

R
008.8
3648

私立中山醫學院生物化學研究所

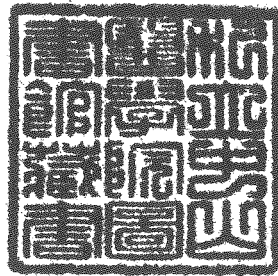
碩士論文

指導教授：林克亮 博士

共同指導教授：蔡考圓 博士

人類間白素-13 (Interleukin 13)
於大腸桿菌以及昆蟲細胞表達之研究

Expression of Human Interleukin 13
In
E. coli and Insect Cell Systems.



研究生：沈柏年 撰

中華民國八十五年六月

中山醫學院圖書館



C036306

授權書
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
組 84 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 人類類間白素-13 於大腸桿菌以及昆蟲細胞表達之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 林克亮

研究生簽名: 張相年 學號: R8302105
(親筆正楷)

日期: 民國 85 年 7 月 8 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄立若未鈎選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。

3. 授權人的權利與義務：

在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。

4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：

在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞

地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：張柏年 聯絡電話：(02) 711 6127

地址：台北市光復南路72巷7弄3號4F

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

台灣大學醫學院免疫研究所
(論文指導教授)

蔡考圓 博士

蔡考圓

私立中山醫學院醫學研究所

蔡嘉哲 博士

蔡嘉哲

私立中山醫學院醫學研究所
(論文指導教授)

林克亮 博士

林克亮

中華民國八十五年六月三日

學生沈柏年論文題目為：人類間白素-13 於大腸桿菌
以及昆蟲細胞表達之研究，其論文已經中山醫學院
生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口
試通過，並由指導教授核閱後無誤。

指導教授：林克亮 博士 簽名：林克亮
蔡考圓 博士 簽名：蔡考圓

中華民國85年6月

誌謝

兩年的研究生生活轉眼間就過去了，我由對研究一知半解進而對實驗的熱衷。研究生的生活雖然辛苦，但在這兩年之中，我學到了許多，不論是學識上或是待人處事方面。

論文能夠順利的完成，首先要感謝林克亮老師在知識、實驗以及研究態度上給予我細心的指導；台大醫學院免疫學研究所蔡考圓老師對於我的督促及教誨更使我獲益良多；而中山醫學院蔡嘉哲院長以及中央研究院生物醫學研究所嚴仲陽老師對於實驗上的幫助，使我能夠順利完成實驗，在此表達由衷的感謝。另外，張大真以及李瑤玲老師也在實驗上提供了相當寶貴的經驗，實驗室的伙伴—珍容、瑞玲學姐，博修學長，姿妙、舒柔學姐，王凱助老師，還有再靜學姐、重進學長、健隆、學弟廷佳、呂克桓醫師以及碧緣，在實驗上給予我許多的幫助，謝謝你們；也要感謝陳凌雲老師在器材以及實驗技巧上給予的幫助。

最後當然要感謝我的父親、母親以及家人，在各方面對我的關心與支持，還要感謝佩倫，在這兩年中給我的鼓勵，使我能夠順利完成學業，謝謝你們。

沈柏年 謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十五年七月四日

第一節	hIL-13 於昆蟲細胞的表達.....	55
第二節	流式細胞計數儀分析.....	65
第三節	MTT assay.....	66
第三章	結果.....	69
第一節	hIL-13 基因之製備.....	69
第二節	構築 IL-13 基因至桿狀病毒載體.....	69
第三節	感染昆蟲細胞.....	70
第四節	hIL-13 融合蛋白質的純化.....	70
第五節	以人類單核球對 hIL-13 進行活性分析.....	70
第六節	以 MMT assay 測定 hIL-13 的生物活性.....	71
第四章	討論.....	80
參考文獻	84

摘要

間白素-13 (interleukin-13) 為一發現不久的細胞激素 (cytokine)，是由活化的 T cell 所分泌，在體外 (in vitro) 的狀態下為 B cell 和 monocyto 的調節物。根據研究顯示：interleukine-13 和 interleukine-4 有許多相似的功能，且可促進免疫球蛋白的類別轉換 (Ig class switching) 及 IgE、IgG4 的分泌。Interleukin-13 可抑制 inflammatory cytokine 的合成，而 interleukin-13 在發炎反應，過敏反應及許多臨床疾病上都有重要意義。

為了更進一步瞭解 interleukin 13 的功能以及在各種疾病上所扮演的角色，本實驗的第一部分是利用大腸桿菌表達系統 (*E.coli*/pET-30 expression system) 來表現人類 interleukin-13 (hIL-13) 希望能夠得到多量且穩定的 hIL-13 以供研究。Interleukin-13 為一真核細胞所表現的蛋白質，於是我們也利用桿狀病毒載體/昆蟲細胞表達系統 (Baculovirus/insect cell system)，將 hIL-13 以及全長 hIL-13 cDNA 分別構築至桿狀病毒載體 pAcG2T 以及桿狀病毒載體 pVL1393 之中，並感染昆蟲細胞—SF-9，來表現 interleukin-13，以期得到更接近自然狀態，以提供更進一步的研究。在實驗最後，利用人類單核球 (hmman monocyte) 以及人類白血球過多症細胞株 (Human Leukemic cell line)—TF-1 細胞，測定 hIL-13 的生物活性。

Abstract

Interleukin 13 (IL-13) is a recently found cytokine secreted by activated T cells that is a potent in vitro modulator of human monocyte and B cell functions. The studies of IL-13 and IL-4 indicate that they share many common biological activities. Both IL-13 and IL-4 inhibit the production of proinflammatory cytokines, chemokines and hemotopoietic growth factors by human monocyte, and can also enhance the Ig isotype class switching and the secretion of IgE and IgG4. These indicate that IL-13 play an important role in anti-inflammatory responses, allergic responses and many clinical diseases.

In order to further investigate the functions and roles of hIL-13, we hope to obtain a large quantify and reliable source of hIL-13. Firstly, we use a *E.coli*/pET-30 expression system to produce recombinant hIL-13 protein. hIL-13 DNA was ligated with pET-30 plasmid and transformed them into *E.coli* BL21 (DE3), hIL-13 fusion protein was purified using His-Binding Resin.

Since hIL-13 is an eukaryotic protein, we also use a Baculovirus/insect cell system to express hIL-13. Two transfer plasmids (pVL1393, pAcG2T) was ligated with hIL-13 cDNA, respectively, and co-transfected the ligands with Baculovirus DNA into SF-9 insect cell line. In this eukaryotic system, we wish to obtain recombinant hIL-13 that will resemble its native confer part. The biological activity of the recombinant hIL-13 was determined by using TF-1 cell line and human monocytes.

第一部份

人類間白素-13
於大腸桿菌之表達

第一章 文獻整理

間白素 13 (Interleukin 13 , IL-13) 為一發現不久的一個細胞激素 (Cytokine) , 是由活化的 T_H2 細胞所產生, 目前已發現其可在體外 (in vitro) 的情況下影響 B 細胞和單核球的功能。而 IL-13 的許多功能與另一個亦是由 T_H2 所分泌的細胞激素----interleukin 4 (IL-4) , 十分的接近, 而這兩個細胞激素之間, 其氨基酸序列也有相當高的相似性。而由實驗結果發現, IL-4 與 IL-13 具如此多的相似功能, 可能其接受體 (receptor) 含有一共同的組成成分之故。

第一節 Interleukin 13 的發現

老鼠的 interleukin 13 (mouse IL-13 , mIL-13) 最初是由 Brown 等人, 於 1989 年由 Cl.Ly-1⁺2⁻/9 T cell clone 的 cDNA 基因庫 (cDNA library) 所發現 (11) , 當時稱其為 P600 , 此 P600 蛋白質主要是由 T_H2 細胞所產生, 其 mRNA 大約為含 1300 個核糖核酸、碼製一含有 131 個氨基酸的蛋白質, 且為誘導性的 (inducible) 。

人類與 P600 具高度相似性的蛋白質, 於 1993 年由 Mckenzie 等人分離而得。他們以 P600 的 cDNA 為探針 (probe) 來篩選由 B21 CD4⁺ T-cell clone 建立的 cDNA 基因庫, 得到一個

positive clone，而全長的人類 IL-13 (hIL-13) cDNA clone 則是後來在 Con A 所活化後的 A10 CD8⁺ T-cell clone 的 cDNA 基因庫中所選殖得到。

第二節 人類與老鼠 Interleukin 13 的 mRNA 與蛋白質 (Human and mouse interleukin 13 mRNA and protein)

mIL-13 是一個含 131 個氨基酸的糖蛋白 (glycoprotein)，具有二個 O-linked 糖化位置 (glycosylation sites) 及一個 N-linked 糖化位置。hIL-13 的 cDNA 碼製一相似，且含 132 個氨基酸的蛋白質。然而，hIL-13 的 cDNA 含有幾種不同的型式；有一部分的 hIL-13 其 cDNA 所碼製的蛋白質，在第 61 個氨基酸的位置由 Glycine (Gly) 改變為 Aspartic acid (Asp) (71)；另一方面，由 A10 cDNA 基因庫所得的 hIL-13 cDNA，其碼製的蛋白質則在第 98 個氨基酸的位置，較由 B21 所得者多了一個 Glutamine。hIL-13 也含有一段疏水性的前導序列 (hydrophobic leader sequence)，而這段前導序列在 Gly21 的位置被切下，而成為一成熟的 hIL-13。

mIL-13 與 hIL-13 其基因序列 (nucleotide sequence) 有 66% 的相似性，而氨基酸序列 (amino acid sequence) 則有 58% 的相似性，hIL-13 也含有 3 個糖化位置，然而由 COS-7 細胞所表現 hIL-13 的情形顯示，hIL-13 主要仍是以非糖化

(unglycosylated) 的型式分泌，分子量約為 10kDa，只有一小部分以較高分子量的醣化型式分泌。

第三節 Interleukine 13 對細胞株的影響

(Responses of cloned cell lines to IL-13.)

目前已有許多的細胞株 (cell line) 被用來測定一些細胞激素的活性。TF-1 cell (human premyeloid cell line) 可被許多細胞激素所刺激而分裂 (如：IL-5、IL-3、GM-CSF)；而此細胞株也會被 hIL-13 及 mIL-13 所刺激而分裂 (3,9)，而 hIL-13 (不論有或無 Gln98) 與 mIL-13 對 TF-1 的影響相近。另一細胞株 B9 (mouse hybridoma cell line) (Aarden et al., 1987)，已被分離出數株次細胞株 (subclone)，如 B9 cell 可對 IL-6 有分裂的反應 (poliferative response)，B9.11 cell 則對 IL-11 有反應。目前又已分離出 B9-1-3 cell，可對 IL-13 有分裂的反應 (11)。

對 T 細胞株而言，mIL-13 與 hIL-13 均沒有作用，可能是由於 T 細胞沒有 IL-13 的接受體 (IL-13 receptor, IL-13R)。綜合許多的實驗結果顯示，不論 mIL-13 或 hIL-13，對人類的細胞有相似的活性，而對老鼠的細胞而言，則是 mIL-13 的影響較為明顯。

第四節 Interleukin 13 對人類單核球的影響

(The effects of IL-13 on human monocyte.)

對人類單核球 (human monocyte) 而言，IL-13 可對其有許多影響，如型態 (morphology)，表面抗原的表現 (surface antigen expression)，抗體依賴型細胞毒殺作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 以及細胞激素的合成 (cytokine synthesis) (70, 73)。若將人類單核球培養於含 IL-13 的情形下時，可使單核球增強對受質的黏附性產生 homotypic aggregation 的現象，以及增長其存活時間。

除了影響單核球的型態之外，IL-13 也影響其表現型 (phenotypes)。IL-13 與 IL-4 相似，均可影響人類單核球的一些 integrin superfamily 的表現，例如：可增加 CD11b、CD11c、CD18、CD29 及 CD49e (VLA-5) 的表現，因為 CD11b/CD18 以及 CD11c/CD18 這兩個異質雙聚體 (heterodimers) 是參與細胞與細胞之間的交互作用，homotypic aggregation，與受質間的吸附作用 (92)，可與纖維蛋白原 (fibrinogen) 的結合。而 VLA-5/CD29 為 fibrinogen 的接受體，所以正可以解釋 IL-13 為何可影響單核球的型態、聚集等的現象。而同屬於此一超基因家族 (superfamily) 的其他蛋白質：CD11a、CD49b (VLA-2)、VLA-3、CD49d (VLA-4)、CD49f (VLA-6)、CD61 ($\beta 3$) 及 $\beta 4$ 則沒有顯著的影響 (27)。另外，IL-13 對 Major histocompatibility complex (MHC) class II、CD13 及 CD23 的表現也有劑量依賴性的

(dose-dependent manner) 正調節 (upregulation) 的作用，對 CD64 (Fc γ RI)、CD32 (Fc γ RII)、CD16 (Fc γ RIII) 及 CD14 則有負調節 (downregulation) 的作用；而 MHC class I、CD54 (ICAM-1)、ICAM-2 或 CD58 (LFA-3) 的表現則沒有什麼影響。

對人類單核球的抗體依賴性細胞毒殺作用 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 而言，IL-13 對此有抑制的作用，且認為這與降低其 Fc γ RI (CD64) 的表現有關 (95)。IFN- γ 及 IL-10 亦會對單核球的 ADCC 活性有促進的作用，並增加其 Fc γ RI 的表現 (94)，也可抑制 IL-4 與 IL-13 對 Fc γ RI 的負調節作用。有趣的是，雖然 IFN- γ 與 IL-10 可防止 IL-13 對 Fc γ RI 的負調節作用，但單核球的 ADCC 活性仍然被抑制，顯示 ADCC 的活性不僅只與 CD64 的表現多寡有關，IL-13 可能還以另一個機制控制著單核球的 ADCC 活性。

Lipopolysaccharide (LPS) 可刺激人類單核球產生 proinflammatory cytokines，chemokines 以及 hematopoietic growth factor，IL-13 可抑制這現象，而 IL-4 與 IL-10 同樣有此作用 (26, 27)。被抑制的 proinflammatory cytokines 包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α 、TNF- α (tumor necrosis factor α)、IL-10、GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 以及 G-CSF，而這此抑制作用均發生在轉錄 (transcription) 階段。IL-1 接受體 (receptor) 的拮抗物 (IL-1 receptor antagonist, IL-1ra) 的分泌卻會受 IL-13 的影響

而升高 (73) 。顯示 IL-13 具有抑制發炎 (anti-inflammatory) 的功能。

CD14, 單核球表面的分子, 為一 glycosylphosphatidylinositol (GPI) -linked 蛋白質, 表現在單核球及嗜中性球 (neutrophils) 的表面, 可調節單核球與淋巴球 (lymphocyte) 間的交互作用, 也是 LPS 引起單核球分泌 proinflammatory cytokine 的主要接受器 (67) 。IL-13 與 IL-4 可以降低 CD14 在單核球上的表現。除此之外, INF- γ (interferon- γ) 、phorbol esters 以及 Ca^{2+} 也可以降低 CD14 在單核球上的表現, 其機制是經由活化一細胞膜上的酵素-----membrane-bound protease (s), 此酵素活化之後, 可造成 CD14 分子由膜上脫落, 進而使在單核球上的 CD14 降低 (5) 。而 IL-13 與 IL-4 則是在轉錄 (transcription) 的階段, 抑制 CD14 mRNA 的合成, 使 CD14 表現減少 (5) 。由於 LPS 可引起 pro-inflammatory cytokine 的生成, 而 CD14 又是 LPS 主要的接受體, 所以 IL-13 的抑制發炎反應的功能, 可能是經由降低單核球 CD14 的表現, 進而抑制 LPS 引起的細胞激素的釋放。IL-13 也可以抑制 PMA 所刺激單核球之後的 TNF- α (tumor necrosis factor α) 的分泌, 而此途徑與 CD14 並沒有關聯, 所以 IL-13 除了以降低 CD14 表示的機制、抑制發炎反應之外, 另外還存在一個與 CD14 無關 (CD14 independent) 的機制, 直接抑制 pro-inflammatory cytokine 的分泌, 進而抑制發炎反應。

除了以上的作用之外, IL-13 還可促進人類單核球呈獻抗原 (Antigen presentation) 的能力。綜合來說, IL-13 對於人類

單核球的影響與 IL-4 類似，均可降低單核球的抗體依賴細胞毒殺作用，降低發炎反應以及增加呈獻抗原的能力。且由 IL-13 抑制單核球 IL-12 α chain 及 β chain 的表現看來，IL-13 也與 IL-4 一樣，可抑制 T_H1 細胞的發展（43），而較偏向於發展成 T_H2 的途徑。

第五節 IL-13 抑制 HIV 在單核球內的複製 (IL-13 inhibits HIV replication in monocytes.)

HIV-1 (human immunodeficiency virus) 在培養的人類單核球中的複製作用 (replication)，可被 IL-13 所抑制 (76)，IL-13 可抑制反轉錄複製酵素 (reverse transcriptase) 以及病毒蛋白 (p24) 的合成。而前病毒 DNA (proviral DNA) 仍可在與 IL-13 培養過的單核球中被偵測到，顯示 HIV 並沒有被消滅而只是被抑制。IL-13 對 HIV-1 的影響與 IL-13 影響單核球 CD14 的表現有協同的作用 (Synergize)，由於 LPS 是 HIV-1 於單核球中表現的一個強有力的刺激物 (83)，而 CD14 對於 LPS 刺激潛伏性的或是慢性的 HIV-1 在單核球中的表現，都是必需的；所以 IL-13 造成單核球 CD14 的降低，使得 HIV 潛伏性病人在被革蘭氏陰性菌 (Gram-negative) 感染後，由 LPS 引起 HIV-1 的表現的門檻升高了，進而使病人仍然停留於潛伏期。

第六節 IL-13 對老鼠巨噬細胞的影響

(The effect of IL-13 on mouse macrophages.)

