การแสดงออกและคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสมเมตาโลโปรตีเนสชนิดใหม่จากพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คริปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบริส)

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาว ปัญชลี จ้างประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 9 7 4 7 4 9 6 3 0

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT NOVEL SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE FROM GREEN PIT VIPER (CRYPTELYTROP ALBOLABRIS)

Miss Panchalee Jangprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522295

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

ปัญชลี จ้างประเสริฐ: การแสดงออกและคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสมเมตาโลโปรตีเนสชนิดใหม่จากพิษงูเขียวหางไหม้ท้องเหลือง (คริปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส). EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT NOVEL SNAKE VENOM METALLOPROTEINASE FROM GREEN PIT VIPER (CRYPTELYTROP ALBOLABRIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.นพ.ดร.พลภัทร โรจน์นครินทร์ 50หน้า.

โปรตีนเมตาโลโปรตีเนสจากพิษงูมีฤทธิ์ตัดย่อยเนื้อเยื่อรอบเซลล์ ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด และ ยับยั้งการทำงานเกล็ดเลือด การศึกษาโปรตีนนี้ไม่เพียงแต่ให้ความรู้เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของงูกัด แต่ยังอาจทำให้ได้ยาต้านเกล็ดเลือดชนิดใหม่ เราได้โคลนของโปรตีนเมตาโลโปรตีเนสชนิดใหม่ซึ่งมีลำดับเบส RGD ที่แยกได้จากห้องสมุด cDNA ของต่อมพิษของของงูเขียวหางไหม้ท้องเหลืองคริปเทไลทรอปส์ อัลโบลาบรีส การวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่มย่อย P-IIb ของโปรตีนเมตาโลโปรตีเนสจากพิษงูและมีความเหมือนกับ Jerdonitin จากงู *Trimeresurus jerdonii* ร้อยละ 81 โดยมีส่วนของซิสเทอีนที่เหมือนกันซึ่งเกิดไดซัลไฟด์บอนด์จับระหว่างเมตาโลโปรตีเนสและดิสอินทริกรินเข้าด้วยกัน cDNA ซึ่งติดฉลากด้วยฮิสทิดีนที่ปลายด้านอมิโนประกอบด้วยของโดเมนส่วนเมตาโลโปรตีเนสและดิสอินทริกรินถูกนำมาใส่ในพาหะ pPICZαA และแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* โปรตีนที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 32 กิโลดาลตัน จากการทำ Western blot ที่จับด้วยแอนติบอดีต่อ polyhistidine โปรตีนลูกผสมมีความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการกระตุ้นด้วยคอลลาเจนโดยขึ้นกับความเข้มข้น ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) คือ 5.6 ไมโครลิตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่กระตุ้นด้วย เอดีพี ดังนั้นกลไกการยับยั้งอาจเกิดจากการขัดขวางการเข้าจับที่ตัวรับของคอลลาเจน โปรตีนนี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นสารต้านการแข็งตัวของเกร็ดเลือดชนิดใหม่ได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ปัญชลี จ้างประเสริฐ

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

4974749630: MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS : Snake venom / metalloproteinase / Yeast expression / Platelet aggregation

Panchalee Jangprasert: Expression and Characterization of Recombinant Novel Snake venom metalloproteinase from green pit Viper (*Cryptelytrops albolabris*). Thesis Advisor: Associate Professor Ponlapat Rojnuckarin, M.D., PhD., 50 pp.

Snake venom metaloproteases (SVMPs) may degrade extracellular matrix and/or clotting factors, as well as inhibit integrin and platelet functions. Studying them not only gives us deeper insights in pathogenesis of snakebites, but also potentially yields novel antiplatelet agents. A clone of novel RGD-containing, P-II type, snake venom metalloproteinase was isolated from the green pit viper, *C. albolabris,* venom gland cDNA library. Sequence analysis revealed that it belonged to P-IIb subclass of SVMP and 81% identical to Jerdonitin from *Trimeresurus jerdonii*. They contained 2 conserved cysteines forming a disulfide bond, which held metalloproteinase and disintegrin together in mature proteins. The N-terminally histidine-tagged construct of metalloproteinase and disintegrin domains was inserted into the pPICZαA vector and expressed in *Pichia pastoris*. The recombinant protein was approximately 32kD on Western blot probed with anti-polyhistidine antibody. The recombinant SVMP dose dependently inhibited platelet aggregation induced by collagen with the IC_{50} of 5.6 μM. . However, there was no effect on ADP-induced platelet aggregation. Therefore, the inhibition mechanism should be through blocking of collagen receptor(s). This recombinant protein has a potential to be a novel anti-platelet agent.

