

# 실험적으로 항원에 의하여 일차 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포의 이차 면역 반응의 분석

전북대학교 수의과대학 미생물학교실 및 생체안전성연구소

박성옥 · 한영우 · Abi G. Aleyas · Junu A. George · 윤현아 · 어성국

## The Kinetics of Secondary Response of Antigen-Specific CD4<sup>+</sup> T Cells Primed *in vitro* with Antigen

Seong-Ok Park, Young-Woo Han, Abi George Aleyas, Junu Abi George, Hyun-A Yoon and Seong-Kug Eo

Laboratory of Microbiology, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Memory T lymphocytes of the immune system provide long-term protection in response to bacterial or viral infections/immunization. Ag concentration has also been postulated to be important in determining whether T cell differentiation favors effector versus memory cell development. In the present study we hypothesized that naïve Ag-specific CD4<sup>+</sup> T cells briefly stimulated with different Ag doses at the primary exposure could affect establishment of memory cell pool after secondary immunization. **Methods:** To assess this hypothesis, the response kinetics of DO11.10 TCR CD4<sup>+</sup> T cells primed with different Ag doses *in vitro* was measured after adoptive transfer to naïve BALB/c mice. **Results:** Maximum expansion was shown in cells primarily stimulated with high doses of ovalbumin peptide (OVA<sub>323-339</sub>), whereas cells *in vitro* stimulated with low dose were expanded slightly after *in vivo* secondary exposure. However, the cells primed with low OVA<sub>323-339</sub> peptide dose showed least contraction and established higher number of memory cells than other treated groups. When the cell division was analyzed after adoptive transfer, the high dose Ag-stimulated donor cells have undergone seven rounds of cell division at 3 days post-adoptive transfer. However, there was very few division in naïve and low dose of peptide-treated group. **Conclusion:** These results suggest that primary stimulation with a low dose of Ag leads to better memory CD4<sup>+</sup> T cell generation after secondary immunization. Therefore, these facts imply that optimally primed CD4<sup>+</sup> T cells is necessary to support effective memory pool following administration of booster dose in prime-boost vaccination. (*Immune Network* 2006;6(2):93-101)

**Key Words:** CD4<sup>+</sup> T cells, primary exposure, secondary response, memory T cell pool

### 서 론

기억 면역 T 세포(memory T cell)가 항원에 대한 이차 노출에 대하여 매우 빠르고 효과적인 반응을 보이는 것은 적응 면역(adaptive immunity) 반응에 있어서 매우 중

요하게 여겨지고 각종 백신 및 바이러스 감염에 있어서 주의 깊게 다루어지고 있다. 이와 같은 memory T 세포는 바이러스나 세균 등에 의한 급성 감염(acute infection) 후 naïve T 세포가 반응을 하여 증식하는 확장기(expansion phase)를 거쳐 effector T 세포가 형성되고 그 후 90% 이상의 대부분 effector T 세포가 세포사멸기전(programmed cell death)에 의하여 죽어가는 과정 중, 각종 생존신호(survival signal)에 의하여 일부 effector T 세포가 남아 수축기(contraction phase)를 거쳐 지속적인 생존을 보여주는 기억면역세포 형성기(memory phase)를 이룸으로써

책임저자 : 어성국, 전북대학교 수의과대학 미생물학교실  
☎ 561-756, 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14  
Tel: 063-270-3882, Fax: 063-270-3780  
E-mail: vetvirus@chonbuk.ac.kr

본 연구는 한국학술진흥재단 지역대학우수과학자 지원 연구(R05-2003-000-10270-0)의 지원에 의하여 수행된 것임.

형성되는 것으로 여겨지고 있다(1-4). 이와 같이 형성된 기억 면역 T 세포(memory T cell)는 바이러스와 같은 병원균의 재감염에 대한 방어 면역을 형성하는 데 매우 중요한 역할을 하고, 전체적으로 형성되는 항원 특이 기억 면역 T 세포의 크기(memory T cell pool)는 각종 백신 개발에 있어서 중요하게 여겨진다. 그래서, 기억 면역 T 세포의 크기를 높일 수 있는 일반적인 방법으로 항원에 노출 후 나타나는 확장기의 크기가 형성되는 기억 면역 T 세포의 크기를 결정하는 것으로 여겨지며, 또한, 수축기에서 effector T 세포의 세포사멸기전을 억제함으로써 보다 많은 수의 기억 면역 T 세포를 형성할 수 있을 것으로 생각된다(5,6).

비록 naive T 세포와 기억 면역 T 세포가 항원 노출에 의하여 활성화되고 유지되는 방법에 대한 기전과 인자들의 많은 정보가 있지만, 위에서 언급한 확장기와 수축기를 조절하는 기전에 대한 정보는 많지 않다. 많은 급성 감염 모델에서 T 세포의 수축기의 시작은 항원이 생체 내에서 사라짐과 동시에 시작되는 것으로 여겨진다(7). 따라서, 급성 감염에 있어서 항원의 노출기간이 확장기에서 수축기로의 전환을 유도하는데 중요할 것으로 생각된다. 그러나, 최근의 연구 결과에 의하면 *Listeria monocytogenes* (LM) 감염 모델에서 급성 감염 후 항생제 ampicillin을 처리함으로써 LM을 반응 초기에 제거함으로써 급성 감염 기간과 항원 노출 시간을 조절한 실험 모델에서 감염 기간과 항원 노출의 축소는 초기의 CD8<sup>+</sup> T 세포의 확장기에서 수축기로의 전환에 아무런 영향을 미치지 못함을 알게 되었다(8). 마찬가지로, CD8<sup>+</sup> T 세포의 수축기의 시작은 만성 감염(chronic infection) 모델로서 lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) 감염 모델을 이용한 경우 지속적인 항원 노출이 아무런 영향을 주지 못하였다(8-10). 따라서, 이와 같은 결과들은 감염 기간과 항원 노출 기간이 항원 특이 CD8<sup>+</sup> T 세포의 수축의 시간과 크기를 변화시키지 못함을 의미하고, 적어도 CD8<sup>+</sup> T 세포의 경우에는 아주 이른 감염 초기에 수축기의 시작과 규모는 정하여진 것으로 여겨진다.

