

مقاله پژوهشی

تحلیل بیوانفورماتیکی شبکه ژنی و مسیرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید (WSD) در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

رضا پسندیده^{۱*}، مجید پسندیده^۲

DOI: 10.22124/japb.2024.28614.1554

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۳

چکیده

ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) عامل بیماری لکه سفید (WSD) است که طی ده‌های اخیر موجب ضررهای اقتصادی زیادی در صنعت جهانی پرورش میگو شده است. هدف از این پژوهش، شناسایی مسیرهای زیستی موثر و ژن‌های کلیدی مرتبط با بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بود. داده‌های ریزآرایه شامل ۶ نمونه از بافت هیپاتوپانکراس میگوهای آلوده به WSSV از پایگاه داده GEO با شماره دسترسی GSE4955 استخراج و با استفاده از ابزار GEO2R تجزیه و تحلیل شدند. سپس ژن‌های افتراقی با بیان معنی‌دار مشخص شدند. از نرم‌افزار آنالیز STRING به منظور ساخت شبکه بین ژن‌های افتراقی استفاده شد. سپس ژن‌های کلیدی با استفاده از افزونه CytoHubba در نرم‌افزار Cytoscape و با روش حداکثر مرکزیت دسته (MCC) شناسایی شدند. عملکرد پیش‌بینی شده ژن‌های کلیدی در ارتباط با بیوسنتز پروستاگلاندین، فاکتور هسته‌ای کاپا B (NFKB)، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) و گیرنده گاما فعال شده با تکثیر پراکسی‌زوم (PPARG) بود. به نظر می‌رسد مسیرهای زیستی مربوط به این ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های NFKB و MAPK می‌توانند برای شناسایی نشانگرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید، تشخیص و یا طراحی مهارکننده علیه آن بیماری مفید باشند.

واژگان کلیدی: تجزیه و تحلیل شبکه ژنی، برهم‌کنش پروتئینی، ریزآرایه، میگوی سفید غربی، ویروس سندروم لکه سفید.

۱- استادیار پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: Rezapasandideh63@gmail.com

مقدمه

ژنوم DNA دو رشته‌ای حلقوی بزرگ با اندازه‌های مختلف (۲۹۲/۹ تا ۳۰۷/۲ کیلوپاز) است که جدایه‌های مختلف آن تفاوت‌هایی را در حدت بیماری‌زایی نشان می‌دهند (Desrina et al., 2022). بیماری لکه سفید برای اولین بار در میگوی ببری ژاپنی (کروما، Kuruma Shrimp، *Marsupenaeus japonicus*) در سال ۱۹۹۲ در تایوان و ژاپن گزارش شد. در مدت زمان کمی پس از آن، WSD به دیگر کشورهای تولید کننده میگو در آسیا گسترش یافت و به یک بیماری بومی تبدیل شد (Desrina et al., 2022). بیماری لکه سفید موجب مرگ و میر و خسارات اقتصادی چشمگیری در یکی از گونه‌های مهم پرورشی میگوی جهان به نام میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) می‌شود. در ایران میگوی سفید غربی به عنوان گونه نخست پرورشی محسوب شده و در برخی از استان‌های ساحلی پرورش داده می‌شود. با این حال، بسیاری از مزارع پرورشی در ایران سالانه با بیماری لکه سفید درگیر هستند. بنابراین پیشگیری، تشخیص و کنترل شیوع این بیماری در اولویت اصلی صنعت میگو قرار گرفته است.

پرورش میگو جایگاه مهمی را در صنعت جهانی آبی‌پروری سخت‌پوستان به خود اختصاص داده است. اگرچه در دهه‌های اخیر تولیدات صنعت میگو به طور قابل توجهی افزایش یافته است، اما بیماری‌های میگو به عنوان یک تهدید جدی، توسعه پایدار این صنعت در سراسر جهان را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند (Millard et al., 2021). میگو در معرض آلودگی با طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها قرار دارد. در این میان، ویروس سندرم لکه سفید (White Spot Syndrome Virus: WSSV) که عامل ایجاد بیماری لکه سفید (White Spot Disease: WSD) است، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا برای همه گونه‌های میگوی پرورشی در سراسر جهان تلقی می‌شود (Millard et al., 2021). نام این بیماری به دلیل ظهور نقاط سفید روی کاراپاس میگوها است که پس از آلوده شدن جانور با ویروس و نزدیک به مرگ قابل شناسایی هستند (Islam et al., 2023). عامل این بیماری یک ویروس بسیار کشنده و وابسته به استرس است که به جنس *Whispovirus* از خانواده *Nimaviridae* تعلق دارد. این ویروس دارای

طی دهه‌های اخیر، چندین روش با کارایی بالا برای درک چگونگی تاثیر عوامل محیطی بر بیان ژن‌ها ایجاد شده است. این روش‌ها شامل بررسی برچسب توالی بیان شده (Expressed Sequence Tag: EST)، هیبریداسیون کاهشی سرکوب (Suppression Subtractive Hybridization: SSH Differential)، تجزیه و تحلیل سریالی بیان ژن (Hybridization Serial Analysis of Gene Expression)، ریزآرایه (Microarray) و الکتروفورز دو بعدی (Two-dimensional electrophoresis: 2-DE Aoki et al., 2011). در میگو از فناوری ریزآرایه برای بررسی بیان ژن توسط ویروس سندرم لکه سفید استفاده شده است. پروفایل‌های بیان ژن جهانی ویروسی برای سه سویه از این ویروس شامل WSSV- تایوان، WSSV- تایلند و WSSV- چین در میگوی ببری سیاه و خرچنگ *Cambarus clarkia* آلوده شده به صورت تجربی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Marks et al., 2005; Lan et al., 2006). علاوه بر این، با استفاده از پایگاه داده ریزآرایه ویروسی به دست آمده از تیمارهای آزمایشی مختلف، چندین ویژگی خاص این ویروس از جمله ژن‌های مربوط به نهفتگی (Latency-related Genes)، ژن‌های اولیه سریع (Immediate-early Genes: IEs)، موتیف‌های پروموتور و ژن‌های ویروسی با بیان بالا شناسایی شده‌اند (Liu et al., 2005; Marks et al., 2006; Wang et al., 2007). تاکنون مطالعات متعددی با استفاده از ریزآرایه‌ها به منظور بررسی ارتباط بیان ژن‌های افتراقی و پاسخ‌های ایمنی میگو تحت تاثیر شرایط آزمایشی مختلف از جمله تحریک ایمنی، شرایط استرس (پاسخ‌های هیپوکسیک (Hypoxic)، هیپرترمیک (Hyperthermic) و هیپواسموتیک (Hypoosmotic))، عفونت WSSV، عفونت ویروس سر زردی (Yellow Head Virus: YHV) و عفونت *Vibrio anguillarum* انجام شده است (Aoki et al., 2011).

