

DE GEHEIMEN VAN DE SPUGENDE COBRA

THE SECRETS OF THE SPITTING COBRA

Jory van Thiel & Roel Wouters

Stel je een giftige slang voor die zijn dodelijke cocktail giftige stoffen in een prooi injecteert. Het gif verstoort allerlei belangrijke fysiologische processen in het hart- en bloedvaatsysteem en het zenuwstelsel. Als gevolg hiervan verliest de prooi mobiliteit en wordt uitgeschakeld. Tot nu toe was dit de belangrijkste algemeen geaccepteerde functie van gif: het vangen van prooien. Maar spugende cobra's gebruiken hun gif ook ter verdediging, door het gif in de ogen van belagers te spugen. Er zijn drie groepen spugende cobra's; de Afrikaanse spugende cobra's, de Aziatische spugende cobra's (beide behorende tot het geslacht *Naja*) en de ringhalscobra (*Hemachatus haemachatus*). Sommige van deze spugende cobra's waaronder de zwarthalscobra (*Naja nigricollis*) en de rode spugende cobra (*Naja pallida*), kunnen met zeer grote nauwkeurigheid spugen. Dit doen ze door de precieze locatie van de ogen te berekenen op basis van de beweging van het hoofd van hun belager (Westhoff *et al.*, 2005). Spuuggedrag in cobra's verruimt de functie van gif bij slangen, dus niet alleen voor het vangen van prooien, maar óók ter verdediging. Wij maken deel uit van een groot team van internationale wetenschappers, dat tracht de geheimen van spugende cobra's te ontrafelen. Onlangs publiceerden wij onze bevindingen over *hoe* en *waarom* het gif van spugende cobra's evolueerde in *Science*.

Maar eerst gaan we terug naar 2015, toen Jory (25) werkte en woonde in de jungle in het noordoosten van Thailand. Hij deed daar onderzoek naar de levenswijze en ecologie van de koningscobra (*Ophiophagus hannah*). Op een dag kwam hij tijdens veldwerk een Indochinese spugende cobra tegen (*Naja siamensis*). Bij

Jory van Thiel & Roel Wouters

Imagine a venomous snake injecting its lethal cocktail of toxins into a prey. The venom specifically disrupts all kinds of key physiological processes including the cardiovascular and the nervous system. This ultimately leads to the immobilisation of the prey. Up until now, this was the main generally accepted function of venom in snakes; prey capture. However, spitting cobras also exploit their venom defensively by spraying venom into the eyes of their aggressors. There are three groups of spitting cobras; the African spitting cobras, the Asian spitting cobras (both members of the *Naja* ge-



Voorkant van het tijdschrift Science / Cover of Science magazine. © Science magazine, American Association for the Advancement of Science (AAAS).



Naja mossambica uit/from Eswatini (Swaziland). Foto/Photo Wolfgang Wüster.

het vangen van dit dier voor onderzoek werd Jory in zijn ogen gespuugd. Dit gaf een pijnlijk en branderig gevoel, maar door te spoelen met water kon dit snel verholpen worden. Deze ervaring bracht Jory op het idee om verder onderzoek te doen aan het gif van spugende cobra's. Zou het gif van spugende cobra's zijn aangepast voor verdediging in tegenstelling tot dat van niet-spugende cobra's? Met andere woorden, zou dit defensieve spuuggedrag hebben geleid tot aanpassingen in de gif-samenstelling van deze slangen?

Een aantal jaren later startte Jory een onderzoeksproject voor zijn bacheloropleiding aan het Instituut voor Biologie van de Universiteit Leiden in de groep van Prof. Dr. Michael Richardson. Samen met Roel (24) voerden we in het laboratorium onderzoek uit naar oogirritatie door cobragiffen door gebruik te maken van een *in vivo* kippenembryomodel. In totaal testten we zeventien giften van spugende co-

nus) and the rinkhals (*Hemachatus haemachatus*). Some of these spitting cobras such as the black-necked spitting cobra (*Naja nigricollis*) and the red spitting cobra (*Naja pallida*) are as a matter of fact extremely accurate in spitting venom by calculating the location of the eyes based on the movements of the aggressor's head (Westhoff *et al.*, 2005). The phenomenon of venom spitting in elapids extends the function of venom, next to prey capture, also to defence. We recently, as part of a large international team of scientists, published our findings on how and why the venom of these spitting cobras evolved on the cover of *Science* magazine, unravelling the secrets of the spitting cobra...

