

Masna spektrometrija v raziskavah kačjih strupov

Mass spectrometry in snake venom research

Adrijana Leonardi

Institut »Jožef Stefan«, Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti,
Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija

Korespondenca: adrijana.leonardi@ijs.si

Izveček: Masna spektrometrija omogoča hitro in zanesljivo identifikacijo in karakterizacijo proteinov in peptidov v kačjih strupih. Z vse večjo dostopnostjo transkriptomskih in genomskih podatkov se večja podatkovna baza proteinskih zaporedij, ki je ključna za identifikacijo proteinov. Kačje strupe analiziramo z večdimenzionalnim proteomskim pristopom, poimenovanim »venomika«. Proteine najprej med seboj ločimo z eno- ali dvo-dimenzionalno gelsko elektroforezo ali s hitro tekočinsko kromatografijo na obrnjenih fazah. Posamezne proteinske lise oziroma frakcije encimsko razgradimo in dobljene peptide analiziramo z masnim spektrometrom. Proteine identificiramo s primerjavo masnih spektrov peptidov s spektri v podatkovni bazi. Visoko zmogljivi masni spektrometri omogočajo analizo strupov tudi brez predhodnega ločevanja mešanice proteinov v strupu. Analizirali smo proteinski sestavi (proteoma) dveh evropskih, medicinsko najbolj zanimiv kačjih strupov, modrasovega (*Vipera a. ammodytes*) in gadovega (*Vipera b. berus*). Modras je najbolj strupena evropska kača. Njen ugriz je sicer redko smrten, pogosto pa zahteva bolnišnično opazovanje in zdravljenje s protistrupom. Gad je najbolj razširjena evropska strupenjača, katere ugriz v večini primerov izzove blažje simptome kot ugriz modrasa. S proteomsko raziskavo smo na molekulskem nivoju razložili opažene razlike v delovanju obeh strupov. Poleg tega smo analizirali tudi proteom strupa malega gada (*Vipera ursinii* ssp.), najbolj ogrožene evropske kačje vrste. Za človeka ne predstavlja nobene nevarnosti. V naravi se prehranjuje pretežno z insekti, medtem ko jih v ujetništvu hranijo z mišmi. Primerjava proteomske analize strupa kač iz naravnega okolja in strupa kač iz ujetništva je pokazala očitne razlike. Sestava kačjega strupa je torej pogojena z dieto. Masna spektrometrija je zelo uporabno orodje tudi pri karakterizaciji protistrupov (antivenomika), za določanje njihove specifičnosti in nevtralizacijske moči.

Ključne besede: antivenomika, kačji strup, mali gad, masna spektrometrija, modras, navadni gad, proteomika, venomika, *Vipera a. ammodytes*, *Vipera b. berus*, *Vipera ursinii*

Abstract: Mass spectrometry allows rapid and reliable identification and characterisation of proteins and peptides in snake venoms. With the increasing availability of transcriptomic and genomic data, there is a growing database of protein sequences that is essential for protein identification. Snake venoms are analysed using a multi-

dimensional proteomic approach known as ‚venomics‘. Proteins are first separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis or reversed-phase liquid chromatography. The individual protein spots or fractions are digested enzymatically and the resulting peptides are analysed by mass spectrometry. The proteins are identified by comparing the mass spectra of the peptides with those in the database. High-performance mass spectrometers allow the analysis of venoms even without prior separation of the protein mixture. We have analysed the protein composition (proteome) of two European snake venoms of greatest medical interest, the nose-horned viper (*Vipera a. ammodytes*) and the common adder (*Vipera b. berus*). The nose-horned viper is the most venomous European snake. Although its bite is rarely fatal, a human victim often needs to be observed in hospital and treated with an antivenom. The adder is the most widespread European venomous snake and its bite causes milder symptoms than the bite of the nose-horned viper in most cases. To explain the observed differences in the effects of the two venoms at the molecular level, a proteomic study was performed. We also analysed the proteome of the venom of the meadow viper (*Vipera ursinii*), the most threatened snake species in Europe. It does not pose a threat to humans. In the wild, it feeds mainly on insects, while in captivity it is fed on mice. A comparison of the proteome of the venom of snakes in the wild and snakes in captivity showed clear differences. Thus, the composition of snake venom is diet-dependent. Mass spectrometry is also a very useful tool in the characterisation of antivenoms (antivenomics) to determine their specificity and neutralising power.

Keywords: antivenomics, common adder, mass spectrometry, meadow viper, nose-horned viper, proteomics, snake venom, venomics, *Vipera s. ammodytes*, *Vipera b. berus*, (*Vipera ursinii*)

Uvod

Strupene kače so skozi evolucijo razvile enega najbolj izpopolnjenih orožij v naravi. Njihov strup lahko povzroči prizadetost ali celo smrt, zato so se jih ljudje skozi zgodovino bali, jih častili in jim pripisovali nadnaravne moči. Raziskave kačjega strupa so v sodobnem času usmerjene predvsem v obvladovanje kačjih ugrizov, v razvoj diagnostike in protistrupov (antidotov) ter novih pristopov zdravljenja. Kačji strupi so zanimivi tudi kot potencialni vir visoko specifičnih

farmakološko aktivnih snovi in spojini vodnic za razvoj inovativnih zdravil. Opisanih je že več kot 3000 vrst kač, od katerih je le ena petina strupenih (Uetz in sod. 2022). Slednje razvrščamo v štiri družine: Colubridae (goži), Elapidae (strupeni goži), Atractaspidae (zemeljski gadi) in Viperidae (gadi). Približno deset odstotkov vseh kač (376 vrst) pripada družini Viperidae. Ta se naprej deli na tri poddružine: *Azemiopinae* in *Crotalinae* (jamičarke) ter *Viperinae* (pravi gadi). Evolucijski izvor poddružine *Viperinae* (trenutno obsega 100 vrst) je še vedno nejasen, vendar sega v srednji

Okrajšave: IDE, enodimenzionalna gelska elektroforeza; 2DE, dvodimenzionalna gelska elektroforeza; cDNA, komplementarna deoksiribonukleinska kislina; CRISP, s cisteinom bogati sekretorni proteini; CTL, lektini tipa C; DIS, disintegrini; DNA, deoksiribonukleinska kislina; ELISA, encimsko-immunski test; ESI, elektrosprej ionizacija (ang. *electrospray ionization*); LC, tekočinska kromatografija (ang. *liquid chromatography*); KUN, peptidi Kunitzovega tipa; LAO, *L*-aminokislinske oksidaze; MALDI, ionizacija z lasersko desorbcijo ob pomoči matrice (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*); MPKS, metaloproteinaze iz kačjih strupov; MS, masna spektrometrija; MS/MS, tandemna masna spektrometrija; NaDS-PAGE, poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata; NCBI, Nacionalni center za biotehnoške informacije (ang. *National Center for Biotechnology Information*); RNA, ribonukleinska kislina; RP-HPLC, visokotlačna tekočinska kromatografija na obrnjenih fazah; sPLA₂, sekretorne fosfolipaze A₂; SPKS, serinske proteaze iz kačjih strupov; TOF, čas preleta ionov (ang. *time of flight*); WHO, Svetovna zdravstvena organizacija (ang. *World Health Organization*).

eocen in zgodnji miocen (42 do 34 milijonov let nazaj) (Alencar in sod. 2016). Najstarejši znani fosil, *Vipera antiqua*, pa so našli v srednji Evropi in je datiran v zgodnji miocen, pred približno 22,5 milijoni let (Šmid in Tolley 2019). Odtlej so se *Viperinae* razvile v več linij in osvojile "Stari svet". Ob Evropi (z izjemo Irske in nekaj sredozemskih otokov), te kače najdemo na Bližnjem vzhodu, v Afriki (z izjemo Madagaskarja) in v Aziji, celo na skrajno vzhodnih otokih, Tajvanu in Sahalinu. V Sloveniji lahko srečamo modrasa (*Vipera ammodytes ammodytes*), navadnega gada (*Vipera berus berus*) in laškega gada (*Vipera aspis*, podvrsta *francisciredi*). Prvi je najbolj strupena, drugi pa najbolj razširjena evropska strupenjača.

Strupene kače so za onesposobitev ali celo usmrnitev plena razvile zelo zapleten strupni aparat (Mebs 2002). Na obeh straneh zgornje čeljusti se nahajajo posebne strupne žleze, ki razvojno izhajajo iz žlez slinavk in proizvajajo strupen izloček oziroma strup. Tega ob ugrizu kače vbrizgajo v plen skozi ostre strupnike, različno dolge votle zobe z majhno odprtino na konici. Pri velikih kačah iz družine gadov, npr. puhnici (*Bitis arietans*), so strupniki daljši od 3 cm, pri slovenskih strupenjačah pa niso daljši od enega centimetra. Količino iztisnjenega strupa kača regulira s pritiskom mišic na žlezo. Tako v primeru obrambnega ugriza včasih celo ne pride do izločanja strupa. Takemu ugrizu pravimo suhi ugriz. Kače svoj plen pogoltnejo v celoti, zato mora strup hitro in učinkovito prizadeti vitalne telesne funkcije žrtve, npr. blokirati krčenje mišic ali pretok krvi. Delovanje strupa je odvisno od njegove sestave, ki je značilna za vsako kačjo družino. Strupi gožev in gadov najbolj zmotijo strjevanje krvi (hemotoksičnost), strupi zemeljskih gadov delovanje srca (kardiotoksičnost), strupi strupenih gožev pa poleg delovanja srca tudi delovanje živčevja (nevrotoksičnost).