سازوکارهای مختلف اپی‌ژنومی شامل متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم هیستون، ریز RNAهای کروماتین و RNAهای بلند غیرکدکننده با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا و آب و هوا برای تاثیر روی بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh et al., 2016). بنابراین، ممکن است تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی رخ

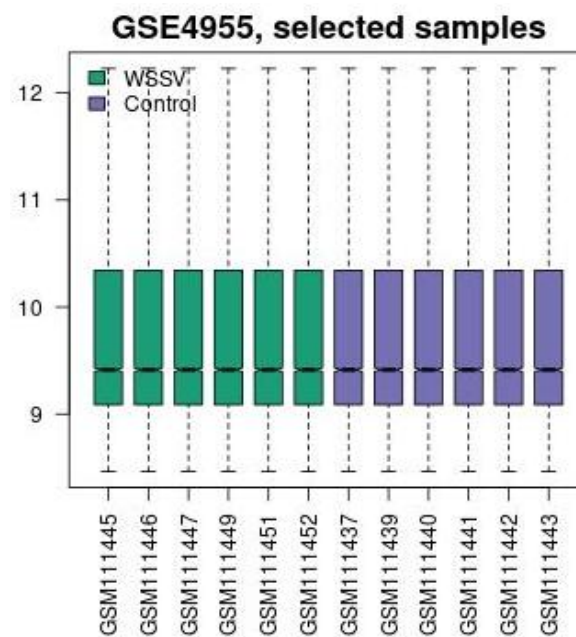
مزایای متعددی از جمله مقرون به صرفه بودن، افزایش قدرت آماری، شناسایی نشانگرهای زیستی جدید، اعتبارسنجی یافته‌های قبلی و کاوش در سوالات پژوهشی جدید، داشته باشد (Tarca et al., 2006).

مواد و روش‌ها

داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) سالم و آلوده به ویروس سندروم لکه سفید از پایگاه داده GEO در مرکز ملی اطلاعات بیولوژیکی (NCBI) با شماره دسترسی GSE4955 استخراج شدند. داده‌های مورد مطالعه مربوط به ۱۲ نمونه شامل ۶ نمونه از بافت هیپاتوپانکراس میگوهای سالم و ۶ نمونه از بافت هیپاتوپانکراس میگوهای آلوده به WSSV بودند. شماره دسترسی داده‌های مورد استفاده در شکل ۱ نشان داده شده است. داده‌های موجود توسط ابزار تحت وب GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) که یک ابزار وب تعاملی است و برای مقایسه بیان ژن‌ها در دو یا چند گروه نمونه استفاده می‌شود، تجزیه و تحلیل شدند.

دهد. بیان ژن‌های یوکاریوتی به طور موقت و چند بعدی کنترل می‌شود و تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود (Khabiri et al., 2023). بنابراین یکی از فعالیت‌های اساسی در زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، مطالعه ژن‌ها و بیان پروتئین‌های مرتبط با صفات و بررسی آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Bordbar et al., 2022).

علاوه بر روش‌های مدیریتی و امنیت زیستی کنونی، یک راهکار بالقوه برای مقابله با بیماری لکه سفید شناسایی نشانگرهای ژنتیکی و مسیرهای زیستی مرتبط با این بیماری است. با درک بهتر سازوکارهای ژنتیکی و زیستی مرتبط با بیماری می‌توان از این اطلاعات به منظور اصلاح نژاد انتخابی برای ایجاد یک جمعیت میگوی مقاوم و یا اهداف دارویی برای طراحی مهارکننده علیه این ویروس استفاده کرد. از این رو در این مطالعه، داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی سفید غربی سالم و آلوده به ویروس سندروم لکه سفید، برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، مسیرهای زیستی کلیدی و موثر در این بیماری شناسایی شدند. ارزیابی مجدد داده‌های ریزآرایه در مطالعات جدید می‌تواند



شکل ۱: شماره دسترسی داده‌های ریزآرایه مورد استفاده در این مطالعه مربوط به بافت هیاتوپانکراس نمونه‌های میگوی سالم و آلوده به ویروس سندروم لکه سفید (WSSV)

۲۰۲۱ انتقال داده شدند. ژن‌های افتراقی بیان شده با adjP-Value کمتر از ۰/۰۵ مشخص شدند. سپس ژن‌های با LogFC (Log Fold Change) بزرگ‌تر از ۱ به عنوان ژن‌های با افزایش بیان و ژن‌های با LogFC کوچک‌تر از ۱- به عنوان ژن‌های با کاهش بیان در نظر گرفته شدند.