반대로, CD4<sup>+</sup> T 세포의 이와 같은 확장기와 수축기에 대한 정보는 많지 않다. CD4<sup>+</sup> T 세포는 수지상 세포(dendritic cell)의 활성화, 대식세포(macrophage)의 활성을 유도할 수 있는 각종 염증성 cytokine의 생산, 항체 형성을 위한 cytokine의 생산 등의 다양한 방법에 의하여 면역 반응에 관여한다(11,12). 일반적으로, CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포의 활성화는 항원(antigen)과 CD28을 비롯한 costimulation 신호를 요구하며 같은 방법에 의하여 확장기, 수축기를 거쳐 기억 면역 세포 형성기를 형성할 것으로 생각된다(13,14). 그러나, 급성 감염에 대한 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응의 비교 연구에서 차이점이 나타났고, 이러한 차이점은 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포가

병원체 감염에 대하여 서로 다른 기능을 할 수 있음을 의미한다(15,16). 예를 들어, 항원에 대한 노출을 유도하고 나타나는 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응의 동역학(kinetics)을 분석하면, 두 세포 간의 반응은 같은 수준의 역학을 보여준다. 그러나, 형성된 항원 특이 CD8<sup>+</sup> T 세포의 기억 면역 세포보다 안정정인 기억 면역 T 세포의 크기를 형성하여 오랫동안 지속되는 반면에 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 시간이 지남에 따라서 지속적인 감소 현상을 나타내었다(17). 더욱이, 형성된 기억 면역 CD8<sup>+</sup> T 세포는 이중 감염(heterologous infection) 후 기억 면역 세포의 크기가 감소된 반면에 CD4<sup>+</sup> T 세포의 경우 아무런 변화를 보여주지 못하였다(18-21). 이와 같은 기억 면역 CD8<sup>+</sup> T 세포와 CD4<sup>+</sup> T 세포를 유지하는 데 있어서의 차이는 T 세포의 생존과 증식에 관여하는 각종 cytokine 및 생존 신호의 차이를 반영하는 것으로 보여진다. 따라서 실제로 IL-7은 기억 면역 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포의 생존에 관여하는 것으로 보고되었으며, IL-15은 기억 면역 CD8<sup>+</sup> T 세포의 유지에만 관여하고 기억 면역 CD4<sup>+</sup> T 세포의 유지에는 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 보고된 바 있다(22-26).

현재, 감염기간과 항원 노출 기간에 따른 CD4<sup>+</sup> T 세포 반응의 동역학에 대한 정보는 없다. 더욱이, 일차 항원에 노출된 CD4<sup>+</sup> T 세포가 이차 항원에 노출되었을 때 나타나는 역학에 대한 정보는 없다. 따라서, 본 연구에서는 형질전환 실험동물 DO11.10.BALB/c 생쥐에서 chicken ovalbumin의 epitope peptide OVA323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 얻어 실험실적으로 저용량의 항원 또는 고용량의 항원으로 자극한 다음(primary exposure), naive BALB/c 생쥐에 adoptive transfer 후 이차 항원 노출(secondary exposure) 후 나타나는 CD4<sup>+</sup> T 세포의 역학을 살펴보았다. 그 결과 흥미롭게도 저용량의 항원으로 일차 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수축기의 규모가 적게 유도됨으로써 궁극적으로 보다 많은 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 기억 면역 T 세포가 형성될 수 있음을 알게 되었다. 이와 같은 결과는 향후 CD4<sup>+</sup> T 세포의 기억 면역 T 세포 형성에 대한 정보와 CD4<sup>+</sup> T 세포가 방어 면역에 깊게 관여하는 각종 감염에 대한 백신 개발에 중요한 정보를 제공할 것으로 여겨진다.

## 재료 및 방법

**실험동물.** 실험동물은 5~6주령의 BALB/c (H-2<sup>d</sup>)를 (주) 다물 사이언스에서 구입하여 사용하였으며, chicken ovalbumin의 peptide 323-339 (OVA<sub>323-339</sub>: ISQAVHAAHAEINEAGR)에 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 높은 빈도로 갖고 있는 형질전환 실험동물 DO11.10.BALB/c는 울산대학교 면역 조절 센터로부터 공급받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 실험동물은 전북대학교 수의과대학 실험 동물실에서

유지되어 관리규정에 맞추어 실험에 사용하였고, 형질 전환된 실험 동물은 trimethoprim과 sulfamethoxazol이 첨가된 멸균된 물과 사료를 공급하고 정화시설이 갖추어진 살균된 깨끗한 환경에서 실험에 사용되었다.

**항체와 펩타이드.** 항원 특이 세포를 분석하기 위한 유세포분석(flow cytometry)에 사용된 다음과 같은 항체는 Pharmingen (BD Bioscience)로부터 구입하여 사용하였다: PE-conjugated anti-CD4 (RM4-5), FITC-conjugated anti-CD25 (7D4), anti-CD44 (IM7), anti-CD26L (MEL-14) 및 anti-CD69 (H1.2F3). OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드에 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분석하기 위해 biotin-conjugated KJ1-26 (Caltag Lab., Burlingame, CA)와 streptavidin-PerCP를 사용하였다. Chicken ovalbumin 단백질의 CD4<sup>+</sup> T 세포의 epitope인 OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드(ISQAVHAAHAEINEAGR)는 화학적으로 합성(Peptron Inc., Daejeon city, Korea)하여 사용하였다.

