



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

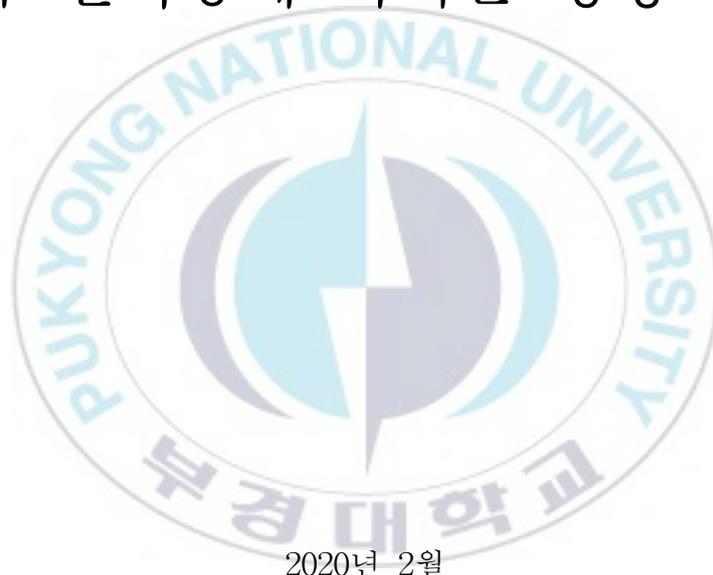
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

세균 RNA 및 CpG-motif를 지닌
long double-stranded RNA가
어류 면역능에 미치는 영향 분석



2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

백 수 연

이 학 석 사 학 위 논 문

세균 RNA 및 CpG-motif를 지닌
long double-stranded RNA가
어류 면역능에 미치는 영향 분석

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2020년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

백 수 연

백수연의 이학석사 학위논문을 인준함

2020년 2월 21일

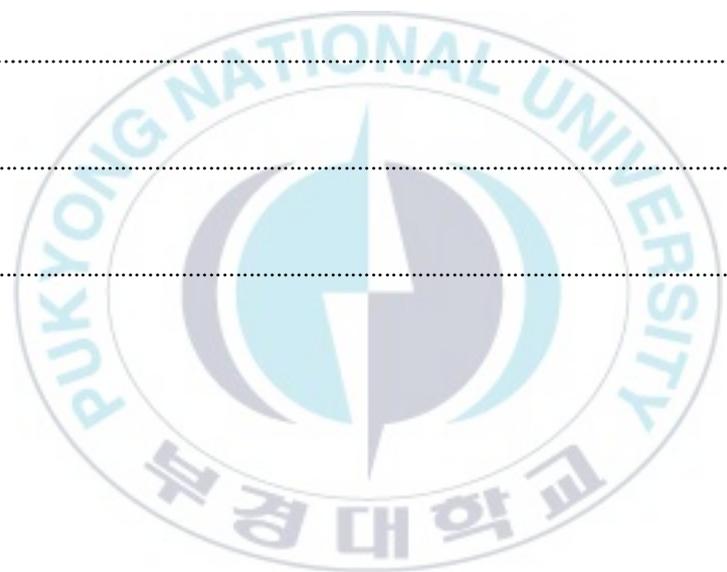


위원장	이학박사	정현도 (인)
위원	이학박사	정준기 (인)
위원	이학박사	김기홍 (인)

목 차

Abstract	iii
List of Tables	vi
List of Figures	vii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. <i>In vitro</i> 실험 : 넙치 두신 식세포의 respiratory burst activity	4
1-1. <i>E.coli</i> RNA 및 EPC cell RNA 분리	4
1-2. 두신 백혈구 분리 및 <i>E.coli</i> RNA와 EPC cell RNA 처리	5
1-3. Luminol 및 zymosan 제작	5
1-4. Chemiluminescence (CL) assay	6
2. <i>In vivo</i> 실험 : 넙치 두신 식세포의 respiratory burst activity	7
2-1. 실험어 및 <i>E.coli</i> RNA 처리	7
2-2. 실험어 및 <i>E.coli</i> RNA와 EPC cell RNA 처리	7
2-3. 두신 백혈구 분리	8
2-4. Chemiluminescence (CL) assay	8
3. Bacterial RNA 분리 및 NF- κ B activity	9
4. Multi-CpG motif를 지닌 long double-stranded RNA의 효과	10
4-1. Vector 제작 및 dsRNA 합성	10
4-2. <i>In vivo</i> 실험	10
4-3. Quantitative Real-time RT-PCR	11
5. 통계 분석	13
III. 결 과	14
1. Chemiluminescence(CL) assay	14
1-1. <i>In vitro</i> 실험	14

1-2. <i>In vivo</i> 실험	16
가. Bacterial RNA 처리	16
나. <i>E.coli</i> RNA 및 EPC cell RNA 처리	18
2. NF- κ B activity	20
3. 넵치에서 type I IFN 반응과 TLR 발현에 대한 poly I:C와 long dsRNA의 효과	23
 IV. 고 찰	 26
 요 약	 31
감사의 글	34
참고문헌	36



**Analysis of immunomodulatory activity of bacterial RNA and CpG
motif-containing long double-stranded RNA in fish**

SU YEON BAEK

Department of Aquatic Life Medicine, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by corresponding receptors trigger the activation of innate immune responses, and each PAMP-specific stimulating properties have been utilized for the development of immunostimulants or vaccine adjuvants. The innate immune system also distinct between live and dead microorganisms through the recognition of vita-PAMPs. Bacterial RNA is a representative vita-PAMP, and has been reported to be able to stimulate both innate and adaptive immunity in mammals. However, no information is available about the effect of vita-PAMPs on fish immunity. The immunostimulating effect of bacterial RNA on respiratory burst activity was investigated by measurements of the chemiluminescent responses of olive flounder kidney phagocytes *in vitro*. The results of this study suggest that bacterial RNA was shown to be immunomodulating on olive flounder leukocytes. In the present study, the immunostimulatory effect of bacterial RNA isolated from *Escherichia coli* was analyzed using juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) as experimental fish. In addition, the immunostimulatory effect of bacterial RNA was compared with that of eukaryotic RNA isolated from *Epithelioma papulosum cyprini*

(EPC) cells. The head-kidney leukocytes were isolated by Percoll density gradient centrifugation for the measurement of respiratory burst activity using chemiluminescence. NF- κ B plays a key role in regulating the immune response to infection. Activity of NF- κ B in EPC cells that treated with bacterial RNA was investigated using luciferase reporter system. As a results, the increase of luciferase activity was detected from supernatant of cell treated with bacterial RNA. Fish can recognize long dsRNAs via either the endosomal TLR3 or the plasma membrane TLR22. Unmethylated CpG dinucleotides in the DNA of various pathogens are recognized as a PAMP by TLR9 in vertebrates including fish. Recognition of CpG DNA by TLR9 triggers the recruitment of MyD88, which activates signal cascade that results in the production of various cytokines and chemokines related to antibacterial and antiviral immune responses. However, to the best of our knowledge, there has been no report concerning on the recognition of long dsRNAs containing unmethylated CpG motifs can exert not only long dsRNA-mediated but also CpG motifs-mediated immunomodulatory effects on hosts. Thus, in the present study, we compared the expression of TLR3, TLR22, TLR9 and type I IFN responsive genes (Mx1 and ISG15) of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to an intraperitoneal injection of in vitro transcribed long dsRNAs containing multiple CpG 1668 motifs. In the present study, the expression of TLR3 and TLR9 was not significantly increased in response to poly I:C, long dsRNA containing GFP or CpG motif sequences. On the other hand, the expression of TLR22 was conspicuously increased by the three molecules. These results suggest that TLR22 may be the main receptor of olive flounder for long dsRNAs administered through an i.p. route. Furthermore, no differences in the immune genes expression between long dsRNA-GFP and long dsRNA-CPG in this study suggests that fish could not recognize CpG motifs in long dsRNAs.

