

BCG 예방접종을 받은 개체에서 유도되어 있는 결핵균 균체항원에 특정한 CD8+T 세포의 보호 면역반응

¹연세대학교 의과대학 미생물학교실, ²한림대학교 유전체응용연구소, ³국립마산결핵병원
¹조장은, ¹조상래, ²이경화, ³박승규, ¹*조성애

M. tuberculosis Somatic Antigen Specific CD8+T cell Responses in BCG-Vaccinated Subjects

¹Jang-Eun Cho, ¹Sang-Nae Cho, ²Kyung Wha Lee, ³Seung Kyu Park and ¹Sungae Cho

¹Department of Microbiology, Brain Korea 21 project for Medical Sciences, Yonsei University Medical Center,

²Hallym Institution for Genome Application Hallym University, ³National Masan Tuberculosis Hospital

Background : The immune responses mediated by CD8+T cells are known to be significant in controlling *M. tuberculosis* infections. In order to determine the role of cytotoxic CD8+T cells in the protective immune mechanism in latently infected subjects, this study examined whether or not the cytotoxic immune responses of CD8+T cells specific to the *M. tuberculosis* somatic antigens are induced in BCG vaccinated healthy subjects.

Methods : Cytotoxicity and IFN- γ elispot assays were used to investigate the activities of CD8+T cells specific for the thyA₃₀₋₃₈ peptide epitope in circulating peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from BCG-vaccinated HLA-A*0201 and A*0206 subjects.

Results : The results indicate the cytotoxic and IFN- γ immune responses of CD8+T cells specific for thyA₃₀₋₃₈ were induced in BCG vaccinated healthy subjects.

Conclusion : The cytotoxic and IFN- γ responses by CD8+T cells specific for the *M. tuberculosis* somatic antigens are induced in BCG-vaccinated subjects, and appear to be involved in the protective immune mechanism in latently infected people against a *M. tuberculosis* infection. (*Tuberc Respir Dis* 2005; 59: 272-278)

Key words : CD8+T cells, cytotoxicity, *M. tuberculosis* somatic antigens

서 론

결핵은 전세계 인류의 약 1/3이 보균자로 추정되고 있으나, 이중에서 약 1/10 정도만이 실제로 면역기능의 저하 등의 요인으로 질병을 일으킨다고 보고되고 있다¹. 결핵균 보균자들의 대부분에서는 면역반응이 효율적으로 일어나서 일생동안 질병이 유발되지 않

고 잠복감염의 형태로 남아있는데, 따라서 면역저하 현상이 결핵을 유발시키는 기전에 대한 연구와 잠복 감염된 개체에서 효율적으로 일어나는 보호면역반응에 관한 연구등이 활발히 진행되고 있다².

결핵균에 대한 신체의 보호 기전에서 임상적으로나 실험에 의한 증거들 모두 T 세포나 대식세포들에 의한 세포매개 면역반응 (Cell-mediated immune responses)이 주요한 보호 기전이라고 알려져 왔다^{3,4}. 특히 IFN- γ 나 TNF- α 같은 싸이토카인의 분비와 감염된 대식세포의 활성화등을 일으키는 CD4+T 세포의 중요성이 그 동안 많이 강조되어 왔는데⁵⁻⁷, 최근에 와서는 CD8+T 세포의 결핵의 보호면역반응에서의 중요성도 많이 알려지고 있다. CD8+T 세포들은 IFN- γ 와 granulysin과 같은 항균성 (antimicrobial) 물질의 분비로 감염된 대식세포내의 결핵균을 죽일 수 있다고 증명된 바 있다. 잠복감염의 조절기전에서도 CD8+T 세포의 중요성 또한 최근에 보고되는데, 그 예로 잠복 감염된 사람들에게서 결핵균에 특정한 CD8+T 세포

본 연구는 2001년도 연세대학교 학술연구비 (6-2001-0056)와 과학기술부 국정연구실 연구비 (M1-0204-00-0146)에 의하여 지원되었음.

