

CTLA-4 항원의 활성화 T 세포내 발현의 특성: 세포질내 단백질복합체 구성분자의 동정

한양대학교 의과대학 미생물학교실

임대철 · 정용훈

Characterization of CTLA-4 Antigen Expression: Identification of Molecules Composing Intracellular CTLA-4 Multiprotein Complex

Dae-Cheol Rhim and Yong-Hoon Chung

Department of Microbiology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4, CD152) has been known as a homologue of CD28, an accessory molecule providing a key costimulatory signal for successful antigen-driven activations of T lymphocyte. Most of biochemical and cell biological characteristics of the CD152 protein remain unknown while those of CD28 have been characterized in detail. **Methods:** In this study CD152 expression in both CD4⁺ and CD8⁺ PBLs was studied by using flow cytometry. And intracellular CD152 multiprotein complex was purified and used for generating antibodies recognizing proteins composing of intracellular CTLA-4 multi protein complex. **Results:** Level of surface expression of this molecule was peaked at 2 days of PHA stimulation in flow cytometric analysis. 40~45% of PHA blast cells were CD152⁺ in both of two subsets at this stage and the level of expression were equivalent in both two subsets. Contrary to this surface expression, intracellular expression was peaked at day 3 and it was preferentially induced in CD8⁺ cells and about 60% of CD8⁺ cells were CD152⁺ at this stage. High molecular weight (>350 kD) intracellular CD152 protein complex purified by using preparative electrophoresis were immunized into rabbits and then 3 different anti-P34PC4, anti-P34PC7 and anti-P34PC8 antibodies were obtained. Using these 3 antibodies two unknown antigens associated with intracellular CD152 multiprotein complex were found and their molecular weights were 54 kD and 75 kD, respectively. Among these, the former was present as 110 kD homodimer in non-reducing condition. **Conclusion:** It seemed that 34 kD intracellular CD152 molecule forms high molecular weight multiprotein complex at least with 2 proteins of 75 kD monomer and 110 kD homodimer. (*Immune Network* 2002;2(1):35-40)

Key Words: CTLA-4, intracellular complex, p54, p75

서 론

CD28과 유사한 구조를 갖는 것으로 알려진 사람의 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CD152) 분자는 T 림프구가 활성화되었을 때 일과성으로

발현되는 T 세포 활성화 항원의 일종이다(1-4). CD152는 단백질을 발현하는 유전자 염기서열 및 단백질의 아미노산 구성상에서 CD28과 비교하여 높은 유사성을 보이며(4), 염색체상의 위치도 두 분자 모두 사람에서는 2번 염색체 장완(2q33-34)의(5), 마우스에서는 1번 염색체 장완(1c1-3)의(1) 동일한 부위에 존재하는 것으로 알려졌다. 또한 두 분자가 동일하게 항원제시 세포(antigen presenting cell, APC) counter-receptor로서 CD80 (B7.1)와 CD86 (B7.2)를 인식하고(6-11), CD28분자의 제 3의 유사 분자인 ICOS-1과 그 counter-receptor B7H가 발견됨으로

책임저자: 정용훈, 한양대학교 의과대학 미생물학교실

☎ 133-791, 서울시 성동구 행당동 17

Tel: 02-2290-0644, Fax:02-2281-8995

E-mail: chungyh@hanyang.ac.kr

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-1997-021-F00269).

씨(12,13) 이 분자들간의 기능적 유사성과 T 세포 활성화 및 면역반응 진행에 있어서 이들의 중요성이 한층 더 강조되었다. 현재 CTLA-4항원에 대응하는 대응수용체는 최소한 3가지 이상 존재하는 것으로 추정되고 있다(14). 그러나 현재까지 알려진 바로는 이 CD152는 면역반응의 증강조절자(positive regulator)인 CD28과는 달리 면역반응의 억제조절자(negative regulator)의 기능을 한다는 실험적 증거들이 보고되고 있다(15).

CD152 관련 최근 5년간 주요 연구들의 상당수는 유전자 재조합 CTLA4Ig 융합 단백을 사용한 각종 장기이식 거부반응의 억제 및 각종 자가면역질환의 치료에 집중되고 있으며, 상당한 성과를 거두고 있다. 그러나 이상의 상당한 실험적 연구가 진행되었음에도 불구하고 CD152 분자의 기본적 생화학 및 세포생물학적 성격의 대부분은 아직 알려지지 않고 있다.