老鼠巨噬細胞 (Macrophage, M ϕ) 由骨髓 (bone marrow) 分離出來在體外 (in vitro) 培養時，會因培養液中含有不同的細胞激素，而發展出具有不同表現型的細胞：若培養於含 GM-CSF 的培養液中，簡稱為 GMM ϕ ；若培養於含 M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) 的培養液中，簡稱為 MM ϕ 。GMM ϕ 與 MM ϕ 間最大的差別在於 GMM ϕ 為一較佔優勢的抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cells, APC)，而且主要引起 T_H1 細胞的反應 (29, 38)。

IL-13 並不能引起培養於 GM-CSF 的巨噬細胞發生分裂反應，但可以延長其存活的時間，並且增加 MM ϕ 的 MHC class I 與 MHC class II 之表現，但對於原本就表現較高量 MHC class II 的 GMM ϕ ，IL-13 則沒有此作用 (30)。IL-13 可降低人類單核球上 IgG 接受體 (Fc γ R) 的表現，同樣的，對於這兩類的老鼠巨噬細胞，IL-13 均可以降低 Fc γ R 的表現，但與人類單核球比較之下，IL-13 似乎對老鼠巨噬細胞的 Fc γ R II 並無明顯影響。另外，CD11b 的表現也受 IL-13 的影響而增加。

若將 GMM ϕ 或 MM ϕ 事先與 IL-13 或 IL-4 培養之後，再以 LPS 加以活化，以刺激其產生細胞激素。結果發現此前發炎細胞激素的生成有被抑制的現象，如：IL-1、IL-6 以及 TNF- α ，而 IL-12 α 及 IL-12 β 的 mRNA 生成也被抑制。在這些功能方面，IL-13 與 IL-4 的效果相近，而以抗 IL-4 單株抗體 (anti-

IL-4 mAb) 只能抑制 IL-4 的反應，對 IL-13 則沒有作用，顯示 IL-13 與 IL-4 為分別作用的細胞激素 (30) 。

對於殺死細胞內寄生蟲 (intracellular parasites)，NO (nitric oxid) 扮演了一個重要的角色 (91)。IL-4 與 IL-10 均有抑制活化的巨噬細胞產生 NO 的能力，IL-13 在這方面也有類似的能力。GMM ϕ 若先與 IL-13 培養之後，再以 LPS 刺激，則其 NO 的產生較沒有以 IL-13 處理者有明顯下降。MM ϕ 原本 NO 的產量就比較低，IL-13 或 IL-4 對其 NO 產生則沒有影響。而這個現象與以下的結果正好相關；IL-13 可以在體外 (in vitro) 的情形之下，延長一細胞內寄生蟲-----*Leishmania major* 在 GMM ϕ 中的存活時間，但對於 MM ϕ 卻沒有此作用 (30)。雖然 IL-13 會降低巨噬細胞的細胞毒殺 (cytotoxic) 作用，但對吞噬作用 (phagocytic capacity) 及抗原呈獻能力 (antigen-presenting capacity) 並不影響。將巨噬細胞培養於含 GM-CSF 或 IL-13 的培養液中，其抗原呈獻能力與培養在不含這些細胞激素時能力相近。因此認為，IL-13 並非經由影響巨噬細胞的處理抗原或呈獻抗原的能力，而降低其細胞毒殺作用 (30)。

在骨髓巨噬細胞的發展方面，mIL-13 可以使得體外 (in vitro) 培養的老鼠骨髓細胞 (mouse bone marrow cultures) 發展出大型黏附性細胞 (large adherent cells)，而這些 large adherent cells 是由非黏附性細胞前驅物 (nonadherent precursor) 發展而來。非黏附性細胞前驅物在骨髓中的含量很少，在胸腺 (Thymus) 或脾臟 (Spleen) 並不存在。這些由 mIL-13 引起的細胞，可表現巨噬細胞的成熟標記 (mature

markers) , 如 : MAC-1 (CD11b) 及 F4/80 ; 與 GMM ϕ 和 MM ϕ 相較之下 , 雖然抗原呈獻能力並無差別 , 吞噬能力 (phagocytic capacity) 卻變得很微弱。因此 , mIL-13 可刺激老鼠骨髓細胞發展出 macrophage-like 的細胞 , 但與 GMM ϕ 或 MM ϕ 不同。

第七節 Interleukin13 對人類 B 細胞的影響

(The effect of interleukin on human B cells.)

對於高度純化的胎兒骨髓 $s\mu^+$ 、 $CD10^+$ 、 $CD19^+$ 的細胞 ($s\mu^+$, $CD10^+$, $CD19^+$ cells derived from fetal bone marrow) , 在與 anti-CD40 mAb 共同作用下 , IL-13 可以促進其分裂 (proliferation) (85) , 也可使事先以抗 IgM 單株抗體 (anti-IgM mAb) 活化的 B 細胞 , 發生分裂反應 (18, 70) 。 IL-4 的作用較 IL-13 高 2 到 3 倍。不論 IL-13 或 IL-4 , 在缺乏 anti-CD40 mAb 的共同刺激時 , 均無法促使 B 細胞產生分裂反應。這些結果與 IL-13 對正常成人 B 細胞的反應相同 (18) 。

至於 B 細胞的表現型 (phenotypes) 方面 , IL-13 可以刺激其 CD23 、 MHC class II 、 sIgM 、 CD71 以及 CD72 等表現的升高。而 CD19 、 CD20 、 CD25 、 CD40 、 MHC class I 、 B7 、 ICAM-I (Intercellular adhesion molecule-1) 、 LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-3, CD11a) 或 LFA-3 (CD58) 則無顯著影響 (84) 。 IL-4 也有同樣的作用 , 但其效果較 IL-13 強。

IL-13 可刺激脾臟 B 細胞之 MHC class II 及 CD72 表現的增加，而對於扁桃腺分離得之 B 細胞 (tonsillar B cells) 以抗 CD40 單株抗體 (anti-CD40 mAb) 及 IL-4 或 IL-13 作用之後，只有部分的 B 細胞的 CD23 以及 CD71 有增高的現象，顯示 IL-13 可能只作用於 tonsillar B cell 的部分細胞。

IL-13 對於培養中的前 B 細胞 (pre-B cells)，並不能夠促進其表現 CD23、CD40 或 HLA-DR (82)，IL-4 卻有作用，這結果顯示 IL-4 對 pre-B cell 的影響小於成人 B 細胞。一般來說，培養中的胎兒 pre-B 細胞只有 6-9 % 會自發性的分化 (differentiated) 成 $s \mu^+$ 細胞 (85)，IL-4 與 IL-13 均沒有使 $s \mu^-$ 、CD19⁺ pre-B 細胞轉變成 $s \mu^+$ B 細胞的能力。

細胞激素 (cytokines) 對 B 細胞的分裂 (poliferation) 及分化 (differentiation) 是必需的，它們不僅決定了免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 分泌的量，也決定免疫球蛋白的類別轉換 (isotype switching) (89)。例如，IL-4 可引起 IgG4 和 IgE 的 switching (82)，TGF- β (transforming growth factor β) 則會引起 IgA 的 switching (89)。除了細胞激素之外，B 細胞表面的 CD40 與其結合體 (ligand)-----CD4⁺ T 細胞表面的 CD40R 之間的交互作用所提供的共同刺激 (costimulation)，對 B 細胞的分裂與免疫球蛋白的產生都是必需的 (3)。

IL-13 被發現可以劑量依賴型 (dose-dependent) 的方式，引起培養中的 PBMC (peripheral blood mononuclear cells) 產生免疫球蛋白 (Ig)，而且除了生成 IgM 和 IgD 外，也有 IgE 的

生成，顯示 IL-13 與 IL-4 相似，均為 IgE 的類別轉換因子（switch factors）（18, 84）。若將高度純化過的純真 sIgD⁺脾臟 B 細胞（naive sIgD⁺ splenic B cells），以 IL-13 加一共同刺激訊號（如活化的 CD4⁺ T 細胞，anti-CD40 mAb）刺激後，可引起 IgG4 和 IgE 的產生（18, 84），但其能力較 IL-4 弱些。這個結果則可以排除先前所懷疑 IL-13 引起的 IgE 的生成，是由於有 IgE-committed B 細胞的污染而產生的問題。以 anti-IL-4 mAbs 作用時，只能夠封鎖住 IL-4 所引起的免疫球蛋白之生成，對於 IL-13 所引起的 IgE 及 IgG4 的產生，並沒有影響，這點又再次說明了 IL-13 與 IL-4 的作用是各自獨立的。而由上述的結果可以知道，在 T 細胞所分泌的細胞激素之中，IL-13 是除了 IL-4 之外，另一個可以使純真人類 B 細胞（naive human B cells）轉換成為產生 IgG4 以及 IgE 細胞的另一個重要的細胞激素。

免疫球蛋白類別轉換成 IgE 是由於引起 germline ϵ mRNA 的合成（35）。起初，IL-4 被認為是唯一可以引起 B 細胞 ϵ mRNA 合成的細胞激素（35），然而，IL-13 也被發現可以促使純化的 B 細胞之 germline ϵ mRNA 的表現而使免疫球蛋白類別轉換成 IgE（84）。在引起免疫球蛋白類別轉換（Ig isotype switching）方面，IL-13 與 IL-4 並沒有加成（additive）或協同（synergistic）的效果，因此推測 IL-13 與 IL-4 在引起免疫球蛋白的合成時，是利用共同的訊號傳遞的途徑（signal transduction pathway）（18, 84）。

T 細胞在被活化之後，IL-13 蛋白質在 2 個小時之後，即可被偵測到，而 IL-13 mRNA 一直到 72 個小時後仍可被偵測到；

IL-4 則要在 T 細胞被活化 24 小時之後，其 mRNA 才被偵測到 (102)。這些現象顯示在 T 細胞活化後，IL-13 較 IL-4 早被合成且存在的時間也較 IL-4 長。因此認為 IL-13 在調節過敏病人 (allergic patients) 的 IgE 合成上，扮演一非常重要的角色。

另外一個較有趣的現象則是，老鼠與人類 IL-13 (mIL-13 and hIL-13)，均無法使老鼠的 B 細胞發生免疫球蛋白的類別轉換。IL-4 可以促使 LPS 活化的老鼠 B 細胞，在活化的 T_H2 細胞的協助之下，產生適量 IgG 1 和 IgE，但 IL-13 不能。再者，若將老鼠的 IL-4 基因破壞 (mice with disrupted IL-4 gene)，這隻老鼠在面對寄生蟲感染時，將無法產生 IgE (59)。綜合這些結果，得知 IL-13 並沒有影響老鼠 B 細胞的功能，而這與人類 B 細胞比較的話，則可能因為老鼠 B 細胞缺乏有效的 IL-13 接受體 (functional IL-13 receptors)。

第八節 人類 Interleukin 13 並不能活化人類 T 細胞

(Human interleukin 13 does not activate human T cells.)

對於人類 T 細胞，IL-13 則沒有類似 IL-4 的功能。IL-4 可以促進活化的 T 細胞 (activated T cells)，以及 T-cell clones 的生長 (34)，並且引起 CD4⁺ T 細胞表現 CD8 α (81)。雖然對於人類或老鼠的單核球或巨嗜細胞以及人類 B 細胞，IL-13 均有類似 IL-4 的功能，但 IL-13 卻沒有活化人類 T cells 的能力 (105)。另外，高濃度的 IL-13 對於 IL-4 引起的 T 細胞分

裂反應，並沒有抑阻的作用，顯示 IL-13 對於 T 細胞來說，並非 IL-4 的拮抗物 (H. Yssel)。IL-13 也無法使得 CD4⁺T 細胞表現 CD8 α ，因此認為人類 T 細胞並不表現 IL-13 接受體。

第九節 Interleukin 13 對自然殺手細胞的影響

(The effects of interleukin 13 on NK cells.)

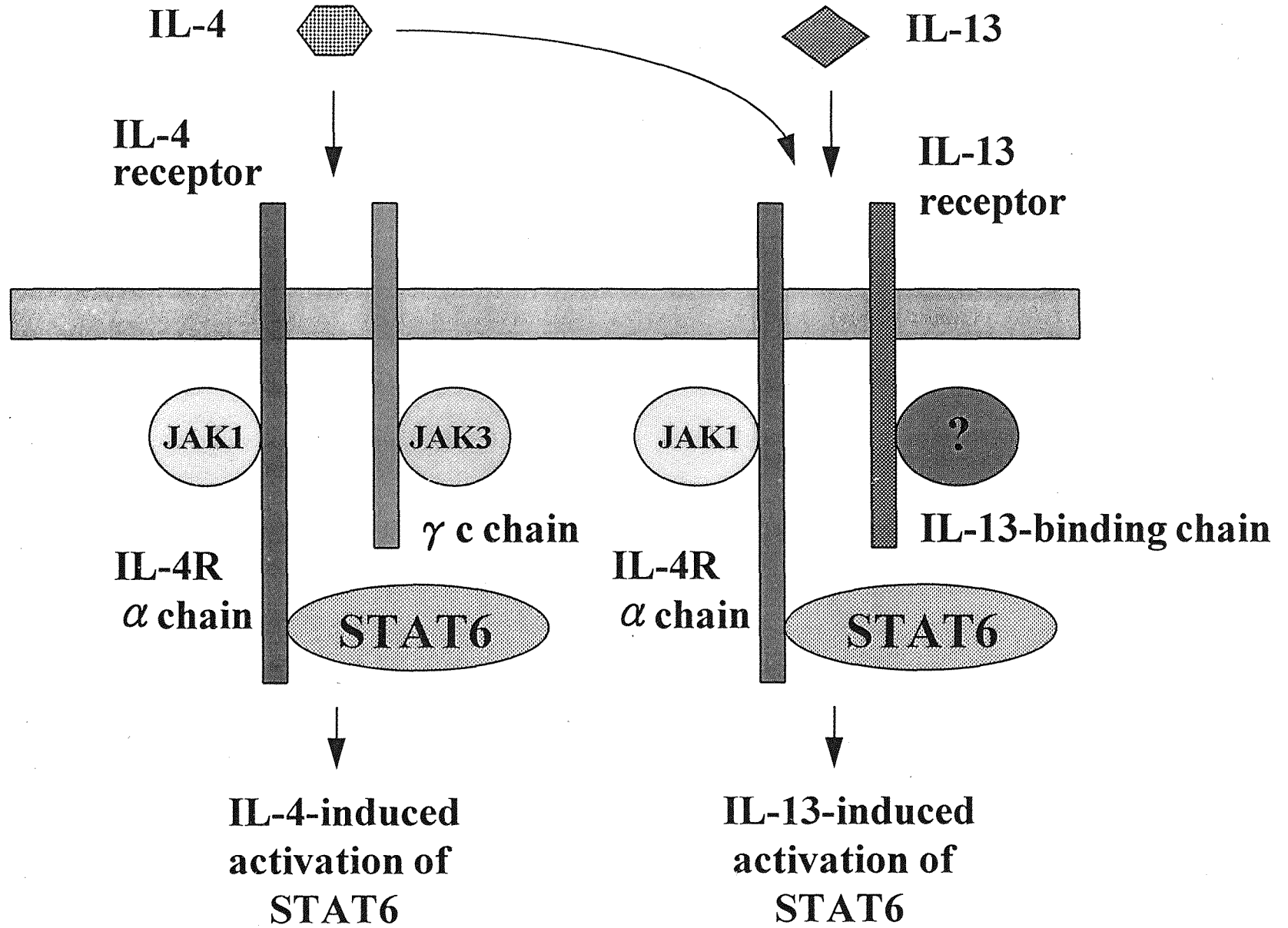
IL-2 對於 NK 細胞 (Nature Killer cells) 產生 IFN- γ 來說是一強抑制物 (101)，IL-2 對 NK 細胞的作用則可被 IL-4 有效的抑制 (73)。以高濃度的 IL-2 (100U/ml) 刺激 CD3⁻CD16⁺CD56⁺NK 細胞產生 IFN- γ ，仍可被 IL-4 完全抑制；IL-13 只能抑制較低量的 IL-2 (20U/ml) 對 NK 細胞的刺激，且只能夠有部份抑制的作用 (H. Yssel)。這些結果顯示 IL-13 可抑制 IL-2 刺激 NK 細胞產生 IFN- γ ，但較 IL-4 效力差一些。

第十節 Interleukin 13 與 interleukin 4 接受體共有一相同次單位 (IL-13 and IL-4 receptors share a common subunit.)

由於 IL-13 大部份的生物活性均與 IL-4 相似，且兩者之間也沒有加成或協同的作用，所以一般認為 IL-13 與 IL-4 可能有一共同接受體。而由 Zurawski 等人於 1993 年的實驗中，他們設計了一個 IL-4 的突變物—IL-4Y124D，將 IL-4 的第 124 個氨基酸由

Tyrosin 改變成 Aspartic acid。這個突變物雖然仍保有與 IL-4 接受體結合的能力，但無法將訊號傳至細胞內 (60)。由於 IL-4Y124D 可以抑制由 IL-13 與 IL-4 所引起 TF-1 細胞株 (104) 及 B 細胞 (68) 的反應，所以認為 IL-4 與 IL-13 的接受體含有一共同次單位 (common subunit)。IL-4 接受體為含有一 α chain (p140) 及一 γ chain (現稱為 common γ chain, γ c chain) 的異質二聚體 (heterodimer) (6)。IL-13 雖不會與 IL-4R 或 IL-4R α chain 結合，但卻可競爭 TF-1 細胞株的 IL-4 結合位置 (104)。因此最初認為 γ c chain 為 IL-4R 與 IL-13R 的共有次單位。

然而，另一細胞株 — X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) B 細胞，此細胞雖不表現 γ c chain，但卻會 IL-13 有反應 (68)，且 IL-4Y124D 又可抑制 IL-13 的作用；再者，IL-4 所引起 MC/9 細胞株的分裂反應，可被抗 γ c chain 單株抗體 (anti- γ c chain mAb) 所抑制，而此抗體卻不影響 IL-13 的作用 (42)。這些結果均指向 γ c chain 似乎不存於 IL-13R 之中。再由於抗 IL-4R α chain 單株抗體 (anti-IL-4R α chain mAb) 可抑阻 IL-4 與 IL-13 的活性 (65)，所以確認 IL-4R α chain 才是 IL-4R 與 IL-13R 所共有。而 IL-13R 除了含 IL-4 α chain 外，也以發現一分子量約為 60-70kDa 的次單位 (78)。由上述結果可知，IL-4 α chain 可與 γ c chain 結合而形成 IL-4R (此接受體不與 IL-13 結合)，或與 IL-13 的另一次單位結合，而形成 IL-13R。



From: Robin E. Callard et al.
(1996) Immunol. Today 17, 108.

