

**EVALUACIÓN DE MARCADORES DE AGOTAMIENTO CLONAL EN
LINFOCITOS T CD8+ DE INDIVIDUOS SANOS**

JOSE MATEUS TRIVIÑO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2011**

**EVALUACIÓN DE MARCADORES DE AGOTAMIENTO CLONAL EN
LINFOCITOS T CD8+ DE INDIVIDUOS SANOS**

JOSE MATEUS TRIVIÑO

APROBADO

Dra. Ingrid Schuler, Biol. PhD.
DECANA ACADÉMICA

Dra. Diana Patiño
DIRECTORA CARRERA
BACTERIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE MARCADORES DE AGOTAMIENTO CLONAL EN
LINFOCITOS T CD8+ DE INDIVIDUOS SANOS**

JOSE MATEUS TRIVIÑO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar el título de

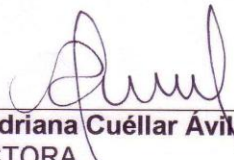
Bacteriologo.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2011**

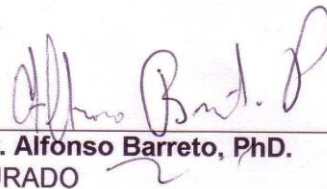
**EVALUACIÓN DE MARCADORES DE AGOTAMIENTO CLONAL EN
LINFOCITOS T CD8+ DE INDIVIDUOS SANOS**

JOSE MATEUS TRIVIÑO

APROBADO



Dra. Adriana Cuéllar Ávila. PhD.
DIRECTORA



Dr. Alfonso Barreto, PhD.
JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la expresión de marcadores de agotamiento clonal en linfocitos T CD8+ de individuos sanos.

Materiales y métodos: Se seleccionaron 10 individuos sanos clínicamente con edades comprendidas entre 25 y 46 años. A partir de sangre periférica, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante gradientes de Ficoll-hypaque. Se seleccionó la población de Linfocitos T (LT) CD8+ y se evaluó la frecuencia de expresión individual de CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1, y la coexpresión de CD160/2B4 y CTLA-4/PD-1 en el Citómetro FACSCanto I y los análisis fueron realizados en el programa FlowJo 7.6.1.

Resultados: Sobre la población de LT CD8+ se evaluó la expresión individual de los diferentes marcadores, encontrándose gran variabilidad en los diferentes individuos. Para CD160 el rango de expresión fue de 5,35 – 31,90%; para 2B4 de 5,17 a 68,10%; para CTLA-4 de 0,36 a 4,30% y para PD-1 de 1,58 a 8,71%. Para la coexpresión de CD160 y 2B4 el rango de expresión fue de 1,18 a 25,50%; de CTLA-4 y PD-1 de 0,226 a 0,348% en LT CD8+ de individuos sanos.

Conclusión: La expresión individual de los marcadores evaluados varía de acuerdo con su expresión en los diferentes individuos, para CD160 y CTLA-4 se encuentra una expresión relativamente uniforme, sin embargo, 2B4 y PD-1 muestran gran variabilidad entre individuos.

Palabras clave: Agotamiento clonal, marcadores inhibitorios

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Resumen.	
Tabla de contenido.	7
Introducción.	8
Justificación.	8
Marco Teórico.	9
- Expresión de marcadores inhibitorios en infecciones agudas.	9
- Agotamiento clonal de linfocitos T CD8+ en infecciones crónicas.	9
Objetivos.	10
- Objetivo General.	10
- Objetivos Específicos.	10
Metodología.	10
Resultados.	12
- Descripción de los controles sanos incluidos en el estudio.	12
- Porcentaje de expresión de marcadores inhibitorios (CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1) en LT CD8+ de individuos sanos.	13
Discusión de Resultados.	16
Conclusiones y Recomendaciones.	18
Bibliografía.	18

INTRODUCCIÓN

En infecciones crónicas, los linfocitos T (LT) CD8+ específicos juegan un papel importante en el curso de la infección. En infecciones virales persistentes en humanos (HIV, HCV, HBV, HTLV) y modelos murinos (LCMV), se ha mostrado que LT CD8+ conforme a la persistencia antigénica continua y progresión a la fase crónica pierden progresivamente sus funciones efectoras asociadas a la expresión de algunos marcadores inhibitorios (PD-1, CTLA-4, 2B4, CD160), fenómeno denominado agotamiento clonal (Rutebemberwa, 2008; Watanabe, 2010; Yi, 2010; Bengsch, 2010; Blackburn, 2009). En el presente estudio, con el fin de evaluar el comportamiento de las frecuencias de expresión de estos marcadores inhibitorios en LT CD8+ de individuos sanos, se seleccionaron 10 individuos clínicamente sanos con edades comprendidas entre 25 y 46 años. A partir de sangre periférica, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En un análisis descriptivo, se evaluó la frecuencia de expresión individual de los marcadores inhibitorios PD-1, CTLA-4, 2B4, CD160 y la coexpresión de PD-1/CTLA-4 y 2B4/CD160 en LT CD8+ de individuos sanos en el Citómetro FACSCanto I y los análisis fueron realizados en el programa FlowJo 7.6.1., donde se observó, que la expresión individual de los marcadores evaluados varía de acuerdo con su expresión en los diferentes individuos, para CD160 y CTLA-4 se encuentra una expresión relativamente uniforme, sin embargo, 2B4 y PD-1 muestran gran variabilidad entre individuos.

