

Departamento de Bioquímica
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Farmacia (Madrid)

Efectos de algunos antibióticos sobre la piruvato descarboxilasa (Enzima y Holoenzima recombinada)

por

F. G. Ferrándiz, F. Mayor y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 22 de octubre de 1965)

MARTÍN HERNÁNDEZ, DE LA FUENTE y SANTOS RUIZ (9) han estudiado y discutido la acción de diversos productos antibióticos sobre la piruvato carboxilasa de levadura. Los trabajos ulteriores realizados por BEGUÉ en nuestro Laboratorio (1) condujeron a la obtención de preparaciones apoenzimáticas desprovistas totalmente de actividad residual y con alta capacidad de recombinación, lo que nos sugirió la idea de continuar el estudio del efecto de los antibióticos sobre la enzima y sus constituyentes en condiciones experimentales muy favorables, con el fin de intentar contribuir al mejor conocimiento de las propiedades de la enzima y al esclarecimiento de algunos aspectos de los mecanismos por los que la inhibición se produce.

Se presentan y comentan los resultados obtenidos en la acción directa de diversos antibióticos sobre la enzima altamente purificada, la holoenzima reconstruida y en las incubaciones previas de los antibióticos con cada uno de los componentes del sistema.

Material y métodos

Material. — En la preparación de la enzima purificada y de la apocarboxilasa se han utilizado las centrífugas Magnun MSE y MSE refrigerada. La determinación del pH se ha realizado en un aparato Radiometer modelo L22. Las medidas colorimétricas se han llevado a cabo en una fotolorímetro Klett-Sumerson. También son necesarios un disgregador mecánico y un molino de grano. La determinación manométrica de la actividad enzimática se ha efectuado en un aparato de Warburg de la firma Braun, modelo SL-65.

Productos. — La levadura se recoge directamente de las fábricas de cerveza el mismo día en que debe ser utilizada. El piruvato sódico empleado procede de Merck y de la California Corporation for Biochemical Research. El difosfato de tiamina, cuya pureza se comprobó cromatográficamente, es original de la casa Merck. Los productos antibióticos empleados en el trabajo que presentamos

han sido sustancias puras procedentes directamente de las firmas productoras.

Métodos

A) Obtención de la carboxilasa pirúvica

a) *Preparación del polvo seco de levadura.* La levadura fresca comercial se lava dos veces con agua, empleando cada vez cinco volúmenes por cada volumen de levadura de cerveza. Se filtra por BUCHNER grande a través de un lienzo no muy tupido y ayudando la filtración mediante suave succión al vacío. De este modo se obtienen unas tortas de levadura de uno o dos centímetros de grosor que se extienden sobre bandejas y se dejan secar a la temperatura ambiente en un lugar ventilado, cuidando de remover y trocear de vez en cuando la masa para que toda ella siga un mismo ritmo de secado, que es esencial para una buen rendimiento en polvo seco activo (9). Al cabo de diez o quince días se obtiene un producto oscuro de extraordinaria dureza que es preciso triturar en una máquina de moler grano. El polvo de levadura así obtenido se conserva durante varios meses, sin pérdida de actividad enzimática descarboxilante. Las ventajas de este sistema de secado han sido convenientemente discutidas por DE LA FUENTE (3).

b) *Fraccionamiento del polvo seco de levadura.* En líneas generales, se ajusta al esquema dado por GREEN y col. (5, 6), modificado en nuestro laboratorio por DE LA FUENTE (3). 100 g de polvo de levadura se añaden lentamente y agitando sobre 300 ml. de tampón fosfato M/15 pH 7,2; se deja una hora en estufa a 37° C, agitando de vez en cuando. La mezcla obtenida se diluye con 400 ml. de agua destilada bien fría y se centrifuga durante 15 minutos a 6.500 r.p.m. Se mide el volumen del sobrenadante obtenido y se adiciona, poco a poco y agitando, sulfato amónico sólido — pu-