Address for correspondence : **Sungae Cho, Ph.D.**
Department of Microbiology, Yonsei University Medical Center 134 Seodaemun-ku, Shinchon-dong 120-749 Seoul, Korea
Phone : 02-2228-1831 Fax : 02-392-9310

Current address : Institut Pasteur Korea, 39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu 136-791 Seoul, Korea
Phone : 02-3299-0322 Fax : 02-3299-0210
E-mail : scho@pasteur.or.kr

Received : Jun. 16. 2005

Accepted : Aug. 26. 2005

들이 많이 존재한다고 보고된 바 있다⁸⁻¹¹. 또한 결핵 잠복감염의 마우스 모델에서 CD8+T 세포들을 제거하면 재감염이 일어난다고 보고되었으며¹², 잠복감염이 되어 있는 환자의 육아종(granuloma)에는 결핵균에 특이적인 CD4+T 세포와 CD8+T 세포들이 모여 있어서 면역반응을 조절한다는 결과가 최근에 보고되었다¹³.

결핵균에 존재하는 단백질 중에서 효율적으로 세포매개 면역반응을 유도할 수 있는 항원의 동정은 결핵에 대한 면역 반응의 연구와 백신을 개발하는 단계에 있어서 매우 중요하다. 이러한 항원 동정의 연구가 결핵균의 분비항원들에 대하여 국한되어 왔으나, 최근의 보고에 따르면 균체항원도 면역반응을 효율적으로 일으킬 수 있다는 결과가 나오고 있다^{14,15}. 예를 들어서 HLA-A*0201에 제한적인 CD8+T 세포에 특정한 항원 결정기들이 결핵균의 균체항원에서 동정되었는데, 결핵환자 뿐만 아니라 BCG 예방접종을 한 건강인에서도 항원결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+T 세포들이 유도되어 있어서 결핵의 감염에서 보호면역 기전에 관여하고 있다고 제시된 바 있다¹⁶. CD8+T 세포는 IFN- γ 분비뿐만 아니라 독성면역반응을 유도하여 결핵의 보호기전에서 중요한 역할을 하므로, 본 연구에서는 균체항원 중에서 결핵균의 핵산 합성에 관여하는 thymidylate synthase 단백질과 세포대사에 관여하는 hydrolase 단백질에 공통으로 존재하는 항원결정기에 특정하게 유도되는 CD8+T 세포들의 독성능이 BCG 예방접종을 한 건강인 들에서 유도되어 있는지 알아보려고 하였다.

또한, 한 펩티드가 여러 가지 다른 MHC subtype에 의해 제시될 수 있는데, 이들을 묶어서 MHC super-

type이라고 정의한다. 하나의 supertype에 속하는 subtype들은 정도의 차이는 있으나 같은 펩티드와 결합하여 결합된 펩티드를 T 세포에 제시할 수 있으며, 이러한 개연성은 펩티드 백신 개발을 장려할 수 있는 요인이기도 하다^{17,18}. HLA-A*0201 type은 HLA-A2 supertype에 속하는데 한국인에게 흔하게 표현되는 HLA-A2 supertype에 속하는 subtype에는 HLA-A*0201 (약 30%) 과 A*0206 (약 15-17%)이 있다. 그러므로, 본 연구에서는 HLA-A*0206를 표현하는 개체의 말초혈액에서도 본 연구에 사용된 결핵균의 항원 결정기에 특정한 CD8+T 세포의 독성 반응이 유도될 수 있는지 연구하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

연구 대상 : BCG 예방접종을 한 건강인들 중에서 HLA-A*0201을 보유하고 있는 개체 2명 (N1, N2)과 HLA-A*0206을 보유하고 있는 개체 2명 (N3, N4) 에서 말초혈액을 채취하였다 (도표 1). Tuberculin PPD (Statens serum institute, Copenhagen, Denmark) 검사에서 6 mm 이상 크기의 지연 과민반응을 나타낸 사람을 양성 (PPD+) 으로 하였다.