First, we have to go back to 2015 when Jory (25) was working and living in the jungle of Northeast Thailand where he was studying the spatial ecology of the king cobra (*Ophiophagus hannah*). During field work, he en-



Mozambiquaanse spugende cobra/Mozambique spitting cobra (*Naja mossambica*) uit/from Pretoria North. Foto/Photo Johan Marais.

bra's, niet-spugende cobra's en nauw verwante soorten op oogirritatie. Echter, uit onze resultaten en data-analyse blijkt er geen sterke associatie te bestaan tussen extra oogirritatie bij gif van spugende cobra's. Dit zou kunnen betekenen dat gifspugen niet uitsluitend geëvolueerd is om meer irritatie in de ogen te veroorzaken (Kazandjian *et al.*, 2021). Desondanks toonden we wel aan dat alle groepen spugende cobra's aantoonbare oogirritatie veroorzaakten.

Kortom, de geheimen van het spugende cobra-gif konden niet worden ontrafeld op basis van oogirritatie. Op hetzelfde moment waren onze collega's en leiders van het onderzoek, Dr. Taline Kazandjian en Prof. Dr. Nicholas Casewell van de *Liverpool School of Tropical Medicine*, bezig met soortgelijk en aanvullend onderzoek. Als eerste onderzochten ze ook de gifsamenstelling van deze cobra's en ze ontdekten dat het gif van spugende cobra's voor een groot

countered an Indochinese spitting cobra (*Naja siamensis*), and while catching this snake for an ongoing research project, Jory got venom in his eyes which gave a painful and burning sensation. This experience brought him to the idea to study whether spitting cobra venoms are adapted for defensive purposes compared to the venom of non-spitting cobras. In other words, could defensive venom spitting behaviour have altered the composition of these spitting cobra venoms?

A couple of years later, Jory started a research project for his bachelor in the group of Prof. Dr. Michael Richardson at the Institute of Biology from Leiden University. Together with Roel (24) we conducted lab work to test eye-irritation of spitting cobra venom using an *in vivo* embryonic chicken model. We tested seventeen venoms of spitting cobras, non-spitting cobras and closely related outgroups, to test whether defensive venom spitting behaviour resulted in



Zwarte spugende cobra/Black spitting cobra (*Naja nigricincta woodi*) uit/from Cederberg, Cape Province. Foto/Photo Johan Marais.

deel bestaat uit cytotoxines (*cytotoxic three finger toxins*; 3FTXs) en fosfolipases A2 (PLA2) (Kazandjian *et al.*, 2021). Vooral de PLA2's zijn in grote hoeveelheden aanwezig in het gif van de drie groepen spugende cobra's in vergelijking met de niet-spugende cobra's. Ten tweede, bestudeerden ze in plaats van oogirritatie, de activatie van pijn door giften van spugende cobra's. Ze vonden een sterke associatie tussen een toename van pijn en gif van spugende cobra's (Kazandjian *et al.*, 2021). Daaropvolgend werd het pijnonderzoek nogmaals uitgevoerd, maar dit keer met alleen de individuele toxines in het gif (gefractioneerd). Hieruit bleek dat de PLA2's het pijnlijke effect van de cytotoxische 3FTXs versterkt en dat dit in alle drie de spugende cobragroepen onafhankelijk van elkaar op identieke wijze is ontstaan. Er is als het ware een synergie tussen deze twee gifstoffen in het gif van spugende cobra's die zorgt voor extra pijn wanneer het in de ogen gespuugd wordt (Kazandjian *et al.*, 2021).

increasing levels of eye-irritation. Interestingly, our data analysis reveals no strong association between enhanced irritation levels and spitting behaviour which could indicate that eye-irritation did not specifically evolve for defensive purposes (Kazandjian *et al.*, 2021). Nevertheless, we showed that all spitting cobra lineages caused notable eye-irritation.

So apparently, eye-irritation does not unravel the secrets within spitting cobra venoms. At the same time, colleagues Dr. Taline Kazandjian and Prof. Dr. Nicholas Casewell from the Liverpool School of Tropical Medicine led the research using complementary approaches. First, they studied the venom composition of the tested cobra species - showing that the majority of toxins in spitters are composed of cytotoxins (*cytotoxic three finger toxins*; 3FTXs) and phospholipases A2 (PLA2) (Kazandjian *et al.*, 2021). Particularly, PLA2s are high-abundant in the three spitting lineages compared to



Zebra cobra (*Naja nigricincta nigricincta*) uit/from Otjiwarongo, Namibia. Foto/Photo Johan Marais.