rísimo y sin grumos — en la proporción de 40 gr. de sal por cada 100 ml. de líquido. Se deja en refrigerador durante media hora, al cabo de la cual se centrifuga durante una hora a 9.000 r.p.m., descartándose el sobrenadante. El residuo se disuelve en 300 ml. de tampón citratos 0,04 M pH 6 y se mide el volumen de la disolución obtenida, añadiendo en las mismas condiciones anteriores, 38 g de sulfato amónico por cada 1.000 ml de líquido. Se mantiene durante una hora en refrigerador y se centrifuga 50 minutos a 9.000 r.p.m., eliminándose el sobrenadante. El precipitado se redissuelve en 140 ml. de tampón citratos 0,04 M pH 6, obteniéndose una disolución de saturación 0,11, que sirve de punto de partida para el fraccionamiento de la enzima, que se realiza con solución saturada de sulfato amónico (s.s.s.a) a 0,42 y 0,57, con intervalos de precipitación de 1 h. y centrifugación a 9.000 r.p.m. durante 30 minutos, a -5° C. El precipitado de la fracción 0,42 — 0,57 se redissuelve en 60 ml. de tampón citrato 0,04 M, pH 6. La disolución resultante es de color amarillo, transparente, y su concentración en sulfato amónico es de 0,10. Se repite el fraccionamiento a 0,47-0,53, dejando precipitar en este último caso durante toda la noche en refrigerador. Se centrifuga a 9.000 r.p.m., 30 minutos y se resuspende el sedimento en 27 ml. de s.s.s.a. y 23 ml. de tampón citratos 0,04 M pH 6. (Saturación final 0,53). La suspensión así obtenida puede utilizarse directamente como preparación enzimática y constituye el punto de par-

TABLA I

	Proteínas mg/ml	Actividad μ l CO ₂ /ml/ 15°/30° C	Actividad específica μ l CO ₂ / mg. prot.
Extracto inicial	17,66	350	20
Preparación enzimática.	29	27.900	962

tida — debidamente valorada para conocer su actividad específica — para la obtención de la apoenzima. La actividad específica de las preparaciones enzimáticas obtenidas respecto al extracto crudo se indica en la tabla I.

B) *Obtención de la apocarroboxilasa pirúvica*

A un vaso de precipitados de 25 ml. de capacidad, situado en baño de hielo-sal, se añaden en el mismo orden que se indica, las siguientes sustancias: 1 ml. de preparación enzimática; 2 ml. de fosfato disódico 0,5 M pH 8 y 1 ml. de EDTA 0,4 M pH 10. Se mezcla bien, se tapa el vaso con un vidrio de reloj y se deja una hora en refrigerador. En estas condiciones, el pH obtenido es superior a 9. Se añaden 9,2 ml. de s.s.s.a. — muy lentamente y con continua y suave agitación — y 1 ml. de sosa concentrada para mantener el pH conveniente. Se deja de nuevo media hora en el refrigerador. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos a -5°C y el precipitado obtenido se disuelve en tampón maleato Smits doble molar (d.m.) pH 6,16. La preparación apoenzimática así obtenida posee un pH de 6,22.

C) *Determinación de la actividad enzimática*

Se sitúa en la parte central del vaso de WARBURG la cantidad necesaria de enzima, de acuerdo con los ensayos que se efectúen, completando hasta 3 ml. de solución con tampón maleato Smits d.m. En el brazo lateral se colocan 0,5 ml. de solución de piruvato sódico. Los agentes inhibidores empleados se preparan de acuerdo con sus características especiales (4). En cada ensayo se determina la proporción en que deben mezclarse las soluciones 1 y 2 del tampón Smits d.m. para que el pH resultante sea igual en todos los casos. Después de un período de equilibrio de 10 minutos, se rea-

lizan las adiciones a intervalos de 20 segundos una vez graduadas la frecuencia y amplitud en las condiciones de lectura (temperatura = 30°C).