Izvor in sestava kačjih strupov

Kačji strupi vsebujejo mešanico biološko aktivnih proteinov in peptidov (približno 90-95 % mase strupa) ter drugih neproteinskih sestavin, vključno z ogljikovimi hidrati, lipidi, amini in anorganskimi solmi (Villar-Briones in Aird 2018; Mebs 2002). Proteinske komponente

izvirajo iz genov, ki sicer nosijo zapis za telesne proteine, po navadi tiste, ki sodelujejo v ključnih fizioloških procesih v telesu (npr. v hemostazi, prenosu živčnega signala ...). V evoluciji je prišlo do podvajanja teh genov, prenosa ene od kopij v strupno žlezo in njenega razvoja v strupni žlezi, kjer je v procesu neofunkcionalizacije razvila nove funkcije za učinkovito delovanje strupne žleze (Barua in Mikheyev 2020). Da bi bili učinkoviti pri lovljenju plena in obrambi pred plenilci, se geni za toksine, v primerjavi z geni za netoksične proteine, razvijajo precej hitreje (Kini 2018). Predlaganih je bilo več različnih mehanizmov za razlago tega zanimivega pojava, kot so pogostejše mutacije v eksonih (delih gena, ki nosijo zapis za protein) v primerjavi z introni (delih gena, ki ne nosijo zapisa za protein) in nesinonimne zamenjave v eksonih (zamenjava nukleotida v DNA, ki povzroči spremembo v aminokislinskem zaporedju), visoka pogostost točkovnih mutacij, spremembe na meji med intronom in eksonom, izbris eksona in izguba/pridobitev domen z rekombinacijo ter hitro kopičenje mutacij, ki povzročajo spremembe na površini proteinske molekule. V multigenških družinah toksinov se ohrani osnovno molekularno strukturo (tridimenzionalna struktura), spreminjajo pa se aminokislinski ostanki izven ogrodnih, ki so ključni za funkcijo. Tako skozi evolucijo nastajajo izooblike osnovne molekule z novimi aktivnostmi (Fry in sod. 2009). Dejavniki, ki vplivajo na neofunkcionalizacijo so številni, nekateri še neznani, povzročajo pa variacije v sestavi strupa. Na krajši rok pa so za sestavo strupa pomembni dejavniki, ki vplivajo na izražanje strupnih genov. Tako sestava strupa variira glede na vrsto in geografsko podvrsto kače, njen spol, starost in velikost kot tudi prehrano in letni čas (Chippaux in sod. 1991; Lang Balija in sod. 2005).

Venomika kačjih strupov

V novem tisočletju je masna spektrometrija (MS) postala glavna analitska metoda v proteomiki, masovno in hitropretočno identifikacijo in karakterizacijo kompleksnih proteinskih zmesi, kakršne so tudi kačji strupi. Skokovit tehnični napredek na področju MS in proteomike vzporedno z nekaterimi

drugimi »omik«-tehnologijami, transkriptomiko in genomiko, toksinologom omogočajo bolj in bolj poglobljeno kvalitativno in kvantitativno analizo živalskih strupov, tako imenovano venomiko (Calvete in sod. 2007; Calvete in sod. 2009).

Masna spektrometrija–Proteomika

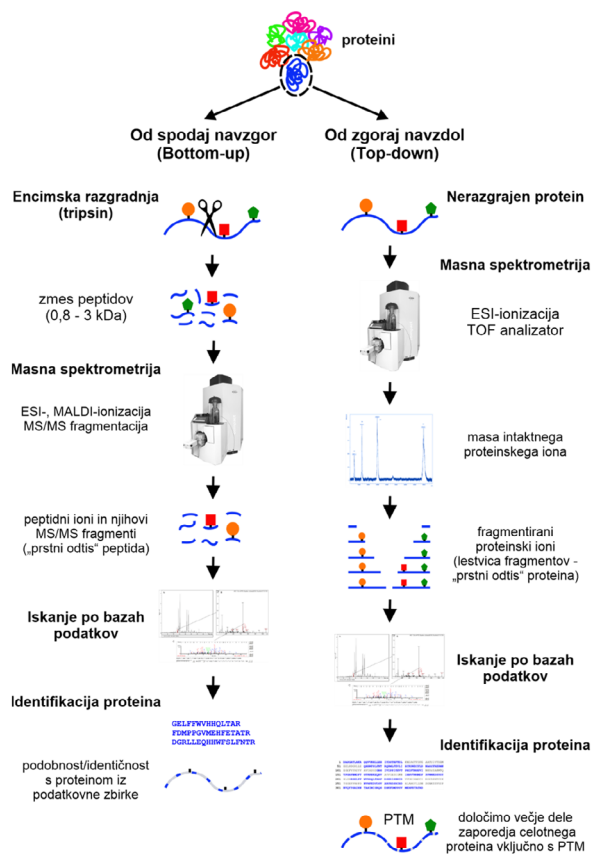
MS temelji na analizi ionov v plinastem stanju. Ti se v magnetnem polju ločijo glede na razmerje njihove mase in naboja (m/z). Glede na način ionizacije (npr. elektrosprej (ang. *electrospray ionization*, ESI); ionizacija z lasersko desorbpcijo ob pomoči matrice (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) in masnega analizatorja (npr. kvadrupolni, na ionsko past, na čas preleta ionov (ang. *time of flight*, TOF) ločimo več vrst masnih spektrometrov. Za določanje mase celih proteinskih molekul se uporablja kombinacija MALDI- ali ESI-TOF, medtem ko je kombinacija ESI in analizatorja z ionsko pastjo ali trojnega kvadrupolnega (ang. *quadrupole*, Q) analizatorja primerna za generiranje sekundarnih ionskih spektrov in s tem za »*de novo*« sekvenčiranje peptidov. Identifikacijo proteinov z MS najpogosteje izvajamo s pristopoma »od spodaj navzgor« (ang. *bottom-up*) in »od zgoraj navzdol« (ang. *top-down*) (Sl. 1).

Proteomika »od spodaj navzgor« temelji na MS in MS/MS analizi peptidov, dobljenih z encimsko ali kemično razgradnjo proteinov. Peptidni oziroma prekurzorski ion ujamemo v kolizijski celici in izzovemo njegovo delno fragmentacijo. Tako se v prekurzorskem ionu delno cepijo le vezi v osnovni peptidni verigi, da nastanejo fragmenti - produkti ioni, ki se med seboj razlikujejo le za en aminokislinski ostanek. Produktne ione analiziramo, da dobimo MS/MS spekter, ki je specifičen za vsak peptid oziroma njegov prekurzorski ion. Odvisen je od njegovega aminokislinskega zaporedja in predstavlja njegov »prstni odtis«. Peptide identificiramo z bioinformatičnimi analizami MS in MS/MS spektrov, ki uporabljajo različne algoritme za iskanje po podatkovnih bazah (npr. Mascot in Sequest) (Chen in sod. 2020). Slednje temelji na matematični primerjavi prekrivanja masnih spektrov analiziranih peptidov z bazo podatkov, v kateri so eksperimentalno določeni ali/in teoretično

generirani peptidni MS spektri proteinov. Rezultat računalniške analize je najverjetnejša identiteta analiziranega proteina.

Pri proteomskem pristopu »od zgoraj navzdol« (Sl. 1) analiziramo cele proteinske molekule (Schaffer in sod. 2019). Z ESI ali MALDI ionizacijo se v plinski fazi pripravijo ioni celih proteinov, ki jih potem analiziramo s TOF analizatorjem. Prednost te metode je, da lahko med seboj ločimo vse oblike, v katerih določeni protein obstaja (proteoforme) - so sicer produkt istega gena, a rezultat specifičnih genetskih variacij, alternativnega spajanja in posttranslacijskih modifikacij. Proteinski ioni lahko fragmentirajo z disociacijo, povzročeno s trki, ali z metodama »mehke« disociacije z zajemanjem elektronov ali prenosom elektronov v masnem spektrometru. Pri tem razberemo molekulsko maso proteinskega iona in mase njegovih fragmentov - peptidov (»prstni odtis« proteina). Če je za identifikacijo potrebno, lahko večje peptide dodatno fragmentiramo in produkte analiziramo s tandemsko MS (MS/MS). V primeru MS analize čistih proteinov lahko določimo njihovo celotno primarno strukturo vključno s post-translacijskimi modifikacijami. Fragmentacija ionov celih proteinov z visoko molekulsko maso (večjo od 50-70 kDa) v plinski fazi je težavna, zato je za razločevanje razlik med velikimi molekularnimi ioni podobnih mas potreben instrument zelo visoke ločljivosti. Glavni izzivi, s katerimi se trenutno sooča proteomika »od zgoraj navzdol«, so še posebej omejena točnost proteinov, dinamično območje proteomov, kompleksnost proteomov in analiza kompleksnih podatkov (Melby in sod. 2021).

Glede na dopolnjujočo se naravo informacij, ki jih zagotavljata oba pristopa masne analize proteinov, se bosta v proteomiki še naprej uporabljala oba. Različne statistične metode in metode strojnega učenja, ki so bile razvite za izvajanje poglobljene analize v proteomskih študijah, pa nam omogočajo, da kvalitativne in kvantitativne podatke o proteinih uporabimo pri rekonstrukciji proteinskih interakcij in signalnih omrežij.



Slika 1: Pristopi v proteomiki, ki temeljijo na masni spektrometriji. S proteomiko »od spodaj navzgor« (ang. *bottom-up*) analiziramo manjše proteinske fragmente (peptide), pridobljene z encimsko (najpogosteje se uporablja tripsin) ali kemično razgradnjo proteinov. Posamezni peptidni ion v masnem spektrometru fragmentiramo, da dobimo tandemski masni spekter (MS/MS spekter), ki je značilen za vsak peptid oziroma njegov prekursorjski ion (»prstni odtis« peptida) posebej. Z uporabo računalniških algoritmov primerjamo izmerjene mase peptidnih ionov in/ali njihovih fragmentov z bazo podatkov, v kateri so teoretično generirani peptidni masni spektri (MS in MS/MS) proteinov. Rezultat te analize je najverjetnejša identiteta analiziranega proteina. S proteomiko »od zgoraj navzdol« (ang. *top-down*) dobimo informacijo o masi celih, intaktnih proteinskih molekul, vključno z njihovimi post-translacijskimi modifikacijami. Za identifikacijo cele proteine fragmentiramo v masnem spektrometru, da dobimo masno lestvico fragmentov, značilno za vsak protein (t.i. »prstni odtis« proteina).

Figure 1: Mass spectrometry-based approaches in proteomics. Bottom-up proteomics is used to analyse small protein fragments (peptides) obtained by enzymatic (usually trypsin) or chemical degradation of proteins. A single peptide ion is fragmented inside mass spectrometer to obtain a tandem mass spectrum (MS/MS spectrum), characteristic for each peptide i.e. its precursor ion (the peptide's »fingerprint«). Computer algorithms are used to compare the acquired masses of the peptide ions and/or their fragments with a database containing theoretically generated peptide mass spectra (MS and MS/MS) of proteins. The result of this analysis is the most probable identity of the analysed protein. Top-down proteomics provides information on the mass of whole, intact protein molecules, including their post-translational modifications. For identification, the proteins are fragmented in the mass spectrometer to obtain a ladder of fragment masses, characteristic for each protein (the protein's »fingerprint«).