Maar waarom gingen deze drie groepen cobra's gifspugen? In ons artikel in *Science* besdiscussiëren we dat we het antwoord op deze vraag bij onszelf kunnen vinden, of eigenlijk, bij onze voorouders. Uit evolutionaire analyses die we uitvoerden, bleek dat de groep Afrikaanse spugende cobra's grofweg zes miljoen jaar geleden is gaan spugen. Dit komt overeen met de opkomst van de eerste mensachtige die op twee benen liep in Afrika. Zo'n vier miljoen jaar later gingen de Aziatische spugende cobra's spugen na de aankomst van *Homo erectus* in Zuidoost-Azië. Primaten, onder wie wijzelf, staan erom bekend gereedschappen, zoals takken en stenen, te gebruiken om slangen op afstand te houden. Cobra's kunnen hun gif over enkele meters ver spugen en dit is nou juist effectief als langeafstandsverdediging. Daarnaast wordt spuuggedrag niet waargenomen tegen predatoren zoals mangoesten en vogels, of grote belagers zoals olifanten of gnoes. Het spuuggedrag bij cobra's

the non-spitting lineages. Secondly, instead of eye-irritation, they tested direct algescic activity as well (in other words pain) and surprisingly, they revealed a strong association between venom spitting and increased pain-stimuli. In order to learn which toxins are actually responsible for causing pain, similar pain experiments were performed but now with isolated toxins instead of crude venom. This showed that independently in all three spitting cobra lineages, cytotoxins work together with PLA2 (a synergy) to cause enhanced pain in the eyes of their aggressor (Kazandjian *et al.*, 2021).

The question remains as to why these three groups of elapids started to spit venom and, as we discuss in our *Science* article, we believe the answer lies within ourselves, or to be more precise, our ancestors. From evolutionary analysis we found that the African spitting cobras started spitting roughly 6 million years ago which coincides with the emergence of the first



Indochinese spugende cobra (Naja siamensis) / Indochinese spitting cobra (Naja siamensis). Foto/Photo Jory van Thiel

zou een voorbeeld kunnen zijn van co-evolutie met onszelf, mensen.

In ons onderzoek hebben we dus feitelijk aangetoond dat dat drie groepen spugende cobra's onafhankelijk van elkaar speciale aanpassingen in hun gif hebben ontwikkeld om meer pijn te veroorzaken in het oog van hun belagers.

two-legged hominins in Africa. Some 4 million years later the Asian spitting cobras started spitting after the emergence of *Homo erectus* in South East Asia. Primates are well known for using tools such as stones and sticks to attack snakes and spitting cobras can spit their venom for several meters in the eyes of their aggressors. Spitting behaviour is not observed against predators such as birds and mongooses nor in large aggressors such as wildebeest or elephants. Therefore, spitting behaviour in snakes might be an example of coevolution with ourselves, humans.

In summary, our research shows that spitting cobras have independently evolved special adaptations in their venom composition on three separate occasions, stimulating enhanced pain in the eyes of an aggressor.

Literatuur/Literature

- Kazandjian, T. D.; Petras, D.; Robinson, S.D.; van Thiel, J.; Greene, H.W.; Arbuckle, K.; Barlow, A.; Carter, D.A.; Wouters, R.M.; Whiteley, G.; Wagstaff, S.C.; Arias, A.S.; Albuлесcu, L.-O.; Plettenberg Laing, A.; Hall, C.; Heap, A.; Penrhyn-Lowe, S.; McCabe, C.V.; Ainsworth, S.; da Silva, R.R.; Dorrestein, P.C.; Richardson, M.K.; Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J.; Harrison, R.A.; Vetter, I.; Undheim, E.A.B.; Wüster, W. and Casewell, N.R., 2021. Convergent evolution of pain-inducing defensive venom components in spitting cobras. *Science* (371) 80: 386–390.
- Westhoff, G.; Tzschätzsch, K. & Bleckmann, H., 2005. The spitting behavior of two species of spitting cobras. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 191: 873-881.