D) *Determinación de la actividad aescarroboxilante de la holoenzima recombinada*

Se precisan los siguientes reactivos: Tampón maleato Smits d.m. (3:7) pH 6,16 para disolución de la apocarroboxilasa obtenida según se ha expresado anteriormente; disolución de iones magnésicos 0,4 M, que se prepara disolviendo 9,857 gr. de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml. de tampón maleato Smits d.m. (1,5:8,5) pH 6,52, quedando la solución de iones magnesio a pH 5,95; solución de difosfato de tiamina (DPT): se pesan 5 mg. de DPT y se disuelven en 25 ml. de tampón maleato Smits d.m. (3:7) pH 6,16 obteniéndose una disolución de DPT a pH 6,18 que contiene 200 mg. de DPT por ml.; piruvato sódico 1 M; tampón maleato Smits d.m. (4:6) pH 5,97. Se disuelve la preparación apoenzimática en tampón Smits d.m. (3:7) pH 6,16, quedando a un pH 6,22. Los ml. de tampón utilizados en esta disolución se indican en cada caso. A 1 ml. de la preparación apoenzimática obtenida se añaden 1 ml. de solución de iones magnesio, 0,5 ml. de la solución DPT y 0,5 ml. de tampón maleato Smits (3:7). En el bulbo lateral se colocan 0,5 ml. de piruvato sódico 1 M. Volumen final: 3,5 ml. Para proceder a la recombinación de los componentes enzimáticos se introduce el conjunto manómetro-vaso en el baño termostático a 30°C y se deja incubar durante 20-25 minutos. La actividad residual se mide en unos vasos que contienen en su compartimiento central 1 ml. de la preparación apoenzimática y 2 ml. de tampón maleato (4:6) pH 5,97. Las lecturas se llevan a cabo como se ha indicado en el apartado C. Antes de iniciar el presente trabajo se comprobó

TABLA II
Penicilina VK.

Efecto de una concentración fija de antibiótico sobre la enzima y la holoenzima recombinada, empleando distintas concentraciones de sustrato ($I_0 = 0,025$ ml; $pH = 6$; Temp. = $30^\circ C$).

Substrato	I	Enzima		Holoenzima recombinada	
		μl $CO_2/10$ min.	% inhibición	μl $CO_2/10$ min.	% inhibición
5×10^{-3} M	5×10^{-3} M	80	44	36	46
5×10^{-3} M	—	144		66	
1×10^{-2} M	5×10^{-3} M	127	43	60	45
1×10^{-2} M	—	220		107	
5×10^{-2} M	5×10^{-3} M	152	44	100	43
5×10^{-2} M	—	276		173	

que la preparación de apocarboxilasa era altamente reproducible, no poseía actividad residual y que su velocidad de reacción era del 100 % respecto a la misma cantidad de preparación enzimática. Las proteínas se han determinado por el procedimiento de LOWRY y colaboradores (8).

Resultados

ANTIBIÓTICOS PROTÍDICOS

Penicilina VK. — La penicilina VK (fenoximetil-penicilina) produce una notable inhibición de la actividad piruvato carboxilásica (tabla II). El tipo de inhibición es claramente no competitivo, como se deduce de la constancia de los porcentajes de inhibición a diferentes

concentraciones de sustrato. En las pruebas realizadas con la holoenzima recombinada se obtuvieron los valores que se resumen, asimismo, en la tabla II, los cuales indican que la inhibición no aumenta cuando el inhibidor se añade sobre la holoenzima recombinada, pero se incrementa fuertemente cuando se hace la adición del producto antibiótico en el momento de la recombinación (tabla III). La inhibición obtenida en este último caso se mantiene en el mismo grado sea cual sea la incubación previa realizada.

Metansulfonato de colimicina. — Para una inhibición del 41 % se precisa una

TABLA III

Fenoximetil-penicilina

Efecto del antibiótico en las incubaciones previas con los constituyentes de la holoenzima. S: 5×10^{-3} M. I: 5×10^{-3} M.

	μl $CO_2/10$ min.	% Inh.
Apoenzima + Mg. + DPT	77	
Apoenzima + Inh + Mg. + DPT	24	69
Apoenzima + (Mg. + Inh) + DPT	23	70
Apoenzima + Mg. + (DPT + Inh)	24	69

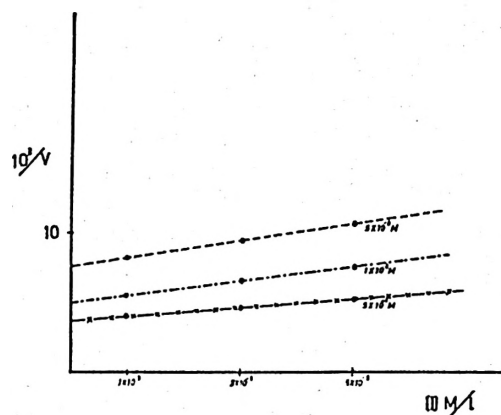


FIG. 1. Representación gráfica del efecto producido por la colimicina (metansulfonato) sobre concentraciones de sustrato y de inhibidor.

