

УДК 577.1

**ФАКТОР УГНЕТЕНИЯ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ (MIF) ИЛОВОГО  
КРАБА *Scylla paramamosain*: МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ,  
ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ В РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ  
И ПРИ ЗАРАЖЕНИИ БАКТЕРИЕЙ *Vibrio*<sup>#</sup>**

© 2013 г. Y. Fang<sup>1,2</sup>, K. Jiang<sup>1</sup>, F. Zhang<sup>1</sup>, M. Sun<sup>1,2</sup>, J. Hu<sup>1,2</sup>, L. Ma<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,  
300 Jungong Road, Shanghai 200090, China

<sup>2</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 999 Huchenghuan Road, Shanghai 201306, China

Поступила в редакцию 29.06.2012 г.

Принята к печати 29.10.2012 г.

Один из первых обнаруженных цитокинов – фактор угнетения миграции макрофагов (MIF) – выполняет важные функции в различных физиологических процессах у краба. В данной работе клонировали полноразмерную кДНК MIF (GenBank acc n JX131610) из илового краба *Scylla paramamosain* (Sp) на основе последовательности из библиотеки его кДНК. Полноразмерный ген *SpMIF* состоит из 734 п.н. с открытой рамкой считывания длиной в 363 п.н., кодирующей пептидную цепь SpMIF длиной 120 а.о. (молекулярный вес 13.46 кДа, pI 6.82). Сравнительный анализ первичной структуры показал, что ген *SpMIF* и такой же ген из китайского краба *Eriocheir sinensis* высокоомологичны (68%). Методом количественной ПЦР в реальном времени показано, что в клетках гепатопанкреаса и в гемоцитах уровень экспрессии гена *SpMIF* высок. После заражения бактерией *Vibrio parahaemolyticus* ( $4.00 \times 10^6$  БОЕ/мл) уровень синтеза SpMIF через 6 ч повышается, достигает максимума через 8 ч и снижается до нормального уровня через 48 ч. Эти данные свидетельствуют о том, что ген успешно клонирован и, по-видимому, является частью иммунной системы краба.

**Ключевые слова:** фактор угнетения миграции макрофагов, количественная ПЦР в реальном времени, краб *Scylla paramamosain*, тканевая экспрессия.

MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR IN MUD CRAB *Scylla paramamosain*: MOLECULAR CLONING, EXPRESSION PROFILES IN VARIOUS TISSUES AND UNDER *Vibrio* CHALLENGE, by Y. Fang<sup>1,2</sup>, K. Jiang<sup>1</sup>, F. Zhang<sup>1</sup>, M. Sun<sup>1,2</sup>, J. Hu<sup>1,2</sup>, L. Ma<sup>1,\*</sup> (<sup>1</sup>East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 300 Jungong Road, Shanghai, 200090 China, \*e-mail: malingbo@vip.sina.com; <sup>2</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 999 Huchenghuan Road, Shanghai, 201306 China). As one of the first found cytokines, macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays an important role in several physiological processes in crabs. In this study, a full-length MIF cDNA (GenBank accession number: JX131610) from mud crab *Scylla paramamosain* (Sp) was cloned based on a sequence of *S. paramamosain* cDNA library. The full length of *SpMIF* was 734 bp consisting of a 363 bp open reading frame encoding the SpMIF, a 120 amino acid peptide chain. The molecular weight of SpMIF was 13.46 kDa with the pI of 6.82. The alignment analysis showed that SpMIF appeared to be closely related to the counterpart from crab *Eriocheir sinensis* (68%). Quantitative real-time PCR analysis revealed that *SpMIF* was highly expressed in hepatopancreas and hemocytes. In addition, the expression level of SpMIF was increased significantly after a 6-h challenge by *Vibrio parahaemolyticus* ( $4.00 \times 10^6$  CFU/mL), peaked at 8 h, and then declined to the common level in 48 h. This data indicated that *SpMIF* was cloned successfully, and suggested that it participated in the immune system of mud crabs.

**Keywords:** macrophage migration inhibitory factor, quantitative real-time PCR, *Scylla paramamosain*, tissue expression.

DOI: 10.7868/S0026898413040034

Принятые сокращения: MIF (Macrophage Migration Factor) – фактор угнетения миграции макрофагов.

<sup>#</sup> Текст статьи представлен авторами на английском языке.

\* Эл. почта: malingbo@vip.sina.com

Фактор угнетения миграции макрофагов (MIF) — один из интереснейших цитокинов, который, как показано ранее, высвобождается в результате активирования Т-лимфоцитов антигенами и выполняет функцию подавления миграции макрофагов в позвоночных организмах [1, 2]. Со времени открытия этого цитокина в 1966 г. опубликовано множество исследований, которые показали, что фактор секретируется не только активированными Т-клетками, но и другими иммунными клетками, такими как моноциты, макрофаги и некоторые неиммунные клетки [3, 4]. Факторы MIF выделены и охарактеризованы из множества тканей, таких, например, как мозг крупного рогатого скота [5, 6] или придаток яичка крысы [7]. После клонирования кДНК MIF человека в 1989 г. были клонированы гены MIF из других организмов, например, мышцы (*Mus musculus*) [8, 9], ланцетника (*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*) [10], овцы (*Ovis aries*) [11]. В настоящее время очевидно, что MIF выполняет в организме множество функций, в том числе — функцию медиатора воспалительной реакции [12–14]. Во многих других работах показано, что белки MIF участвуют в процессах регуляции пролиферации клеток и злокачественного ангиогенеза [14], а также функционируют как фактор роста во время дифференцировки эмбриона [15]. Предполагается, что при повышении физиологического уровня MIF в клеточной линии нейробластомы мышцы (Neuro-2a) подавляется активация Т-клеток и индуцируется гибель Т-клеток по  $\gamma$ IFN-зависимому пути [16]. Кроме того, предполагается, что MIF может активировать путь ERK1-ERK2-MAPK внутриклеточной сигнальной системы [4, 17, 18]. Некоторые авторы предполагают, что при температурах, вызывающих тепловой шок, в случае, когда белков теплового шока оказывается недостаточно, MIF может выступать в качестве шаперона, связывая другие белки со сходными свойствами, препятствуя раннему наступлению стресса [19].