JUSTIFICACIÓN

Los linfocitos T (LT) CD8+ específicos juegan un papel importante en el curso de infecciones crónicas. En infecciones virales persistentes en humanos y modelos murinos, se ha mostrado que la progresión a la fase crónica se relaciona con la pérdida progresiva de funciones efectoras de LT CD8+ como consecuencia del estímulo antigénico continuo, junto con el aumento en la expresión de algunos marcadores inhibitorios (PD-1, CTLA-4, 2B4, CD160), fenómeno denominado agotamiento clonal (Rutebemberwa, 2008; Watanabe, 2010; Yi, 2010; Bengsch, 2010; Blackburn, 2009). Teniendo en cuenta lo anterior, con este proyecto se pretende determinar bajo nuestras condiciones de laboratorio la frecuencia de LT CD8+ de individuos sanos que expresan estos marcadores inhibitorios. Este trabajo representa el punto de partida para estudiar el fenómeno de agotamiento clonal en pacientes con enfermedad crónica.

MARCO TEÓRICO

EXPRESIÓN DE MARCADORES INHIBITORIOS EN INFECCIONES AGUDAS:

En una infección aguda, la activación de linfocitos T (LT) involucra dos señales, la primera dada por la célula presentadora de antígeno (CPA) al presentar un péptido en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), la segunda proporcionada por la interacción de las moléculas coestimuladoras expresadas tanto en CPA como en las células T. La activación promueve el desarrollo de células T efectoras o de memoria (Harty, 2008). Sin embargo, la activación puede generar señales negativas que estimulan el desarrollo de células T reguladoras o apoptosis, mecanismos importantes en la regulación de la respuesta inmune. Moléculas como PD-1 (Programmed Death-1), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4), 2B4 y CD160 son expresadas en LT y han sido identificadas como moléculas coestimuladoras que inducen señales tanto positivas como negativas en la activación de células T CD4+ y CD8+. PD-1 es una proteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada en bajos niveles en LT vírgenes y activados, contribuye a modular la activación celular T y a limitar la duración de la respuesta inmune adaptativa (Folkl, 2010). CTLA-4 es una glicoproteína que regula negativamente la activación de LT y un importante mediador de tolerancia periférica, requerido para prevenir la activación y la proliferación de LT autoreactivos (Scalapino, 2008). 2B4 y CD160 fueron descritas inicialmente en células NK, posteriormente se observó que se expresaban en células T CD8+ y se han descrito como un regulador proteico que puede activar o inhibir señales en LT CD8+ (Boles, 2001; Nakajima, 2000; Cai, 2009)

AGOTAMIENTO CLONAL DE LINFOCITOS T CD8+ EN INFECCIONES

CRONICAS: Tras una infección aguda, nuevos encuentros con el antígeno inducen en los LT CD8+ de memoria una rápida reactivación de sus funciones efectoras, con alta capacidad proliferativa independiente de la presencia del antígeno, lo cual en suma les permite conferir protección frente al patógeno (Kaech, 2007). Durante una infección persistente, los LT CD8+ específicos de antígeno adquieren funciones efectoras que pierden conforme persiste el antígeno. Este agotamiento ocurre de forma progresiva, iniciando con la pérdida del potencial de proliferación y de producción de la interleucina 2 (IL-2), continúa con la pérdida en la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y finalmente de interferón gama (IFN γ) (Shin, 2007; Yi, 2010).

En este proceso de agotamiento intervienen diversas moléculas que actúan como inhibidores de la señal de activación del receptor de la célula T (TCR), tal como la molécula PD-1 (Programmed Death-1), la cual se encuentra significativamente aumentada en los LT CD8+ agotados de ratones infectados con el virus de la

coriomeningitis linfocítica murina (LCMV) y en humanos infectados con el virus de la Hepatitis C, entre otros (Blattman, 2009; Nakamoto, 2009). Llamativamente, el bloqueo del ligando de PD-1, PD-L1, aunque de forma incompleta, es capaz de restaurar la funcionalidad de los LT CD8+ agotados (Barber, 2006). También se ha visto de forma importante que otros receptores inhibitorios tales como la molécula LAG-3, CD160, 2B4, CTLA-4 y TIM-3 se coexpresan en los LT CD8+ agotados (Blackburn, 2009; Nakamoto, 2009; Rutebemberwa, 2008).

En conjunto estos datos sugieren que la población de LT CD8+ sufre un proceso de agotamiento clonal gradual, quizás como respuesta a la continua exposición al antígeno y que este proceso se asocia con el aumento en la expresión de algunos marcadores de superficie.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión de marcadores de agotamiento clonal en linfocitos T CD8+ de individuos sanos.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión individual de las moléculas CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1 en linfocitos T CD8+ totales.
2. Evaluar la coexpresión de las moléculas CD160 y 2B4 en linfocitos T CD8+ totales.
3. Evaluar la coexpresión de las moléculas CTLA-4 y PD-1 en linfocitos T CD8+ totales.