Proteomski pristopi v venomiki

Ena sama analitična metoda ne zadostuje za razkritje kompleksnosti kačjega strupa, vsak pristop pa ima svoje prednosti in omejitve. Postopek se začne z odvzemom strupa, ki je preprost, vendar ključen korak, ki ima velik vpliv na nadaljnjo analizo in razlago podatkov. Pred tem morajo raziskovalci pridobiti uradna dovoljenja za terensko delo, ki so odvisna od kraja zbiranja in statusa ohranjenosti ciljne vrste. V Sloveniji so vse strupene kače razglašene za ogrožene vrste (Uradni list RS, 1993). Ročno odzemanje strupa z »molžo« je daleč najpogostejša metoda za pridobivanje kačjega strupa. Pri tem žival ugrizne v s tanko membrano prekrito čisto stekleno posodo in vanjo sprosti strup. Tako zbrani strup lahko desetletja hranimo zamrznjenega pri temperaturah od -20 do -80 °C. Večinoma se strup hrani v liofilizirani obliki. Tako zagotovo še dolgotrajnejšo stabilnost proteinskih komponent.

Calvete in sod. (2007) so predlagali postopek za analizo kačjih strupov, ki temelji na proteomiki »od spodaj navzgor« in je do danes ostal zlati standard venomike. Po ločevanju surovega strupa z visokotlačno tekočinsko kromatografijo na obrnjenih fazah (RP-HPLC) sledi analiza proteinskih frakcij z enodimenzionalno poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti detergenta natrijevega dodecil sulfata (1D NaDS-PAGE; 1DE). Odvisno od količine, proteine v gelu vizualiziramo z različnimi z MS kompatibilnimi barvili, kot npr. Coomassie modrim, Ponceau rdečim in koloidnim srebrom (Miller in sod. 2006). Obarvane proteinske lise izrežemo iz gela, proteine v gelu reduciramo, alkiliramo njihove proste SH-skupine (npr. karbamidometiliramo) in jih razgradimo s tripsinom. Nastale peptide ekstrahiramo iz gela, nato pa analiziramo in identificiramo s tandemsko MS. Relativno količino proteina lahko ocenimo glede na njegovo UV absorbcijo (površino vrha pri RP-HPLC analizi), intenzivnost proteinske lise na gelu ali glede na relativno intenzivnost MS spektrov treh najbolj intenzivnih ionov. V nekaterih proteomskih študijah so metodo RP-HPLC uspešno zamenjali z gelsko filtracijo, kombinacijo RP-HPLC/1DE pa z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo (2DE) (Abd El-Aziz in sod. 2020). Slednja omogoča natančnejši vpogled v

makromolekulsko organizacijo in v število proteoform posameznih toksinov v strupu.

Opisani pristop ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Zahteva večje količine strupa ter dolgotrajnejšo manipulacijo vzorcev, kar povečuje možnost njihove kontaminacije. Poleg tega razgradnja vzorca s tripsinom pogosto preprečuje jasno identifikacijo številnih različic posameznih toksinov, izooblik ali kompleksnih multimernih struktur. Isti peptid pogosto identificiramo v več različnih proteoformah, kar vnaša dvom pri določanju identitete toksinov, posledično pa otežuje določanje skupnega števila in relativne vsebnosti proteoform, prisotnih v strupu.

Tem omejitvam se lahko izognemo tako, da nativne strupne proteine analiziramo s tandemsko MS v okviru proteomskega pristopa »od zgoraj navzdol« (Melani in sod. 2016; Ghezellou in sod. 2019). Surove vzorce strupa injiciramo v MS instrument neposredno preko sistema za tekočinsko kromatografijo, kar bistveno zmanjša potrebno količino strupa in skrajša operativni čas. Ta proteomski pristop pa zahteva tehnološko bolj zahtevne pristope, ki vključujejo visokoresolucijske MS instrumente z ustrezno računalniško in programsko podporo, ti pa so na voljo le v specializiranih laboratorijih (Melby in sod. 2021). Poleg tega kačji strupi pogosto vsebujejo veliko proteinov z visoko molekulsko maso, katerih analiza je, kot je omenjeno zgoraj, še vedno zahtevna in manj uspešna.

Ne glede na izbiro pristopa k analizi kačjega strupa je uspešnost identifikacije proteinov v največji meri odvisna od baze podatkov oziroma poznavanja proteoma, transkriptoma in genoma določene vrste kače. V proteinski knjižnici Nacionalnega centra za biotehnoške informacije (»National Center for Biotechnology Information«; NCBI) za taksonomsko skupino kače (*Serpentes*) najdemo že pol milijona vnosov, od tega za družino *Viperidae* 118.685 in poddružino *Viperinae* 6.550 vnosov.

Raznolikost in številčnost toksinov v proteomih kačjih strupov

Tasoulis in Isbister sta v svojem članku iz leta 2017 zbrala podatke o vseh 132 do takrat objavljenih proteomskih raziskavah kačjih strupov. V samo

štirih naslednjih letih je bilo analiziranih še dodatnih 79 novih proteomov (Tasoulis in sod. 2021). Ta trend se nadaljuje in v bazi Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) v zadnjem letu najdemo že 32 novih objav proteomov kačjih strupov. To je nedvomno spodbudila Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO), ko je l. 2017 zastrupitvam s kačjimi strupi ponovno podelila status zanemarljive tropske bolezni, ki na vseh celinah povzroča ogromno trpljenja zaradi invalidnosti in prezgodnjih smrti (Chippaux 2017). Skupno so v proteomskih raziskavah odkrili toksine iz 63 encimskih in neencimskih družin proteinov in peptidov (Tasoulis in Isbister, 2017; Tasoulis in sod. 2021). Med njimi so tudi družine z majhnim številom proteinov, katerih funkcija ali biološki pomen ni znan. Encimske komponente so večinoma hidrolaze in *L*-aminokislinske oksidaze (LAO), ki sodelujejo pri usmrtni pleni in pomagajo pri njegovi prebavi (Mebs, 2002). Med neencimskimi komponentami najdemo toksine, ki prizadenejo živčni sistem in celične membrane ter peptide z različnimi znanimi (npr. encimski inhibitorji) ali še neznanimi funkcijami. Glede na dosedanje proteomske raziskave so posamezni kačji strupi sestavljeni iz toksinov, ki jih lahko uvrstimo v le tri pa do celo 20 različnih proteinskih družin. V povprečju večino kačjih strupov sestavljajo toksini iz štirih proteinskih družin: triprstni proteini, sekretorne fosfolipaze A₂ (sPLA₂), serinske proteaze iz kačjih strupov (SPKS) in metaloproteinaze iz kačjih strupov (MPKS). Prvi dve družini prevladujeta pri strupenih gozih, zadnje tri pa pri gadih, v katerih so triprstni proteini zelo redko prisotni. Večina preostalih proteinov v kačjih strupih sodi med s cisteinom bogate sekretorne proteine (CRISP), peptide Kunitzovega tipa (KUN), LAO, natriuretne peptide, lektine tipa C (CTL) in disintegrine (DIS).

Skoraj dve tretjini vseh proteomskih raziskav se nanaša na strupe gadov. Njihovi strupi imajo bolj kompleksno sestavo od strupov strupenih gožev glede na število proteinskih družin, ki jih sestavljajo. Čeprav so strupi strupenih gožev sestavljeni iz manjšega števila proteinskih družin, pa je raznolikost toksinov znotraj njih zelo velika. Primer takega strupa je strup trakaste egiptovske kobre (*Naja annulifera*), ki ga povečini sestavljajo toksini iz ene same proteinske družine, to je triprstni

proteini (78 %), vendar je znotraj te družine prisotnih 18 različnih izooblik (Tan in sod. 2020). V strupu vzhodne zelene mambe (*Dendroaspis polylepsis*) so zabeležili celo 80 različnih triprstnih proteinov (Ainsworth in sod. 2018).

Proteomska slika strupov kač iz poddružine Viperinae

Celovito zbirko podatkov o proteomih strupov poddružine *Viperinae*, analitičnih metodah in postopkih najdemo v nedavno objavljenem članku Damm in sod. (2021), ki obravnava 54 objavljenih proteomskih študij, v katerih je bilo analiziranih 89 strupov iz 37 različnih vrst kač, ki pripadajo 11 rodovom. Primerjave njihovih proteomov so pokazale izjemne razlike na znotrajvrstni in medvrstni ravni med rodovi s poudarkom na regionalnih razlikah. Največ raziskav je posvečenih medicinsko najbolj pomembnim vrstam iz rodov *Bitis*, *Echis*, in *Daboia*, ki povzročijo največ smrti v ruralnih predelih Afrike, Indije in Srednjega Vzhoda (Gutiérrez in sod. 2010; Amr in sod. 2020; Pintor in sod. 2021). Veliko raziskav se po drugi strani posveča tudi medicinsko pomembnim evropskim strupenjačam iz rodu *Vipera* (Di Nicola in sod. 2021). V večini raziskav je bila uporabljena proteomika »od spodaj navzgor«, proteini v strupih pa so bili predhodno ločeni z eno izmed tekočinskih (gelska filtracija, ionsko-izmenjevalna, RP-HPLC) in/ali gelskih kromatografij (1DE, 2DE). Le v šestih raziskavah so uporabili proteomiko »od zgoraj navzdol«, od tega v štirih primerih za analizo strupov kač iz rodu *Vipera* (*V. ammodytes*, *V. anatolica*, *V. kaznakovi* in *V. transcaucasiana*) (Göçmen in sod. 2015; Hempel in sod. 2018; Petras in sod. 2019; Gopevcic in sod. 2021).