List of Tables

Table 1. Summary of primers used in this study 12



List of Figures

Fig. 1. Effects of <i>E.coli</i> RNA and <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC) cell RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) head kidney phagocytes stimulated with zymosan <i>in vitro</i>	15
Fig. 2. Effects of <i>E.coli</i> RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) head kidney phagocytes stimulated with zymosan <i>in vivo</i>	17
Fig. 3. Effects of <i>E.coli</i> RNA and <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC) cell RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) head kidney phagocytes stimulated with zymosan <i>in vivo</i>	19
Fig. 4. Analysis of NF- κ B activity in <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC) cells by measuring activity of luciferase that was used as the reporter protein	21
Fig. 5. Analysis of NF- κ B activity in <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (EPC) cells by measuring activity of luciferase that was used as the reporter protein	22
Fig. 6. Analysis of Mx1 and ISG15 gene expression in olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) by quantitative real-time RT-PCR	24
Fig. 7. Analysis of TLR3, TLR9 and TLR22 gene expression in olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) by quantitative real-time RT-PCR	25

I. 서론

최근에 비특이적 방어 기전의 활성을 향상시키고 질병으로부터 보호하기 위하여 면역자극제를 사용하는 것에 대한 관심이 높아지고 있다. 선천성 면역계는 침입 병원균의 초기 인식에 중요한 기능을 한다. 선천적 면역 세포의 활성화는 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)라 불리는 병원체 분자 구조를 인식함으로써 이루어진다. PAMP로는 lipopolysaccharide (LPS), lipoprotein, peptiglycan, flagellin, zymosan, double stranded RNA (dsRNA), single stranded RNA (ssRNA), bacterial DNA 등이 있다. 상응하는 수용체에 의한 PAMP의 인식은 선천적 면역 반응의 활성화를 유발하고, 각 PAMP-특이적 자극 특성은 면역 자극제 또는 백신 adjuvant의 개발에 이용되어왔다. 선천적 면역 시스템은 또한 viability associated PAMP (vita-PAMP)의 인식을 통해 살아있는 미생물과 죽은 미생물을 구별해, 오직 살아있는 미생물에만 강한 염증 반응을 유발할 수 있게 한다. Bacterial RNA는 대표적인 vita-PAMP이며, 포유 동물에서 선천성 및 적응성 면역 둘 다를 자극할 수 있다는 것으로 보고되어 있다 (Eigenbrod and Dalpke, 2015). Bacterial RNA는 type I IFN과 NF- κ B-dependent cytokines의 강력한 유도 인자이며 또한 Nlrp3 inflammasome을 활성화 시킬 수 있다. 그러나 vita-PAMP가 어류 면역에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 정보는 거의 없다. 따라서 bacterial RNA를 이용해 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 식세포의 호흡 폭발 (respiratory burst)과 어류 세포에서의 NF- κ B 활성을 보았다.

호흡 폭발은 식세포가 어떤 적절한 자극에 노출될 경우 발생하는 산화 대사 과정에 있어서의 일련의 변화를 말한다. 식세포작용 (phagocytosis) 동

안 어류 식세포는 superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)와 hydroxyl radical (OH)과 같은 reactive oxygen species (ROS)의 생산뿐만 아니라 산소 소비를 증가시킨다. 이러한 ROS는 식세포의 항균 활성화에 중요한 역할을 한다 (Chung and Secombes, 1988; Kim et al., 1999). Chemiluminescence는 대식세포가 식세포작용이나 대식세포의 표면을 자극할 수 있는 물질과 접촉했을 때 자극된 대식세포에서 호흡 폭발과 관계되어 빛을 발사하는 (light emission) 현상을 말한다. 자극을 받은 대식세포는 산화물질을 생산하고 이 산화물질은 어떤 기질(substrate)과 작용하여 높은 에너지를 가지는 dioxetane을 만든다. dioxetane은 다시 전기적으로 흥분된 carbonyl로 분해된다. 즉 고도로 흥분된 산화물질이 이완되면서 photon emission을 일으키는 현상이 chemiluminescence이다 (Suh, 1986).

본 연구에서는 *Escherichia coli*에서 분리한 bacterial RNA의 투여에 따른 넙치의 면역학적 변화를 조사하였다. 그리고 bacterial RNA의 면역 자극 효과를 *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell에서 분리한 eukaryotic RNA와 비교하였다. 면역학적 영향을 조사하기 위하여, 넙치에 *in vivo* 및 *in vitro*상으로 투여한 후, 넙치로부터 분리한 식세포의 chemiluminescence (CL) 반응을 측정함으로써 호흡 폭발 활성을 관찰하였다.

NF- κ B (nuclear factor κ B)는 선천면역반응과 적응면역반응 모두에서 중요한 역할을 한다. NF- κ B는 필요가 없을 때에는 κ B 억제제 (I κ B)와 비활성 복합체를 이루어 세포질에 머문다. IKK는 I κ B를 인산화시켜 NF- κ B를 억제제로부터 유리시킨다. 그 결과 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동한다. 핵 속에서 NF- κ B는 사이토카인, 부착분자 및 감염조직에서 염증상태를 유발하는 데 필요한 다른 단백질에 대한 유전자의 전사를 유도한다. 본 연구에서는 bacterial RNA가 NF- κ B 활성화에 관련이 있는지 알아보기 위해

NF- κ B response element를 가진 luciferase reporter vector가 transfection 된 EPC cell에서 luciferase reporter system을 이용해 분석하였다.

PAMP의 인식은 선천성 면역 세포의 표면 또는 세포질에 존재하는 pattern recognition receptors (PRRs)에 의해 매개된다. PRR에 속하는 Toll-Like Receptors (TLRs)는 선천적 면역 반응을 유발하는 감염성 미생물 병원체의 PAMP 또는 damage-associated molecular patterns (DAMPs)를 인식한다 (Akira et al., 2006; Gay et al., 2006). 포유 동물에서, 바이러스 복제 동안 생성될 수 있는 double-stranded RNAs (dsRNAs)는 endosome에서 TLR3에 의해 인식되며, 이로 인해 interferon (IFN) regulatory factor 3 (IRF3)가 MyD88-independent pathway를 통해 활성화된다 (Alexopoulou et al., 2001; Akira and Takeda, 2004). 어류는 endosome에 있는 TLR3 또는 원형질막에 있는 TLR22를 통해 long dsRNA를 인식할 수 있다 (Matsuo et al., 2008). 다양한 병원체의 DNA에서 unmethylated CpG dinucleotides는 어류를 포함한 척추 동물에서 TLR9에 의해 PAMP로 인식된다 (Ahmad-Nejad et al., 2002; Akira and Takeda, 2004). TLR9에 의한 CpG DNA의 인식은 MyD88의 모집을 유발하는데 이는 signal cascade를 활성화 시켜 항균 및 항바이러스 면역 반응과 관련된 다양한 사이토카인과 케모카인을 생성한다 (Krieg, 2002; Klinman, 2004). 그러나 unmethylated CpG motif를 함유하는 long dsRNA의 인식이 숙주에 대해 long dsRNA-매개뿐만 아니라 CpG motif-매개 면역조절 작용에 영향을 미치는지에 대한 보고는 없다. 따라서, 본 연구에서, multiple CpG 1668 motif를 함유하는 long dsRNA의 복강 주사에 대한 반응으로 넙치의 TLR3, TLR22, TLR9 및 type I IFN 유전자 (Mx1 그리고 ISG15)의 발현을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. *In vitro* 실험 : 넓치 두신 식세포의 respiratory burst activity

1-1. *E.coli* RNA 및 EPC cell RNA 분리

실험에 사용된 *Escherichia coli* DH5a를 Luria-Bertani (LB, LPS Solution) 배지에서 37°C, 24시간 배양하였다. 배양한 후 3000rpm에 10분 원심분리 후 pellet을 모아 Trans Zol Up (Trans Genic)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 세균을 원심분리한 후 상층액을 제거하고 pellet에 TransZol Up 1 ml을 넣고 pipetting한 뒤 실온에서 5분간 반응했다. Chloroform 200 μ l를 첨가하여 강하게 shaking한 후 실온에서 3분간 반응시키고 원심분리 (13000 rpm, 15분, 4°C)하였다. 상층액을 분리하여 Isopropanol 500 μ l를 첨가하고 inverting하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시키고 원심분리하였다. 상층액을 버리고 침전물에 75% ethanol 1 ml을 넣고 vortexing 후 원심분리하였다. 상층액을 제거한 다음 RNA pellet을 상온에서 건조 시킨 후 RNA dissolving solution에 녹였다. 녹인 다음 55-60°C에서 10분간 반응시킨 후 사용 전까지 -70°C에 보관하였다.

실험에 사용된 *epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell은 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE)와 1% penicillin-streptomycin (Pen Strep, WELGENE)을 포함한 Leibovitz-15 배지 (L-15, Sigma)에서 배양

하였다. EPC cell을 3000rpm에 10분 원심분리 후 pellet을 모아 Trans Zol Up (Trans Genic)을 사용하여 total RNA를 분리하였다.

1-2. 두신 백혈구 분리 및 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA 처리

시장에서 구매한 상품용 활 넙치를 MS-222로 마취 후 미부 정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 최대한 제거하였으며, 무균적으로 두신을 절취하였다. heparin (10 U/ml) 및 penicillin (100 μ g/ml)이 첨가된 L-15 배지를 petri dish에 분주한 뒤 nylon mesh를 사용하여 적출한 두신을 마쇄하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 멸균 test tube에 미리 분주해 둔 47% percoll density gradient (GE Healthcare) 용액 위에 조심스럽게 올린 다음 600 g 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구는 원심분리 (3000rpm, 4 $^{\circ}$ C 5 min)하고 heparin과 penicillin 처리된 L-15 배지로 3회 세척하였다.

이렇게 분리한 세포를 tryphan blue로 viability를 확인하였으며, hemocytometer를 이용하여 cell count 후 희석하여 1×10^7 cells/ml로 세포 수를 맞추었다. 불투명 백색 바탕의 96-well plate에 식세포 40 μ l를 넣고 *E.coli* RNA 및 EPC cell RNA를 첨가하여 20 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다.