**항원 특이 CD4<sup>+</sup> T cell 분리 및 in vitro 자극.** 형질 전환 실험동물 DO11.10.BALB/c 생쥐로부터 OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드에 특이적인 CD4<sup>+</sup> T 세포는 nylon-wool column을 이용하여 분리하고, 면역화 되지 않은 naive BLAB/c의 비장 세포로부터 metrizamide (14.5 g/100 ml PBS)를 이용한 농도 구배방법에 의하여 항원제시세포(antigen-presenting cells, APCs)를 준비하였다. Nylon-wool column에 의하여 분리된 T 세포는 유세포 분석에 의하여 분석한 결과 85% 이상의 CD3<sup>+</sup> T cells (>65% CD4<sup>+</sup> T cells, >25% CD8<sup>+</sup> T cell)와 그 외 <8% B220<sup>+</sup> cell과 <5% CD11b<sup>+</sup> cell의 분포를 보여 주었다. 얻어진 T 세포(5×10<sup>6</sup> cells/ml)와 항원제시 세포(1×10<sup>6</sup> cells/ml)를 일정 비율(5 : 1)로 혼합하고 OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드를 0.05μg/ml 또는 5.0μg/ml의 농도로 첨가함으로써 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 12시간 동안 자극하였다. Naive T 세포를 12시간 자극시킨 후 또 다시 T 세포를 nylon-wool column에 적용하여 OVA<sub>323-339</sub> peptide와 항원제시세포를 제거하였다. OVA<sub>323-339</sub> peptide에 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 포함하는 분리된 T 세포는 naive BLAB/c의 꼬리 정맥(tail vein)에 마리당 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T세포가 1×10<sup>6</sup> cells가 되도록 주입하였다. Recipient 생쥐는 adoptive transfer 후 3일째 되는 날에 발바닥(footpad)에 complete Freund's adjuvant (CFA)를 섞은 OVA<sub>323-339</sub> peptide (마리당 20μg)를 주입함으로써 면역화 하였다.

**FACS 분석.** OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분석하기 위한 유세포 분석은 지시된 항체를 이용하여 염색한 후 분석하였다. 준비된 림프구 또는 비장 세포(1×10<sup>6</sup> cells/100μl PBS-0.5% BSA)를 준비하고 지시된 항체를 넣고 흔들어 준 후 4°C에서 40분간 방치하였다. 항체로 염색된 세포는 PBS-0.5% BSA용액을 이용하여 두 번 세척하고 고정액을 이용하여 고정시킨 후 FACSCaliber

cytometer와 CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 분석하였다.

**Cytokine assay.** 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포로부터 생산된 IL-2와 IFN-γ의 측정은 사이토카인 ELISA방법에 의하여 측정하였다. 준비된 비장세포 또는 림프절 세포를 OVA<sub>323-339</sub> peptide 1μg/ml의 농도로 처리하여 2일간 자극시켰다. 자극을 위하여 항원제시세포가 필요한 경우에는 naive BALB/c 생쥐로부터 준비하여 일정비율(5 : 1)로 혼합함으로써 자극시켰다. 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포로부터 생산되는 사이토카인을 측정하기 위하여 배양 상층액을 ELISA에 적용하였다. ELISA plate는 anti-mouse IL-2 (JES6-1A12) 및 IFN-γ (R4-6A2) 항체로 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. ELISA plate를 PBS-Tween 20으로 3회 세척하고, 3%의 탈지유로 처리함으로써 37°C에서 2시간 동안 블로킹하였다. 배양 상층액과 표준 cytokine 단백질을 처리하고 1시간 30분 동안 배양하였다. 다시 PBS-Tween 20으로 3회 세척하고 biotinylated anti-mouse IL-2 (JES6-5H4)와 IFN-γ (XMGI.2) 항체를 처리한 다음 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. ELISA plate를 또다시 PBS-Tween 20으로 3회 세척하고 peroxidase-conjugated streptavidin을 첨가한 다음, 1시간 배양한 후 기질용액으로 발색시켰다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader (Molecular Device, USA)로 405 nm에서 측정하여 림프구에서 생산된 cytokine IL-2와 IFN-γ의 양을 계산하였다.

**CFSE에 의한 in vivo Ag-specific CD4<sup>+</sup> T 세포 증식 측정.** OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드에 특이적인 CD4<sup>+</sup> T 세포를 OVA<sub>323-339</sub> 펩타이드 0.05μg/ml 또는 5.0μg/ml로 12시간 동안 자극한 후 펩타이드를 nylon-wool column을 이용하여 제거하였다. 12시간 자극 후 T 세포(2×10<sup>7</sup> cells/ml PBS)를 5μM CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; Molecular Probes, Eugene, OR)에 넣고 5분간 상온에서 방치하였다. 결합되지 않은 CFSE는 동량의 우태아 혈청을 첨가함으로써 염색 반응을 종결짓고 배지를 이용하여 3회 세척하였다. CFSE로 표지된 T 세포는 마리당 1×10<sup>7</sup> 세포가 되도록 naive BLAB/c의 꼬리 정맥(tail vein)에 주사하였다. 그로부터 3일째 되는 날 popliteal lymph node (LN)로부터 세포를 준비하고 PE-conjugated anti-CD4와 KJ1-26 항체를 이용하여 CFSE division을 분석하였다.

**Mitotic events에 의한 세포 분열 계산.** CFSE division에 의한 총 mitotic event 수의 계산은 이전에 기술된 방법에 준하여 수행되었다(27). Mitotic event를 보여주는 CFSE의 각 peak를 0 division부터 n division까지 유세포 분석에 의하여 분석하였다. n division이 유도된 하나의 T 세포는 2<sup>n</sup>개의 daughter cell로 분화되기 때문에, 만약 세 번의 division (n=3)이 유도된 총 T 세포의 수가 8이면 하나

의 T 세포로부터 이루어진 것임을 알 수 있다( $2^3=8$ ). 따라서, 이와 같은 수학적 계산에 의하여 각 peak 내에 존재하는 T 세포의 수를 분석한 다음 그로부터 precursor의 수를 계산하고 발생한 총 mitotic event의 수를 계산하였다.