이 연구에서는 정 등(16)의 선행연구결과를 토대로 하여 사람 활성화 T 세포 표면 항원 CD152의 두 유형 즉 세포막형 및 세포질형의 발현적 차이를 세포표면과 세포질내에서 발현양상의 차이를 관찰하고 CD152 분자의 세포외역에 대한 항-펩타이드 항체를 사용하여 세포질액상 분획내에 존재하는 CD152 단백질 복합체에 대한 항체 등을 개발하였다. 이들 항체를 사용하여 이 연구에서는 세포질내에서 CD152분자와 결합되는 세포질내 미지의 단백질복합체 구성 단백질을 동정하여 그 특성 일부를 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양. 건강한 성인에서 채취한 혈액을 RPMI-1640 배지로 1 : 1로 희석한 후 Ficoll-Hypaque (FH)에 중첩하여 2,000×g로 20분간 밀도구배 원심침전한 후 림프구를 얻었고 이를 세척하여 사용하였다. 10% 우태아 혈청 함유 RPMI-1640 배지(FBS-RPMI)로 림프구 농도를 5×10^5 cells/ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 림프구활성화를 통해서 CTLA-4 발현을 유도하기 위하여 phytohemagglutinin-L (PHA-L, Sigma) 3~10µg/ml을 첨가하여 배양하거나 또는 마우스에서 유래된 OKT-3 hybridoma cell을 상기한 동일배지에서 배양한 후 RPMI-1640배지로 세척한 다음 6,000 rad로 조사하여 건강한 성인으로부터 분리한 말초혈액림프구와 각각 세포농도가 1×10^6 cells/ml되게 혼합하여 상기와 동일한 조건에서 배양하였다.

항펩타이드 항체 제조. 사람 CTLA-4분자의 세포외역의 아미노산 중 N¹-C₁₀₃TGTSSGNQV₁₁₂-C¹서열을 갖는 10 mer의 펩타이드 B (CTLA4pB)를 peptide synthesizer를 사용하여 제조하였다. 이 펩타이드를 각각 운반단백질인 keyhole limpet hemocyanin (KLH, Calbiochem, U.S.A.)에 결합하여 토끼면역에 사용하였다. 이 때 coupling 반응에

는 각 펩타이드의 N 말단 또는 C 말단 cysteine의 SH-기와 운반단백질 아미노산의 NH₂기를 연결시켜 주는 m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS, Pierce)를 사용하였다. 실험과정을 요약하면 다음과 같다. MBS를 dimethyl formamide (DMF)에 25 mg/ml로 녹인 다음, 50 mM sodium phosphate buffer (SPB, pH 6.0) 0.25 ml에 녹아 있는 5 mg의 KLH 용액에 1 : 40의 비율로 가한 다음 실온에서 30분간 탁반하였다. 이렇게 하여 합성된 KLH-MB를 Sephadex G-25 column을 통과시켜 반응되지 않은 MBS와 분리시켜 회수하였다. KLH-MB를 50 mM SPB (pH 7.5)로 투석한 후, 동일한 완충용액으로 준비된 펩타이드를 2 mg씩 가한 후 실온에서 3시간 이상 탁반한 다음 하룻밤 투석하여 반응되지 않은 펩타이드를 제거하였다.

매 회 상기의 제조된 펩타이드-KLH를 펩타이드 기준 200 µg씩 2주 간격으로 New Zealand White 토끼(수컷, 약 2.0 kg 내외)에 근육 및 피하 경로로 4회 면역한 후 마지막 면역일로부터 2주 후 전체혈하여 혈청을 분리하였다. 단 첫 회 면역 시에는 Freund's complete adjuvant (Difco, Detroit, Michigan, USA)에 유화시켜 투여한 다음 2주 후 동일한 용량의 면역원을 Freund's incomplete adjuvant (Difco, Detroit, Michigan, USA)에 유화시켜 booster하였고, 다시 2주 간격으로 adjuvant 없이 2회 더 면역하였다. 상기의 혈청을 PBS 동량으로 희석 후 KLH를 혈청이 혼탁해질 때까지 점적한 다음 1,000×g로 30분간 원심침전하여 KLH에 반응하는 항체를 제거하였다. 이를 다시 protein G 또는 protein A column (Pierce, U.S.A.)을 통과시켜 부착된 항체를 0.05 M glycine완충용액(pH 2.7)으로 용출하여 PBS로 투석한 후 다음 실험에 사용하였다.