1-3. Luminol 및 zymosan 제작

Luminol과 zymosan은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 만들었다. Luminol stock 용액 (100 ml)은 KOH 0.78 g, boric acid 0.618 g,

luminol 14 mg을 멸균 증류수 10 ml에 녹인 다음 1×HBSS를 첨가하여 만들었다. CL을 측정하기 전에 1×HBSS로 10배 희석하여 사용하였다.

Zymosan은 멸균된 시험관에 zymosan 50 mg과 phosphate-buffered saline (PBS)을 5 ml을 넣어 boiling water bath에서 30분간 녹인 후 600 g 5분간 원심 분리하였다. PBS로 두 번 세척하고 50 ml PBS에 재부유시켜 zymosan 1 mg/ml이 되도록 제작하여 CL 측정에 사용하였다.

1-4. Chemiluminescence (CL) assay

식세포 40 μ l에 luminol 70 μ l을 넣은 후 10분간 반응시킨 다음 zymosan 30 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후 VICTOR 3 multilabel plate reader (PerkinElmer)를 이용하여 측정하였다.

2. *In vivo* 실험 : 넙치 두신 식세포의 respiratory burst activity

2-1. 실험어 및 *E.coli* RNA 처리

실험어인 양식 넙치 (체장 : 평균 17.4 cm, 체중 : 평균 43.7 g)는 운반 후 7일간 20°C에서 순치하였으며, 병원체 감염 여부를 확인 후 실험을 진행하였다. 넙치에 대한 bacterial RNA 투여에 따른 CL 반응의 영향을 측정하기 위하여, 넙치를 tricaine methanesulphonate (MS-222, Sigma)로 마취시켜 *E.coli* RNA 50 µg/100 µl를 그룹당 3마리씩 복강 주사하였으며, 대조구는 동량의 nuclease free water를 복강 주사하였다. 복강 주사 후 24시간 후에 두신을 절취하여 CL 반응을 측정하였다.

2-2. 실험어 및 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA 처리

실험어인 양식 넙치 (체장 : 평균 10.1 cm, 체중 : 평균 9.2 g)는 운반 후 7일간 20°C에서 순치하였으며, 병원체 감염 여부를 확인 후 실험을 진행하였다. 넙치에 대한 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA 투여에 따른 CL 반응의 영향을 측정하기 위하여, 넙치를 MS-222로 마취시켜 RNA 10 µg/100 µl를 그룹당 9마리씩 복강 주사하였으며, 대조구는 동량의 nuclease free water를 복강 주사하였다. 복강 주사 후 1일, 3일, 7일 후에 두신을 절취하여 CL 반응을 측정하였다.

2-3. 두신 백혈구 분리

실험어를 MS-222로 마취 후 두신을 무균적으로 분리하여 heparin (10 U/ml), penicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 Leibovitz-15 배지 (L-15, Sigma)를 petri dish에 분주한 뒤 nylon mesh를 사용하여 적출한 두신을 마쇄하여 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 멸균 test tube에 미리 분주해 둔 47% percoll density gradient (GE Healthcare) 용액 위에 조심스럽게 올린 다음 600 g 4°C에서 30분간 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구는 원심분리 (3000rpm, 4°C 5 min)하고 heparin과 penicillin 처리된 L-15 배지로 3회 세척 하였다. 이렇게 분리한 세포를 tryphan blue로 viability를 확인하였으며, hemocytometer를 이용하여 cell count 후 희석하여 1×10^7 cells/ml로 세포 수를 맞추었다.

2-4. Chemiluminescence (CL) assay

1×10^7 cells/ml로 조정된 식세포를 불투명 백색 바탕의 96-well plate에 40 μl 씩 분주하고 luminol 70 μl 을 넣은 후 10분간 반응시킨 다음 zymosan 30 μl 를 첨가하여 잘 혼합한 후 VICTOR 3 multilabel plate reader (PerkinElmer)를 이용하여 측정하였다.

3. Bacterial RNA 분리 및 NF- κ B activity

실험에 사용된 *Escherichia coli* DH5a는 LB 배지에서 37°C, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*는 1.5% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB, Difco)에서 27°C에서 배양한 후 3000rpm에 10분 원심분리 후 pellet을 모아 Trans Zol Up (Trans Genic)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. *S.iniae*는 pellet에 lysozyme 2 ml (5 mg/ml)을 37°C에서 30분 동안 처리하고 원심분리 후 RNA를 분리하였다.

pNF- κ B-Metluc reporter vector를 EPC cell에 transfection 후 selection 하여 제작한 cell을 6 well plate에 2×10^6 cells씩 분주하여 28°C에서 배양하였다. 세포가 monolayer로 자랐을 때, polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C, Sigma), *E.coli* RNA, *E.tarda* RNA, *S.iniae* RNA, *V.anguillarum* RNA를 100 μ g/ml 첨가하였다. 12시간, 24시간, 48시간 후에 각 세포에서 상층액 50 μ l를 수집하여 Ready-To-Glow secreted luciferase reporter assay kit (Clontech)와 VICTOR 3 multilabel plate reader (PerkinElmer)를 이용하여 매뉴얼에 따라 luciferase 활성을 측정하였다. 같은 방법으로 LPS (Sigma)를 농도별로 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g 처리한 후 12시간, 24시간, 48시간 후에 luciferase 활성을 측정하였다.

4. Multi-CpG motif를 지닌 long double-stranded RNA의 효과

4-1. Vector 제작 및 dsRNA 합성

BglII 와 BamHI 제한효소 부위를 함유하는 CpG 1668의 15개 copies를 인공적으로 합성하고 pUC57 vector (Cosmo Genetech)에 삽입하였다. 그리고 fragment GFP를 pGFP vector와 primer pair (GFP-F-EcoRI, GFP-R-HindIII)를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 증폭된 생성물을 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning하고 서열 분석하였다. 15개의 CpG 1668 motif 및 GFP 서열을 가지는 각각의 단편을 BglII/BamHI 및 EcoRI/HindIII으로 분해하여 절개하고, 동일한 제한효소로 pLitmus28i (NEB) vector에 ligation하여 pLit-CpG와 pLit-GFP를 생성하였다. GFP 또는 multiple CpG 1668 motif를 지닌 long dsRNA를 제조사의 매뉴얼에 따라 MEGAscript RNAi kit (Ambion)를 사용하여 in vitro 합성을 하였다. long dsRNA는 agarose gel electrophoresis에 의해 확인하고 spectrophotometer를 사용하여 정량하였다.

4-2. *In vivo* 실험

넙치 (약 3-4 g)를 무작위로 4그룹 (15 fish/50 L tank)으로 분주하고, 실험 전에 적어도 2주 동안 순치시켰다. 각 그룹의 어류는 어류 당 30 μ g의 용량으로 multiple CpG 1668 motif 또는 GFP를 지닌 long dsRNA를 복강

주사하였다. positive control group의 어류는 어류 당 30 μg 의 poly I:C를 주입하였고, negative control group의 어류에는 PBS만 주입하였다. 주사 후 3시간, 6시간과 12시간에 각 탱크에서 5마리씩 무작위로 샘플링 하였다.

4-3. Quantitative Real-time RT-PCR

각각의 시간에 샘플링한 신장으로부터 Hybrid-R kit (GeneAll)을 사용하여 total RNA를 추출한 후, DNase I (GeneAll)로 total RNA를 처리하고, Riboclear plus kit (GeneAll)를 사용하여 DNA를 제거하여 RNA를 정제하였다. first-strand cDNA를 합성하기 위해, 1 μg 의 RNA를 HyperScript First strand Synthesis kit (GeneAll)를 사용하여 oligo(dT) primer와 함께 배양하였다. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)은 PCR primer set를 사용하여 Light Cycle 480 (Roche)에 의해 수행되었다 (Table 1). PCR을 수행하기 위하여 cDNA 5 μl , 5 pM primer, 2 \times SYBR Green Premix (Enzymomics, Korea)을 넣어 20 μl 의 혼합액을 만든 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 1 cycle (pre-incubation), 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초간 40 cycle을 반응시켰다.

Table 1. Summary of primers used in this study

Name of primer	Restriction enzyme	Sequence (5' to 3')
GFP	EcoR I	F GAATTC ATGAGTAAAGGAGAAGAAC
	HindIII	R AAGCTT TTT ATTTGTAGAGCTCATC
Beta-actin		F GATCTGGCATCACACCTTCTAC
		R CATCTTCTCCCTGTTGGCTTTA
Mx1		F ACCGCTGATTATTCGCTACCACCT
		R AACCAATGTCCAGCTCCTCCTTCA
ISG15		F TGCTGTATGACAACGGTCAG
		R GCTCGATCAGCAGAGACAG
TLR3		F AGCACCCCTGGAGAGTTTAATG
		R TGCAACTACACCAGCTCATATC
TLR9		F GAAGGGCCTCACTTGGATTAG
		R AGGAGATGTTCCAGACCAGATA
TLR22		F CGTGTACAACCCTCCTGTTTAT
		R GTCAAAGAGCAAAGCCAAGAAG

The bold letters indicate restriction enzyme sites

5. 통계 분석

실험 분석 결과에 대한 통계학적 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시한 후 Dunnett multiple Range test를 통해 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



Ⅲ. 결 과

1. Chemiluminescence (CL) assay

1-1. *In vitro* 실험

양식 넓치에 있어 *in vitro*상으로 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA에 따른 면역 세포 활성의 변화를 측정하기 위하여 백혈구에 처리 후 1시간 반응한 뒤 CL 활성을 측정하였다 (Fig. 1). *E.coli* RNA를 처리한 실험구는 14분 전·후에서 peak를 이루었고 5 μ g, 1 μ g, 0.5 μ g에서 대조구 보다 높은 CL 반응이 나타났다. 대조구는 24분 전·후에서 peak를 이루었다. *E.coli* RNA를 농도별로 처리한 결과 농도가 낮을수록 높은 CL 반응이 나타났다.