به منظور ساخت شبکه بین ژن‌ها با بیان افتراقی از نرم‌افزار آنلاین STRING استفاده شد که یک پایگاه داده از برهم‌کنش‌های

ابزار GEO2R برای شناسایی ژن‌های مهمی که در گروه‌های مختلف نمونه، بیان متفاوتی داشتند، به کار گرفته شد تا از آنها به عنوان نشانگرهای زیستی مرتبط با صفت مورد نظر استفاده شود. در گام نخست کیفیت داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به این که نرم‌افزار برای نرمال‌سازی داده‌ها بر روی گزینه خودکار بود، نرمال‌سازی داده‌ها در صورت تشخیص توسط نرم‌افزار انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل، داده‌ها به نرم‌افزار Microsoft Excel

نتایج

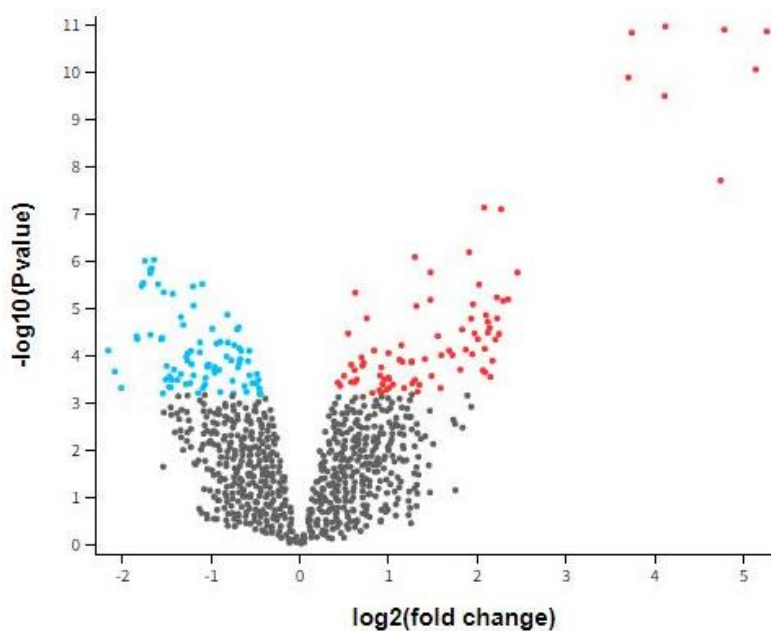
شناسایی ژن‌ها با بیان افتراقی

بر اساس نتایج مطالعه حاضر و با مقایسه داده‌های ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی سالم و آلوده به ویروس سندروم لکه سفید با استفاده از ابزار GEO2R، در مجموع ۱۱۰ ژن با بیان افتراقی شناسایی شد که از این تعداد ۶۰ ژن بیان بالا و ۵۰ ژن بیان پایین داشتند ($P < 0.05$). نمودار آتشفشانی ژن‌ها با بیان افتراقی در شکل ۲ آورده شده است.

هستی‌شناسی ژن‌های با افزایش بیان

هستی‌شناسی ژن‌های با بیان بالا در این مطالعه توسط ابزار DAVID صورت گرفت. فرایندهای زیستی (Biological Process) پیش‌بینی شده برای ژن‌های با افزایش بیان در جدول ۱ آورده شده است. نتایج هستی‌شناسی ژن‌های با بیان بالا در بخش مولفه‌های سلولی (Cellular Components) در جدول ۲ آورده شده است. از بین ژن‌های با افزایش بیان در این مطالعه، ۱۴ ژن در سیتوپلاسم و ۱۴ ژن در هسته سلول‌ها بیان می‌شدند.

پروتئین-پروتئین شناخته شده و پیش‌بینی شده است و به کاربران اجازه می‌دهد تا شبکه‌های تعاملی بین ژن‌ها را ترسیم کنند. این برهم‌کنش‌ها شامل ارتباط مستقیم (فیزیکی) و غیرمستقیم (عملکردی) پروتئین‌ها است که از طریق پیش‌بینی‌های محاسباتی، بررسی اطلاعات بین موجودات و داده‌های جمع‌آوری شده از دیگر پایگاه‌های داده اولیه ایجاد شده‌اند (<https://string-db.org>). سپس شبکه پروتئینی ژن‌های افتراقی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape 3.8.2 تجزیه و تحلیل شد و ژن‌های کلیدی با استفاده از افزونه CytoHubba و با روش حداکثر مرکزیت دسته‌بندی شدند. ژن‌های با بالاترین نمره (Score) و بیشتر از ۱۰ انتخاب شدند. به منظور بررسی هستی‌شناسی ژن‌های (Gene Ontology) با افزایش بیان از ابزار DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov>) استفاده شد.



شکل ۲: نمودار آتشفشانی نشان دهنده ژن‌ها با بیان افتراقی در بافت هیپاتوپانکراس میگوی سفید غربی آلوده به ویروس لکه سفید نسبت به بافت سالم. ژن‌ها با افزایش بیان با نقاط قرمز و ژن‌های با کاهش بیان با نقاط آبی مشخص شده‌اند.

جدول ۱: فرایندهای زیستی پیش‌بینی شده برای ژن‌های با افزایش بیان

GO کد	فرایند زیستی	P-Value
GO:0071260	پاسخ سلولی به محرک‌های مکانیکی	۰/۰۰۴
GO:0007264	انتقال سیگنال کوچک با واسطه GTPase	۰/۰۰۶
GO:0006979	پاسخ به استرس اکسیداتیو	۰/۰۱۰
GO:0007165	انتقال سیگنال	۰/۰۱۷
GO:0071222	پاسخ سلولی به لیپوپلی ساکارید	۰/۰۲۴
GO:0010628	تنظیم مثبت بیان ژن	۰/۰۲۵
GO:0045087	پاسخ ایمنی ذاتی	۰/۰۲۹
GO:0009410	پاسخ به محرک‌های بیگانه‌زیست (Xenobiotic)	۰/۰۴۰

حداقل تعداد ژن برای هر فرایند زیستی ۳ ژن و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۲: مولفه‌های سلولی پیش‌بینی شده برای ژن‌های با افزایش بیان

GO کد	مولفه‌های سلولی	P-Value
GO:0005737	سیتوپلاسم	۰/۰۱۲۳
GO:0005634	هسته	۰/۰۲۲

حداقل تعداد ژن برای هر مولفه سلولی ۳ ژن و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

محدود بودن اطلاعات ژن‌های شناسایی شده در میگو، تعداد ۵ ژن با بیشترین شباهت از پایگاه‌های داده به عنوان ژن‌های همولوگ کلیدی مرتبط با بیماری لکه سفید شناسایی شدند. بر اساس اطلاعات نرم‌افزار STRING، عملکرد این ژن‌ها پیش‌بینی شد (جدول ۴).