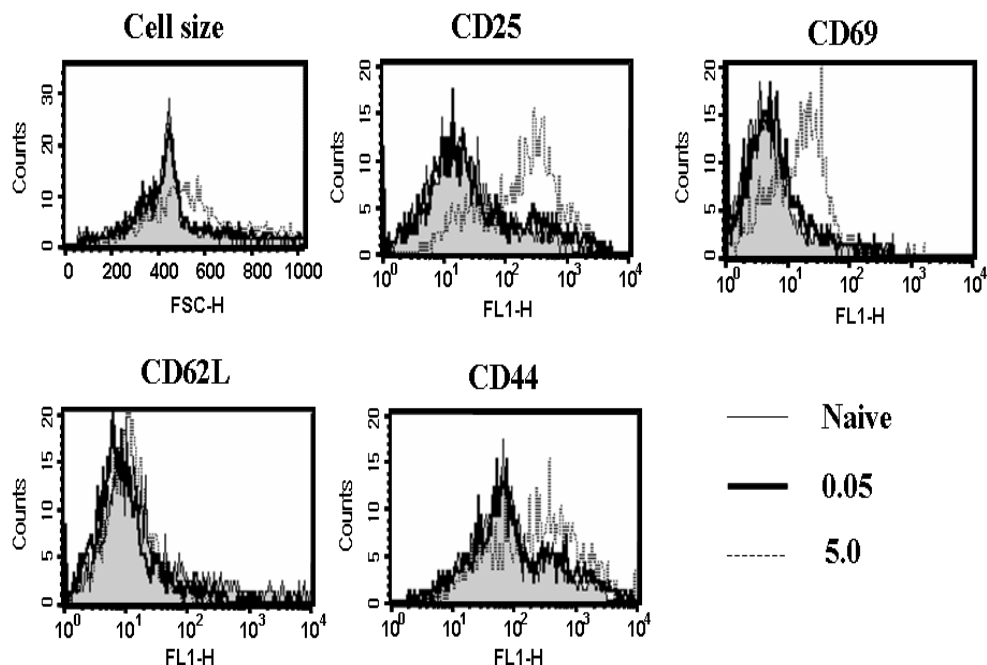
**통계학적 처리.** 각 실험군 간의 통계학적 처리는 별도로 기술되지 않는 한 paired Student's t-test와 Chi-square test에 의하여 검정하였다. 실험군 간의 유의성은  $p < 0.05$ 인 경우에만 인정하였다.

## 결과

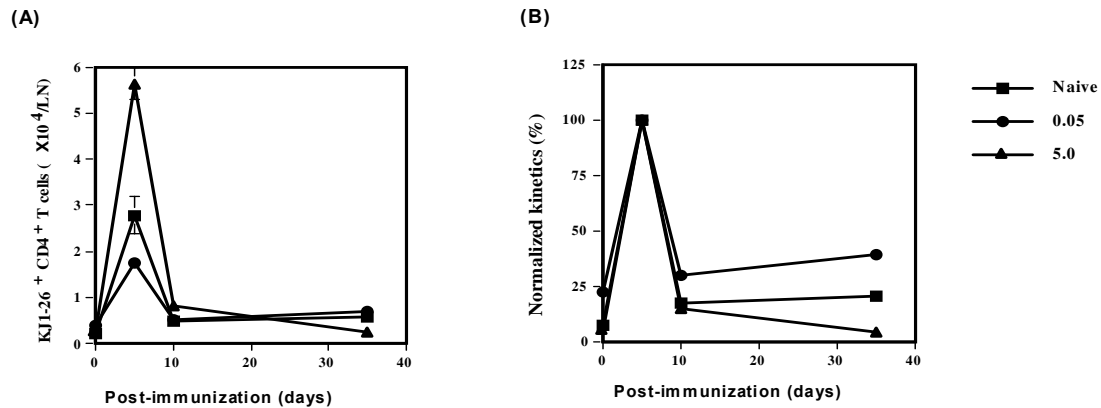
**항원 용량에 따른 in vitro 자극 후 표현형 변화.** 형질전환 실험동물 DO11.10.BALB/c 생쥐로부터 분리된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 항원 용량에 따른 표현형의 변화를 알아보기 위하여 nylon-wool column에 의하여 분리된 T 세포를 syngeneic APC와 혼합한 다음 OVA<sub>323-339</sub> peptide 0.05 µg/ml 또는 5.0 µg/ml의 농도로 처리한 후 12 시간 동안 자극시킨 다음 표현형의 변화를 측정하였다. 그 결과 저농도(0.05 µg/ml)로 처리된 경우에는 세포크기를 비롯하여 CD25, CD69, CD62L 및 CD44의 발현이 무처리군과 비교하여 크게 변화되지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 반대로 고용량 (5.0 µg/ml)의 항원을 넣고 12시간

CD4<sup>+</sup> T 세포가 활성화된 것으로 나타났다. 그래서 무처리 군과 비교하여 세포 크기가 증가하였고 그 외에 CD62L을 제외하고 CD25, CD69 및 CD44 등의 표면 단백질 발현이 증가된 것으로 나타났다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 실험실적으로 분리된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 저용량과 고용량의 항원으로 자극시킨 경우 고용량의 경우 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 12시간 자극에 의하여 대부분이 활성화된 반면에 저용량으로 자극된 경우는 자극되지 않은 naive CD4<sup>+</sup> T 세포와 같은 수준의 활성화 정도를 보여주는 것을 의미한다.

**자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포 adoptive transfer 후 이차 항원 반응의 Kinetics.** 실험실적으로 12시간 동안 저용량 또는 고용량으로 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 생체 내에서의 항원에 대한 이차 노출 후의 반응을 분석하기 위하여 일차적으로 자극된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 naive BALB/c 생쥐에 adoptive transfer하였다. 그로부터 recipient 생쥐를 3일간 방치한 후 OVA<sub>323-339</sub> peptide를 이용하여 면역화함으로써 생체 내에서 이차 반응을 유도하였다. Recipient 생쥐는 면역화 후 5일, 10일 그리고 35일째에 림프절에 존재하는 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수를 측정하는 데 이용되었다. 그 결과 면역화 후 5일째 되는 날 항원 특이 반응의 peak



**Figure 1.** Phenotype of KJ1-26<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with different doses for 12 h in the presence of Th1-type driving cytokines. T cells isolated from DO11.10.BALB/c mice were enriched by nylon-wool column and stimulated by different doses (0.05 and 5.0 µg/ml) of chicken ovalbumin peptide (OVA<sub>323-339</sub>) in the presence of cytokines IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (2 ng/ml) and IL-4 antibody (1 µg/ml). Twelve hours later, phenotype of stimulated KJ1-26<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was determined by three-color FACS analysis. 자극시킨 경우에는 대부분의 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이