세포 내재형 CD152 단백질 복합체의 분리정제 및 항복합체 항체제조. 건강한 성인의 혈액 약 300 ml로부터 말초혈액 림프구를 전술된 방법으로 분리하였다. 여기에 3,000 Rad 가량 조사된 γ-irradiated OKT-3 hybridoma세포와 세포수 1 : 1의 비율로 혼합 배양하였다. 배양 3일에 세포를 회수하고 세포 농도가 5×10^7 cells/ml 되게 조절하여 항CD14 (Leu-M3), 항CD4 (OKT-4), 항CD56 (Leu-19) 및 항CD20 (Leu-20) (Becton-Dickinson) 단일클론 항체들을 각각 1µl/ml 되게 첨가한 다음 1% FBS-RPMI에 부유하여 4°C에서 30분간 진탕반응시켰다. 반응 후 RPMI-1640 배지로 3회 세척한 다음 세포농도를 2×10^8 cells/ml로 하였고, 세포와 bead의 비율은 1 : 4로 하여 goat anti-mouse IgG로 conjugate된 magnetic bead (Dynabead[®] M-450)를 첨가한 다음 4°C에서 30분간 진탕반응 후 bead에 부착된 세포를 자석으로 제거하므로써 순수분리된 CD8 양성 세포를 얻었다. 분리된 세포를 미리 응축시킨 0.5% Tx-114용액을 사용하여 용해하고 위상분리하여 cytosolic fraction을 얻었다(17). 이 세포용해액을 제한 분

자량 30만인 초여과막을 이용하여 고분자량 분획을 얻은 다음 ammonium sulfate 포화도를 점증하여 CD152포함 분획을 분리하였다. 이를 preparative native SDS-PAGE를 실시한 다음 gel의 일부를 slice하여 Western blot 방법으로 특정 CD152포함 band의 위치를 확인하였다. 확인된 band를 전기적으로 용출하여 순수하게 분리정제된 intracellular CD152 complex를 얻었고 이를 상기의 방법으로 항체생산에 사용하였다.

Western blot. 전기영동은 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하였다. 각 전기영동 시 한 lane에 가하는 시료는 세포수 1×10^6 으로부터 추출된 양이 되게 조절하였다. 전기영동 후 젤은 pore 크기 0.2 μ m 혹은 0.45 μ m의 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, U.S.A.)으로 전기적으로 막전이하였다. 이 때 25 mM Tris-192 mM glycine (pH 8.3)-20% methanol을 완충용액으로 사용하였다. 막 전이 후 2~3% 탈지분유(skim milk) 및 0.1% Tween20 함유 10 mM Tris (pH 7.6, blocking buffer, 이하 BF)로 blocking한 후 동일 BF에 일차 항체를 넣고 하룻밤 반응시켰다. 이 때 사용된 일차 항체는 아래의 본 연구에서 제조된 항-펩타이드 항체를 사용하였다. 일차 항체반응 후 BF로 3회 세척한 다음 anti-rabbit goat IgG-peroxidase 및 anti-mouse goat IgG-peroxidase 등을 1 : 2,000으로 희석하여 2시간 반응시켰다. 반응 후 이를 다시 BF로 3회 세척한 다음 이차 증류수로 1회 최종 세척하였다. 세척된 nitrocellulose membrane을 25 mg diaminobenzidine 함유 10 mM Tris (pH 7.6) 50 ml에 담그고 33% H₂O₂ 100 μ l를 첨가하여 실온에서 10~15분간 진탕반응시켰다. 이 때 발색 반응은 수돗물 세척으로 중단시켰다.