بررسی شبکه پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده در نرم‌افزار STRING نشان داد که این ژن‌ها با یکدیگر دارای برهم‌کنش زیادی هستند (شکل ۳). ارتباط ژن‌های کلیدی با یکدیگر می‌تواند نشان دهنده هم‌افزایی اثر آنها در پاسخ به عفونت ویروس لکه سفید در میگوی سفید غربی باشد. همان‌طور که در جدول ۴ آورده شده است، بررسی میزان LogFC ژن‌های کلیدی با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه نشان داد که همگی ۵ ژن در پاسخ به عفونت ویروس لکه سفید افزایش بیان داشتند ($P < 0.05$).

نتایج عملکرد مولکولی (Molecular Function) ژن‌های با بیان بالا در جدول ۳ آورده شده است. از بین ژن‌های با افزایش بیان در این مطالعه، بیشترین عملکرد مولکولی مربوط به اتصال پروتئین بود که تعداد ۲۳ ژن در این مسیر نقش داشتند.

تجزیه و تحلیل شبکه پروتئینی ژن‌های افتراقی و پیش‌بینی عملکرد ژن‌های کلیدی
نتایج نرم‌افزار آنالیز STRING نشان داد که تعداد ۶۷ ژن از مجموعه ژن‌های با بیان افتراقی، تشکیل شبکه هم‌بیانی دادند. برای شناسایی گره‌های شبکه زیستی که در واقع ژن‌های کلیدی هستند، شبکه پروتئینی ژن‌های افتراقی توسط نرم‌افزار Cytoscape 3.8.2 و با استفاده از افزونه CytoHubba و با روش MCC بررسی شد. ژن‌های با بالاترین نمره و بیشتر از نمره ۱۰ انتخاب شدند. با توجه به

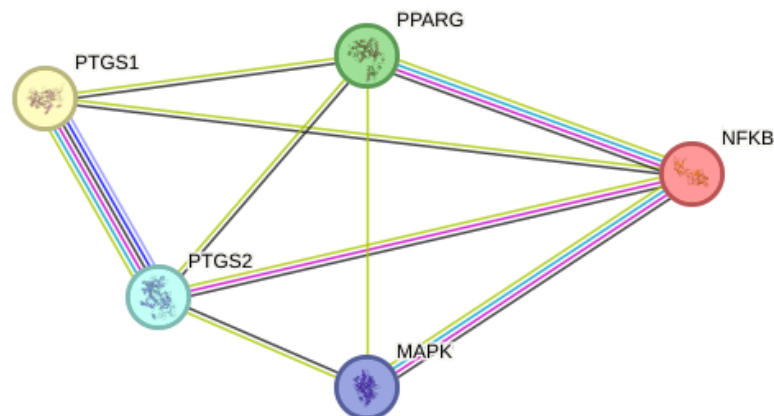
جدول ۳: عملکردهای مولکولی پیش‌بینی شده برای ژن‌های با افزایش بیان

GO کد	عملکرد مولکولی	P-Value
GO:0004666	فعالیت پروستاگلاندین- اندوپروکسید سینتاز	۰/۰۰۲
GO:0003682	اتصال کروماتین	۰/۰۰۴
GO:0050693	اتصال دامین LBD (Ligand Binding Domain)	۰/۰۰۹
GO:0016702	فعالیت اکسیدوردوکتاز	۰/۰۱۰
GO:0003712	فعالیت تنظیم کننده رونویسی	۰/۰۱۱
GO:0005515	اتصال پروتئین	۰/۰۱۲
GO:0004629	فعالیت فسفولیپاز C	۰/۰۱۲
GO:0004435	فعالیت فسفاتیدیل اینوزیتول فسفولیپاز C	۰/۰۳۳
GO:0004601	فعالیت پراکسیداز	۰/۰۳۹

حداقل تعداد ژن برای هر عملکرد مولکولی ۲ ژن و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۴: عملکرد پیش‌بینی شده و میزان بیان ژن‌های همولوگ کلیدی مرتبط با بیماری لکه سفید شناسایی شده با روش MCC

رتبه	شناسه ژن	نمره	عملکرد پیش‌بینی شده	LogFC
۱	۵۷۴۳	۲۴	بیوسنتز پروستاگلاندین	۲/۴۵۲
۲	۴۷۹۰	۲۲	فاکتور هسته‌ای کاپا B (NFkB)	۲/۳۴۵
۳	۵۵۹۹	۱۸	پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK)	۳/۷۴۰
۴	۵۴۶۸	۱۷	گیرنده گاما فعال شده با تکثیر پراکسی‌زوم (PPARG)	۵/۲۶۶
۵	۵۷۴۲	۱۲	بیوسنتز پروستاگلاندین	۲/۰۶۲



شکل ۳: شبکه برهم‌کنش پروتئینی ژن‌های کلیدی مرتبط با بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی بر اساس تجزیه و تحلیل نرم‌افزار STRING

بحث

ریزآرایه DNA یک فناوری با کاربردهای

گوناگون است که با کمک آن می‌توان مطالعات بیان ژن‌های افتراقی را در طیف گسترده‌ای از جانداران با سهولت نسبی انجام داد. تجزیه و تحلیل داده‌های ریزآرایه مرتبط با ایمنی در میگو می‌تواند اطلاعات جدید مفیدی را به منظور بررسی تنظیم درون‌سلولی و برهم‌کنش بین بسیاری از ژن‌های ایمنی ذاتی این جانور ارائه دهد. علاوه بر این، فناوری ریزآرایه ممکن است ابزار مفیدی برای شناسایی نشانگرهای ژنی مرتبط با مقاومت به بیماری برای انجام برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر (Marker-Assisted Selection: MAS) باشد (Lu et al., 2011). در مطالعه حاضر از داده‌های

ویروس سندروم لکه سفید (WSSV) عامل بیماری لکه سفید (WSD) است که طی ۲۵ سال گذشته صنعت جهانی پرورش میگو را تحت تاثیر خود قرار داده و موجب ضررهای اقتصادی زیادی شده است. این بیماری در انواع سیستم‌های پرورشی سخت‌پوستان رخ می‌دهد. در حال حاضر، WSD یک بیماری همه‌گیر است و توسط سازمان جهانی بهداشت جانوران (World Organization for Animal Health, OIE) به عنوان یک بیماری مخاطره‌آمیز فهرست شده است (Desrina et al., 2022).

