento clonal es PD-1.

6.4. Que es PD-1 y cómo se comporta en la respuesta linfoide

La molécula de muerte programada (PD-1 del inglés *Programmed Death 1*) (también conocida como CD279) es una proteína de 288 aminoácidos compuesta por un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático que contiene ITIMS (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory based*) e ITSM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) y está codificado por el gen *pdcd1* el cual se encuentra en el cromosoma 1 en los ratones y en los humanos en el cromosoma 2 (Keir, 2008).

Pertenece a la familia CD28 (Okazaki, 2006) pero a diferencia de los otros miembros de esta familia se encuentra como un monómero en la membrana celular y no puede formar dímeros ya que no cuenta con una cisteína extracelular que es la que permite la dimerización de CD28 y CTLA-4 (Zhang, 2004).

Su expresión es inducida por las señales del TCR (Agata, 1996) al momento de la activación del LT y también puede ser inducida por el estrógeno (Polanczyk, 2006), esta expresión se ve disminuida por la crio-preservación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (Campbell, 2009) y se ha demostrado

que el factor de transcripción T-bet reprime la transcripción del gen que codifica para PD-1 mejorando la respuesta inmune del hospedero frente a infecciones crónicas (Kao, 2011).

PD-1 es una molécula que se encuentra expresada en timocitos (Nishimura, 2001; Blank, 2003) LT activados y LB (Agata, 1996). Cuando PD-1 se une a sus ligandos PD-L1 (CD274) (ampliamente distribuido en los tejidos) o PD-L2 (CD273) (presente exclusivamente en las células presentadoras de antígeno) se transmite una señal que inhibe la proliferación celular, la producción de citocinas o la actividad citolítica de las células T atenuando la respuesta inmune y manteniendo la tolerancia central (Nishimura, 2000) y periférica (Okasaki, 2006).

PD-1 se expresa cuando está ocurriendo el rearreglo del TCR en el paso de timocitos doble negativos (DN) CD4-CD8- a doble positivos (DP) CD8+CD4+. Cuando PD-1 se une a sus ligandos PD-L1 expresado en la corteza tímica o PD-L2 expresado en la médula tímica, se restringe la selección positiva. Si existe una sobreexpresión de PD-1 la selección positiva se inhibe y en el caso contrario, cuando existe una disminución en la expresión de PD-1 o de sus ligandos la selección positiva aumenta y tiene como resultado el aumento de los timocitos DP (Nishimura, 2000; Keir, 2005; Keir, 2007). El papel de PD-1 en la tolerancia periférica fue sugerido al encontrar que ratones knockout PD1-/- desarrollan enfermedades autoinmunes de forma espontánea (Nishimura, 1998), a diferencia de la deficiencia de CTLA-4, la cual hizo que los ratones desarrollaran enfermedades linfoproliferativas y murieran 3 o 4 semanas después de su nacimiento (Tivol, 1995).

Otros hallazgos que soportan el papel de PD-1 en la tolerancia periférica es la expresión de sus ligandos en tejidos inflamados de ratones y humanos para limitar la respuesta inmune y evitar que progrese el daño al tejido (Eppihimer, 2002; Mazanet 2002; Wiendl, 2003) y además la presencia de PD-L1 en la barrera inmunológica feto-madre la cual contribuye a mantener la tolerancia necesaria en el embarazo para evitar el rechazo del feto (Guleria, 2005). El papel de PD-1 en mantener la tolerancia periférica se debe a la amplia distribución de su ligando PD-L1 en tejidos no linfoides y PD-L2 en tejidos linfoides ya que si algún LT autoreactivo activado encuentra su tejido blanco, PD-1 se unirá a su ligando inhibiendo la función efectora del LT evitando así el daño al tejido y previniendo la autoinmunidad en al menos dos ambientes diferentes como son el tejido linfoide y no linfoide.

Como se vio, la molécula PD-1 es de vital importancia en el mantenimiento de la

tolerancia periférica y central contribuyendo a evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes, pero su expresión ha sido usada como uno de los mecanismos de escape inmunológico de las células tumorales para la progresión del cáncer y para el establecimiento de una infección crónica por ciertos microorganismos alterando la vía PD-1: PD-L1 (Keir, 2008).