HLA-A 형별 분석 : 개체의 HLA-A 형별은 PCR-SBT (PCR sequence based typing method) 방법으로 확인하였다¹⁹. 즉, 각 개체의 말초혈액에서 분리된 백혈구에서 DNA를 추출하였으며, HLA-A 유전자좌 -특이 PCR primer set와 중합효소를 이용하여 HLA-A 유전자의 다형적 부위 (exon 2와 exon 3)를 증폭하고

Table 1. HLA-A molecule subtyping of subjects participated in the study

Subjects	HLA-A type	PPD test	Age	Sex
N1	A*0201/A*2402	+(14mm)	38(10)	M
N2	A*0201/A*1101	+(10mm)	52(1)	M
N3	A*0206/A*2402	-(0mm)	24(10)	M
N4	A*0206/A*1101	+(20mm)	34(10)	M

The HLA-A typing of each blood donor was performed by DNA sequencing analysis of PBMC. Four subjects expressing either HLA-A*0201 or A*0206 subtypes were selected for this study. The subject was defined as being PPD positive (+) if a hypersensitivity skin reaction with 2 T.U. tuberculin/0.1 ml (Statens Seruminstitut) was 6 mm three days after the tuberculin injection. In the PPD test, the number in parenthesis indicates the diameter of swelling reaction at the site of injection. In the age description, the number in parenthesis indicates the age when the subject was most recently vaccinated with BCG.

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, DA, USA)와 DNA 자동염기서열 측정기(ABI3100)를 이용하여 HLA-A 유전자 염기서열을 확인하고 형별을 분석하였다. 분석된 개체 중에서, HLA-A*0201 와 A*0206 type을 가진 개체들을 선별하였다.

2. 방법

펩티드 배열과 합성 : 본 연구에서 사용된 펩티드의 아미노산 배열은 RLPLVLPVAV 이고, 결핵균의 알려진 2 개의 유전자들 (ThyA₃₀₋₃₈ (thymidylate synthase, GenBank accession no. 15609852) 또는 Rv2715₁₆₃₋₁₇₁ (possible hydrolase, GenBank accession no. 15609852)) 에 공통으로 존재한다. 펩티드는 고려대학교에 부속 되어 있는 기초과학연구원 연구소에서 합성되었다.

말초혈액에서 기억독성 면역반응 (Recall CTL response)의 유도 : HLA-A*0201 또는 A*0206 을 표현하는 개체의 말초혈액에서 백혈구를 Ficoll/hypaque (Pharmacia) density gradient centrifugation 방법을 사용하여 분리하고, 3X10⁶ cells/ml culture media 들을 24 well plate의 각각 well에 가하였다. 10 µg/ml 펩티드를 각각의 well에 가한 다음, 3일과 6일 후에 recombinant human IL-2 (R&D) 를 10 units/ml 의 농도로 가하였다. 7일째에 cell culture를 펩티드로 pulse 된 자가대식세포로 자극시켰다. 10일째와 12일째에,

10 units/ml 의 IL-2를 가하고, 독성능을 14일째에 ⁵¹Cr release assay (NEN) 를 사용하여 측정하였다¹⁵.

IFN-γ Elispot (Enzyme-linked immunospot Assay) : 96 well elispot assay plate는 anti-IFN-γ (BD-Pharmingen) 항체로 하루 동안 코팅하였다. 다음날 개체에서 말초혈구를 분리하고 CD4+ conjugated magnet beads (Dynal biotech, NY, USA) 를 사용하여 CD4+T 세포들을 제거하였다. CD4+T 세포가 제거된 말초혈구를 3x10⁵, 6x10⁵의 배율로 희석하고 펩티드, anti-CD28 mAb (1 µg/ml, BD-Pharmingen), IL-2(10 units/ml) 를 넣고 이틀 동안 배양하였다. 그 다음, biotinylated anti-IFN-γ mAb를 넣고 2시간 동안 반응시키고, streptavidine-alkaline phosphatase 접합체를 넣고 30분 동안 반응시켰다. IFN-γ를 분비하는 각각의 세포들은 색깔이 있는 점으로 보여지게 되는데, elispot assay plate reader 기계 (AID, Strassberg, Germany)를 사용하여 그 수를 측정하였다.

