

ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИИ НОВОГО СС-ХЕМОКИНА, СВЯЗАННОГО С ВРОЖДЕННЫМ ИММУНИТЕТОМ КОБИИ (*Rachycentron canadum*)

© 2013 г. Y. Su¹, J. Feng^{1*}, X. Sun², Z. Guo³, L. Xu¹, J. Jiang¹

¹Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong, China, 510300

²Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510222

³Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong, China, 510300

Поступила в редакцию 29.11.2012 г.

Принята в печать 09.01.2013 г.

Хемокины – это небольшие секретируемые белки, относящиеся к цитокинам. Отличительная особенность хемокинов – их способность вызывать миграцию и активацию популяции лейкоцитов как в патологических, так и в физиологических условиях. На основе ранее сконструированных маркерных экспрессируемых последовательностей (EST) библиотеки кДНК пронефроса и селезенки морской рыбы отряда окунеобразных *Rachycentron canadum* (кобии) с помощью метода двунаправленной быстрой амплификации концов кДНК (RACE) нами была получена полноразмерная кДНК гена нового хемокина подсемейства СС (названного *RcCC3*). Предполагаемый продукт этого гена, белок *RcCC3*, по своей аминокислотной последовательности сходен с хемокинами *CCL19/21/25*, также относящимися к хемокинам подсемейства СС. Мы изучили конститутивную экспрессию транскриптов гена *RcCC3* в 12 тканях кобии без стресса; для этого использовали методы обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР в реальном времени). Транскрипты гена *RcCC3* обнаружены во всех исследованных тканях. Самый высокий уровень экспрессии наблюдался в жабрах и печени, немного меньше в пронефросе, почках, селезенке, коже, кишечнике, мышцах, желудке, сердце, крови и мозге. Также изучена экспрессия *RcCC3* в органах, ответственных за иммунный ответ – в пронефросе, селезенке и печени, после внутрибрюшинной инъекции фосфатно-солевого буфера (в качестве контроля), полирибоинозиновой-полирибоцитидиловой кислоты (поли(I:C)) или убитой формалином бактерии *Vibrio carchariae* (бактериальной вакцины). Инъекции поли(I:C) и бактериальной вакцины вызывали быстрое накопление транскрипта, наблюдаемое в ранних временных точках, хотя профили экспрессии оказались различными для разных органов и разных воздействий. Полученные данные говорят о том, что *RcCC3* может быть важным компонентом врожденного иммунитета кобии.

Ключевые слова: хемокины СС, клонирование, экспрессия генов, кобия, врожденный иммунитет.

CHARACTERIZATION AND TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF A NEW CC CHEMOKINE ASSOCIATED WITH INNATE IMMUNE RESPONSE IN COBIA (*Rachycentron canadum*), by Y. Su¹, J. Feng^{1*}, X. Sun², Z. Guo³, L. Xu¹, J. Jiang¹ (¹Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong, China 510300, *e-mail: juanfeng@scsfri.ac.cn; ²Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou, Guangdong, China, 510222; ³Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong, China, 510300). Chemokines are small, secreted cytokine peptides, known principally for their ability to induce migration and activation of leukocyte populations under both pathological and physiological conditions. On the basis of previously constructed express sequence tags (ESTs) of the head kidney and spleen cDNA library of the perciform marine fish *Rachycentron canadum* (common name cobia). We used bi-directional rapid amplification of cDNA ends (RACE) and obtained a full-length cDNA of a new CC chemokine gene (designated *RcCC3*). The *RcCC3* putative peptide exhibits sequence similarity to the group of *CCL19/21/25* CC chemokines. The reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used in transcript expression studies of *RcCC3*. We examined the constitutive expression of the transcripts in 12 tissues of non-stressed cobia; *RcCC3* transcripts were de-

* Эл. почта: juanfeng@scsfri.ac.cn

tected in all tissues examined, with the highest expression in gill and liver, following by head kidney, kidney, spleen, skin, intestine, muscle, stomach, heart, blood and brain. Transcript expression of *RcCC3* was examined in immune-related organs, including head kidney, spleen and liver, following intraperitoneal injection of phosphate-buffered saline control, polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) and formalin-killed *Vibrio carchariae* (bacterial vaccine). The transcripts in these tissues were quickly up-regulated by the injection of poly(I:C) and bacterial vaccine at early time points, although with different expression profiles. These results indicate *RcCC3* represents an important component of innate immunity in cobia.

Keywords: CC chemokine, cloning, gene expression, cobia, innate immunity.

DOI: 10.7868/S0026898413030178

Хемокины, суперсемейство небольших секретируемых белков, включающее большое число лигандов, играют ключевую роль в системе врожденного иммунитета, защищая организм от инфекций [1]. Хемокины имеют характерную мономерную структуру, ядро которой состоит из трех β -цепей и C-концевой α -спирали [2], и зачастую осуществляют свои разнообразные биологические функции через активацию 7-го трансмембранного домена G-белок связанных рецепторов на поверхности своих клеток-мишеней [3]. Среди хемокинов млекопитающих можно выделить четыре подсемейства в зависимости от положения двух первых остатков цистеина: они могут идти подряд (подсемейство CC), разделяться одним (СХС) или тремя аминокислотными остатками (СХЗС), либо же второй цистеин первой пары может вообще отсутствовать (С) [4]. Среди этих подсемейств самым крупным считается подсемейство CC. Хемокины этого подсемейства играют ключевые роли в механизмах защитных реакций хозяина, регулируя перемещение различных типов лейкоцитов в физиологических условиях и в случае патологий [5–7]. CC-хемокины млекопитающих хорошо изучены; у человека идентифицировано 24 гена этого подсемейства [6, 8].

Рыбы эволюционно представляют собой самый ранний класс позвоночных, у которых имеются активные составляющие как врожденного, так и приобретенного иммунитета. За последние несколько лет, благодаря достижениям в изучении геномов, у рыб идентифицированы многие хемокины подсемейства CC [4]. СК-1- хемокин с шестью остатками цистеина, обнаруженный у радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), был первым хемокином, найденным у костных рыб [9]. Впоследствии обнаружили и другие CC-хемокины, например, 6 ранее неизвестных CC хемокинов в геноме золотистого спара (*Sparus aurata*) [10], 18 – у радужной форели [11], 28 – у канального сомика (*Ictalurus punctatus*) [12], 30 – у семги (*Salmo salar*) [7], 32 – у атлантической трески (*Gadus morhua*) [13] и 81 – у данио-рерио (*Danio rerio*) [5]. На основании филогенетического анализа CC хемокины рыб разделены на семь больших групп: CCL19/21/25, CCL20, CCL27/28, CCL17/22, воспалительные белки макрофагов (macrophage in-

flammatory protein, MIP), белки хемотаксиса моноцитов (monocyte chemotactic protein, MCP) и белки, специфические для рыб [7]. Однако весьма сложно выявить действительных ортологов между хемокинами рыб и млекопитающих ввиду сравнительно быстрого их изменения по сравнению с другими генами иммунного ответа. Кроме того, отсутствие данных о функциях многих из них препятствует нашему пониманию роли хемокинов в иммунном ответе костных рыб [4].