6.5. Mecanismos de inhibición al LT por PD-1

PD-1 puede inhibir la activación o limitar las funciones de LT cuando se une a sus ligandos; evita los eventos de señalización, cohibe a la célula la toma de glucosa del medio, acelera la apoptosis de LT o inhibe el contacto con la CD. PD-1 inhibe los eventos de señalización próximos a la membrana de LT al reclutar la proteína tirosina fosfatasa (SHP-1 ó SHP-2) por los ITSM presentes en la cola citoplasmática evitando la fosforilación de las enzimas Lck y Fyn que a su vez fosforilarán los ITAMS presentes en el complejo CD3 los cuales son eventos cruciales en la activación de los LT (Okazaki, 2007; Riley, 2009; Chaplin, 2010). Adicionalmente, PD-1 también puede inhibir las funciones de LT cohibiendo a la célula la toma de glucosa del medio, la cual es fundamental para que el linfocito tenga energía para realizar las funciones. En una activación normal, las moléculas coestimuladoras como CD28 e ICOS reclutan la subunidad catalítica de la proteína fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) (Rudd, 2003) la cual se fragmenta tras su activación y actúa sobre la proteína AKT que activará vías de señalización como las vías que están involucradas en el incremento de la expresión de transportadores de glucosa en la membrana plasmática (Fox, 2005). Cuando PD-1 se une a sus ligandos se bloquea la actividad de la PI3K dejando la AKT sin activación, el metabolismo de la glucosa se verá bloqueado y no se dará la activación del LT por la supresión de glucosa, necesaria para realizar funciones como la proliferación de los LT inducida por el encuentro con el antígeno (Riley, 2009). La acción de PD-1 sobre AKT puede ser bloqueada por la IL-2 ya que esta tiene la capacidad de activar la AKT por medio de otra vía de señalización (Parry, 2005; Riley, 2009).

PD-1 utiliza una tercera forma para limitar las funciones del LT al acelerar la apoptosis de éste ya que esta molécula inhibe la expresión de la proteína antiapoptotica Bcl-xL y factores de transcripción asociados con funciones efectoras como GATA-3, T-bet y Eomes (Chemnitz, 2004; Nurieva, 2006), este bloqueo parece ser muy eficiente a comparación del bloqueo dado por CTLA-4 ya que éste tiene un efecto contrario, es decir aumenta la expresión de la proteína Bcl-xL (Blair, 1998) por lo que es concluyente que la estimulación dada por PD-1 hace que las células tengan mayor susceptibilidad a la apoptosis que otras (Riley,

2009).

Por último, PD-1 tiene la capacidad de inhibir el contacto de la CD y el LT en el momento de la activación contribuyendo a la motilidad del LT, evitando el contacto prolongado con la CD para su activación (Fife, 2009).

6.6. PD-1 y autoinmunidad

La vía PD-1: PD-L1/2 controla la tolerancia periférica de varias maneras:

- Limita la fase de activación y expansión del LT auto-reactivo (Francisco, 2010).
- Restringe la función efectora del LT auto-reactivo en los órganos blanco (Francisco, 2010).
- Inhibe la expansión de LT vírgenes autoreactivos ó su diferenciación a célula efectora (Francisco, 2010).
- Regula negativamente la reactivación, expansión y las funciones del LT efector (Keir, 2006).
- Restringe la extravasación de los LT a los órganos blanco cuando PD-1 hace contacto con PD-L1 ubicado en las células endoteliales (Grabie, 2007).
- Regula la interacción entre LTreg y entre LT efector y controla el desarrollo, mantenimiento y función de los LTreg (Francisco, 2010).
- Las CD expresan en su membrana los ligandos para PD-1. Cuando un LT está reconociendo su antígeno en la CD la unión de PD-1 a su ligando puede tener dos caminos, el primero es que la célula T se convierta en célula efectora o el segundo camino es que se convierta en reguladora (Probst, 2005).

Uno de los mecanismos para mantener la tolerancia periférica además de la vía PD-1: PD-L1 es el subconjunto de los LT reguladores. Se ha observado, que la unión de PD-1 con PD-L1/PD-L2 en CD favorece la generación de LTregs. Cuando CD carecen de PD-L1 existe una deficiencia en la generación de LTregs inducidos (Francisco, 2009). Además, la vía PD-1:PD-L1 aumenta y mantiene la expresión de Foxp3 en los LTreg y mejora la actividad supresora de esta subpoblación (Sauer, 2008). Los LT toman un fenotipo regulador al hacer contacto con la célula dendrítica pero en el medio tiene que estar presente TGF β , mientras

que si hay un estímulo persistente del antígeno y no hay presencia de esta citocina el LT tomará un fenotipo de agotamiento (Francisco, 2010).

Si alguno de estos mecanismos es alterado, la tolerancia periférica se romperá y tendrá como consecuencia el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Esto fue evidente en modelos murinos donde se induce la no expresión o el bloqueo de PD-1 y se tiene como resultado el desarrollo de enfermedades autoinmunes como diabetes tipo I, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, artritis, hepatitis autoinmune, entre otras (Fife, 2011).

6.7. PD-1 en el agotamiento clonal en infecciones persistentes

El papel de PD-1 en el agotamiento clonal fue evidente al comparar la expresión de PD-1 en LT específicos del LCMV entre un modelo de infección crónico y agudo, en donde se encontró que LT específicos del LCMV en un modelo crónico expresaban altos niveles de PD-1 de forma constante, mientras que en el modelo agudo, había expresión de PD-1 en LT efectores pero esta expresión ya no era detectable cuando la infección era aclarada, por lo que se asoció la expresión de PD-1 con el agotamiento que ocurría en el modelo crónico de la infección. En este mismo experimento se reportó como el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1 restauraba la proliferación, producción de citocinas, actividad citolítica del LT y la disminución de la carga viral (Barber, 2006).