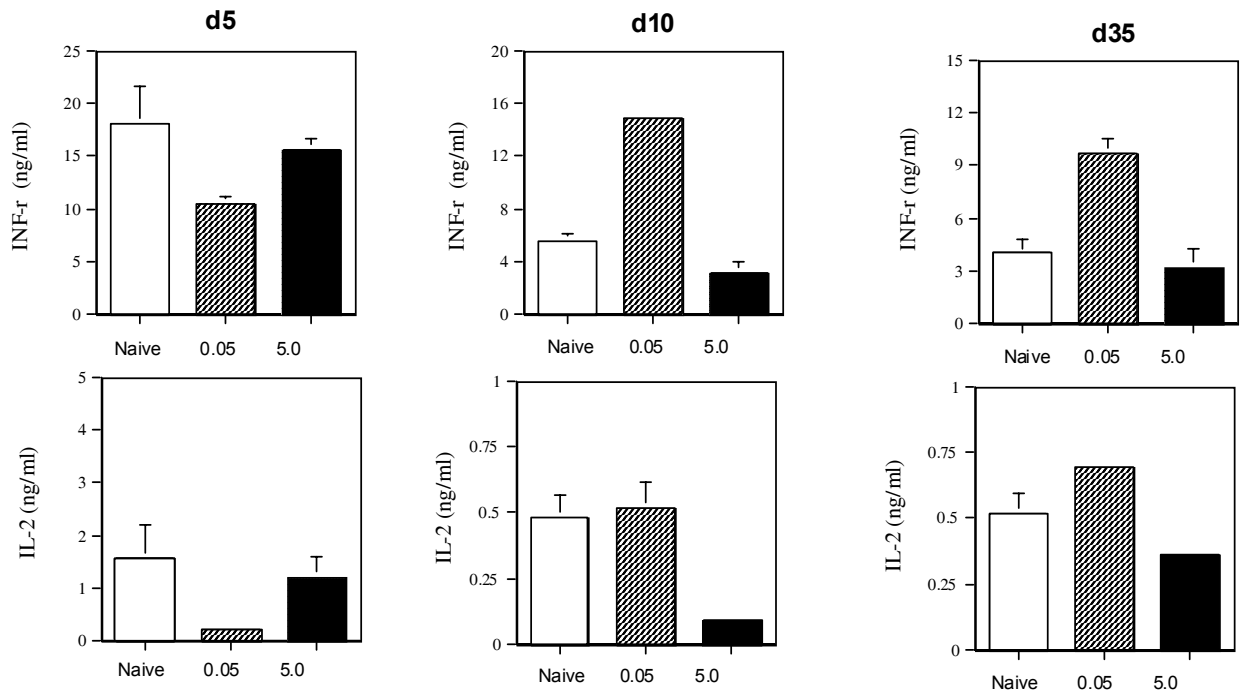


**Figure 2.** Kinetics of KJ1-26<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell number in popliteal LN of recipients immunized with OVA<sub>323-339</sub> peptide. T cells isolated from DO11.10.BALB/c mice were enriched by nylon-wool column and stimulated by different doses (0.05 and 5.0 μg/ml) of OVA<sub>323-339</sub> peptide in the presence of Th1-type driving cytokines IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (2 ng/ml) and IL-4 antibody (1 μg/ml). Twelve hours later, peptide was removed by washing with nylon-wool column again and then stimulated T cells were adoptively transferred into naive BALB/c mice. The recipient BALB/c mice were immunized with 20 μg OVA<sub>323-339</sub> peptide plus complete Freund's adjuvant (CFA) three days following adoptive transfer. The immunized recipients were sacrificed to determine Ag-specific T cell at 5, 10, and 35 days post-immunization. The number of KJ1-26<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell was determined by two-color FACS analysis. The graphs represent the average and standard deviation of three mice per group.

이 CD4<sup>+</sup> T 세포 대부분이 소실되어 10% 정도의 항원 특이 T 세포가 존재하였으며, 그 후 35일째에 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분석한 결과 일부의 세포가 생존하여 기억 면역 세포(memory T cell)가 형성된 것으로 보여진다 (Fig. 2A). 더욱이 저용량으로 일차 자극된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 경우 이차 자극에 의하여 생체 내에서 수축의 정도가 자극되지 않은 naive CD4<sup>+</sup> T 세포보다 낮은 수준의 항원 특이 반응이 이루어져 최고점을 이루는 5일째에 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수가 가장 적게 나타났으며, 고용량으로 일차 자극된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 경우는 생체 내에서 2차 항원 반응에 의하여 가장 높은 이차 반응을 보여줘 면역화 후 5일째에 가장 많은 수의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 검출되었다. 그러나 수축이 완성되는 면역화 후 10일째 존재하는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수는 무처리군과 저용량으로 일차 자극된 그룹과 비슷한 수준의 수를 보여주었으며 35일째에는 그와 같은 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수가 계속적으로 감소되어 저용량으로 일차 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포를 adoptive transfer한 군보다 낮은 수준의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 검출되었다( $p=0.024$ )(Fig. 2A). 이와 같은 일차 자극된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 adoptive transfer 후 이차 면역반응 후 나타나는 동역학의 최고점을 이루는 5일째에 존재하는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 100%로 하여 면역화 후 5일, 10일 및 35일째에 존재하는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수를 각각 표준화(normalization)하였을 때 저용량과 고용량으로 일

차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 이차 면역반응 후 나타나는 확장기의 증가(fold)는 고용량으로 일차 자극된 군에서 높게 관찰되었고(fold > 20), 저용량으로 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포는 낮은 수준의 expansion 규모를 보여주었다(fold < 5.0)(Fig. 2B). 그러나 흥미로운 것은 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 면역화 후 10일째에 수축이 적게 유도되어 고용량으로 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포 또는 naive CD4<sup>+</sup> T 세포보다 높은 수준의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 존재하는 것으로 나타났다( $p=0.007$ ). 이와 같은 사실은 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 이차 면역 반응 후 확장기는 고용량으로 자극된 경우 또는 무처리군의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 달리 증식되는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 낮은 수준의 확장기를 보여 주지만, 확장기의 최고점을 이룬 후 수축기에서 낮은 수준의 수축이 유도됨으로써 면역화 후 10일째와 기억 면역 세포 형성기(35일째)에서 높은 수준의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 존재하는 것으로 나타났다.