V strupih kač poddružine *Viperinae* prevladujejo štiri glavne družine toksinov, MPKS, sPLA₂, SPKS in CTL, ki predstavljajo 60 do 90 % celotnega strupa; pet sekundarnih družin toksinov (DIS, LAO, CRISP, KUN in žilni endoteljski rastni dejavniki F) predstavlja 6 do 15 % strupa; šest manj pomembnih družin toksinov, živčni rastni dejavnik, 5' nukleotidaze, fosfodiesteraze, hialuronidaze, fosfolipaze B in cistatin iz rodu *Bitis*, so določili v manj kot polovici proteomov s skupnim povprečnim deležem 13 %; več redkih

družin toksinov pa je prisotnih v povprečnem 1 % deležu: glutaminil ciklotransferaza, aspartana proteaza, različne proteaze in triprstni proteini. Izmed peptidov prevladujejo inhibitorji MPKS, natriuretični peptidi in peptidi, ki potencirajo bradikinin.

Rod *Vipera* šteje 21 različnih vrst in številne podvrste. Taksonomska raznolikost se odraža tudi v sestavi njihovega strupa. Med vsemi kačami iz družine Viperidae imajo tiste iz rodu *Vipera* v svojem strupu največ CRISP (5–30 %) in najmanj DIS (le nekaj 1 %). Izjema je strup stepskega gada (*V. renardi*) iz Rusije, pri katerem toksini iz družine DIS predstavljajo četrtno strupa (Kovalchuk in sod. 2016). V strupih *V. ursini* (Hrvaška), *V. b. berus* (Slovaška), *V. nikolskii* (Rusija) ter *V. a. montadoni* in *V. transcaucasiana* (Turčija) pa DIS niso odkrili (Bocian in sod. 2016; Kovalchuk in sod. 2016; Hempel in sod. 2018; Lang Balija in

sod. 2020). Medtem ko imajo nekateri strupi kač iz rodu *Vipera* visoko vsebnost MPKS (npr. 40–50 % pri *V. ursini* in *V. anatolica*), so drugi bogati s $sPLA_2$ (npr. 45–52 % pri *V. a. montadoni* in *V. transcaucasiana*) ali SPKS (npr. 20–30 % pri *V. b. berus*, *V. nikolskii* in *V. orlovi* iz Rusije) (Göçmen in sod. 2015; Kovalchuk in sod. 2016; Latinović in sod. 2016; Hempel in sod. 2020). Zanimivo je opažanje, da sta količina MPKS in $sPLA_2$ v strupih obratno sorazmerni.

V nadaljevanju bom bolj podrobno opisala venomiko treh kač, modrasa (Sl. 2), gada in travniškega gada, ki je bila tema naših raziskav (Latinović in sod. 2016; Leonardi in sod. 2019; Lang Balija in sod. 2020) V vseh primerih smo uporabili proteomiko »od spodaj navzgor«. Naše rezultate bom primerjala z rezultati drugih raziskovalcev.



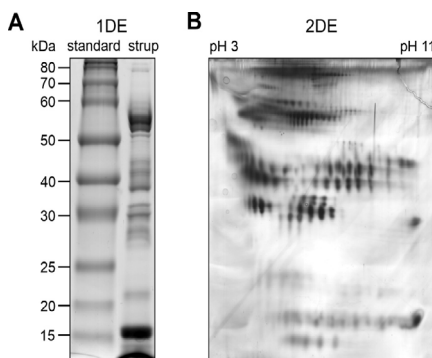
Slika 2: Modras (*Vipera a. ammodytes*). Njegov prepoznavni znak je rožiček na nosu, od koder izvira tudi njegovo angleško ime nose-horned viper ali long-nosed viper. Na hrbtu svetlo rjave, rdečkasto rjave ali sive barve ima cikcak vzorec temnejše barve (foto: Neven Vrbanić).

Figure 2: The nose-horned viper (*Vipera ammodytes ammodytes*). Its distinct feature is a single “horn” on the snout, hence its English name nose-horned or long-nosed viper. It has a dark zigzag pattern on its pale brown, reddish brown, or grey back (photo: Neven Vrbanić).

Venomika modrasovega strupa

Proteom in peptidom modrasovega strupa hrvaškega izvora smo analizirali s kombinacijo metod 2DE/LC-MS/MS in gelska filtracija/RP-HPLC/LC-MS/MS. Ključnega pomena za identifikacijo proteinov je bila transkriptomaska analiza strupne žleze modrasa, s pomočjo katere smo zgradili cDNA knjižnico strupne žleze, ki je vsebovala prepise za prekurzorje 45 različnih proteinov in peptidov. Proteine iz surovega strupa z molekulsko maso večjo od 10 kDa smo ločili z 2DE in jih nato identificirali z MS. Za boljšo ločbo proteinov smo optimizirali vsak korak v 2DE metodi. V prvi dimenziji smo proteine ločili na poliakrilamidnih trakovih z imobiliziranim pH gradientom (IPG) v območju pH 3–11. Uspešnost analize je odvisna predvsem od priprave vzorca, to je njegove topnosti v pogojih izoelektričnega fokusiranja. Zato smo sestavo pufra za popolno raztapljanje vzorca in rehidracijo IPG trakov optimizirali z modificirano Taguchijevo metodo, ki omogoča enostavno in hitro optimizacijo večkomponentnih sistemov (Ahmad in Sharma, 2009). Puffer je vseboval standardne komponente, denaturante ureo in tioureo, ki smo jim za boljšo topnost proteinov dodali detergenta

(CHAPS in ASB-14) in amfolite v optimalnih koncentracijah (Sl. 3). Proteine v IPG trakovih, fokusirane pri pH svojih izoelektričnih točk, smo reducirali in alkilirali pred analizo v drugi dimenziji. Slednja je potekala v 10 % (m/v) poliakrilamidnem gelu v puferskem sistemu Tris/tavrin (Sl. 3) (Tastet in sod. 2003). Ta puferski sistem ima v proteomiki prednost pred klasičnim NaDS-PAGE puferskim sistemom Tris/glicin, ker za ločbo proteinov v širokem masnem območju (5-250 kDa) potrebujemo manj zamrežene gele (le 9-11,5 % (m/v) namesto klasičnih 7,5-15 % (m/v)). Razgradnja proteinov, predvsem tistih z višjo maso, in ekstrakcija peptidov za MS analizo je bolj uspešna v manj zamreženih gelih. Pod temi pogoji smo strup modrasa z 2DE ločili na 208 proteinskih lis, ki smo jih vizualizirali z občutljivim reverznim barvanjem v prisotnosti imidazola in Zn^{2+} (Castellanos-Serra in sod. 2001). Gel se obarva motno belo, medtem ko kompleksi protein-NaDS-imidazol ostanejo prozorni. Prednost te metode pred barvanjem s koloidnim srebrom ali barvilom Coomassie modro je, da je zelo hitra in ne zahteva fiksacije proteinov v gelu, pri čemer lahko nastanejo netopni agregati. Proteinske lise smo izrezali iz gela, jih razgradili s tripsinom in analizirali s tandemsko MS.



Slika 3: Optimizirana 1DE (A) in 2DE (B) analiza modrasovega strupa. Strup smo analizirali z 1DE v 10 % (m/v) gelu v puferskem sistemu Tris/tavrin. Pri 2DE smo prvo dimenzijo (izoelektrično fokusiranje) izvedli na 7 cm IPG trakovih v optimiziranem rehidracijskem pufuru, ki je vseboval detergenta 2,5 % (m/v) CHAPS in 0,25 % (m/v) ASB-14 ter 1 % (v/v) amfolitov. Pogoji v drugi dimeziji so bili enaki kot pri 1DE. Gele smo pobarvali s koloidnim srebrom.

Figure 3: Optimized 1DE (A) and 2DE (B) analysis of *V. a. ammodytes* venom. (A) - the venom was analysed in a 10% (w/v) gel in a Tris/Taurine buffer system. For 2DE, the first dimension (isoelectric focusing) was performed on 7 cm IPG strips in an optimised rehydration buffer containing detrgents 2.5% (w/v) CHAPS and 0.25% (w/v) ASB-14, and 1% (v/v) ampholytes. The conditions in the second dimension were the same as for 1DE. The gels were stained with colloidal silver.

Za identifikacijo proteinov smo masne spektre primerjali s podatkovno bazo neredundantnih proteinskih zaporedij NCBI, ki smo jo dopolnili z zaporedji prepisov iz naše cDNA knjižnice. V 176 proteinskih lisah smo identificirali 57 proteinov iz 16 različnih proteinskih/toksinskih družin, med katerimi so najštevilčnejši SPKS, MPKS, CTL in sPLA₂ (Tab. 1). Pomemben dosežek naše proteomske študije je bilo odkritje novega P-IIIe podrazreda MPKS, ki je nastal tekom evolucije s podvajanjem predniškega gena in izgubo celotne proteinazne domene (Požek in sod. 2022). MPKS predstavljajo izjemen primer evolucije večgenskih proteinskih družin, katerih zgodovino so zaznamovale številne epizode izgube domen (katalitičnih in nekatalitičnih), posttranslacijske modifikacije in pospešena evolucija s pozitivno selekcijo, kar je povzročilo pogoste spremembe strukturnega ogrodja (Casewell in sod. 2011).

Polipeptide in peptide iz modrasovega strupa z molekulsko maso pod 10 kDa smo najprej ločili z gelsko filtracijo celotnega strupa, ki ji je sledila RP-HPLC analiza nizkomolekulskih frakcij. V njih smo z MS in Edmanovim sekvenciranjem določili proteine DIS, KUN in žilni endoteljski rastni dejavnik F, izmed peptidov pa natriuretične peptide, peptide, ki potencirajo bradikinin in inhibitorje MPKS.

V podobni proteomski študiji so strup bolgarskega modrasa ločili z 2DE na le 139 proteinskih lis (Georgieva in sod. 2008). Proteine so uspešno identificirali le v eni tretjini lis, skupno 38 proteinov iz 9 proteinskih družin, kar je lahko posledica manjše sekvenčne identitete proteinov modrasovega strupa s proteini v takrat dostopnih podatkovnih bankah. Primerjava dveh omenjenih proteomskih študij poudarja pomen optimizacije protokola za predhodno ločevanje proteinov iz strupa in uporabo vrstno specifičnega referenčnega transkriptoma za njihovo MS identifikacijo.