Desde este momento el papel de PD-1 en infecciones crónicas como HIV (Day, 2006), HCV (Urbani, 2006), HBV (Boni, 2007), Toxoplasmosis (Bhadra, 2011), y en enfermedades crónicas no infecciosas como cáncer ha sido estudiado y demostrado por diversos grupos de investigación y es de interés común ya que en la vía PD-1: PD-L1 se podría encontrar estrategias terapéuticas (Day, 2006; Mueller, 2008) para mejorar la salud de los pacientes que padecen estas enfermedades ya que todas son consideradas como problemas de salud pública.

La infección de HCV es un ejemplo de infección crónica; en este modelo se pudo encontrar que los LT CD8+ de pacientes crónicos expresaban mayores niveles de PD-1 que los LT CD8+ de individuos sanos, además observaron que la proteína core del HCV era la responsable de inducir la expresión de PD-1 en los LT al estimular células de individuos sanos con esta proteína y detectar una sobreexpresión del gen que codifica para PD-1 y al igual que en el modelo de LCMV, el bloqueo in vitro de la vía PD-1:PD-L1 mejoró la función efectora de los LT (Frazier, 2010).

En otro estudio aislaron los LT CD8 específicos de HCV en pacientes crónicos de sangre periférica e intrahepáticos para evaluar la expresión de PD-1 en los diferentes compartimentos y el resultado del bloqueo PD-1: PD-L1 en ambos casos. Se encontró que ambos expresaban el fenotipo de agotamiento, pero los LT intrahepáticos expresaban mayores niveles de PD-1, además el bloqueo de PD-1 en los LT de sangre periférica restauró la función efectora pero este mismo efecto no se vio en los LT extraídos del hígado del paciente; concluyendo así que la disfunción y la respuesta al bloqueo de PD-1:PD-L1 está definida por la compartimentalización y el nivel de expresión de PD-1 (Nakamoto, 2008).

Otro modelo que se ha estudiado mucho por su impacto en la salud pública ha sido el HIV en el que se han encontrado resultados similares en LT específicos de pacientes HIV+ sin recibir terapia antirretroviral. Además de estos resultados, PD-1 en la infección por HIV es usado como marcador de progresión de la enfermedad ya que a mayor expresión de PD-1, mayor carga viral y menor recuento de LT CD4+ (Day, 2006). Recientemente, se ha observado que PD-1 es el único marcador de fracaso de terapia antirretroviral en pacientes HIV+ (Grabmeier, 2011). En la infección por HIV se conoce tres tipos de progresores de la enfermedad: típicos, rápidos y lentos. Los progresores típicos al infectarse tendrán 3 fases de la infección: aguda, latente que puede durar de 8 a 10 años y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) como tal con elevada carga viral y disminución en el conteo de LT CD4+. Los progresores rápidos en donde no existe una fase de latencia. Y los progresores lentos los cuales tienen cargas virales muy bajas, no disminuyen tan drásticamente el conteo de LT CD4+ y además no progresan a la fase SIDA de la infección. Se ha visto que el nivel de PD-1 expresado por LT de los progresores típicos es mucho mayor que los niveles expresados por LT de los progresores lentos, en donde estos últimos, presentan LT funcionales con una producción normal de IFN γ y de perforinas (Zhang, 2007).

La infección por *Helicobacter pylori* se asocia con gastritis, úlceras, y cáncer gástrico; todo esto se desarrolla debido a la cronicidad de la infección en humanos, las células gastrointestinales tienen la capacidad de presentar el antígeno y expresar moléculas coestimuladoras necesarias para la segunda señal en la activación de LT, pero adicionalmente, en esas mismas células se ha demostrado la sobreexpresión de PD-L1 tanto in vitro como in vivo, que igualmente con lo reportado en estudios antes descritos, esta expresión reduce la proliferación de LT y la síntesis de IL-2 (Das, 2006). Pero en este modelo de infección se demostró que la expresión de PD-L1 y su unión a PD-1 induce la generación de LTregs CD4+CD25+Foxp3+ y además el bloqueo de PD-1 previene

la formación de LTregs (Beswick, 2007).

En la enfermedad de Chagas en modelos murinos se observó una expresión elevada de PD-1 en LT que infiltraban el miocardio y de PD-L1 en el tejido cardiaco, al bloquear esta vía, se redujo la parasitemia pero ocurrió la muerte de los ratones debido a la activación de LT autoreactivos específicos de antígenos cardiacos que no eran inhibidos por la unión de PD-1 a su ligando (Gutierrez, 2011).