결 과

1. BCG 예방접종을 받은 HLA-A*0201 개체의 말초혈액에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 특정한 CD8+T 세포의 독성반응.

HLA-A*0201 subtype을 표현하며 BCG 예방접종을 받은 6 명의 개체들에서 백혈구를 분리하고 ThyA₃₀₋₃₈

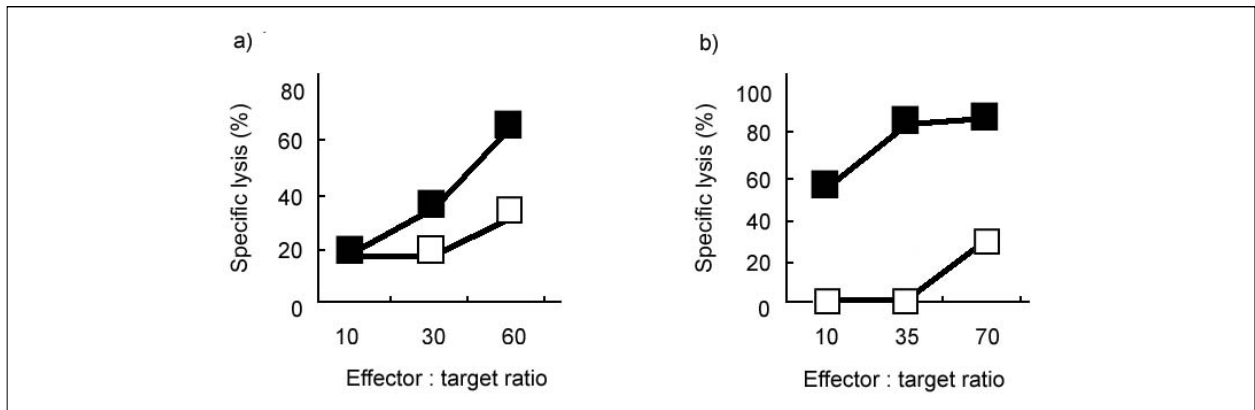


Figure 1. Cytotoxic T cell responses from BCG vaccinated subjects expressing HLA-A*0201 subtype. PBMC from BCG vaccinated HLA-A*0201 subjects (a)N1, (b)N2) were stimulated with ThyA₃₀₋₃₈ peptide for 1 week and restimulated with ThyA₃₀₋₃₈ peptide-pulsed autologous monocytes for an additional week. The cytolytic activity of these cultured PBMC was tested on day 14 by ⁵¹Cr release assay.