ریزآرایه مربوط به نمونه‌های میگوی سالم و آلوده به ویروس سندروم لکه سفید استخراج شده از پایگاه داده GEO برای بررسی مسیرهای زیستی مرتبط با ایمنی در برابر این عفونت ویروسی در میزبان استفاده شد. این اطلاعات می‌توانند از طریق بررسی برهم‌کنش‌های ویروس و میزبان تعیین کند که کدام ژن‌ها و در چه مقدار نسبی در طی عفونت بیان می‌شوند.

در آبی‌پروری، ریزآرایه‌ها برای بررسی شرایط فیزیولوژیکی جانوران از جمله نمو (Darias et al., 2008)، رژیم غذایی (Leaver et al., 2008)، شرایط محیطی (Chou et al., 2008) و واگرایی ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Jeukens et al., 2009) استفاده شده‌اند.

در سال‌های اخیر، توجه فزاینده‌ای به برهم‌کنش‌های عامل بیماری‌زا و میزبان به‌ویژه پاسخ ایمنی میزبان در برابر عوامل بیگانه شده است. فناوری تجزیه و تحلیل ریزآرایه، دیدگاه‌های مهم جدیدی را در مورد تنظیم سازوکارهای دفاع زیستی آبزیان در پاسخ به محرک‌های مختلف ارائه کرده است (Peatman et al., 2008). تاکنون چندین تراشه ریزآرایه برای گونه‌ها و اندام‌های مختلف میگو ساخته شده است. در سال ۲۰۰۳ یک ریزآرایه با تراکم پایین برای میگوی آبی ساخته شد که تراشه‌های

شیشه‌ای (Glass Chips) آن حاوی ۱۰۰ کلون به دست آمده از EST‌های هپاتوپانکراس میگوی آلوده به WSSV بودند (Dhar et al., 2003). Wang و همکاران (۲۰۰۶) یک ریزآرایه cDNA برای میگوی سفید چینی طراحی کردند که حاوی ۳۱۳۶ cDNA هدف از یک کتابخانه cDNA به دست آمده از اندام سر-سینه (سفالوتوراکس، Cephalothorax) میگوهای طبیعی و کتابخانه‌های SSH از میگوهای آلوده به WSSV بود. اولین ریزآرایه cDNA برای میگوی سفید غربی حاوی ۲۴۶۹ کلون EST به دست آمده از کتابخانه‌های cDNA استاندارد و کتابخانه‌های SSH بود که از سه بافت تحت محرک‌های مختلف تولید شد (Robalino et al., 2007). اولین نسل از تراشه‌های ریزآرایه cDNA برای میگوی ببری سیاه حاوی ۳۸۵۳ قطعه cDNA مجزا بود که از یک cDNA هموسیت سالم و شش کتابخانه SSH به دست آمده بود (De La Vega et al., 2007). Pongsomboon و همکاران (۲۰۰۸) و Fagutao و همکاران (۲۰۰۸) از یک ریزآرایه cDNA متشکل از ۲۰۳۶ کلون EST جمع‌آوری شده از کتابخانه‌های cDNA هموسیت سالم و آلوده به WSSV به ترتیب از میگوی ببری سیاه و میگوی ببری ژاپنی

- استفاده کردند (Fagutao et al., 2008; Lu و Zeng. (Pongsomboon et al., 2008 (۲۰۰۹) بیان ژن‌های افتراقی در هموسیت‌های خرچنگ *Procambarus clarkii* آلوده به WSSV را با استفاده از ریزآرایه cDNA مبتنی بر غشای نایلونی بررسی کردند.
- بر اساس نتایج نرم‌افزار STRING، عملکرد ژن‌های کلیدی شناسایی شده مرتبط با بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی پیش‌بینی شد. از تعداد ۵ ژن شناسایی شده در این مطالعه، عملکرد ۲ ژن با بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها در ارتباط بود. در پستانداران، پروستاگلاندین‌ها در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی و آسیب‌شناسی از جمله تنظیم ماهیچه‌ها و رگ‌های خونی، التهاب، پیام‌رسانی، هومئوستازی، تولیدمثل و تنظیم خواب و بیداری نقش دارند. این مولکول‌ها در موجودات پست‌تر از جمله بی‌مهرگان دریایی نیز کشف شده‌اند و در آنها علاوه بر عملکردهای مشابه پستانداران، در کنترل تخم‌زایی و اسپرم‌زایی، انتقال یون و سیستم دفاعی نیز نقش ایفا می‌کنند (Di Costanzo et al., 2019). برخی از پروستاگلاندین‌های تولید شده توسط لکوسیت‌ها در چندین گونه ماهی، در واکنش‌های التهابی دخیل هستند.
- پروستاگلاندین‌ها نقش کلیدی در توسعه پاسخ‌های ایمنی به‌ویژه سیستم ایمنی ذاتی دارند (Gomez-Abellan and Sepulcre, 2016). عملکرد یکی دیگر از ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه مربوط به فاکتور هسته‌ای کاپا B (Nuclear Factor-Kappa B: NFkB) بود. NFkB نه تنها به عنوان یک تنظیم‌کننده اصلی پاسخ‌های التهابی شناخته می‌شود، بلکه در برخی از فعالیت‌های سلولی گسترده‌تر از جمله تکثیر و مرگ سلولی نیز نقش دارد. اگرچه میزبان از NFkB علیه عامل بیماری‌زا استفاده می‌کند، با این حال بسیاری از ویروس‌ها و برخی عوامل بیماری‌زای دیگر، با فعال‌سازی این ژن در جهت تکثیر خود سود می‌برند (Qiu et al., 2014). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که NFkB میگوی سفید غربی (LvNF-kB) ممکن است نقش مهمی در همانندسازی WSSV ایفا کند (Qiu et al., 2014). در میگوی سفید چینی، دو عضو خانواده NFkB به نام‌های FcDorsal و FcRelish که مربوط به رونویسی پنائیدین-۵ بودند، کلون شدند. در میگوی سفید غربی سه شکل از NFkB به نام‌های LvDorsal، LvRelish و ایزوفرم کوتاه‌تر آن به نام sLvRelish شناسایی شده

