

제브라피쉬 interferon regulatory factor 10의 주사에 따른 면역 유전자 발현과 VHSV에 대한 방어 효과

김혜지* · 김진영* · 박종빈* · 이지현* · 박정수* · 김형준** · 권세련*,***†

*선문대학교 수산생명의학과, **VHS OIE 표준실험실, 국립수산물과학원

***유전체 기반 바이오IT 융합연구소

Immune gene expression and protection effect against VHSV by injection of interferon regulatory factor 10 in zebrafish (*Danio rerio*)

Hye Ji Kim*, Jin Young Kim*, Jong Bin Park*, Ji Hyun Lee*, Jeong Su Park*,
Hyoung Jun Kim** and Se Ryun Kwon*,***†

*Department of Aquatic Life Medical Sciences, Sunmoon University, Asan 31460, Korea

**OIE Reference Laboratory for VHS, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

***Genome-based BioIT Convergence Institute, Asan 31460, Korea

Interferon regulatory factors (IRFs) are a family of transcription factors essential to the control of antiviral immune response, cell growth, differentiation and apoptosis. IRF10 of zebrafish (*Danio rerio*) was negative regulation of the interferon Φ 1 and 3 response *in vitro*. In this study, we analyze the induction of *in vivo* immune response activation from the IRF10 gene of zebrafish and the protective effect against VHSV. As the results, the group inoculated with IRF10 expression vectors, there was no expression of IFN Φ 1, suggestion that IRF10 may function as a negative regulator of IRF3, which binds to the IFN Φ 1 promoter. And other types of interferon genes (IFN Φ 2-4) are thought to have been activated, inducing to the expression of pro-inflammatory cytokine and Mx genes. As the results of challenge test performed at 14 days after inoculation of the expression vectors, the maximum survival rate [50% (1 μ g DNA) and 42.5% (10 μ g DNA)] for IRF10 group were recorded. Meanwhile, the survival rates of pcDNA3.1 and PBS as the control groups were 10% and 15%, respectively. This study suggests that the possibility that activation of IRF10 molecule could be exploited as a VHS control method.

Key words: viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), zebrafish (*Danio rerio*), interferon regulatory factor 10, IRF10, interferon, IFN

서론

†Corresponding author: Se Ryun Kwon
Tel: +82-41-530-2289, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: srkwon@sunmoon.ac.kr

바이러스성출혈성패혈증(viral haemorrhagic septicaemia, VHS)의 병원체인 VHSV는 *Rhabdoviridae* 과, *Novirhabdovirus* 속의 외막을 가진 단일 가닥

RNA virus로 주로 저수온기에서 담수어 및 해수어에 질병을 유발한다. 어류 바이러스성 질병은 병원성이 강하고 높은 폐사를 유도하여 양식 산업에 막대한 경제적 손실을 입히고 있으며, 침입된 바이러스를 방어하기 위해 숙주내의 면역 반응이 활성화된다. 이는 선천성 면역을 즉각적으로 활성화시키고 이후 특이적 면역을 형성하여 체내에서의 바이러스 증식을 효과적으로 제어할 수 있다. 최근 Poly (I:C)를 이용한 VHSV live vaccine의 어류에 면역화 시킨 후 어류 면역 유전자변화를 NGS 분석을 통하여 확인한 결과 높게 발현된 면역유전자가 VHSV의 증식을 감소시키는 것을 확인하였다 (Park, 2018).

어류에서의 interferon (IFN)이 처음 보고(Kinkelin & Dorson et al., 1973)되어 많은 연구가 진행되고 있으며, 제브라피쉬에서는 포유류의 interferon 1, 3형과 다른 특정 수용체 사슬이 입증되어 이를 interferon Φ 라고 명명하였다(Stein et al., 2007). 바이러스에 의해 유도되는 IFN Φ 는 한 쌍의 cysteine을 갖는 group1 (IFN Φ 1, 4)과 두 쌍의 cysteine을 갖는 group2 (IFN Φ 2, 3)로 세분화되었다(Aggad et al., 2009). 이들은 생체 내 항바이러스 활성을 나타내며 박테리아 감염에 대해서도 숙주를 보호할 수 있다고 보고되었다(López-Muñoz et al., 2009).