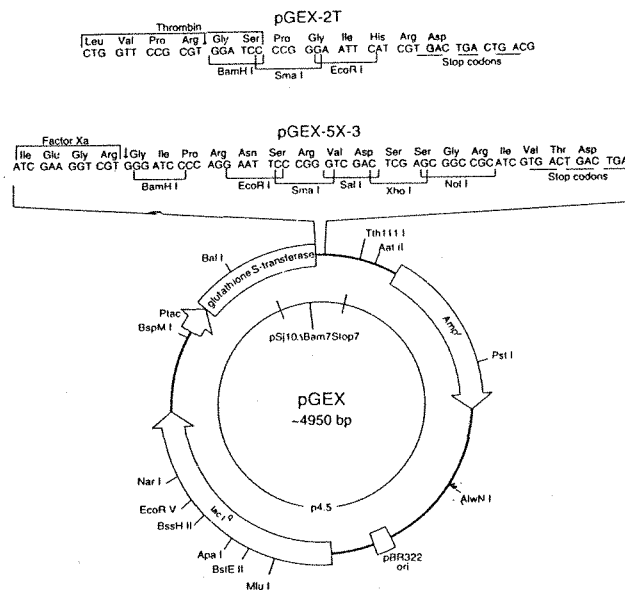
到目前為止，IL-13 的結構，分泌形式，功能，生物活性等，都有初步的瞭解。但仍有許多方面，如：訊號傳遞形式，接受體結構，對過敏病人的影響， T_H1 與 T_H2 之間的平衡，甚至與自體免疫疾病之間的關係，都有待進一步之研究。

第二章 材料與方法

第一節 hIL-13 於大腸桿菌之 pGEX-2T 載體之表達

(一) hIL-13 DNA 由台大蔡考圓老師提供，已構築至 pGEX-2T 表現載體中，且已轉型至 *E. coli*。

(二) 載體 DNA (pGEX-2T) 之簡介：



hIL-13 被放置於 *BamHI* 和 *EcoRI* 兩個限制酵素的切割位置之間，而與 Glutathione-S-transferase (GST) 形成一融合蛋白質 (fusion protein)。形成的融合蛋白質可以利用含 Glutathione agarose beads 的管柱加以純化，並可利用 Thrombin 將 GST 與 hIL-13 切開。

(三) hIL-13 之 DNA 序列分析

本實驗室是採用雙去氧核糖核酸鍊終止法 (Sanger F et al.,1977) 為原理的試劑 Sequenase Verson 2.0 (USB,Ohio) 。

a. 質體 DNA 之純化

我們將構築好的 pGEX-2T 質體，利用 Wizard Minipreps (Promega) 的 DNA 純化系統，將質體 DNA 純化出來，其步驟如下：

將隔夜培養在 L Broth 中的 *E. coil* 取 1.5ml 以 1500rpm 離心，將菌體沉澱下來。倒去上清液後，以 200 μ l 的 Cell Resuspend Solution 將菌體再次懸浮。加入 200 μ l 的 Cell Lysis Solution ，小心的混合至澄清。加入 200 μ l Neutralization Solution ，上下反轉混合均勻。以 14,000rpm 離心 5 分鐘，取出上清液後，加入 1ml DNA purification Resin 作用 1 分鐘後再移到 minicolumn ，再以 2ml Wash Solution 清洗，將 minicolumn 以 12,000rpm 離心 2 分鐘，加入 50 μ l ， 65-70 $^{\circ}$ C 的水， 1 分鐘後，以 12000 rpm 離心 20 秒即得。

b. 模板 (templete) 準備

先取 4 μ g 的 pGEX-2T 雙股 DNA，體積約為 27 μ l，再加入 3 μ l 鹼性溶液 (2M NaOH, 2mM EDTA)，靜置 10 分鐘，使雙股 DNA 降解成單股。再加入 2 μ l 的中和鹽類溶液 (3M Ammonium acetate)，使解離的單股 DNA 能穩定。再加入 3-4 倍體積的絕對酒精，置於 -70 °C 沉澱 15 分鐘後，以 14,000rpm 離心 30 分鐘，再以 200 μ l 的 70% 酒精清洗，真空乾燥後，加入 7 μ l ddH₂O 溶解後備用。

c. 引子 (primers)

本實驗共用了二組 primers：

第一組：

pGEX 5' sequencing primer

5'- [GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG] -3'

pGEX 3' sequencing primer

5'- [CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG] -3'

第二組：

5' primer

. 5'-GCCCTGTGCCTCCCTCTACAGCCCTCAGG-3'

3' primer

. 5'-TTTCGCGAGGGACGGTTCAACGAATTCGC-3'

d. 黏結作用 (annealing)

把所需的 primers 配置成 2pmole 的濃度，並準備 65 °C 的水浴槽，把 (b) 中準備的 7 μ l 單股質體加入 2 μ l 5X 之反應緩衝液 (reaction buffer) 及 1 μ l 配置好的 primer。混合均勻後，置於 65 °C 水浴中 2 分鐘，使其自然降溫至 35 °C 以下，再將其置於冰上備用。在此同時，分別將四種不同的中止混合物 (termination mixture, ddG, ddA, ddT, ddC)，取 2.5 μ l，分裝於標示好的微量離心管中。再以 1:5 將標示混合物 (labeling mixture) 稀釋於 ddH₂O 中，以 1:8 將 sequenase 稀釋於 Sequenase dilution buffer 中之後，置於冰上備用。

e. 標示反應 (labeling reaction)

將置於冰上，已黏上 primer 的 DNA 混合物，加入 1 μ l 0.1M DTT，2 μ l 稀釋過的標示混合物，0.5 μ l 的 [³⁵S] dATP，及 2 μ l 稀釋過的 sequenase，將其充分混和均勻後，置於室溫下作用 2-5 分鐘。

f. 終止反應 (termination reaction)

把已經標誌好裝有終止混和物的微量離心管，置於 37 °C 中預熱 2 分鐘。此時再取 3.5 μ l 已經完成標示反應的標示混和物

至每個裝有終止混和物的微量離心管中，於37°C中作用5分鐘。再加入4 μ l 的終止反應溶液至每個離心管中，以終止合成反應。此時，完成的反應物可於-20 °C下保存1-2星期。

g. 電泳 (electrophoresis)

本實驗室利用雙去氧核糖核酸 (ddNTP) 來終止 DNA 的聚合反應，因此合成出來的 oligonucleotide 會有不同的長度。再利用8% polyacrylamide 及7M urea 的電泳膠片分離並解讀。以1700伏特的電壓進行電泳後，可使相差一個氮鹼基的 oligonucleotide 在電泳膠上分離開，再以真空乾熱乾膠後，以X光底片於70 °C下感光2-3天。洗片後，置於 light box 上判讀。

(四) hIL-13 蛋白質的表現

a. 步驟

將轉形成功的 E. coli 菌株，先隔夜培養在 L-Broth 中，然後取 1/10 體積接種在含有安匹西林 (Ampillin 100 μ g/ml) 3000ml 的 L-Broth 中，放在 37 °C 下，搖動培養，一直到吸光度約在 $OD_{600}=0.5$ 時 (約二小時) 。加入 IPTG (Isopropylthiogalactosidase) 於 L-Broth 中，使其終濃度為 0.1mM，繼續培養至 $OD_{600} = 1.5$ 。之後以 3000g 離心 15 分鐘，使菌體沉澱，再以 1/100 L-Broth 體積的 TBS (Tris Buffer

saline)，將 L-Broth 洗去。離心將菌體沉澱下來，再加入 TBS (6g pellet/20 ml TBS)，菌體懸浮後，加入 $MgCl_2$ (1M) 150 μ g ; DNase I (10 mg/ml) 60 μ l ; Aprotinin 200 μ l ; PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride 100mM) 150 μ l ; Tween-20 150ul 。混合後，以均質機 (homogenizer) 將菌體打破。再以 15,000 rpm ，在 4 °C 下，離心半小時，取上清液。此時上清液約有 30ml ，加入 15 μ l 的 EDTA (0.5M) ，混合均勻。通 0.45um 的 minipore 之後備用。

b. 備準 Glutathione agarose beads

取 Glutathione agarose beads (powder) 浸泡於 TBS 中，使其膨脹，再移至管柱中，並以含 0.25mM EDTA 的 TBS 沖洗之。
(16g E. coli pellet / 50 mg Glutathione agarose bead powder)

c. 純化 hIL-13

將 (a) 準備好的上清液，通 (b) 準備的管柱三次後，再以 TBS 將沒有結合在管柱中的雜蛋白質洗去，直到洗下的 TBS $OD_{280} < 0.003$ 為止。洗完之後，以洗出緩衝液 (Glutathione elution buffer: Tris 0.605g, Glutathione 0.154g / 100ml ddH₂O pH8.0) 將 GST hIL-13 fusion protein 沖下，並以 TBS 沖洗管柱 (管柱可重複使用) 。收集的蛋白質以透析膜/PBS 透析之。

d. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 分析

• Resolving gel (12.5 %)

試藥：

1:29,30% Bis-Acrylamide	3.75ml
1.5M Tris,pH8.6	2.25ml
H ₂ O	3ml
SDS(Sodium dodecyl sulfate,20%)	45ul
A.P.(Ammonium persulfate,10%)	35ul
TEMED(N,N,N',N',-tetramethylethylenediamide)	5ul

將上述試藥混合均勻後，加於 mini-proten 的玻璃中，並加 20%酒精壓平，靜置 60 分鐘。

• Stacking gel

試藥：

Bis-Acrylamide (1:29 , 30%)	0.5ml
Tris , 0.5M pH 6.8	0.95ml
H ₂ O	2.25ml
SDS(Sodium dodecyl sulfate , 20%)	17.5ul
A.P.(Ammonium persulfate, 10%)	20ul
TEMED (N,N,N',N',-tetramethylethylenediamide)	5ul

將上述試藥混合均勻後，把 resolving gel 上層的酒精倒掉，加入此混合物，並將齒槽插上，做出凹槽，靜置 30 分鐘。在 gel 完成前，可先處理欲分析的樣品。將欲分析的樣品，與含 Bromophenobluе的 SDS-PAGE sample buffer 在沸水中煮 3 分鐘，待 gel 完成後，將煮好的樣品加入凹槽中，以 110 伏特的電壓，使樣品由陰極跑向陽極。當樣品通過 Stacking gel 與 Running gel 的界面時，把電壓增大為 150 伏特。但當染料跑出 gel 後即可關掉電源，取下 gel，置於 Stacking buffer (0.1% Coomassive blue, 10% Acetic acid, 50% methanol) 中染色 2 小時後，再以脫色液將顏色去掉。

(五) 西方點墨法 (Western Blot) 分析

a. 轉印 (Transfer)

採用 ATTO coporation 的 AE-6675 HORIZBLOT。將 SDS-PAGE gel 放於負極處，NC (nitro-cellulose) paper 緊貼於 SDS-PAGE gel。使用的毫安培數為 NC paper 的面積 (cm^2) 乘以 2.5。轉印的時間為 40 分鐘。轉印完後可用 2% 的 Ponceau-S 染色，檢查轉印是否成功並可用鉛筆標出分子量。

b. 雜交 (Hybridization)

轉印成功的 N-C paper，先以 5% 的脫脂奶粉做阻斷 (Blocking) 的工作，置於 4 °C 下作用隔夜。將 Rabbit anti-hIL-13 polyclonal Ab (IgG) 以 1000x 稀釋於脫脂奶粉中，再與 N-C paper 於室溫中作用 2 個小時後，以 TBS-Tween 洗三次，每次 10 分鐘。在本實驗中所使用的二級抗體 (secondary antibody) 有二種，分別是接上放射性 [¹²⁵I] 的 protein A 以及接上 Alkaline phosphatase 的山羊抗兔子 IgG 的抗體 (Goat anti-rabbit IgG mAb)。方法分別為：

(1) Protein A labeled [¹²⁵I]

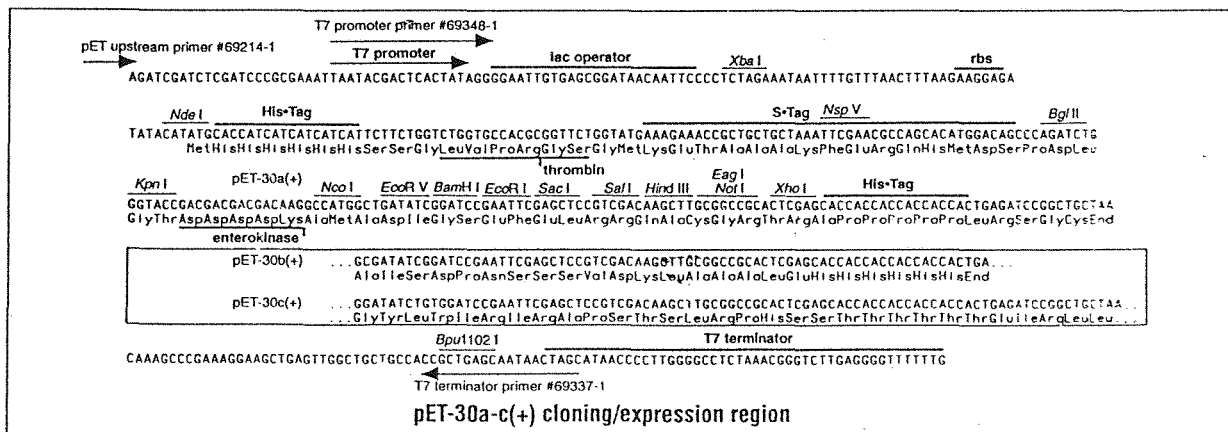
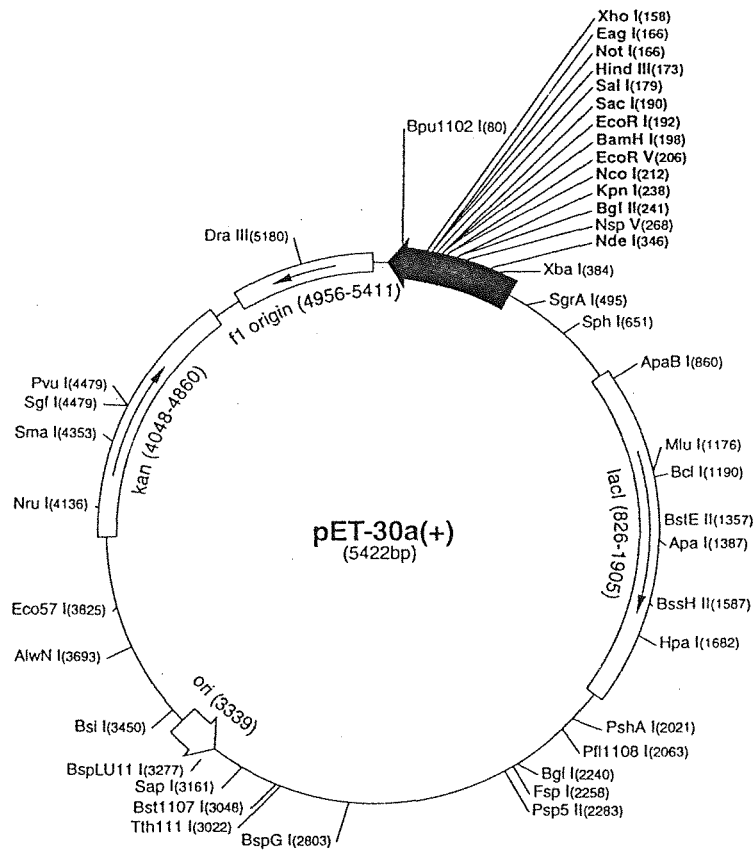
取 50ul [¹²⁵I]protein A 稀釋於 20ml 脫脂奶中，與 N-C paper 在室溫中作用 2 小時。以 TBS-Tween 洗六次，每次 10 分鐘。最後待 N-C paper 乾了後，以 X 光片壓片，洗片即可。

(2) Alkaline phosphatase

取接有 alkaline phosphatase 的 goat anti-Rabbit IgG，以 1000X 稀釋於脫脂奶中，與 N-C paper 在室溫下作用 2 小時。以 TBS-Tween 洗六次，每次 10 分鐘。加入 substrate buffer，蓋上錫箔紙，於室溫下作用十分鐘使其呈色。

第二節 h-IL13 於大腸桿菌之 pET-30 載體之表達

(一) pET-30 載體表達系統之簡介



(二) hIL-13 DNA 之製備

由於 pGEX-2T 載體中的 hIL-13 DNA 並不含終止密碼，而是利用 pGEX-2T 載體所提供的終止密碼。於是我們想利用 PCR (Polymerase chain reation) 的方法將終止密碼建立。我們使用了二個 primers，分別具有 *BamHI* 和 *EcoRI*，等限制酵素位置，其序列如下：

5'-GCGGATCCCCTCCCTCTACAGCCCTCAGG

5'-GGCGAATTCTCAGTTGAACCGTCCCTCGCGAAA

(三) PCR 反應模版之置備

將 pGEX-2T 質體自 *E. coli* 中分離，並 *BamHI* 及 *EcoRI* 於 37 °C，作用 1.5 小時，把產物於 2% 低融點 (Low melting gel) 洋菜膠上以電泳分離後，在紫外燈下切下含 hIL-13 DNA 的膠，置於微量離心管中，於 65 °C 水浴 15 分鐘，再以 PCR prep (Promega) 將 hIL-13 DNA 純化出來，步驟如下：

加 0.5ml resin 至以融解的洋菜膠中，並迅速移至 1.5ml 針筒珠中再打入 minicolumn 內，並將洋菜膠打掉。以 2ml Wash Solution 沖洗，以 12000 rpm 離心 2 分鐘，再加 30 μ l，65 °C，70 °C 的水，一分鐘後，以 12000 rpm 離心 20 秒即得。

PCR 反應之條件

Template(hIL-13)	0.01ug
primers	各 20pmole
dNTP	0.2mM
Mg ²⁺	2mM
10x pfu buffer	5 λ
pfu	1 unit
95 °C 5min	1cycle
95 °C 1min, 60 °C 2min, 72 °C 2min	38cycle
72 °C 10min	1cycle
sock at 4 °C	

待反應完成後，以前述方法將 PCR 產物回收。

(四) 用限制酵素切 pET-30a 及欲插入 pET-30a 的 hIL-13 DNA

將載體 pET-30a DNA 和 PCR 產物，皆以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 同時在 37 °C 作用 1.5 小時。再分別以 2% 低融點洋菜膠電泳分離後，以同 (b) 的方法純化。得到含 *Bam*HI 終端和 *Eco*RI 終端的 pET-30a 及 hIL-13-DNA 。

(五) 接合 (ligation)

將已被 *Bam*HI , *Eco*RI 限制酵素作用過的載體 (vector) DNA (pET-30a)和 hIL-13 insert DNA 以 T4 DNA ligase 進行接合，其條件如下：

pET-30a DNA	2ul(100ng/ μ g)
hIL-13DNA	1ul(206ng/ μ g)
DTT(100mM)	1 μ l
Ligase	1 μ l
Ligase buffer	2 μ l
ddH ₂ O	13 μ l

在 16 °C 下，作用整晚。

(六) 轉型 (Transformation)

(1) Competent cell 之制備

將隔夜培養的 *E.coli* (JM109)，以 1/50 倍體積稀釋在 L-Broth，在 37 °C 培養到 OD₆₀₀ 約為 0.6。此時取 50ml 菌液，以 2500rpm，在 4 °C 下離心 5 分鐘後，以 25ml 無菌、冰的 0.1M CaCl₂，小心的將菌體重新混合懸浮，再靜置於冰中 30 分鐘。以 2500 rpm 於 4 °C 下離心 5 分鐘，將菌體沉澱，此時再以 1 ml 冰的 CaCl₂ (0.1M) 混合，放於冰中 1 小時後備用。