است (Huang et al., 2010a,b). با تجزیه و تحلیل ۵۳۱ چارچوب خوانش باز (Open Reading Frames: ORFs) احتمالی از WSSV مشخص شد که حدود ۴۰ پروموتور ژنی این ویروس از مکان‌های اتصال چندگانه برای NFkB تشکیل شده‌اند. در میان آنها، پروموتور ژن‌های WSV069 و WSV303 می‌توانند توسط LvDorsal فعال شوند. همچنین یک موتیف اتصال برای NFkB در پروموتور WSV069 شناسایی شده است که به LvRelish متصل شده و منجر به فعال شدن پروموتور WSV069 می‌شود (Huang et al., 2010a,b). در یک مطالعه اخیر مشخص شد که پروتئین‌های LvDorsal و LvRelish از خانواده NFkB در مواجهه میگوی سفید غربی با WSSV به طور معنی‌داری فعال می‌شوند و تکثیر WSSV در بدن میزبان تا حدی بر فعال‌سازی این دو پروتئین متکی است (Qiu et al., 2014).

ژن شناسایی شده دیگر در این مطالعه مربوط به خانواده ژنی پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (Mitogen-Activated Protein Kinase: MAPK) بود. مسیر انتقال سیگنال MAPK یکی از مهم‌ترین مسیرهای ایمنی است که اغلب با فرایندهای زیستی متنوعی از جمله تکثیر، تمایز، بقای سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و پاسخ ایمنی مرتبط است (Wagner and Nebreda, 2009). تاکنون دو عضو از خانواده MAP3K شامل LvTAK1 یا LvMAPKKKK7 و LvASK1 یا LvMAPKKK5 در میگوی سفید غربی شناسایی شده‌اند. مشخص شده است که LvTAK1 عملکرد مهمی را در دفاع میگو در برابر عفونت باکتریایی ایفا می‌کند. ناک‌دون (Knock Down) LvASK1 با واسطه RNAi، میزان آپوپتوز هموسیت‌ها را در میگوهای آلوده به WSSV کاهش می‌دهد و به زنده‌مانی میگو کمک می‌کند. سه MAP2Ks به نام‌های LvMKK4، LvMKK6 و LvMKK7 و سه MAPKs به نام‌های LvJNK، Lv38 و LvERK در میگوی سفید غربی شناسایی شده‌اند. در طی عفونت لکه سفید، هر سه LvJNK، Lv38 و LvERK برای القای بیان ژن‌های اولیه سریع (IEs) مانند WSV069 از این ویروس و تسهیل تکثیر آن فعال می‌شوند. همچنین در طی عفونت لکه سفید، برخی از پپتیدهای ترشح شده میزبان فعال می‌شوند که می‌توانند این عفونت را محدود کنند. برای مثال، ژن‌های Vago4 و Vago5 پپتیدهای قابل القا توسط عفونت ویروسی در

لیپیدهای پیچیده و اجزای فعال (Reactive Species) دارند. اخیراً، پراکسی‌زوم‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی عملکردهای ایمنی و التهابی در طی عفونت شناسایی شده‌اند. پراکسی‌زوم‌ها می‌توانند اجزای آنیونی فعال سلولی مانند گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species: ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال (Reactive Nitrogen Species: RNS) را تولید و پاکسازی کنند و در نتیجه به وضعیت احیای سلولی کمک کنند (Di Cara et al., 2019). در یک مطالعه نشان داده شد که سطح بیان PPAR گاما در ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) مواجهه شده با *Vibrio alginolyticus* افزایش معنی‌داری یافت و ممکن است این ژن به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی سیتوکین‌های پیش‌التهابی، نقش مهمی در دفاع ایمنی در برابر این عفونت ایفا کنند (Luo et al., 2015). ممکن است طی یک عفونت باکتریایی، با افزایش بیان NFkB یک پاسخ التهابی ایجاد شود، در حالی که افزایش PPAR گاما می‌تواند مسئول تنظیم پاسخ‌های التهابی میزبان و حفظ هومئوستاز ایمنی باشد (Kelly et al., 2004). یکی از فرایندهای زیستی پیش‌بینی شده برای ژن‌های با افزایش بیان در این مطالعه،

میگو هستند که می‌توانند تکثیر WSSV را محدود کنند (Wang et al., 2021). در مطالعه اخیر، یک همولوگ از ژن MAPKKK15 به نام LvMAPKKKK15 در میگوی سفید غربی شناسایی شد (Wang et al., 2021). MAPKKK15 که ASK3 نیز نامیده می‌شود، یکی از اعضای خانواده MAP3K است که می‌تواند در پاسخ به محرک‌های پیش‌آپوپتوزی مختلف از جمله Fas، TNF-alpha و استرس اکسیداتیو فعال شود و نیز در پاسخ‌های استرسی متنوع از جمله استرس اسمزی دخیل باشد (Kaji et al., 2010). مشخص شده است که LvMAPKKK15 با افزایش رونویسی از ژن‌های اولیه سریع (IEs) ویروس لکه سفید و سرکوب فاکتور ضدویروسی میزبان به نام LvVagos در همانندسازی و تکثیر این ویروس و افزایش حساسیت میزبان به بیماری نقش دارد (Wang et al., 2021).

عملکرد پیش‌بینی شده یکی دیگر از ژن‌های شناسایی شده در این مطالعه مربوط به گیرنده گاما فعال شده با تکثیر پراکسی‌زوم (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma: PPARG) بود. پراکسی‌زوم‌ها اندامک‌های متابولیکی ضروری هستند که نقش مهمی در ساخت و توزیع

پاسخ به استرس اکسیداتیو بود (GO: 0006979). به نظر می‌رسد که ROS ناشی از استرس، نقش محوری در مسیر پیام‌رسانی برای فعالیت همزمان سیستم ایمنی ذاتی با پاسخ ایمنی اکتسابی ایفا کند. با این حال، سطح بیش از حد ROS ناشی از استرس می‌تواند تاثیر نامطلوبی بر جانداران داشته باشد و منجر به تجمع ROS و عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی شود که ممکن است باعث آسیب DNA، اکسیداسیون پروتئین و پراکسیداسیون لیپیدی شود (Luo et al., 2015).

