



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Unidad de Posgrado**

**Caracterización estructural y funcional de la pictobina,  
una enzima similar a trombina del veneno de la  
serpiente peruana *Bothrops pictus* “jergón de la costa”**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**AUTOR**

Dan Erick VIVAS RUIZ

**ASESOR**

Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Lima, Perú

2016

## RESUMEN

La presente tesis describe la purificación y caracterización bioquímica, estructural y funcional del principio coagulante del veneno de la serpiente endémica del Perú *Bothrops pictus*, denominada Pictobina. La enzima fue purificada por la combinación de tres pasos cromatográficos, empleando intercambio catiónico CM-Sephadex C-50 seguida de dos pasos de filtración molecular en Sephadex G-100 y Sephadex G-75 respectivamente. La Pictobina es una glicoproteína monomérica con una masa molecular de 49 kDa medida por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y de 41 kDa por MALDI-TOF-TOF. El contenido de carbohidratos es de aproximadamente 45% de la masa y pueden ser removidos por deglicosilación con PNGasa F. Los carbohidratos asociados detectados fueron hexosas (25.76%), hexosaminas (13.12%) y ácido siálico (0.76%). La secuencia N-terminal (VIGGDECNINEHRFLAFTYS) muestra semejanza con las enzimas similares a trombina. La Pictobina tiene actividad coagulante sobre plasma humano y fibrinógeno humano y bovino. La actividad coagulante específica de la enzima fue equivalente a 131.1 NIH U/mg de trombina liberando solo el fibrinopéptido A del fibrinógeno humano y tuvo un efecto defibrinogenante en roedores. La enzima produce una malla de fibrina porosa visualizada por microscopía electrónica de barrido y logró producir agregación plaquetaria. La Pictobina posee actividad catalítica sobre los sustratos sintéticos BApNA, S-2266, S-2302, S-2160 y S-2238. El tripéptido sintético D-Val-Leu-Arg-pNa el cual fue considerado como el mejor sustrato. La actividad amidolítica fue inhibida por PMSF, DTT y 2-β mercaptoetanol. La enzima mostró estabilidad a diferentes temperaturas (25 a 55 °C), valores de pH (5.0 a 11.0) o en presencia de iones ( $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ ) pero fue inhibida por el  $Zn^{+2}$ . La enzima interacciona con el inhibidor endógeno α:2-macroglobulina y con el suero antibotrópico polivalente. La deglicosilación de la enzima produjo alteración en la actividad y el reconocimiento del antiveneno. El cDNA de la Pictobina (760 pb) codifica una proteína madura de 233 aminoácidos que conserva dominios estructurales con otras enzimas similares a trombina como el sitio catalítico (His<sub>40</sub>, Asp<sub>89</sub> y Ser<sub>179</sub>) y los sitios de unión a sustrato S1, S2 y S3. Se identificaron tres motivos para la N glicosilación. El modelamiento de la Pictobina revela un plegamiento tipo quimotripsina presentando un bolsillo hidrofóbico sobre su superficie, involucrado en el reconocimiento del sustrato y un importante bucle 90's clave en la restricción del sitio catalítico. Los análisis de interacción molecular revelan que los residuos Phe<sub>194</sub> y Trp<sub>195</sub> de la Pictobina forma una interacción estable con los residuos Gly<sub>13</sub>, Gly<sub>14</sub> y Val<sub>15</sub> del fibrinopéptido A posicionando el puente de los residuos Arg<sub>16</sub> y Gly<sub>17</sub> del sustrato para el clivaje en el sitio catalítico. Tomando en conjunto estos resultados, se concluye que Pictobina es una enzima similar a trombina presente en el veneno de la serpiente *Bothrops pictus*.

**Palabras clave:** Pictobina, *Bothrops pictus*, enzima similar a trombina, coagulación sanguínea, veneno ofídico.

## ABSTRACT

The present thesis described the isolation and biochemical, structural and functional characterization of coagulant principle from *Bothrops pictus* Peruvian snake venom, called Pictobin. The purification was carried out through three chromatography steps, using a cationic interchange on CM-Sephadex C-50, followed by molecular filtration on Sephadex G-100 and finally a molecular filtration Sephadex G-75. Pictobin is a monomeric glycoprotein of 49 kDa (reducing condition) by SDS-PAGE and 41 kDa by MALDI-TOF-TOF. The enzyme contain approximately 45% carbohydrate by mass which could be removed by PNGase F. Detected associated carbohydrates were hexoses (25.76%), hexosamines (13.12%) and sialic acid (0.76%). The N-terminal sequence of the enzyme (VIGGDECNINEHRFLAFTYS) showed high similarity with the thrombin-like enzymes. Pictobin showed clotting activity upon human plasma and bovine and human fibrinogen. Its specific coagulant activity was 131.1 NIH thrombin units/mg, releasing fibrinopeptide A from human fibrinogen and showed defibrinogenating effect in mouse. The enzyme produces an unstable fibrin network visualized by scanning electron microscopy and promoted platelet aggregation. The enzyme had catalytic activity upon synthetic substrates such as BApNA, S-2266, S-2302, S-2160 and S-2238. Synthetic tripeptide D-Val-Leu-Arg-pNA was considered as best substrate ( $K_m$ : 2.23  $\mu$ M;  $K_{cat}/K_m$ : 4.63  $s^{-1}/\mu M^{-1}$ ). The amidolytic activity was inhibited by PMSF, DTT, 2 $\beta$  Mercaptoethanol. Moreover, this enzyme showed stability when examined at different temperatures (25 to 55  $^{\circ}$ C), pH values (5.0 to 11.0) or in the presence of divalent or monovalent ions ( $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ ) but was inhibited by  $Zn^{+2}$ . The enzyme interacts with endogenous inhibitor  $\alpha$  2-macroglobulin and bothropic polyvalent serum. The enzyme lost its catalytic activity and antivenom interaction when carbohydrates was removed. The cDNA sequence of Pictobin (760 bp) encodes 233 amino acid residues, which conserve common domains with other snake venom thrombin-like enzyme such as those corresponding to the catalytic site (His40, Asp89, Ser179) and binding substrates subsites S1, S2 and S3, already reported. In addition, three functional motifs for N-linked glycosylation were found. Spatial modeling of Pictobin reveals a chymotrypsin fold presenting a hydrophobic pocket on its surface, involved in substrate recognition, and important 90's loop, involved in restricting the Pictobin catalytic site cleft. Molecular docking showed that Phe<sub>194</sub> and Trp<sub>195</sub> residues from Pictobin form a stable interaction with Gly<sub>13</sub>, Gly<sub>14</sub> y Val<sub>15</sub> from fibrinopeptide A, orientating Arg16-Gly17 bridge from substrate to perform the hydrolysis. Taken together, the data showed that Pictobin is in fact a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pictus* snake venom.

**Keywords:** Pictobin, *Bothrops pictus*, thrombin-like enzyme, blood coagulation, snake venom