항바이러스 면역을 유도하는 interferon은 패턴 인식 수용체(PAMP)를 통해 숙주세포가 바이러스를 인식하고 하류 신호 전달 단백질을 활성화시켜 인터페론 및 interferon-stimulated genes (ISGs)의 전사를 개시한다. 바이러스가 숙주 내로 침입하게 되면 retinoic acid-inducible gene 1 like receptors (RLRs) 신호 물질 중 retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) 및 melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)에 의해 mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS)이 활성화되어 mediator of IRF3 activation (MITA)이 TANK-binding kinase 1 (TBK1)을 유도하여 interferon regulatory factor (IRF)3, 7을 인산화하고 인터페론 발현을 활성화시킨다(Seth et al., 2005; Stark, 2007; Loo et al., 2008;).

IRF family는 DNA-binding domain (DBD)에서 광범위한 상동성을 갖는 전사 인자 그룹으로, 선천적 및 적응성 면역반응에서 인터페론 유전자 발현의

조절에 관여한다. 포유류에서는 9가지의 IRF가 발견된 반면에 어류에서는 10가지의 IRF가 식별 및 특성화되었다(Ozato et al., 2007; Huang et al., 2010). 숙주가 바이러스 감염을 방어하기 위해서는 RLRs 분자에 의해 활성화된 인터페론 생산이 반드시 필요하지만, 인터페론의 과도한 발현은 세포 독성과 자가면역질환을 유발하여 오히려 숙주에게 위험할 수 있다. 따라서 정상 상태일 때 숙주의 불필요한 인터페론 활성화를 방지하기 위한 RLR 신호전달 반응을 부정적으로 조절하는 분자 시스템이 있다(Komuro et al., 2008). Xu et al. (2016)는 IRF10이 interferon 1형의 유도를 지연시키고 MHC class I의 발현을 상향 조절하여 항바이러스 방어를 유도한다고 보고하였으며, 그 중 제브라피쉬의 IRF10은 RIG-1의 하류 유전자인 MITA를 차단하거나 interferon Φ 1 promoter를 활성화시키는 IRF3와 길항작용을 하여 IFN Φ 1 발현을 음성조절하는 유전자로 밝혀졌다(Li et al., 2014).

IRF10 유전자의 기능적 특성에 대해 많은 연구가 진행되었으나(Li et al., 2014; Huang et al., 2020), 생체내에서의 면역 반응에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 제브라피쉬의 IRF10 유전자를 확보한 후 진행세포 발현벡터인 pcDNA3.1에 삽입하여 발현벡터를 구축하였으며, 이를 제브라피쉬에 접종하여 다양한 면역유전자의 변화를 분석하고 VHSV 감염에 대해 방어력을 부여하는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

본 실험에 사용한 제브라피쉬(평균 체중 0.31 g, 평균 전장 3.2 cm)는 UV 살균 시스템이 설치되어 있는 유수식 사육조를 이용하여 사육수 수온 22℃에서 2주간 순치시켰다. 실험에 사용하기 전에 바이러스 감염 여부를 확인하기 위해 무작위로 4마리를 선별한 후 비장과 신장을 적출하여 PCR을 통해 VHSV 음성임을 확인하였다.

바이러스 배양

바이러스는 VHSV KJ2008 분리주를 사용하였

으며, 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco)와 1% antibiotic-antimycotic agent (Gibco)가 첨가된 minimum essential medium (MEM, Gibco)으로 준비된 epithelioma papulosum cyprinid (EPC) 세포에 접종하여 15°C에서 배양하였다. 바이러스 증식으로 인해 cytopathic effect (CPE)가 관찰되었을 때 배양액을 4°C, 3000×g로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 수거하였다.