Иловый краб (*Scylla*) распространен, главным образом, в Индо-Тихоокеанском и Тихоокеанском регионах [20], где его добыча имеет большое коммерческое значение. Поэтому гибель иловых крабов от заражения *Vibrio parahaemolyticus*, их основным инфекционным агентом, вызывает огромные экономические потери. Для повышения иммунитета иловых крабов необходимо изучить механизм действия стимулирующих иммунитет белков. В литературе имеются данные по клонированию генов MIF из различных организмов, однако данных по гену MIF из *Scylla paramamosain* (*SpMIF*) нет. В нашей работе мы охарактеризовали полноразмерную кДНК *SpMIF*, аминокислотную последовательность кодируемого геном белка, изучили экспрессию гена в различных тканях здоровых особей, а также особей, инфицированных вибрионом *V. parahaemolyticus*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Библиотеку кДНК** получали при помощи набора SMART™ cDNA Library Construction Kit (“Clontech”, США), все маркеры экспрессированных последовательностей (EST) подвергали BLAST-анализу [21]. В общей сложности, секвенировано с 5'-конца 7168 произвольно отобранных индивидуальных колоний с использованием универсального праймера T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'). После удаления коротких (<100 п.н.), “некачественных” и векторных последовательностей получено 1709 высококачественных EST-последовательностей. Для дальнейшего анализа была выбрана последовательность с предполагаемым сигналом полиаденилирования (AATAAA), сходная с охарактеризованными ранее генами MIF. Не обнаружено ни одной сколько-нибудь гомологичной последовательности в библиотеке EST ни на белковом, ни на нуклеотидном уровне. Эту последовательность амплифицировали, применяя два праймера (*SpMIF-F*: 5'-CCGAA-GAACCTCACTCCA-3', *SpMIF-R*: 5'-CAGCCGACAATCGAAATAT-3'), сконструированные нами на основе выбранной последовательности с помощью программы Primer Premier 5.00 — для обеспечения точности при определении открытой рамки считывания. Использовали следующий режим ПЦР: 3 мин при 95, 35 циклов (95°C по 30 с, 52°C по 45 с, 72°C по 1 мин), полимеризация при 72°C в течение 7 мин. Продукт хранили при 4°C, проверяли при помощи электрофореза в агарозном геле, очищали, используя набор Agarose Gel DNA Purification kit Ver. 2. 0. (“TaKaRa Biotechnology”, Япония), клонировали в векторе pMD19-T (TaKaRa, Япония) и секвенировали.

**Анализ последовательностей.** Основные свойства полноразмерной кДНК *SpMIF* определяли при помощи программы Vector NTI Advance 11.5. Выведенная на этой основе пептидная последовательность подтверждена по соответствию генам MIF из библиотеки NSBI с использованием поисковой программы ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) и программы BLAST. Биохимические свойства искомого белка определяли, используя данные сайта [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/). Аминокислотные последовательности из различных организмов получали из базы данных NCBI GenBank и анализировали при помощи программы Vector NTI Suite Advance 11.5. Для филогенетического анализа использовали метод ближайшего связывания (NJ) по программе MEGA 5.

**Подготовка проб.** Взрослых иловых крабов (*S. paramamosain*) весом  $200 \pm 20$  г приобретали на рыбном рынке (провинция Хайнань, Китай), охлаждали на льду, выделяли из них гепатопанкреас, мышцы, жабры, семенник, сердце и гемциты, которые хранили до анализа при  $-80^\circ\text{C}$ . Ге-

моциты из неутолщенных мембран краба отбирали иглой в шприц, содержащий охлажденный до  $-4^{\circ}\text{C}$  антикоагулирующий раствор (0.45 М NaCl, 0.1 М глюкоза, 30 мМ цитрат натрия, 26 мМ лимонная кислота и 10 мМ EDTA, pH 4.6), до соотношения ткань/раствор 1 : 1 и осаждали центрифугированием (8000 об./мин) при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин [22].

**Выделение суммарной клеточной РНК и синтез первой цепи кДНК.** РНК выделяли из тканей, используя реагенты Unizol (“Biostar”, Китай) согласно инструкции производителя и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Качество и концентрацию препарата определяли, используя методы агарозного гель-электрофореза и спектрофотометрии. Первую цепь кДНК получали путем обратной транскрипции тотальной РНК (1 мкг) при помощи набора Rever Tra Ace qPCR RT Kit (“Toyobo Co”, Япония). Продукт разводили в 10 раз и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Профили экспрессии гена *SpMIF*** изучали в гепатопанкреасе, мышцах, жабрах, семеннике, сердце и гемоцитах краба *S. paramamosain* при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием специфических по отношению к *SpMIF* праймеров (*SpMIF-Q-F*: 5'-CGAACCTGCCCAAGGAGAA-3' и *SpMIF-Q-R*: 5'-ACTGGTGGCCGCCGAAAG-3'). В качестве внутреннего контроля использовали праймеры к гену *Sp18S* (*Sp18S-Q-F*: 5'-ggggtttgcaattgtctccc-3' и *Sp18S-Q-R*: 5'-GGTGTGTA-CAAAGGGCAGGG-3'), которые конструировали, исходя из нуклеотидной последовательности этого гена из базы данных GenBank (n FJ646616.1). Уровни экспрессии гена *SpMIF* определяли методом построения стандартных кривых. ПЦР в реальном времени проводили, используя в качестве пробы краситель SYBR Green qRT-PCR (Power SYBR Green PCR Master Mix, ABI) на приборе ABI StepOnePlus Detection system (“Applied Biosystems”, США). Применяли следующий режим амплификации для ПЦР в реальном времени с красителем SYBR Green: 10 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ , 45 циклов с денатурацией при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 15 с и отжигом при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин, с последующей полимеризацией при  $72^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Специфичность амплификации подтверждали на основании анализа кривых плавления.