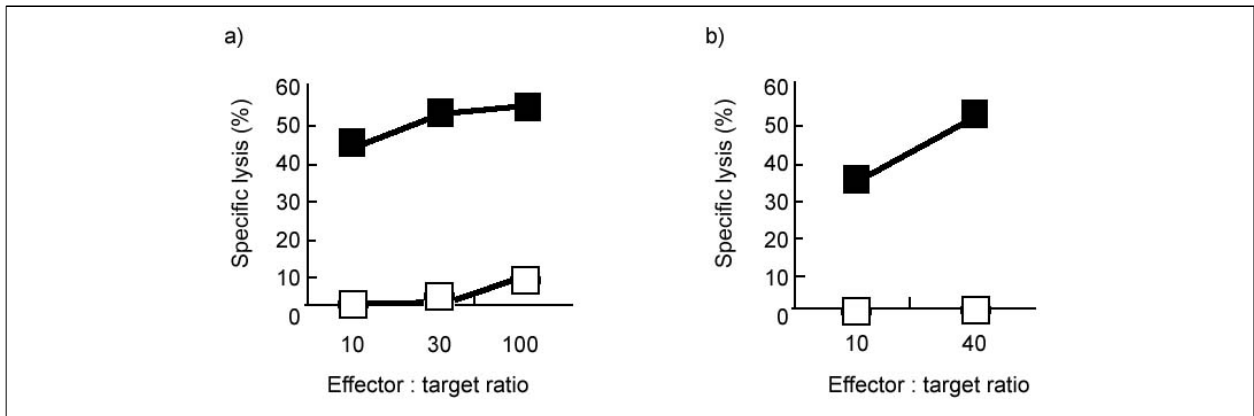


Figure 2. Cytotoxic T cell responses from BCG vaccinated subjects expressing HLA-A*0206 subtype. PBMC from BCG vaccinated HLA-A*0206 subjects (a)N3, b)N4) were stimulated with ThyA₃₀₋₃₈ peptide for 1 week and restimulated with ThyA₃₀₋₃₈ peptide-pulsed autologous monocytes for an additional week. The cytolytic activity of these cultured PBMC was tested on day 14 by ⁵¹Cr release assay.

펩티드로 2주간 자극하여 기억독성 면역반응을 유도하였다. 2주간 자극을 준 단기세포주의 독성반응을 검사하였는데, 2명에게서 독성반응이 효율적으로 유도되는 것을 Figure 1 에서와 같이 확인하였다. 그리고 이들 2 명은 모두 PPD 검사를 하였을 때 양성을 나타내었다. 이러한 결과는 BCG 예방백신을 맞거나, 또는 결핵의 잠복감염이 되어 있는 개체에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 특정한 CD8+ T 세포의 기억면역반응이 유도되어 있으며, 항원의 자극이 왔을 때 빨리 활성화가 일어나서 독성능을 나타내며 보호면역 반응을 일으킬 수 있다는 것을 제시한다.

2. BCG 예방접종을 받은 HLA-A*0206 개체의 말초혈액에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 특정한 CD8+T 세포의 독성반응.

기억독성 면역반응을 유도하기 위하여 HLA-A*0206을 표현하는 개체 6명에게서 백혈구를 분리하고, ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드로 2주간 자극을 준 후에 독성반응을 검사하였는데, 개체 2명에게서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드와 결합된 표적세포에 대한 독성반응이 효율적으로 유도되는 사실을 Figure 2에서와 같이 확인하였다. 이와 같은 결과는 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드가 HLA-A*0206를 표현하는 개체에서도 효율적으로 CD8+T 세포에 의한 독성반응을 일으키는 HLA-A2 supertype 항원결정기임을 제시한다. 그러나 이들 2명중에서 1명(N3)은

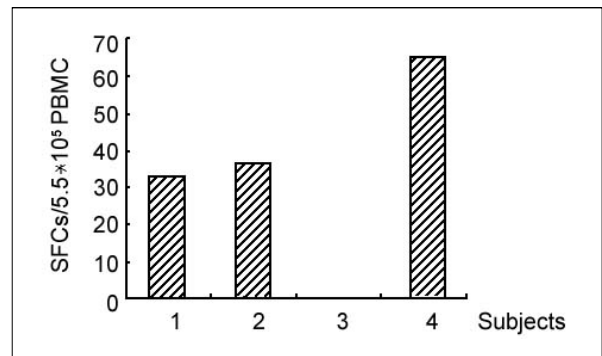


Figure 3. Enumeration of the frequency of the circulating ThyA₃₀₋₃₈ peptide specific IFN-γ secreting CD8+ T cells in BCG vaccinated healthy subjects. An *ex vivo* IFN-γ elispot assay was used to quantify the frequency of the circulating ThyA₃₀₋₃₈ specific IFN-γ secreting CD8+ T cells in BCG vaccinated healthy subjects (1:N1, 2:N2, 3:N3, 4:N4). The frequencies of the SFCs (spot forming cells) were calculated as number of spots per 5.5*10⁵ PBMC after subtracting the number of spots in the unstimulated PBMC.

