

Abstract

Project Code: RSA5480023

Project Title: Molecular Approach to Viper Venoms

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

E-mail Address: rojnuckarinp@gmail.com

Project Period: 15 June 2014 to 14 June 2017

Snakebite is still a major global public health problem. Although antivenom promptly neutralizes venom-induced coagulopathy, it cannot reverse tissue necrosis and renal failure. As viper venom is a rich source of innumerable proteins with diverse effects on human biology, venom research yields not only insights in snakebite management, but also clinically useful derivatives from snake venoms.

From the library of Green pit viper venom glands, a novel snake venom metalloproteinase (SVMP), albolamin, was cloned. The recombinant protein could digest collagen and inhibit collagen-induced platelet aggregation. Additionally, serine proteases, GPV-TLs, were cloned and characterized. The proteins could cleaved fibrinopeptide B from fibrinogen and had potentials to be diagnostic agents. Mutagenetic studies showed an important role of the exosite of the proteins. These data may be helpful for future protein engineering.

Next-Generation Sequencing (NGS) of mRNA from Myanmar Russell viper (MRV) venom glands was performed on Illumina HiSeq2000 platform. After *de novo* assembly using the Trinity software, the transcripts were annotated through BlastN and BlastX. SVMPs were the most abundant toxin transcripts, which were disintegrin (75%), type P-III (25%) and type P-II SVMPs (0.002 %). Isoform differences in SVMPs were detectable between snake genders supporting the use venoms of both sexes for the preparation of antivenom. In addition, novel tripeptide SVMP inhibitors (SVMPis) were discovered and 2 tripeptides, pERW and pEKW, were isolated from the venom. These inhibitors completely inhibited the proteolytic activities of purified MRV SVMPs, RVV-X and Daborhagin, at 5 mM concentration suggesting that they deserved further studies for development of a therapy for Russell's viper envenoming.

Keywords: Viper venom, Serine protease, Snake venom metalloproteinase, Next generation sequencing, Snake venom metalloproteinase inhibitor

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5480023

ชื่อโครงการ: การศึกษาพิษงูไวกเปอร์ระดับโมเลกุล

ชื่อนักวิจัย: นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์, ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์,

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: rojnuckarinp@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2557 ถึงวันที่ 14 มิถุนายน 2560

ภาวะงูกัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ถึงแม้เซรุ่มต้านพิษงูสามารถต้านฤทธิ์ต่อระบบโลหิตได้ทันที แต่ไม่สามารถแก้ฤทธิ์ที่ทำให้เนื้อตายและไตวายได้ พิษงูตระกูลไวกเปอร์เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยโปรตีนที่มีผลต่อระบบต่างๆในคน การวิจัยพิษงูไม่เพียงแต่จะทำให้การรักษางูกัดมีความก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น แต่ยังทำให้ได้สารใหม่เพื่อมาช่วยในการวินิจฉัยและรักษาโรคอื่นๆด้วย

จากห้องสมุดยีนที่แสดงออกในต่อมพิษงูเขียวหางไหม้ได้ค้นพบเมทัลโลโปรตีนเนส (SVMP) ตัวใหม่ ได้แก่ albolamin ซึ่งสามารถย่อยสลายคอลลาเจน และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยคอลลาเจน นอกจากนี้ได้พบ GPV-TLs ซึ่งสามารถตัดย่อยไฟบริโนเจนเปปไทด์ บี ออกจากไฟบริโนเจนได้ ซึ่งอาจนำมาใช้ตรวจโรคของไฟบริโนเจนได้ การศึกษาโดยการกลายพันธุ์ในหลอดทดลองพบว่าส่วน exosite มีความจำเป็นต่อการทำงานของโปรตีน ซึ่งความรู้นี้อาจนำไปสู่ การสร้างโปรตีนให้มีประสิทธิภาพตามต้องการได้ในอนาคต

ผู้วิจัยได้ศึกษา mRNA จากต่อมพิษงูแมวเซาพม่าโดยวิธี Next-Generation Sequencing (NGS) ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq2000 ลำดับเบสได้นำมาเชื่อมกันโดยโปรแกรม Trinity และนำมากำหนดชื่อโดยโปรแกรม BlastN และ BlastX พบว่าเมทัลโลโปรตีนเนสเป็นโปรตีนพิษที่พบมากที่สุด โดยเป็น ดิสอินทิกริน (75%) SVMP ชนิด P-III (25%) และ ชนิด P-II (0.002 %) และพบว่าชนิดย่อย (isoform) ของ SVMPs มีความแตกต่างกันระหว่างเพศของงู ดังนั้นการเตรียมเซรุ่มจากพิษงูต้องใช้พิษจากงูทั้ง 2 เพศ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารต้านเมทัลโลโปรตีนเนส (SVMPis) ชนิด tripeptide ทั้งจาก mRNA และจากพิษงู โดย SVMPis นี้สามารถต้านฤทธิ์การย่อยโปรตีนของ SVMPs จากงูแมวเซา ได้แก่ RVV-X และ Daborhagin ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งบ่งว่าสารเหล่านี้น่าจะนำมาศึกษาต่อเพื่อพัฒนาการรักษาผู้ป่วยงูแมวเซากัดในอนาคต

คำสำคัญ: พิษงูไวกเปอร์ ซีรีนโปรตีเอส เมทัลโลโปรตีเอส Next-generation sequencing สารต้านเมทัลโลโปรตีเอส