**Профиль синтеза мРНК гена *SpMIF* в гемоцитах при заражении микроорганизмом *Vibrio parahaemolyticus*.** Вибрион суспендировали концентрации  $4.00 \times 10^6$  БОЕ/мл. Каждому крабу через неутолщенные мембраны четвертой правой ноги иглой вводили по 70 мкл суспензии вибриона, контрольным крабам — по 70 мкл 0.9% раствора NaCl. Гемолимфу отбирали через различные интервалы времени (0, 2, 6, 8, 12, 24, 48 и 96 ч), смешивали в шприце с предварительно охлажденным ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) антикоагулянтом (см. выше) в объемном соотношении 1 : 1 и осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об./мин и  $4^{\circ}\text{C}$ . Далее, в об-

разцы добавляли реагент Trizol (“Biostar”, Китай). Каждый образец анализировали в четырех повторностях. Суммарную клеточную РНК выделяли и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Уровни экспрессии гена *SpMIF* измеряли количественной ПЦР в реальном времени с помощью тех же праймеров и методов, которые описаны выше.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Анализ нуклеотидной последовательности

В результате поиска по библиотеке маркеров экспрессированных последовательностей [21] была обнаружена *MIF*-подобная последовательность (GenBank JX131610), которая состоит из 734 п.н., содержит открытую рамку считывания длиной 363 п.н. и кодирует полипептид из 120 а.о., с участком 5'-УТР длиной 98 п.н. и участком 3'-УТР длиной 273 п.н., содержащим сигнал полиаденилирования после стоп-кодона (рис. 1).

Индукцированный белок SpMIF состоит также из 120 а.о. и, согласно прогнозу по программе Signal P3.0 Server, не содержит сигнальных пептидов. Мол. масса белка — 13.46 кДа и  $pI = 6.82$ . При помощи программы Vector NTI Suite Advance 11.5 белок сравнивали с описанными в литературе белками MIF из других организмов (рис. 2). Белок SpMIF наиболее гомологичен белкам из китайского краба (*Eriocheir sinensis*, 68%), а также белкам из мучнистого червеца (*Macronellicoccus hirsutus*, 50%), гороховой тли (*Acyrtosiphon pisum*, 49%) и шелкопряда (*Bombyx mori*, 45%).

### Филогенетический анализ *SpMIF*

Так же, как при изучении филогении других организмов по структуре MIF, мы провели филогенетический анализ, используя бутстреп-тест, основанный на методе UPGMA (метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего) программы Mega 5.00, и построили NJ-дерево (рис. 3). Видно, что белок SpMIF наиболее близок к белку из китайского краба (*E. sinensis*) ветви беспозвоночных, что соответствует традиционным таксономическим взаимоотношениям.

### Относительная экспрессия гена *SpMIF*

Относительные уровни экспрессии гена *SpMIF* в гепатопанкреасе, гемоцитах, сердце, семеннике, мышцах и жабрах определяли при помощи количественной ПЦР в реальном времени. На рис. 4 показано, что этот ген экспрессируется, в основном, в гепатопанкреасе и в меньшей степени — в порядке убывания — в гемоцитах, жабрах, сердце, семеннике и мышцах.

```

1 -----gaccatct
  tcgttctctgacaagcagcaagcaaggactagcactctgtctt
  ccgaagaacctcactccagacagtgaagccaggaacgctgccacg
99 atgccttttctcgagggtccacgaacctgcccaaggagaaggtg
  M P F L E V S T N L P K E K V 15
144 accccagaagtgctcagcggcctcagcaagatggtcagcagatg
  T P E V L S G L S K M V S E M 30
189 ctcgacaaatcggagagtactgcatgatgcgcgtcctgcctgac
  L D K S E S Y C M M R V L P D 45
234 cagctgatgactttcggcggcaccagtgagccgtgcgcggtgctc
  Q L M T F G G T S E P C A V V 60
279 agactgatctccatcggcaggctgggtgtggagctaaacaagaag
  R L I S I G R L G V E L N K K 75
324 catgctgccaaagatcttcgcctcatggacaacaatctcgggatc
  H A A K I F A F M D K H L G I 90
369 tccaatgatagaatggtcatggtgtccaggacctggactcatca
  S N D R M F M V F Q D L D S S 105
414 actggtggatacaaggaacaacattccatgaactgtatggcgt
  T V G Y K G T T F H E L Y G R 120
459 taa acttttaccacaagtgaattaagatgttcagctcaacaac
  *
504 agcatgccgtgaaatcagggccgcccagcactaccctgagtggt
549 gcgggactctccgggttgccagtcactgctgcacatgcacactga
594 gactgaggtccatataatctcgattgtcggctcagatttttctc
639 actcctacagacagactgaccagctgctgtttattacgattgtaa
684 ctgaacacaattagtttttctttatccattcaagacagat
729 aataaa

```

**Рис. 1.** Нуклеотидная последовательность кДНК и предполагаемая аминокислотная последовательность MIF из краба *S. paramamosain*. Иницирующий кодон ATG и терминирующий кодон ТАА подчеркнуты. Праймеры, использованные для подтверждения и амплификации открытой рамки считывания, выделены серым цветом; консервативные аминокислотные остатки (P<sup>2</sup> и K<sup>33</sup>), входящие в состав-каталитических центров, — рамкой; сайты полиаденилирования — жирным шрифтом.

