

**GENOME, VIRULENCE FACTORS, AND SPECIFIC  
MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE MICROSPORIDIAN  
*ENTEROCYTOZON HEPATOPENAEI***



**PATTANA JAROENLAK**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2017**

Copyright by Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**GENOME, VIRULENCE FACTORS, AND SPECIFIC MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE MICROSPORIDIAN *ENTEROCYTOZOON HEPATOPENAEI***

PATTANA JAROENLAK 5736085 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: ORNCHUMA ITSATHITPHAISARN, Ph.D., KALLAYA SRITUNYALUCKSANA, Ph.D., TIMOTHY W. FLEGEL, Ph.D., RAPEEPUN VANICHVIRIYAKIT, Ph.D., BRYONY A.P. WILLIAMS, Ph.D.

**ABSTRACT**

Hepatopancreatic microsporidiosis (HPM), a newly emerging disease caused by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), has become a major disease in the shrimp industry. EHP has been reported to be associated with severe growth retardation and size variation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the Pacific white shrimp *P. vannamei* that results in unprofitable harvests and significant economic losses. Unfortunately, treatment against EHP infection is not yet available due to the lack of insights into infection mechanisms of the parasite. Therefore, in this study, the whole genome sequencing of EHP was carried out using next generation sequencing technology (NGS) to identify potential pathogenic genes. Among many putative virulence factors identified through the genomic study, a spore wall protein gene called EhSWP1 was used to develop a more specific detection method (SWP-PCR) to replace the first generation diagnosis from which false positive results arose when used to screen raw materials such as shrimp feed. With greater specificity, the SWP-PCR method can be used to screen environmental samples and identify reservoirs of EHP in the environment. In addition, we functionally characterized EhSWP1 for its role in host cell recognition. Sequence analyses revealed that EhSWP1 contained three heparin binding motifs (HBMs) at its N-terminus and a BAR-2 domain at its C-terminus. Localization studies showed that EhSWP1 localized on both exospore and endospore layers of mature spores. These results confirmed that EhSWP1 is indeed a spore wall protein. For functional characterization, EhSWP1 could bind to heparin in an *in vitro* heparin binding assay and exogenous heparin reduced the interaction in a dose dependent manner. Mutation of positively charged amino acids in the HBMs to neutral (Gly) or partially negative (Ser) residues abrogated the interaction. Thus, HBMs are important for spore adherence. Taken together, EHP genome information obtained from this study provides a foundation for the development of diagnostic tools that can be used to monitor EHP transmission routes and virulence genes that could be novel targets for therapeutics and control of EHP infection.

**KEY WORDS:** *Enterocytozoon hepatopenaei* / EHP / MICROSPORIDIA / SPORE WALL PROTEIN / SHRIMP

218 pages

จีโนม ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ และวิธีตรวจโรคที่จำเพาะต่อไมโครสปอริเดียน *Enterocytozoon hepatopenaei*  
 GENOME, VIRULENCE FACTORS, AND SPECIFIC MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE MICROSPORIDIAN  
*ENTEROCYTOZOON HEPATOPENAEI*

พัฒนา เจริญลักษณ์ 5736085 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อรชума อัฐสถิตไพศาล, Ph.D., กัลยาณี ศรีชัยญลักษณ์, Ph.D.,  
 ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., รพีพรรณ วานิชวิริยกิจ, Ph.D., ไบรโอนี วิลเลียม, Ph.D.

บทคัดย่อ

Hepatopancreatic microsporidiosis (HPM) เป็นโรคอุบัติใหม่ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) ได้ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง เชื้อตัวนี้ทำให้เกิดการโตช้าและการแตกขนาดในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว ส่งผลกระทบต่อการเก็บเกี่ยวที่ลดลงและขาดทุน อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการรักษาโรคชนิดนี้ เนื่องจากยังขาดความรู้ความเข้าใจเรื่องกลไกการเกิดโรค ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการถอดรหัสจีโนมของเชื้อ EHP ด้วยเทคโนโลยี next generation sequencing เพื่อวิเคราะห์หายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรค ในบรรดาฮีนก่อโรคทั้งหลายของ EHP ยีน spore wall protein หรือ EhSWP1 ได้ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะสูงต่อ EHP ชื่อว่า SWP-PCR เนื่องจากวิธีตรวจวิเคราะห์เดิม (SSU-PCR) สามารถให้ผลบวกปลอมเมื่อตรวจวิเคราะห์กับตัวอย่างอาหารสดและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม วิธีตรวจโรค SWP-PCR ยังมีประโยชน์ในการใช้ระบุแหล่งสะสมเชื้อ (reservoir) ของ EHP ในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการทำงานของยีน EhSWP1 ซึ่งสมมุติฐานว่าเกี่ยวข้องกับการจดจำของเชื้อ EHP กับเซลล์ของกุ้ง จากผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า EhSWP1 ประกอบด้วย 3 Heparin binding motifs (HBMs) อยู่ที่ปลายเอมีน และ 1 BAR-2 domain ที่ปลายคาร์บอกซี ตำแหน่งการแสดงออกของโปรตีน EhSWP1 สามารถพบได้ในชั้น exospore และ endospore บนผนังสปอร์ของเชื้อ จากผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันว่า EhSWP1 เป็น spore wall protein การศึกษาหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้พบว่า EhSWP1 สามารถจับกับ heparin ที่คาดว่าสามารถลดการจับกันของ heparin กับ EhSWP1 ได้ นอกจากนี้การทดลองมีวเทชั่นของ HBMs ทั้งสามใน EhSWP1 เป็นกรดอะมิโนชนิดไกลซีนหรือซีรีน พบว่า EhSWP1 ไม่สามารถจับกับ heparin ได้อีกต่อไป แสดงให้เห็นว่า HBMs มีความสำคัญต่อการจับกับ heparin จากการทดลองทั้งหมด ข้อมูลทางจีโนมของ EHP ที่ได้จากการทดลองนี้เป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคซึ่งใช้ในการระบุเส้นทางการส่งผ่านและก่อโรคของ EHP นอกจากนี้ฮีนก่อโรคต่างๆที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสารยับยั้งหรือวิธีการยับยั้งการติดเชื้อ EHP ได้ในอนาคต

218 หน้า