Морская костная рыба отряда окунеобразных *Rachycentron canadum* (кобия) считается одной из наиболее перспективных промысловых рыб для разведения на рыбоводных заводах в Южно-Китайском море и составляет около 80% всего морского промысла на Тайване [14]. Вспышки болезней, вызванных бактериями, вирусами и паразитами, такими, как *Photobacterium damsela* подвид *Piscicida* [15], *Vibrio carcharia* [16], вирус лимфоцистоза (lymphocystis virus) [17] и *Sphaerospora myxosporidia* [18], наносят серьезный экономический ущерб рыбному промыслу. Несмотря на экономическую значимость решения этих проблем, напрямую связанных с разведением рыбы, довольно малоизвестно об иммунной системе кобии.

В наших более ранних исследованиях был обнаружен первый CC-хемокин кобии (*RcCC1*), относящийся к группе MIP [19]. Для лучшего знакомства с иммунной системой кобии мы занялись поиском других CC-хемокинов и идентифицировали в ее геноме ген другого CC-хемокина (названный *RcCC3*). Нами получена и охарактеризована полноразмерная кДНК *RcCC3*; исследован профиль экспрессии этого гена в тканях кобии, не подвергавшейся стрессу, а также в тканях, связанных с иммунным ответом, после инъекции либо полирибоинозиновой-полирибозитидиловой кислоты (поли(I:C), PIC), либо инактивированной формалином бактерии *Vibrio carchariae* (бактериальной вакцины). Полученные в данной работе результаты позволяют предположить участие этого гена во врожденном иммунитете кобии.

Таблица 1. Используемые в работе праймеры

| Наименование | Нуклеотидная последовательность (5'–3') | Метод |
|------------------|---|-------------------|
| Олиго-dG | GGGGGGGGGGGGGGGG | 5' RACE |
| Олиго-dT-адаптор | GGCCACGCGACTAGTAC(T)16 | 3' RACE |
| Адаптор | GGCCACGCGACTAGTAC | 3' RACE |
| CC3F1 | CGGCTATGTTTCGCCTGAT | 3' RACE |
| CC3F2 | AGAAGAATGGAGCAGAGG | 3'-гнездовая RACE |
| CC3R1 | TATTTGATCCAATCCCTC | 5' RACE |
| CC3R2 | TGGTGATGTGGCAGTTAT | 5'-гнездовая RACE |
| β-актин F | AGGGAAATTGTGCGTGAC | RT-qPCR |
| β-актин R | AGGCAGCTCGTAGCTCTT | RT-qPCR |
| CC3qF | GTTTCGCCTGATGAAAGCA | RT-qPCR |
| CC3qR | TATGTCTGGACCCACCC | RT-qPCR |

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор частичной последовательности СС-хемокина из библиотеки кДНК кобии. Библиотека кДНК получена ранее из смеси тканей пронефроса и селезенки кобии после вакцинации против *V. carchariae*, *Proteus vulgaris* и *Streptococcus* sp. [19]. Анализ BLAST показал, что маркерная экспрессируемая последовательность (EST) длиной 754 п.н. имеет сходство с другими СС-хемокинами рыб. Эта последовательность была выбрана для дальнейшей работы по клонированию гена СС-хемокина кобии.

Получение полноразмерной кДНК RcCC3. На основе выбранной EST сконструированы четыре специфических праймера (табл. 1) для клонирования полноразмерной кДНК методом быстрой амплификации концов кДНК (RACE). Для получения 3'-конца проведена полугнездовая ПЦР с прямыми праймерами CC3F1 и CC3F2 и обратным праймером-адаптером (табл. 1). Для получения 5'-концевой последовательности кДНК на ее 5'-конец добавили поли(dC)-последовательность при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы ("Takara", Япония). Амплификация осуществлена методом полугнездовой ПЦР с прямым праймером олиго(dG) и обратными праймерами CC3R1 и CC3R2 (табл. 1). Параметры ПЦР были следующими: начальный денатурирующий период 3 мин при 94°C, затем 35 циклов по 45 с при 94°C, 45 с при 60°C, 1 мин при 72°C и в конце один цикл 72°C в течение 10 мин. Продукты ПЦР очищали с использованием набора QiaexII Gel Extraction Kit ("Qiagen", Германия), затем встраивали в вектор pMD18-T ("Takara"), амплифицировали в клетках *Escherichia coli* TOP10 ("Invitrogen", США) и секвенировали ("BGI", Китай).

Получение бактериального антигена, стимуляция стресса и сбор тканей. Рыбы, использованные в настоящем исследовании, приобретены на рыб-

ной ферме Китая в провинции Хайнань (Xincun, Hainan Province). Кобии (массой тела около 120 г) были размещены в трех цистернах на 1000 л: первая цистерна содержала контрольную группу рыб, которым внутрибрюшинно вводили 0.2 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS-контрольная группа); рыбы во второй цистерне были внутрибрюшинно инъецированы 0.2 мл 10 мг/мл поли(I:C) ("Sigma", США) в PBS (группа поли(I:C)); в третьей цистерне рыбы получили внутрибрюшинную инъекцию 0.2 мл суспензии инактивированных формалином бактерий *V. carchariae* (1.0×10^8 колониеобразующих единиц/мл) в PBS (группа бактериальной вакцины). Получение бактериального антигена, содержание рыб, проведение внутрибрюшинных инъекций и сбор тканей проводили как описано ранее [19]. Через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после инъекции в каждой из групп (PBS, поли(I:C) и бактериальной вакцины) из пяти отдельных особей выделяли пронефрос, селезенку и печень. Конститутивную экспрессию исследовали в 12 тканях, включая сердце, мозг, кишечник, желудок, почки, жабры, кровь, селезенку, печень, кожу, пронефрос и мышцы, пяти не подвергнутых инъекции кобий. Все образцы тканей помещали в 1.5 мл пробирки, содержащие реагент RNeasy lysis buffer ("Qiagen", США), выдерживали при 4°C в течение ночи, а затем замораживали при -80°C. Для экспрессионного анализа ткани пяти особей объединяли в один образец.

Выделение РНК и получение кДНК. Суммарную РНК выделяли из ~50 мг различных образцов тканей с использованием реагента TRIzol® ("Invitrogen") в соответствии с протоколом. Качество полученных РНК проверяли электрофорезом в агарозном геле. Концентрацию определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ("Thermo"). Первую цепь кДНК получали из 2 мкг суммарной РНК, обработанной ДНКазой (Promega RQ1 DNase I), под действием обратной транскриптазы

M-MLV (“Promega”) при 42°C в течение 50 мин с олиго(dT)-адапторным праймером (табл. 1). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР при клонировании полноразмерной кДНК и при анализе экспрессии.

