

Abstract

Project Code: RMU 4980016

Project Title: Expression and characterization of recombinant proteolytic enzymes from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*) venom

Investigator: Ponlapat Rojnuckarin, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

E-mail Address: rojnuckarinp@gmail.com

Project Period: 20 July 2006 to 19 July 2009

Snakebite is the 'neglected' health problem despite the yearly 5.4 million victims worldwide. Furthermore, viper venoms are the exceptional sources of proteins affecting hemostasis, vascular and cancer biology. In-depth studies not only advance clinical managements, but also yield potentially useful therapeutic and diagnostic agents. Molecular biology approach was used to investigate the toxic components of the venom. A novel serine protease, albofibrase, was cloned from GPV gland cDNA library and expressed in *Pichia pastoris*. Albofibrase showed fibrinogenolytic activity, which is inhibited by antivenom and probably plays an important role in clinical defibrination syndrome. Furthermore, it has a potential to be a novel anticoagulant, which can be reversed of over-dosage using antivenom. In addition, 3 cDNA clones of snake venom metalloprotease/disintegrins (SVMPs) were isolated and expressed in *Pichia* system. Clone 35 (Albolatin) and 38 are type P-II SVMPs composed of pro-, protease and disintegrin domains. Recombinant albolatin disintegrin is a KGD-bearing homodimer that inhibits collagen-induced platelet aggregation. Homologously, clone 38 contains an RGD motif and also completely blocks collagen-stimulated platelet aggregation. These 2 disintegrins are potentially novel anti-platelet agents. On the other hand, clone 39 is a type P-III SVMP comprising pro-, protease, disintegrin-like and cysteine-rich domain. The recombinant protein degrades type IV collagen within a few hours suggesting its role in the pathogenesis of tissue necrosis after snakebites. Inhibitory experiments on this SVMP will be helpful to find a novel remedy for the complication that is usually unresponsive to conventional antivenoms.

Keywords: Green pit viper, viper venom, serine protease, snake venom metalloprotease, disintegrin, platelet aggregation, anticoagulant

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU 4980016

ชื่อโครงการ: การสังเคราะห์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากพิษงูเขียวหางไหม้ (*Cryptelytrops albolabris*)

ชื่อนักวิจัย: นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์, ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: rojnuckarinp@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 20 กรกฎาคม 2549 ถึงวันที่ 19 กรกฎาคม 2552

ภาวะงูกัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ถูกกละเลยมองไม่ให้ความสนใจแม้ว่าจะมีผู้ถูกงูกัดถึง 5.4 ล้านคนต่อปีทั่วโลก พิษงูตระกูลไวยเปอร์เป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนที่มีผลต่อระบบการห้ามเลือด หลอดเลือด และ เซลล์มะเร็ง การวิจัยเชิงลึกไม่เพียงแต่จะทำให้การรักษางูกัดมีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้นแล้ว ยังอาจจะได้สารใหม่เพื่อมาช่วยในการวินิจฉัยและรักษาโรคอื่นๆด้วย ผู้วิจัยได้โคลนยีนจากห้องสมุดยีนที่แสดงออกในต่อมพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลืองของไทย และ แสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* โปรตีนอัลโบไฟเบอร์ส เป็นเอนไซม์ซีรีนโปรติเอสตัวใหม่ ที่ย่อยสลายไฟบริโนเจนสายอัลฟาของคน และถูกต้านฤทธิ์ด้วยเซรุ่ม สารนี้จึงอาจสามารถนำมาพัฒนาเป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดใหม่ ที่สามารถถูกแก้ฤทธิ์ได้ด้วยเซรุ่มต้านพิษงูถ้าได้รับยาเกินขนาด นอกจากนี้ได้โคลนยีนเมทัลโลโปรติเอสใหม่อีก 3 ตัวและ แสดงออกใน *Pichia pastoris* โคลนที่ 35 (Albolatin) และ 38 เป็น เมทัลโลโปรติเอสจากพิษงู ชนิด P-II คือประกอบด้วยส่วน prodomain, protease และ ดิสอินทิกริน โดย albolatin มีกรดอะมิโน KGD อยู่เป็นคู่ และสามารถยับยั้งการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจน และ เช่นเดียวกัน เมทัลโลโปรติเอสโคลนที่ 38 มีกรดอะมิโน RGD และ ยับยั้งการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจนได้สมบูรณ์ ดิสอินทิกรินทั้งคู่นี้ น่าจะได้รับการศึกษาในการนำมาเป็นยาต้านเกร็ดเลือดชนิดใหม่ต่อไป ส่วนเมทัลโลโปรติเอสโคลนที่ 39 เป็น เมทัลโลโปรติเอสจากพิษงู ชนิด P-III คือประกอบด้วยส่วน prodomain, protease, disintegrin-like และ ส่วน cysteine-rich โปรตีนที่แสดงออกใน *Pichia* พบว่าสามารถย่อยสลายคอลลาเจน ชนิดที่ IV ได้ในเวลาเป็นชั่วโมง จึงน่าจะมีส่วนที่ทำให้เกิดเนื้อเน่าตายในผู้ป่วยที่ถูกงูกัดซึ่งเป็นภาวะที่ใช้เซรุ่มไม่ได้ผล การพยายามหาสารต้านฤทธิ์โปรตีนนี้ในหลอดทดลองอาจนำไปสู่การรักษาที่ได้ผลต่อภาวะนี้ในอนาคต

คำสำคัญ: งูเขียวหางไหม้, พิษงู, ซีรีนโปรติเอส, ดิสอินทิกริน, เมทัลโลโปรติเอส, เมทัลโลโปรติเอส, สารต้านเกร็ดเลือด, สารต้านการแข็งตัวของเลือด