concentración de antibiótico 8×10^{-3} M. El tipo de inhibición es claramente no competitivo (fig. 1) y la acción del antibiótico se incrementa cuando actúa sobre la holoenzima recombinada. (65 %, 51 % y 37 % a concentraciones de antibiótico $1,5 \times 10^{-2}$ M, 1×10^{-2} M y 5×10^{-3} M, respectivamente).

Cicloserina. — La cicloserina no tiene efecto inhibitor, sino que, al contrario, produce un claro incremento de la actividad, sea cual sea la concentración de piruvato utilizada. A una concentración de cicloserina 3×10^{-3} M la activación es del 24 % [(S) = 5×10^{-3} M].

ANTIBIÓTICOS GLUCÚRIDOS

Novobiocina. — La novobiocina monosódica es un potente inhibidor de la piruvato carboxilasa (fig. 2). Su efecto es claramente no competitivo. La adición de un exceso de DPT no disminuye la fuerte inhibición producida, haciéndolo muy levemente la de un exceso de iones magnesio. Su efecto sobre la holoenzima produce los mismos porcentajes de inhibición que sobre la enzima y, asimismo, la suplementación de los componentes del sistema en mayor cantidad de la normal no reduce el efecto.

Ristocetina. — La ristocetina es un inhibidor todavía más potente que la novobiocina, decreciendo la actividad en un 40 % a la concentración de 5×10^{-4} M. En este caso la adición de magnesio y

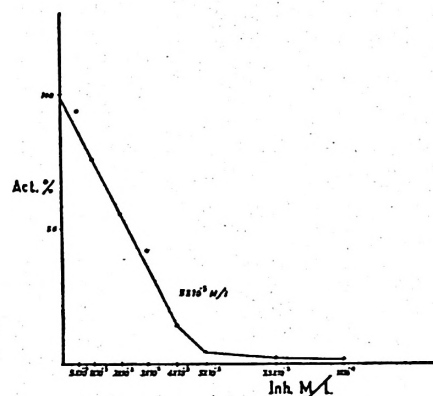


FIG. 2. Efecto de la novobiocina sobre la actividad enzimática (S = 5×10^{-3} M).

DPT reduce notablemente la inhibición, de tal modo que la sitúa al mismo nivel de los valores hallados con la holoenzima recombinada, donde existe, asimismo, un exceso de ambos efectores (tabla IV). De acuerdo con estos resultados, la inhibición se incrementa cuando se realizan incubaciones previas de los componen-

TABLA IV

Efecto de la ristocetina sobre la piruvato carboxilasa.

	$\mu\text{l CO}_2/10 \text{ min.}$	% Inh.
Enzima	111	
Enzima + Inh	86	23
Enzima + DTP + Mg.	178	
Enzima + Inh + DTP + Mg.	163	6
Holoenzima recombinada	168	
(Apoen. + Mg. + DTP) + Inh	153	6
Apoenzima + (Mg. + Inh) + DPT	67	59
Apoenzima + Mg. + (DTP + Inh)	96	41

I: $2,5 \times 10^{-1}$ M	Mg.: 1 ml. sol. 0,4 M	de enzima
S: 5×10^{-3} M	Enz.: 0,025 ml.	Apoenz. correspon. 0,025 ml.

tes del sistema con el antibiótico. Los datos obtenidos parecen sugerir que la acción inhibidora se debe, al menos en parte, a la captación o interferencia del ion metálico por el antibiótico. El tipo de inhibición es claramente no competitivo, como lo demuestran las experiencias realizadas con iguales concentraciones de inhibidor frente a distintas concentraciones de sustrato.

la incubación previa del antibiótico con DPT aumenta considerablemente la inhibición, si bien no se alcanzan porcentajes tan altos como los que se obtienen al incubar el antibiótico con el Mg^{++} .