METODOLOGÍA

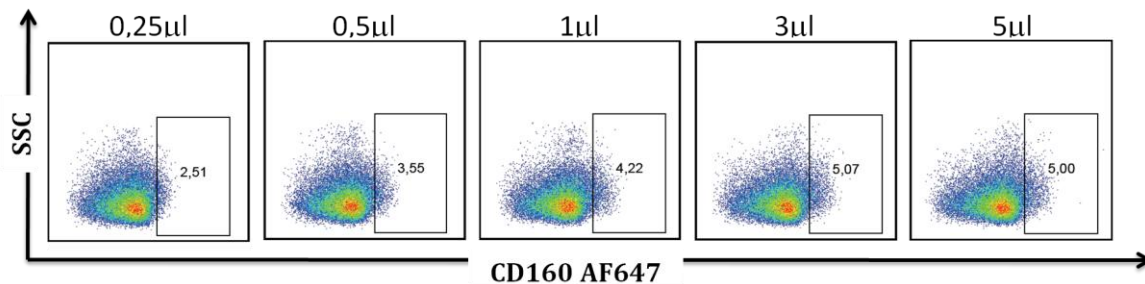
Individuos sanos: Se trabajó con individuos sanos con edades comprendidas entre 25 y 46 años de Bogotá que firmaron el consentimiento informado. Teniendo en cuenta la disponibilidad de recursos y el tiempo asignado para la realización de este trabajo, se incluyeron 10 individuos sanos.

Determinación de Marcadores de Agotamiento en LT CD8+: A partir de 15 ml de sangre periférica, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante gradientes de Ficoll-hypaque (Sigma) (Díez, 2006). Se realizó el marcaje para citometría de flujo multiparamétrica con conjugados previamente titulados (los conjugados escogidos fueron: CD160-AF647, 2B4-FITC, CTLA-4-APC, PD-1-FITC) en el laboratorio de acuerdo con la metodología reportada en la literatura con el fin de optimizar la señal, minimizar el ruido de fondo y determinar

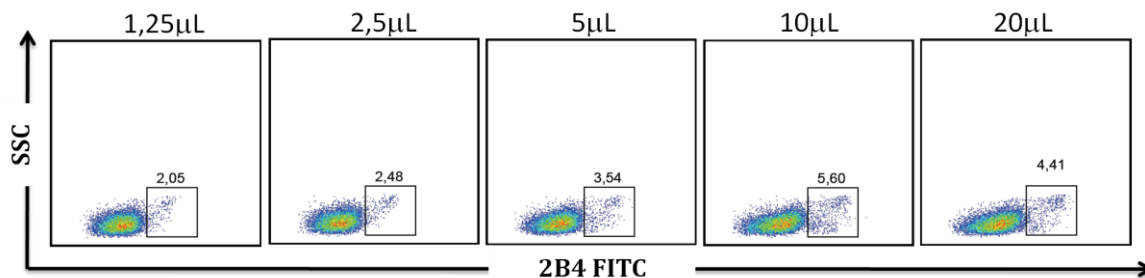
la concentración óptima del conjugado que permita separar las poblaciones positivas y negativas (Nikolova, 2005; Toussiro, 2009; Frydecka, 2004). La figura 1 muestra la distribución de las poblaciones celulares marcadas con diferentes cantidades de los conjugados, utilizada para seleccionar la cantidad que permite la mejor separación de las poblaciones y que no se encuentra acumulada sobre alguno de los ejes. De esta forma, las cantidades seleccionadas fueron: CD160 = 5 μ l, 2B4 = 20 μ l, CTLA-4 = 2,5 μ l y PD-1 = 2 μ l. Las lecturas se realizaron en el citómetro de flujo FACSCanto I (BD Immunocytometry Systems). Se adquirieron 200000 eventos totales esperando encontrar frecuencias de 0,2% de expresión nos aseguramos que en el número de eventos adquiridos se encuentren frecuencias de expresión de los marcadores evaluados, teniendo en cuenta las recomendaciones de la literatura (Donnenberg, 2007; Roederer, 2008). Los análisis se realizaron en el programa FlowJo 7.6.1.

Análisis de los datos: Se hizo un análisis descriptivo de los datos obtenidos, teniendo en cuenta la frecuencia de expresión de los marcadores a evaluar en LT CD8+ de individuos sanos.