또한, 저용량 또는 고용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 adoptive transfer한 다음 면역화 후 림프절로부터 세포를 준비하여 OVA<sub>323-339</sub> peptide로 실험실적으로 자극하여 생산되는 cytokine IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생산을 ELISA에 의하여 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 면역화 후 5일째 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포로부터 생산되는 IFN- $\gamma$ 와 IL-2 cytokine의 양이 자극되지 않은 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 고용량으로 자

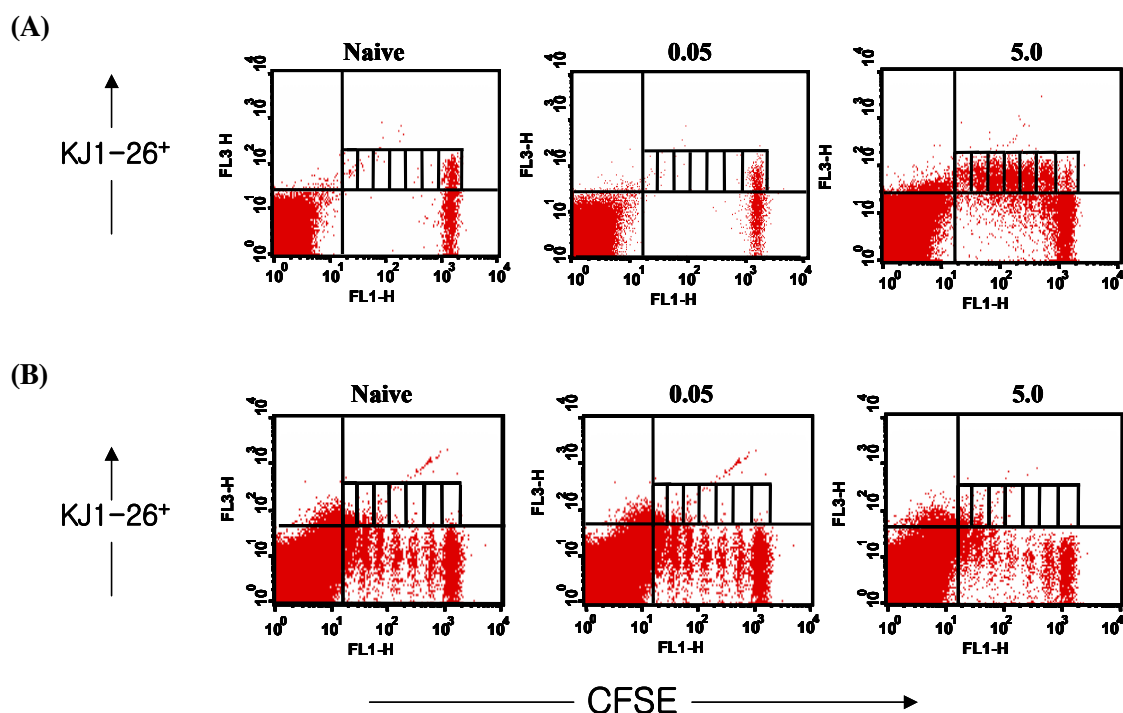


**Figure 3.** The production of cytokine IFN- $\gamma$  and IL-2 from popliteal LN cells isolated of recipients immunized with OVA<sub>323-339</sub> peptide. The popliteal LN cells were isolated from recipients at 5, 10, and 35 post-immunization and stimulated with APCs pulsed by OVA<sub>323-339</sub> peptide (1 $\mu$ g/ml). The amount of cytokines were determined by conventional ELISA after stimulating CD4<sup>+</sup> T cells with antigen for either 48 h (d5) or 72 h (d10 and d35). The graphs represent the average and standard deviation of three mice per group.

극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포로부터 생산되는 양보다 적게 나타났다(d5)(Fig. 3). 그러나, 그와 같은 cytokine 생산은 10일째의 경우 역전되어 저용량으로 일차 반응시 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 많은 양의 IFN- $\gamma$ 와 IL-2의 생산을 보여 주었고(d10), 기억 면역 세포 형성기의 35일째 경우도 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 많은 양의 cytokine을 생산하는 것으로 나타났다(d35). 따라서, 이와 같은 결과는 일차 반응시 저용량으로 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 생체내에서 이차 항원에 대한 반응이 고용량으로 일차 자극된 것보다 확장기의 규모가 적게 나타나지만 수축이 적게 유도됨으로써 보다 많은 기억 면역 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 존재한다는 것을 보여 준다.

**CFSE에 의한 세포분열 분석.** 실험실적으로 저용량 또는 고용량의 항원으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 생체내 adoptive transfer 후 면역화하기 전까지 3일간에 세포분열 여부를 분석하기 위하여, 저용량 또는 고용량의 항원으로 12시간 동안 일차자극 후 nylon-wool column을 이용하여 항원제시세포와 OVA<sub>323-339</sub> peptide 항원을 제거하고 CFSE를 이용하여 T 세포를 형광 염색하였다. 염색된 T 세포는 naive BALB/c 생쥐에 adoptive transfer 후 3일째 되는 날에 popliteal LN에서 세포를 준비한 다음, OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 분열

을 분석하였다. 그 결과 저용량의 항원으로 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 항원으로 자극되지 않은 naive CD4<sup>+</sup> T 세포는 세포 분열 현상이 adoptive transfer 후 3일간 발생하지 않은 것으로 나타났다(Fig. 4A). 반면에, 실험실적으로 고용량의 항원으로 일차 자극된 OVA<sub>323-339</sub> peptide 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 adoptive transfer 후 세포분열 현상을 보여 주어 3일째에 일부 세포의 경우 7~8회의 세포 분열이 이루어진 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또 다시, adoptive transfer 후 3일째에 recipient 생쥐를 OVA<sub>323-339</sub> peptide (20  $\mu$ g/mouse)로 면역화 후 3일째에 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 세포 분열을 분석한 결과 naive CD4<sup>+</sup> donor cell과 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 비롯하여 고용량의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 모두 항원의 이차 도입에 의하여 왕성하게 세포 분열이 이루어져 대부분이 7번 이상의 세포분열이 일어난 것으로 나타났다(Fig. 4B). 이와 같은 세포분열 현상을 popliteal LN에서 일어난 mitotic event의 총 수를 계산하여 보면 Table I과 같다. 따라서, 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 naive CD4<sup>+</sup> T 세포와 같이 adoptive transfer 후 세포 분열 현상이 거의 유도되지 않은 반면에, 고용량으로 12시간 동안 일차 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포는 adoptive transfer 후 세포분열이 일어나 popliteal LN에서 총 2,629번의 mitotic event가 일어났음이 수학적으로 계산되었



**Figure 4.** The in vivo division of CFSE-labeled OVA<sub>323-339</sub>-specific CD4<sup>+</sup> T cells in popliteal LNs of recipients. T cells isolated from DO11.10.BALB/c mice were enriched by nylon wool column and stimulated by different dose (0.05 and 5.0 μg/ml) of chicken ovalbumin peptide (OVA<sub>323-339</sub>) in the presence of cytokine IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (2 ng/ml), adn IL-4 antibody (1 μg/ml). Twelve hours later, peptide was removed by washing with nylon-wool column again. Following staining the stimulated T cells with CFSE, T cells were then adoptively transferred into naive BALB/c mice. The CFSE division was analysed by FACS analysis at 3 days post-adoptive transfer and post-immunization.