Анализ последовательностей. На основе полноразмерной последовательности кДНК *RcCC3* составляли нуклеотидную последовательность гена и логически дедуцировали аминокислотную последовательность предполагаемого белка. Эти последовательности проанализированы с помощью BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) с использованием программного обеспечения DNASTAR 5.0. Сигнальные пептиды предсказаны программой SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Множественное выравнивание выполнено с использованием программы ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Неукорененное филогенетическое дерево построено методом присоединения соседей с использованием программы MEGA 3.1. Оценку устойчивости проводили с помощью бутстреп-анализа (bootstrapping) с 1000 репликаций.

Анализ экспрессии *RcCC3* методом обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (RT-qPCR, ОТ-ПЦР в реальном времени). Для анализа конститутивной экспрессии *RcCC3* выделяли суммарную РНК из сердца, мозга, кишечника, желудка, почек, жабр, крови, селезенки, печени, кожи, пронефроса и мышц здоровых особей кобии. Также суммарную РНК выделяли из пронефроса, селезенки и печени кобий, получивших внутривенную инъекцию PBS, поли(I:C) или бактериальной вакцины, на различных временных точках. Первую цепь кДНК получали, как описано выше. Для оценки экспрессии *RcCC3* проводили RT-qPCR на приборе Mastercycler ep realplex Real-time PCR system (“Eppendorf”, Германия) с использованием набора Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit (“Invitrogen”). Специфичные праймеры СС3qF и СС3qR (табл. 1) использованы для амплификации ПЦР-продукта размером 177 п.н. В качестве референсного гена для стандартизации использован ген β -актина (GenBank ID: EU266539). Для амплификации фрагмента гена β -актина длиной 110 п.н. использованы два праймера: β -actin F и β -actin R (табл. 1). Амплификацию в реальном времени проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл 2×Supermix, 1 мкл препарата кДНК, по 1 мкл прямого и обратного праймеров и 7 мкл воды, качество которой соответствует требованиям qPCR. Условия отжига: 50°C в течение 2 мин, 95°C в течение 2 мин, затем 40 циклов по 15 с при 95°C и 30 с при 61°C. Анализ кривой плавления продуктов амплификации проводили в конце каждой ПЦР для подтверждения того, что в смеси накапливается и детектируется только один ПЦР-продукт. Каждый образец наносили

трижды; для анализа уровня экспрессии *RcCC3* применяли метод сравнения C_T . Уровни экспрессии рассчитывались методом $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [20]. Статистический анализ проводили при помощи программы SPSS (версии 17.0). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Статистическую значимость определяли с помощью одномерного дисперсионного анализа. Во всех случаях уровень значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование и анализ кДНК *RcCC3* кобии

Полноразмерная кДНК *RcCC3* (рис. 1) содержит 874 п.н., в том числе открытую рамку считывания длиной 303 п.н., предположительно кодирующую белок из 100 аминокислот. Расчетная молекулярная масса этого белка составляет 11.7 кДа, а его теоретическая изоэлектрическая точка равна 9.98. Также полноразмерная кДНК имеет 5'-нетранслируемую область (UTR) длиной 85 п.н., 3'-UTR длиной 486 п.н., предполагаемый консенсусный сигнал полиаденилирования (AATAAA), поли(A)-хвост из 17 п.н. и характерный для цитокинов АТТТА-мотив нестабильности РНК (GenBank ID: JF975592). Предсказанный сайт гидролиза сигнального пептида в возможном зрелом белке находится между остатками глицина 22 и серина 23. Зрелые белки имеют четыре консервативных остатка цистеина (С27, С28, С55 и С79), первые два из которых расположены рядом друг с другом. Описанные особенности *RcCC3* хорошо согласуются с данными, известными о хемокинах подсемейства СС.

Филогенетический анализ *RcCC3*

Для вычисленной аминокислотной последовательности изучаемого хемокина и СС-хемокинов рыб и млекопитающих построили неукорененное филогенетическое дерево методом присоединения соседей. Полученное дерево содержит четыре отдельных ветви, и белок *RcCC3* попадает в группу СС19/21/25, описанную ранее [7]. Внутри этой группы *RcCC3* наиболее близок белкам SCYA102 и SCYA103 цихлид (*Paralabidochromis chilotes*), СК9 радужной форели, ЛусСС большого желтого горбыля (*Larimichthys crocea*) и SCYA речной камбалы (*Platichthys flesus*) (рис. 2).

Анализ аминокислотной последовательности

Выравнивание аминокислотной последовательности белка *RcCC3* кобии с другими СС-хемокинами группы СС19/21/25 выявило наличие семи абсолютно консервативных аминокислотных остатков, включая четыре остатка цистеина (рис. 3). Полное выравнивание показало, что *RcCC3* имеет 10.0–57.0% и 17.0–28.0% общих аминокислотных остатков с СС-хемокинами рыб