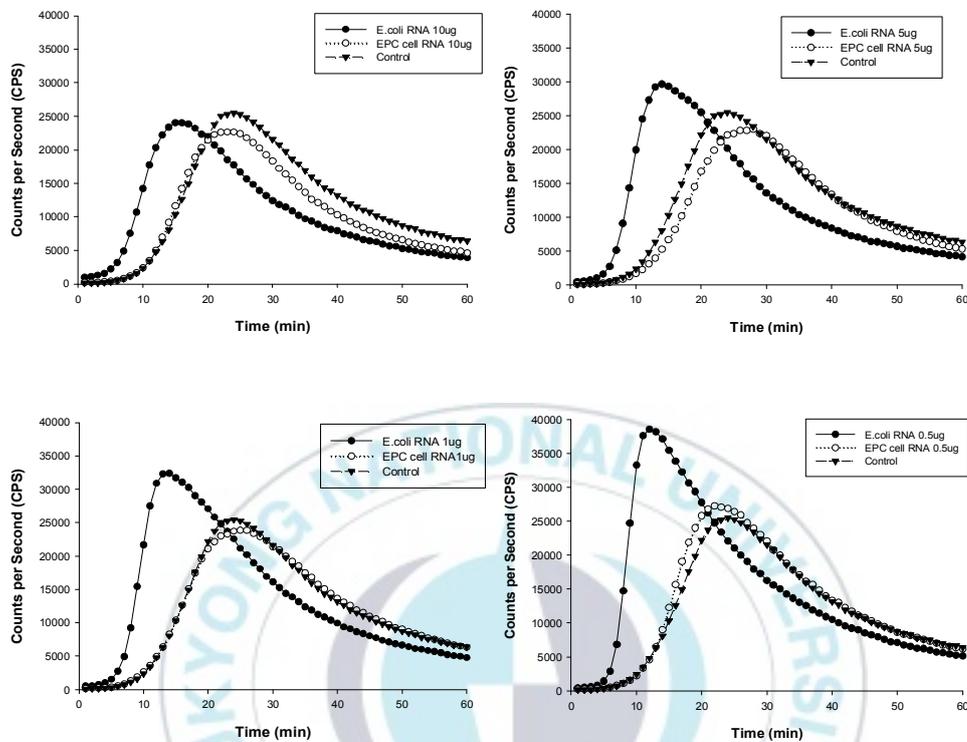
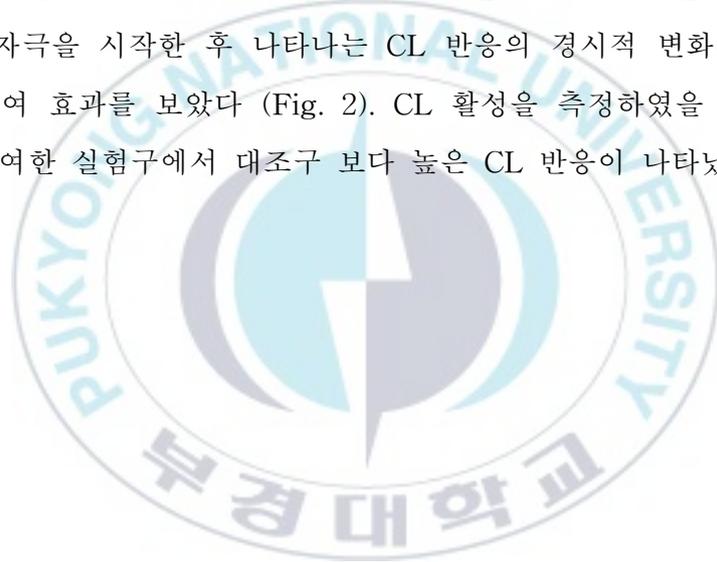


Fig. 1. Effects of *E.coli* RNA and *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney phagocytes stimulated with zymosan *in vitro*. Leukocytes were pre-cultured for 1 h with nuclease free water (control) or various concentrations (10, 5, 1 and 0.5 μg) of *E.coli* RNA and EPC cell RNA at 20°C, and then stimulated with zymosan. Reactive oxygen species (ROS) production was measured by chemiluminescent (CL) response.

1-2. *In vivo* 실험

가. Bacterial RNA 처리

양식 넘치에 있어 *in vivo*상으로 bacterial RNA 투여에 따른 면역세포 활성의 변화를 측정하기 위하여 *E.coli* (DH5a)로부터 분리한 RNA 50 μg /100 μl 를 복강 주사하였다. 24시간 후 두신으로부터 백혈구를 분리해 zymosan 자극을 시작한 후 나타나는 CL 반응의 경시적 변화와 bacterial RNA의 투여 효과를 보았다 (Fig. 2). CL 활성을 측정하였을 시에 *E.coli* RNA를 투여한 실험구에서 대조구 보다 높은 CL 반응이 나타났다.



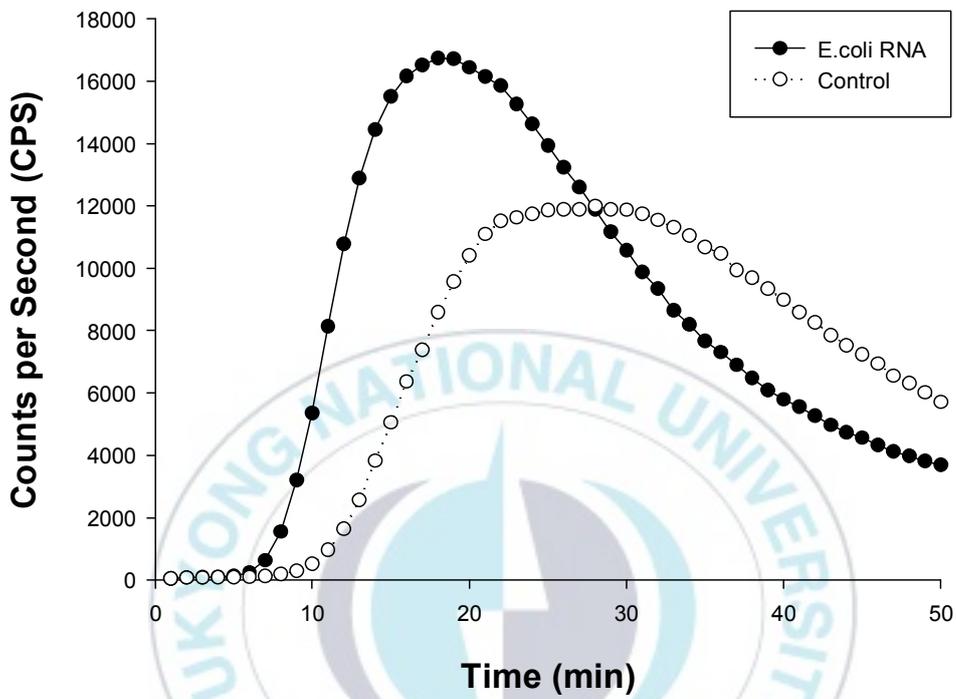


Fig. 2. Effects of *E.coli* RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney phagocytes stimulated with zymosan *in vivo*.

나. *E.coli* RNA 및 EPC cell RNA 처리

양식 넙치에 있어 *in vivo*상으로 *E.coli* (DH5a) RNA와 EPC cell RNA 투여에 따른 면역 세포 활성의 변화를 측정하기 위하여 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 로 복강 주사하였다. 주사 후 1일, 3일, 7일째에 백혈구를 분리하여 CL 활성을 측정하였다 (Fig. 3). 1일, 3일째 넙치 식세포의 CL 반응은 EPC cell RNA 및 대조군과 비교하여 *E.coli* RNA에 의해 유의하게 향상되었다. 그러나 주사 후 7일째에는 대조군과 비교하여 모든 실험 그룹에서 유의한 차이가 없었다.