Para el estudio de PD-1 en infecciones crónicas se han usado múltiples modelos como los mencionados anteriormente; otros modelos que ayudan a soportar la relación directa de PD-1 con la disfunción de LT y el posterior desarrollo de una infección crónica son:

- Tuberculosis (Henao, 2011).
- Toxoplasmosis (Bhadra, 2011).
- Leishmaniasis cutánea difusa (Hernandez, 2010)

En donde se ha encontrado sobreexpresión de PD-1 en LT específicos de cada uno de los agentes causales de estas infecciones y así en muchos más modelos de infecciones crónicas que presentan LT disfuncionales con características similares y que conllevan a una misma dirección, el desarrollo de infecciones crónicas.

6.8. PD-1 y cáncer

En los pacientes con cáncer, la presencia de LTh1 y LT CD8+ en el tejido donde se encuentra el tumor es un factor pronóstico favorable para la progresión del paciente (Galon, 2006), sin embargo, muchas de las células T que se encuentran infiltrando el tejido están en un estado de disfunción debido a los mecanismos de inmunosupresión que ejerce el tumor en los LT (Zou, 2005). Por ejemplo, la expresión de PD-L1 por las células tumorales promueve la muerte celular programada (apoptosis) cuando LT activados específicos del tumor reconocen este ligando a través de PD-1 (Dong, 2002).

Las células tumorales expresan niveles mayores de PD-L1 que los tejidos normales (Dong, 2002) y a medida que el cáncer progresa los niveles de expresión de PD-L1 van aumentando (Lu, 2011), el IFN γ induce la expresión de este ligando en tumores de: laringe, pulmón, estómago, seno, ovarios, gliomas y

melanomas, entre otros (Dong, 2002). Experimentos in vitro con células murinas tumorales que sobreexpresan PD-L1, demostraron que la expresión de este ligando suprime la actividad citotóxica de los LT CD8+ e incrementa la apoptosis de LT específicos (Iwai, 2002). El bloqueo de la vía de señalización tiene como resultado la erradicación acelerada del tumor (Iwai, 2002; Blank, 2006; Hirano, 2005) y al mismo tiempo evita la metástasis (Iwai, 2005).

Otra forma de inducción de PD-L1 en las células tumorales es por medio de la vía de PI3K la cual es activada por factores de crecimiento presentes en el medio que se unen a al receptor de las tirosinas cinasas, al activarse esta vía, la célula sufre alteraciones metabólicas que favorecerán la proliferación celular y el aumento de la expresión de PD-L1. En el microambiente tumoral existe una competencia por los recursos energéticos entre el tumor y LT, uno de los mecanismos que usa el tumor es la unión de PD-L1 con PD-1 en linfocitos, una de las consecuencias de esta unión, como ya se había descrito es la inhibición de la vía de señalización mediada por PI3K en los LT la cual no le permitirá a la célula tomar la glucosa presente en el medio extracelular inhibiendo las funciones de LT (Lu, 2011).

En tumores humanos se encontraron resultados similares con lo encontrado en modelos murinos, acerca de la expresión y el bloqueo de PD-L1, además, se encontró una correlación entre la expresión de PD-L1 y la progresión del cáncer en los pacientes, en un grupo de 300 pacientes con carcinoma renal y sometidos a nefrectomía se demostró que la supervivencia era mayor en aquellos que no expresaban niveles de PD-L1 o que tenían una baja expresión de esta molécula, a diferencia de los que presentaban mayores niveles de expresión en los cuales hubo una supervivencia menor. La correlación de la expresión de PD-L1 y la progresión del paciente también se demostró en cáncer de ovario, carcinoma urotelial, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y carcinoma gástrico (Konishi, 2004; Wu, 2006; Thompson, 2006; Nomi, 2007; Nakanishi, 2007; Hamanishi, 2007), sugiriendo la importancia de la vía PD-1:PDL1 en la evasión de la respuesta inmune (Blank, 2007).

En modelos murinos con cáncer gástrico, los factores de transcripción T-bet y Eomes son necesarios para la respuesta inmune antitumoral ya que regulan el tráfico de LT al tumor, además regulan las funciones de LT en el microambiente del tumor (Zhu, 2010), pero cuando PD-1 está expresado, la expresión de T-bet se ve reprimida (Kao, 2011; Lu, 2011), y como en los LT específicos de tumor hay una sobreexpresión de PD-1 debido a la persistencia antigénica, el factor de transcripción T-bet no se expresará teniendo como consecuencia una deficiencia en la respuesta inmune antitumoral.