### Относительная экспрессия гена *SpMIF* в крабах, инфицированных вибрионами *V. parahaemolyticus*

Чтобы протестировать иммунную устойчивость гена *SpMIF* при нарушении иммунитета, определяли относительную экспрессию *SpMIF* в гемолимфе после введения *V. parahaemolyticus* (рис. 5). Гибели крабов в течение первых 48 ч не наблюдалось, а в течение последующих 48 ч смертность составила менее 10% как в экспериментальной, так и в контрольной группе. Уровень экспрессии *SpMIF* в гемоцитах значительно увеличивается через 6 ч после начала бактериальной инфекции, достигает максимального уровня через 8 ч и возвращается к нормальному уровню через 48 ч (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фактор угнетения миграции макрофагов — важный для жизнедеятельности цитокин, который участвует в различных физиологических процессах и позвоночных, и беспозвоночных. В данной работе впервые успешно клонирована кДНК *SpMIF*, которая, как предполагалось, кодирует белок, состоящий из 120 а.о. Сравнительный анализ последовательностей показал, что этот полипептид обладает высокой гомологией (68%) с белком MIF из близкородственного организма — китайского краба *Eriocheir sinensis*. N-концевой остаток пролина (рис. 1, P<sup>2</sup>) и консервативный остаток лизина (рис. 1, K<sup>33</sup>), которые, как показано ранее, являются ключевыми для тауомеразной активности MIF млекопитающих, обнаружены также в *SpMIF* и MIF из китайского краба [23], японского гребешка (*Chlamys farreri*) [24], клеща (*Haemaphysalis longicornis*) [25], а также человека [3]. Это свидетельствует о том, что *SpMIF* обладает такой же ферментативной активностью, как и MIF из других организмов. В СХХС-мотиве белка млекопитающих имеется два консервативных цистеина, которые отвечают за его оксидоредуктазную активность [26], но в *SpMIF* краба имеется только один С (С<sup>57</sup>AVV<sup>60</sup>) (рис. 1), который аналогичен таковому из мидии (*Mytilus galloprovincialis*), в котором мотив С<sup>57</sup>GSV<sup>60</sup> вовлечен в оксидоредуктазную активность [27]. Вопрос, является ли эта разница результатом эволюции белка, составит предмет дальнейшего исследования. Отсутствие в белке сигнального пептида свидетельствует о том, что переноса MIF в эндоплазматический ретикулум не происходит, в то время как ABCA1-транспортер включен в этот процесс [28]. Чтобы получить больше информации, мы провели филогенетический анализ на основе выравнивания последовательностей различных MIF (рис. 2 и 3). Филогенетическое дерево показывает, что аминокислотные последовательности MIF отражают эволюционные взаимосвязи.

Далее, мы изучили функцию *SpMIF*, определили его вторичную структуру и создали 3D-модель. Показано, что *SpMIF* состоит из пяти β-слоев и трех α-спиралей, расположенных следующим образом: β1α1β2β3β4α2β5α3 [29]. Это свидетельствует о высокой степени гомологии белка с фактором MIF человека. Его вторичная структура представлена набором элементов β1α1β2β3β4α2β5β6 [30]; эта структура также сходна с MIF из краба *E. sinensis* (β1α1β2β3β4α2β5α3α4) [23]. Единственная разница между ними состоит в том, что C-концевой фрагмент *SpMIF* содержит β-слой и небольшую α-спираль (β5α3), в то время как MIF человека содержит два β-слоя (β5β6), а *EsMIF* — две спирали (α3α4).

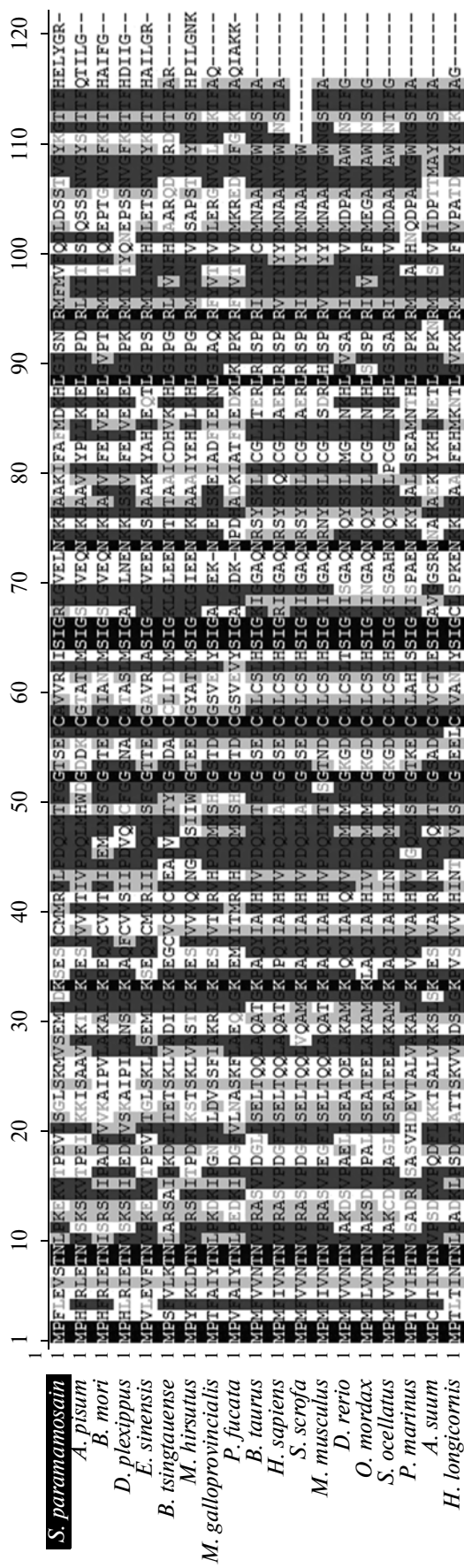
Сравнение *SpMIF* и MIF из мидии (*M. galloprovincialis*) [27] и из кокцидий (про-