수거된 바이러스의 감염가를 측정하기 위해 EPC 세포 trypsin-EDTA (Gibco) 처리를 통해 플라스크에서 탈락시키고 MEM 배지에 현탁시킨 후 96 well plate에 100μl씩 분주하여 15°C에서 밤새 배양하였다. VHSV는 FBS가 첨가되지 않은 MEM 배지를 사용하여 10^{-1} ~ 10^{-12} 까지 10배 단계 희석 후 96 well plate에 준비된 EPC 세포에 25 μl씩 접종하였다. 접종된 EPC 세포는 15°C에서 14일간 CPE를 관찰하였으며 50% tissue culture infectious does (TCID₅₀)을 이용하여 바이러스의 감염가를 측정하였다.

발현벡터 구축

제브라피쉬의 신장 조직으로부터 TRizol (Molecular Research Center)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 1 μg의 total RNA는 TOPscript RT Dry Mix (dT18 plus, Enzynomics)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 제브라피쉬 IRF10 유전자의 ORF와 Nhe I (5'-GCTAGCATGGAGGACAGGTCCAGACA-3'), Xho I (5'-CTCGAGTCATTGGTTTCCTGTGCGAGG-3')이 포함된 primer를 제작하였으며 준비된 cDNA를 template로 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 생성물은 pGEM-T Easy Vector를 통해 cloning하고, competent cell (E. coli, DH5α)에 transformation하였다. 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 염기서열을 분석한 후, 제한효소를 처리하여 진핵세포 발현벡터인 pcDNA3.1에 ligation하여 최종 발현벡터를 구축하였으며, 이를 pcIRF10이라고 명명하였다.

인위 감염 실험

각 실험구당 60마리의 제브라피쉬를 사용하였으며 모든 실험구는 2반복구로 진행하였다. 준비

한 발현벡터(pcIRF10)를 어체 당 1 μg/10 μl 또는 10 μg/10 μl씩 근육 주사하였으며, 대조구는 동량의 pcDNA3.1 또는 멸균 생리 식염수를 동일한 방법으로 주사하였다. 사육 수온은 22°C를 유지하며, 어체 내에서 발현벡터에 의한 면역 유전자 발현을 분석하기 위해 접종 후 1일, 3일, 7일, 14일째 각각 그룹당 4마리의 실험어에서 신장과 비장을 적출하였다.

VHSV 감염에 대한 방어 효과를 확인하기 위해 바이러스를 접종하기 3일 전부터 사육 수온을 서서히 낮추어 15°C로 조정하였고, 발현벡터 접종 후 14일째에 모든 실험구의 제브라피쉬에 VHSV를 10^5 TCID₅₀/10 μl/fish 복강 주사하였다. 각 실험구당 40마리씩 주사하였으며, 인위감염 후 21일간 누적 폐사율을 조사하였다.

면역유전자 발현 분석

발현벡터를 제브라피쉬에 접종하여 유도된 면역유전자 발현 양상을 비교하기 위해 real-time PCR을 사용하여 분석하였다. 제브라피쉬 한 마리당 발현벡터 1 μg을 접종한 후 1일, 3일, 7일 그리고 14일째에 각 그룹당 4마리씩 해부하여 신장과 비장을 적출하였고, TRizol을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 1 μg의 total RNA는 TOPscript RT Dry Mix를 이용하여 cDNA 합성한 후 DEPC 처리수로 10배 희석하여 template DNA로 사용하였다. 제조사 매뉴얼에 따라 Topreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with high ROX) (Enzynomics) 10 μl, 각각의 primer와 template DNA를 1 μl씩 첨가한 후 DEPC로 최종 20 μl의 volume이 되도록 제조하였으며 시료 당 3반복으로 수행하였다 (Table 1). Real-time PCR은 Step One Plus (Applied Biosystems)을 통해 수행되었으며, 반응 조건은 95°C에서 15분간 반응한 후, 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 20초의 반응을 1 cycle로 하여 총 40 cycles을 반응시켰다. 모든 cycle의 마지막 단계에서 melting curve 분석을 실시하였으며, real-time PCR 결과는 reference 유전자인 EF-1α에 대한 상대 정량을 비교하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method로 분석하였다.

통계분석 방법

통계적 유의성은 SPSS version 23.0 (SPSS Inc.)