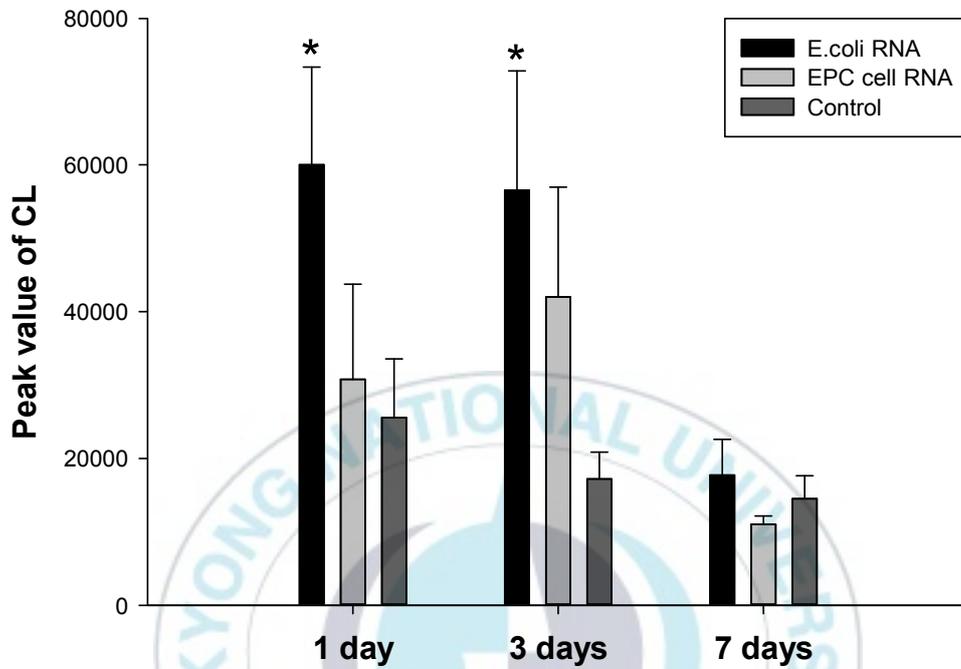


Fig. 3. Effects of *E.coli* RNA and *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell RNA on the respiratory burst activity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney phagocytes stimulated with zymosan *in vivo*. Asterisks on the bars represent significantly different at $p < 0.05$ (*) compared to control group.

2. NF- κ B activity

pNF- κ B-Metluc reporter vector가 transfection된 EPC cell에 LPS를 농도별 (10, 1, 0.1 μ g)로 자극해 12시간, 24시간, 48시간 후에 luminometer로 luciferase activity를 측정했을 때 (Fig. 4), 대조구간에 유의한 차이가 없었다. EPC cell에 bacterial RNA를 처리 후 NF- κ B 활성을 측정한 결과 (Fig. 5), 대조구와 비교해 보았을 때 *E.coli* RNA, *E.tarda* RNA, *S.iniae* RNA, *V.anguillarum* RNA 100 μ g/ml로 자극 후 NF- κ B 활성이 증가하였다.



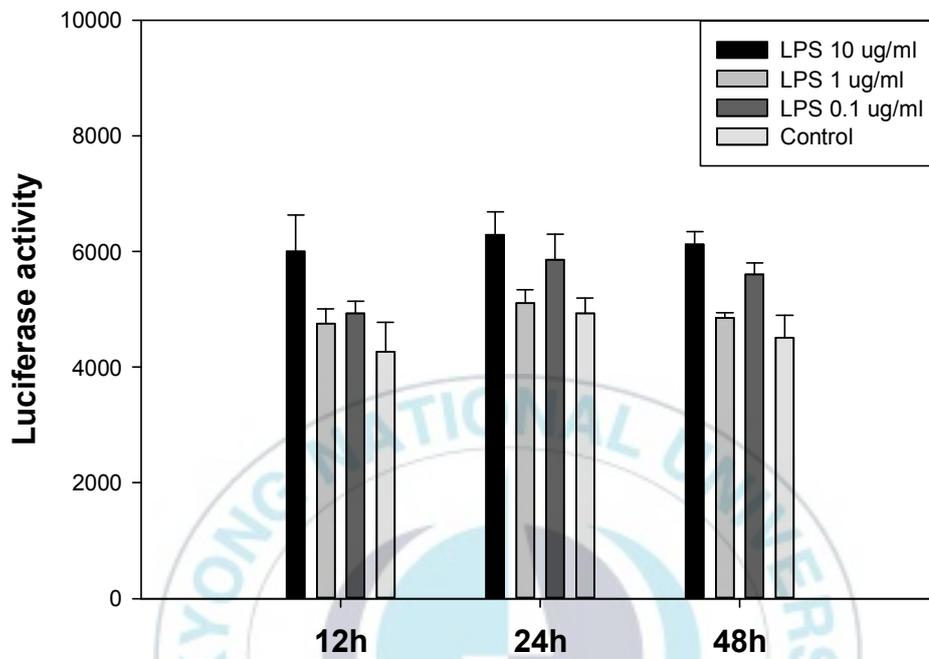


Fig. 4. Analysis of NF- κ B activity in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells by measuring activity of luciferase that was used as the reporter protein. EPC cells were treated with various concentrations (10, 1 and 0.1 μ g) of LPS, and luciferase activity was analyzed at 12 h, 24 h, and 48 h post-treatment.

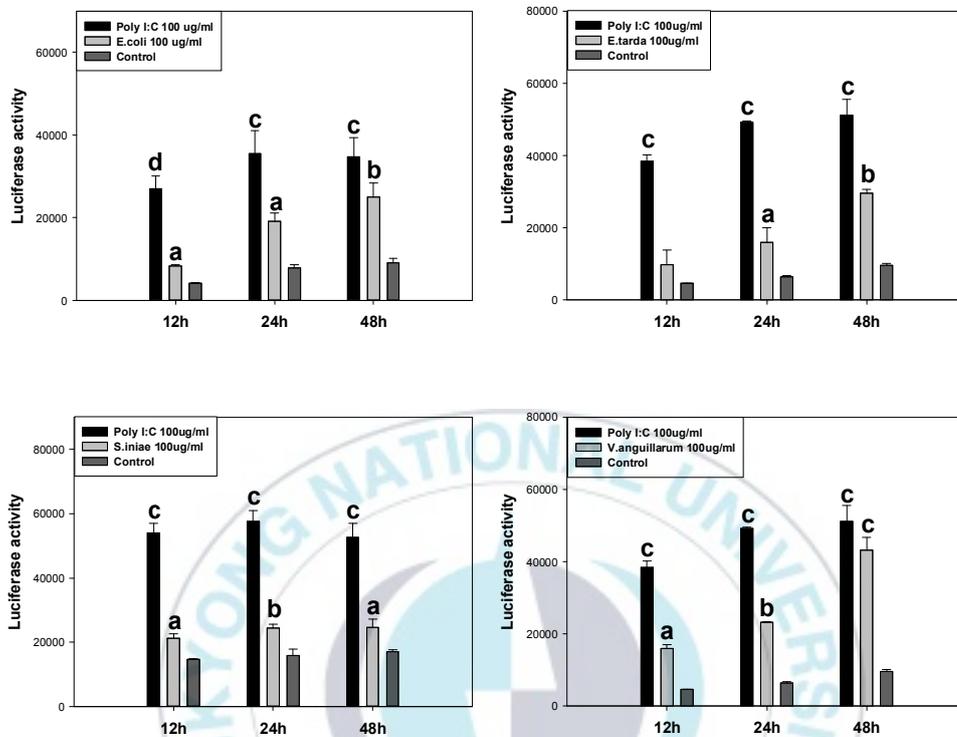


Fig. 5. Analysis of NF- κ B activity in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells by measuring activity of luciferase that was used as the reporter protein. EPC cells were treated with poly I:C (100 μ g/ml) and bacterial RNA, and luciferase activity was analyzed at 12 h, 24 h, and 48 h post-treatment. Different letters on the bar represent significantly different at $p < 0.05$ compared to control group.

3. 넙치에서 type I IFN 반응과 TLR 발현에 대한 poly I:C와 long dsRNA의 효과

Poly I:C, multiple CpG 1668 motif를 지닌 long dsRNA와 GFP를 지닌 long dsRNA를 자극함으로써 넙치에서 Mx, ISG15, TLR3, TLR9 그리고 TLR22 유전자 발현을 주사 후 3시간, 6시간, 12시간째에 quantitative real-time RT-PCR 분석하였다 (Fig. 6). Multiple CpG 1668 motifs-long dsRNA로 주사된 넙치에서 type I IFN 유전자 (Mx1 그리고 ISG15) 발현은 poly I:C 또는 GFP-long dsRNA로 주사한 어류와 유사하였다. 그리고 TLR3와 TLR9은 poly I:C, multiple CpG 1668 motifs-long dsRNA와 GFP-long dsRNA에 대하여 발현되지 않았다. 그러나 TLR22의 발현은 상당히 증가 되었다.