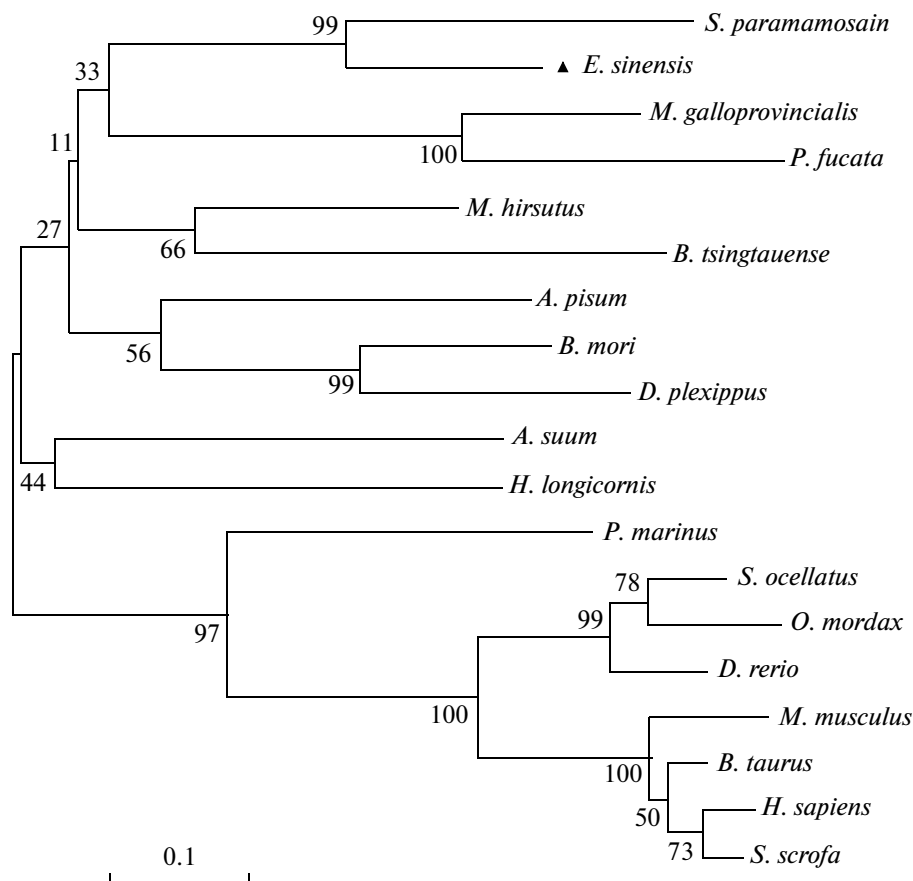
**Рис. 2.** Сравнение аминокислотных последовательностей белка SpMIF и других MIF из базы данных NCBI с помощью программы Vector NTI Suite 11.5. Пропуски (—) введены для максимально полного выравнивания последовательностей. Несходные остатки — черные буквы на белом фоне; консервативные остатки — черные буквы на темносером фоне; гомологичные участки — черные буквы на светлосером фоне; идентичные остатки — белые буквы на черном фоне; аминокислотные остатки с низкой гомологией — светлосерые буквы на белом фоне. Даны названия белков разных организмов и их номера в базе данных GenBank: *Acyrtosiphon pisum* (NP\_001156107.1), *Bombyx mori* (NP\_001040199.1), *Danaus plexippus* (EJH74805.1), *Eriocheir sinensis* (ADM86239.1), *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (AAT77697.1), *Maconellicoccus hirsutus* (ABM55630.1), *Mytilus galloprovincialis* (AEN25591.1), *Pinctada fucata* (ADU19847.1), *Bos taurus* (NP\_001028780.1), *Homo sapiens* (CAG46452.1), *Sciænopis ocellatus* (ACJ68424.1), *Mus musculus* (EDL25009.1), *Danio rerio* (NP\_001036786.1), *Osmerus mordax* (ACO09938.1), *Sus scrofa* (BAI48031.1), *Petromyzon marinus* (AAP33793.1), *Ascaris suum* (BAD24819.1), *Haemaphysalis longicornis* (BAF38455.1).

стейшие, *Eimeria*) [31] показало, что большинство элементов вторичной структуры SpMIF консервативно, так что предполагаемая молекулярная модель структуры SpMIF сходна со структурами других MIF. Нами предсказана 3D-модель SpMIF (рис. 6) при использовании программы SWISS-MODEL, разработанной на основе известной структуры MIF человека (Swiss Prot 315Pa 1.80 Å, данные не приведены) [32–34]. Оказалось, что последовательность SpMIF имеет небольшую гомологию с последовательностью MIF человека (35.97%), но в то же время их вторичные структуры сходны, а оксидоредуктазный каталитический сайт и таутомеразный мотив консервативны (рис. 6). Отсюда следует главный вывод, что белки SpMIF и MIF человека могут обладать сходными биологическими функциями.