세포 유동 분석(Flow Cytometry). 상기의 과정으로 준비된 림프구를 PBS로 3회 세척한 다음 상기의 anti-

하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 다시 PBS로 3회 세척한 후 30 μ l에 재부유한 다음 goat anti-rabbit IgG-FITC (Pharmigen USA) 1 μ l를 첨가하여 다시 4°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 다시 PBS로 3회 세척한 다음 FACSCALIBUR flow-cytometer (Beckton and Dickinson, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

세포내 항원 단백질 발현은 permeabilization staining 방법으로 관찰하였으며, 이는 상기와 동일한 sample을 PBS로 세척 후 permeabilization buffer (5 μ g/ml lysolecithin-0.02 M sodium acetate pH 4.5) 1 ml로 4°C에서 2분 처리한 다음 4% para-formaldehyde 250 μ l를 첨가하여 반응을 중단시키고 이하의 동일한 염색과정 후 flow cytometry를 실시하였다.

결 과

CD152 분자의 세포막형 및 세포내재형 두 유형의 발현 특성. 이러한 두 유형의 CD152가 사람 말초혈액 림프구의 CD4 양성 및 CD8 양성 각 아형에서의 활성화에 따른 발현 양상을 세포 유동 분석(flow cytometric analysis)으로 관찰하여 보았다. 세포막형의 세포표면 발현을 관찰하기 위하여 항체의 표면염색(surface staining) 방법을 썼고(Fig. 1), 세포내재형의 세포내부 발현을 관찰하기 위하여는 세포투과 염색(permeabilization staining) 방법을 썼다(Fig. 2).

먼저 사람 말초혈액 림프구의 세포 표면에서 활성화에 따른 본 CD152 항원의 발현은 PHA 자극 2일경에 최고조에 달한 후 3일경에 자극 이전의 수준으로 감소되는 것으로 관찰되었고, CD4 양성 및 CD8 양성 두 림프구 아형간의 차이는 없었다. 즉 두 세포간의 비율이(CD4/CD8) 자극 이전보다 자극 후 CD8 양성 세포의 약간(2~3%)의 증가로 인하여 감소되는 경향은 있으나 대체로

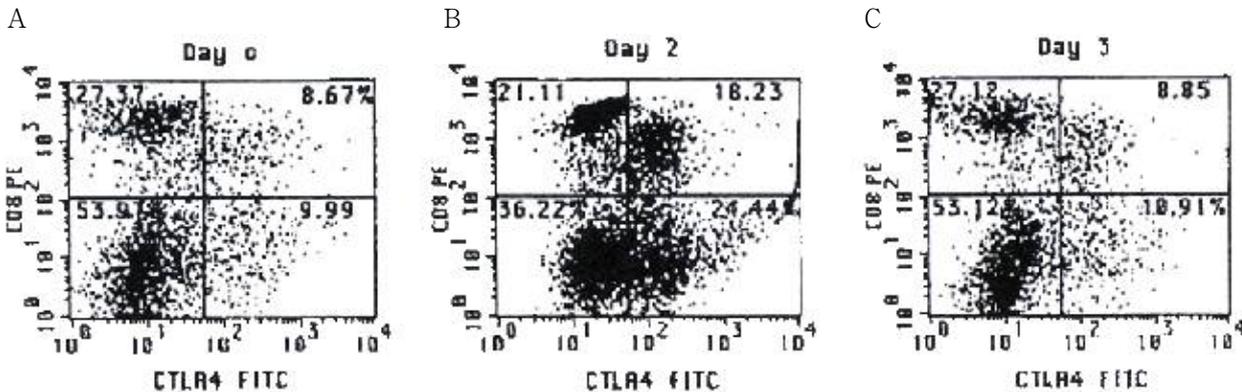


Figure 1. Flow cytometric analysis of surface expression of CD152 in PHA-activated human PBL showed equivalent induction pattern in both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Panels A, day 0 of stimulation; B, day 2 of stimulation; C, day 3 of stimulation. Numbers in four quadrants represent percent of cells.