در مجموع، در این مطالعه از توانایی فناوری ریزآرایه DNA برای بررسی مجموعه‌ای از ژن‌ها که با یکدیگر در مسیرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی مشارکت دارند، استفاده شد. همچنین با کمک

این ابزار قدرتمند، الگوی بیان ژن‌های افتراقی مرتبط با این بیماری به طور همزمان بررسی شد. علاوه بر این، با استفاده از داده‌های ریزآرایه و ابزارهای بیوانفورماتیکی، عملکرد ۵ ژن کلیدی مرتبط با بیماری لکه سفید پیش‌بینی شد. عملکرد پیش‌بینی شده این ژن‌ها در ارتباط با بیوسنتز پروستاگلاندین، فاکتور هسته‌ای کاپا B (NFKB)، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) و گیرنده گاما فعال شده با تکثیر پراکسی‌زوم (PPARG) بود. به نظر می‌رسد مسیرهای زیستی مربوط به این ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های NFKB و MAPK می‌توانند در جهت شناسایی نشانگرهای زیستی مرتبط با بیماری لکه سفید، تشخیص و یا طراحی مهارکننده علیه آن بیماری مفید باشند.

منابع

- Aoki T., Wang H.C., Unajak S., Santos M.D., Kondo H. and Hirono I. 2011. Microarray analyses of shrimp immune responses. *Marine Biotechnology*, 13: 629–638. doi: 10.1007/s10126-010-9291-1
- Barazandeh A., Mohammadabadi M., Ghaderi-Zefrehei M. and Nezamabadi-Pour H. 2016. Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11): 487–495. doi: 10.17221/78/2015-CJAS
- Bordbar F., Mohammadabadi M., Jensen J., Xu L., Li J. and Zhang L. 2022. Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals*, 12(9): 1–14 (1103). doi: 10.3390/ani12091103
- Chou M.Y., Hsiao C.D., Chen S.C., Chen I.W., Liu S.T. and Hwang P.P. 2008. Effects of hypothermia on gene expression in zebrafish gills: upregulation in differentiation and function of ionocytes as compensatory responses. *Journal of Experimental Biology*, 211(19): 3077–3084. doi: 10.1242/jeb.019950
- Darias M.J., Zambonino-Infante J.L., Hugot K., Cahu C. and Mazurais D. 2008. Gene expression patterns during the larval development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarray analysis. *Marine Biotechnology*, 10(4): 416–428. doi: 10.1007/s10126-007-9078-1
- De La Vega E., Hall M.R., Wilson K.J., Reverter A., Woods R.G. and Degnan B.M. 2007. Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Physiological Genomics*, 31(1): 126–138. doi: 10.1152/physiolgenomics.00068.2007
- Desrina H., Prayitno S.B., Verdegem M.C., Verreth J.A. and Vlask J.M. 2022. White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Reviews in Aquaculture*, 14(4): 1843–1860. doi: 10.1111/raq.12676
- Dhar A., Dettori A., Roux M., Klimpel K. and Read B. 2003. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Archives of Virology*, 148: 2381–2396. doi: 10.1007/s00705-003-0172-z
- Di Cara F., Andreoletti P., Trompier D., Vejux A., Bulow M.H., Sellin J., Lizard G., Cherkaoui-Malki M. and Savary S. 2019.

- Peroxisomes in immune response and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16): 1–29 (3877). doi: 10.3390/ijms20163877
- Di Costanzo F., Di Dato V., Ianora A. and Romano G. 2019.** Prostaglandins in marine organisms: A review. *Marine Drugs*, 17(7): 1–23 (428). doi: 10.3390/md17070428
- Fagutao F.F., Yasuike M., Caipang C.M., Kondo H., Hirono I., Takahashi Y. and Aoki T. 2008.** Gene expression profile of hemocytes of kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* following peptidoglycan stimulation. *Marine Biotechnology*, 10: 731–740. doi: 10.1007/s10126-008-9110-0
- Gomez-Abellan V. and Sepulcre M.P. 2016.** The role of prostaglandins in the regulation of fish immunity. *Molecular Immunology*, 69: 139–145. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.022
- Huang X.D., Yin Z.X., Jia X.T., Liang J.P., Ai H.S., Yang L.S., Liu X., Wang P.H., Li S.D. and Weng S.P. 2010a.** Identification and functional study of a shrimp dorsal homologue. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(2): 107–113. doi: 10.1016/j.dci.2009.08.009
- Huang X.D., Zhao L., Zhang H.Q., Xu X.P., Jia X.T., Chen Y.H., Wang P.H., Weng S.P., Yu X.Q. and Yin Z.X. 2010b.** Shrimp NF- κ B binds to the immediate-early gene ie1 promoter of white spot syndrome virus and upregulates its activity. *Virology*, 406(2): 176–180. doi: 10.1016/j.virol.2010.06.046
- Islam S.I., Mou M.J., Sanjida S. and Mahfuj S. 2023.** A review on molecular detection techniques of white spot syndrome virus: Perspectives of problems and solutions in shrimp farming. *Veterinary Medicine and Science*, 9(2): 778–801. doi: 10.1002/vms3.979
- Jeukens J., Bittner D., Knudsen R. and Bernatchez L. 2009.** Candidate genes and adaptive radiation: Insights from transcriptional adaptation to the limnetic niche among coregonine fishes (*Coregonus* spp., Salmonidae). *Molecular Biology and Evolution*, 26(1): 155–166. doi: 10.1093/molbev/msn235
- Kaji T., Yoshida S., Kawai K., Fuchigami Y., Watanabe W., Kubodera H. and Kishimoto T. 2010.** ASK3, a novel member of the apoptosis signal-regulating kinase family, is essential for stress-induced cell death in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(2): 213–218. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.164
- Kelly D., Campbell J.I., King T.P., Grant G., Jansson E.A., Coutts A.G., Pettersson S. and Conway**