Table 1. Primers for real-time PCR used in this study

Target gene	Sequence (5'-3')
TNF- α	F AAGGAGAGTTGCCTTTACCG
	R ATTGCCCTGGGTCTTATGG
IL-1 β	F TGGACTTCGCAGCACAAAATG
	R CACTTCACGCTCTTGGATGA
IFN- γ	F GAGAGGCTGGCACATGTTCA
	R CCCATAGCGTTTCTGCATACG
IFN Φ 1	F AGTCCTGACATTGGATCACATC
	R TGCTGGCTTTGCGTATCTTG
IFN Φ 2	F CCTCTTTGCCAACGACAGTT
	R CGGTTCTTGAGCTCTCATC
Mx	F AGACCATCTCATTTTCAGCAAACCTCT
	R CAATCTTTTTGAATGAATCCCCTG
EF-1 α	F AACAGCTCGTTGGAGTCAA
	R TTGATGTATGCGCTGACTTCCT

프로그램을 사용하여 분석하였다. Real-time PCR을 통한 면역유전자 발현 분석 실험에서의 반복구의 유의차는 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시한 후 Student's t-test를 통해 검정하였으며, $P < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

IRF 계열 단백질은 인터페론 유전자 발현의 조절에 관여하며, 선천성 면역 및 특이 면역계에 중추적인 역할을 한다(Ozato et al., 2007; Langevin et al., 2013). 본 실험에서는 IFN Φ 1을 음성 조절하는 제브라피쉬의 IRF10 유전자에 대한 생체내 면역반응을 확인하고자 IRF10 유전자를 탑재한 발현벡터를 구축하고, 제브라피쉬에 접종함으로써 제브라피쉬의 면역 반응이 활성화되고 VHSV 감염에 대한 방어 효과가 나타나는지를 확인하였다.