Sulfato de Kanamicina. — No posee efecto alguno sobre la reacción, tanto si se emplea la enzima recombinada como si se incuba previamente con sus componentes. El efecto activador hallado sobre

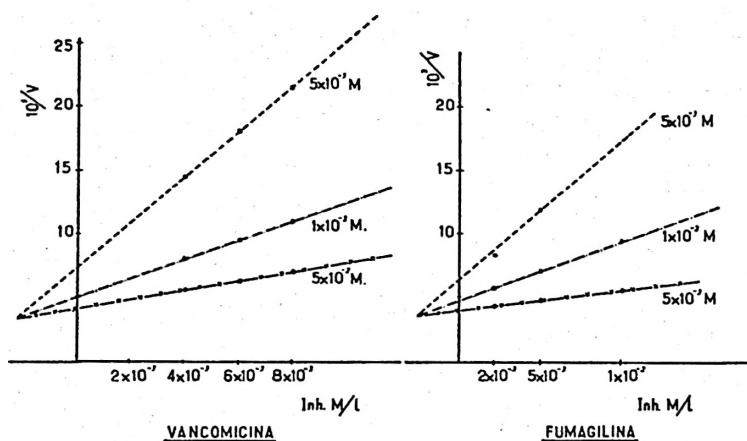


FIG. 3. Inhibición competitiva por la vancomicina y fumagilina sobre el sistema enzimático.

Vancomicina. — Como los derivados glúcidos que acabamos de referir, la vancomicina posee un claro efecto inhibidor (54 % a una concentración 8×10^{-3} M). Su curva de inhibición es totalmente lineal, marcando un descenso muy notable de la actividad enzimática a medida que aumenta la concentración del inhibidor. El efecto producido es de tipo competitivo (fig. 3) como corresponde a la protección ejercida por el sustrato. Sobre la holoenzima se mantienen los mismos porcentajes de inhibición que sobre la enzima de origen. Pero cuando se realiza la incubación previa de Mg^{++} más antibiótico, el tanto por ciento de inhibición aumenta bruscamente, de tal manera que a una inhibición del 32 % corresponde, para la misma concentración de antibiótico, una inhibición del 90 %. También

el sistema en reconstrucción resultó ser debido a la presencia de iones magnesio en el preparado antibiótico.

ANTIBIÓTICOS MACRÓLIDAS

Propionil eritromicina. — A las concentraciones empleadas habitualmente en nuestros ensayos, la propionil eritromicina no inhibe prácticamente la actividad piruvato descarboxilante.

Espiramicina. — La inhibición producida por la espiramicina es muy escasa, siendo del 30 % a la concentración de 1×10^{-2} M. La inhibición es de tipo no competitivo, aumentando moderadamente cuando el antibiótico actúa sobre la enzima recombinada. La adición de DPT a la enzima no disminuye la inhibición.

Sin embargo, la adición previa de iones Mg^{++} reduce los porcentajes hallados.

Olcandomicina. — Este antibiótico presenta un claro efecto inhibidor cuando actúa frente a bajas concentraciones de sustrato (55 % a (I) y (S) = 5×10^{-3} M). Sin embargo, a medida que la concentración de piruvato aumenta la inhibición disminuye, llegando a anularse prácticamente (S = 1×10^{-2} M).

ANTIBIÓTICOS DEL GRUPO DE LAS TETRACICLINAS. — El fosfato, hexametáfosfato y demetilclorotetraciclina, inhiben a la piruvato carboxilasa de levadura. La

bidora de las tetraciclina estudiadas parece tener lugar por captación del ion metálico. La holoenzima recombinada requiere un gran exceso de los componentes termoestables para alcanzar la actividad correspondiente a la enzima de origen, ya que la unión entre los constituyentes es más débil que en la enzima. Así se explica que la inhibición se acrecienta al actuar sobre la holoenzima reconstruida. El antibiótico añadido sobre la apoenzima antes de la adición de Mg^{++} y de DPT produce una inhibición prácticamente total.

TABLA V

Efecto del fosfato de tetraciclina y de la dimetilaminoetil-tetraciclina.