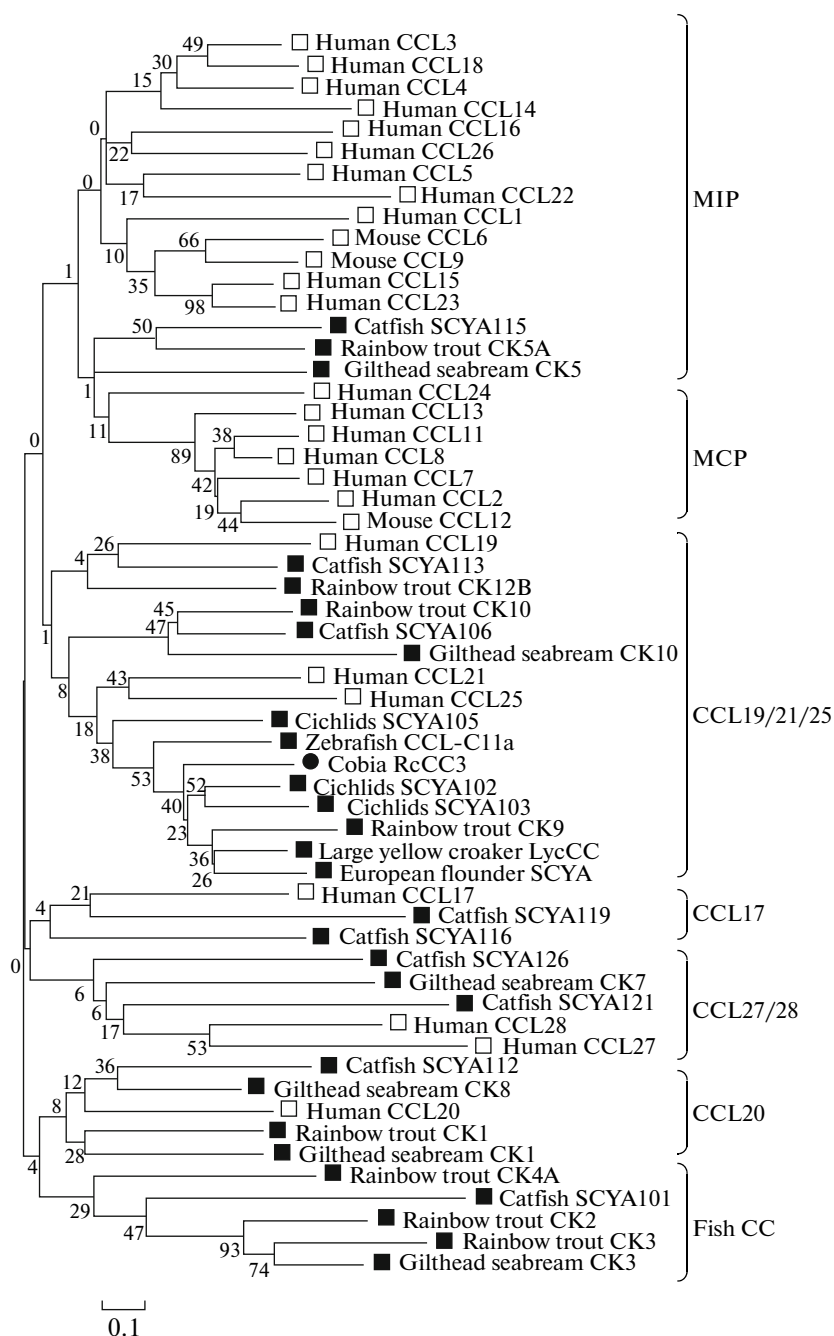


Рис. 2. Объединенное филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей СС-хемокинов млекопитающих и рыб. Белыми прямоугольниками, черными прямоугольниками и черным кружком обозначены соответственно СС-хемокины млекопитающих, рыб и кобии. Числа в узлах ветвления представляют собой доверительный уровень 1000 бутстреп-репликаций. Номера доступа в базе GenBank соответствуют приведенным в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хемокины млекопитающих широко и всесторонне изучаются в связи с их важной ролью в развитии иммунного ответа на различные события, такие как поражение патогенами, рост опухолей или сердечно-сосудистые нарушения [21–23]. Недавно появилась информация относительно хемокиновых последовательностей и регуляции

экспрессии генов хемокинов других видов, в основном представляющих интерес для разведения в аквакультуре [10, 13, 24]. Первый хемокин кобии (ген *RcCC1*) представляет пример нового типа СС-хемокинов с определенными профилями экспрессии при индуцированном воспалительном ответе [19]. В данной работе представлен другой хемокин кобии подсемейства СС (ген *RcCC3*).

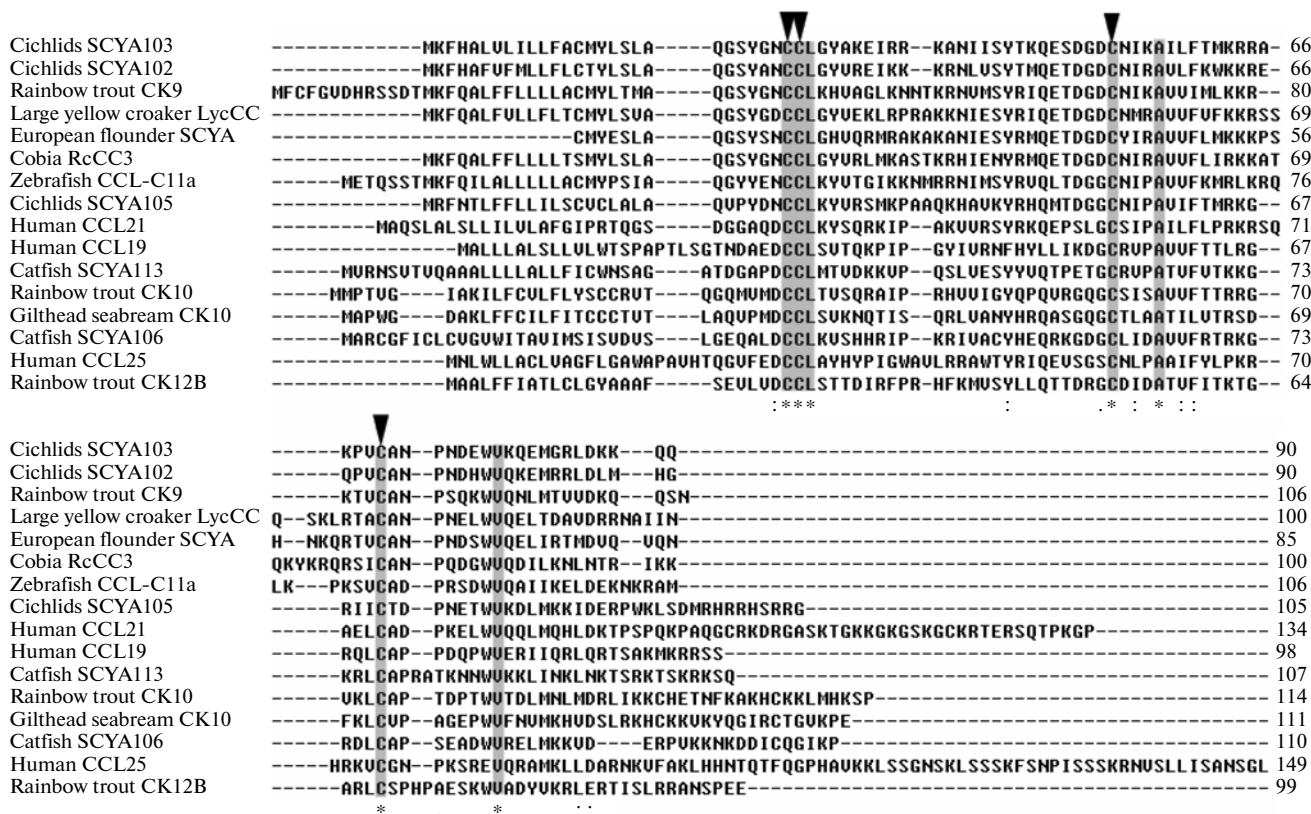


Рис. 3. Множественное выравнивание дедуктивной аминокислотной последовательности RcCC3 с последовательностями СС-хемокинов группы ССL19/21/25. Четыре консервативных остатка цистеина (С) указаны черными стрелками. Полностью консервативные для всех выравниваемых последовательностей аминокислотные остатки показаны звездочками (*) и выделены серым фоном. Одна точка и двоеточие указывают соответственно на низкий и высокий уровень идентичности. Пропуски в последовательностях даны пунктиром (-). Номера доступа в базе GenBank соответствуют приведенным в табл. 2.

