

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica, Madrid.
(Director: Prof. A. Santos Ruiz)

Estudios sobre carboxilasas

X. — Inhibición enzimática de la carboxilasa pirúvica por antibióticos de naturaleza protídica

D. Martín-Hernández*, G. de la Fuente-Sánchez**, y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 1 de junio de 1956)

En trabajo previo publicado en esta revista (1) hemos investigado la acción de los antibióticos derivados del núcleo naftacénico sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica y hemos encontrado que la clorotetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina inhiben considerablemente a este enzima por un mismo mecanismo de acción, sugiriéndose que la inhibición es causada por tres o más grupos funcionales presentes en las tres moléculas de los antibióticos de este grupo. También se ha estudiado la acción de los antibióticos de naturaleza glucídica (2).

Continuando el estudio de los antibióticos de importancia terapéutica, se presentan una serie de experimentos sobre la acción que los de estructura peptídica ejercen en el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica.

Las interacciones de polipéptidos y proteínas tienen importancia en Bioquímica por cuanto los complejos proteína-polipéptido constituyen, probablemente, el vehículo de distribución de estos polipéptidos en el organismo y una posible causa de bloqueo de sistemas enzimáticos. Algunas de estas interacciones pueden ser el origen de las manifestaciones antibióticas o de la toxicidad de determinados medicamentos.

* Becario del Patronato S. Ramón y Cajal.

** Becario del Patronato J. de la Cierva.

La carboxilasa pirúvica, cuyo interés bioquímico hemos hecho resaltar en nuestra publicación anterior (1), es un enzima típicamente dependiente de sus grupos sulfhidrúlicos y constituye un excelente medio de estudio para detectar tales interacciones.

Material y métodos

En cuanto a las características y preparaciones del enzima, sustrato activadores y otros reactivos utilizados en este trabajo, nos remitimos a lo dicho en el correspondiente apartado de nuestra anterior comunicación (1). También la técnica manométrica se ha empleado aquí, procediendo de la misma manera.

TABLA I

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por bacitracina
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato de viomicina	Concentración de bacitracina en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm.}^3$	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$4,6 \times 10^2$	—
»	0,0025	$3,0 \times 10^2$	18
»	0,005	$2,4 \times 10^2$	47
»	0,01	$1,7 \times 10^2$	61
»	0,02	$1,1 \times 10^2$	74
0,015	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	0,0025	$4,4 \times 10^2$	17
»	0,005	$3,6 \times 10^2$	33
»	0,01	$2,9 \times 10^2$	47
»	0,02	$2,1 \times 10^2$	62
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	0,0025	$4,6 \times 10^2$	15
»	0,005	$4,5 \times 10^2$	17
»	0,01	$3,7 \times 10^2$	32
»	0,02	$3,1 \times 10^2$	42

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

Resultados

EXPERIMENTOS CON BACITRACINA.

La bacitracina inhibe a la carboxilasa pirúvica. La tabla I,

que resume los resultados, muestra cómo la concentración del sustrato tiene influencia marcada en el grado de inhibición, pues para 0,0045 M. de piruvato, la inhibición correspondiente a 0,01 M. de bacitracina es del 61 %, mientras que al aumentar la concentración de este sustrato, y convertirse en 0,015 y 0,045 molares, para la misma concentración del inhibidor, los tantos por cientos de inhibición son, respectivamente, 47 y 32.