CTLA4pA antibodies (anti-peptide A antibody) 2 μ l를 첨가

1.5~1.7 정도로 CD4 양성 세포가 많은 관계로 이를 기

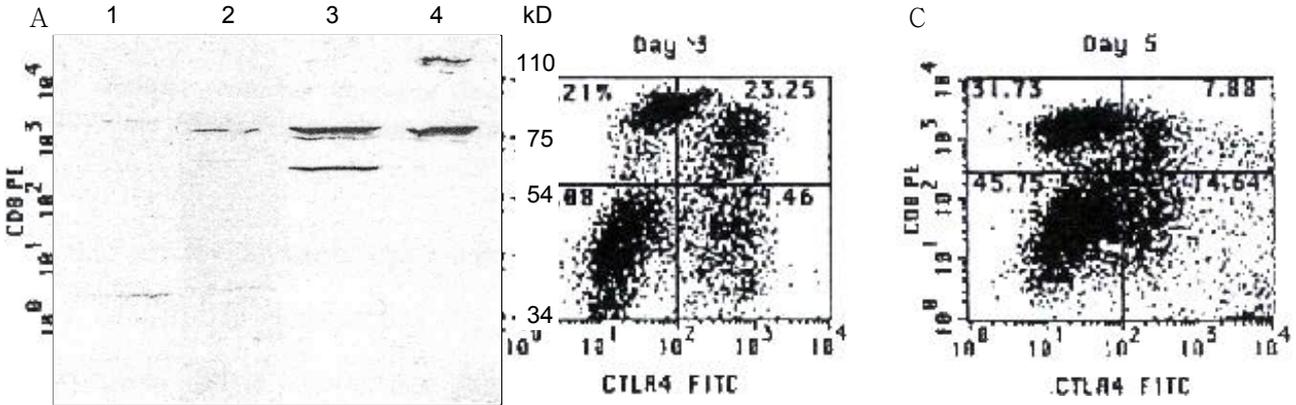


Figure 2. Permeabilization flow cytometric analysis of intracellular expression of CD152 in PHA-activated human PBL showed delayed CD152 protein expression and preferential increase in CD8 lymphocytes. Panels A, day 0 of stimulation; B, day 3 of stimulation; C, day 5 of stimulation. Numbers in quadrants represent percent of cells. reducing condition; 4, lysate treated in non-reducing condition; 1, anti-P34PC8 antibody; 2, anti-P34PC7 antibody; 3 & 4, anti-P34PC4 antibody.

준으로 교정해 보면 자극 2일에 두 아형 각각에서 약 40~45%에 해당되는 세포가 CD152 양성이었다(Fig. 1). 이에 반하여 본 분자의 세포내 발현은 자극 배양 제3일경에 최고조에 달하였고 CD8 양성 세포는 이 아형 전체의 60% 이상에서 CD152 양성으로 관찰되어 이 항원의 세포 내재형은 주로 CD8 양성 T 림프구에서 발현되었다(Fig. 2).

CD152 분자의 세포내재형인 p34 단백 복합체의 구성.
세포내 CD152 단백 복합체를 정제하여 Western blot한 결과 분자량 약 350 kD 이상의 고분자량 복합체를 분리 정제할 수 있었고, 이를 토끼에 면역하여 anti-P34PC4, anti-P34PC7 그리고 anti-P34PC8 등의 세 종류의 antibody를 얻었다. 이를 사용하여 Western blot을 실시한 결과, anti-P34PC4 antibody는 54 kD 및 75 kD 항원(Fig. 3, lane 3 & 4)을, anti-P34PC7 antibody는 75 kD 항원(Fig. 3, lane 2)을, 그리고 anti-P34PC8 antibody는 34 kD 항원(Fig. 3, lane 1)을 각각 인식하였다. 이들 중 54kD 항원만이 비환원 상태에서 약 110 kD band(Fig. 3, lane 4)를 형성하여 homodimer로 존재하는 것으로 관찰되었다.