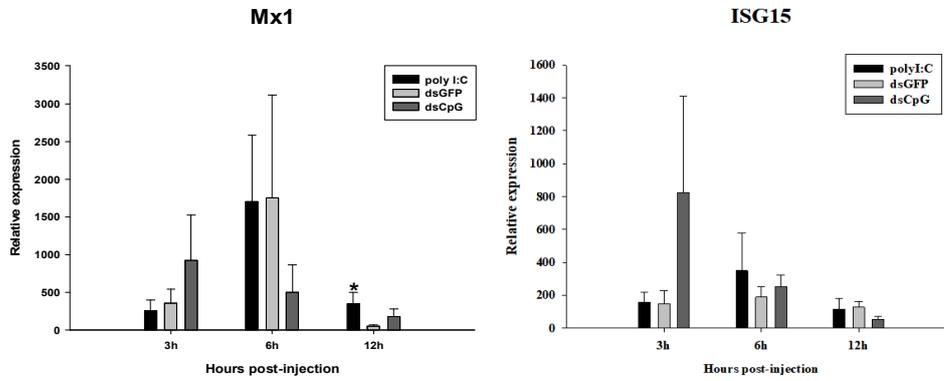


Fig. 6. Analysis of Mx1 and ISG15 gene expression in olive flounder (*paralichthys olivaceus*) by quantitative real-time RT-PCR. Asterisks on the bars represent significantly different at $p < 0.05$ (*) compared to control group.

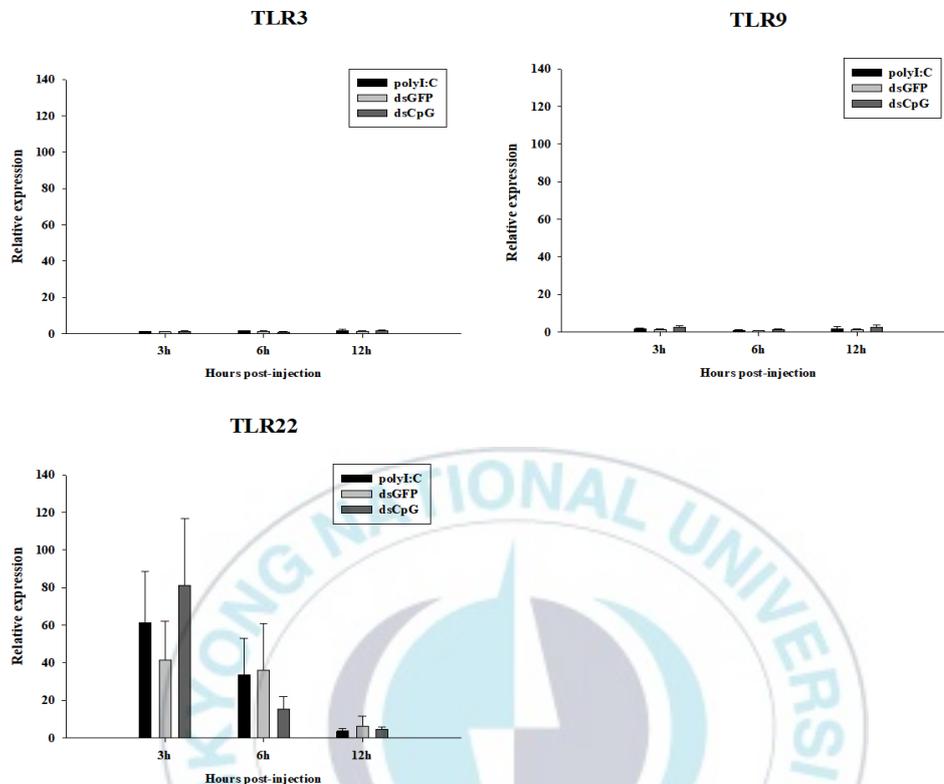


Fig. 7. Analysis of TLR3, TLR9 and TLR22 gene expression in olive flounder (*paralichthys olivaceus*) by quantitative real-time RT-PCR.

IV. 고찰

선천성 면역계는 PAMP의 인식을 통해 self와 non-self를 구별할 수 있을 뿐만 아니라, vita-PAMP를 통해 살아있는 미생물과 죽은 미생물을 구별할 수 있다. 그리하여 오직 살아있는 미생물에 강한 염증 반응을 유발할 수 있게 한다 (Blander and Sander, 2012; Sander et al., 2011). 생백신은 죽은 백신보다 더 강력한 면역 반응을 일으키는 것으로 알려져 있는데, vita-PAMP를 포함하는 백신 제제는 생백신의 높은 면역력과 죽은 백신의 높은 안전성 둘 다의 특징을 가질 수 있다. 대표적인 vita-PAMP로 bacterial RNA는 포유 동물에서 선천성 및 적응성 면역 둘 다를 자극할 수 있다. *E.coli* mRNA는 포유류의 면역 세포에서 pyroptosis와 IL-1 분비를 유도한다 (Sander et al., 2011). 본 연구에서는 양식 넘치에 있어 *in vitro*와 *in vivo*상으로 bacterial RNA에 따른 식세포의 호흡 폭발 (respiratory burst)을 측정하기 위하여 백혈구를 분리해 CL 반응을 측정하였다.

침입하는 병원체에 대한 식세포 등의 호흡 폭발 활성 (respiratory burst activity)은 감염에 대한 주요 방어 기작이다 (Secombes, 1996). 호흡 폭발은 세포 내 효소가 산소를 높은 반응성과 독성을 지닌 과산화 음이온 및 과산화 수소화시켜 살균작용을 하도록 하는 것으로 수용체-ligand 결합이 일어나면 NADPH oxidase 효소가 활성화되면서 이루어진다 (Kim and Seoh, 1998). Zymosan은 NADPH oxidase를 활성화하고 식세포의 호흡 폭발을 유발하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 자극제이다. Zymosan으로 유도된 호흡 폭발은 세포 외 칼슘에 의존하며 수용체-매개 식균 작용을 동반한다. CL 반응은 산소가 ROS로 전환되는 식세포의 호흡 폭발 활성을

측정한다. ROS와 luminol을 반응시켜 생성되는 형광물질의 양을 측정하는 CL 반응법은 민감도가 매우 높고 연속적으로 측정할 수 있는 장점이 있기 때문에 비특이적 면역능의 평가에 많이 활용되고 있다 (Roszell and Anderson, 1994; An et al., 2012). *In vitro* 실험에서 넙치 두신으로부터 분리한 백혈구에 *E. coli* RNA를 농도별로 처리한 결과, *E. coli* RNA에 의해 호흡 폭발 활성이 대조군에 비해 더 빠른 시간대에 발생하고 것을 볼 수 있었다. 식세포의 활성화는 감염성 병원체에 대한 숙주의 비특이적 방어에서 중요하므로, bacterial RNA는 넙치 백혈구에서 면역 자극제로 작용할 가능성이 있다. *E. coli* RNA를 농도별로 처리 후 CL 반응을 측정했을 때, 농도가 낮을수록 CL 반응이 증가했다. 이는 ROS가 살균작용을 하는 장점도 있지만 세포의 구성물질인 단백질, 지질, DNA 등을 손상시켜 세포사멸을 일으키므로, *in vitro*에서 bacterial RNA 농도가 높을수록 CL 반응이 낮아진 것으로 생각된다. *In vivo* 실험에서, 주사 후 1일, 3일째 넙치 식세포의 CL 반응은 EPC cell RNA 및 대조군과 비교하여 *E. coli* RNA에 의해 유의하게 향상되었다. EPC cell RNA를 주사한 어류에서 분리한 백혈구의 CL 반응은 *E. coli* RNA보다 낮았지만, 대조군 어류보다 높은 활성을 보였다. 그러나 주사 후 7일째에는 대조군과 비교하여 모든 실험 그룹에서 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 bacterial RNA가 넙치 식세포의 면역성을 향상시키는 것으로 보여진다. 게다가 EPC cell RNA는 넙치를 활성화시킬 수 있는 위험 신호로 인식될 수 있다고 생각된다.

NF- κ B는 염증반응 조절, 면역체계 조절 (immune modulation), 세포고사 (apoptosis), 세포증식 등에 관여하는 단백질군으로 다양한 유전자들의 발현을 조절하며 세포 내의 신호전달 체계의 중심축을 이루고 있다. 본 연구에서는 *In vitro* 상에서 bacterial RNA에 의한 NF- κ B의 활성을 확인하기 위해서 luciferase reporter assay를 사용하여 측정하였다. RNA 분리 시 남

아있을 수 있는 LPS에 의해 NF- κ B 활성이 증가하는지 확인하기 위해 LPS를 농도별로 측정해본 결과 대조군과 비슷한 활성을 보였다. *E.coli* RNA, *E.tarda* RNA, *S.iniae* RNA, *V.anguillarum* RNA로 자극 후 NF- κ B 활성을 측정한 결과 활성이 증가하였다. 그 결과, bacterial RNA가 NF- κ B 활성을 증가시키는데 기여한다는 것을 확인할 수 있었다.