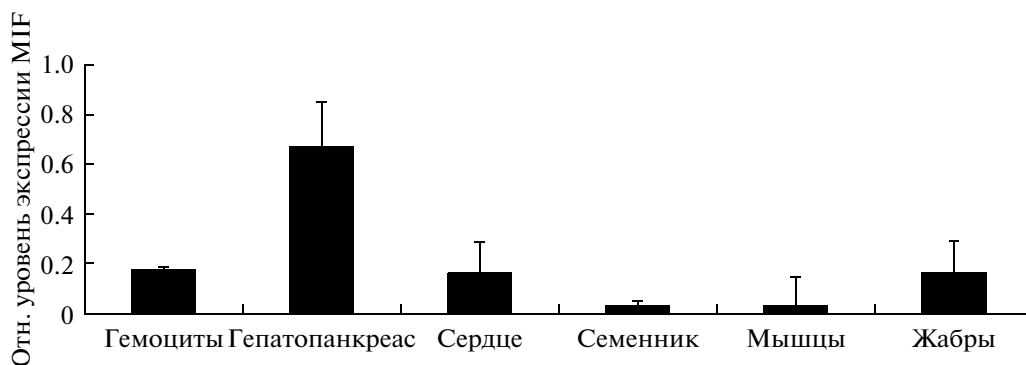
Профили экспрессии гена тесно связаны с его функцией. В настоящей работе с помощью ПЦР в реальном времени мы сравнивали относительные уровни экспрессии гена *SpMIF* в различных тканях здоровых крабов. Транскрипты гена *SpMIF* образуются во всех исследованных тканях (в гепатопанкреасе, гемоцитах, семеннике, мышцах и жабрах). Наибольший уровень экспрессии гена наблюдается в гепатопанкреасе, меньший — в гемоцитах и жабрах, и самый низкий — в мышцах. Это позволяет предположить, что гепатопанкреас и гемоциты играют важную роль в иммунитете краба. Ранее показано, что уровень экспрессии этого гена также наиболее высок в гепатопанкреасе китайского мохнаторукого краба *E. sinensis* [23], но в жабрах этого организма он был выше, чем в гемоцитах.

В то же время, у мидии (*M. galloprovincialis*) MIF накапливается, в основном, в гемоцитах и в содержащей гонады мантии. Далее, по убыванию





**Рис. 3.** NJ-филогенетическое древо белков MIF, построенное на основе аминокислотных последовательностей. Номера использованных последовательностей в базе GenBank – см. рис. 2. Каждый узел подтверждали бутстреп-методом (1000 реплик), используя пакет программ Mega 5.00.



**Рис. 4.** Относительные уровни экспрессии гена *SpMIF* в различных тканях, определенные при помощи количественной ПЦР в реальном времени. Количество мРНК *MIF* нормализовали к количеству транскрипта гена *18S pPHK*. На оси ординат отложены отношения уровней синтеза мРНК генов *MIF/18S pPHK*.

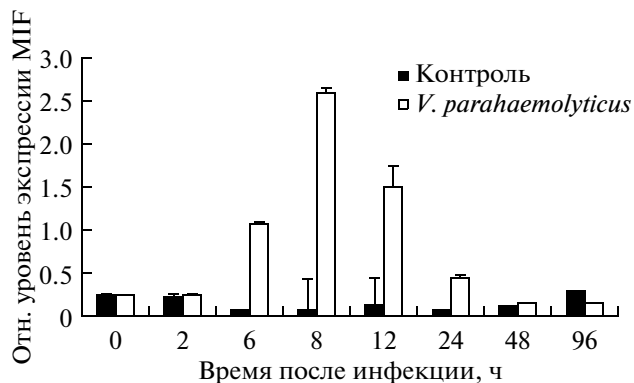
уровня экспрессии, располагаются жабры, гепатопанкреас, мышцы и ткань ноги моллюска. Так как *S. paramamosain*, *E. sinensis* и *M. galloprovincialis* имеют незамкнутую кровеносную систему, становится понятным, почему MIF может быть обнаружен во всех тканях. Все эти результаты позволяют предположить, что гепатопанкреас, гемоциты

и жабры являются основными органами, вовлеченными в иммунный ответ. Во всех тканях рыб также присутствуют транскрипты MIF, в том числе – в кишечнике, мозге, селезенке, печени, жабрах. Наиболее высокий уровень зарегистрирован в тигре, который содержит самое большое количество Т-клеток [35]. В тоже время, у позвоночных, осо-

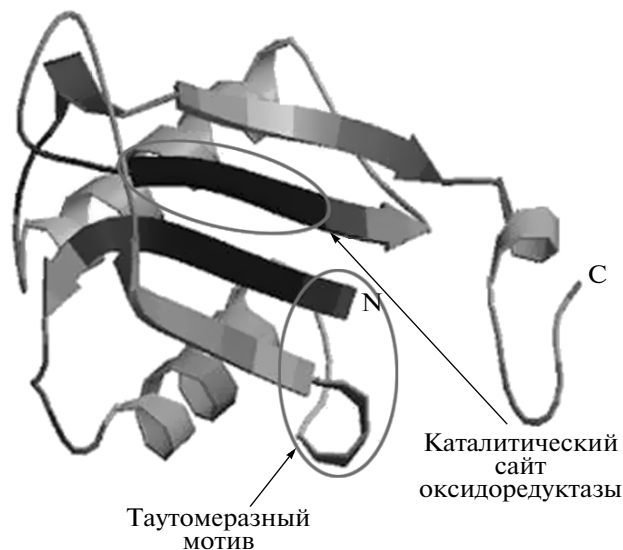
бенно у млекопитающих, таких как мейшаньская свинья, обладающих развитой эндокринной системой, наиболее высок уровень экспрессии гена в желудке, который занимает важное место в эндокринной системе млекопитающих, а в печени, легких, почках, кишечнике и жировой ткани уровень экспрессии MIF невысок [36].