**Table I.** Total mitotic events of adoptively transferred OVA<sub>323-339</sub>-specific CD4<sup>+</sup> T cells in popliteal lymph nodes of recipients

	OVA <sub>323-339</sub> peptide used for in vitro stimulation (μg/ml)		
	Naive	0.05	5.0
Three days post-adoptive transfer (before immunization)	4	5	2,629
Three days post- immunization (secondary exposure)	-	-	-

다. 따라서, 이와 같은 결과는 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 naive CD4<sup>+</sup> 세포와 같은 특성으로 adoptive transfer 후 아무런 변화가 유도되지 못하지만 이차 항원 도입에 의하여 왕성하게 자극받을 수 있음을 알 수 있고, 고용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 12시간의 자극으로 이미 활성화되어 adoptive transfer 후 항원이 존재하지 않은 상태에서도 세포분열

은 이루어져 effector cell이 만들어지는 것으로 보여진다. 또한, 그와 같은 상황에서 이차 항원 도입은 저용량으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포도 활성화되어 세포 분열이 유도될 수 있음을 의미한다.

## 고 찰

생체 내(in vivo)에서 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포는 항원제시세포에 의하여 제시되는 항원과 costimulation 분자들의 도움을 받아 활성화된다. 활성화된 후 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포는 특이적으로 증식하여 수많은 effector T 세포로 분화되며, 이러한 확장기의 최고점은 면역화 후 비장의 경우 7~9일, draining LN의 경우 5~7일 사이에 형성되는 것으로 보여진다(8,15,28,29). 이와 같은 확장기의 최고점이 형성된 후 대부분의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포는 세포사멸기전에 의하여 죽어 수축기를 형성한다(15). 이와 같은 수축기에서 생존신호를 받아 살아남은 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포는 기억 면역 세포 형성기로 들어가 기억 면역 T 세포를 형성한다(15). 여기서, 수축기의 시작과 수축의 크기를 결정하는 인자들에 대한 정보는 없다. 일부의 경우 수축기의 시작은 도입된 항원이 생체

내로부터 제거되는 시점에서 시작되는 것으로 여겨지며, 이러한 경우 생존 cytokine 신호가 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다(30-32). 이와 같은 모델은 감염체의 생체 내 제거를 지연시킨 만성 감염 모델에서 항원 노출을 지속적으로 유도한 경우 T 세포가 왕성하게 증식하여 많은 기억 면역 T 세포를 형성한다는 결과와 항원을 보다 짧은 시간동안 노출시킨 경우에는 T 세포의 증식이 억제되고 일부의 경우 궁극적으로 면역 관용을 유도한다는 사실은 앞서 이야기한 결론과 일치한다(33-37). 결국 이러한 사실은 항원의 노출 또는 감염체의 감염 지속 시간 등이 항원 특이 T 세포의 수축기의 시작과 전체 기억 면역 T 세포의 크기를 결정한다는 것으로 예견된다.

그러나, 최근 LM 감염 모델에서 감염 후 항생제 ampicillin 처리에 의한 항원 노출 시간을 감소시켰을 때 수축기를 비롯한 항원 특이 CD8<sup>+</sup> T 세포의 반응 동역학에 아무런 변화가 발견되지 않았음은 반대의 결론을 유추한다(8). 이러한 사실은 항원 특이 CD8<sup>+</sup> T 세포의 수축기의 시작과 규모는 이미 항원이 도입된 후 초기에 결정되어 있는 것으로 여겨진다. 또한, 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 경우도 LM 감염 모델에서 항원 특이 CD8<sup>+</sup> T 세포와 같은 역학을 보여주었다(38). 한편, 본 연구에서는 형질전환 실험동물로부터 분리된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 저용량 또는 고용량의 항원으로 자극한 다음 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 naive BALB/c에 adoptive transfer 후 3일 후에 일정량의 항원을 이용하여 면역화 후 나타나는 CD4<sup>+</sup> T 세포의 이차 반응의 동역학을 살펴 보았다. 흥미로운 사실은 항원이 도입된 후 5일째에 확장기의 최고점을 형성한 후 수축기가 시작되었고, 수축의 크기는 저용량으로 항원에 노출된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 수축이 낮게 유도됨으로써 궁극적으로 고용량으로 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포보다 많은 수의 기억 면역 T 세포를 형성할 수 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 사실은 위에서 기술된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 항원에 대한 반응 동역학이 같은 경향을 보여 주었지만 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 이전에 항원에 노출될 때의 상황에 따라 이차 항원 노출에 대한 이차 반응의 역학이 변화 될 수 있음을 의미하는 것이다. 또한, 본 연구에서 실험적으로 저용량 또는 고용량의 항원으로 일차 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포를 naive BALB/c 생쥐에 adoptive transfer 후 면역화하기 전 3일째 되는 날에 세포의 증식을 CFSE division에 의하여 분석하였다. 저용량으로 전처리된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 naive CD4<sup>+</sup> T 세포와 같이 전혀 세포 분열이 유도되지 못하여 effector T 세포를 형성하고 있지 못한 반면에, 고용량의 항원을 12 시간 동안 자극된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 이미 많은 세포분열이 이루어져 딸세포(daughter cell)가 형성되어

있는 것이 관찰되었다. 그러나, 면역화하기 전 popliteal LN에 존재하는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 총수를 분석한 결과 저용량 또는 고용량으로 처리된 CD4<sup>+</sup> T 세포와 naive CD4<sup>+</sup> T 세포를 adoptive transfer한 경우에 실험군 사이에 차이를 보여 주었지만 유의성 있게 관찰되지 않았다. 이러한 사실은 adoptive transfer 후 3일째 면역화 시 비슷한 수의 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 popliteal LN에 존재하여 이차 반응이 시작되었음을 의미한다. 그러나, 고용량으로 처리된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 이차 반응에서 가장 큰 규모의 확장기를 보여준 것은 일차 반응 시 고용량의 항원에 의하여 보다 활성화됨으로써 다른 실험군보다 폭발적으로 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포가 증식된 것으로 여겨진다.