(2) 轉型

取 100ul 已準備好的 competent cell ，加至 20 μ l 由 (五) 制備好的 ligant 中，均勻混合後，靜置於冰上 30 分鐘，之後再放置於 42 °C 下 3 分鐘，再放置於冰上 5 分鐘。取 200ul 的 L-Broth 加至此作用完的 competent cells 中，並於 37 °C 下培養 1 小時。將此培養完的 *E. coli* ，塗抹在含有 30ng kanamycin/ml 的平板培養基上，於 37 °C 下培養隔夜。

(七) 篩選 (selection)

將平板培養基上長出來的菌落各別培養，並純化其質體 DNA ，再以 *Bam*HI 、 *Eco*RI 限制酵素於 37 °C 下，作用 2 小時，之以 1 % 洋菜膠電泳分析後，選擇其質體中含 hIL-13 DNA 的質體，以前述方法，將此質體再次轉型，至表現宿主細胞 *E. coli* BL21 (DE3) 。

(八) 表現及純化 hIL-13 fusion protein

將轉型成功的 BL21 (DE3) ，取一單一菌落，接種至 L-Broth (含 30ng/ml 之 kanamycin) ，在 37 °C 下隔夜培養。然後取 1/10 體積於同樣含 Kanamycin 的 L-Broth 中，置於 37 °C 搖動，直到吸光度 $OD_{600}=0.5$ 。此時加入 IPTG 至終濃度為 1mM ，繼續培養

3-4 小時。以 3000g 於 4 °C 下離心 10 分鐘，將菌體收集後，以 Binding Buffer 將 L-Broth 洗去後，再次離心。以 4/100 L-Broth 體積的 Binding buffer 將菌體再次懸浮，加 0.1% NP-40，PMSF（至 1mM）Aprotinin（1% v/v）。放置於冰中，以超音波將菌體打破後，再以 39,000g，再 4 °C 下離心 20 分鐘後取上清液，通 0.45 micron minipor。再將上清液通過以 His-binding Resin 充填的管柱。而此管柱的充填方法如下：

1. 先取 ddH₂O 至管柱，使之通過管柱。
2. 以 inversion 方式，將 His-binding Resin 小心的混合後，將 Resin 加至管柱中。
3. 當 Storage buffer 流過後，以下列 buffer 活化及平衡 Resin

3 volume sterile ddH₂O

5 volume 1X charge buffer

3 volume 1X binding buffer

以約 10 倍管柱體積/小時的流速，使上清液通過管柱三次後，先以 10 倍 Resin 體積的 Binding buffer 清洗，再以 6 倍 Resin 體積的 Wash buffer 清洗，最後以 6 倍 Resin 體積的 Elute buffer 將目標蛋白質（hIL-13 fusion protein）引流下來。

（九）SDS-PAGE 與西方點墨法分析

將引流下來的蛋白質，用 SDS-PAGE sample buffer 煮沸三分鐘後，以 SDS-PAGE 分析之。並以同前述之作法，將電泳後的膠片，轉印到 N-C paper 上，以兔子抗人類 IL-13 抗體測定。

(十) 蛋白質測定

本實驗室是採用 BIO-RAD PROTEIN ASSAY 的方法。以 0、2、4、6、8、10 μ g BSA/ml 當成 standard。將 0、2、4、6、8、10 μ g BSA 與欲測的樣品皆溶於 0.8ml 的水中。均勻混合，再加入 0.2ml 的 Bio-Rad reagen，混合後靜置 5 分鐘，再測定 280nm 的吸光值，做出標準曲線（standard curve），再計算樣品的濃度。

第三章 結果

第一節 hIL-13 於 pGEX-2T 載體系統中表達

在本實驗中，以 pGEX-2T 這個表達載體所表現的 hIL-13 是一個與 GST (Glutathione-S-Transferase) 融合的蛋白質，所以表現出來的融合蛋白質其分子量大約為 38 kDa 左右。因此，在以 IPTG 刺激之前與之後的 *E. coli* total lysate，用 SDS-PAGE 進行分析時，刺激之後在大約 38 kDa 左右處，有較刺激前產生更多的蛋白質(圖 1.)，這與我們預期的結果相同。但以 Glutathione agarose beads 將這融合蛋白質加以純化時卻發現，純化到的蛋白質絕大部份均以降解 (degradation)，且成為分子量約為 28 kDa 的蛋白質 (圖 2.)。用兔子抗 hIL-13 抗體 (Rabbit anti-hIL-13 Abs) 做西方墨點法分析 (Western blot analysis) 時發現，這 28 kDa 的蛋白質可以被兔子抗 hIL-13 抗體所認識 (圖 3.)，而且這 28 kDa 的蛋白質在以 IPTG 刺激之後就已存在於 *E. coli* 中 (圖 1.)。

第二節 hIL-13 DNA 序列分析

我們將由 basophil 得到的 cDNA 構築至 pGEX-2T 載體之後，對 hIL-13 作序列分析，得到的結果發現其序列並沒有不同。(圖 4.)

5'- ATG GCG CTT TTG TTG ACC ACG GTC ATT GCT CTC ACT TGC CTT 42
 GGC GGC TTT GCC TCC CCA GGC CCT GTG CCT CCC TCT ACA GCC 84
 CTC AGG GAG CTC ATT GAG GAG CTG GTC AAC ATC ACC CAG AAC 126
 CAG AAG GCT CCG CTC TGC AAT GGC AGC ATG GTA TGG AGC ATC 168
 AAC CTG ACA GCT GGC ATG TAC TGT GCA GCC CTG GAA TCC CTG 210
 ATC AAC GTG TCA GGC TGC AGT GCC ATC GAG AAG ACC CAG AGG 252
 ATG CTG AGC GGA TTC TGC CCG CAC AAG GTC TCA GCT GGG CAG 294
 TTT TCC AGC TTG CAT GTC CGA GAC ACC AAA ATC GAG GTG GCC 336
 CAG TTT GTA AAG GAC CTG CTC TTA CAT TTA AAG AAA CTT TTT 378
 CGC GAG GGA CGG TTC AAG TGA 399

圖 4. hIL-13 DNA 序列

第三節 構築 hIL-13 基因至 pET-30a 表現載體

在利用 pET-30a 這個表達載體表現 hIL-13 時，我們先將 hIL-13 DNA 由 pGEX-2T 載體中，用 *Bam*HI 與 *Eco*RI 切下（圖 5.），並且做了一次 PCR（Polymerase Chain Reaction），將 hIL-13 DNA 的終止密碼（stop codon）建立（圖 6.）。在將這以 PCR 產生的 hIL-13 DNA 構築於 pET-30a 的 *Bam*HI 與 *Eco*RI 這兩個限制酵素位置之間。將與 hIL-13 DNA 完成接和（Ligation）的 pET-30a 載體先轉型（Transform）至 JM109 這株 *E. coli* 突變體中，在將 JM109 中的 pET-30a 載體分離出來（圖 7.），待確定已將 hIL-13 DNA 成功的接合至 pET-30a 載體後，再把這接合成功的 pET-30a 載體轉型至表現寄主（expression host）— BL21（DE3）這個 *E. coli* 突變體中，並且以 IPTG 刺激 hIL-13 的表現。

第四節 hIL-13 蛋白質於 pET-30a 表現系統之表現、確認與純化

在這個表達系統之中，所表現的蛋白質也是一個融合蛋白質，而由於是與一分子量約為 6 kDa 且含有六個 Histidin 的一小段 polypeptide 接合在一起，所以此融合蛋白質的分子量約為 16kDa 左右。我們把以 IPTG 刺激之前與刺激之後的 *E. coli* total lysate 用 SDS-PAGE 分析後發現，在小於 20 kDa 處，IPTG 刺激之後出現了大量的蛋白質，這在以 IPTG 刺激之前幾乎沒有（圖 8.）。我們在以兔子抗 hIL-13 抗體對其作西方墨點分析時，這個因刺激而表現的蛋白質可以被抗 hIL-13 抗體所認識（圖 9.）。

於是以 His-Binding Resin 純化這個蛋白質（圖 10.），且純化得到的蛋白質也可以被兔子抗 hIL-13 抗體所認識（圖 11.）。所以在這個表達系統中，我們可以表達 hIL-13 這個蛋白質，並且可以純化得到。

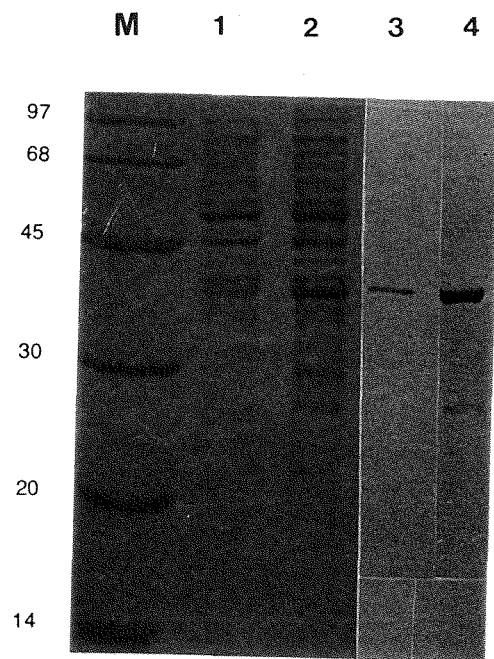


圖 1. 12% SDS-PAGE analysis and western blot analysis.
SDS-PAGE analysis.

M: low range marker

lane 1: *E. coli* total lysate before IPTG induction

lane 2 : *E. coli* total lysate after IPTG induction

Western blot analysis.

lane 3: *E. coli* total lysate before IPTG induction

lane 4: *E. coli* total lysate after IPTG induction

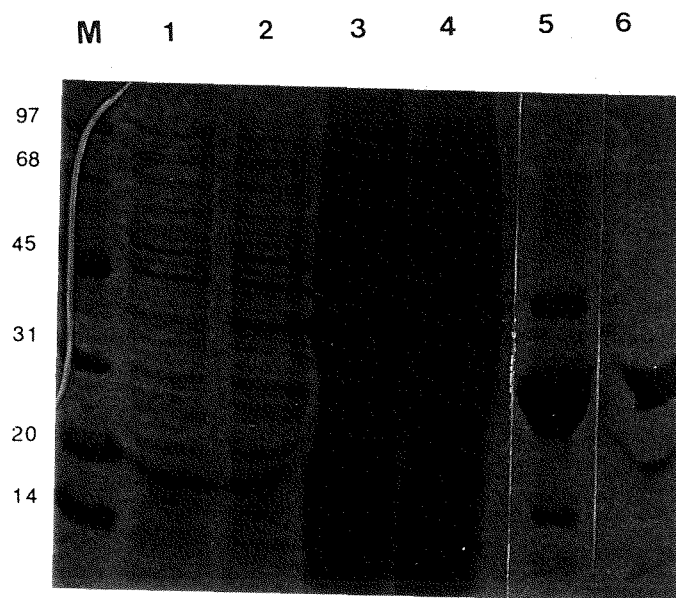


圖 2. 12% SDS-PAGE analysis.

M: low range marker

lane 1: E. coli total lysate before IPTG induction

lane 2: E. coli total lysate after IPTG induction

lane 3, 4: the supernatant of E. coli lysate

lane 5: GST-hIL-13 fusion protein

lane 6: GST

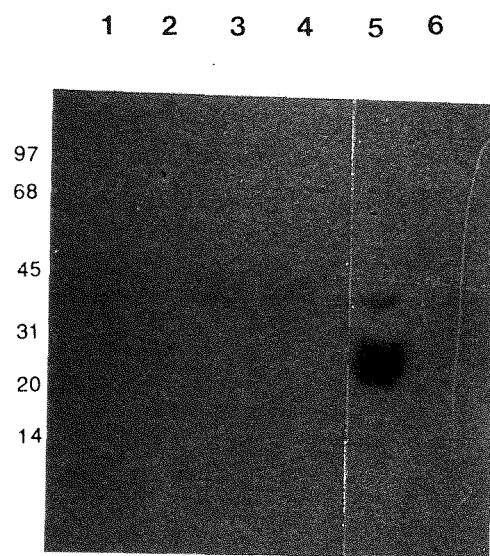


圖 3. Western blot analysis. (2nd Ab: protein A [^{125}I])

lane 1: E. coli total lysate before IPTG induction

lane 2: E. coli total lysate after IPTG induction

lane 3, 4: the supernatant of E. coli lysate

lane 5: GST-hIL-13 fusion protein

lane 6: GST

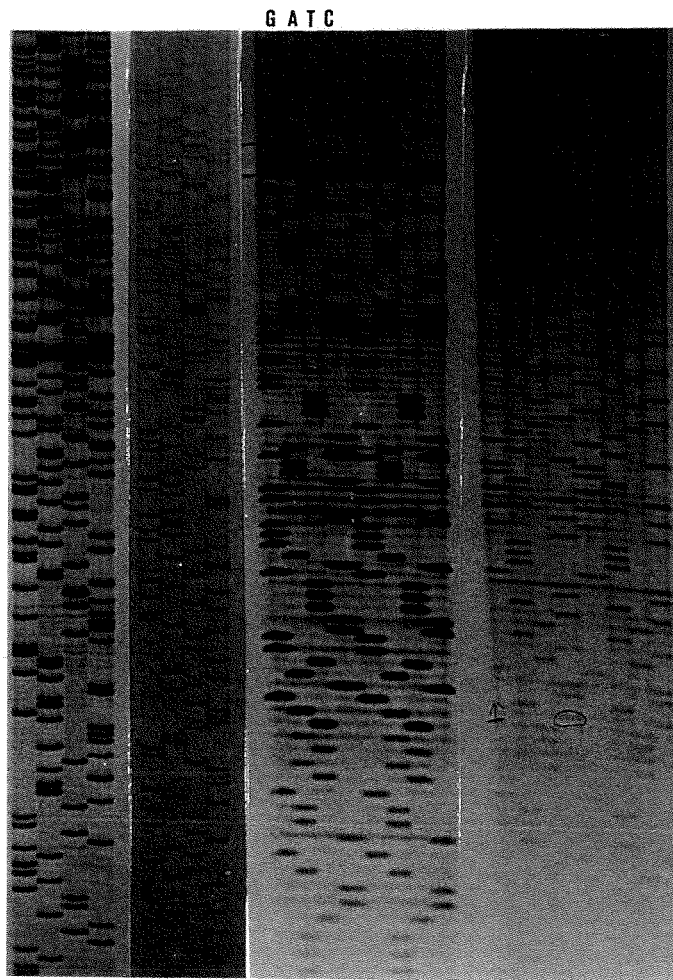


圖 4. 以 Sequence Version 2.0 Kit 作的 DNA 序列分析

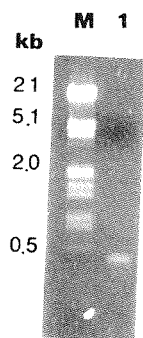


圖 5. 1%Agarose electrophoresis of hIL-13cDNA cut from pGEX-2T vector with *Bam*HI and *Eco*RI restriction enzymes.

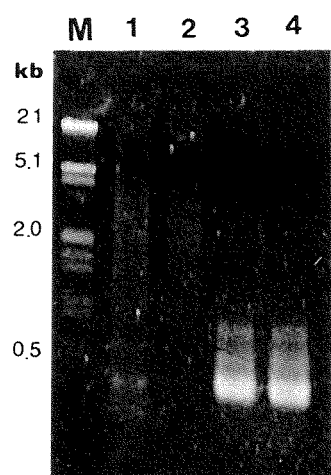


圖 6. 1%Agarose electrophoresis of PCR products.

M: marker

lane 1: template only (hIL-13 DNA fragment)

lane 2: primers only

lane 3, 4: template and primers.

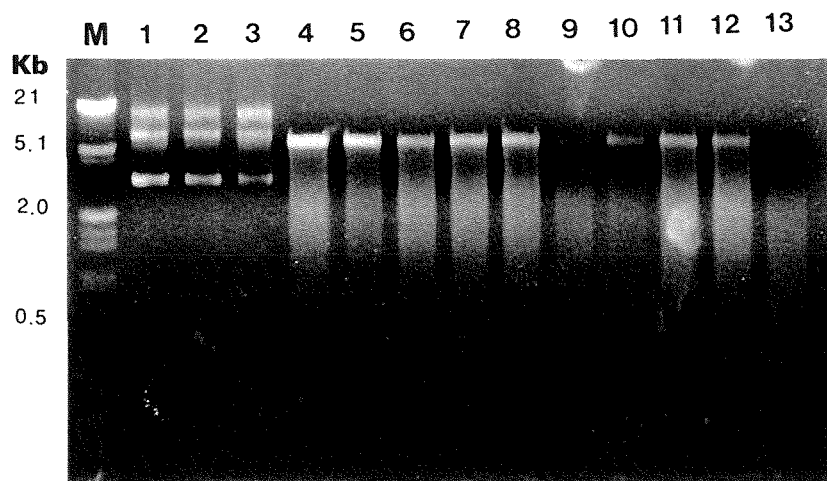


圖 7. 1%Agarose electrophoresis of pET-30 plasmid purified from transformed JM109.
 lane 1, 2, 3 : pET-30 plasmid
 lane 4 - 13 : pET-30 plasmid digested with *Bam*HI and *Eco*RI

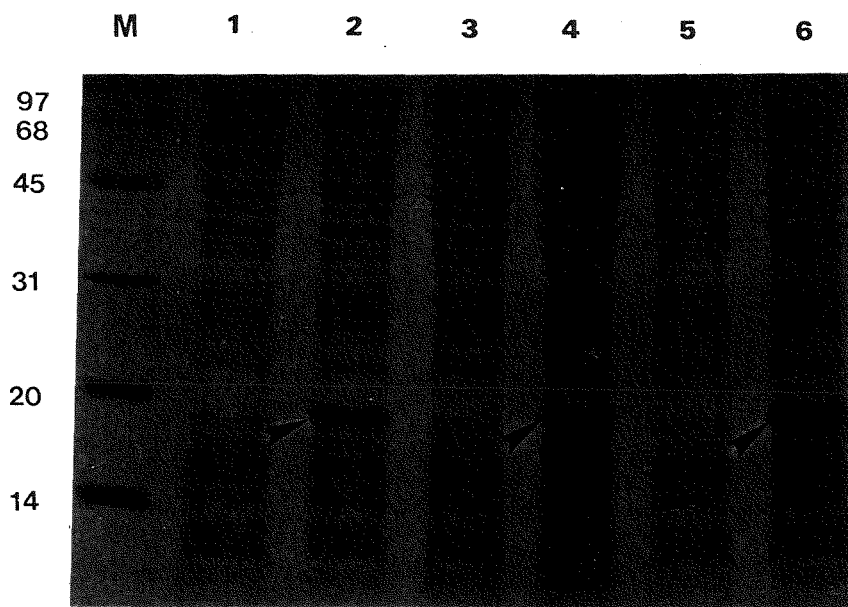


圖 8 . 15% SDS PAGE analysis.