A. Conjugado para la molécula CD160.



B. Conjugado para la molécula 2B4.



C. Conjugado para la molécula CTLA-4.

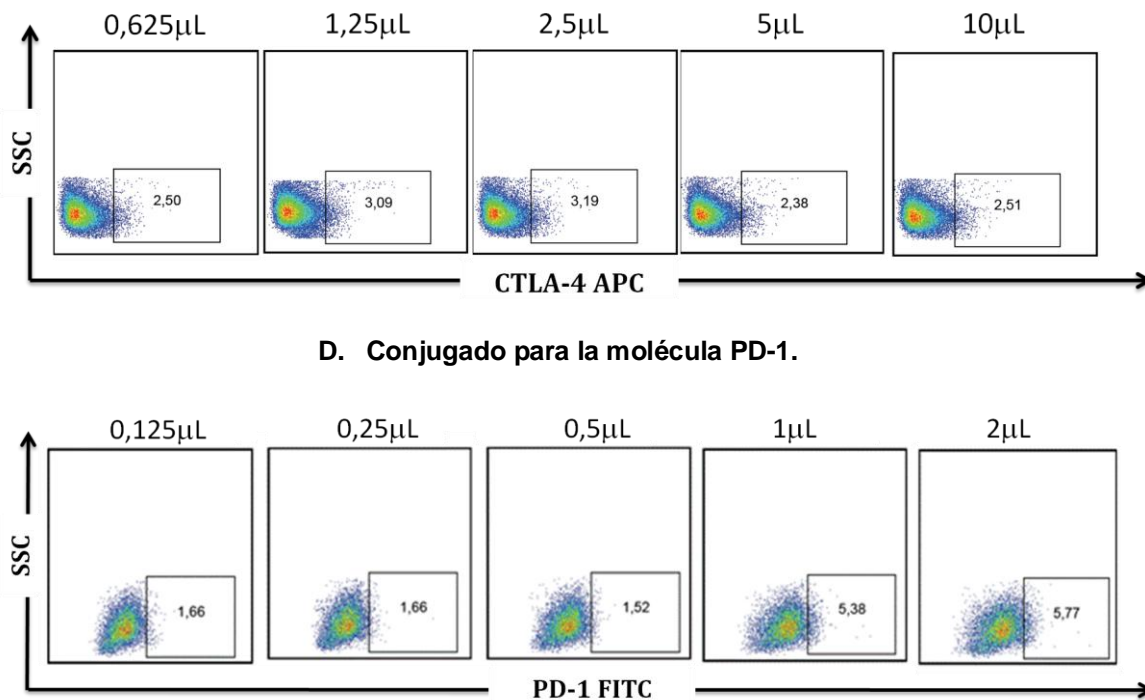


Figura 2. A. Gráfica representativa de la titulación del conjugado para la identificación de LT CD8+ que expresan la molécula CD160. B. 2B4. C. CTLA-4. D. PD-1.

RESULTADOS

Descripción de los controles sanos incluidos en el estudio.

Se incluyeron 10 individuos sanos en el estudio con edades comprendidas entre 25 y 46 años, 3 hombres y 7 mujeres (Tabla 1).

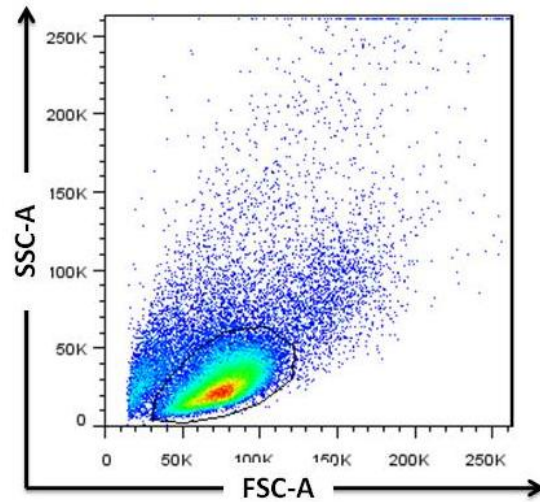
Tabla 1. Resumen de controles sanos incluidos en el estudio.

Control	Sexo	Edad
JA001	F	25
JA002	F	26
JA003	F	43
JA004	F	46
JA005	M	33
JA006	F	29
JA007	F	27
JA008	M	43
JA009	F	25
JA010	M	28

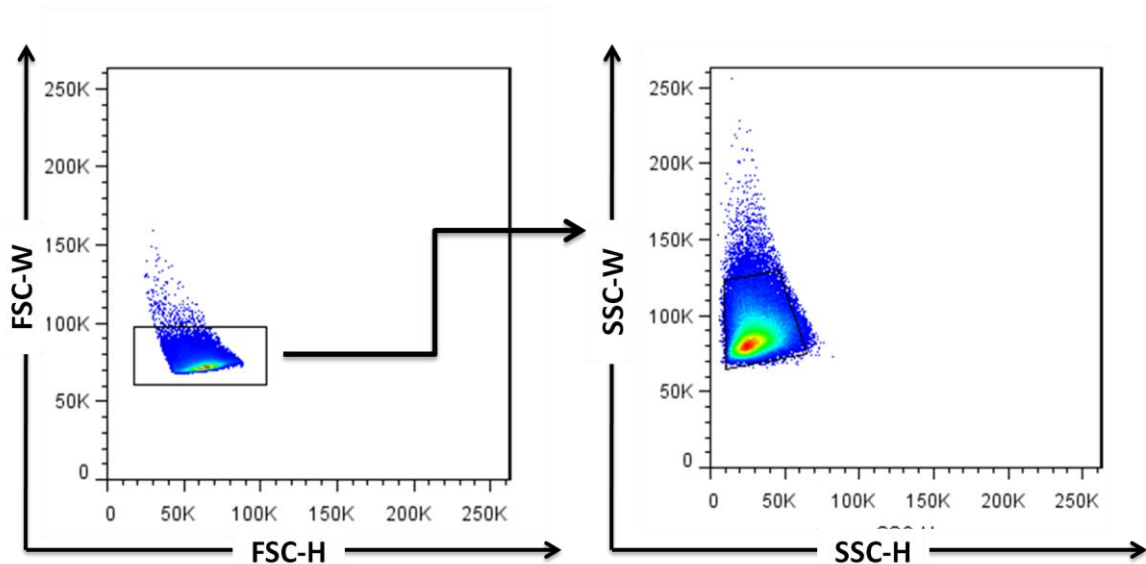
Porcentaje de expresión de marcadores inhibitorios (CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1) en LT CD8+ de individuos sanos.