최근 포유 동물에서 면역 치료제 및 백신 보조제로 CpG-oligodeoxynucleotides (ODNs)의 사용이 크게 확대되었고, 양식 어류에서 전염병을 통제할 수 있는 가능성도 보고 되었다 (Oumouna et al., 2002; Jørgensen, 2001a; Tassakka and Sakai, 2002). 합성된 dsRNA 분자인 poly I:C 또는 자연적으로 발생하는 long dsRNA는 어류를 포함한 척추 동물에서 type I interferon 반응을 향상시키는 것으로 알려져 있으며, 바이러스 감염에 대한 내성을 증가시키는 데 사용되었다. 이전에 unmethylated CpG motif 및 poly(G) tail을 가진 single-stranded RNA가 인간 단핵구와 PBMC를 자극하여 IL-6, IL-12를 생성하고 NF- κ B, p38 MAPK를 활성화시켰으며 이는 CpG-ODN의 면역 자극 효과와 유사하다고 보고되었다 (Sugiyama et al., 2005). 그리고 CpG motif를 지닌 dsRNA가 넙치에서 바이러스 및 기생충 감염에 대한 면역 반응과 질병 저항성을 향상시킬 수 있는 효과적인 면역 자극제로 사용될 수 있다고 보고되었다 (Kang, 2012). TLR2는 어류에만 존재하며 dsRNA의 인식에 관여한다. 먹도미류 (gilthead seabream)에서 poly I:C는 대식세포에서 TLR2의 발현을 유도하였다 (Muñoz et al., 2014). 복어에서 TLR3는 소포체에 존재하며 비교적 짧은 크기의 dsRNA를 인식하는 반면, TLR2는 세포 표면에서 긴 크기의 dsRNA를 인식하였다 (Matsuo et al., 2008). 어류가 TLR3 및 TLR2와 TLR9을 통해 각각 long dsRNA와 unmethylated CpG DNA를 인식할 수 있다는 것이 입증되었지만 (Matsuo et al., 2008; Samanta, 2013; Yeh,

2013), CpG motif sequence를 지닌 long dsRNA의 효과에 대한 정보는 없어 넙치에서 유전자 발현을 통해 그 효과를 분석하였다. 다양한 어종에 대한 CpG-ODN의 면역 자극 효과가 보고되어 있는데 (Tassakka and Sakai, 2005; Carrington and Secombes, 2006), 실험에 사용된 CpG-ODN은 대부분 B-class ODN이었다. B-class ODN에 속하는 CpG-ODN 1668은 넙치에 투여하였을 때 기생충 감염에 대하여 높은 생존율을 보였다 (Lee and Kim, 2009). 그리하여 CpG-ODN 1668 sequence를 사용한 multiple CpG motif를 지닌 long dsRNA를 가지고 실험하였다. 본 연구에서 multiple CpG motif를 지닌 long dsRNA를 투여한 넙치에서 Mx1과 ISG15 유전자 발현은 poly I:C 또는 GFP sequence를 함유하는 long dsRNA를 투여한 어류의 것과 유사하여, CpG-dsRNA가 넙치에서 type I IFN 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다. Poly I:C 및 CpG-ODN에 대하여 TLR3 및 TLR9의 상향 조절이 여러 어종에서 보고된 바 있지만 (Samanta et al., 2013; Kang, 2012), 이들 유전자의 증가는 높지 않았다. 본 연구에서 TLR3와 TLR9의 발현은 poly I:C, GFP 또는 CpG motif sequence를 지닌 long dsRNA에 대하여 유의하게 증가 되지 않았다. 한편, TLR22의 발현은 poly I:C, GFP 또는 CpG motif sequence를 함유하는 long dsRNA에 의해 현저하게 증가 되었다. 이러한 결과는 TLR22가 복강을 통해 투여된 long dsRNA에 대한 넙치의 주요 수용체일 수 있음을 시사한다. 또한 이번 연구에서 long dsRNA-GFP와 long dsRNA-CPG 사이의 유전자 발현 차이가 없는 것은 어류가 long dsRNA에서 CpG motif를 인식하지 못하는 것을 보여준다.

결론적으로 본 실험에서는 bacterial RNA 및 CpG motif를 지닌 long dsRNA가 어류의 면역에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였다. 그 결과 bacterial RNA가 *in vitro*와 *in vivo*상에서 넙치 식세포의 호흡폭발능을

증가시키고 어류 세포에서 NF- κ B 활성을 증가시켰다. 이를 통해 vita-PAMP인 bacterial RNA가 어류의 면역을 향상시키는 능력을 가지고 있어 면역 자극제로써 사용이 가능할 것으로 생각된다. CpG motif를 지닌 long dsRNA는 넙치에 복강 주사하였을 때 TLR22에 의해 인식되어 type I IFN 반응을 유도하였는데, dsRNA에서 CpG motif는 인식하지 못하는 것으로 생각된다.



요 약

상응하는 수용체에 pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)의 인식은 선천적 면역 반응의 활성화를 유발하고, 각 PAMP-특이적 자극 특성은 면역 자극제 또는 백신 보조제의 개발에 이용되어왔다. 선천적 면역 시스템은 또한 vita-PAMP의 인식을 통해 살아있는 미생물과 죽은 미생물을 구별한다. 그중 Bacterial RNA는 대표적인 vita-PAMP이며, 포유 동물에서 선천성 및 적응성 면역 둘 다를 자극할 수 있다는 것으로 보고되었다. 그러나 vita-PAMP가 어류 면역에 미치는 영향에 대한 정보는 없다. 본 연구에서는 *Escherichia coli*에서 분리한 RNA의 면역 자극 효과를 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 이용하여 분석하였다. 또한 prokaryotic RNA와 eukaryotic RNA의 면역 자극 효과를 비교하기 위하여 *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell로부터 분리된 eukaryotic RNA를 이용하여 효과를 비교하였다. *In vitro* 실험에서 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA에 대한 호흡 폭발 활성을 chemiluminescence (CL)를 이용해 측정된 결과, *E.coli* RNA와 배양된 식세포가 EPC cell RNA와 대조군과 비교하여 호흡 폭발 활성 (respiratory burst activity)이 증가 된 것으로 나타났다. 이러한 결과를 보았을 때 bacterial RNA가 넙치 식세포에 대한 면역 자극 효과가 있는 것을 보여준다. *In vivo* 실험에서는 *E.coli* RNA와 EPC cell RNA를 넙치에 복강 주사하였고, 대조군 어류는 동일한 양의 nuclease free water를 주사하였다. 두신 백혈구는 Percoll density gradient를 통해 분리하고 CL assay를 통해 호흡 폭발 활성을 측정하였다. 넙치 식세포의 CL 반응은 EPC cell RNA와 대조군과 비교하여 bacterial RNA에 의해 유의하게 향상되었다. EPC cell RNA를 주사한 어류에서 분리한 백혈구의

CL 반응은 bacterial RNA를 주사한 어류의 CL 반응보다는 낮았지만, 대조군 어류보다는 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 bacterial RNA가 식세포의 면역성을 향상시키는 능력을 가지고 있음을 시사한다. NF- κ B는 감염에 대한 면역 반응을 조절하는 데 중요한 역할을 하는데, Bacterial RNA로 처리된 EPC cell에서 NF- κ B의 활성을 luciferase reporter system을 사용하여 조사하였다. Bacterial RNA는 *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*으로부터 분리한 RNA를 사용하였고, pNF- κ B-Metluc reporter vector가 transfection된 EPC cell에 RNA를 처리하였다. Luciferase 측정 결과 bacterial RNA로 처리된 세포에서 NF- κ B의 활성이 증가하였다.

어류는 TLR3 또는 TLR22를 통해 long dsRNA를 인식할 수 있다. 다양한 병원체의 DNA에서 unmethylated CpG dinucleotides는 어류를 포함한 척추 동물에서 TLR9에 의해 PAMP로 인식된다. TLR9에 의한 CpG DNA의 인식은 MyD88의 모집을 유발하는데 이는 signal cascade를 활성화시켜 항균 및 항바이러스 면역 반응과 관련된 다양한 사이토카인과 케모카인을 생성한다. 그러나 unmethylated CpG motif를 함유하는 long dsRNA의 인식이 숙주에 대해 long dsRNA-매개뿐만 아니라 CpG motifs-매개 면역 조절 작용 (immunomodulatory effect)으로 미치는지에 대한 보고는 없다. 따라서 multiple CpG 1668 motif를 함유하는 long dsRNA의 복강 주사에 대한 반응으로 넙치의 TLR3, TLR22, TLR9 및 type I IFN 유전자 (Mx1 그리고 ISG15)의 발현을 비교하였다. 본 연구에서 TLR3와 TLR9의 발현은 poly I:C, GFP 또는 CpG motif sequences를 함유하는 long dsRNA에 대하여 유의하게 증가 되지 않았다. 한편, TLR22의 발현은 poly I:C, GFP 또는 CpG motif sequences를 함유하는 long dsRNA에 의해 현저하게 증가되었다. 이러한 결과는 TLR22가 복강을 통해 투여된 long dsRNA에 대

한 넓치의 주요 수용체일 수 있음을 나타낸다. 또한 이번 연구에서 long dsRNA-GFP와 long dsRNA-CPG 사이의 면역 유전자 발현의 차이가 없는 것은 어류가 dsRNA에서 CpG motif를 인식하지 못하는 것으로 보인다.



감사의 글

먼저 길다면 길고 짧다면 짧은 2년의 석사과정 동안 많은 지도와 관심을 주신 김기홍 지도교수님께 깊이 감사드립니다. 교수님의 가르침을 통해 연구가 무엇인지, 제게 부족한 점이 무엇이고 어떤 방향으로 나아가야 할지에 대해 알 수 있었습니다. 그리고 바쁘신 가운데에도 학위논문의 심사위원을 맡아주시고 좋은 조언을 해주신 정현도 교수님과 정준기 교수님, 학부 과정부터 많은 가르침을 주셨던 김도형 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사드립니다.