	Porcentajes de inhibición	
	Fosf. de tetrac. / 2×10^{-2} M/	DAE tetrac. / 1×10^{-2} M/
Enzima + Inh + 2 ml. Mg.	45	40
Enzima + Inh + 1 ml. Mg.	61	48
Holoenzima recomb. + Inh	80	77
(Apoenz. + Inh) + Mg. + DPT	96	100
Apoenz. + DPT + (Mg. + Inh)	94	92
Apoenz. + Mg. + (DPT + Inh)	89	80

Apoenz. equivalente a 0,025 ml. enzima. S: 5×10^{-3} M.

DPT: 200 μ g/ml. Mg.: 0,4 M.

El % se refiere a los controles respectivos sin inhibidor.

acción del fosfato y hexametáfosfato de tetraciclina es protegida por el sustrato. El clorhidrato de demetilclorotetraciclina posee un poder inhibidor más fuerte que el de los derivados fosforilados, pero no existe protección por el piruvato. En los tres casos, la suplementación de Mg^{++} reduce la inhibición, en relación a los valores obtenidos en los ensayos correspondientes sin inhibidor. El efecto del fosfato de tetraciclina y de la dimetilaminoetil-tetraciclina. El efecto de estos antibióticos sobre los constituyentes del sistema enzimático nos ha permitido comprobar (tabla V) que la acción inhi-

ARTIBIÓTICOS DE TIPO POLIÉNICO

Tricomocina. — Este antibiótico es un potentísimo inhibidor de la carboxilasa pirúvica (84 % a 150 U/ml). La inhibición es de tipo no competitivo y los porcentajes hallados no se afectan por la adición de Mg^{++} o DPT. La curva obtenida a distintas concentraciones de sustrato presenta unos puntos de inflexión característicos, interesantes en la interpretación del efecto de este antibiótico.

Fumagilina. — Como la tricomocina, la fumagilina es un potente inhibidor de la actividad enzimática. La inhibición

producida es de tipo claramente competitivo (fig. 3). En la acción sobre la holoenzima recombinada y en la previa incubación con Mg^{++} y DPT no se alteran sensiblemente los porcentajes obtenidos sobre la enzima purificada. A pesar de la inexistencia de analogías estructurales, tanto la representación de Lineweaver y Burk [$10^3/v$ frente a $1/(S)$] como la gráfica de (I) frente a % de inhibición y la de $10^3/v$ frente a (I), sugieren que se trata de una inhibición de tipo competidor.

DERIVADOS QUINÓNICOS

Griseofulvina. — Este antibiótico inhibe la actividad piruvato carboxilásica cuando está presente a concentraciones bastante elevadas. Los porcentajes de inhibición son, aun en estas condiciones, muy discretos. La inhibición es de tipo no competitivo. La adición a la enzima de Mg^{++} incubado previamente con el antibiótico incrementa débilmente la inhibición producida, en relación a los controles oportunos. Sobre la holoenzima recombinada la inhibición producida por una misma concentración de antibiótico es mucho mayor. La incubación previa de la apoenzima con el inhibidor no influye excesivamente sobre el porcentaje, pero sí lo hacen las incubaciones previas del antibiótico con el DPT o el Mg^{++} (tabla VI).

TABLA VI

Efecto de la griseofulvina sobre la piruvato carboxilasa.

	Porcentaje de inh.
Enzima	14
Holoenzima recombinada	47
(Apoenz. + Inh) + DPT + Mg.	53
Apoenzima + Mg. + (DPT + Inh)	70
Apoenzima + DPT + (Mg. + Inh)	75

S: 5×10^{-3} M

I: 2×10^{-2} M

Nitrofurantoina. — La nitrofurantoina inhibe moderadamente a la piruvato carboxilasa (33 % a 5×10^{-3} M). El sustrato y la coenzima ejercen una clara protección de la inhibición.

Discusión

El efecto producido *in vitro* por los productos ensayados sobre el sistema enzimático de la piruvato carboxilasa de levadura confirma la fuerte labilidad de las enzimas a los antibióticos. El efecto de cada antibiótico sobre uno o varios procesos enzimáticos *in vivo* y el lugar celular donde la interferencia se produce dependen de numerosas circunstancias, entre las que destaca la misma posibilidad de acceso de los antibióticos a las posiciones donde las enzimas ejercen su misión específica. Son ya numerosos los conocimientos sobre los procesos interceptados por los antibióticos e inhibidores. El mecanismo íntimo de acción de algunos de los antibióticos ensayados sobre los microorganismos sensibles han podido ser interpretados con detalle. La finalidad principal de los estudios sobre sistemas enzimáticos aislados es la de aportar datos para facilitar la interpretación de posibles modos generales de interferencia y, especialmente, información sobre las características enzimológicas del sistema en estudio.