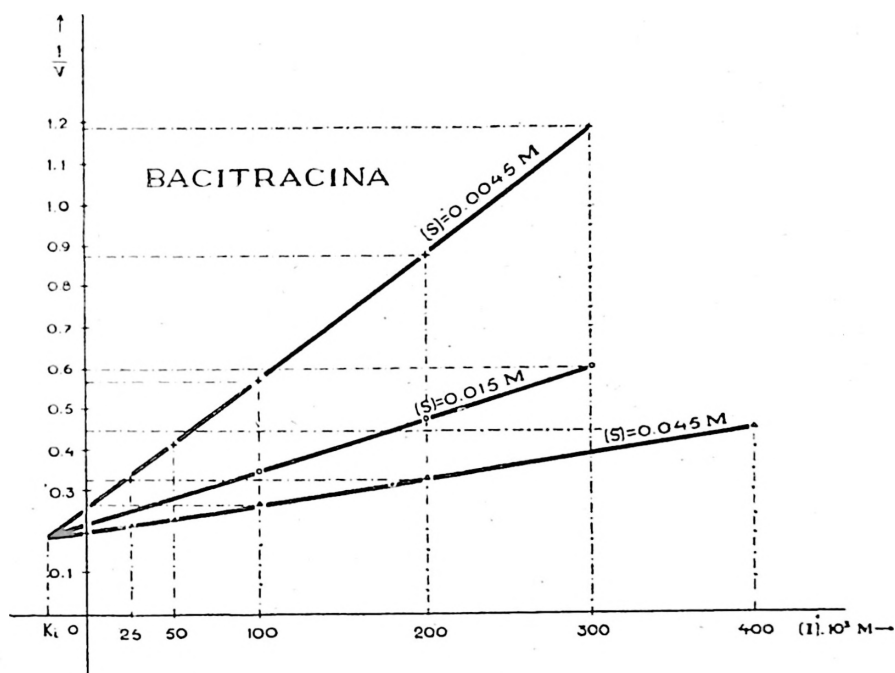


Figura 1

El tratamiento teórico de esta inhibición sugiere que se trata de un fenómeno reversible de tipo competitivo, y de la consideración y estudio de la figura 1, correspondiente a las representaciones de los valores $1/V$ frente a los de las concentraciones del antibiótico, se deduce la posibilidad de que la molécula de esta sustancia, de carácter peptídico, se una al enzima en posiciones moleculares que dificultan el acceso del sustrato a los centros activos del fermento.

Se sabe que por hidrólisis ácida suave la bacitracina libera grupos sulhidrúlicos y, operando con bacitracina brevemente hervida con solución diluída de ácido clorhídrico, se ha comprobado que aumenta su capacidad inhibidora.

La incubación previa de bacitracina con sustrato no modifica el grado de inhibición, mientras que la incubación con el enzima lo eleva. Esto refuerza la hipótesis de que bacitracina forme complejos proteicos con la carboxilasa pirúvica (tabla V).

Se sabe que las interacciones entre dos moléculas proteicas pueden deberse a dos causas: *a*), a factores electrostáticos moleculares, y *b*), a factores específicos estructurales. Descartada la posibilidad de que bacitracina forme complejos poco solubles con el enzima estudiado, porque no se observó en ningún caso enturbiamiento, a pesar de la amplitud de la escala de concentraciones empleadas, y como, por otra parte, tanto la bacitracina como la carboxilasa pirúvica tienen caracteres ligeramente ácidos y esto elimina la posibilidad de una unión de tipo salino entre las dos moléculas polipeptídicas en cuestión, se concluye, finalmente, que el complejo de bacitracina con carboxilasa pirúvica debe estar causado, probablemente, por factores específicos estructurales, lo que hace suponer que el antibiótico pudiera no inhibir a otros enzimas con funciones sulfhidrúlicas activas, pero de características diferentes en cuanto a su estructura.

TABLA II

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por polimixina B (sulfato)
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato (en M/l.)	Concentración de polimixina B en M/l.	Velocidad de descarboxilación en $\mu\text{l/h. cm.}^2$	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$3,9 \times 10^2$	—
»	$0,5 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^2$	10
»	0,001	$3,4 \times 10^2$	13
»	0,005	$3,0 \times 10^2$	24
0,045	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	$0,5 \times 10^{-3}$	$5,1 \times 10^2$	5
»	0,001	$5,0 \times 10^2$	8
»	0,005	$4,8 \times 10^2$	11

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

EXPERIMENTOS CON POLIMIXINA B.

La polimixina B inhibe a la carboxilasa pirúvica y el aumento

de la concentración del sustrato hace disminuir el grado de inhibición (tabla II).

El empleo del método gráfico para el estudio de la acción inhibidora de este antibiótico indica la existencia de un mecanismo que no se ajusta a ninguno de los modelos aceptados como competitivos (véase figura 2).