Como se vio, los microorganismos no son los únicos que evaden la respuesta inmune por medio de los mecanismos de inhibición que tiene PD-1, sino que también los tumores evaden la respuesta inmune al expresar altos niveles del ligando de esta molécula. Además el tumor toma ventaja de una de las funciones efectoras del LT, la secreción de IFN γ para expresar mayor cantidad de moléculas de PD-L1 y así evadir aún más la respuesta inmune antitumoral, teniendo como resultado el progreso del tumor y la aparición de metástasis en el organismo. También se vio que PD-L1 aumenta su expresión a medida que el tumor va progresando por lo que se puede llegar a considerar como un marcador para la supervivencia del paciente, ya que su expresión aumenta cuando el tumor aumenta su tamaño, cuando existen metástasis o cuando hay una mayor invasión al tejido por parte del tumor (Lu,2011).

7. Conclusiones

El agotamiento clonal bajo un estímulo persistente como el que hay en infecciones crónicas y en cáncer es un estado de los LT que ocurre bajo el estímulo de múltiples sucesos como son la disminución de la ayuda de LT CD4+, la presencia de citocinas inmunorreguladoras, de LTreg y la presencia de moléculas inhibitorias como PD-1 y CTLA-4.

PD-1 es una molécula de 288 aminoácidos que cuenta con un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático que esta expresada normalmente en timocitos, LT activados y LB, y al unirse con sus ligandos PD-L1 o PD-L2 generará señales inhibitorias a la célula T por múltiples vías, por ejemplo, puede inhibir la señalización del TCR directamente, reclutar las fosfatasa SHP-1 o SHP-2 , inhibir la actividad de la proteína AKT por medio de la proteína PI3K, disminuir la expresión de factores antiapoptóticos en la célula o de factores de transcripción importantes e inhibir el contacto correcto del LT con la CD en el momento de la presentación de antígeno promoviendo el movimiento del LT.

La función de PD-1 y sus ligandos están directamente ligadas con el mantenimiento de la tolerancia central y periférica, ya que cuando no hay expresión de PD-1 o sus ligando en modelos in vitro se generan enfermedades autoinmunes, además que está involucrado en la inducción de LTreg.

La función de PD-1 es de vital importancia para controlar la actividad efectora de LT autoreactivos, pero esta vía de señalización ha sido usada por los microorganismos y células tumorales para desarrollar infecciones crónicas, progreso tumoral y desarrollo de metástasis.

Existen muchos modelos de infecciones crónicas en donde se muestra la sobreexpresión de PD-1 en LT y sus ligandos en múltiples tejidos, y que el bloqueo de esta vía permite la restauración de la función de los linfocitos y la disminución de la expresión de PD-1. Es necesario resaltar que aunque estos hallazgos se comparten en la mayoría de los modelos estudiados, también difieren en algunas características como es esperado por ser biológicamente diferentes. En el modelo de cáncer en donde al igual que en las infecciones crónicas existe una sobreexpresión de su ligando PD-L1 en las células tumorales, permitiendo así la evasión de la respuesta inmune.

Estos hallazgos han permitido establecer nuevas estrategias terapéuticas inhibiendo esta vía de señalización para restaurar la función de los LT, pero hay que tener en cuenta que la inhibición de esta vía sin ningún tipo de control puede traer consigo el desarrollo de enfermedades autoinmunes debido al rol tan importante que tiene la molécula en la prevención de este tipo de enfermedades.

8. Recomendaciones

Es importante seguir con la revisión de los artículos científicos del tema de la molécula PD-1 y del agotamiento clonal de linfocitos, ya que se pueden encontrar otras funciones asociadas a las moléculas y a sus ligandos. Además si se mejoran las técnicas de laboratorio se podría llegar a una terapia para mejorar la respuesta inmune en infecciones crónicas y en cáncer sin perturbar la tolerancia periférica.

9. Referencias

·Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubat T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol.* 1996;8:765–772

·Akbar A, Henson S. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev.* 2011;11:289-295.

·Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim- Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-22, a Member of the IL-10 Subfamily, Induces Inflammatory Responses in Colonic Subepithelial Myofibroblasts. *Gastro.* 2005;129:969-984.

·Anichini A, Veggetti C, Mortarini R. The paradox of T-cell mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53:855-864.

·Aujla S, Chan Y, Zheng M, Fei M, Askew D, Pociask D, Reinhart T, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler J, Dubin P, Pilewski J, Myerburg M, Mason C, Iwakura Y, Kolls J. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008;14:275-281.

·Barber D, Wherry J, Masopust D, Zhu B, Allison J, Sharpe A, Freeman G, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439:682-687.