고 찰

CD152에 관한 연구는 유전자 재조합 융합 단백질인 CTLA4Ig를 사용한 생체 면역 조절 및 질환의 치료에 집중되고 있다. 현재까지 대표적인 이 융합단백의 효과에 관한 연구결과를 보면, 본 CTLA4Ig는 동물실험에서 각종 장기이식 거부반응억제(18,19), 유전자치료 시 보조 효과(20), 각종 감염질환 등의 치료와 예방 효과(21), 각종 자가 면역 질환(22-24) 등의 예방 및 치료 효과 등이 입증되고 있다. 이 CD152와 CD28 간에는 공통점도 있지

만 상당한 차이점도 갖고 있다. 즉 CD152는 CD28과는 달리 T세포가 활성화되어야만 발현되고(7), 대응수용체의 일부가 다르며(14), 세포표면 발현이 CD28의 1/20 이하인 반면 CD80에 대한 결합력은 CD28보다 20배 가량 높으며(6), 비정상적으로 길며 수용성이 높은 N'-말단의 친수성이 높은 여유분(redundancy)을 갖는 leader sequence를 보유하고(1,4) 있다. 만일 이 CD152가 세포 표면에 발현되면 costimulatory signal 전달에 매우 중요한 기능을 담당하고 있는 CD28의 기능이 차단될 것이다. 따라서 이 연구의 주제인 CD152 분자의 세포막형 및 세포질 내재형의 두 유형의 존재는 본 분자의 막표면 발현을 T 림프구가 적절하게 조절함으로써 면역반응을 정교하게 유지시키는 중요한 기전이 될 수 있을 것이다.

이상의 논리적 배경에도 불구하고 이 연구주제인 세포 표면에 존재해야 할 수용체 CD152 단백질의 세포질내의 존재는 그 유사한 예를 찾아보기 어려우므로 좀 더 구체적이며 완벽한 실험적 증거를 제시할 수 있어야 한다고 생각된다.

따라서 이 실험에서는 CD152 분자의 세포외역(extracellular domain)에 대한 항-펩타이드 항체와 세포질 액상 분획내에 존재하는 CD152 단백질복합체에 대한 항체 등을 개발하였고, 이들을 사용하여 이 분자의 사람 말초 혈액 림프구에서의 세포표면 및 세포질내 발현 양상의 차이와 결합 단백질복합체의 구성특성을 규명하고자 하였다.

이를 사람 CD152의 세포외역 부위를 인식할 수 있는 항-펩타이드 항체인 anti-human CTLA4pB antibody를 사용하여 두 유형의 CD152가 사람 말초혈액 림프구의 활성화의 시간 경과에 따라서 어떠한 발현 양상을 보이는지를 세포 유동 분석(flow cytometric analysis)으로 관찰하여 보았다. 세포막형의 세포표면 발현을 관찰하기 위하여 항체의 표면염색법이 사용되었으며, 세포내재형의

세포내부 발현을 관찰하기 위하여는 세포투과 염색(permeabilization staining) 방법을 썼다. 먼저 사람 말초혈액 림프구의 세포 표면에서 활성화에 따른 CD152 항원의 발현은 PHA 자극 2일경에 최고조에 달한 후 3일경에 자극이전의 수준으로 감소되는 것으로 관찰되었고, CD4 양성 및 CD8 양성 두 림프구 아형간의 차이는 없었다. 즉 두 세포간의 비율이(CD4/CD8) 자극 이전보다 자극 후 CD8 양성 세포의 약간(2~3%)의 증가로 인하여 감소되는 경향은 있으나 대체로 1.5~1.7 정도로 CD4 양성 세포가 많은 관계로 이를 기준으로 교정해 보면 자극 2일에 두 아형 각각에서 약 40~45%에 해당되는 세포가 CD152 양성으로 관찰되었다. 이에 반하여 이 분자의 세포내 발현은 자극 배양 제 3일경에 최고조에 달하였고 CD8 양성 세포는 이 아형 전체의 60% 이상에서 CD152 양성으로 관찰되어 이 항원의 세포 내재형은 주로 CD8 양성 T 림프구에서 발현되는 것으로 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 선행연구에서 보고된 바와 일치하는 것이며, 세포 표면 발현의 관점에서 본 CD152 분자는 CD4 양성 및 CD8 양성 두 아형 간의 차이가 없으나 세포 내재형은 CD8세포에서 발현이 현저히 증가하므로 이 두 가지 발현을 종합하면 본 CD152 분자를 발현하는 주된 세포는 CD8 양성 T 림프구임을 시사한다.