Ранее показано, что MIF постоянно синтезируется в гемоцитах и высвобождается в ответ на появление различных эндо- и экзотоксинов при различных обстоятельствах [4, 37]. Гемоциты мы анализировали после заражения бактерией *V. parahaemolyticus*, наиболее широко распространенным патогеном, при культивировании *S. paramamosain*. Уровень экспрессии гена *SpMIF* при этом быстро нарастает к 6 ч после заражения, достигает максимума через 8 ч и затем понижается до нормального уровня. В крабах контрольной группы, инокулированных 0.9% NaCl, существенного повышения уровня экспрессии мРНК MIF не происходит. Так же, как и у краба *E. sinensis*, в гепатопанкреасе и жабрах наблюдается четыре пика уровня экспрессии в ответ на однократное заражение вибрионом *Vibrio anguillarum* — через 4, 6, 8 и 12 ч [23]. Уровень экспрессии гена *MIF* у одного из брюхоногих моллюсков (*Haliotis diversicolor supertexta*) через 24 и 48 ч после заражения вибрионом *V. parahaemolyticus* также заметно повышается [38]. Уровень синтеза MIF изучали также в голове, почке и селезенке иглобрюхих рыб (Tetraodontidae) после введения липополисахаридов (ЛПС). В этом случае уровень экспрессии транскрипта достигает максимума через 6 ч после введения [39]. Это свидетельствует о том, что *SpMIF* представляет собой быстро образующуюся защитную молекулу, которая отвечает на экзогенную стимуляцию иммунной системы у краба.

Таким образом, имеются многочисленные данные, которые свидетельствуют о том, что MIF играет ключевую роль в регуляции врожденного иммунного ответа и воспалительных процессов. После заражения нокаутных мышей *MIF*<sup>-/-</sup> грибом *Aspergillus fumigatus* уровень их смертности значительно выше, чем уровень смертности мышей дикого типа. Фармакологическое угнетение синтеза MIF метиловым эфиром (*S,R*)-3-(4-гидроксифенил)-4,5-дигидро-5-изоксазолуксусной кислоты (ISO-1) увеличивает чувствительность инфицированных мышей дикого типа к летальной инфекции [40]. На модельных системах, при использовании дефицитных по MIF клеток, а также специфических к MIF антител или рекомбинантных MIF показано, что синтез и экспрессия провоспалительных молекул широкого профиля действия, таких как TNF, IL-2, воспалительный белок макрофагов 2 и COX2, прямо или опосредовано стимулируется MIF [4]. Стимуляция ЛПС или другими эффекторными молекула-



**Рис. 5.** Профили экспрессии гена *SpMIF* в гемоцитах после введения 70 мкл суспензии *Vibrio parahaemolyticus* в концентрации  $4.00 \times 10^6$  БОЕ/мл (белые столбцы) или 0.9% раствора NaCl (контроль, черные столбцы) относительно экспрессии гена *18S pPHK*. На оси абсцисс отложено время после инфекции, на оси ординат — относительные уровни синтеза мРНК генов *MIF/18S pPHK*.



**Рис. 6.** Предполагаемая 3D-модель белка *SpMIF*, построенная по аналогии со структурой MIF человека из базы данных PDB (315pA chain A), с использованием пакета программ Swiss Model (<http://cn.expasy.org>). N — N-концевой аминокислотный остаток белка, C — C-концевой.

ми иммунных клеток, вызывающими воспаление, такими как TNF, также может быть сильным индуктором синтеза MIF макрофагами [41]. Наши данные поддерживают выводы предыдущих работ на других организмах, которые были посвящены молекулярному исследованию *SpMIF* и профилей его экспрессии в условиях иммунного вызова. Мы наблюдали отчетливый ответ на внешнюю стимуляцию бактерией *V. parahaemolyticus*, и это позволяет предположить, что *SpMIF*

образуется в иммунном ответе на бактериальную стимуляцию в крабах, хотя регуляторные механизмы пока неясны и требуют дальнейшего изучения. Результаты настоящего исследования могут оказаться полезными при разработке новых подходов к терапии воспалительных заболеваний беспозвоночных и позвоночных.