M : Low range protein marker

lane 1 , 3 , 5 : before IPTG induction

lane 2 , 4 , 6 : 2hr after IPTG induction

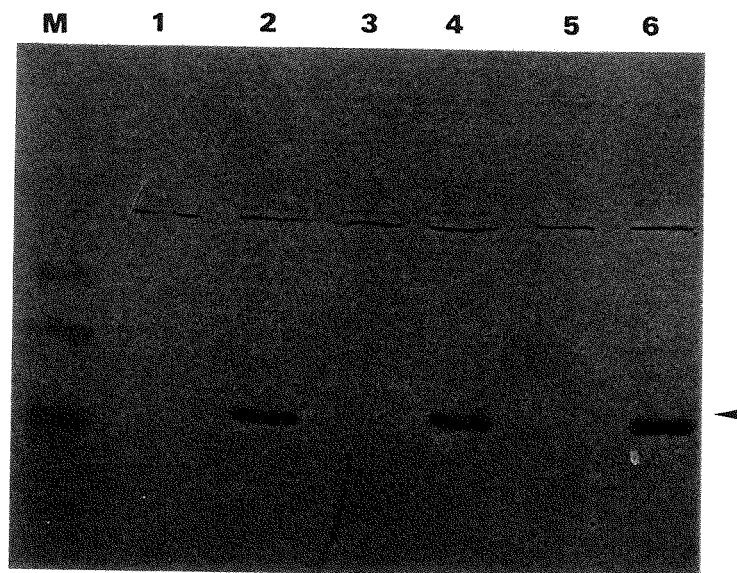


圖 9 . Western blotting analysis by anti-hIL-13 polyclonal Ab.

M : Low range protein marker

lane 1 , 3 , 5 : before IPTG induction

lane 2 , 4 , 6 : 2hr after IPTG induction

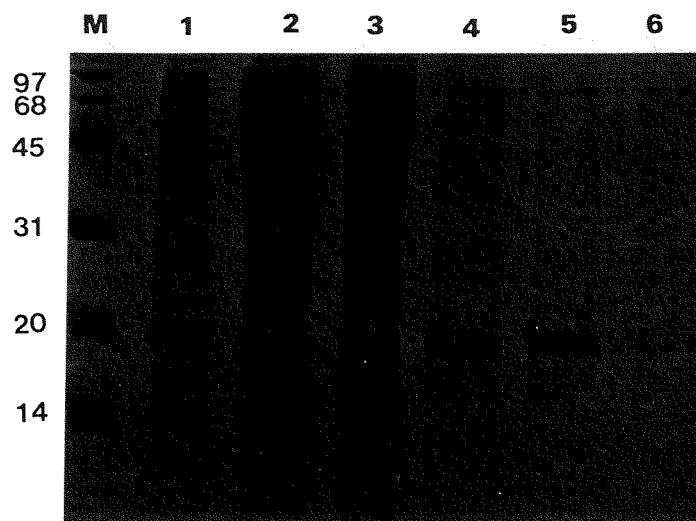


圖10. 15% SDS-PAGE analysis.

M : low range protein marker

lane 1 : cell total lysate after IPTG induction

lane 2 : cell extract

lane 3 : cell extract flow through

lane 4 , 5 , 6 : recombinant hIL-13 eluted from His-binding resin

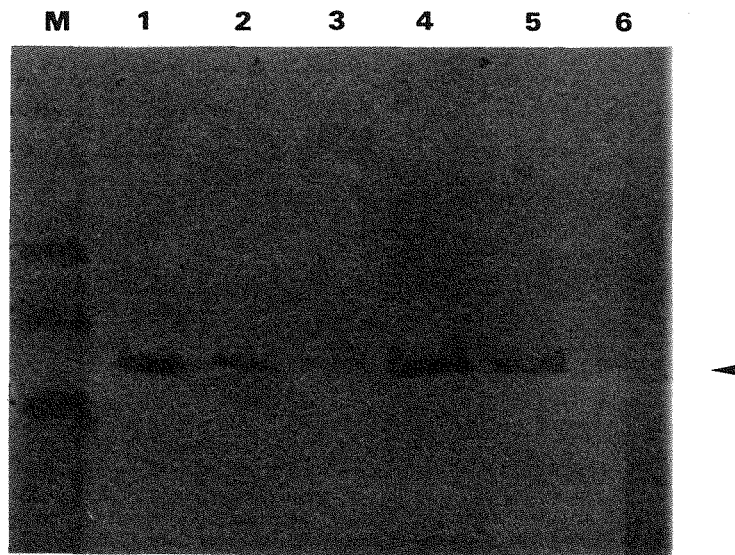
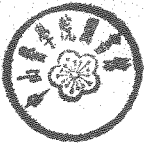


圖 11. Western blotting analysis by anti-hIL-13 polyclonal Ab.

M : low range protein marker

lane 1 : cell total lysate after IPTG induction

lane 2 : cell extract

lane 3 : cell extract flow through

lane 4 , 5 , 6 : recombinant hIL-13 eluted from His-binding resin

第二部份

人類間白素-13
於昆蟲細胞之表達

第一章 前言

原核生物細胞 (prokaryote) 與真核生物細胞 (eukaryote) 所表現的蛋白質，有著某種程度的不同。例如真核細胞的蛋白質多了轉譯後的修飾作用 (post-translational modification)。我們為了希望能夠得到較接近於自然狀態的 hIL-13，於是選用真核細胞表現系統——桿狀病毒 / 昆蟲細胞表現系統 (Baculovirus/insect cell expression system) 來表現 hIL-13。

桿狀病毒 (Baculovirus) 具有許多族群，幾乎在大部份的昆蟲身上都可以找到，且不會寄生於非節肢動物身上。Baculovirus 顆粒為長桿狀，其外殼直徑約為 40-50um，長為 200-400um (Haprrap et al., 1972)，且可攜帶大約 15kbp 如此大的外來 DNA (Fraser et al., 1986)。每一種桿狀病毒皆只能感染極少數相關的昆蟲細胞，且重組過的桿狀病毒對哺乳類並沒有不利的影響，因此對於實驗者也就沒有安全上的顧慮。

桿狀病毒/昆蟲細胞表達系統提供了真核系統的環境，使得蛋白質在合成時，有較合宜的折疊 (folding)，雙硫鍵的形成 (disulfate bound formation)，醣化 (glycosylation) 以及轉譯後修飾 (post-translational modification)。桿狀病毒正常於 27°C 之下增殖，而在適合的溫度之下，桿狀病毒/昆蟲細胞表達系統能夠大量表現所植入的外來基因 (Reynisdattir et ai., 1990)。此外，這個系統並不需要輔助病毒 (helper phage) 的幫助，而利用重組病毒的方式，速度較快，在感染後 4-5 天後便形成溶菌斑 (plaque)。實驗中所使用的細胞株是 *S. frugiperda* (Sf9)，

此細胞株是蠶的腸細胞，表達能力好且生長快，培養容易，可懸浮培養亦可以貼附的方式培養。病毒於此細胞內複製穩定，18-24 小時即可複製一次，因此選用此細胞株。

第二章 材料與方法

第一節 hIL-13 於昆蟲細胞的表達

(A) 桿狀病毒載體

我們所採用的載體有兩種，pVL-1393 (圖) 及 pAcG2T (圖)。pVL-1393 是以 pVL941 為基礎而設計的，主要是利用其 polyhydriin 這一個強 promoter (polh)，將其下游處切除，並將 polyhydriin promoter 的 ATG 突變成 ATt，使其下游 (downstream) 的 ATG 得以啓動。pAcG2T 則是以 pAcCL29 為基礎所設計的，可將目標蛋白質放入 *Bam*HI、*Sma*I 或 *Eco*RI 等三個不同的限制酵素位置中，以 GST 融合蛋白的形式表現，而以一強 AcNPV polyhydriin promoter 控制其表現。此 GST 融合蛋白與 reduced glutathion 有很高的親合力，可以以單一步驟純化。

(B) hIL-13 cDNA 的製備

我們所表現的 hIL-13 可分為全長 (含 Leader peptide) 及不含 Leader peptide residues。不含 leader peptide 的 hIL-13 DNA 與在 pET-30 系統所使用的相同。而全長的 hIL-13 DNA 則是利用二階段的 PCR 的方式產生。在製備全長的 hIL-13 DNA 中，我們使用了三條 primers，分別是：

BV-hIL-13-5-1

5'ACT TGC CTT GGC TTT GCC TCC CCA GGC CCT GTG CCT
CCC TCT ACA GCC CTC AGG → 57 mer

BV-hIL-13-5-2

5' TGC GGA TCC ATG GCG CTT TTG TTG ACC ACG GTC
ATT GCT CTC ACT TGC CTT GGC GGC TTT GCC → 63 mer

BV-hIL-13

5'GGC GAA TTC TCA GTT GAA CCG TCC CTC GCG AAA
→ 33 mer

我們以 hIL-13 DNA (encoding residues 21-131)為模板，而 PCR
的條件如下：

1st PCR

Template	0.01ug
5' primer BV-hIL-13-5-1	20pmole
3' primer BV-hIL-13-3	20pmole
dNTP	0.2mM
Mg ²⁺	2mM
pfu buffer(10X)	5ul

pfu	1unit
加 dd H ₂ O 至 50ul ,	
95 °C 5min	1cycle
95 °C 1min ,60 °C 2min, 72 °C 2min	38cycle
72 °C 10 min	1cycle
soak at 4 °C	

待反應完成後，以 PCR prep (Promega) 將產物回收後，
做為 2nd PCR 的模板。

2nd PCR

Template	0.01 μ g
5' primer BV-hIL-13-5-2	20pmole
3' primer BV-hIL-13-3	20pmole
dNTP	0.2mM
Mg ²⁺	2mM
pfu buffre(10X)	5 λ
pfu	1unit
加 ddH ₂ O 至 50 μ l	
95 °C 5 分鐘	1cycle
95 °C 1 分鐘,60 °C 分鐘,72 °C 2 分鐘	38cycle
72 °C 10 分鐘	1cycle
sock at 4 °C	

待反應完成後，以 PCR prep (Promega) 將產物回收後備用。

(C) pVL1393 與 pAcG2T 載體之製備

(1) 限制酵素處理 (restriction enzymes digestion)

將全長 hIL-13 DNA ， hIL-13 DNA (encoding residues 21-131) ， pVL1393 及 pAcG2T 均以 *Bam*HI 及 *Eco*RI 限制酵素於 37 °C 之下作用 2 個小時之後回收，以備進行接和作用。

(2) 接和作用 (ligation)

分別將 (1) 處理過的 pVL1393 與全長的 hIL-13 cDNA 進行接和作用，以及將 pAcG2T 與 hIL-13 cDNA (encoding residues 21-131) 進行接和作用。接和作用的條件如下：

(i) pVL1393 transfer vector 與全長 hIL-13 cDNA

◆ vector	50ng
◆ insert DNA	200ng
◆ DTT(100mM)	1 μ l
◆ T4 DNA ligase buffer(10 \times)	2 μ l
◆ T4 DNA ligase	1 μ l

加 ddH₂O 至 20 μ l

置於 16 °C 作用隔夜，以備轉型用。

(ii) pAcG2T transfer vector 與 hIL-13 cDNA (encoding residues 21-131)

◆ vector	100ng
◆ insert DNA	200ng
◆ DTT(100mM)	1 μ l
◆ T4 DNA ligase buffer(10 \times)	2 μ l
◆ T4 DNA ligase	1 μ l

加 ddH₂O 至 20 μ l

置於 16 °C 作用隔夜，以備轉型用。

(3) 轉型 (transformation)

將 *E.coli* HB101，依第一部份的方法，作成 competent cells，且分別將 (i) (ii) 的產物轉型到 HB101 中。

(4) 篩選 (screening)

將轉型成功的 HB101 (分別含有 pVL1393 及 pAcG2T) , 分別純化其 pVL1393 質體及 pAcG2T 質體, 並以 *Bam*HI , *Eco*RI 限制酵素於 37 °C 之下作用 2 個小時之後, 以 1% 洋菜膠電泳分析之, 找出含有全長 hIL-13 cDNA 的 pVL1393 質體, 以及含有 hIL-13 cDNA (encoding residues 21-131) 的 pAcG2T 質體。將這二個質體分別純化以備日後感染昆蟲細胞用。

(D) 培養 SF9 (*Spodoptera frugiperda*) 昆蟲細胞 :

a. 培養液 (culture medium) : TNM-FH

昆蟲細胞培養液有許多種類, 最常使用的基質分別為 Grace's medium (Grace, 1962) , IPL-41 (Weiss et al, 1981, Weiss and Vaughn, 1986) 及 TC-100 (Garduner and Stockdale, 1975)。目前使用最廣泛的是 TNM-FH medium (Hink, 1970) , 其成分以 Grace's basal medium 為主, 再加上二種補充物 (supplement) , lactalbumin hydrolysate 及 yeasolate 。

我們採用 Grace's Insect Cell Culture Medium powder/1 pack (GIBCO BRL 11300-043)。首先把 0.35g 的 sodium bicarbonate (NaHCO₃) , 加入 950 ml 的純水中, 放於滅菌爐之中加以滅菌, 加入 Grace's Medium powder , 3g TC yeasolate (GIBCOBRL 18190-017) 及 3g lactalbumin hydrolysate

(GIBCOBRL 11800-026) ，於室溫下攪拌 2 小時，使各成分均以溶解後，再以 10N NaOH 調整 pH 值至 6.2 ，在置入無菌操作箱中，以丟棄式的 0.22 μ m minipore 過濾至無菌的玻璃瓶中，再加入 50ml 胎牛血清。此時，把配好的 medium 置於 27 $^{\circ}$ C 中培養 3-5 天，確定 medium 沒有被污染之後，可置於 4 $^{\circ}$ C 之下保存，3 個之內均可使用。

b. 解凍細胞 (Thawing) 、繼代培養 (Passage) 、冷凍細胞 (Freezing) ：

本實驗所採用的 SF9 細胞，是蠶的腸細胞，而這類細胞培養時亦會有接觸抑制 (contact inhibition) ，所以只有在適合的情況之下，細胞才可呈現均勻圓球狀。

在解凍細胞時，先準備好 37 $^{\circ}$ C 的水浴後，將由液態氮中取出的細胞置於 37 $^{\circ}$ C 水浴中迅速的攪拌 30-60 秒使細胞解凍，再以 70% 的酒精將瓶子外消毒後，置入無菌操作箱內，把細胞放入 T-25 培養瓶中。此時加入 5ml TNM-FH medium ，於 27 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘，待細胞附著於培養盒 (attach) 後，再更換 5ml 新鮮的 TNM-FH medium 。於 27 $^{\circ}$ C 之下培養 3-4 天之後，再繼代培養 (passage) 即可。每個 T-25 培養瓶中約含 30 萬個細胞。Sf9 細胞的分裂速度大約 12 個小時一次，所以大約 3-4 天之後即會在培養瓶之中形成單層的細胞 (monolayer) ，此時可利用滅

過菌的橡皮刮棒 (rubber policeman)，以單一方向將細胞刮下。利用 trypan blue 與細胞懸浮液以 1:9 的比例混和，將細胞染色，再利用血球計算盤 (counting chamber) 計算存活的細胞。T25 培養瓶內放入 3×10^5 cells，並加培養液至 5ml; 而 T75 培養瓶則放入 9×10^5 cells，並加培養液至 15ml，3-4 天之後可再度繼代培養。

冷凍細胞時，先將細胞培養至增殖期 (log phase)，刮下細胞後，計算存活的細胞數，再以 800rpm 之下離心。以 TNM-FH 含有 5-8% 的胎牛血清 (可提高血清的濃度至 10%) 將細胞稀釋成每 ml 含 100-200 萬個細胞，加入 1/10 的 DMSO (dimethyl sulfoxide) 混和均勻之後，分裝至 1.8ml 冷凍保存管中 (Cryotube corning)。此時，先將細胞置於冷凍保存盒中 (Cryobox, Nalgene)，因為此保存和中含有 isopropanol，所以將此保存和置於 -70°C 冰箱內時，其會以每分鐘 1°C 的速度降溫，第二天之後，在放置於 -196°C 液態氮中做長期保存。

c. 共同感染 (Co-transfection)

我們所使用的是 Liposome-mediated Transfection 的方法。主要所使用的成分為 Lipofectin (DOTMa 和 phospholipid dioleoyl phosphatidylethanolamine 1:1 混和)，他是一種脂質的合成物—N- [1- (2,3-dioleoyloxy) propyl] -N,N,N,N-tetraethylammonium chloride (DOPA)，可形成帶正電的脂質小體 (positive charged

liposome)，可與 DNA 或 RNA 形成分子內鍵結 (Felgner et al.,1987)。

在進行感染之前，首先要準備好健康的細胞。要改成以不含胎牛血清的培養液來培養 (因為血清會影響 co-transfection)，並將細胞刮下以計算細胞數目。取 10^6 個細胞於 60mm 的培養盤 (petri dish) 中，靜置 30-60 分鐘。另外，再準備二個培養盤，一盤標示為 negative 控制組，並加入 3ml TNM-FH 培養液;另一盤標示為 positive 控制組，且加入 3ml 的培養液及 $50 \mu\text{l}$ 高力價 wild type AcNPV (BaculoGold™ 21103E)。此時把 $40 \mu\text{l}$ lipofectin (GIBCOBRL 18292-011) 稀釋在 1ml 不含胎牛血清的培養液中，另外，把桿狀病毒的線型 DNA (BaculoGold™ 21100D) $0.5 \mu\text{g}$ 和接有全長 hIL-13 cDNA 的 pVL1393 質體 $2 \mu\text{g}$ 混和，置於室溫下 5 分鐘後，再將其滴在培養盤的細胞中，置於 27°C 下培養 4 個小時後，再以不含胎牛血清的培養液置換二次之後，再以含有胎牛血清的培養液於 27°C 之下培養 4-5 天，並注意細胞型態的改變。培養之後，取培養過細胞的培養液，以 3000rpm 離心 5 分鐘後，取上清液保存於 4°C 之中。

d. 病毒顆粒的大量增殖 (Amplification)

取健康的細胞 7×10^6 個置於 14.5 cm 的培養盤中，待細胞附著之後，更換新的培養液，並加入初次感染之後回收的培養液 1ml，置於 27°C 下培養 3-5 天。重複這個步驟幾次直到病毒的力