Para la evaluación de la población celular de interés, primero se seleccionó la población de linfocitos que corresponde a células pequeñas poco granulares (Figura 2.A.), a partir de la cual se seleccionaron las células que no se encuentran agrupadas mediante la combinación de FSC-W y FSC-H, luego con SSC-W y SSC-H (Figura 2.B.). En la región de linfocitos se seleccionaron las células positivas para la coexpresión de CD3 y CD8, correspondiente a LT CD8+ (Figura 2.C.).

A. Dispersograma representativo para la selección de linfocitos



B. Dispersograma representativo para la selección de la población de interés.



C. Dispersograma representativo para la selección de LT CD8+.

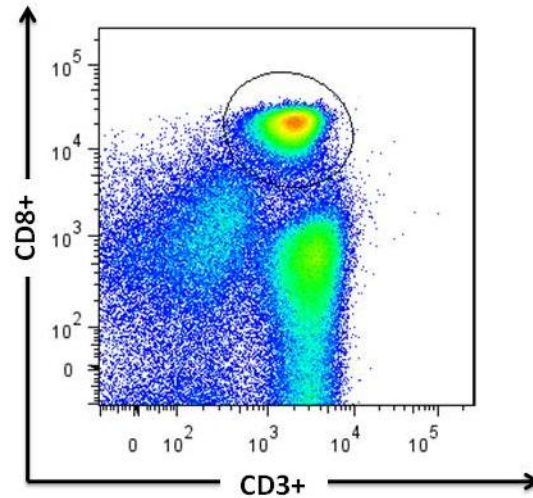
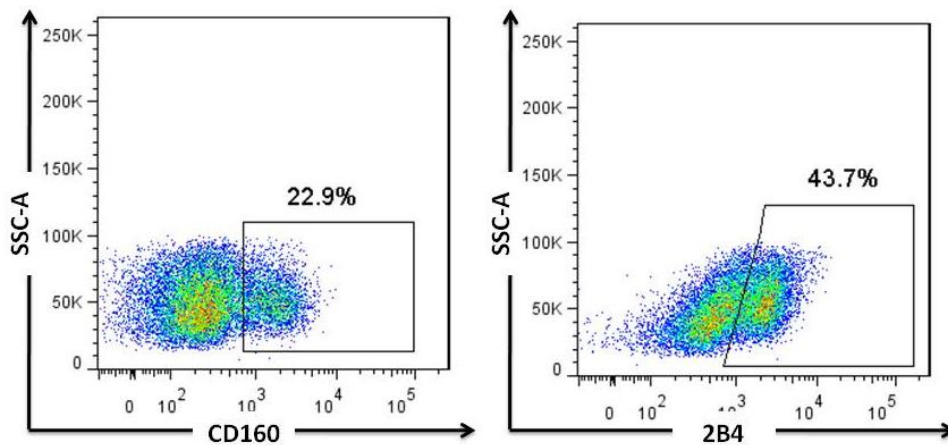
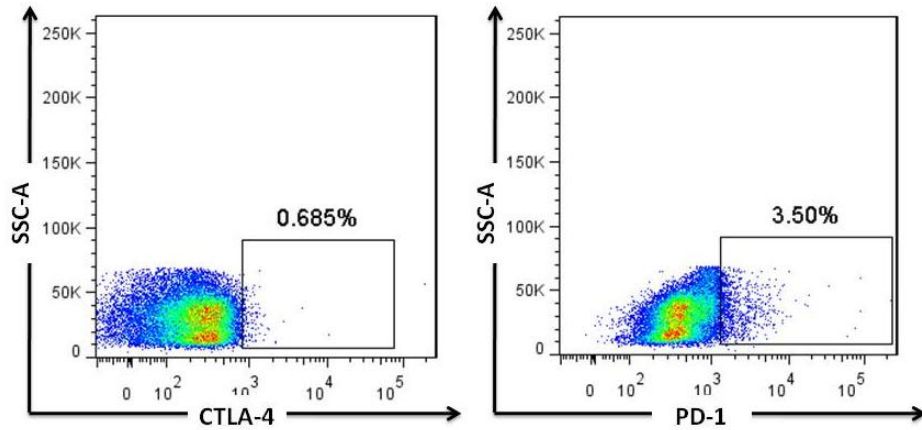


Figura 2. Dispersograma representativo. **A.** Dispersograma representativo para la selección de linfocitos. **B.** Dispersograma representativo para la selección de la población de interés. **C.** Selección de LT CD8+.