PPD 검사에서 음성을 나타내었고, 다른 1명(N4)은 양성을 나타내었다.

3. *Ex vivo* IFN-γ elispot assay를 이용하여서 BCG 예방접종을 받은 개체의 말초혈액내에서 결핵균 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드 항원 결정기에 특정하게 IFN-γ 를 분비하는 CD8+T 세포수의 정량 분석.

Ex vivo IFN-γ elispot assay를 이용하여서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드 자극에 특정하게 IFN-γ를 분비할 수 있는 CD8+T

세포의 수를 앞의 실험에서 독성능을 나타낸 4명 개체의 말초혈액에서 측정하였다. Figure 3에서 보여주는 바와 같이 2명의 A*0201 과 1명의 A*0206 개체에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+T 세포가 5.5×10^5 PBMC 당 약 30개 이상 존재한다는 것을 알 수 있었다. 이들 양성을 나타낸 사람들은 또한 PPD 검사에서 양성 반응을 나타낸 개체들이었다. 결론적으로 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 대한 면역반응에서 개체 1 (N1, A*0201, PPD+) 과 2 (N2, A*0201, PPD+) 그리고 개체 4 (N4, A*0206, PPD+) 에서 모두 IFN- γ 분비능이 *ex vivo* assay 결과에서 보여주는 것처럼 말초혈액에서 유도되어 있고, 기억 독성 면역반응도 유도될 수 있었다. 개체 3 (N3, A*0206, PPD-)에서는 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 대한 독성 면역반응만이 유도되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 특정한 CD8+ T 세포의 독성능과 IFN- γ 분비능이 항상 함께 유도되지는 않는다고 할 수 있으며, 독성능보다는 IFN- γ 분비능이 PPD 검사와 더 상관관계가 있다고 해석된다.

고 찰

본 연구에서는 결핵균의 균체 항원에서 유래한 항원 결정기에 특정 CD8+T 세포의 독성능과 IFN- γ 분비능에 의한 면역 반응이 BCG 예방백신을 맞은 개체에게서 유도되어 있는 정도를 알아보려 하였다. 결핵균은 인체내에 들어왔을 때 대개 대식세포내의 탐식포(phagosome) 내에서 번식하게 된다. 이때 탐식포 내로 분비되는 결핵균의 분비항원이 숙주의 세포 면역반응을 효율적으로 유도한다고 알려져 왔고 따라서 대부분의 결핵에 대한 면역반응의 연구는 결핵균의 분비항원에 대한 연구에 국한되어 왔다. 그러나 결핵균 자체에 존재하는 균체 항원도 세포매개 면역반응을 효율적으로 유도할 수 있다고 발표되고 있으므로 결핵에 대한 면역반응이나 백신 개발 등의 연구가 균체항원에 대하여도 이루어져야 한다고 사료된다.

IFN- γ 유전인자가 결여된 마우스 모델에서는 결핵균의 감염이 정상 마우스보다 훨씬 증가한다는 사실이 검증되었으므로, IFN- γ 가 매우 중요한 보호 면역

작용을 한다는 사실은 증명된 바 있다⁵. 한편으로는 IFN- γ 의 면역반응이 결핵의 보호기전에서 꼭 필요한 요소이기는 하지만 충분한 조건은 아니라고 알려져 왔다^{20,21}. 즉 면역반응의 다른 요소들이 결핵에 대한 보호 면역기전에 필요하다는 보고들이 발표되고 있는데 독성능이 그 하나라고 할 수 있다. 본 연구에서 사용한 항원 결정기에 특정 CD8+T 세포들은 결핵균으로 감염된 대식세포를 인지하여서 죽일 수 있다고 보고되었는데, 이러한 독성능이 BCG로 예방접종을 한 건강인 들에서 유도되어 있는지 알아 보려 하였다.