價數變高。當細胞的 CPE (Cytopathic effect) 顯得很明顯時，即可將病毒回收 (harvest)。以 pipetting 的方式，將細胞沖下，置於 50ml 的離心管中，以 2500rpm 離心 10-15 分鐘。因為病毒會由細胞中釋放出來，所以收取培養液既是病毒的懸浮液。

e. 終點稀釋 (End point dilution)

此實驗的目的是為偵測病毒的價數。取 2×10^4 個細胞至 12 個 wells 的培養盤的每一個槽中，待細胞附著之後，以 2ml 新鮮含胎牛血清的培養液置換，再分別加入 100 μ l, 10 μ l, 1 μ l, 0 μ l 的病毒懸浮液，於 27°C 下培養 72 個小時，並觀察細胞是否有明顯受感染的情形。

若在僅加入 1 μ l 病毒懸浮液的槽中既有明顯 CPE 的出現，則表示病毒的力價很高；若僅在加入 100 μ l 病毒懸浮液的槽中才有 CPE 的出現，則表示病毒的力價很低。

f. 時間行程 (Time course)

取 10^6 個 Sf9 細胞至 35mm 的培養盤中，靜置 30 分鐘，待其附著後，以 2ml 新鮮、含胎牛血清的培養液置換，並加入適量的病毒懸浮液，培養於 27°C 之下，並於 12 小時之後、24 小時之後、36 小時之後及 72 小時之後，分別收集細胞，收集得的

細胞先以 PBS (pH6.2) 洗二次，再以 SDS-PAGE 分析以及以 rabbit anti-hIL-13 polyclonal antibody 做西方墨點法分析之。

第二節 流式細胞計數儀分析 (Flow cytometry analysis)

1. 分離人類單核球 (isolation of human monocyte)

以真空採血的方式抽取志願者的靜脈血，加入抗凝血劑 (Heparin) 後，已無菌的 PBS 稀釋成 3 倍。將此稀釋過的靜脈血，緩慢的加入已含有 Ficoll-Hypaque 的離心管中，小心不要使得血液與 Ficoll-Hypaque 混和。稀釋的靜脈血與 Ficoll-Hypaque 的比例為 2:1。此時靜脈血應於 Ficoll-Hypaque 的上層，將此離心管以 400g 在室溫下離心 30 分鐘。之後，以吸管取出血清與 Ficoll-Hypaque 之間的 mononuclear cells。加入無菌的 PBS，再於室溫下以 200g 離心 10 分鐘，重複此步驟二次，將 Ficoll-Hypaque 洗去。洗完後，再以 RPMI 1640 (含 10% AB⁺ serum, 2mM glutamin, 50 μ g/ml Streptomycin, 100U/ml penicillin) 將細胞在懸浮成 2×10^7 cells/ml 後，置於 petri dish 內，於 5%CO₂ 培養箱內以 37°C 培養隔夜，使 monocyte 黏附於 petri dish 上。之後，吸去培養液，並且以 RPMI 1640 將沒有黏附於 petri dish 將沒有吸附於 petri dish 上的細胞洗去，以冰的 PBS 在冰上培養 15 分鐘後，以 pipetting 的方式，將黏附於 petri dish 上的 monocyte 洗下

並收集起來。以 RPMI 1640 將細胞稀釋成 2×10^6 cells/ml 之後，培養於 37°C ，5% CO_2 培養箱中備用。

(2) 免疫螢光染色 (Immunofluorescence staining)

將純化好的 monocytes，以 2×10^6 cells/ml 的濃度培養於 RPMI 1640 中，再加入各種不同濃度的 hIL-13 於培養液中，分別培養 24，48 及 72 個小時。培養完後，以 pipetting 的方式將細胞沖下，再以 1500rpm 離心，吸去上清液後，將細胞以 2×10^6 cells/ml 懸浮於 staining buffer (RPMI 1640 contains 10% AB⁺ serum, 0.01% sodium azide) 中。取 200 μ l 的細胞，加入 10 μ l 的抗體 (labeled PE or FITC)，以錫箔紙包裹著之後，置於 4°C 下作用 40 分鐘。作用完之後，以 $200 \times g$ 在室溫下離心 10 分鐘，再以 PBS 將細胞懸浮，重覆此步驟二次，以洗去剩餘沒有作用完的 antibodies。最後，將細胞懸浮 1ml 的 PBS 中，以 FACScan 分析之。

第三節 MTT assay

本實驗是利用前面介紹過的 TF-1 細胞，將其與 IL-13 共同培養時，IL-13 可促進其分裂。利用這個性質，測定我們所純化的 hIL-13 的生物活性。

步驟：

1. 先將 TF-1 細胞以無菌的 PBS 洗二次，將原來存於培養液中的 GM-CSF 洗去以免干擾實驗。
2. 以 1000rpm 的轉速將細胞離心 10 分鐘，到去上清液，再以不含細胞激素的培養液（cytokine free medium），將細胞稀釋成 2×10^5 cells/ml。
3. 把稀釋好了的細胞，取 100 μ l 至 96 wells 的細胞培養盤中備用。
4. 將 rhIL-13 以不同濃度，稀釋於 100 μ l 培養液中，在將此含有 hIL-13 的培養液，分別加至先前準備的 96 wells 細胞培養盤的細胞中。
5. 培養於 37°C，48 個小時。
6. 加入 40 μ l/well MTT Working solution [3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide] 至每一個 well 中。
7. 培養於 37°C，2-4 個小時。此時若有存活的細胞時，則會出現紫色結晶。
8. 小心的將培養液吸去 200 μ l，但不要吸到結晶物。再加入 100 μ l 的 DMSO，並輕輕的搖動至結晶物溶解。
9. 以 ELISA reader 讀取 O.D. (540nm-650nm)。

注意事項：

1. MTT 對細胞是有毒性的，操作時要小心。
2. MTT 形成的紫色結晶物在 DMSO 中並不穩定，大約只能維持 40 分鐘到 1 小時，所以加入 DMSO 之後，要盡快測定吸光度。

結果

第一節 hIL-13 基因之製備

本實驗是要將 hIL-13 以及另一包括前導序列 (leader peptide) 的全長 hIL-13 , 分別以 pAcG2T 以及 pVL1393 這兩個桿狀病毒 (baculovirus) 運送載體 (transfer vector) , 送至昆蟲細胞中表達。hIL-13 DNA 與在 pET-30a 表達系統所使用的相同, 全長 hIL-13 DNA 則是以 PCR 的方式得到。PCR 分兩段進行, 以自 pGEX-2T 載體中切下的 hIL-13 DNA 為模版 (template) , 先進行第一次 PCR , 再以第一次 PCR 的產物作為第二次 PCR 時的模版進行第二次 PCR , 而得到全長 hIL-13 DNA (圖 14.) 。

第二節 構築 IL-13 基因至桿狀病毒載體

先將 hIL-13 DNA 與 pAcG2T 運送載體進行接合, 而全長 hIL-13 DNA 則與 pVL1393 運送載體進行接合, 兩者皆是利用 *Bam*HI 與 *Eco*RI 這兩個限制酵素位置。接合完成的載體分別轉型至 HB101 這個 *E. coli* 突變體中放大, 並且以 *Bam*HI 與 *Eco*RI 這兩個限制酵素處理以確定接合成功 (圖 15.) (圖 16.) 。

第三節 感染昆蟲細胞

此時把接合成功的 pAcG2T 與 pVL1393，分別感染 SF-9 昆蟲細胞。感染的方式是藉由桿狀病毒 DNA 以及 lipofectin 的幫助，共同感染（co-transfection）至昆蟲細胞。

第四節 hIL-13 融合蛋白質的純化

將以桿狀病毒與 pAcG2T 載體感染的 SF-9 昆蟲細胞，再感染三天之後，離心收集之，再以溶解緩衝液（lysis buffer）將細胞溶解，取上清液，並且以 Glutathione agarose beads 將 hIL-13 蛋白質純化。純化得到的蛋白質以 SDS-PAGE（圖 17.）以及西方墨點分析（圖 18.）的結果得知，此蛋白質為 hIL-13。

第五節 以人類單核球對 hIL-13 進行活性分析

將以抗凝血劑（Heparin）處理過的血液，以 Ficoll-Hypaque 做密度梯度（density gradient）離心，取出 mononuclear cells 後，培養於 petri dish 中，再收集吸附於 petri dish 上的單核球。分離得到的單核球先與 hIL-13 共同培養 24-72 小時，再以 anti-CD14，anti-CD11b 以及 anti-CD11a 作用後，以 FACScan 分析。在個實驗中，我們將純化的人類單核球分別培養於含 10ng/ml，100ng/ml，1 μ g/ml 的 hIL-13（from Baculovirus/insect cells system and pET system）的培養液中，分別培養 24，48，72 個小時之後，再以 FACScan 分析，但結果並不如預期，CD11b

以及 CD14 的表現並沒有顯著變化。1993 年 McKenzie 等人的研究發現，若將單核球培養於含有 IL-13 的培養液中，其型態會變成較長，而成為梭形，但在本實驗中亦沒有明顯觀察到。

第六節 以 MTT assay 測定 hIL-13 的生物活性

在 MTT assay 中，我們 TF-1 細胞分別培養於含有 2000ng/ml，200ng/ml，20ng/ml，2ng/ml，0.2ng/ml，0.02ng/ml，以及 0.002ng/ml 的 hIL-13 (from Baculovirus/insect cells system and pET system) 培養液中，經過 48 小時的培養後，加入 MTT 作用 2 小時，吸去 200 μ l 培養液，再加入 DMSO 之後以 ELISA reader 測定吸光度。結果顯示，包括 positive control 在內，並無顯著變化 (表 1.)。

表 1.

hIL-13	standard	pET	pET	pET	B.V.	B.V.	B.V.	free	blank
2000ng/ml		0.059	0.060	0.017	0.080	0.061	0.056	0.060	#0.005
200ng/ml	0.098	0.055	0.052	0.035	0.052	0.045	0.047	0.038	#0.002
20ng/ml	0.079	0.057	0.050	0.053	0.044	0.056	0.047	0.040	#0.002
2ng/ml	0.045	0.049	0.043	0.067	0.037	0.058	0.041	0.044	
0.2ng/ml	0.059	0.055	0.032	0.050	0.049	0.024	0.035	0.061	
0.02ng/ml	0.033	0.037	0.031	0.019	0.047	0.035	0.041	0.062	
0.002ng/ml	0.034	0.063	0.048	0.042	0.068	0.057	0.089	0.103	



pVL1392/1393 Baculovirus Transfer Vector Set

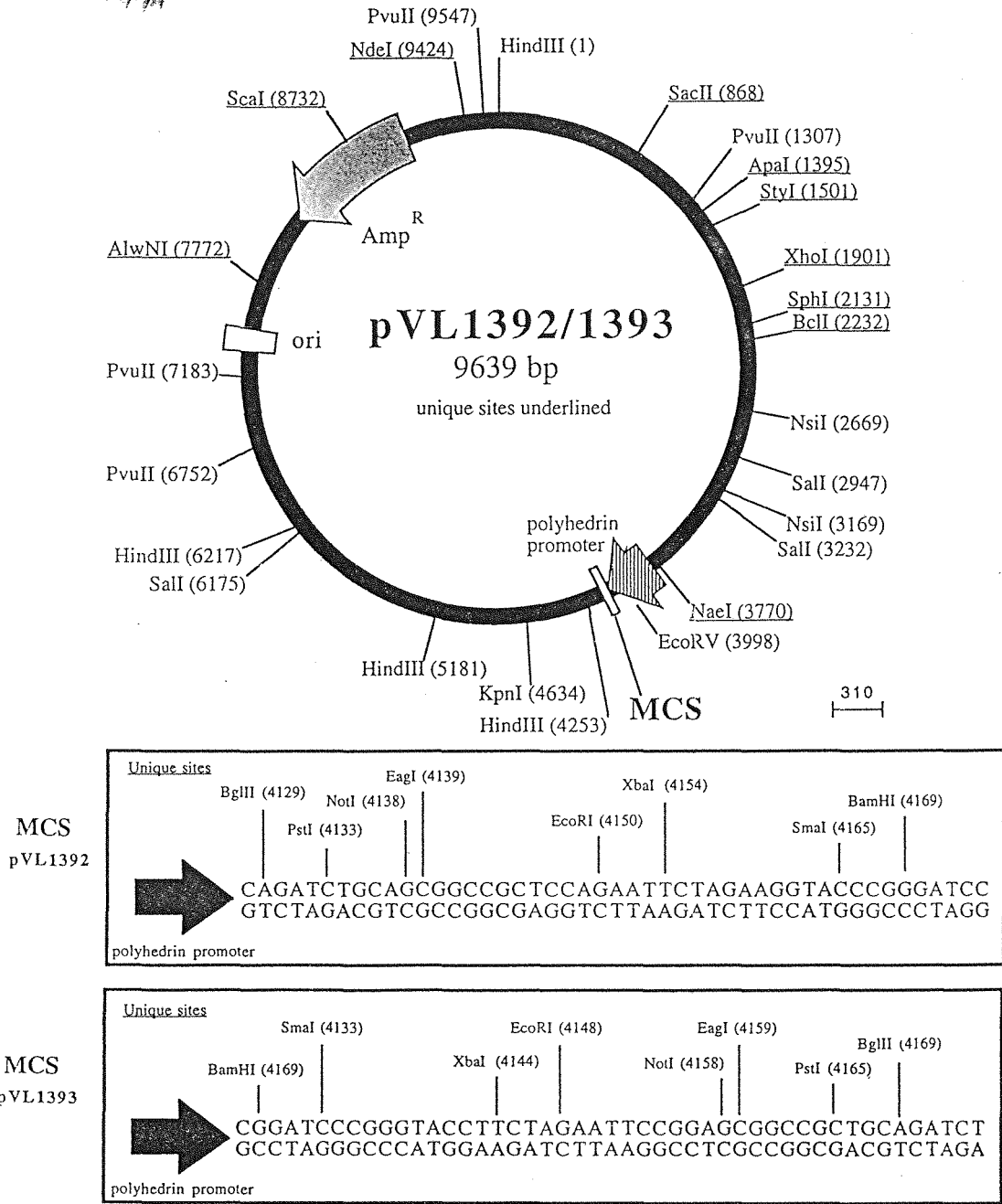


圖 12. pVL1393 載體介紹圖

Revision 09/94

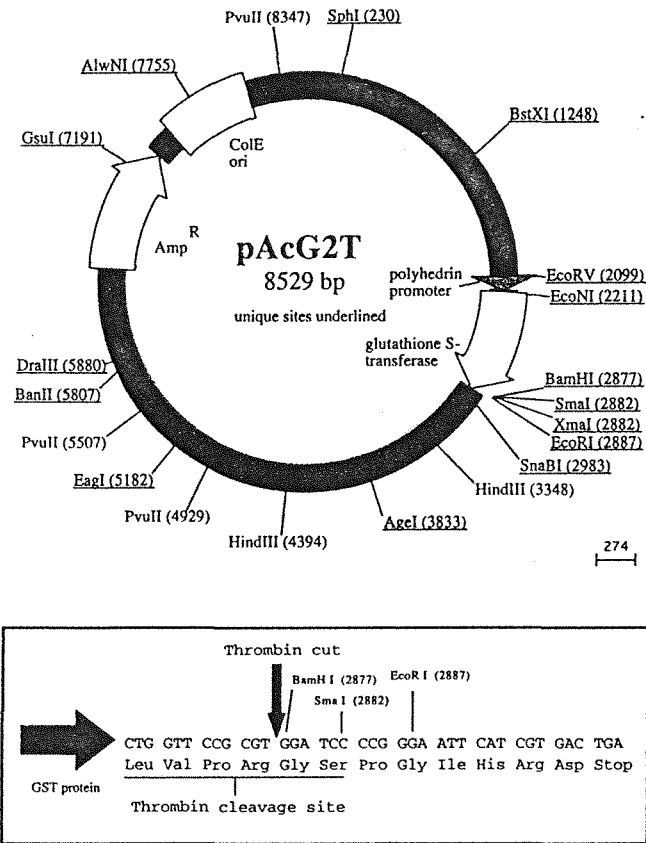


圖 13. pAcG2T 質體介紹圖

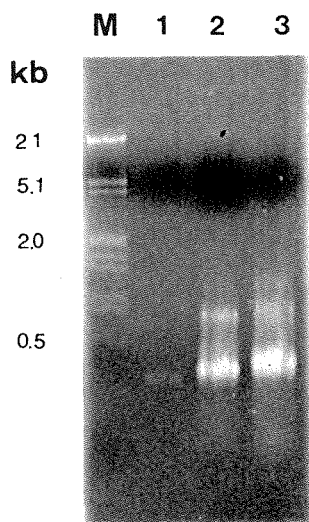


圖 14. 1% Agarose electrophoresis of PCR products.

M: marker

lane 1: hIL-13 DNA fragment encoding residues 21-131

lane 2: 1st PCR product

lane 3: 2nd PCR product.