Field of Study : Medical Science Student's Signature Panchalee Jangprasert

Academic Year : 2009 Advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENTS

I really would like to express my gratitude to all people who participated in this work. Firstly, I thank to my advisor Assoc. Prof. Ponlapat Rojnackarin for his kindness, care, invaluable advice and encouragement during my work on this thesis. I am also indebted to other committee members, Prof. Apiwat Mutirangura, Asst. Prof. Tewin Tencomnao and Asst. Prof. Yuttana Mundee, for their helpful comments and suggestions during my study.

I am really grateful to Dr. Chaunchom Maunpasitporn, Miss Pon Singhamatr, Mr. Anuwat Pinyachat and Miss Pornthip Mekchay who are in our laboratory for their helps and support from the beginning of my laboratory practice. Moreover, they often asked me good questions, encouraged me to do my thesis, gave valuable comments and reviewed my work.

Finally, I would like to thank to my dear parents for their loves, which have brought me today's success.

This study was supported by the Thai Research Fund and The Commission on Higher Education.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Snake bites and green pit viper venom	1
1.2 Research Questions	5
1.3 Hypothesis	5
1.4 Objectives of the Study	5
1.5 Keywords	5
1.6 Conceptual Framework	6
1.7 Benefits and Applications	7
CHAPTER II LITERATURE REVIEW	8
2.1 Characteristics and activities of Snake Venom Metalloproteinase (SVMPs)	8
2.2 Study of the effect of native and recombinant SVMPs *in vivo* and *in vitro*	10
2.3 Production of recombinant SVMPs in *Pichia* Expression System	13
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS	15
3.1 Materials	15

Page

3.1.1 Cloning of P-II Snake venom metalloproteinase..... 15
3.1.2 Expression of P-II SVMPs in *Pichia pastoris*..... 17
3.1.3 Activity Assay..... 18
3.2 Methods..... 18
3.2.1 Expression of P-II SVMP in *Pichia pastoris*..... 18
3.2.2 Purification of Recombinant Proteins..... 24
3.2.3 Protein Detection..... 24

CHAPTER IV RESULTS 27
4.1 Expression of Snake Venom Metalloprotease Clone 038 (SVMP 038) in *Pichia pastoris* 27
4.2 Characteristics and function of recombinant protein 34

CHAPTER V DISCUSSION..... 37

REFERENCES..... 45
BIOGRAPHY..... 50

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Oligonucleotide primers and their descriptions.....	15

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Classification of venom metalloproteinase.....	3
2	The SVMP 038 PCR product on 1.5% agarose gel.....	27
3	The restriction enzyme digested products of the plasmid purified from.....	28
4	The restriction digested transformed pPICZαA vector.....	29
5	The homology search for the cDNA sequence of P-II SVMP clone 038 from *C. albolabris*	30
6	The cDNA sequence and conceptual translation of 038 SVMP.....	31
7	The protein sequence alignment of our SVMP_038 and Jerdonitin using CLUSTALW program.....	32
8	The *Sac* I restriction product from pPICZαA vector	33
9	Colonies found 4 days on a Zeocin-containing plate	33
10	The purified recombinant protein on Western blotting analysis	34
11	Inhibition of platelets aggregation assay with variable concentration of recombinant SVM038.	35
11	Effect of variable concentration and IC_{50} of recombianant SVM038 on inhibition human platelets aggregation	36

LIST OF ABBREVIATIONS

ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine tri phosphate
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
dNTPs	dATP, dttp, dGTP and dCTP
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	*Escherichia coli*
g	Gram
IC_{50}	The concentration of an inhibitor required to inhibit 50% of aggregation
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani media
M	Molarity
mg/Liter	Milligram per liter
Micro BCA	Micro Bicincrhoninic Acid
nM	Nano molar
nm	Nanometer
OD	Optical density
P-II SVMP	Class II of Snake Venom Metalloprotease
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Round per minutes
SDS	Sodium dodecyl suphate
SDS PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SVMP 038	Snake Venom Metalloprotease Clone 038
Tris-HCl	Tris-(hydroxylmethyl)-aminoethane
µ	Micro
µg	Microgram
µl	Microliter

µg/ml	Microgram per millilitre
x g	Gravity