발현벡터를 제브라피쉬에 접종한 후 1일, 3일,

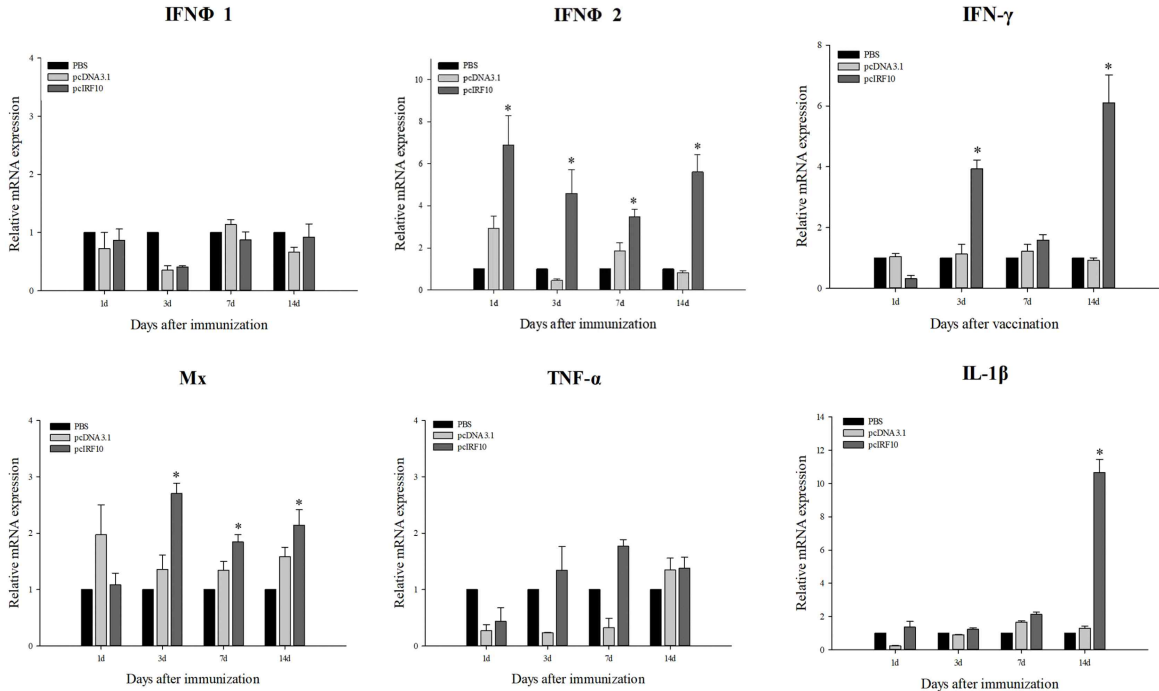


Fig. 1. The expression of immune genes (IFN Φ 1, IFN Φ 2, IFN- γ , Mx, IL-1 β , TNF- α) in zebrafish (*Danio rerio*) injected with each plasmid. Fish were sampled at various points (1, 3, 7, 14d) and the level of expression of each gene was measured by real-time PCR. The error bars represent SD (standard deviation) and the asterisk indicates significant differences between groups at $P < 0.05$.

7일 및 14일째 어체내에서 어떠한 면역유전자가 발현되었는지 real-time PCR를 통하여 유전자 발현량을 조사하였다(Fig. 1). 항바이러스 기능을 가지고 있는 세 가지 인터페론(IFN Φ 1, IFN Φ 2, IFN- γ) 유전자와 선천성 면역 유전자(TNF- α , IL-1 β , Mx)의 발현을 비교하여 분석한 결과, IFN Φ 1와 TNF- α 유전자는 모든 실험 기간에서 발현이 나타나지 않았다. IFN Φ 2 유전자는 1일차부터 즉각적으로 상향 조절되어 모든 기간에서 유의적으로 높은 발현이 나타났으며(6.9, 4.5, 3.4 및 5.6배), IFN- γ 유전자는 3일 및 14일차에 상향 조절되어 발현량이 증가하였음을 나타냈다(3.9 및 6.1배). 또한, Mx 유전자는 3일, 7일 및 14일째에 2.7, 1.8 및 2.1배씩 상향 조절되었으며, 14일째 IL-1 β 유전자는 10.6배 높아진 것으로 확인되었다. IRF10 유전자는 IFN Φ 1 promoter의 활성화를 유도시키는 IRF3 유전자와의 길항작용에 의해 promoter의 활성을 제어한다(Li et al., 2014). 본 연구에서 IRF10 유전자를 접종한 그룹은 모든 기간에 IFN Φ 1의 발현이 유도되지 않았던 반면에 IFN Φ 2은 모든 기간에 발현이 유도되어 상반된 결과가 도출되었다. 또한 후천성 면역체계에 관여하는 IFN- γ 유전자 또한 높은 발현양상을 보였다. 이는 IRF10 유전자가 IFN Φ 1의 발현을 선택적으로 억제하는 반면 다른 경로의 IFN 발현은 유도함을 시사한다. 이러한 인터페론 매개 면역 반응은 숙주에서 바이러스 복제를 억제하는

항바이러스 작용에 중요하며 다양한 ISG의 활성을 수반한다. Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 와 TNF- α 유전자는 세포 매개 면역 반응에 관여하여 염증반응과 숙주 방어에서 핵심적인 유전자이며(Turner et al., 2014), Interferon 신호 전달의 하류 인자인 Mx 유전자는 바이러스 복제 주기의 초기 단계를 차단시키는 1형 interferon 유도 유전자이다(Haller et al., 2015). 본 연구에서는 14일째에 IL-1 β 유전자의 발현이 높아졌으나 TNF- α 유전자의 발현이 유도되지 않은 것으로 보아 IRF10 유전자는 NK- κ B 경로에 관여하지 않는다고 사료된다. 또한 본 연구에서 Mx 유전자 발현은 3일째부터 나타났으며 14일째까지 유지되었다. 이는 제브라피쉬의 IRF10 유전자가 다른 유형의 interferon 유전자(IFN Φ 2-4)를 활성화시켜 이것에 의해 Mx 유전자가 유도된 것으로 사료되며, Lu et al. (2008) 연구에서도 IFN α 의 발현이 나타나지 않았으나 IFN 하류 인자인 Mx 유전자의 발현이 유도되었음을 보고한 바 있다.