- Beswick E, Pinchuk I, Das S, Powell D, Reyes V. Expression of the programmed death ligand 1, B7-H1, on gastric epithelial cells after *Helicobacter pylori* exposure promotes development of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Infect and Immun.* 2007;75:4334-4341.
- Betts M, Nason M, West S, De Rosa S, Migeles S, Abraham J, Lederman M, Benito J, Goepfert P, Connors M, Roeder M, Koup R. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood.* 2006;107:4781-4789.
- Bevan M. Helping the CD8 T cells response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:595-602.
- Bhadra T, Gigley J, Weiss L, Khan I. Control of *Toxoplasma* reactivation by rescue of dysfunctional CD8 T cells response via PD-1--PD-L1 blockade. *PNAS.* 2011;22:9196-9201.
- Blackburn S, Shin H, Haining W, Zou T, Workman C, Polley A, Betts M, Freeman G, Vignali D, Wherry J. Corregulation of CD8 T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009;10:29-37.
- Blair P, Riley J, Levine B, Lee K, Craighead, Francomano T, Perfetto S, Gray G, Carreño B, June C. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol.* 1998;160:12-15.
- Blank C, Brown I, Marks R, Nishimura H, Honjo T, Gajewski TF. Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8double-negative TCR-transgenic T cells. *J Immunol.* 2003;171:4574-4581.
- Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, Majdic O, Gajewski T, Theobald M, Andreesen R, Macken A. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer.* 2006;119:317-327.
- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:739-745.
- Bogle G, Dunbar R. T cells responses in lymph nodes. *WIREs Syst Bio & Med.* 2010; 2: 107-116.
- Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertolotti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J. Virol.* 2007;81:4215-4225.
- Bonilla F, Oettgen H. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S33-40. .
- Brooks D, Ha S, Elsaesser H, Sharpe A, Freeman G, Oldstone M. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:20428-20433.
- Brooks D, Teyton L, Oldstone M, McGarven D. Intrinsic functional dysregulation of CD4 T cells occurs rapidly following persistent viral infection. *J virol.* 2005;76:10514-10527.
- Brooks D, Trifilo M, Edelman K, Teyton L, McGaven D, Oldstone M. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med.* 2006;12:1301-1309.
- Campbell D, Tustin N, Riedel E, Tustin R, Taylor J, Murray J, Douglas D. Cryopreservation decreases receptor PD-1 and ligan PD-L1 coinhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes. *Clinic and Vacc Immunol.* 2009;16:1648-1653.
- Chaplin D. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S3-23.
- Chemnitz J, Parry R, Nichols K, June C, Riley J. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol.* 2004;173:945-954.
- Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel R, Mitsdoerffer M, Strom B, Elyaman W, Ho I, Khouri S, Oukka M, Kuchroo V. IL-4 inhibits TGF-beta induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* 2008;9:1347-1355.
- Das S, Suarez G, Beswick E, Sierra J, Graham D, Reyes V. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J. Immunol.* 2006;176:3000-3009.

- Das A, Hoare M, Davies N, Lopes R, Dunn C, Kennedy P, Alexander G, Finney H, Lawson A, Plunkett F, Bertolotti A, Akbar A, Mani M. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J. Exp. Med.* 2008;205:2111–2124.
- Day C, Kaufmann D, Kiepiela P, Brown J, Moodley E, Reddy S, Mackey E, Miller J, Leslie A, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry J, Coovadia H, Goulder P, Klenerman P, Ahmed R, Freeman G, Walker B. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443:350–354.
- Dong H, Strome S, Salomao D, Tamura H, Hirano F, Flies D, Roche P, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon V, Celis E, Chen L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8:793–800.
- Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10:857-864.
- Ejrnaes M, Filippi C, Martinic M, Ling E, Togher L, Crotty S, von Herrath M. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med.* 2006;203:2461-2472.
- Elsaeser H, Sauer K, Brooks D. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science.* 2009;324:1569-1572.
- Eppihimer M, Gunn J, Freeman G, GreenWeld E, Chernova T, Erickson J, Leonard J. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation.* 2002;9:133–145.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odoriso T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham S, Schmidt-Weber C, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Inv.* 2009;119:3573- 3585.
- Fife B, Pauken K, Eagar T, Obu T, Wu J, Tang Q, Azuma M, Krummel M, Bluestone J. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol.* 2009;10:1185-1193.
- Fife B, Pauken K. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N.Y Acad. Sci.* 2011;1217:45–59.
- Fox C, Hammerman P, Thompson C. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:844–852.
- Francisco L, Salinas V, Brown K, Vanguri V, Freeman G, Kuchroo V, Sharpe A. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009;206:3015–3029.
- Francisco L, Sage P, Sharpe A. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Revs.* 2010;236:219-242.
- Frazier A, Zhang C, Ni L, Ma V, Zhang Y, Wu X, Atia A, Yao Z, Moorman J. Programmed Death-1 affects suppressor of cytokine signaling-1 expression in T cells during Hepatitis C infection. *Viral Immunol.* 2010;23:487-495.
- Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev A, Weber J, Marsland B, Oxenius A, Kropf M. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of viral infection. *Science.* 2009;324:1576-1580.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P, Trajanoski Z, Fridman W, Pagès F. Type, density and location of immune cells within human colorectal tumor predict clinical outcome. *Science.* 2006;313:1960-1964.
- Golden-Mason L, Palmer B, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon B, Castleblanco N, Kuchroo V, Gretch D, Rosen H. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4 and CD8 T cells. *J Virol.* 2009;83:9122-9130.
- Grabie N, Gotsman I, DaCosta R, Pang H, Stavrikis G, Butte M, Heir M, Freeman G, Sharpe A, Lichtman A. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8 + T-cell mediated injury in the heart. *Circulation.* 2007;116:2062–2071.
- Grabmeier K, Steinberger P, Rieger A, Leitner J, Kohrgruber N. Identification of PD-1 as a unique marker for failing immune reconstitution in HIV-1-infected patients on treatment. *J Acquir Immune*