Полноразмерная кДНК гена *RcCC3* кодирует предполагаемый белок длиной в 100 аминокислотных остатков, что совпадает с длиной известного хемокина *LycCC* большого желтого горбыля [25]. Следует заметить, что размер хемокинов *ССL19* человека и *СК12В* радужной форели соответствует 98 и 99 аминокислотным остаткам (рис. 3). Предполагаемый хемокин *RcCC3* имеет в своей структуре четыре консервативных остатка цистеина, включая два соседствующих цистеина, что может определять его третичную структуру и функции [26]. В 3'-UTR кДНК расположен один мотив нестабильности АТТТА, который, как известно, способствует быстрой и точной деградации мРНК, обеспечивая таким образом регуляцию экспрессии гена [9]. На основании сравнения последовательностей и филогенетического анализа сделано заключение, что *RcCC3*, по всей видимости, не является ортологом какого-либо СС-хемокина человека. Согласно описанной ранее [7] эволюции СС-хемокинов, кодируемый геном *RcCC3* белок филогенетически относится к группе *ССL19/21/25* СС хемокинов. В настоящее время вопрос наименования СС-хемокинов у живот-

ных, не относящихся к млекопитающим, остается открытым [4], поэтому хемокин, рассматриваемый в данной работе, условно назван *RcCC3*.

Полученные данные о конститутивной экспрессии *RcCC3* немного отличаются от информации, известной для других хемокинов рыб. Например, *JFCCL3*, ген СС-хемокина ложного палтуса (*Paralichthys olivaceus*), в значительной степени экспрессируется в крови [27], в то время как уровень экспрессии *RcCC3* в крови кобии практически не детектируем. Хемокин большого желтого горбыля *LycCC*, относящийся к группе *ССL19/21/25*, достаточно интенсивно экспрессируется в сердце [25]. *RcCC3*, как и гены *SCYA107* сома и *KC70* тюрбо (*Scophthalmus maximus*), усиленно экспрессируется в пронефросе, почках и селезенке [12, 24]. Как известно, рыбы используют пронефрос, почки и селезенку как первичные или вторичные лимфоидные органы [28]. Ткани этих органов представляют собой основные “резервуары” врожденного и приобретенного иммунитета рыб, в них сосредоточено максимальное количество лимфоцитов и макрофагов [29]. И это может быть одним из объяснений, почему экспрессия СС-хемокинов в

тканях этих органов высока. Экспрессия мРНК *RcCC3* также довольно интенсивно происходит в жабрах. Самый высокий уровень экспрессии мРНК *RcCC3* в жабрах не противоречит известным данным о СС-хемокинах группы CCL19/21/25 других рыб; мРНК *CsCCK1* интенсивно экспрессируется в жабрах морского языка (*Cynoglossus semilaevis*) [30]. У радужной форели высокий уровень экспрессии *CK12* наблюдается в слизистых оболочках, включая слизистые жабр, причем показано, что этот ген играет существенную роль в иммунном ответе слизистых [31]. Слизистые кожи, жабр и кишечника могут служить воротами для вторжения патогенов [32]. При этом жабры – это орган, в котором наблюдается самый высокий уровень

экспрессии мРНК *RcCC3*; и это может отражать тот факт, что в первую очередь атакуются патогеном именно жабры, так как экспонированы на поверхности тела рыбы [33]. Профиль экспрессии *RcCC3* похож на таковой для хемокинов слизистых, например *CK12* [31], т.е. интенсивно экспрессируется в жабрах, а также в коже, кишечнике и желудке. Кроме того, экспрессия *RcCC3* находится на высоком уровне в печени, но на низком в крови, что отличает его от гена *RcCC1* [19]. Полученные данные позволяют предположить, что эти два СС хемокина различаются по выполняемым ими функциям. Следует заметить, что высокий уровень мРНК *RcCC3*, обнаруженный в печени кобии, характерен для большинства

Таблица 2. Идентичность аминокислотной последовательности *RcCC3* СС-хемокина млекопитающих и рыб

| Номер в GenBank | Вид | Хемокин | Идентичность аминокислот (%) | Номер в GenBank | Вид | Хемокин | Идентичность аминокислот (%) |
|-----------------|---------|---------|------------------------------|-----------------|-------------------------------|----------|------------------------------|
| P22362 | Человек | CCL1 | 21.0 | DQ173280 | Сом | SCYA106 | 21.0 |
| P13500 | Человек | CCL2 | 22.0 | DQ173286 | Сом | SCYA112 | 23.0 |
| P10147 | Человек | CCL3 | 22.0 | DQ173287 | Сом | SCYA113 | 24.0 |
| P13236 | Человек | CCL4 | 22.0 | DQ173289 | Сом | SCYA115 | 19.0 |
| P13501 | Человек | CCL5 | 25.0 | DQ173290 | Сом | SCYA116 | 17.0 |
| P80098 | Человек | CCL7 | 25.0 | DQ173293 | Сом | SCYA119 | 10.0 |
| P80075 | Человек | CCL8 | 23.0 | DQ173295 | Сом | SCYA121 | 11.0 |
| P51671 | Человек | CCL11 | 27.0 | DQ173298 | Сом | SCYA126 | 16.0 |
| Q99616 | Человек | CCL13 | 23.0 | AAF23867 | Радужная форель | CK1 | 20.0 |
| Q16627 | Человек | CCL14 | 24.0 | AAM09300 | Радужная форель | CK2 | 16.0 |
| Q16663 | Человек | CCL15 | 24.0 | AJ315149 | Радужная форель | CK3 | 17.0 |
| O15467 | Человек | CCL16 | 23.0 | CA371157 | Радужная форель | CK4A | 22.0 |
| Q92583 | Человек | CCL17 | 20.0 | CA383670 | Радужная форель | CK5A | 22.0 |
| P55774 | Человек | CCL18 | 23.0 | CA378686 | Радужная форель | CK9 | 52.0 |
| Q99731 | Человек | CCL19 | 21.0 | CA361535 | Радужная форель | CK10 | 23.0 |
| P78556 | Человек | CCL20 | 25.0 | CA346383 | Радужная форель | CK12B | 18.0 |
| O00585 | Человек | CCL21 | 27.0 | ADE58983 | Золотистый спар (дорада) | CK1 | 25.0 |
| O00626 | Человек | CCL22 | 25.0 | ADE58986 | Золотистый спар (дорада) | CK3 | 20.0 |
| P55773 | Человек | CCL23 | 25.0 | ADE58984 | Золотистый спар (дорада) | CK5 | 18.0 |
| O00175 | Человек | CCL24 | 21.0 | ADE58987 | Золотистый спар (дорада) | CK7 | 16.0 |
| O15444 | Человек | CCL25 | 28.0 | ADE58985 | Золотистый спар (дорада) | CK8 | 27.0 |
| Q9Y258 | Человек | CCL26 | 18.0 | ADE58982 | Золотистый спар (дорада) | CK10 | 18.9 |
| Q9Y4X3 | Человек | CCL27 | 21.0 | AY178963 | Цихлиды | SCYA102 | 52.0 |
| Q9NRJ3 | Человек | CCL28 | 17.0 | AY178965 | Цихлиды | SCYA103 | 46.0 |
| P27784 | Мышь | CCL6 | 5.0 | AY178967 | Цихлиды | SCYA105 | 46.0 |
| P51670 | Мышь | CCL9 | 20.0 | EF679299 | Большой желтый горбыль | LucCC | 57.0 |
| Q62401 | Мышь | CCL12 | 22.0 | AJ605124 | Европейская речная камбала | SCYA | 49.0 |
| DQ173276 | Сом | SCYA101 | 14.0 | AB331767 | Данио-рерио (полосатый данио) | CCL-C11a | 51.0 |