발현벡터 접종에 의한 면역 활성화로 VHSV 감염에 대해 방어력이 생성되는지 확인하기 위하여 발현벡터 1 μ g 또는 10 μ g을 근육 주사 후 14일째에 10⁵ TCID₅₀ VHSV를 복강 주사하여 21일간 누적 폐사율을 분석하였다(Fig. 2). 실험 결과 모든 수조에서 4일째부터 점진적으로 폐사가 나타났으며, 1 μ g의 발현벡터를 접종한 pcIRF10 그룹은 50% (RPS

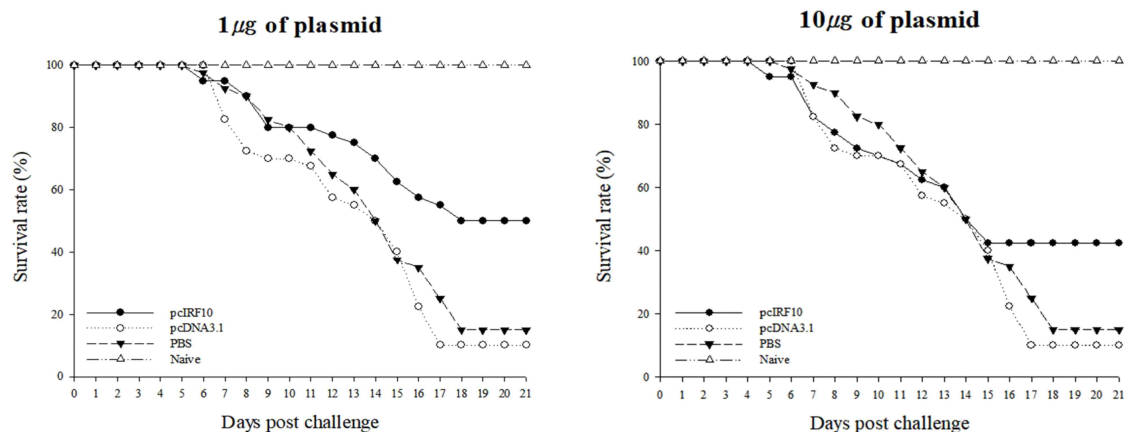


Fig. 2. Survival rates of zebrafish (*Danio rerio*) after intraperitoneal injection with expression vector harboring IRF10 of zebrafish. Fish were challenged with VHSV of 10⁵ TCID₅₀/fish at 14 day after administration with 1 μ g and 10 μ g of plasmid.

41.2%)의 생존율을 보였으며 10 µg의 발현벡터를 접종한 pcIRF10 그룹은 42.5% (RPS 32.3%)의 생존율을 기록하였다. 한편 대조구인 pcDNA3.1과 PBS 그룹은 각각 10%와 15%의 낮은 생존율을 보였다. 이러한 결과로부터 IRF10의 발현은 VHSV에 대한 항바이러스 효과가 재확인되었으며, 다양한 면역 반응을 활성화시켜 VHSV에 대한 방어 효과를 부여한다는 것이 입증되었다. 또한 발현벡터를 1 µg 및 10 µg를 접종한 경우 1 µg에서 더 높은 생존율이 나타났기 때문에 1 µg 농도로도 충분한 방어력을 부여한다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 제브라피쉬의 IRF10 유전자로 발현벡터를 구축하고 어류에 접종한 결과, IRF10 유전자는 IFN Φ 1의 발현을 유도하지 않으나 다른 경로의 IFN 발현과 IL-1 β 가 활성화되면서 VHSV에 대한 방어 효과가 나타남을 확인하였다. 이러한 결과는 VHS 제어방법으로서 IRF10 분자의 활성화가 이용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

감사의 말

이 논문은 국립수산물과학원 수산과학연구소(R2021065)의 지원 및 2017년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(NRF-2017R1D1A1A0900992)임.