Defic Syndr. 2011;56:118-124.

·Guleria I, Koshroshai A, Ansari M, Habitch A, Azuma M, Yagita H, Noelle R, Coyle A, Mellor A, Khoury S, Sayegh M. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J. Exp Med.* 2005;202:231-237.

·Gutierrez F, Mariano F, Oliveira C, Pavanelli W, Guedes P, Silva G, Campanelli A, Milannezi C, Azuma M, Honjo T, Teixeira M, Aliberti J, Silva J. Regulation of Trypanozoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor. *Infect and Immun.* 2011;79:1873-1881.

·Hamanishi J, Mandai M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, Higuchi T, Yagu H, Takakura K, Minato N, Hongo T, Fujii S. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:3360–3365.

·Henao M, Irwin S, Shang S, Ordway D, Orme I. T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. *Tuber.* 2011;91:308-313.

·Hernandez J, Salaiza N, Carrada G, Escoto S, Ruiz A, Rosenstein Y, Zentella A, Becker I. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous Leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, In Vitro, by TLR2 agonists. *PLOS.* 2010;4:1-11.

·Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies D, Lau J, Zhu G, Tamada K, Chen L. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005;65:1089–1096.

·Iwai Y, Ishida Y, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD- L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:12293–12297.

·Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol.* 2005;17:133-144.

·Jin H, Jeong Y, Park H, Ha A. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB reports.* 2011;44:217-224.

·Jones R, Ndhlovu L, Barbour J, Sheth P, Jha A, Long B, Wong J, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman J, Gyenes G, Vali B, Hycza M, Yue F, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht F, Chun T, McCune J, Kaul R, Rini J, Nixon D, Ostrowski M. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2008;205:2763-2779.

·Kaech S, Wherry E, Ahmed R. Effector and memory T cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:251-262.

·Kaiko G, Horvart J, Beagly K, Hansbro P. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunol.* 2007;123:326-338.

·Kao C, Oestreich K, Paley M, Crawford A, Angelosanto J, Ali M, Intlekofer A, Boss J, Reiner S, Weinmann A, Wherry J. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD- 1 and sustains virus-specific CD8 T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol.* 2011;12:663-672.

·Kauffmann D, Kavanagh D, Pereyra F. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4 T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. 2007;8:1246-1254.

·Keir M, Butte M, Freeman G, Sharpe A. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.

·Keir M, Freeman G, Sharpe A. PD-1 regulates self-reactive CD8 + T cell responses to antigen in lymph nodes and tissues. *J Immunol.* 2007;179:5064–5070.

·Keir M, Liang S, Guleria I, Latchman Y, Qipo A, Albacker L, Koulmanda M, Freeman G, Sayegh M, Sharpe A. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006;203:883–895.

·Keir M, Latchman Y, Freeman G, Sharpe A. Programmed death-1 (PD-1): PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol.* 2005;175:7372– 7379.

·Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression

on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5094-5100.

·Lechner, F, Wong D, Dunbar R, Chapman R, Chung R, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker B. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 2000;191:1499-1512.

·Lee P, Yee C, Savage P, Fong L, Brockstedt D, Weber J, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg P, Roederer M, Davis M, Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature Med.* 1999;5:677-685.

·Lu B, Chen L, Liu L, Zhu Y, Wu C, Jiang J, Zhang X. T-cell-mediated tumor immune surveillance and expression of B7 co-inhibitory molecules in cancers of the upper gastrointestinal track. *Immunol Res.* 2011;50:269-275.

·Manel N, Unutmaz D, Littman D. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* 2008;9:641-649.

·Maris C, Chappell C, Jacob J. Interleukin-10 plays an early role generating virus-specific T cell energy. *BMC Immunol.* 2007;8:1-9.

·Mazanet M, Hughes C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. *J Immunol.* 2002;169:3581-3588.

·Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.

·Mueller S, Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *PNAS.* 2008;early edition:1-6.

·Nakamoto N, Cho H, Shaked A. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *Plos Pathog.* 2009;5:1-13.

·Nakamoto N, Kaplan D, Coleclough J, Li Y, Valiga M, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price D, Freeman G, Wherry J, Chang K. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells

by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastro.* 2008;134:1927-1937.

·Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:1173-1182.

·Nakanishi Y, Lu B, Gerard C, Iwasaki A. CD8 T lymphocyte mobilization to virus infected tissues requires CD4 T cell help. *Nature.* 2009;462:510-513.

·Nishimura H, Honjo T, Minato N, Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:891-898.

·Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol.* 2001;22:265-268.

·Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol.* 1998;10:1563-1572.

·Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2151-2157.

·Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin N, Wang Y, Kaja M, Yu X, Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* 2006;25:2623-2633.

·Nurieva R, Liu X, Dong C. Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 2009;229:88-100.

·Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007;19:813-824.

·Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* 2006;27:195-201.

·Parry R, Chemnitz J, Frauwirth K, Lanfranco A, Braunstein I, Kobayashi S, Linsley P, Thompson

- C, Riley J. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25:9543–9553.
- Pestka S, Krause C, Sarkar D, Walter M, Shi Y, Fisher P. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:929-979.
- Polanczyk M, Hopke C, Vandenbark A, Offner H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res.* 2006;84:370-378.
- Probst H, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8 + T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol.* 2005;6:280-286.
- Riley J. PD-1 signaling in primary T cells. *Immun Rev.* 2009;229:114-125.
- Rudd C, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signaling. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:544–556.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune diseases. *Int Rev of Immunol.* 2005;24:211-226.
- Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, Knight Z, Cobb B, Cantrell D, O Connor E, Shokat K, Fisher A, Merckenschlager M. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105:7797-7802.
- Schluns K, Lefrancois L. Cytokine control of memory T cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:269-279.
- Sjoberg A, Trouw L, Blom A. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol* 2009;30:83-90.
- Szabo S, Kim S, Costa G, Zhang X, Fathman G, Glimcher L. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000;100:655-669.
- Thauland T, Parker D. Diversity in immunological synapse structure. *Immunol.* 2010;131:466-472.
- Thompson R, Kuntz S, Leibovich B, Dong H, Lohse C, Webster W, Sengupta S, Frank I, Parker A, Zincke H, Blute M, Sebo T, Cheville J, Kwon E. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66:3381-3385.
- Tivol E, Borriello F, Schweitzer A, Lynch W, Bluestone J, Sharpe A. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 1995;3:541-547.
- Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari G. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J. Virol* 2006;80:11398-11403.
- Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C, Stockinger B. Transforming growth factor beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 2008;9:1341-1346.
- Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevesga A, Lai L, Venderford H, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman G, Ahmed R, Amara R. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature.* 2009;458:206-210.
- Virgin H, Wherry E, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell.* 2009;138:30–50.
- Waldman T. Effective cancer therapy through immunomodulation. *Annu Rev Emd.* 2006;57:66-81.
- Wang X, Yao J, Zheng J, Liu J, He Y, Li X, Yu J, Wei J, Yang J, Liu Z, Huang S. Increase of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in the peripheral blood of acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2004;104:697a-698a.
- Wherry J, Ha S, Kaech S, Haining S, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman J, Barber D, Ahmed R. Molecular signature of CD8+ T Cell exhaustion during chronic viral infection. *Cell press.* 2007; 27: 670-684.
- Wherry J. Memory CD-8 T cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004;78:5535-5545.
- Wherry J. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12:492-499.
- Wiendl H, Mitsdoerfer M, Schneider D, Chen L, Lochmuller H, Melms A, Weller M. Human muscle

cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.* 2003;17:1892-1894.

·Williams M, Bevan M. Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:171–192.

·Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang X, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 2006;108:19–24.

·Yang L, Anderson D, Baecher-Allan C, Hastings W, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V, Hafler D. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* 2008;454:350–352.

·Yi J, Du M, Zajac A. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science.* 2009;324:1572-1576.

·Zajac A, Blattman J, Murali-Krishna K, Sourdive D, Suresh M, Altman J, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 1998;188:2205–2213.

·Zhang X, Schwartz J, Guo X, Bhatia S, Cao E, Chen L, Zhang Y, Eddin M, Nathenson S, Almo S. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity.* 2004;20:337–347.

·Zhang J, Zhang Z, Wang X, Fu J, Yao J, Jiao Y, Chen L, Zhang H, Wei J, Jin L, Shi M, Gao G, Wu H, Wang F. PD-1 up regulation is correlated with HVI specific memory CD8 t cell exhaustion in typical progressors but not in long-term nonprogressors. *Blood.* 2007;109:4671-4678.

·Zheng W, Flavell R. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* 1997;89:587–596.

·Zhu Y, Ju S, Chen E, Dai S, Li C, Morel P, Liu L, Zhang X, Lu B. T-bet and Eomes are required for T cell-mediated antitumor immune responses. *The Jour of Immunol.* 2010; 185:3174-3183.

·Zou W. Immunossuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev in Can.* 2005;5:263-274.