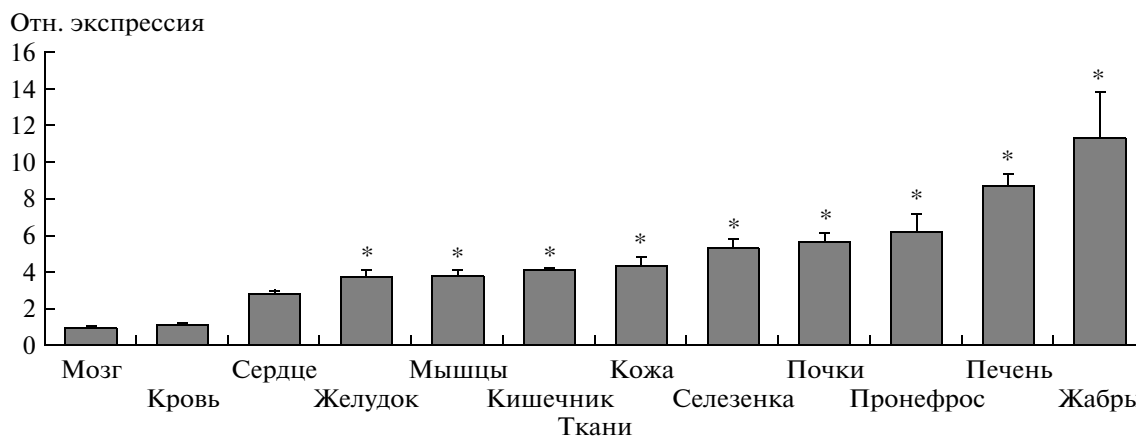


Рис. 4. Экспрессия *RcCC3* в мозге, крови, сердце, желудке, мышцах, кишечнике, коже, селезенке, почках, пронефросе, печени и жабрах кобии. Относительное содержание мРНК *RcCC3* оценивали методом количественной ПЦР (RT-qPCR). Данные приведены относительно уровня экспрессии мРНК *RcCC3* в мозге. Каждый столбец диаграммы представляет среднее значение, рассчитанное на основании трех определений, со стандартной ошибкой. Значимые различия между уровнями экспрессии *RcCC3* в мозге и тканях других органов показаны звездочками (*) для $P < 0.05$.

СС хемокинов, особенно относящихся к группе CCL19/21/25, других видов рыб, например, для хемокинов SCYA106 и SCYA113 сома [12], SK10 золотистого спара [10] и CsCCK1 морского языка [30]. Вообще, печень рыб находится в самом центре множества важнейших физиологических процессов, поддерживающих гомеостаз, включая синтез большинства белков плазмы и детоксикацию потенциально опасных ксенобиотиков [34]. В проведенных в последнее время многочисленных исследованиях показано, что многие разнообразные белки, продуцируемые печенью, в том числе и хемокины, служат защитными молекулами системы врожденного иммунитета [24, 35, 36]. Выявление конститутивной экспрессии гена *RcCC3* предполагает возможное участие кодируемого им продукта в системе врожденного иммунитета, так как *RcCC3*-транскрипты интенсивно экспрессируются как в неспецифических иммунных тканях, так и в лимфоидных иммунных органах при нормальных физиологических условиях.

Система врожденного иммунитета – это первая линия “обороны” хозяина, предназначенная для его защиты в первые несколько часов или дней после инфицирования, когда система специфического иммунного ответа еще не активирована [37]. С целью установить возможную вовлеченность гена *RcCC3* в работу врожденного иммунитета рыб мы оценили, насколько быстро изменяется его экспрессия в ответ на воздействие на иммунную систему. Выявлена временная зависимость усиления экспрессии *RcCC3* при индукции иммунного ответа нуклеиновой кислотой поли(I:C), имитирующей вирусное заражение, или инактивированной бактериальной вакциной. После этих воздействий профили экспрессии *RcCC3* в пронефросе, селезенке и печени были в общих чер-

тах схожи с таковыми для генов других хемокинов рыб. Так, у золотистого спара введение вирусных частиц повышает экспрессию большинства СС-хемокинов, подтверждая их вовлеченность в противовирусный ответ [10]. У атлантической трески введение инактивированной формалином атипичной *A. salmonicida* или poly(I:C) приводит к возрастанию экспрессии едва ли не всех известных СС-хемокинов [13]. Интересно, что в иммунных тканях экспрессия *RcCC3* индуцируется на ранних временных точках. Из этих данных можно предположить вовлеченность СС-хемокинов в систему врожденного иммунитета. У горбыля *Miichthys miiuy* экспрессия гена СС-хемокина заметно возрастала в печени через 6 ч после индукции [35]. У ложного палтуса быстрое накопление СС-хемокина обнаружили в пронефросе и селезенке уже через 2 ч после воздействия *Nocardia seriolae* [36]. Полученные профили экспрессии гена *RcCC3* кобии могут отражать важность кодируемого им продукта для быстрого иммунного ответа на вторгающиеся патогены. Заметим, что в профиле экспрессии *RcCC3* (в селезенке и в печени) есть, по меньшей мере, два пика в ответ на однократную индукцию, и это похоже на поведение генов хемокина СК6 радужной форели [38] и хемокина *RcCC1* кобии [19]. При воздействии поли(I:C) или бактериальной вакцины экспрессия гена *RcCC3* в различных тканях регулируется по-разному. Результаты недавно проведенных исследований подтверждают, что профили экспрессии хемокинов группы СС радужной форели различаются по ответу на разные вирусные патогены, и их реакция на каждый патоген тканеспецифична [39, 40]. Таким образом, можно утверждать, что характер экспрессии различных СС хемокинов может отличаться в разных тканях, а также в ответ