V nedavno objavljeni kvalitativni analizi strupa modrasa iz Srbije so uporabili proteomski pristop »od spodaj navzgor«, ki temelji na MS/MS analizi tripsinskega hidrolizata celotnega strupa (Gopcevic in sod. 2021). Identificirali so 99 proteinov iz 9 proteinskih družin in s tem dobro pokrili visokomolekulski del proteoma. Ta pristop omogoča zelo hitro analizo celotnih kompleksnih nefrakcioniranih proteomov, vendar zahteva

visokoločljive nanoLC-MS/MS sisteme. Zato je bil do sedaj uporabljen le v osmih proteomskih študijah strupov iz poddružine *Viperinae*, od tega pet iz rodu *Vipera* (Damm in sod. 2021). Omejitev uporabljenega pristopa je slabša identifikacija nizkomolekulskih proteinov in peptidov.

Po podatkih WHO (2017) je modras uvrščen na seznam vrst strupenih kač največjega medicinskega pomena v Evropi. Modrasov strup na majhne živali (mali glodavci, ptiči, kuščarji), ki so njegov naravni plen, deluje predvsem nevrotoksično zaradi delovanja nevrotoksičnih sPLA₂, amoditoksinov (Križaj, 2011). Ob zastrupitvi človeka pa so najbolj izraženi lokalna in sistemska hemoragija, lokalna poškodba tkiva in motnje strjevanja krvi, v manjši meri nevrotoksičnost, poročila o smrtnih izidih pa so zelo redka (Luksić in sod. 2006; Karabuva in sod. 2016a). Skladno s to zelo zapleteno klinično sliko je proteomska analiza strupa modrasa potrdila njegovo izredno kompleksno sestavo. Posamezne komponente smo povezali s patofiziološkim delovanjem strupa tako, da smo z različnimi metodami tekočinske kromatografije postopoma načrtno ločevali sestavine strupa in testirali njihov vpliv na srčno-žilni sistem (Sajević in sod. 2014; Karabuva in sod. 2016b; Karabuva in sod. 2017). Na ta način smo pokazali, da so toksini iz štirih najštevilčnejših in najbolj raznolikih družin, SPKS, sPLA₂, CTL in MPKS, ki predstavljajo 80 % vseh proteinov strupa, odgovorni za glavne toksične učinke strupa, vključno s krvavitvami, koagulopatijo, zaviranjem agregacije trombocitov, kardiološkimi in nevrološskimi motnjami. Protein iz novega podrazreda MPKS, sestavljen iz nekatalitskih domen, zavira agregacijo trombocitov.

Tabela 1: Sestava in relativni deleži identificiranih družin proteinov/toksinov v strupu modrasa, navadnega gada in malega gada.**Table 1:** Composition and relative abundances of the identified protein/toxin families in the venom of *Vipera a. ammodytes*, *Vipera b. berus* in *Vipera ursinii* ssp.

Proteinska/toksinska družina	Masni delež v strupu (%)		
	modras (<i>V. a. ammodytes</i>)	navadni gad (<i>V. b. berus</i>)	mali gad (<i>V. ursinii</i> ssp.)
<i>Encimi</i>			
serinske proteaze (SPKS)	25	31	6,3
fosfolipaze (PLA ₂)	21,5	10	11,5
metaloproteinaze (MPKS)	14,4	19	55,2
oksidaze <i>L</i> -aminokislilin (LAO)	2,9	1,6	ni zaznan
aspartatne proteaze	< 1	< 1	ni zaznan
glutaminil ciklotransferaza	< 1	ni zaznan	ni zaznan
5' nukleotidaza	< 1	ni zaznan	ni zaznan
<i>Brez encimske aktivnosti</i>			
lektini tipa C (CTL)	19,3	1,6	1,8
s cisteini bogati sekretorni proteini (CRISP)	7,7	8,2	12,2
disintegrini (DIS)	2	< 1	ni zaznan
žilni endotelijski rastni faktor	< 1	ni zaznan	ni zaznan
živčni rastni dejavnik	< 1	ni zaznan	< 1

Venomika gadovega strupa

Navadni gad (*V. b. berus*, Sl. 4) je druga nevarna strupenjača, ki jo lahko srečamo v naravi v Sloveniji in je zaradi razširjenosti in zato večje pogostosti srečevanja z ljudmi medicinsko najbolj pomembna kača v Evropi. V naši venomski študiji smo analizirali strup ruskega izvora (moskovska regija) in ga primerjali s strupom modrasa iz prej opisane raziskave (Latinović in sod. 2016). Kvalitativni primerjalni analizi obeh strupov z RP-HPLC in 2DE sta razkrili manjšo kompleksnost gadovega strupa. Zaradi tega in manjše količine razpoložljivega strupa smo za strukturno in kvantitativno analizo gadovega strupa izbrali klasični proteomski pristop Calveteja in sod. (2007) RP-HPLC/1DE/MS. Surovi strup smo najprej ločili v 14 frakcij z RP-HPLC, ki smo jih naprej analizirali z 1DE pod ne-reducirajočimi pogoji. Na gelu smo zaznali 30 diskretnih proteinskih lis z masami v razponu od 15 do 150 kDa. V njih smo s tandemsko MS določili

31 različnih proteinov, predstavnike 7 glavnih proteinskih družin iz strupov gadov, SPKS, MPKS, sPLA₂, CRISP, LAO, CTL in DIS (Tab. 1). Prvič smo na proteinskem nivoju v nekem kačjem strupu identificirali tudi aspartatno proteazo. Komponente z nizko molekularno maso v frakcijah RP-HPLC smo analizirali neposredno z uporabo razgradnje po Edmanu ali ESI-QTOF-MS/MS in identificirali inhibitorje MPKS, natriuretične peptide in KUN.

Bistvene razlike v sestavi strupov navadnega gada in modrasa, ki lahko na molekularni ravni razložijo razlike v kliničnih slikah po zastrupitvah s temi strupi, so naslednje: i) delež SPKS in MPKS sta večja v strupu gada, deleži sPLA₂, LAO, CTL in DIS pa manjši, ii) nevrotoksičnih sPLA₂, amoditoksinov, v gadovem strupu ni, iii) prav tako ne proteinov CTL. Slednje smo v strupu gada identificirali le kot kovalentno vezane podenote MPKS in ne pa tudi kot proste proteine v strupu (Tab. 1). Njihov delež v strupu modrasa pa je 10 % in lahko povzročijo življenjsko nevarno trombocitopenijo,

t.j. znižanje števila trombocitov v krvi. V skladu z odsotnostjo amoditoksinov v gadovem strupu so poročila o nevrotoksičnih učinkih po zastrupitvi z njegovim strupom zelo redka. Nasprotno pa so se nevrotoksični znaki (npr. pareza ali paraliza kranialnih živcev) pojavili v približno 6 % pacientov zastrupljenih z modrasovim strupom. Ti zahtevajo nujno medicinsko pomoč, saj lahko napredujejo od ptoze (povešenost zgornjih vek) do močne mišične oslabelosti, ki lahko traja celo več ur (Luksić in sod. 2006). Najbolj učinkovita terapija po zastrupitvah s kačjimi strupi je imunoterapija s protistrupi. Naša raziskava imunološke navzkrižne reaktivnosti obeh strupov je pokazala, da protistrupi proti modrasovemu strupu lahko nudijo popolno zaščito v primeru zdravljenja po strupenem ugrizu gada. Po drugi strani pa ne moremo pričakovati, da antiserum proti strupu gada nudi zadostno zaščito v primeru zastrupitve po ugrizu modrasa, še zlasti ne v primeru resne zastrupitve z močno izraženimi nevrološkimi učinki in trombocitopenijo.

Tako kot modrasov je tudi strup navadnega gada bil predmet še dveh proteomskih raziskav, ki so lepo pokazale, kako je sestava strupov iz iste vrste kač odvisna od geografskega porekla. Al-Shekhadat in sod. (2019) so uporabili enak standardni venomski pristop kot smo ga uporabili mi za analizo prav tako strupa ruskega izvora, toda iz regij Tver in Novosibirsk. Tudi ta strup vsebuje kompleksen nabor toksinov, saj so določili 80 različnih proteinov in peptidov iz 13 družin. Za razliko od gadovega strupa iz moskovske regije je imel gadov strup iz Sibirije dvakrat več sPLA₂, dvainpolkrat več LAO, a dvakrat manj SPKS in CRISP. Delež ostalih komponent, MPKS, DIS, CTL (le kot podenote MPKS), KUN in natriuretčnih peptidov je bil primerljiv. Od peptidov so poleg natriuretčnih peptidov za razliko od nas določili tudi peptide, ki potencirajo bradikinin in sicer v 9,5 % deležu. Ker so za analizo uporabili večjo količino strupa, so lahko identificirali tudi komponente, ki so v strupih navadno prisotne v zelo majhnih količinah (pod 1 %), kot so hialuronidaza, 5' nukleotidaza, glutaminil ciklotransferaza, fosfodiesteraza in živčni rastni dejavnik. Z izjemo hialuronidaze smo jih lahko določili tudi v strupu modrasa.

Bocian in sod. (2016) so s proteomskim pristopom »od spodaj navzgor« in kombinacijo

metod 2DE/MALDI TOF/TOF MS analizirali strup navadnega gada iz Slovaške. 2DE analiza v širokem območju pH 3–10 je pokazala, da se večina proteinskih lis nahaja v ožjem območju pH 5–8. Zato so za boljšo ločbo različnih izooblik proteinov strup analizirali tudi v tem ožjem območju, izrezali vse lise iz obeh gelov in proteine identificirali s tandemsko MS. Slovaški strup se je od ruskega razlikoval na kvalitativni in kvantitativni ravni. V njem so določili manjše število različnih proteinov, 25 iz 6 toksinskih družin, izmed peptidov pa le peptide, ki potencirajo bradikinin. Poleg tega, da niso našli proteinov iz družine DIS, je vsebnost proteinov iz družine CTL le 6 %. Presenetljivo pa so več kot polovico strupa sestavljale sPLA₂, med njimi tudi nevrotoksične, sledili so jim SPKS, LAO in CRISP ter MPKS, ki jim je pa pripadel le nekaj odstotni delež. Do sedaj so poročali o primerih nevrotoksičnega učinka strupa navadnega gada po ugrizih v Romuniji in na Madžarskem, različni surovi strupi modrasa po poreklu iz Madžarske pa so povzročili paralizo izoliranih živčno-mišičnih preparatov iz piščanca (Malina in sod. 2017). Opaženi znaki paralize pri človeku in popolna ohromelost pri miših, ki so jim vbrizgali madžarski strup so tudi značilni za delovanje sPLA₂ nevrotoksinov. Čeprav so te strupe analizirali le z 1DE, pa so iz intenzitet lis z maso 13–15 kDa, kar ustreza masi sPLA₂, lahko sklepali, da so to dominantne komponente. Pričakujemo lahko torej, da je sestava strupov navadnega gada iz nekaterih regij Madžarske in Romunije bolj podobna sestavi slovaškega kot pa ruskega strupa.