최근에 본 연구에 이용한 항원결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+T 세포들이 결핵환자와 BCG 예방백신을 맞은 건강인에게서 유도되어 있는 결과를 발표하였는데, 본 연구에서는 이들 항원 결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+T 세포들이 또한 BCG 예방백신을 맞은 건강인들에게서 독성능을 나타낼 수 있다는 것을 증명하였다. 그러나 CD8+T 세포들의 IFN- γ 분비능과 독성면역 반응이 항상 함께 유도되어 있지는 않다고 해석된다²². 또한 잠복감염으로 남아있는 건강인과 질병이 일어난 결핵환자에서는 결핵균 항원의 표현이 다르게 일어나므로 이에 반응하는 CD8+T 세포에 특정하게 항원성이 높은 항원 결정기도 다를 수 있다고 추측할 수 있다²³. 이미 발표된 연구에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 대한 독성반응이 결핵환자에게서 약하게 유도되어 있는 것을 관찰할 수 있었는데, 본 연구에서 연구된 바는 BCG 예방백신을 맞은 건강인에서 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 반응하는 CD8+T 세포들의 독성능이 더 효율적으로 유도되어 있다고 해석된다¹⁵. 이러한 결과로써, BCG 예방백신을 받은 개체에게서는 ThyA₃₀₋₃₈에 대한 CD8+T 세포의 독성 면역반응이 효율적으로 유도되어 있으며 보호면역기전에 관여하리라고 기대된다. 결핵균에 특정 CD8+T 세포들의 역할이 보호면역반응을 일으키거나 아니면 오히려 숙주 조직의 파괴와 병의 진전에 관여할 수도 있는데, 건강인에 더 효율적으로 유도되어 있는 CD8+T 세포의 독성능은 이러한 CD8+T 세포들이 오히려 보호면역에 관여한다는 사실을 제시한다고 하겠다.

현재, 결핵에 대한 새로운 예방백신에 관련된 주요 연구분야는 결핵의 병인기전과 방어면역기전이며 이와 같이 결핵에 대한 예방백신 개발은 여러 가지 측면에서 연구가 이루어지고 있는데, 동정된 항원이나 항원결정기들은 subunit 백신이나 유전자재조합백신, DNA 백신들의 개발에 응용될 수 있다. 또한, 본 연구에서 사용된 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드는 HLA-A*0201과 A*0206 subtype을 갖고 있는 개체들에게서 CD8+T 세포의 면역반응을 유도할 수 있으므로, 결핵에 대한 펩티드 백신개발에서 그 백신 대상의 범위를 넓힐 수 있다는 것을 제시한다고 할 수 있다.

요 약

배 경 :

결핵의 보호면역 반응에서 CD8+T 세포에 의한 여러 기전이 중요한 역할을 한다는 사실이 최근에 보고되고 있다. IFN- γ 분비 외에도 결핵균으로 감염된 세포에 독성을 나타내어 직접 결핵균으로 감염된 세포를 제거하는 독성능 또한 그 역할이 중요하다고 알려지고 있는데, BCG 예방접종을 받은 개체에서도 이러한 균체항원에 특정한 CD8+T 세포의 독성능이 유도되어 있어서 보호면역 반응에서의 역할을 하는지 연구하였다.

대상 및 방법 :

HLA-A*0201 과 A*0206를 표현하며 BCG 예방접종을 한 개체들의 혈액에서 백혈구를 분리하고 균체항원의 항원결정기 (ThyA₃₀₋₃₈) 에 대한 독성능과 *ex vivo* IFN- γ 분비능을 유도하였다.