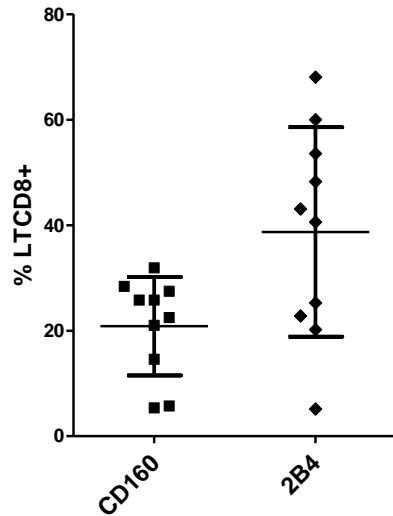
Sobre la población de LT CD8+ se evaluó la expresión individual de los diferentes marcadores, encontrándose gran variabilidad en los diferentes individuos. Para CD160 el rango de expresión fue de 5,35 – 31,90%; para 2B4 de 5,17 a 68,10%; para CTLA-4 de 0,36 a 4,30% y para PD-1 de 1,58 a 8,71% (Figura 3).

A. Dispersograma representativo de LT CD8+ de individuos sanos que expresan marcadores inhibitorios.





B. % de expresión de CD160 y 2B4 en LT CD8+ de individuos sanos.



C. % de expresión de CTLA-4 y PD-1 en LT CD8+ de individuos sanos.

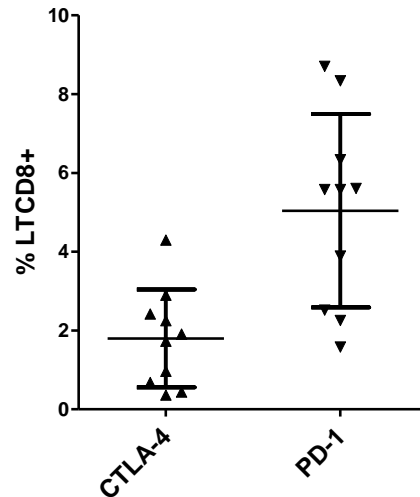
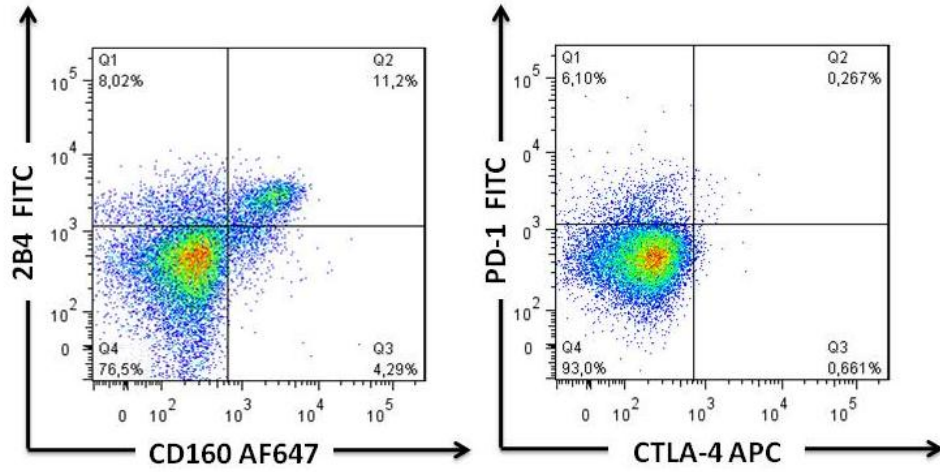


Figura 3. A. Dispersograma representativo de células T CD8+ de individuos sanos que expresan marcadores inhibitorios (CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1). **B.** Porcentaje de expresión individual de CD160 y 2B4 en LT CD8+ de individuos sanos. **C.** Porcentaje de expresión individual de CTLA-4 y PD-1 en LT CD8+ de individuos sanos. La línea central representa la media y las líneas a los extremos la desviación estándar (SD).

Para evaluar la coexpresión de las moléculas CD160, 2B4, CTLA-4 y PD-1, se marcaron LT CD8+ de controles sanos en tubos distintos: 1. CD160 y 2B4. 2. CTLA-4 y PD-1 (estas combinaciones fueron escogidas teniendo en cuenta la disponibilidad en el mercado de los marcadores a evaluar junto con los fluorocromos y las características del citómetro FACSCanto I). Para la coexpresión de CD160 y 2B4 el rango de expresión fue de 1,18 a 25,50%; de CTLA-4 y PD-1 de 0,226 a 0,348% en LT CD8+ de individuos sanos (Figura 4).