Slika 4: Navadni gad (*Vipera berus berus*). Telo mu краси neprekinjena temna cikcakasta proga vzdolž hrbta, ki se začne za ovalno glavo. Navadno je sivkaste ali rjavkaste barve, čeprav je lahko tudi popolnoma črn (foto: Neven Vrbanić).

Figure 4: Common or European adder (*Vipera berus berus*). Its body is decorated with a continuous dark zigzag stripe along the back, starting behind the oval head. It is usually greyish or brownish in colour, although it could be also completely black (photo: Neven Vrbanić).

Venomika strupa malega gada

Mali gad (*V. ursinii*) je ogrožena vrsta evropske kače. Zaradi nevarnosti izumrtja je Svet Evrope leta 2005 sprejel načrt za njegovo zaščito. V Sloveniji te kače ni, na Hrvaškem pa najdemo njeno podvrsto *V. ursinii* ssp. (Sl. 5). Poseljuje visokogorske suhe travnate predele na jugu in jugovzhodu države. Je medicinsko manj pomembna kot druge kače iz vrste *Vipera* zaradi redkih srečanj s človekom in zelo majhne količine strupa, ki ga lahko injicira s svojimi le nekaj milimetrov dolgimi strupniki. V svojem naravnem okolju se večinoma prehranjuje z žuželkami.

Strup hrvaškega malega gada je dosti manj kompleksen od prej opisanih strupov modrasa in gada (Lang Balija in sod. 2020). Surovi strup kač iz naravnega okolja, smo ločili z IDE na le sedem in z 2DE na le 50 proteinskih lis. V izrezanih

proteinskih lisah smo s tandemsko MS identificirali 25 proteinov, uvrščenih v sedem družin, MPKS, SPKS, sPLA₂, CRISP, CTL in KUN in živčni rastni dejavnik (Tab. 1). Dobro polovico strupa sestavljajo visokomolekulske MPKS, ki so večinoma homologe modrasovih hemoragičnih MPKS. Skladno s tem sta oba strupa, strup malega gada in strup modrasa, v testu v podganah pokazala primerljivo visoko hemoragično aktivnost. sPLA₂ iz strupa malega gada so encimi brez nevrotoksične aktivnosti, zato je strup za podgano precej manj toksičen kot strup modrasa. Po drugi strani je bil strup modrasa bistveno manj toksičen za črčike kot strup malega gada. To je lepa demonstracija naravne prilagoditve, saj so črčiki naravna hrana malega gada, ne pa tudi modrasa.

Za namene ohranjanja in raziskav nekatere primerke malega gada gojijo tudi v ujetništvu, kjer imajo drugačen režim prehranjevanja kot v naravi;

hranijo jih namreč z mišmi namesto z žuželkami. Sprememba sestave strupa zaradi spremembe prehrane je bila že opisana pri drugih kačah (Barlow in sod. 2009; Gibbs in sod. 2013; Amazonas in sod. 2019). Da bi ugotovili, kako različna prehrana v primeru malega gada vpliva na sestavo strupa, smo strupe, zbrane od kač v ujetništvu, in strupe, pridobljene od divjih živali, primerjalno analizirali z metodo 2DE. Opažene spremembe v sestavi

strupa kač v ujetništvu v primerjavi s tistimi, ki živijo v naravi, so predvsem večja količina sPLA₂ ter manjša količina MPKS in CRISP. Ta ugotovitev podpira hipotezo, da pridobitev različnih izooblik sPLA₂ v strupu s pospešeno evolucijo (Ogawa in sod. 1996) predstavlja močno selektivno prednost, npr. za hitro prilagajanje razpoložljivemu plenu s spremembo v izražanju genov (Aird in sod. 2015).



Slika 5: Mali ali Ursinijev gad (*Vipera ursinii* ssp.). Ime je dobil po italijanskem naravoslovcu Antoniu Orsiniju (1788–1870). Ima majhno srčasto oblikovano glavo, telo je pa kratko in čokato. Je sive ali oker barve s črno obrobljeno temno rjavo cikcakasto progno na hrbtu (foto: Neven Vrbanič).

Figure 5: Meadow or Ursini's viper (*Vipera ursinii* ssp.). It is named after the Italian naturalist Antonio Orsini (1788–1870). It has a small, heart-shaped head and a short, stocky body, which is grey or ochre in colour and has a black-edged, dark brown zigzag stripe on the back (photo: Neven Vrbanič).

Antivenomika

Po podatkih WHO (2019) strupene kače vsak dan ugriznejo skoraj 7400 ljudi na vseh kontinentih, od posledic ugriza pa jih umre 220 do 380. To pomeni približno 2,7 milijona primerov zastrupitev in 81.000 do 138.000 smrtnih primerov na leto. Problematika najbolj prizadeva države v razvoju

z velikim številom ruralnega prebivalstva. Zato je WHO pripravila celovito strategijo za zmanjšanje umrljivosti in invalidnosti zaradi zastrupitev po kačjih ugrizih za 50 % do leta 2030. Pri tem je proizvodnja in dostopnost učinkovitih protistrupov eden glavnih ukrepov za obvladovanje kačjih ugrizov. Protistrupi so zaenkrat edino res učinkovito specifično zdravilo proti sistemskim

učinkom zastрупitev s kačjimi strupi (Gutiérrez in sod. 2017).

Sam izraz antivenomika opisuje proteomski proces identifikacije tistih polipeptidov v strupu, ki imajo epitope, ki jih protistrup slabo ali pa sploh ne prepozna (Calvete in sod. 2009). Vzrok za slabši zaščitni učinek protistrupa, pridobljenega z imunizacijo živali s celotnim strupom, je lahko tvorba protiteles z nizko afiniteto ali pa sploh izostanek tvorbe protiteles proti določenim toksičnim komponentam v strupu. Antivenomika dopolnjuje *in vitro* in *in vivo* teste nevtralizacije aktivnosti strupa ter tradicionalne imunološke metode, kot so analize ELISA in prenos po Westernu, za predklinično oceno nevtralizacijskega spektra protistrupov. Predstavlja alternativni pristop testiranju na živalih za določanje učinkovitosti zaščite protistrupov pred letalno nevarnostjo, ki jo povzroča strup. Prva generacija antivenomike, ki je temeljila na imunoprecipitaciji kompleksov antigen-protitelo v raztopini in ji je sledila kromatografska kvantifikacija prostega antigena v supenatantu, je bila primerna le za protistrupe, ki so vsebovali celotne IgG (Núñez in sod. 2009; Lingam in sod. 2020). Ta pristop je bil pozneje preoblikovan tako, da je bil primeren tudi za protistrupe, ki jih sestavljajo F(ab')₂ fragmenti. Ključna posodobitev v antivenomiki druge generacije je priprava imunoafinitetne kolone z vezavo molekul protistrupa na kromatografski nosilec (Villalta in sod. 2012; Lomonte in Calvete, 2017; Patra in sod. 2017; Pla in sod. 2017a). S kombinacijo imunoafinitetne kromatografije in proteomske analize sestavin strupa v nevezanih in vezanih frakcijah takšen pristop zagotavlja kvalitativne in tudi kvantitativne informacije o obeh skupinah proteinov strupa, tistih, ki jih protistrup dobro prepozna, in tistih, ki jih ne (imajo slabšo imunoreaktivnost). Ob predpostavki, da je stopnja imunoprecipitacije toksičnih sestavin v strupu s protistrupom *in vitro* enaka stopnji nevtralizacije toksičnih učinkov teh sestavin *in vivo*, rezultati antivenomike zagotavljajo podatke o tem, s katerimi sestavinami strupa je treba dodatno obogatiti imunizacijsko mešanico ali katerim sestavinam strupa je treba z določenimi postopki izboljšati imunogenost, da dobimo visoko učinkovit antiserum.

Antivenomika tretje generacije nadgrajuje predhodni pristop z določitvijo največje kapacitete

vezave različnih toksinov iz strupa s protistrupom in kvantifikacijo celotnega deleža protiteles v protistrupu, ki imajo imunoafiniteto do toksinov iz strupa – terapevtska protitelesa (Pla in sod. 2017b). Dejansko so pri skoraj vseh obstoječih protistrupih najpogostejše molekule protitelesa proti antigenom, ki niso strup (60-90 %) (Sanny, 2011). Ta pristop se uporablja tudi v molekularnih študijah navzkrižne reaktivnosti protistrupov in heterolognih strupov (Gutiérrez in sod. 2009). Protitelesa bodo verjetno navzkrižno nevtralizirala toksine znotraj iste družine toksinov v različnih kačjih strupih.

Zaključki

Venomika je orodje, ki nam omogoča boljše razumevanje kačjih strupov z evolucijskega, biološkega in kliničnega vidika. Izjemen pospešek raziskavam živalskih strupov je omogočil razvoj proteomskih, transkriptomskih in genomskih platform, ki jih podpirajo visoko zmogljive tehnologije sekvenciranja proteinov/peptidov, RNA in DNA. Tako se skokovito bogatijo baze aminokislinskih zaporedij, ki jih z analizo s pomočjo vse zmogljivejših bioinformatičnih orodij prevajamo v vse bogatejše baze znanja. Proteomika strupov temelji predvsem na masni spektrometriji, s katero določamo i) kvalitativno in kvantitativno sestavo proteoma na nivoju proteinskih družin, ii) delna ali celotna zaporedja izoliranih proteinov/peptidov, in iii) njihove točne mase, kar omogoča identifikacijo različnih proteoform. Informacije o sestavi strupa so bistvene za določitev obsega medvrstnih in znotrajvrstnih razlik ter vpliva ekologije in prehrane na evolucijo strupa. Podprta z genomiko in transkriptomiko nam torej proteomika zagotavlja veliko informacij o procesih, ki uravnavajo izražanje genov, o alternativnem spajanju in drugih molekularnih mehanizmih, odgovornih za izražanje fenotipskih razlik. Primerjalni podatki o sestavi strupa so koristni tudi za nadaljnje raziskave na področju molekularne biologije, kot so regulacija, izguba in podvajanje genov. Izjemen potencial v prihodnosti leži v povezavi proteomike z naprednimi slikovnimi tehnologijami, tako imenovana prostorska venomika – kartiranje proteinskih toksinov in njihove aktivnosti neposredno v tkivu

strupne žleze – ki odstira pogled v morfološke in funkcionalne značilnosti strupnega sistema.