결 과 :

이들 대상에게서 IFN- γ 분비능과 독성능이 유도되는 것을 관찰할 수 있었고, 또한 HLA-A*0201에 결합하여 CD8+T 세포의 면역 반응을 일으키는 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드들은 HLA-A*0206인 개체에서도 면역반응을 일으키는 것을 관찰할 수 있었다.

결 론 :

균체 항원에 특정한 CD8+T 세포들의 IFN- γ 분비능과 독성능이 BCG 백신주사를 맞은 개체에서 유도되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 이러한 균

체항원에 특정한 CD8+T 세포들이 보호면역 반응에 관여한다는 것을 제시하며, 또한 HLA-A*0201 개체들과 HLA-A*0206 개체들을 대상으로 하는 백신이나 치료제로써 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드의 사용 가능성을 제시한다.

참 고 문 헌

1. World Health Organization. WHO report on the tuberculosis epidemic. Publ. No. WHO/TB/95. Geneva: World Health Organization; 1995. p. 183.
2. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 2004;110:2-12.
3. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
4. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis* 2004;84:93-101.
5. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 1993;178:2249-54.
6. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* 1995; 2:561-72.
7. Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1995;63:736-40.
8. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, et al. High frequencies of circulating IFN- γ -secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted Mycobacterium tuberculosis epitope in M. tuberculosis-infected subjects without disease. *Eur J Immunol* 2000;30: 2713-21.
9. Smith SM, Brookes R, Klein MR, Malin AS, Lukey PT, King AS, et al. Human CD8+ CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A. *J Immunol* 2000;165:7088-95.
10. Lewinsohn DM, Alderson MR, Briden AL, Riddell SR, Reed SG, Grabstein KH, et al. Characterization of human CD8+ T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis-infected antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1998;187:1633-40.
11. Lewinsohn DM, Zhu L, Madison VJ, Dillon DC, Fling SP, Reed SG, et al. Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from Mycobacterium tuberculosis-infected cells: definition of antigenic specificity.

- J Immunol* 2001;166:439-46.
12. van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 2000;30:3689-98.
 13. Tully G, Kortsik C, Hohn H, Zehbe I, Hitzler WE, Neukirch C, et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2005;174:2174-84.
 14. Canaday DH, Ziebold C, Noss EH, Chervenak KA, Harding CV, Boom WH. Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol* 1999;162:372-9.
 15. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, Stenger S, Serbina N, Mazzaccaro RJ, et al. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12210-5.
 16. Cho JE, Lee KW, Park SK, Cheon SH, Cho SN, Cho S. The study of MHC class I restricted CD8+ T cell mediated immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection: evidence of *M. tuberculosis* specific CD8+ T cells in TB patients and PPD+ healthy individuals. *Immune Netw* 2003;3:235-41.
 17. Sette A, Vitiello A, Reheman B, Fowler P, Nayarsina R, Kast WM, et al. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 1994;153:5586-92.
 18. del Guercio MF, Sidney J, Hermanson G, Perez C, Grey HM, Kubo RT, et al. Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype. *J Immunol* 1995;154:685-93.
 19. Hurely C. Sequence-based typing for HLA-A. In: Tilanus MG, Hansen JA, Hurley CK, editors. *Class I sequencing amplification of exons 2 and 3 based upon Cereb. IHWG Technical Manual. Vol. TM7A. Seattle: International Histocompatibility Working Group; 2000.*
 20. Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 1999;7:366-72.
 21. Flynn JL. Why is IFN-gamma insufficient to control tuberculosis? *Trends Microbiol* 1999;7:477-8.
 22. Chen A, Wang L, Zhang J, Zou L, Jia Z, Zhou W, et al. H-2 Kd-restricted hepatitis B virus-derived epitope whose specific CD8+ T lymphocytes can produce gamma interferon without cytotoxicity. *J Virol* 2005;79:5568-76.
 23. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, et al. Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med* 2003;198:693-704.
-