A. Dispersograma representativo de LT CD8+ de individuos sanos que coexpresan marcadores inhibitorios.



B. % de coexpresión de marcadores inhibitorios en LT CD8+ de individuos sanos.

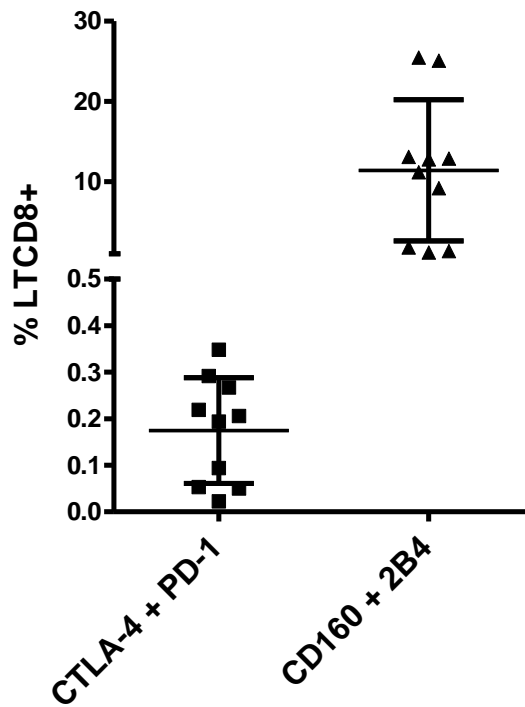


Figura 4. A. Representativo de células T CD8+ de individuos sanos que coexpresan marcadores inhibitorios (1. CD160 y 2B4. 2. CTLA-4 y PD-1). **B.** Porcentaje de coexpresión de marcadores inhibitorios en células T CD8+ de individuos sanos. La línea central representa la media y las líneas a los extremos la desviación estándar (SD).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El fenómeno de agotamiento clonal ha sido descrito en modelos murinos y humanos. En modelos murinos, en infecciones por el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica (LCMV) se describió inicialmente que linfocitos T (LT) CD8+ específicos no mostraban una respuesta efectora frente a la estimulación antigénica *in vivo* (Zajac, 1998). En modelos humanos, en infecciones crónicas se ha descrito que LT CD8+ pierden gradualmente su función efectora, además que la estimulación antigénica persistente se asocia a la expresión de moléculas inhibitoras en LT CD8+ comparados con controles sanos: CD160, 2B4, CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4), PD-1 (Programmed death-1), TIM-3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3) y KLRG-1 (Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) (Bensch, 2010; Nakamoto, 2008, Abdelbary, 2011; Raziorrouh, 2010; Schadeva, 2010).

CD160 es expresado en LT CD4+ y CD8+. CD160 mediante señales negativas inhibe la activación celular T (Cai, 2009). Algunos reportes muestran frecuencias de expresión de CD160 en LT CD8+ de controles sanos de 5,8% (Bensussan, 1993) y 19% (Rey, 2006). En el presente estudio, la frecuencia de expresión de LT CD8+CD160+ en controles sanos fue de 20,86%. De acuerdo con lo encontrado en el presente estudio, la expresión de CD160 presenta un patrón relativamente uniforme que muestra un promedio de expresión de 20.86%, similar al máximo valor reportado en la literatura. CTLA-4 es un receptor inhibitorio inmune, perteneciente a la familia de moléculas coestimuladoras CD28 (Riley, 2005). CTLA-4 puede inhibir la activación celular T y contribuye a la regulación inmune en modelos animales por infecciones causadas por bacterias y parásitos (Anderson, 2006; McCoy, 1997). De acuerdo con los reportes de la literatura, la frecuencia de expresión de CTLA-4 en LT CD8+ de controles sanos es de: 2,40% (Wang, 2001) y 2,9% (Frydecka, 2004). De igual forma que para CD160, en el presente estudio se encontraron un patrón de expresión relativamente uniforme en los individuos estudiados, con un valor promedio de 1,79%, cercano a lo reportado en otros estudios.

2B4 ha sido identificada en células NK, monocitos, basófilos y LT CD8+ (Eissmann, 2005). PD-1 es una proteína miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada en LT vírgenes y activados (Folkl, 2010), descrito como un importante marcador para la identificación del agotamiento en células T (Bensch, 2010; Folkl, 2010; Sachdeva, 2010). Reportes acerca de la población de LT CD8+ que expresan 2B4 es muy limitada. La frecuencia de LT CD8+2B4+ en individuos sanos es de: 51% (Peritt, 1999) y 68% (Rey, 2006). En el caso de PD-1 en la misma población, los reportes indican frecuencias de expresión de 3,5% (Song, 2010) y 7,4% (Sachdeva, 2010). En el presente estudio se encontró

que la expresión de estos dos marcadores muestra gran variabilidad entre los individuos evaluados. Se encuentra en general que en algunos hay alta expresión de las moléculas, una población de individuos que tiene una expresión intermedia y las células de algunos individuos expresan bajas frecuencias de LT CD8+ que expresan alguno de los marcadores.

El mismo caso anterior se encuentra al evaluar la coexpresión de marcadores encontrándose altas, intermedias y bajas frecuencias de coexpresión. Para el caso de CD160/2B4, un reporte indica que la frecuencia de coexpresión es de 27% en LT CD8+ de individuos sanos (Rey, 2006). Para el caso de CTLA-4/PD-1 reportes acerca de la población de LT CD8+ que coexpresan estas moléculas es muy limitada y en la información disponible se evalúan poblaciones de LT CD8+ que coexpresan CTLA-4 y PD-1 en pacientes con infecciones crónicas (Nakamoto, 2009).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados en el presente estudio indican que la expresión individual de los marcadores evaluados varía de acuerdo con su expresión en los diferentes individuos, para CD160 y CTLA-4 se encuentra una expresión relativamente uniforme, sin embargo, 2B4 y PD-1 muestran gran variabilidad entre individuos. En todos los casos se encuentra que algunas frecuencias de expresión corresponden con lo reportado en la literatura. Sin embargo, como recomendación de este trabajo, se debe tener en cuenta la variabilidad de expresión entre individuos sanos, cuando se pretendan hacer comparaciones con frecuencias encontradas en entidades clínicas, para hacer una correcta interpretación de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-1 infection. *J Infect Dis.* 2011; 203: 948-59.