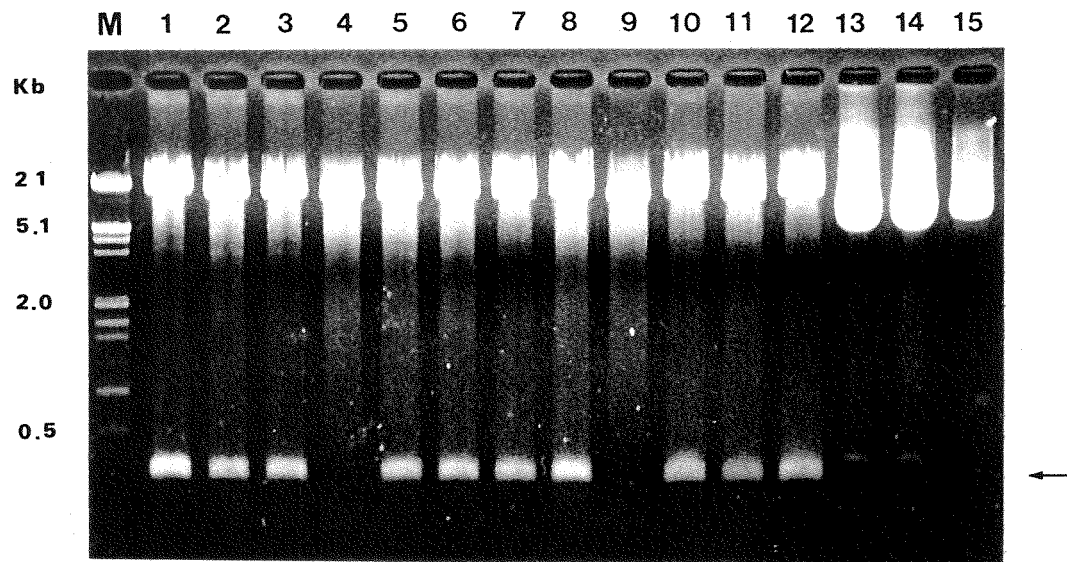


圖 15. 1% Agarose electrophoresis of pAcG2T plasmid purified from transformed JM109.

lane 1 - 12 : pAcG2T plasmid digested with *Bam*HI and *Eco*RI lane 13-15 : pAcG2T plasmid

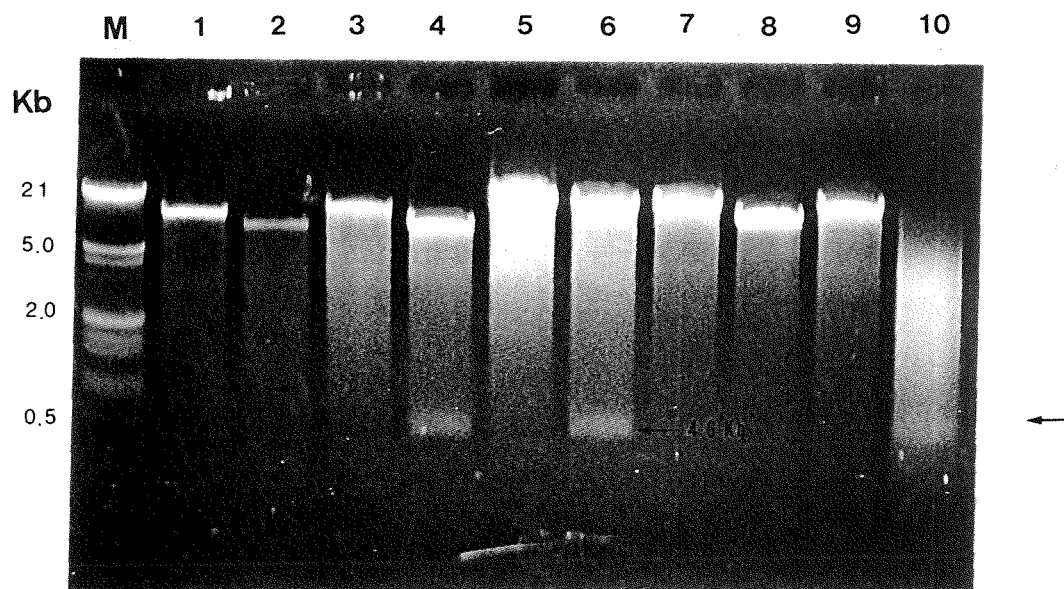


圖 16. 1% Agarose electrophoresis of pVL1393 plasmid purified from transformed JM109 and digested with *Bam*HI and *Eco*RI.

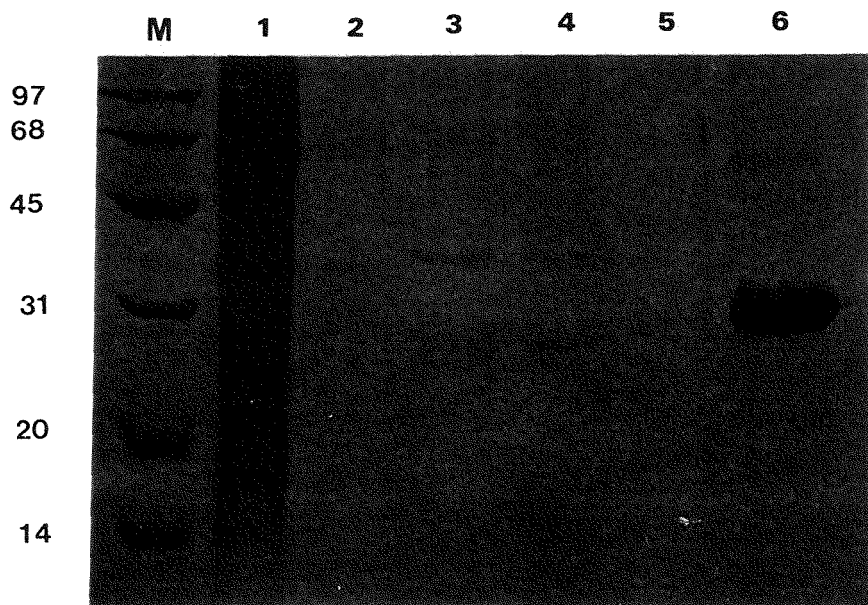


圖 17. 15% SDS-PAGE analysis.

M : low range protein marker

lane 1 : cell total lysate

lanes 2 , 3 , 4 : recombinant hIL-13

lane 5 : recombinant hIL-13 from pET system

lane 6 : GST

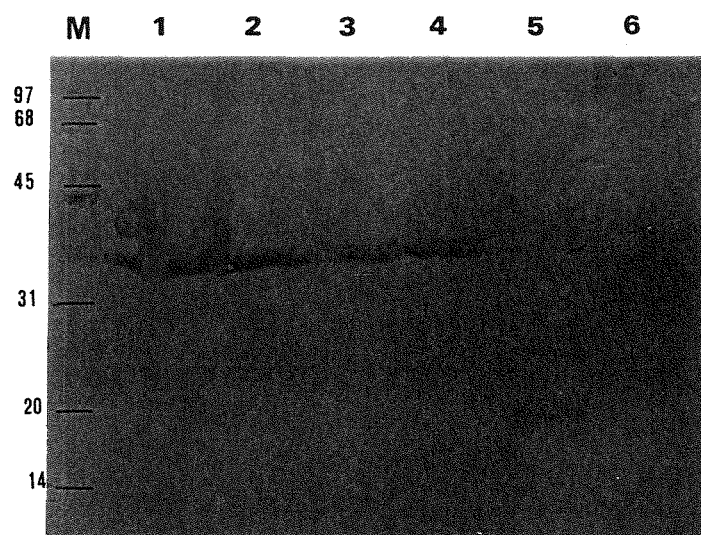


圖 18. Western blotting analysis by anti-hIL-13 polyclonal Ab.

M : low range protein marker

lanes1 : cell total lysate

lane 2 , 3 , 4 : recombinant hIL-13

lane 5 : recombinant hIL-13 from pET system

lane 6 : GST

第四章 討論

我們以 pGEX-2T 這一個表現載體在 *E. coli* 中表現 hIL-13 時，可以看到以 IPTG 刺激之後，*E. coli* total lysate 之中，在約 38kDa 處蛋白質量增加了許多。以西方墨點法，用兔子抗 hIL-13 抗體偵測時發現，除了 38kDa 處的蛋白質有反應之外，在 28kDa 處的蛋白質也可被兔子抗 hIL-13 抗體所認識。由此，我們推測這個蛋白質可能為 GST-hIL-13 融合蛋白質被降解（degradation）的結果。然而，我們進一步純化這個融合蛋白質時卻發現，所純化得到的蛋白質幾乎均為 28kDa 分子量的被降解過後的蛋白質。由於這個蛋白質仍然可以被兔子抗 hIL-13 抗體所認識，因此推測這個降解之後的蛋白質可能仍然帶有一小斷的 hIL-13。過去的研究人員在對 hIL-13 進行研究時，hIL-13 的來源大部份是以 pGEX 這個載體在 *E. coli* 中表現，且在這樣的系統之中，hIL-13 多呈現呈不溶的狀態，純化的過程並不是十分順利。為了能夠以較容易的方式得到多量，而且穩定的 hIL-13 來源以供研究，我們選擇了 pET 這個載體來表現 hIL-13。

以 pET-30a 表現載體表達 hIL-13 時，表現出來的蛋白質也是一個融合蛋白質，與一段分子量約 6kDa，含有六個 Histiding 的 polypeptide 融合在一起，由於這一段 polypeptide 的分子量只有 6kDa，並不像 GST 的 28kDa 這麼大，我們期望在不需將它切除的情形之下，仍能保有 hIL-13 的生物活性。在最初純化這蛋白質時，我們十分順利的將這個蛋白質純化得到，並且發現其

以一可溶性的方式表現，在 500ml 的 *E. coli* 培養液中，可以純化到大約 1mg 的融合蛋白質。但因為在純化之後，蛋白質溶液之中含有高量的鹽類（imidazol），由於高濃度的鹽類可能會影響其活性以及往後對生物活性測試，所以以 PBS 透析將高濃度鹽類去除。但在透析的過程中，大部份的蛋白質卻因為鹽類的降低而沈澱，因而降低了蛋白質得到的量。另外，在後來幾次純化的過程中，得到的蛋白質的量較最初減少了很多，並且發現大多以不溶的形式表現，這與最初我們所看到的結果不太相同。由於最初蛋白質是以可溶性的形式表現，因此我們認為這個問題可以以調整 *E. coli* 培養的條件來改進。例如：降低培養的溫度，降低 IPTG 刺激的量，使蛋白質產生的速率減緩，而有更充分的折疊，提昇蛋白質的溶解率，而更利於方便純化以及提昇產量。

在考慮 hIL-13 為一真核生物所產生的蛋白質，我們也利用桿狀病毒/昆蟲細胞此真核表達系統來表現 hIL-13。在這個系統之中，我們設計了二個不同形式的表現方式來表現 hIL-13。其一為全長的 hIL-13（包含 21 個氨基酸的前導序列），我們將其表現在 pVL1393 載體中，並非以融合蛋白質的形式表現，因為 hIL-13 為一分泌型蛋白質，期望藉由含有前導序列的情況之下，可以將 hIL-13 分泌至細胞外，而在細胞培養液中可以有 hIL-13 的存在。但不幸的，目前為止，不論在細胞培養液中或是 SF-9 細胞之中，均尚未偵測到有 hIL-13 的表現。

另一方面，我們也將一不含前導序列的 hIL-13 DNA 構築於 pAcG2T 載體中，而使 hIL-13 與 GST 形成一融合蛋白質，以利於日後純化。在這個系統中，當 SF-9 細胞在以病毒感染的 3-4 天之後，有許多的細胞就有浮起死亡的現象。檢視細胞培養液以及細胞內的蛋白質發現，在細胞之中可以偵測到 hIL-13 的存在，其分子量大約為 38kDa 左右的一個融合蛋白質。並且可以進一步將這個融合蛋白質純化。由於以 pAcG2T 這個載體表現 hIL-13 的成功，而且實驗室利用 pVL1393 表現家塵（house dust mite）過敏原 *Der p I*，*Der p II* 以及 *Der p V* 均有很好的成果，所以相信 hIL-13 亦能成功的以 pAcG2T 載體以非融合蛋白質的形式，表現全長的 hIL-13。

在 1993 年，由 Rene de Waal Malefyt 等人的研究中發現，IL-13 可以提昇 CD11b 以及降低 CD14 在單核球表面的表現。最初由於我們實驗室中沒有 TF-1 細胞株可供測定 hIL-13 的生物活性，於是利用此性質對純化得到的 hIL-13 做初步的活性測試。後來由於中央研究院生物醫學研究所嚴仲陽老師熱心提供 TF-1 細胞株，我們也利用了 TF-1 細胞株對 hIL-13 做了活性測試。

在利用人類單核球的實驗中，由於其細胞表面分子：CD11b 以及 CD14 並沒有我們所預期的變化，而且型態變化也不明顯。而在 TF-1 細胞株的 MTT assay 中，可能由於在實驗的過程中操作的疏忽，導致沒有預期的結果，針對這一點，仍須進一步的實驗證明。

我們懷疑由於自桿狀病毒/昆蟲細胞中表現的 GST-hIL-13 這個融合蛋白質，可能因為 GST 這段蛋白質的緣故，影響了 hIL-13 的作用，使得在對人類單核球的實驗中，沒有看到預期的結果。另外，再由 pET-30 載體於 *E. coli* 中表現的 hIL-13 蛋白質，純化的過程中，可能有部分的蛋白質其活性被破壞了，而導致必須加入高濃度的 hIL-13，細胞才有反應，而在人類單核球的實驗中，可能加入的細胞激素當中，具有活性的比例並不多，因此單核球並沒受到影響。再者，這個蛋白質也是一個融合蛋白質，雖然與 hIL-13 融合的蛋白質分子量只有大約 6kDa，但是也有可能干擾 hIL-13 的蛋白質結構，而影響其生物功能。因此要解決這些問題可能要將這個融合蛋白質的前段以 entokinase 這個酵素切除，並且以透析甚至通膠體過濾（gel filtration）的方式，除去可能干擾實驗的鹽類之後，應會有好的結果。

参考文献

1. Andersson,-J.; Abrams,-J.; Bjoerk,-L.; Funa,-K.; Litton,-M.; Aagren,-K.; Andersson,-U.. Concomitant in vivo production of 19 different cytokines in human tonsils. IMMUNOLOGY 1994 vol. 83, no. 1, pp. 16-24.
2. Angel,-J.B.; Saget,-B.M.; Wang,-Monica-Z.; Wang,-Alicia; Dinarello,-C.A.; Skolnik,-P.R. Interleukin-10 enhances human immunodeficiency virus type 1 expression in a chronically infected promonocytic cell line (U1) by a tumor necrosis factor alpha -independent mechanism. J.-INTERFERON-CYTOKINE-RES. 1995 vol. 15, no. 6, pp. 575-584
3. Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., DaviSmith, T. and Maliszewski, C.R. 1992. Nature 357, 80-82.
4. Aversa,-G.; Punnonen,-J.; Cocks,-B.G.; de-Waal-Malefyt,-R.; Vega,-F.,Jr.; Zurawski,-S.M.; Zurawski,-G.; de-Vries,-J.E..* An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: Support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. J.-EXP.-MED. 1993 vol. 178, no. 6, pp. 2213-2218.
5. Bazil, V., and J.L. Strominger. 1991. Shedding as a mechanism of down-regulation of CD14 on stimulated human monocytes. J. Immunol. 147, 1567.
6. Beckmann, M.P., Cosman, D. Fanslow, W., Maliszewski, C.R. and Lyman, S.D. 1992. Chem. Immunol. 51, 107-134.
7. Boulay,-J.-L.; Paul,-W.E.. Hematopoietin sub-family classification based on size, gene organization and sequence homology. CURR.-BIOL. 1993 vol. 3, no. 9, pp. 573-581.
8. Bochner,-B.S.; Klunk,-D.A.; Sterbinsky,-S.A.; Coffman,-R.L.; Schleimer,-R.P. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. J.-IMMUNOL. 1995 vol. 154, no. 2, pp. 799-803
9. Brinkmann,-V.; Kristofic,-C. TCR-stimulated naive human CD4 super(+)_{45R0}

- super(-) T cells develop into effector cells that secrete IL-13, IL-5, and IFN-gamma, but no IL-4, and help efficient IgE production by B cells. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 154, no. 7, pp. 3078-3087
10. Brown, K.D., Zurkawski, S.M., Mosmann, T.R. and Zurawski, G. 1989. *J. Immunol.* 142, 679-687.
 11. C. Labit-Le Bouteiller, R. Astruc, A. Minty, P. Ferrar and J.H. Lupker. 1995. *Journal of Immunological Methods.* 181, 29-36.
 12. Burd,-P.R.; Thompson,-W.C.; Max,-E.E.; Mills,-F.C. Activated mast cells produce interleukin 13. *J.-EXP.-MED.* 1995 vol. 181, no. 4, pp. 1373-1380
 13. Burton,-J.D.; Bamford,-R.N.; Peters,-C.; Grant,-A.J.; Kurys,-G.; Goldman,-C.K.; Brennan,-J.; Roessler,-E.; Waldmann,-T.A.. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *PROC.-NATL.-ACAD.-SCI.-USA* 1994 vol. 91, no. 11, pp. 4935-4939.
 14. Cash,-E.; Minty,-A.; Ferrara,-P.; Caput,-D.; Fradelizi,-D.; Rott,-O.. Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J.-IMMUNOL.* 1994 vol. 153, no. 9, pp. 4258-4267.
 15. Cheever,-A.W.; Williams,-M.E.; Wynn,-T.A.; Finkelman,-F.D.; Seder,-R.A.; Cox,-T.M.; Hieny,-S.; Caspar,-P.; Sher,-A.. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J.-IMMUNOL.* 1994 vol. 153, no. 2, pp. 753-759.
 16. Cherwinski, H.M., Schumacher, J.H., Brown, K.D. and Mosmann, T.R, 1987, *J. Exp. Med.* 166, 1229-1244.
 17. Chomarat,-P.; Rissoan,-M.C.; Pin,-J.J.; Banchereau,-J.; Miossec,-P. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 7, pp. 3645-3652
 18. Cocks,-B.G.; De-Waal-Malefyt,-R.; Galizzi,-J.-P.; De-Vries,-J.E.*; Aversa,-G.. IL-

- 13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. *INT.-IMMUNOL.* 1993 vol. 5, no. 6, pp. 657-663.
19. Cosentino,-G.; Soprana,-E.; Thienes,-C.P.; Siccardi,-A.G.; Viale,-G.; Vercelli,-D. IL-13 down-regulates CD14 expression and TNF- alpha secretion in normal human monocytes. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 6, pp. 3145-3151
20. D'-Andrea,-A.; Ma,-Xiaojing; Aste-Amezaga,-M.; Paganin,-C.; Trinchieri,-G.*Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: Priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J.-EXP.-MED.* 1995 vol. 181, no. 2, pp. 537-546
21. Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F. and Banchereau, J. 1992. *J. Exp. Med.* 175, 671-682.
22. de-Vries,-J.E.; Punnonen,-J.; Cocks,-B.G.; Aversa,-G.. The role of T/B cell interactions and cytokines in the regulation of human IgE synthesis. *SEMIN.-IMMUNOL.* 1993 vol. 5, no. 6, pp. 431-439.
23. Del-Prete,-G.. Th1 and Th2 cells in atopy. *EOS,-J.-IMMUNOL.-IMMUNOPHARMACOL.* 1994 vol. 14, no. 1, pp. 15-19.
24. Denis,-M.; Ghadirian,-E.. Interleukin 13 and interleukin 4 protect bronchoalveolar macrophages from productive infection with human immunodeficiency virus type 1. *AIDS-RES.-HUM.-RETROVIRUSES* 1994 vol. 10, no. 7, pp. 795-802.
25. Defrance,-T.; Carayon,-P.; Billian,-G.; Guillemot,-J.-C.; Minty,-A.; Caput,-D.; Ferrara,-P.. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J.-EXP.-MED.* 1994 vol. 179, no. 1, pp. 135-143.
26. de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. Figdor, and J.E. de Vries. 1991. IL-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes:an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1209.
27. De-Waal-Malefyt,-R.; Figdor,-C.G.; Huijbens,-R.; Mohan-Peterson,-S.; Bennett,-B.; Culpepper,-J.; Dang,-W.; Zurawski,-G.; De-Vries,-J.E.. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes.