Aparte de los infrecuentes resultados de activación o inactividad indicados, el tipo predominante de inhibición es, como era previsible, el no competitivo. El sustrato y la coenzima protegen en algunas ocasiones la acción antibiótica, que en ningún caso parece ejercerse sobre el complejo enzima-sustrato, ya que ni las representaciones gráficas ni los ensayos realizados con este fin han permitido establecer dicho tipo de inhibición. Las inhibiciones no competitivas por bloqueo de grupos activos se incrementan normalmente cuando el antibiótico actúa sobre la holoenzima recombinada, que

es, evidentemente, más frágil que la enzima de origen.

Los ensayos realizados con la penicilina V_K y la propionil-eritromicina indican claramente la gran influencia de los radicales unidos a los anillos antibióticos en relación a la actividad inhibidora de los compuestos resultantes sobre una enzima determinada. Así, la penicilina G ejerce una acción protegida por el sustrato (9), totalmente distinta a la hallada por nosotros en el caso de la penicilina V_K, y la propionil-eritromicina posee una débil acción inhibidora que contrasta fuertemente con el notable efecto — de tipo incompetitivo — producido por la eritromicina (9).

Dentro de los inhibidores ensayados deben destacarse aquellos antibióticos que ejercen su acción por captación del efector metálico de la reacción enzimática (tetraciclinas y vancomicina, especialmente). Los resultados obtenidos *in vitro* con una enzima que requiere Mg^{++} y cuya disociación y reconstrucción hacen posible una gran variedad de combinaciones experimentales, están totalmente de acuerdo con la observación, comunicada por diversos autores, de que ciertos cationes polivalentes — y en especial el calcio y el Mg^{++} — contrarrestan la acción de las tetraciclinas y de otros antibióticos sobre los microorganismos. Esta acción es anulada totalmente por los agentes quelantes. Por otra parte, a medida que aumenta la facilidad de formación de quelatos por los antibióticos es mayor la dificultad de contrarrestar su efecto.

Los resultados obtenidos permiten deducir que la enzima, sin adición de Mg^{++} o DPT, forma una asociación compacta que no permite o dificulta el acceso — especialmente en presencia del sustrato — del producto antibiótico al Mg^{++} . En la enzima recombinada — que necesita un gran exceso de los componentes termoestables — la unión es menos fuerte, lo cual conduce frecuentemente a un gran

incremento de la inhibición. Todo parece indicar que el ion metálico se halla implicado en la unión apoenzima-coenzima-sustrato, formando un complejo muy estable y difícilmente atacable al pH de trabajo. Cuando el antibiótico se añade sobre la apoenzima antes de la adición de Mg^{++} y DPT, puede producir una inhibición prácticamente total por impedir, seguramente, el acceso del Mg^{++} a los grupos proteicos o coenzimáticos que deben albergarle.

Los derivados glucídicos — excepto la Kanamicina — poseen una notable acción sobre la piruvato carboxilasa, debiendo destacar el efecto producido por la ristocetina. También en este caso, la adición de un exceso de efector metálico parece reducir la acción inhibidora.

Al considerar el efecto producido por la nitrofurantoína debe tenerse en cuenta la existencia de grupos quinónicos en su molécula, ya que KHUN y BEINERT (7) han comunicado la fuerte acción inhibidora de gran cantidad de derivados de tipo cetónico sobre la piruvato carboxilasa. Por la naturaleza quinónica de la griseofulvina, era previsible que ejerciera su efecto fundamentalmente sobre la apoenzima y/o sobre el DPT. Sin embargo, los resultados hallados sugieren un bloqueo preferente de los puntos de unión entre el Mg^{++} y el DPT.