- S. 2004.** Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature Immunology*, 5(1): 104–112. doi: 10.1038/ni1018
- Khabiri A., Toroghi R., Mohammadabadi M. and Tabatabaeizadeh S.E. 2023.** Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4): 221–228. doi: 10.30466/vrf.2022.548152.3373
- Lan Y.S., Xu X., Yang F. and Zhang X. 2006.** Transcriptional profile of shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes with DNA microarray. *Archives of Virology*, 151(9): 1723–1733. doi: 10.1007/s00705-006-0751-x
- Leaver M.J., Villeneuve L.A., Obach A., Jensen L., Bron J.E., Tocher D.R. and Taggart J.B. 2008.** Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 9: 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-9-299
- Liu W.J., Chang Y.S., Wang C.H., Kou G.H. and Lo C.F. 2005.** Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. *Virology*, 334(2): 327–341. doi: 10.1016/j.virol.2005.01.047
- Lu J., Hsiao Y., Wu J., Bondad-Reantaso M., Jones J., Corsin F. and Aoki T. 2011.** Applications of shrimp immune DNA microarray in aquaculture. P: 241–252. In: Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. and Aoki T. (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Asian Fisheries Society, Malaysia.
- Luo S., Huang Y., Xie F., Huang X., Liu Y., Wang W. and Qin Q. 2015.** Molecular cloning, characterization and expression analysis of PPAR gamma in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*, 43(2): 310–324. doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.003
- Marks H., Ren X.Y., Sandbrink H., Van Hulten M.C. and Vlaskovska J.M. 2006.** In silico identification of putative promoter motifs of white spot syndrome virus. *BMC Bioinformatics*, 7: 1–13. doi: 10.1186/1471-2105-7-309
- Marks H., Vorst O., Van Houwelingen A.M., Van Hulten M.C. and Vlaskovska J.M. 2005.** Gene-expression profiling of white spot syndrome virus in vivo. *Journal of General Virology*, 86(7): 2081–2100. doi: 10.1099/vir.0.80895-0

- Millard R.S., Ellis R.P., Bateman K.S., Bickley L.K., Tyler C.R., Van Aerle R. and Santos E.M. 2021.** How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focused on white spot disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186: 1–13 (107369). doi: 10.1016/j.jip.2020.107369
- Peatman E., Terhune J., Baoprasertkul P., Xu P., Nandi S., Wang S., Somridhivej B., Kucuktas H., Li P. and Dunham R. 2008.** Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Molecular Immunology*, 45(2): 553–566. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.012
- Pongsomboon S., Tang S., Boonda S., Aoki T., Hirono I., Yasuike M. and Tassanakajon A. 2008.** Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. *BMB Reports*, 41(9): 670–677. doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.9.670
- Qiu W., Zhang S., Chen Y.G., Wang P.H., Xu X.P., Li C.Z., Chen Y.H., Fan W.Z., Yan H. and Weng S.P. 2014.** *Litopenaeus vannamei* NF- κ B is required for WSSV replication. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1): 156–162. doi: 10.1016/j.dci.2014.02.016
- Robalino J., Almeida J.S., McKillen D., Colglazier J., Trent III H.F., Chen Y.A., Peck M.E., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W. and Gross P.S. 2007.** Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiological Genomics*, 29(1): 44–56. doi: 10.1152/physiolgenomics.00165.2006
- Tarca A.L., Romero R. and Draghici S. 2006.** Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(2): 373–388. doi: 10.1016/j.ajog.2006.07.001
- Wagner E.F. and Nebreda A.R. 2009.** Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 9(8): 537–549. doi: 10.1038/nrc2694
- Wang B., Li F., Dong B., Zhang X., Zhang C. and Xiang J. 2006.** Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnology*, 8: 491–500. doi: 10.1007/s10126-005-6136-4

- Wang H.C., Wang H.C., Kou G.H., Lo C.F. and Huang W.P. 2007.** Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 74(3): 179–189. doi: 10.3354/dao074179
- Wang S., Li H., Zhu P., Fu Q., Yin B., Li Q., Chen R., Jiang X., Weng S. and He J. 2021.** MAPKKK15 gene from shrimp *Litopenaeus vannamei* is transcribed in larva development stages and contributes to WSSV pathogenesis. *Aquaculture*, 534: 1–31 (736324). doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736324
- Zeng Y. and Lu C.P. 2009.** Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays. *Fish and Shellfish Immunology*, 26(4): 646–650. doi: 10.1016/j.fsi.2008.11.005



Research Paper

Bioinformatics analysis of gene network and biological pathways related to white spot disease (WSD) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Reza Pasandideh^{1*}, Majid Pasandideh²

DOI: 10.22124/japb.2024.28614.1554

Received: October 2024

Accepted: December 2024

Abstract

White spot syndrome virus (WSSV) is the cause of white spot disease (WSD), which has caused countless economic losses in the global shrimp farming industry in recent decades. The aim of this research was to identify effective biological pathways and hub genes related to WSD of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Microarray data including 6 samples of hepatopancreas tissue of healthy shrimp and 6 samples of hepatopancreas tissue of shrimp infected with WSSV were extracted from GEO database with accession number GSE4955 and analyzed using GEO2R tool. Then, differential genes with significant expression were determined. STRING online software was used to construct a network between differential genes. Then, the hub genes were identified using the CytoHubba plugin of the Cytoscape software and the maximal clique centrality (MCC) method. The predicted functions of hub genes related to prostaglandin biosynthesis, nuclear factor kappa B (NFkB), mitogen-activated protein kinase (MAPK) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG). It seems that the biological pathways related to these genes, especially NFkB and MAPK genes, can be useful for identification of biomarkers related to WSD, diagnosing or designing inhibitors against WSD.

Key words: *Gene Network Analysis, Protein Interaction, Microarray, Pacific White Shrimp, White Spot Syndrome Virus.*

1- Assistant Professor in Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding Author: Rezapasandideh63@gmail.com