- Comparison with IL-4 and modulation by IFN- gamma or IL-10. J.-IMMUNOL. 1993 vol. 151, no. 11, pp. 6370-6381
28. De-Vries,-J.E.; Zurawski,-G. Immunoregulatory properties of IL-13: Its potential role in atopic disease. INT.-ARCH.-ALLERGY-IMMUNOL. 1995 vol. 106, no. 3, pp. 175-179
29. Doherty,-T.M. and Coffman, R.L 1993, J. Immuno. 150,5476-5483.
30. Doherty,-T.M.; Kastelein,-R.; Menon,-S.; Andrade,-S.; Coffman,-R.L.. Modulation of murine macrophage function by IL-13. J.-IMMUNOL. 1993 vol. 151, no. 12, pp. 7151-7160.
31. Doyle,-A.G.; Herbein,-G.; Montaner,-L.J.; Minty,-A.J.; Caput,-D.; Ferrara,-P.; Gordon,-S.*. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- gamma. EUR.-J.-IMMUNOL. 1994 vol. 24, no. 6, pp. 1441-1445.
32. Ferrick,-D.A.; Schrenzel,-M.D.; Mulvania,-T.; Hsieh,-B.; Ferlin,-W.G.; Lepper,-H.. Differential production of interferon- gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. NATURE 1995 vol. 373, no. 6511, pp. 255-257.
33. Fluckiger,-A.-C.; Briere,-F.; Zurawski,-G.; Bridon,-J.-M.; Banchereau,-J.. IL-13 has only a subset of IL-4-like activities on B chronic lymphocytic leukaemia cells. IMMUNOLOGY 1994 vol. 83, no. 3, pp. 397-403.
34. Finkelman,-F.D. Relationships among antigen presentation, cytokines, immune deviation, and autoimmune disease. J.-EXP.-MED. 1995 vol. 182, no. 2, pp. 279-282
35. Gauchat,-J.-F., Lebman, D., Coffman, R.L., Gasca., H. and de Vries, J.F. 1990, J. Exp. Med. 172, 463-473.
36. Gauchat,-J.-F.; Henchoz,-S.; Mazzei,-G.; Aubry,-J.-P.; Brunner,-T.; Blasey,-H.; Life,-P.; Talabot,-D.; Bonnefoy,-J.Y.; et-al.. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. NATURE 1993 vol. 365, no. 6444, pp. 340-342.

37. Garraud,-O.; Nkenfou,-C.; Bradley,-J.E.; Perler,-F.B.; Nutman,-T.B. Identification of recombinant filarial proteins capable of inducing polyclonal and antigen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 3, pp. 1316-1325
38. Germann, T., Mattern, F.,Partenheinmer, A. et al. 1992, *Int. Immunol.* 4, 755-764.
39. Grouard,-G.; De-Bouteiller,-O.; Banchereau,-J.; Liu,-Yong-Jun. Human follicular dendritic cells enhance cytokine-dependent growth and differentiation of CD40-activated B cells. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 7, pp. 3345-3352
40. Haraguchi,-S.; Good,-R.A.; James-Yarish,-M.; Cianciolo,-G.J.; Day,-N.K.*Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *PROC.-NATL.-ACAD.-SCI.-USA* 1995 vol. 92, no. 8, pp. 3611-3615
41. Hart,-P.H.; Ahern,-M.J.; Smith,-M.D.; Finlay-Jones,-J.J.. Regulatory effects of IL-13 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. *CLIN.-EXP.-IMMUNOL.* 1995 vol. 99, no. 3, pp. 331-337.
42. He,-You-Wen; Malek,-T.R.*The IL-2 receptor gamma sub(c) chain does not function as a subunit shared by the IL-4 and IL-13 receptors. Implication for the structure of the IL-4 receptor. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 1, pp. 9-12
43. Hsies, C-S., Macatonia, S.E, Tripp, C.A., Wolf, S.F, O'Garra, A. and Murphy, K.M, 1993, *Science* 260, 547-549.
44. Huang,-Shau-Ku; Xiao,-Hui-Qing; Kleine-Tebbe,-J.; Paciotti,-G.; Marsh,-D.G.; Lichtenstein,-L.M.; Liu,-M.C. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 155, no. 5, pp. 2688-2694
45. Jacobsen,-S.E.W.; Okkenhaug,-C.; Veiby,-O.P.; Caput,-D.; Ferrara,-P.; Minty,-A.. Interleukin 13: Novel role in direct regulation of proliferation and differentiation of primitive hematopoietic progenitor cells. *J.-EXP.-MED.* 1994 vol. 180, no. 1, pp. 75-82.
46. Jinqun,-Tan; Deleuran,-B.; Gesser,-B.; Maare,-H.; Deleuran,-M.; Larsen,-C.G.; Thestrup-Pedersen,-K.*Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by

- T cell-derived cytokines IL-2, IFN- gamma , IL-4, IL-10, and IL-13. J.-IMMUNOL. 1995 vol. 154, no. 8, pp. 3742-3752
47. Kapp,-A. Atopic dermatitis - The skin manifestation of atopy. CLIN.-EXP.-ALLERGY 1995 vol. 25, no. 3, pp. 210-219
 48. Keegan,-A.D.; Johnston,-J.A.; Tortolani,-P.J.; McReynolds,-L.J.; Kinzer,-C.; O'Shea,-J.J.; Paul,-W.E. Similarities and differences in signal transduction by interleukin 4 and interleukin 13: Analysis of Janus kinase activation. PROC.-NATL.-ACAD.-SCI.-USA 1995 vol. 92, no. 17, pp. 7681-7685
 49. Keizer, G.D., A.A. Te Velde, R. SchWarting, C.G. Figdor, and J.E. de Vries. 1987. Role of p150,95 in adhesion, migration, chemotaxis and phagocytosis of human monocytes. Eur. J. Immunol. 17, 1317.
 50. Kindler,-V.; Matthes,-T.; Jeannin,-P.; Zubler,-R.H. Interleukin-2 secretion by human B lymphocytes occurs as a late event and requires additional stimulation after CD40 cross-linking. EUR.-J.-IMMUNOL. 1995 vol. 25, no. 5, pp. 1239-1243
 51. Kimata,-H.; Fujimoto,-M.; Furusho,-K. Involvement of interleukin (IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. EUR.-J.-IMMUNOL. 1995 vol. 25, no. 6, pp. 1497-1501
 52. Kimata,-H. GM1, a ganglioside that specifically enhances immunoglobulin production and proliferation in human plasma cells. EUR.-J.-IMMUNOL. 1994 vol. 24, no. 11, pp. 2910-2913.
 53. Kimata,-H.; Fujimoto,-M. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce immunoglobulin (Ig)E and IgG4 production by human B cells. J.-EXP.-MED. 1994 vol. 180, no. 2, pp. 727-731
 54. Kimata,-H. Differential effects of gangliosides on human IgE and IgG4 production. EUR.-J.-IMMUNOL. 1995 vol. 25, no. 1, pp. 302-305
 55. Kimata,-H.; Lindley,-I.; Furusho,-K. Effect of hydrocortisone on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. J.-IMMUNOL. 1995 vol. 154, no. 7, pp. 3557-3566

56. Koehler,-I.; Alliger,-P.; Minty,-A.; Caput,-D.; Ferrara,-P.; Hoell-Neugebauer,-B.; Rank,-G.; Rieber,-E.P.*Human interleukin-13 activates the interleukin-4-dependent transcription factor NF-IL4 sharing a DNA binding motif with an interferon-gamma -induced nuclear binding factor. FEBS-LETT. 1994 vol. 345, no. 2-3, pp. 187-192.
57. Komai-Koma,-M.; Liew,-Foo-Y.; Wilkinson,-P.C. Interactions between IL-4, anti-CD40, and anti-immunoglobulin as activators of locomotion of human B cells. J.-IMMUNOL. 1995 vol. 155, no. 3, pp. 1110-1116
58. Kricek,-F.; Ruf,-C.; Zunic,-M.; De-Jong,-G.; Dukor,-P.; Bahr,-G.M.Induction in mice of serum IgE levels after treatment with anti-mouse IgD antibodies is preceded by differential modulation of tissue cytokine gene transcription. EUR.-J.-IMMUNOL. 1995 vol. 25, no. 4, pp. 936-941
59. Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W. 1991, Science 254, 707-710.
60. Kruse, N., Tony, H.P. and Sebald, W. 1992. EMBO J. 11, 3237-3244.
61. Labit-Le-Bouteiller,-C.; Astruc,-R.; Minty,-A.; Ferrara,-P.; Lupker,-J.H.Isolation of an IL-13-dependent subclone of the B9 cell line useful for the estimation of human IL-13 bioactivity. J.-IMMUNOL.-METHODS 1995 vol. 181, no. 1, pp. 29-36
62. Lebel-Binay,-S.; Laguerre,-B.; Quintin-Colonna,-F.; Conjeaud,-H.; Magazin,-M.; Miloux,-B.; Pecceu,-F.; Caput,-D.; Ferrara,-P.; Fradelizi,-D.Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. EUR.-J.-IMMUNOL. 1995 vol. 25, pp. 2340-2348
63. Lebel-Binay,-S.; Lagaudriere,-C.; Fradelizi,-D.; Conjeaud,-H.*CD82, tetra-span-transmembrane protein, is a regulated transducing molecule on U937 monocytic cell line. J.-LEUKOCYTE-BIOL. 1995 vol. 57, no. 6, pp. 956-963
64. Life,-P.; Gauchat,-J.-F.; Schnuriger,-V.; Estoppey,-S.; Mazzei,-G.; Durandy,-A.; Fischer,-A.; Bonnefoy,-J.-Y.. T cell clones from an X-linked hyper-immunoglobulin (IgM) patient induce IgE synthesis in vitro despite expression of nonfunctional CD40 ligand. J.-EXP.-MED. 1994 vol. 180, no. 5, pp. 1775-1784.

65. Lin,-Jian-Xin; Migone,-Thi-Sau; Tsang,-M.; Friedmann,-M.; Weatherbee,-J.A.; Zhou,-Li; Yamauchi,-A.; Bloom,-E.T.; Mietz,-J.; John,-S.; Leonard,-W.J.*The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. IMMUNITY 1995 vol. 2, no. 4, pp. 331-339.
66. Locksley,-R.M.. Th2 cells: Help for helminths. J.-EXP.-MED. 1994 vol. 179, no. 5, pp. 1405-1407.
67. Lynn, W.A., and D.T. Golenbock. 1992. Lipopolysaccharide antagonists. Immunol. Today 13, 271.
68. Matthews, D.J., Clark, P.A., Herbert, J. et al. 1995. Blood 85, 38-42.
69. McGowan,-I.; Radford-Smith,-G.; Jewell,-D.P.. Cytokine gene expression in HIV-infected intestinal mucosa. AIDS 1994 vol. 8, no. 11, pp. 1569-1575.
70. McKenzie, A.N.J., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R. et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 3735-3739.
71. McKenzie, A.N.J., Li, X. Largaespada, D.A. et al.1993, I. Immunol. 150, 5436-5444.
72. Mikovits,-J.A.; Meyers,-A.M.; Ortaldo,-J.R.; Minty,-A.; Caput,-D.; Ferrara,-P.; Ruscetti,-F.W.* IL-4 and IL-13 have overlapping but distinct effects on HIV production in monocytes. J.-LEUKOCYTE-BIOL. 1994 vol. 56, no. 3, pp. 340-346.
73. Minty,-A.; Chalon,-P.; Derocq,-J.-M.; Dumont,-X.; Guillemot,-J.-C.; Kaghad,-M.; Labit,-C.; Leplatois,-P.; Caput,-D.; et-al.. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. NATURE. 1993. vol. 362, no. 6417, pp. 248-250.
74. Morgan, J.G., Dolganov, G.M., Robbin, S.E, Histon, L.M. and Lovett, M. 1992, Nucleic Acids Res. 20, 5172-5179.
75. Mosmann, T.R., and coffman, R.L 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173.
76. Montaner, L.J., A.G. Doyle, M. Collin, G. Herbein. P. Illei, W. James, A. Minty, D.

- Caput, P. Ferrara, and S. Gordon. 1993. Interleukin 13 inhibits immunodeficiency virus type I production in primary blood-derived human macrophages in vitro. *J. Exp. Med.* 178:743.
77. Nilsson,-G.; Nilsson,-K.Effects of interleukin (IL)-13 on immediate-early response gene expression, phenotype and differentiation of human mast cells. Comparison with IL-4. *EUR.-J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 25, no. 3, pp. 870-873
78. Obiri,-N.I.; Debinski,-W.; Leonard,-W.J.; Puri,-R.K..*Receptor for interleukin 13: Interaction with interleukin 4 by a mechanism that does not involve the common gamma chain shared by receptors for interleukins 2, 4, 7, 9, and 15. *J.-BIOL.-CHEM.* 1995 vol. 270, no. 15, pp. 8797-8804.
79. Oppenheim,-J.J.; Neta,-R.Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. *FASEB-J.* 1994 vol. 8, no. 2, pp. 158-162
80. Ortaldo,-J.R.; Mason,-A.T.; O'-Shea,-J.J.Receptor-induced death in human natural killer cells: Involvement of CD16. *J.-EXP.-MED.* 1995 vol. 181, no. 1, pp. 339-344
81. Paliard, X., de Waal Malefyt, R., de Vries, J.E. and Spits, H. 1988, *Nature* 335, 642-644.
82. Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J.-Y., Spits, H., Yokota, T., Aria, K.-I., Bancherrou, J. and de Vries, J.E. 1988. Ige regulation by normal human lymphocyte is induced by interleukin 4 and suppressed by IFN- γ and α and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6880-6884.
83. Pomerantz, R.J., M.B. Feinberg, D. Trono, and D. Baltimore. 1990. Lipopolysaccharide is a potent monocyte/macrophage-specific stimulator of human immunodeficiency virus type 1 expression. *J. Exp. Med.* 172, 253.
84. Punnonen,-J.; Aversa,-G.; Cocks,-B.G.; McKenzie,-A.N.J.; Menon,-S.; Zurawski,-G.; De-Wall-Malefyt,-R.; De-Vries,-J.E.. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *PROC.-NATL.-ACAD.-SCI.-USA.* 1993. vol. 90, no. 8, pp. 3730-3734.
85. Punnonen,-J.; de-Vries,-J.E.* IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J.-IMMUNOL.* 1994 vol. 152, no.

- 3, pp. 1094-1102.
86. Ricci,-M.. IL-4: A key cytokine in atopy. CLIN.-EXP.-ALLERGY 1994 vol. 24, no. 9, pp. 801-812.
87. Riemann,-D.; Kehlen,-A.; Langner,-J. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. CLIN.-EXP.-IMMUNOL. 1995 vol. 100, no. 2, pp. 277-283
88. Ryan,-J.J.; Kinzer,-C.A.; Paul,-W.E. Mast cells lacking the high affinity immunoglobulin E receptor are deficient in Fc epsilon RI gamma messenger RNA. J.-EXP.-MED. 1995 vol. 182, no. 2, pp. 567-574
89. Sanpper, C.M. and Paul, W.E. 1987. Science 236, 944-947.
90. Saoudi,-A.; Simmonds,-S.; Huitinga,-I.; Mason,-D. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis in rats by targeting autoantigen to B cells: Evidence that the protective mechanism depends on changes in the cytokine response and migratory properties of the autoantigen-specific T cells J.-EXP.-MED. 1995 vol. 182, no. 2, pp. 335-344
91. Sher, A., Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P. et al. 1992, Immunol. Rev. 127, 183-204.
92. Spits, H., Yssel, H., Takebe, Y. et al. 1987. J. Immunol. 139, 1142-1147.
93. Stumbles,-P.; Mason,-D. Activation of CD4 super(+) T cells in the presence of a nondepleting monoclonal antibody to CD4 induces a Th2-type response in vitro. J.-EXP.-MED. 1995 vol. 182, no. 1, pp. 5-13
94. te Velde, A.A., R. de Waal Malefyt, R.J.F. Huijbens, J.E. de Vries, and C.G. Figdor. 1992. IL-10 stimulates monocyte Fc γ R surface expression and cytotoxic activity; distinct regulation of ADCC by IFN- γ IL-4 and IL-10. J. Immunol. 149, 4048.
95. Tripathi, A.K., Taplits, M., Puri, J. and Hoffman, T. 1991. J. Immunol. 146, 1309-1315.

96. Van-Oosterhout,-A.J.M.; Savelkoul,-H.F.J. Interleukin 5 as a drug target in allergy and asthma. The role of interleukin 5 in the perpetuation of airway inflammatory responses. *TRENDS-PHARMACOL.-SCI.* 1995 vol. 16, no. 2, p. 37
97. Wynn,-T.A.; Eltoun,-I.; Oswald,-I.P.; Cheever,-A.W.; Sher,-A.. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J.-EXP.-MED.* 1994 vol. 179, no. 5, pp. 1551-1561.
98. Wynn,-T.A.; Jankovic,-D.; Hieny,-S.; Cheever,-A.W.; Sher,-A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. *J.-IMMUNOL.* 1995 vol. 154, no. 9, pp. 4701-4709
99. Wynn,-T.A.; Oswald,-I.P.; Eltoun,-I.A.; Caspar,-P.; Lowenstein,-C.J.; Lewis,-F.A.; James,-S.L.; Sher,-A. Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *J.-IMMUNOL.* 1994 vol. 153, no. 11, pp. 5200-5209
100. Yano,-S.; Sone,-S.*; Nishioka,-Y.; Mukaida,-N.; Matsushima,-K.; Ogura,-T. Differential effects of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) on tumoricidal and chemotactic properties of human monocytes induced by monocyte chemotactic and activating factor. *J.-LEUKOCYTE-BIOL.* 1995 vol. 57, no. 2, pp. 303-309
101. Young, H.A. and Ortaldo, J.R. 1987. *J. Immunol.* 139, 724-729.
102. Yssel, H., de Waal Malefyt, R., Roncarolo, M.G. et al. 1992. *J. Immunol.* 149, 2378-2384.
103. Zhang,-Ming; Lin,-Yuanguang; Iyer,-D.V.; Gong,-Jianhua; Abrams,-J.S.; Barnes,-P.F. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *INFECT.-IMMUN.* 1995 vol. 63, no. 8, pp. 3231-3234
104. Zurawski,-S.M.; Vega,-F., Jr.; Huyghe,-B.; Zurawski,-G.. Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that

functions in signal transduction. EMBO-J. 1993 vol. 12, no. 7, pp. 2663-2670.

105. Zurawski, S.M., Vega F., Jr, Huyghe, B. and Zurawski, G. 1993. EMBO J. 12, 3899-3905.