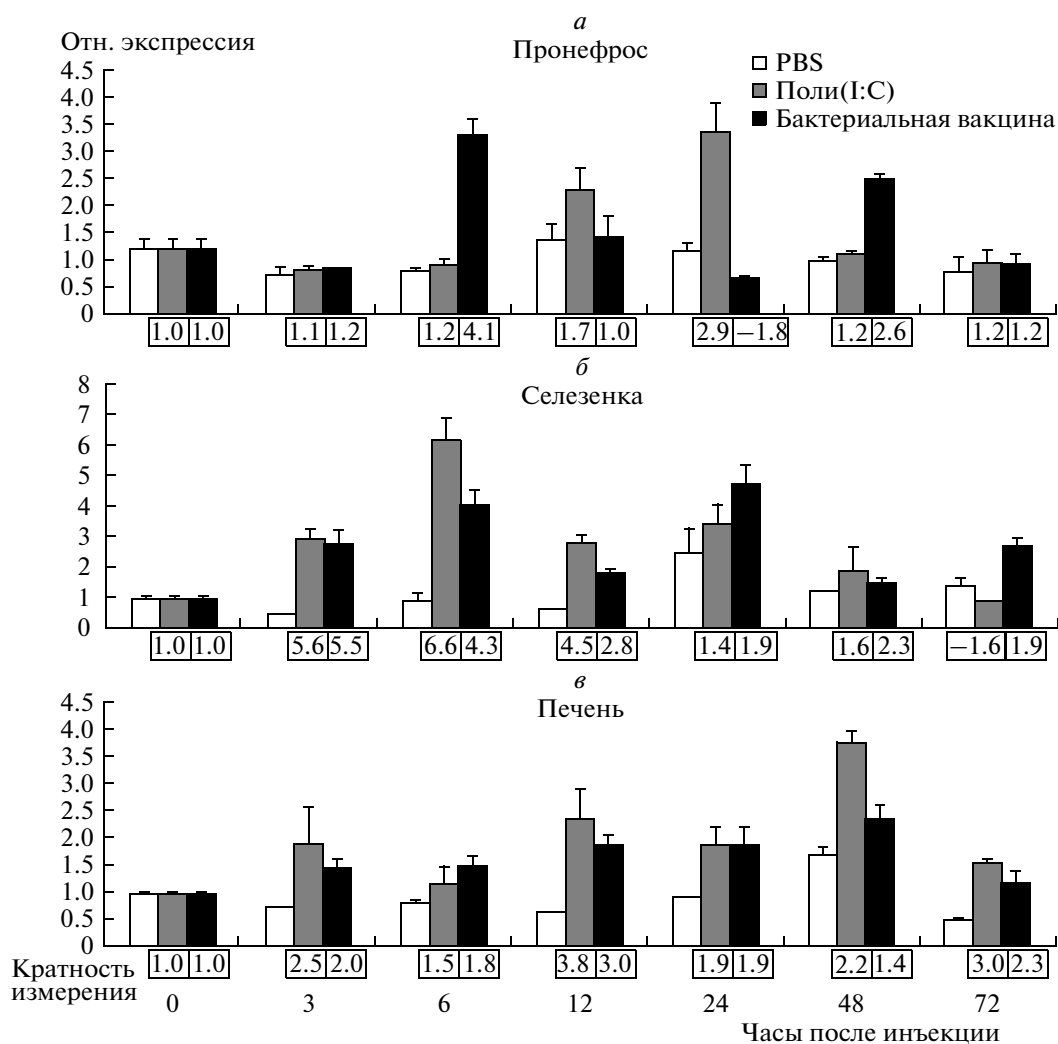


Рис. 5. Временная зависимость экспрессия *RcCC3* в пронефросе (а), селезенке (б) и печени (в) кобии после инъекции PBS, поли(I:C) или бактериальной вакцины. Данные количественной ОТ-ПЦР представлены как среднее значение уровня экспрессии гена хемокина относительно экспрессии контрольных эндогенных генов. Кратность изменения в каждой временной точке увеличение экспрессии после инъекции рассчитывали как соотношение: (средняя относительная экспрессия)/(средняя относительная экспрессия для соответствующего PBS-контроля); снижение экспрессии рассчитывали как обратную величину со знаком минус при значении меньше 1. Каждый столбец диаграммы представляет среднее значение, полученное на основании трех измерений, со стандартной ошибкой.

на разные индукторы, что, по-видимому, отражает различные функциональные нагрузки этих хемокинов в реализации врожденного иммунитета. Слизистые кишечника, кожи и жабр представляют собой первые линии защиты системы врожденного иммунитета у рыб, поэтому для выяснения функциональной роли гена *RcCC3* необходимо в дальнейшем исследовать его экспрессию в этих, а также в других органах кобии в ответ на воздействие таких факторов как поли(I:C) и бактериальная вакцина. Кроме того мы планируем проанализировать хемоаттрактантную активность рекомбинантного *RcCC3* по отношению к лейкоцитам, чтобы подтвердить его связь с системой врожденного иммунитета.

Итак, в результате проведенного исследования идентифицирован новый ген *CC*-хемокина кобии *RcCC3*, относящийся к группе *CCL19/21/25*. Показано, что *RcCC3* конститутивно экспрессируется во всех тканях, но особенно интенсивно в жабрах и печени. Экспрессия *RcCC3* повышается в ответ на воздействие поли(I:C) или инактивированной бактериальной вакцины на ранних временных точках. На основании полученных результатов можно предположить, что хемокины могут участвовать в регуляции гомеостаза и быть вовлечены в реакции врожденного иммунитета в ответ на бактериальную или вирусную инфекцию. Данная работа может получить развитие в дальнейших исследованиях, направленных на

точное понимание регуляции экспрессии СС хемокинов рыб и их участия в механизмах врожденного иммунитета.