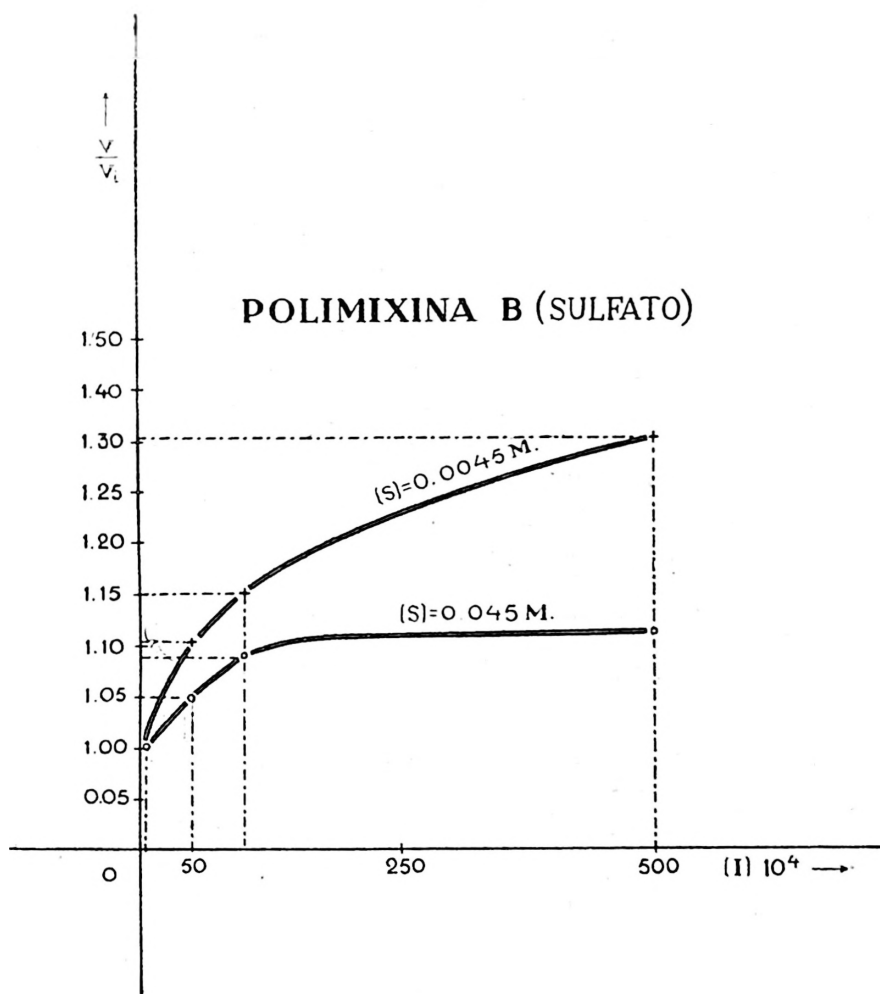


Figura 2

Puede tratarse de un mecanismo de inhibición complejo o mixto y es evidente, según se desprende la curva de representación de los valores de V/V_i frente a los de las concentracio-

res de antibiótico, que se produce formación de un complejo, y que se alcanza un cierto grado de saturación del enzima respecto del inhibidor de modo que, al aumentar la concentración de éste, se llega a un cierto valor por encima del cual la velocidad de reacción permanece constantemente inalterada.

EXPERIMENTOS CON TIOTRICINA.

La carboxilasa pirúvica es inhibida considerablemente por tirotricina. En la tabla III se resumen los resultados, en donde se ve que la concentración del sustrato ejerce influencia marcada en el grado de inhibición.

TABLA III

*Inhibición de la carboxilasa pirúvica por tirotricina
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato*

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración de tirotricina en mgr./cm. ³	Velocidad de descarboxilación en μ l/h. cm. ³	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$5,6 \times 10^{-2}$	—
»	0,132	$4,0 \times 10^{-2}$	29
»	0,33	$3,2 \times 10^{-2}$	43
»	0,462	$2,8 \times 10^{-2}$	50
»	0,725	$2,3 \times 10^{-2}$	60
0,045	0	$6,7 \times 10^{-2}$	—
»	0,132	$5,9 \times 10^{-2}$	17
»	0,33	$4,6 \times 10^{-2}$	24
»	0,462	$3,6 \times 10^{-2}$	32
»	0,725		46

Condiciones experimentales:

Tampón citratos pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

El estudio de las curvas de representación de valores $1/V$ frente a los de las concentraciones del antibiótico (fig. 3) demuestra que el mecanismo de inhibición es de tipo no-competitivo, siendo posible calcular la constante de inhibición, cuyo valor numérico no puede ser expresado porque la tirotricina no es una especie química pura.

El aumento de la concentración de cofermento, adicionándole un exceso al sistema enzimático, no afecta el grado de inhibición.