Работа получила финансовую поддержку Государственного фонда естественных наук Китая (31101890), Комиссии по науке и технологии муниципалитета Шанхай (10JC1418600), Фонда фундаментальных исследований для государственных некоммерческих исследовательских институтов Научно-исследовательского института рыбного хозяйства Восточно-Китайского моря, Китайская академия рыболовных наук (2008M02, 2007Z01).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bloom B.R., Bennett B. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*. **153**, 80–82.
- David, J.R. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **56**, 72–77.
- Weiser W.Y., Temple P.A., Witek-Giannotti J.S., Remold H.G., Clark S.C., David J.R. 1989. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 7522–7526.
- Calandra T., Roger T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 791–800.
- Galat, A., Rivière S., Bouet F. 1993. Purification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) from bovine brain cytosol. *FEBS Letters*. **319**, 233–236.
- Черепкова О.А., Лютова Е.М., Гурвиц Б.Я. 2006. Фактор ингибирования миграции макрофагов: выделение из мозга быка. *Биохимия*. **71**, 90–95.
- Eickhoff R., Wilhelm B., Renneberg H., Wennemth. G., Bacher M., Linder D., Bucala R., Seitz J., Meinhardt A. 2001. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol. Med.* **7**, 27–35.
- Kozak C.A., Adamson M.C., Buckler C.E., Segovia L., Paralkar V., Wistow G. 1995. Genomic cloning of mouse MIF (Macrophage Inhibitory Factor) and genetic mapping of the human and mouse expressed gene and nine mouse pseudogenes. *Genomics*. **27**, 405–411.
- Bozza M., Kolakowski Jr. L.F., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., David J.R., Gerard C. 1995. Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes. *Genomics*. **27**, 412–419.
- Du J., Xie X.J., Chen H.P., Yang W.L., Dong M.L., Su J., Wang Y.H., Yu C.L., Zhang S.C. Xu A.L. 2004. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Chinese amphioxus as a molecular marker of immune evolution during the transition of invertebrate/vertebrate. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 961–971.
- Lopes F., Vannoni A., Sestini S., Casciaro A., Carducci A., Bartolommei S., Toschi P., Ptak G., Cintorino M., Arcuri F. 2011. Sheep (*Ovis aries*) macrophage migration inhibitory factor: molecular cloning, characterization, tissue distribution and expression in the ewe reproductive tract and in the placenta. *Cytokine*. **54**, 315–323.
- Bernhagen J., Calandra T., Michell R.A. Martin S.B., Tracey K.J., Voelter W., Manogue K.R., Cerami A., Bucala R. 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. **365**, 756–759.
- Bernhagen J., Krohn R., Lue H.Q., et al. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* **13**, 587–596.
- Lue H.Q., Kleemann R., Calandra T., Roger T., Bernhagen J. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* **4**, 449–460.
- Ito K., Yoshiura Y., Ototake M., Nakanishi T. 2008. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is essential for development of zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 664–672.
- Yan X.C., Orentas R.J., Johnson B.D. 2006. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation. *Cytokine*. **33**, 188–198.
- Mitchell R.A., Metz C.N., Peng T., Bucala R. 1999. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J. Biol. Chem.* **274**, 18100–18106.
- Lue H.Q., Kapurniotu A., Fingerle-Rowson G., Roger T., Leng L., Thiele M., Calandra T., Bucala R., Bernhagen J. 2006. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/C5N5 and Src kinase activity. *Cell. Signal.* **18**, 688–703.
- Cherepkova O.A., Lyutova E.M., Eronina T.B., Gurvits B.Y. 2006. Chaperone-like activity of macrophage migration inhibitory factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 43–55.
- Keenan C.P., Davie P.J.F., Mann D.L. 1998. A revision of the genus *Scylla* De Haan, 1833 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Portunidae). *Raffles Bull. Zoo.* **46**, 217–245.
- Jiang K.J., Zhang F.Y., Zhang D., Tao Q.C., Zhang Y., Pi Y., Qiao Z.G., Ma L.B. 2011. Identification of a trypsin gene from *Scylla paramamosain* and its expression profiling during larval development. *African J. Agric. Res.* **6**, 6613–6621.
- Söderhäll K., Smith V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 229–239.
- Li W.W., Jin X. K., Wang Y., Chen L.L., Jiang H., Wang Q. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of macrophage migration inhibitory protein (MIF) in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 324–329.
- Li F.M., Huang S., Wang L.L., Yang J.L., Zhang H., Qiu L.M. Li L. Song L.S. 2010. A macrophage migra-



- tion inhibitory factor like gene from scallop *Chlamys farreri*: involvement in immune response and wound healing. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 62–71.
25. Umemiya R., Hatta T., Liao M., Tanaka M., Zhou J.L., Inoue N., Fujisaki K. 2007. *Haemaphysalis longicornis*: molecular characterization of a homologue of the macrophage migration inhibitory factor from the partially fed ticks. *Exp. Parasitol.* **115**, 135–142.
26. Cui S., Zhang D.C., Jiang S.G., Pu H.L., Hu Y.T., Guo H.Y., Chen M.Q., Su T.F., Zhu C.Y. 2010. A macrophage migration inhibitory factor like oxidoreductase from pearl oyster *Pinctada fucata* involved in innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* **31**, 173–181.
27. Parisi M.-G., Toubiana M., Mangano V., Parrinello N., Cammarata M., Poch P. 2012. MIF from mussel: coding sequence, phylogeny, polymorphism, 3D model and regulation of expression. *Dev. Comp. Immunol.* **36**, 688–696.
28. Flieger O., Engling A., Bucala R., Lue H.Q., Nickel W., Bernhagen J. 2003. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Letters.* **551**, 78–86.
29. Rost B., Yachdav G., Liu J. 2004. The predict protein server. *Nucl. Acids Res.* **32**, 321–326.
30. Sun H.W., Bernhagen J., Bucala R., Lolis E. 1996. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5191–5196.
31. Miska K.B., Fetterer R.H., Lillehoj H.S., Jenkins M.C., Allen P.C., Harper S.B. 2007. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. *Mol. Biochem. Parasitol.* **151**, 173–183.
32. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Torsten S. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**, 195–201.
33. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids Res.* **31**, 3381–3385.
34. Guex N., Peitsch M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis.* **18**, 2714–2723.
35. Buonocore F., Randelli E., Facchiano A.M., Pallavicini A., Modonut M., Scapigliati G. 2010. Molecular and structural characterization of a macrophage migration inhibitory factor from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **136**, 297–304.
36. Chen X.D., Chen Y.L., Wang S.B., Lei T., Gan L., Yang Z.Q. 2009. Molecular characterization and functional analysis of porcine macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene. *Cytokine.* **50**, 84–90.
37. Swope M.D., Lolis E. 1999. Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme? *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 1–32.
38. Wang B.Z., Zhang Z.P., Wang Y.L., Zou Z.H., Wang G.D., Wang S.H., Jia X.W., Lin P. 2009. Molecular cloning and characterization of macrophage migration inhibitory factor from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 57–64.
39. Jin H.J., Xiang L.X., Shao J.Z. 2007. Molecular cloning and identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 1131–1144.
40. Stojanovic I., Mirkov I., Kataranovski M., Glamoclija J., Stosic-Grujicic S. 2011. A role for macrophage migration inhibitory factor in protective immunity against *Aspergillus fumigatus*. *Immunobiology.* **216**, 1018–1027.
41. Calandra T., Bernhagen J., Mitchell R.A., Bucala R. 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1895–1902.