Natančno poznavanje sestave strupov je izjemno pomembno tudi za razumevanje patofiziologije zastripitev in za razvoj ustreznih strategij zdravljenja zastripitev s kačjimi strupi in pa za razvoj protistrupov. Zastripitve s kačjimi strupi predstavljajo velik zdravstveni in ekonomski problem še posebej v večjem delu sveta v razvoju. To problematiko je prepoznala tudi WHO, ki je protistrupe uvrstila med ključna zdravila. Specifičnost in učinkovitost teh zdravil – večinoma antiserumov – sta neločljivo povezani s sestavo strupov, ki se uporabljajo za imunizacijo, variabilnost toksinov pa povzroča slabše prepoznavanje in nevtralizacijo toksinov iz različnih strupov. S pomočjo antivenomike lahko s proteomskimi orodji kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo interakcijo (nevtralizacijo) strupov s protistrupi *in vitro*. S tem bistveno zmanjšamo potrebo po testiranju protistrupov v laboratorijskih živalih. Antivenomika nam torej pomaga nadzorovati kakovost in načrtovati najboljše mešanice strupov za imunizacijo živali za proizvodnjo učinkovitih protistrupov. S ciljem povečanja njihove učinkovitosti bi bil namesto imunizacije živali s celotnim strupom bolj primeren pristop s proizvodnjo protistrupa le proti najbolj nevarnim toksinom v strupu. Prihodnost torej leži v pripravi rekombinantnih toksinov – antigenov za imunizacijo. Ti v eni molekuli vsebujejo več ključnih epitopov, sicer prisotnih na različnih toksinih ali proteoformah toksinov (celo iz različnih rodov in vrst kač). Tako proizvedena protitelesa naj bi imela široko nevtralizacijsko moč proti podobnim toksinom v različnih kačjih strupih.

Summary

Snake venoms are complex mixtures of biologically active proteins and peptides that have evolved over the course of evolution to become one of the deadliest natural weapons. The pathological effect of the venom on the organism depends on its composition, which is specific to each venomous snake family and even to a single snake. Indeed, snake venom may vary depending on the age, sex, diet or geographical distribution of a snake. Proteomics of snake venoms, snake venomics, is primarily based

on mass spectrometry, which allows us to determine i) the qualitative and quantitative composition of the proteome at the protein family level, ii) the partial or complete sequences of venom proteins/peptides, and iii) their exact masses, allowing the identification of the different proteoforms. The most commonly used approach to snake venom analysis is bottom-up proteomics. In this approach, the venom is first separated using liquid and/or gel-based chromatographic methods. The proteins are enzymatically degraded and the resulting peptides are analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Bioinformatics tools are then used to identify the proteins and find the best match between the experimental peptide tandem mass spectra and the theoretically generated spectra of proteins in sequence databases. The proteomes of snake venoms are increasingly being studied. Undoubtedly, snake venom research received an additional boost in 2017 when the World Health Organisation reclassified snakebite envenomation into the Category A of the Neglected Tropical Diseases, recognising that it is a major cause of suffering, disability and premature death in many developing countries. To date, venomics studies have identified numerous toxins classified into 63 enzymatic and non-enzymatic families of proteins and peptides. The medically important European vipers belong to the genus *Vipera*. Three of these snakes live in Slovenia, the nose-horned viper (*Vipera a. ammodytes*), the common adder (*Vipera b. berus*) and the asp viper (*Vipera aspis*, subspecies *francisciredi*). The nose-horned viper is the most venomous of the European venomous snakes, while the adder is the most widespread. We have studied their venoms using bottom-up proteomics and found characteristic differences in the composition and relative abundance of certain venom protein/toxin families. The most important difference, which is also reflected in the markedly different pharmacological effects of these two venoms, is the absence of the neurotoxic sPLA₂s and CTLs in the venom of *V. b. berus*. These two groups of toxins are the reason for the neurotoxicity and thrombocytopenia (a decrease in platelet count) in a victim intoxicated by the venom of *V. a. ammodytes*. We also conducted a venom study on the most endangered snake species in Europe, the meadow viper (*Vipera ursinii*). This medically

insignificant viper species produces only a small amount of venom and feeds mainly on insects. It was no surprise that its venom is much less complex than that of the nose-horned viper and the adder. We found that it consists of many fewer toxin families, which are also less diverse. By comparing the venoms of *V. ursinii* snakes from the wild with those in captivity fed on mice instead of insects, we were able to confirm that diet strongly influences the composition of the venom. Currently, antivenoms are the only effective treatment for the systemic effects of snakebite envenomation. In antivenomics, proteomics is used to identify the venom components that carry epitopes that are recognised by the antivenom weekly or not at all. The maximum binding capacity of different toxins

by the antivenom and the proportion of antibodies in the antivenom that have immunoaffinity for the venom toxins to the total antibodies in the antivenom, e.g. the ratio of therapeutic antibodies in the antivenom, are determined by antivenomics. This is an effective alternative approach to animal testing to predict the protective efficacy of an antivenom in the case of snake envenomation.

Zahvala

Zahvaljujem se Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS), ki je nastanek prispevka financirala v okviru raziskovalnega programa P1-0207.

Literatura

- Abd El-Aziz, T.M., Soares, A.G., Stockand, J.D., 2020. Advances in venomics: Modern separation techniques and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1160, 122352.
- Ahmad, Y., Sharma, N., 2009. An effective method for the analysis of human plasma proteome using two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 2 (12), 495–499.
- Ainsworth, S., Petras, D., Engmark, M., Süßmuth, R.D., Whiteley, G., Albulescu, L.-O., Kazandjian, T.D., Wagstaff, S.C., Rowley, P., Wüster, W., Dorrestein, P.C., Arias, A.S., Gutiérrez, J. M., Harrison, R.A., Casewell, N.R., Calvete, J.J., 2018. The medical threat of mamba envenoming in sub-Saharan Africa revealed by genus-wide analysis of venom composition, toxicity and antivenomics profiling of available antivenoms. *Journal of Proteomics*, 172, 173–189.
- Aird, S.D., Aggarwal, S., Villar-Briones, A., Tin, M.M.-Y., Terada, K., Mikheyev, A.S., 2015. Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. *BMC Genomics*, 16 (1), 647.
- Alencar, L.R.V, Quental, T.B., Graziotin, F.G., Alfaro, M.L., Martins, M., Venzon, M., Zaher, H., 2016. Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 50–62.
- Al-Shekhadat, R.I., Lopushanskaya, K.S., Segura, Á., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Pla, D., 2019. *Vipera berus berus* venom from Russia: Venomics, bioactivities and preclinical assessment of microgen antivenom. *Toxins*, 11 (2), 642–651.
- Amazonas, D.R., Freitas-de-Sousa, L.A., Orefice, D.P., Sousa, L.F. de, Martinez, M.G., Mourão, R.H.V., Chalkidis, H.M., Camargo, P.B., Moura-da-Silva, A.M., 2019. Evidence for snake venom plasticity in a long-term study with individual captive *Bothrops atrox*. *Toxins*, 11 (5), 294.
- Amr, Z.S., Abu Baker, M.A., Warrell, D.A., 2020. Terrestrial venomous snakes and snakebites in the Arab countries of the Middle East. *Toxicon*, 177, 1–15.
- Barlow, A., Pook, C.E., Harrison, R.A., Wüster, W., 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings. Biological Sciences*, 276 (1666), 2443–2449.
- Barua, A., Mikheyev, A.S., 2020. An ancient, conserved gene regulatory network led to the rise of oral venom systems. *BioRxiv*, 1–10.

- Bocian, A., Urbanik, M., Hus, K., Lyskowski, A., Petrilla, V., Andrejčáková, Z., Petrillová, M., Legath, J., 2016. Proteome and peptidome of *Vipera berus berus* venom. *Molecules*, 21 (10), 1–13.
- Calvete, J.J., Juárez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42 (11), 1405–1414.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2009. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583 (11), 1736–1743.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S. C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (9), 2637–2649.
- Castellanos-Serra, L., Vallin, A., Proenza, W., Le Caer, J.P., Rossier, J., 2001. An optimized procedure for detection of proteins on carrier ampholyte isoelectric focusing and immobilized pH gradient gels with imidazole and zinc salts: Its application to the identification of isoelectric focusing separated isoforms by in-gel proteolysis. *Electrophoresis*, 22 (9), 1677–1685.
- Chen, C., Hou, J., Tanner, J. J., Cheng, J., 2020. Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (8), 2873.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29 (11), 1279–1303.
- Chippaux, J.-P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23 (1), 38.
- Damm, M., Hempel, B.F., Süßmuth, R.D., 2021. Old world vipers—a review about snake venom proteomics of *Viperinae* and their variations. *Toxins*, 13 (6), 1–26.
- Di Nicola, M.R., Pontara, A., Kass, G.E.N., Kramer, N.I., Avella, I., Pampena, R., Mercuri, S.R., Dorne, J.L.C.M., Paolino, G., 2021. Vipers of major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*, 453, 152724.
- Fry, B.G., Roelants, K., Champagne, D.E., Scheib, H., Tyndall, J.D., King, G.F., Nevalainen, T.J., Norman, J. a, Lewis, R.J., Norton, R.S., Renjifo, C., de la Vega, R.C.R., 2009. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10, 483–511.
- Georgieva, D., Risch, M., Kardas, A., Buck, F., von Bergen, M., Betzel, C., 2008. Comparative analysis of the venom proteomes of *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*. *Journal of Proteome Research*, 7 (3), 866–886.
- Ghezellou, P., Garikapati, V., Kazemi, S.M., Strupat, K., Ghassempour, A., Spengler, B., 2019. A perspective view of top-down proteomics in snake venom research. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 33 (S1), 20–27.
- Gibbs, H.L., Sanz, L., Sovic, M.G., Calvete, J.J., 2013. Phylogeny-based comparative analysis of venom proteome variation in a clade of rattlesnakes (*Sistrurus* sp.). *PLoS ONE*, 8 (6), e67220.
- Göçmen, B., Heiss, P., Petras, D., Nalbantsoy, A., Süßmuth, R. D., 2015. Mass spectrometry guided venom profiling and bioactivity screening of the Anatolian Meadow Viper, *Vipera anatolica*. *Toxicon*, 107, 163–174.
- Gopcevic, K., Karadzic, I., Izrael-Zivkovic, L., Medic, A., Isakovic, A., Popović, M., Kekic, D., Stanojkovic, T., Hozic, A., Cindric, M., 2021. Study of the venom proteome of *Vipera ammodytes ammodytes* (Linnaeus, 1758): A qualitative overview, biochemical and biological profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 37, 100776.
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54 (7), 976–987.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56 (7), 1223–1235.
- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17063.