References

- Aggad, D., Mazel, M., Boudinot, P., Mogensen, K. E., Hamming, O. J., Hartmann, R., Kotenko, S., Herbolmel, P., Lutfalla, G., and Levraud, J.-P.: The Two Groups of Zebrafish Virus-Induced Interferons Signal via Distinct Receptors with Specific and Shared Chains. *The Journal of Immunology*, 183:3924-3931, 2009.
- de Kinkelin, P., and Dorson, M.: Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *The Journal of General Virology*, 19:125-127, 1973.
- Gomez-Casado, E., Estepa, A., and Coll, J. M.: A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine*, 29:2657-2671, 2011.
- Haller, O., Staeheli, P., Schwemmler, M., and Kochs, G.: Mx GTPases: Dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends in Microbiology*, 23:154-163, 2015.
- Huang, B., Li, W. X., Wang, Z. X., Liang, Y., Huang, W. S., and Nie, P.: Identification of a novel splice variant isoform of interferon regulatory factor 10, IRF10, in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 97:637-647, 2020.
- Huang, Bei, Qi, Z. T., Xu, Z., and Nie, P.: Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: Glimpse of the diversification in evolution. *BMC Immunology*, 11:1-28, 2010.
- Kim, H. J., Park, J. S., Choi, M. C., and Kwon, S. R.: Comparison of the efficacy of Poly(I: C) immunization with live vaccine and formalin-killed vaccine against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 48:206-211, 2016.
- Komuro, A., Bamming, D., and Horvath, C. M.: Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling. *Cytokine*, 43:350-358, 2008.
- Langevin, C., Alekseeva, E., Passoni, G., Palha, N., Levraud, J. P., and Boudinot, P.: The antiviral innate immune response in fish: Evolution and conservation of the IFN system. *Journal of Molecular Biology*, 425:4904-4920, 2013.
- Li, S., Lu, L.-F., Feng, H., Wu, N., Chen, D.-D., Zhang, Y.-B., Gui, J.-F., Nie, P., and Zhang, Y.-A.: IFN Regulatory Factor 10 Is a Negative Regulator of the IFN Responses in Fish. *The Journal of Immunology*, 193:1100-1109, 2014.
- Loo, Y.-M., Fornek, J., Crochet, N., Bajwa, G., Perwitasari, O., Martinez-Sobrido, L., Akira, S., Gill, M. A., Garcia-Sastre, A., Katze, M. G., and Gale, M.: Distinct RIG-I and MDA5 Signaling by RNA Viruses in Innate Immunity. *Journal of Virology*, 82: 335-345, 2008.
- López-Muñoz, A., Roca, F. J., Meseguer, J., and Mulero, V.: New Insights into the Evolution of IFNs: Zebrafish Group II IFNs Induce a Rapid and Transient Expression of IFN-Dependent Genes and Display Powerful Antiviral Activities. *The Journal of Immunology*, 182:3440-3449, 2009.
- Lu, M. W., Chao, Y. M., Guo, T. C., Santi, N., Evensen, Ø., Kasani, S. K., Hong, J. R., and Wu, J. L.: The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model. *Molecular Immunology*, 45:1146-

- 1152, 2008.
- Ozato, K., Tailor, P., and Kubota, T.: The interferon regulatory factor family in host defense: Mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 282:20065-20069, 2007.
- Stark, G. R.: How cells respond to interferons revisited: From early history to current complexity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 18:419-423, 2007.
- Stein, C., Caccamo, M., Laird, G., and Leptin, M.: Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biology*, 8, 2007.
- Sun, F., Zhang, Y.-B., Liu, T.-K., Shi, J., Wang, B., and Gui, J.-F.: Fish MITA Serves as a Mediator for Distinct Fish IFN Gene Activation Dependent on IRF3 or IRF7. *The Journal of Immunology*, 187: 2531-2539, 2011.
- Tonheim, T. C., Bøgwald, J., and Dalmo, R. A.: What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*, 25:1-18, 2008.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D. J.: Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843:2563-2582, 2014.
- Xu, Q., Jiang, Y., Wangkahart, E., Zou, J., Chang, M., Yang, D., Secombes, C. J., Nie, P., and Wang, T.: Sequence and Expression Analysis of Interferon Regulatory Factor 10 (IRF10) in Three Diverse Teleost Fish Reveals Its Role in Antiviral Defense. *PLoS ONE*, 11:1-22, 2016.

Manuscript Received : May 28, 2021

Revised : Jun 08, 2021

Accepted : Jun 08, 2021