(*) Nos complace expresar nuestro agradecimiento a los Laboratorios Abbot, Alter, Antibióticos, Bayer, Bristol, Carlo Erba, CEPA, Farmabión, Instituto Farmacológico Latino, Hoechst, Lederle, Lilly, Juan Martín, Rhône-Poulenc y Roussel, por habernos suministrado generosamente los productos antibióticos que se han utilizado en este trabajo. La gratitud especial de uno de los autores (F. G. F.) por la Ayuda concedida por los Laboratorios Leti para la realización del mismo.

Resumen

La piruvato carboxilasa presenta una notable labilidad frente a la mayoría de los anti-

bióticos ensayados. El efecto sobre la holoenzima reconstruida es normalmente más intenso que sobre la enzima purificada. Los resultados hallados *in vitro* con la propionil eritromicina y fenoximetil penicilina difieren notablemente de los obtenidos con otros derivados de ambos antibióticos, de donde se deduce la gran influencia que pueden tener pequeñas modificaciones de las estructuras básicas antibióticas sobre el efecto producido. La penicilina VK, metansulfonato de colimicina, novobiocina, ristocetina, espiramicina, tricomocina y griseofulvina actúan por mecanismos de tipo no competitivo, uniéndose probablemente a la enzima en posiciones moleculares que dificultan el acceso del sustrato a los centros activos. Los derivados glucídicos destacan por la potente acción inhibitoria que ejercen sobre el sistema estudiado.

El efecto producido por las tetraciclinas ensayadas y por la vancomicina y ristocetina tiene lugar a nivel del efector metálico. Las incubaciones previas realizadas con los componentes de la holoenzima han permitido comprobar la captación del Mg^{++} . La presencia del sustrato protege normalmente la inhibición producida por los antibióticos mencionados.

La cicloserina, Kanamicina, eritromicina y oleandomicina no afectan apreciablemente a la piruvato carboxilasa, en las concentraciones empleadas habitualmente en este trabajo.

Summary

Effect of antibiotic compounds on yeast pyruvate decarboxylase (Enzyme and recombined holoenzyme)

Pyruvate decarboxylase (4.1.1.1.) is inhibited by most of the antibiotics tested. The effect on the recombined holoenzyme system is normally higher than on the purified enzyme.

Results found *in vitro* with propionyl erythromycin and phenoxi-methyl-penicillin are remarkably different from tho-

se obtained with other derivatives of the same molecules, showing the influence of little chemical modifications of the antibiotic structure on its effect. Phenoximethyl-penicillin, colimycin metansulfonate, novobiocin, ristocetin, spiramycin, tricomycin and griseofulvin act by noncompetitive mechanisms. Inhibitory action of glycosidic-type antibiotics (kanamycin excepted) is especially high on the pyruvate decarboxylase.

Tetracyclines, vancomycin and ristocetin act at the level of metal cofactor requirement as shown by results obtained in previous incubations with the components of the holoenzyme system. The presence of substrate usually prevents the effect produced by compounds with chelating properties.

Cycloserine, kanamycin, erithromycin and oleandomycin have no effect on the enzyme activity under the conditions of the experiments.

Bibliografía

- (1) BEGUÉ CANTÓN, M. L. : *Actas IV Reunión Soc. Esp. C. Fisiol.*, 1958.
- (2) BOFFI, V. e col. : *Ricerca Scientifica*, **25/7**, 2069, 1955.
- (3) DE LA FUENTE, G. : *An. R. Acad. Farm.*, **4**, 345, 1956.
- (4) GARCÍA FERRÁNDIZ, F. : Tesis doctoral, Madrid, 1963. Facultad de Farmacia.
- (5) GREEN, D. E. and col. : *J. Biol. Chem.*, **135**, 795, 1940.
- (6) GREEN, D. E. and col. : *J. Biol. Chem.*, **138**, 327, 1941.
- (7) KHUN, R. and BEINERT, H. : *Chem. Ber.*, **76 B**, 904, 1943 ; **80**, 101, 1947.
- (8) LOWRY, S. and col. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- (9) MARTÍN HERNÁNDEZ, D. y col. : *R. esp. Fisiol.*, **12**, 93, 117, 143, 225, 1956.
- (10) SMITS, G. : *Biochem. Biophys. Acta*, **1**, 280, 1947.