- Hempel, B.F., Damm, M., Göçmen, B., Karis, M., Oguz, M.A., Nalbantsoy, A., Süßmuth, R. D., 2018. Comparative venomics of the *Vipera ammodytes transcaucasiana* and *Vipera ammodytes montandoni* from Turkey provides insights into kinship. *Toxins*, 10 (1), 23.
- Hempel, B.F., Damm, M., Mrinalini, Göçmen, B., Karış, M., Nalbantsoy, A., Kini, R. M., Süßmuth, R. D., 2020. Extended snake venomics by top-down in-source decay: Investigating the newly discovered Anatolian meadow viper subspecies, *Vipera anatolica senliki*. *Journal of Proteome Research*, 19 (4), 1731–1749.
- Karabuva, S., Vrkić, I., Brizić, I., Ivić, I., Lukšić, B., 2016a. Venomous snakebites in children in southern Croatia. *Toxicon*, 112, 8–15.
- Karabuva, S., Brizić, I., Latinović, Z., Leonardi, A., Križaj, I., Lukšić, B., 2016b. Cardiotoxic effects of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom fractions in the isolated perfused rat heart. *Toxicon*, 121, 98–104.
- Karabuva, S., Lukšić, B., Brizić, I., Latinović, Z., Leonardi, A., Križaj, I., 2017. Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxicon*, 139, 94–100.
- Kini, R.M., 2018. Accelerated evolution of toxin genes: Exonization and intronization in snake venom disintegrin/metalloprotease genes. *Toxicon*, 148, 16–25.
- Kovalchuk, S.I., Ziganshin, R.H., Starkov, V.G., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., 2016. Quantitative proteomic analysis of venoms from Russian vipers of Pelias group: Phospholipases A₂ are the main venom components. *Toxins*, 8 (4), 105.
- Križaj, I. (2011). Ammodytoxin: A window into understanding presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂ and more. *Toxicon*, 58 (3), 219–229.
- Lang Balija, M., Vrdoljak, A., Habjanec, L., Dojnović, B., Halassy, B., Vranesić, B., Tomasić, J., 2005. The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia—biochemical properties and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology Pharmacology*, 140 (2), 257–263.
- Lang Balija, M., Leonardi, A., Brgles, M., Sviben, D., Kurtović, T., Halassy, B., Križaj, I., 2020. biological activities and proteomic profile of the venom of *Vipera ursinii* ssp., a very rare karst viper from Croatia. *Toxins*, 12 (3), 1–16.
- Latinović, Z., Leonardi, A., Šribar, J., Sajevec, T., Žužek, M. C., Frangež, R., Halassy, B., Trampuš-Bakija, A., Pungercar, J., Križaj, I., 2016. Venomics of *Vipera berus berus* to explain differences in pathology elicited by *Vipera ammodytes ammodytes* envenomation: Therapeutic implications. *Journal of Proteomics*, 146, 34–47.
- Leonardi, A., Sajevec, T., Pungercar, J., Križaj, I., 2019. Comprehensive study of the proteome and transcriptome of the venom of the most venomous European viper: Discovery of a new subclass of ancestral snake venom metalloproteinase precursor-derived proteins. *Journal of Proteome Research*, 18 (5), 2287–2309.
- Lingam, T.M.C., Tan, K.Y., Tan, C.H., 2020. Proteomics and antivenom immunoprofiling of Russell's viper (*Daboia siamensis*) venoms from Thailand and Indonesia. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26, e20190048.
- Lomonte, B., Calvete, J.J., 2017. Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23 (1), 1–12.
- Lukšić, B., Bradarić, N., Prgomert, S., 2006. Venomous snakebites in southern Croatia. *Collegium Antropologicum*, 30 (1), 191–197.
- Malina, T., Krecsák, L., Westerström, A., Szemán-Nagy, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Rowan, E.G., Harvey, A.L., Warrell, D.A., Pál, B., Rusznák, Z., Vasas, G., 2017. Individual variability of venom from the European adder (*Vipera berus berus*) from one locality in Eastern Hungary. *Toxicon*, 135, 59–70.
- Mebs, D. 2002: Venomous and poisonous animals: a handbook for biologists, toxicologists and toxinologists, physicians and pharmacists, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 360 pp.

- Melani, R.D., Skinner, O.S., Fornelli, L., Domont, G.B., Compton, P.D., Kelleher, N.L., 2016. Mapping proteoforms and protein complexes from king cobra venom using both denaturing and native top-down proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15 (7), 2423–2434.
- Melby, J.A., Roberts, D.S., Larson, E.J., Brown, K.A., Bayne, E.F., Jin, S., Ge, Y., 2021. Novel strategies to address the challenges in top-down proteomics. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32 (6), 1278–1294.
- Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E., 2006. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics*, 6 (20), 5385–5408.
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Calvete, J.J., 2009. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73 (1), 57–78.
- Ogawa, T., Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Sakaki, Y., Hattori, S., Ohno, M., 1996. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon*, 34 (11–12), 1229–1236.
- Patra, A., Kalita, B., Chanda, A., Mukherjee, A.K., 2017. Proteomics and antivenomics of *Echis carinatus carinatus* venom: Correlation with pharmacological properties and pathophysiology of envenomation. *Scientific Reports*, 7 (1), 17119.
- Petras, D., Hempel, B.F., Göçmen, B., Karis, M., Whiteley, G., Wagstaff, S.C., Heiss, P., Casewell, N.R., Nalbantsoy, A., Süßmuth, R.D., 2019. Intact protein mass spectrometry reveals intraspecies variations in venom composition of a local population of *Vipera kaznakovi* in Northeastern Turkey. *Journal of Proteomics*, 199, 31–50.
- Pintor, A.F.V., Ray, N., Longbottom, J., Bravo-Vega, C.A., Yousefi, M., Murray, K.A., Ediriweera, D.S., Diggle, P.J., 2021. Addressing the global snakebite crisis with geo-spatial analyses - Recent advances and future direction. *Toxicon*: X, 11, 100076.
- Pla, D., Bande, B.W., Welton, R.E., Paiva, O.K., Sanz, L., Segura, Á., Wright, C.E., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., Williams, D.J., 2017a. Proteomics and antivenomics of Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*) venom with analysis of its toxicological profile and the preclinical efficacy of Australian antivenoms. *Journal of Proteomics*, 150, 201–215.
- Pla, D., Rodríguez, Y., Calvete, J. J., 2017b. Third generation antivenomics: Pushing the limits of the in vitro preclinical assessment of antivenoms. *Toxins*, 9 (5), 158.
- Požek, K., Leonardi, A., Pungercar, J., Rao, W., Gao, Z., Liu, S., Laustsen, A.H., Trampuš Bakija, A., Reberšek, K., Podgornik, H., Križaj, I., 2022. Genomic confirmation of the P-IIIe subclass of snake venom metalloproteinases and characterisation of its first member, a Disintegrin-like/Cysteine-rich protein. *Toxins*, 14 (4), 232.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj, I., 2014. An overview of hemostatically active components of *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxin Reviews*, 33 (1–2), 33–36.
- Sanny, C.G., 2011. In vitro evaluation of total venom-antivenin immune complex formation and binding parameters relevant to antivenin protection against venom toxicity and lethality based on size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Toxicon*, 57 (6), 871–881.
- Schaffer, L.V., Millikin, R.J., Miller, R.M., Anderson, L.C., Fellers, R.T., Ge, Y., Kelleher, N.L., LeDuc, R.D., Liu, X., Payne, S.H., Sun, L., Thomas, P.M., Tucholski, T., Wang, Z., Wu, S., Wu, Z., Yu, D., Shortreed, M.R., Smith, L. M., 2019. Identification and quantification of proteoforms by mass spectrometry. *Proteomics*, 19 (10), e1800361.
- Šmíd, J., Tolley, K.A., 2019. Calibrating the tree of vipers under the fossilized birth-death model. *Scientific Reports*, 9 (1), 1–10.
- Tan, K.Y., Wong, K.Y., Tan, N.H., Tan, C.H., 2020. Quantitative proteomics of *Naja annulifera* (sub-Saharan snouted cobra) venom and neutralization activities of two antivenoms in Africa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 605–616.

- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9 (9), 9–10.
- Tasoulis, T., Pukala, T.L., Isbister, G.K., 2021. Investigating toxin diversity and abundance in snake venom proteomes. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 768015.
- Tastet, C., Lescuyer, P., Diemer, H., Luche, S., van, D.A., Rabilloud, T., 2003. A versatile electrophoresis system for the analysis of high- and low-molecular-weight proteins. *Electrophoresis* 24, 1787–1794.
- Uetz, P., Freed, P., Aguilar, R., Hošek, J. (eds.), 2022. The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed November 2022.
- Uradni list RS, 1993. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/1993-01-2094/>
- Villalta, M., Pla, D., Yang, S.L., Sanz, L., Segura, A., Vargas, M., Chen, P.Y., Herrera, M., Estrada, R., Cheng, Y.F., Lee, C.D., Cerdas, M., Chiang, J.R., Angulo, Y., León, G., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2012. Snake venomomics and antivenomics of *Protobothrops mucrosquamatus* and *Viridovipera stejnegeri* from Taiwan: keys to understand the variable immune response in horses. *Journal of Proteomics*, 75 (18), 5628–5645.
- Villar-Briones, A., Aird, S.D., 2018. Organic and peptidyl constituents of snake venoms: The picture is vastly more complex than we imagined. *Toxins*, 10 (10), 392.