Anderson KM, Czinn SJ, Redline RW, Blanchard TG. Induction of CTLA-4-mediated anergy contributes to persistent colonization in the murine model of Gastric *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol.* 2006; 176: 5306-13.

Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature.* 2006;439:682-7.

Bensussan A, Rabian C, Shiavon V, Bengoufa D, Leca G, Boumsell L. Significant enlargement of a specific subset of CD3+CD8+ peripheral blood leukocytes mediating cytotoxic T-lymphocyte activity during human immunodeficiency virus infection. 1993; 90: 9427-30.

Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, Pircher H, Thimme R. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8+ T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. *PLOS Pathog.* 2010;6:1-14.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2009;10:29-37.

Blattman JN, Wherry EJ, Ha SJ, van der Most RG, Ahmed R. The impact of epitope escape on PD-1 expression and CD8 T cell exhaustion during chronic infection. *J Virol.* 2009;83:4386-94.

Boles KS, Stepp SE, Bennett M, Kumar V, Mathew PA. 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol Rev.* 2001; 181: 234-249.

Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol Rev.* 2009; 229: 244-58.

Diez H, López MC, Thomas MC, Guzman F, Rosas F, Velazco V, Gonzalez JM, Puerta CJ. Evaluation of IFN production by CD8+ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 2006; 28:101-5.

Donnenberg AD, Donnenberg VS. Rare-event analysis in Flow cytometry. *Clin Lab Med.* 2007; 27: 627-52.

Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, Tilton JC, Long EO, Watzi C. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Am Soc Hematol.* 2005; 15: 4722-9.

Frydecka I, Kosmaczewska A, Bocko D, Cizzak L, Wolowiec D, Kuliczkowski K, Kochanowska I. Alterations of the expression of T-cell-related coestimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer.* 2004; 90: 2042-8.

Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Vet Immunol Immunopat.* 2010; 134:33-8.

Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 107-19.

Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity.* 2007;27:393-405.

McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR. Tim-3 expression on PD-1⁺ HCV-specific human CTLs Is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Inves.* 2010; 120: 4546-57.

McCoy K, Camberis M, Le Gros G. Protective Immunity to Nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *J Exp Med.* 1997; 186: 183-7.

Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Yun, Valiga ME, Kaminiski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterol.* 2008;134: 1927-37.

Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* 2009;5:1-13.

Nakajima H, Colonna M. 2B4: An NK cell activating receptor with unique specificity and signal transduction mechanism. *Hum Immunol.* 2000; 61:39-43.

Nikolova MH, Muhtarova MN, Taskov HB, Kostov K, Vezenkov L, Boumsell L, Bensussan A. The CD160⁺ CD8^{high} cytotoxic T cell subset correlates with response to HAART in HIV-1+ patients. *Cel Immunol.* 2005; 237: 96-105.

Peritt D, Sesok-Pizzini DA, Schretzenmair R, Macgregor RR, Valiante NM, Tu X, Trinchieri G, Kamoun M. C1.7 Antigen expression on CD8+ T cells is activation dependent: Increased proportion of C1.7+ CD8+ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. *J Immunol.* 1999; 162: 7563-8.

Raziorrouh B, Schraut W, Gerlach T, Nowack D, Grüner NH, Ulsenheimer A, Zachoval R, Wachtler M, Spannagl M, Haas J, Diepolder HM, Jung MC. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology.* 2010; 52: 1934-47.

Rey J, Giustiniani J, Mallet F, Schiavon V, Boumsell L, Bensussan A, Olive D, Costello RT. The co-expression of 2B4 (CD244) and CD160 delineates a subpopulation of human CD8+ T cells with a potent CD160-mediated cytolytic effector function. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 2359-66.

Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Am Soc Hematol.* 2005; 105: 13-21.

Roederer M. How many events is enough? Are you positive?. *Cytometry Part A.* 2008; 73A: 384-5.

Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, Clute S, Wang C, Korman C, Sette A, Sidney J, Pardoll DM, Cox AL. High-programmed death-1 levels on hepatitis c virus-specific t cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol.* 2008;181:8215–25.

Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008; 223: 143-55.

Sachdeva M, Fischl M, Pahwa R, Sachdeva N, Pahwa S. Immune exhaustion occurs concomitantly with immune activation and decrease in regulatory T cells in viremic chronically HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010; 54: 447-54.

Shin H, Wherry EJ. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol.* 2007;19:408-15.

Song L, Zhou Y, Li CZ, Wan MB. Natural course of chronic hepatitis B is characterized by changing patterns of programmed death type-1 of CD8-positive T cells. *World J Gastroenterol*. 2010; 7: 618-24.

Toussirot E, Saas P, Deschamps M, Pouthier F, Perrot L, Perruche S, Chabod J, Tiberghien P, Wendling D. Increased production of soluble CTLA-4 in patients with spondylarthropathies correlates with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2009;11:.

Wang XB, Zheng CY, Giscombe R, Lefvert AK. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells. *Scand J Immunol*. 2001; 54: 453-8.

Watanabe T, Bertoletti A, Tanoto AT. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepatitis*. 2010;17: 453–8.

Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 2010; 129:474-81.

Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJD, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998; 188:2205-13.