Мы благодарим всех членов лаборатории за техническую помощь и полезные диспуты.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантами Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (код: 2007ZD10 и 2012TS08), и Научной и технологической программы провинции Гуандонг (the Science and Technology Program of Guangdong Province; code: 2010B020309002 и 2011B020307003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Santiago F.G., Mark O.H., Rimantas S., Maria F.B.M., Lidy V.K., Kurt B., Michael E.N., Geert F.W. 2007. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 244–254.
- Jin H., Hayes G.L., Darbha N.S., Meyer E., Li Wang P.J. 2005. Investigation of CC and CXC chemokine quaternary state mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 987–999.
- Schutysse E., Struyf S., van Damme J. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 409–426.
- Alejo A., Tafalla C. 2011. Chemokines in teleost fish species. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1215–1222.
- Nomiyama H., Hieshima K., Osada N., Kato-Unoki Y., Otsuka-Ono K., Takegawa S., Izawa T., Yoshizawa A., Kikuchi Y., Tanase S., Miura R., Kusuda J., Nakao M., Yoshie O. 2008. Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics.* **9**, 222.
- Colobran R., Pujol-Borrell R., Armengol M.P., Juan M. 2007. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clin. Exp. Immunol.* **148**, 208–217.
- Peatman E., Liu Z. 2007. Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics.* **59**, 613–623.
- Zlotnik A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **12**, 121–127.
- Dixon B., Shum B., Adams E.J., Magor K., Hedrick R.P., Muir D.G., Parham P. 1998. CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol. Rev.* **166**, 341–48.
- Cuesta A., Dios S., Figueras A., Novoa B., Esteban M.A., Meseguer J., Tafalla C. 2010. Identification of six novel CC chemokines in gilthead seabream (*Sparus aurata*) implicated in the antiviral immune response. *Mol. Immunol.* **47**, 1235–1243.
- Laing K.J., Secombes C.J. 2004. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Mol. Immunol.* **41**, 793–808.
- Bao B., Peatman E., Peng X., Baoprasertkul P., Wang G., Liu Z. 2006. Characterization of 23 CC chemokine genes and analysis of their expression in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 783–796.
- Borza T., Stone C., Rise M.L., Bowman S., Johnson S.C. 2010. Atlantic cod (*Gadus morhua*) CC chemokines: diversity and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 904–913.
- Shih H.H., Ku C.C., Wang C.S. 2010. *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L., in Taiwan. *Vet. Parasitol.* **171**, 277–285.
- Liu P.C., Lin J.Y., Lee K.K. 2003. Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *J. Basic. Microb.* **43**, 499–507.
- Guo M., Liu G., Feng J. 2006. Identification and phylogenetic analysis of a pathogenic *Vibrio* sp. isolated from *Rachycentron canadum*. *J. Fish. Sci. China.* **13**, 823–828.
- Chang O., Shi C., Ma H., Pan H., Yu D., Wu S. 2006. Histopathological study on lymphocystis disease of *Rachycentron canadum*. *J. Fish. Sci. China.* **13**, 973–979.
- Chen S.C., Kuo R.J., Wu C.T., Wang P.C., Su F.Z. 2001. Mass mortality associated with *Sphaerospora*-like myxosporidean infestation in juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (L.), marine cage cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.* **24**, 189–195.
- Su Y., Guo Z., Xu L., Jiang J., Wang J., Feng J. 2012. Identification of a cobia (*Rachycentron canadum*) CC chemokine gene and its involvement in the inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol.* **32**, 204–210.
- Qiu L., Lin L., Yang K., Zhang H., Li J., Zhou F., Jiang S. 2011. Molecular cloning and expression analysis of a F-type lectin gene from Japanese sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mol. Biol. Rep.* **38**, 3751–3756.
- Yoshikawa T., Kato Y., Ihira M., Nishimura N., Ozaki T., Kumagai T., Asano Y. 2011. Kinetics of cytokine and chemokine responses in patients with primary human herpesvirus 6 infection. *J. Clin. Virol.* **50**, 65–68.
- Hamanishi J., Mandai M., Matsumura N., Baba T., Yamaguchi K., Fujii S., Konishi I. 2010. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19 transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer. *Stem Cells.* **28**, 164–173.
- De Sutter J., Struyf S., Van de Veire N.R., Philippé J., Buyzere M.D., Damme J.V. 2010. Cardiovascular determinants and prognostic significance of CC Chemokine Ligand-18 (CCL18/PARC) in patients with stable coronary artery disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **49**, 894–896.
- Chen S.L., Liu Y., Dong X.L., Meng L. 2010. Cloning, characterization, and expression analysis of a CC chemokine gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* **36**, 147–155.
- Zhang J., Chen X. 2008. Molecular characterization of a novel CC chemokine in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and its involvement in modulation of MHC class I antigen processing and presentation pathway. *Mol. Immunol.* **45**, 2076–2086.

26. Laing K.J., Secombes C.J. 2004. Chemokines. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 443–460.
27. Khattiya R., Kondo H., Hirono I., Aoki T. 2007. Cloning, expression and functional analysis of a novel chemokine gene of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, containing two additional cysteines and an extra fourth exon. *Fish Shellfish Immunol.* **22**, 651–662.
28. Press C.M., Evensen O. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 309–318.
29. Trede N.S., Langenau D.M., Traver D., Thomas L.A., Zon L.I. 2004. The use of zebra fish to understand immunity. *Immunity.* **20**, 367–379.
30. Li Y., Sun J., Sun L. 2011. An inflammatory CC chemokine of *Cynoglossus semilaevis* is involved in immune defense against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* **31**, 446–452.
31. Montero J., Ordas M.C., Alejo A., Gonzalez-Torres L., Sevilla N., Tafalla C. 2011. CK12, a rainbow trout chemokine with lymphocyte chemo-attractant capacity associated to mucosal tissues. *Mol. Immunol.* **48**, 1102–1113.
32. Smith P.A., Rojas M.E., Guajardo A., Contreras J., Morales M.A., Larenas J. 2004. Experimental infections of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* **61**, 53–57.
33. Caipang C.M.A., Lazado C.C., Brinchmann M.F., Kiron V. 2010. Infection-induced changes in expression of antibacterial and cytokine genes in the gill epithelial cells of Atlantic cod, *Gadus morhua* during incubation with bacterial pathogens. *Comp. Biochem. Phys. B.* **156**, 319–325.
34. Bayne C.J., Gerwick L., Fujiki K., Nakao M., Yano T. 2001. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 205–217.
35. Xu T., Cheng Y., Shi G., Wang R. 2011. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a disease-resistance related CC chemokine gene in miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Aquaculture.* **318**, 25–32.
36. Tanekhy M., Matsuda S., Itano T., Kawakami H., Kono T., Sakai M. 2010. Expression of cytokine genes in head kidney and spleen cells of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Nocardia seriolae*. *Vet. Immunol. Immunopath.* **134**, 178–183.
37. Lee S.Y., Söderhäll K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* **12**, 421–437.
38. Montero J., Chaves-Pozo E., Cuesta A., Tafalla C. 2009. Immune effects observed after the injection of plasmids coding for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CK5B, CK6 and CK7A chemokines demonstrate their immunomodulatory capacity and reveal CK6 as a major interferon inducer. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 1137–1145.
39. Chaves-Pozo E., Montero J., Cuesta A., Tafalla C. 2010. Viral hemorrhagic septicemia and infectious pancreatic necrosis viruses replicate differently in rainbow trout gonad and induce different chemokine transcription profiles. *Dev. Comp. Immunol.* **47**, 1757–1764.
40. Montero J., Chaves-Pozo E., Cuesta A., Tafalla C. 2009. Chemokine transcription in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is differently modulated in response to viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) or infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 661–669.