함께 동고동락하였던 실험실원 분들께도 감사드립니다. 실험에 있어서 많은 도움을 주시고 항상 친절하게 알려주신 민선 선배, 늘 신경 써 주시고 장난치며 편하게 다가와 주신 선영 언니, 실험에 대해 함께 고민해주셨던 준성 선배, 성실하고 열심히 하는 모습이 멋진 정인 언니, 실험실원들을 잘 챙겨주고 이끄는 방장님 소연 언니, 나의 영어 선생님이자 퇴근길에 말동무가 되어주었던 메리엠 언니, 실험실 동기로서 많은 도움을 주고 큰 힘이 되어준 경민이, 준비실 옆자리에서 많이 챙겨줬던 수정 언니, 밝은 에너지로 나에게 활기를 되찾아줬던 아기자기 재영이, 무엇이든 열심히 하는 실험실 분위기 메이커 은경이, 힘든 내색 한번 하지 않고 묵묵히 도와준 성목이에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 심적으로 많은 도움을 주었던 미정 언니를 비롯한 같이 실험실 생활을 했던 모든 분들께 감사드립니다.

학위논문을 마치기까지 신경 써주신 허재영 조교님, 한재민 조교님, 그리고 실험에 많은 도움을 주신 다른 실험실원 분들께도 감사드립니다. 6년간 함께하며 응원해주고 격려해준 보경, 정은, 아현, 예은, 다정, 소영 언니, 시

은 언니, 현아, 가혜, 복도에서 마주치면 반갑게 인사해준 주형, 현재, 항상
옆에서 힘이 되어준 나의 소울메이트 도윤이에게 감사의 마음을 전합니다.
이 외에도 그동안 도움을 주신 모든 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

마지막으로 항상 저를 믿어주시고 응원해주시는 사랑하는 부모님과 아낌
없는 조언을 해준 오빠에게 감사의 마음을 전합니다.



참 고 문 헌

- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32, 1958-1968.
- Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, pp. 783-801
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- An, J. Y., Lee, H. N., Park, K. I., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Park, K. H. (2012). Effects of N-acetylcysteine (NAC) on non-specific immune parameters, respiratory burst and lysozyme activities, in different fishes. *J. Fish Pathol.*, 25(1) : 1-10
- Auch, C. J., Saha, R. N., Sheikh, F. G., Liu, X., Jacobs, B. L., Pahan, K.

- (2004). Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. *FEBS Lett.* 563, 223-228.
- Blander, J. M., Sander, L. E. (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol.*, 12:215-225
- Chung, S. and Secombes, C. J. (1988). Analysis of events occurring within teleost macrophage during the respiratory burst. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B: 539-544.
- Eigenbrod, T., Dalpke, A. H. (2015). Bacterial RNA : An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses. *J Immunol.* 195 (2) 411-418
- Fernandez-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M. C., Bejar, J., Borrego, J. J., Manchado, M. (2008). Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish Shellfish Immunol.* 24, 279-285.
- Gay, N. J., Gangloff, M. and Weber, A. N. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol.* 6(9):693-8
- Ha, S. J., Woo, S. J., Lee, D. C., Park, S. I. (2008). Responses of

- edwardsiella tarda to innate immunity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 21(3) : 189-199
- Heitmeier, M. R., Scarim, A. L., Corbett, J. A. (1998). Double-stranded RNA-induced inducible nitric-oxide synthase expression and interleukin-1 release by murine macrophages requires NF-kappaB activation. J. Biol. Chem. 273, 15301 - 15307
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 408, 740-745.
- Hirono, I., Takami, M., Miyata, M., Miyazaki, T., Han, H. J., Takano, T., Endo, M., Aoki, T. (2004). Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Immunogenetics 56:38-46.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., Beutler, B. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. Nature 424, 743-748.
- Jault, C., Pichon, L., Chluba, J. (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in Danio rerio. Mol Immunol 40:759 - 771

Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A. I., Robertsen, B. (2002b). Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 311-326.

Jensen, I., Larsen, R., Robertsen, B. (2002c). An antiviral state induced in Chinook salmon embryo cells (CHSE-214) by transfection with the double-stranded RNA poly I:C. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 367-378.

Jensen, I., Robertsen, B. (2002a). Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 221-241.

Jørgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., Sommer, A. I. (2001a). CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 313-321.

Kang, Y. J. (2012). Enhancement of disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using systems producing CpG DNA and double-stranded RNA. Thesis of Doctor of philosophy. Pukyong National University.

- Kim, K. H. and Seoh, J. Y. (1998). Phenotypic and Functional Differentiation of Promyelocytic Cell Line HL-60 by N-N-dimethylformamide. J Korean Pediatr Soc., 41:481-488
- Kim, K. H., Hwang, Y. J., Bai, S. C. (1999). In vitro Effect of Aloe on the Respiratory Burst Activity of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Leucocytes. J. Fish Pathol., 12(1) : 1-6.
- Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. Nat. Rev. Immunol. 4:249.
- Krieg, A. M. (1999). Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. Biochim. Biophys. Acta 1489, 107-116.
- Krieg, A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu. Rev. Immunol. 20:709.
- Krieg, A. M. (2003). CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? Nat. Med. 9, 831-835.
- Kulka, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Metcalfe, D. D. (2004). Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. J. Allergy Clin. Immunol. 114, 174 - 182.

Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M., Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181, 3474 - 3485.

Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Kasai, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M., Seya, T. (2008). Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.* 181, 3474-3485.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 5, 503-507. *Nature Reviews Immunology* 6, 693 - 698.

Muñoz, I., Sepulcre, M. P., Meseguer, I., Mulero, V. (2014). Toll-like receptor 22 of gilthead seabream, *Sparus aurata*: Molecular cloning, expression profiles and postranscriptional regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 173-179

Park, C. J., Kang, K. R., Cho, H. C., Park, S. W., Ihm, S. H. (1994). Flow cytometric Measurement of Respiratory Burst Activity in Diabetic Neutrophils. *Korean J Clin Pathol* Vol. 14, No. 2.

- Plant, K. P., Harbottle, H., Thune, R. L. (2005). Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 296, 27-35.
- Rebl, A., Siegl, E., Koller, B., Fischer, U., Seyfert, H. M. (2007). Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Evolutionary relationship and induced expression by *Aeromonas salmonicida*. *Dev Comp Immunol* 31:499e510.
- Roszell, L. E. and Anderson, R. S. (1994). Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leukocyte subpopulations from *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.*, 38:195-206
- Saint-Jean, S. R., Pérez-Prieto, S. I. (2006). Interferon mediated antiviral activity against salmonid fish viruses in BF-2 and other cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 1-10.
- Samanta, M., Basu, M., Swain, B., Panda, P., Jayasankar, P. (2013). Molecular cloning and characterization of toll-like receptor 3, and inductive expression analysis of type I IFN, Mx and pro-inflammatory cytokines in the Indian carp, rohu (*Labeo rohita*). *Mol. Biol. Rep.* 40, 225 - 235.

- Sander, L. E., Davis, M. J., Boekschoten, M. V., Amesen, D., Dascher, C. G., Ryffel, B., Swanson, J. A., Muller, M., Blander, J. M. (2011). Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, 474:384-389
- Schulz, O., Diebold, S. S., Chen, M., Naslund, T. I., Nolte, M. A., Alexopoulou, L., Azuma, Y. T., Flavell, R. A., Liljestrom, P., Reis e Sousa, C. (2005). Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 433, 887-892.
- Seo, J. S., Jung, S. J., Lee, S. H., Kim, N. Y., Eom, H. K., Huh, M. D., Jung, H. D., Chung, J. K. (2004). Effects of Chloramphenicol on Chemiluminescence Response of Leukocytes Isolated from Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 17(3) : 217-222
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300, 1148-1151.
- Stafford, J. L., Ellestad, K. K., Magor, K. E., Belosevic, M., Magor, B. G. (2003). A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated goldfish macrophages. *Dev Comp Immunol* 27:685-698.
- Sugiyama, T., Gursel, M., Takeshita, F., Coban, C., Conover, J., Kaisho, T., Akira, S., Klinman, D. M., Ishii, K. J. (2005). CpG RNA:

- Identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14⁺CD11c⁺ monocytes. *J Immunol* 174 : 2273-2279.
- Suh, H. J. (1986). Respiratory Burst of Phagocytes. *The Korean Society Of Infectious Diseases*. Vol. 18, No.2, 115-119
- Ugolini, M., Sander, Lief. E. (2019). Dead or alive: how the immune system detects microbial viability. *Vol 56* : 60-66
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* 10, 1366-1373.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169, 6668-6672.

Yeh, D. W., Liu, Y. L., Lo, Y. C., Yuh, C. H., Yu, G. Y., Lo, J. F., Luo, Y., Xiang, R., Chuang, T. H. (2013). Toll-like receptor 9 and 21 have different ligand recognition profiles and cooperatively mediate activity of CpG-oligodeoxynucleotides in zebrafish. PNAS 110, 20711 - 20716.