LM 감염 모델에서 항생제 ampicillin에 의한 항원 노출 시간의 감소는 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포 확장기의 최고 수준을 감소시키고, 최고점에 이르는 시간도 대조군에 비교하여 1일 정도 빠르게 나타남이 관찰되었다(38). 이러한 결과는 일차 반응의 역학을 기초로 하여 나타난 결과로서 본 연구결과와 상이한 점이 발견된다. 저용량 항원에 의하여 실험적으로 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포의 이차 항원 노출에 대한 이차 반응은 이전에 항원으로 자극되지 않은 naive CD4<sup>+</sup> T 세포와 비교해도 낮은 수준의 확장 크기가 관찰되었고, 최고점에 이르는 시간은 고용량 항원으로 자극된 CD4<sup>+</sup> T 세포와 naive CD4<sup>+</sup> T 세포와 같은 5일째에 관찰되었다. 이와 같은 결과는 일차 반응 시 항원에 대한 반응이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 이차 반응에 영향을 줄 수 있다는 의미로서, 특히 백신의 prime-boost 접종의 경우 일차 접종(primary exposure)에 의하여 나타난 면역반응의 특성은 이차 접종(secondary exposure)에 의하여 유도되는 면역반응의 정도 및 기억 면역 T 세포의 크기를 결정할 수 있음을 의미한다. 더욱이 본 연구에서 관찰된 바와 같이 저용량으로 일차 노출된 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포는 이차 노출에 의하여 비록 확장기의 크기는 작지만 수축기 규모가 적게 유도됨으로써 보다 효과적인 기억 면역 T 세포가 형성되는 것으로 보아, 일차 노출 시 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포에 세포사멸기전을 억제할 수 있는 생존 신호가 형성될 수 있음을 예견한다(39,40). 이러한 예견은 향후 일차 노출 시 나타나는 생존 신호에 대한 보다 정확한 분석에 의하여 밝혀지겠지만 결론적으로 본 연구는 보다 효과적인 항원 특이 CD4<sup>+</sup> T 세포의 기억 면역 세포를 형성하기 위한 prime-boost 예방 접종에서의 일차 항원 노출의 중요성을 암시한다.

## 참 고 문 헌

1. Welsh RM, McNally JM: Immune deficiency, immune silencing, and clonal exhaustion of T cell responses during viral infections. *Curr Opin Microbiol* 2;382-387, 1999
2. Whitmire JK, Ahmed R: Costimulation in antiviral immunity:



- differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 12;448-455, 2000
3. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R: Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2;251-262, 2002
  4. Harty JT, Badovinac VP: Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* 14;360-365, 2002
  5. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC: Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369;652-654, 1994
  6. Welsh RM, Selin LK, Razvi ES: Role of apoptosis in the regulation of virus-induced T cell responses, immune suppression, and memory. *J Cell Biochem* 59;135-142, 1995
  7. Ahmed R, Gray D: Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272;54-60, 1996
  8. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT: Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3;619-626, 2002
  9. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R: Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77;4911-4927, 2003
  10. Badovinac VP, Hamilton SE, Harty JT: Viral infection results in massive CD8+ T cell expansion and mortality in vaccinated perforin-deficient mice. *Immunity* 18;463-474, 2003
  11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18;767-811, 2000
  12. Walker LS, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Brocker T, Lane PJ: Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40. *Immunol Today* 21; 333-337, 2000
  13. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA: In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol* 19;23-45, 2001
  14. Harty JT, Badovinac VP: Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* 14;360-365, 2002
  15. Schiemann M, Busch V, Linkemann K, Huster KM, Busch DH: Differences in maintenance of CD8+ and CD4+ bacteria-specific effector-memory T cell populations. *Eur J Immunol* 33;2875-2885, 2003
  16. Homann D, Teyton L, Oldstone MB: Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* 7;913-919, 2001
  17. Varga SM, Selin LK, Welsh RM: Independent regulation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell memory pools: relative stability of CD4 memory under conditions of CD8 memory T cell loss. *J Immunol* 166;1554-1561, 2001
  18. Li J, Huston G, Swain SL: IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 198; 1807-1815, 2003
  19. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM: Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198;1797-1806, 2003
  20. Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R: Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4;680-686, 2003
  21. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L: Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1;426-432, 2000
  22. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, Ahmed R: Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195;1541-1548, 2002
  23. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD: Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* 195;1523-1532, 2002
  24. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J: Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8;591-599, 1998
  25. Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, Mathis D, Butz EA: Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med* 195;1515-1522, 2002
  26. Judge AD, Zhang X, Fujii H, Surh CD, Sprent J: Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 196;935-946, 2002
  27. Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA: Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 100;3173-3183, 1997
  28. Mercado R, Vijn S, Allen SE, Kerksiek K, Pilip IM, Pamer EG: Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165;6833-6839, 2000
  29. Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH: Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection. *Eur J Immunol* 30;1053-1059, 2000
  30. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB: In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell* 6;683-692, 2000
  31. Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356;397-400, 1992
  32. Vella AT, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P: Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;3810-3815, 1998
  33. Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A: The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8;89-95, 1998
  34. Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A: The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29;4092-4101, 1999
  35. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401;708-712, 1999
  36. Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK: Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410;101-105, 2001
  37. Langenkamp A, Casorati G, Garavaglia C, Dellabona P, Lanzavecchia A, Sallusto F: T cell priming by dendritic cells: thresholds for proliferation, differentiation and death and intracлонаl functional diversification. *Eur J Immunol* 32;2046-2054, 2002
  38. Corbin GA, Harty JT: Duration of infection and antigen display have minimal influence on the kinetics of the CD4+ T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 173;5679-5687, 2004
  39. Whitmire JK, Ahmed R: The economy of T-cell memory: CD4+ recession in times of CD8+ stability? *Nat Med* 7; 892-893, 2001
  40. Sprent J, Tough DF: T cell death and memory. *Science* 293;245-248, 2001