끝으로 이 연구에서는 세포내 CD152 단백질복합체를 정제하여 분자량 약 350 kD 이상의 고분자량복합체를 분리 정제하였으며, 이를 편역하여 얻은 세 종류의 항체는 Western blot상에서 anti-P34PC4 antibody는 54 kD (p54) 및 75 kD (p75) 항원을, anti-P34PC7 antibody는 75 kD 항원을, 그리고 anti-P34PC8 antibody는 34 kD 항원을 각각 인식하는 것으로 확인되었다. 이들 중 54 kD 항원만이 비환원 상태에서 약 110 kD의 homodimer로 존재하는 것으로 관찰되었다. 이 실험 결과는 이 세포내재형 CD152는 최소한 110 kD homodimer와 75 kD monomer와 결합한 상태에서 세포질내의 액상 분획에 존재할 것임을 시사하고 있다. 따라서 anti-P34PC4 및 anti-P34PC7 두 항체는 향후 p54 및 p75 두 CD152 결합 단백질의 유전자 클로닝에 귀중한 도구로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, P Golstein: A new member of the immunoglobulin superfamily, CTLA-4. *Nature* 328;267-270, 1987
- Brunet JF, Dosseto M, Denizot F, Mattei MG, Clark WR, Haqqi TM, Ferrier P, Nbholtz M, Schmitt-Verhulst AM, Luciani MF, Golstein P: The inducible cytotoxic T-lymphocyte-associated gene transcript CTLA-1 sequence and gene localization to mouse chromosome 14. *Nature* 322;268-271, 1986
- Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP: Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 18;1901-1905, 1988
- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P: CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147;1037-1044, 1991
- Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, Olive D: Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics* 31;198-201, 1990
- Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Darnle, Ledbetter JA: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174;561-569, 1991
- Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Darnle NK: Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176; 1595-1604, 1992
- Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes R: Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 262;905-907, 1993
- Freeman GJ, Borriello F, Hodes R, Reiser H, Hathcock KS, Laszlo G, McKnight AJ, Kim J, Du L, Lombard DB, Gray GS, Nadler LM, Sharpe AH: Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice. *Science* 262;907-909, 1993
- Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo Jr VA, Lombard LA, Gray GS, Nadler LM: Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262;909-911, 1993
- Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL, Somoza C: B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366; 76-79, 1993
- Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Agostino MJ, Graham JR, Chen S, Jussiff JM, Fisk GJ, Miller CP, Collins M: Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. *Genomics* 78;155-168, 2001
- Liu X, Bai XF, Wen J, Gao JX, Liu J, Lu P, Wang

- Y, Zheng P, Liu Y: B7H costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8 (+) T lymphocytes In Vivo. *J Exp Med* 194;1339-48, 2001
14. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM: Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;11059-11063, 1993
 15. Walunas TL, Bluestone JA: CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160; 3855-3860, 1998
 16. Chung YH, Park CH, Dupont B, Cho YJ: Characterization of CTLA-4 expression in activated human peripheral blood T lymphocytes. *FASEB J* 10;S1455, 1996 (abstract)
 17. Bordier C: Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256;1604-1607, 1981
 18. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC: Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381;434-438, 1996
 19. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA: Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257; 789-792, 1992
 20. Kay MA, Holterman AX, Meuse L, Gown A, Ochs HD, Linsley PS, Wilson CB: Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4lg administration. *Nature Genetics* 11;191-197, 1995
 21. Lu P, Zhou X, Chen SJ, Moorman M, Morris SC, Finkelman FD, Linsley P, Urban JF, Gause WC: CTLA-4 ligands are required to induce an in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. *J Exp Med* 180;693-698, 1994
 22. Knoerzer DB, Karr R, Schwartz B, Mengle-Gaw LJ: Collagen-induced arthritis in the BB rat. Prevention of disease by treatment with CTLA-4-Ig. *J Clin Invest* 96;987-993, 1995
 23. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D: Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science* 265;1225-1227, 1994
 24. Chu EB, Hobbs MV, Wilson CB, Romball CG, Linsley PS, Weigle WO: Intervention of CD4⁺ cell subset shifts and autoimmunity in the BXS mouse by murine CTLA4Ig. *J Immunol* 156; 1262-1268, 1996