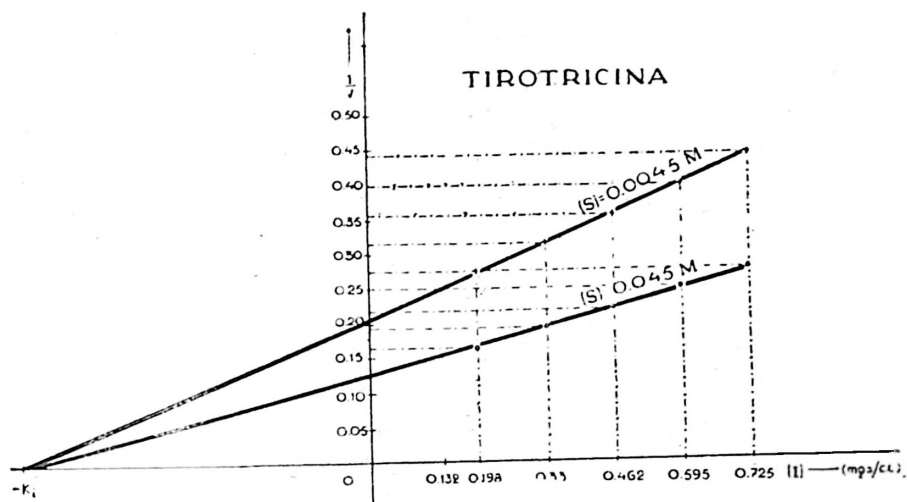


Figura 3

EXPERIMENTOS CON VIOMICINA.

La viomicina inhibe al sistema enzimático estudiado y la concentración del sustrato no ejerce acción protectora del enzima (véase la tabla IV).

TABLA IV

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por viomicina (sulfato)
Efecto de la concentración del antibiótico a diferentes concentraciones de piruvato

Concentración de piruvato en M/l.	Concentración en M/l.	Velocidad de descarboxilación en μ l/h.	Tanto por ciento de inhibición
0,0045	0	$5,4 \times 10^2$	—
»	0,066	$2,8 \times 10^2$	48
»	0,166	$2,0 \times 10^2$	63
»	0,266	$1,5 \times 10^2$	71
»	0,33	$1,3 \times 10^2$	81
0,015	0	$6,4 \times 10^2$	—
»	0,066	$4,7 \times 10^2$	27
»	0,130	$3,2 \times 10^2$	48
»	0,266	$1,9 \times 10^2$	68
»	0,33	$1,6 \times 10^2$	75

Condiciones experimentales:
 Tampón citratos pH = 6,0.
 Volumen final = 3,0 ml.
 Atmósfera = aire.
 Temperatura = 30° C.

El estudio de la figura 4, que representa los valores de $1/V$ frente a los de las concentraciones del antibiótico, demuestra que se trata de una inhibición típicamente acopladora, de lo que se deduce que viomicina se une al complejo enzima-sustrato y no al enzima libre.

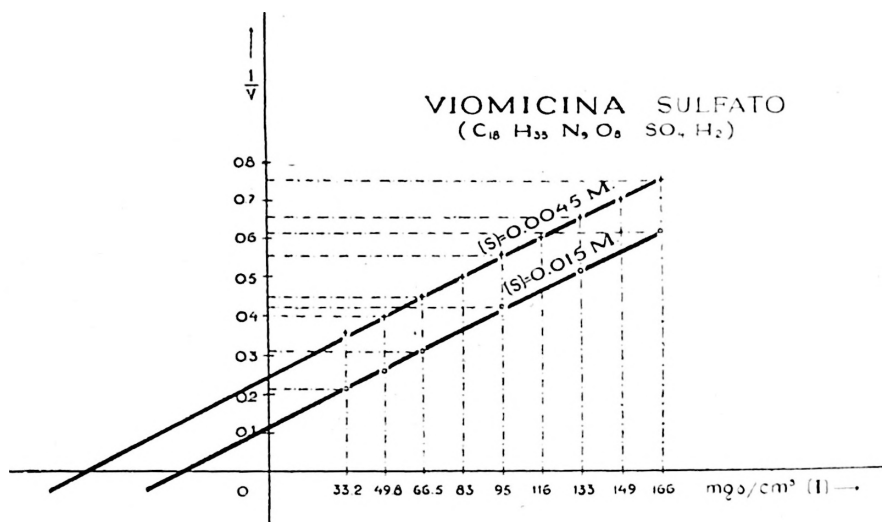


Figura 4

TABLA V

Inhibición de la carboxilasa pirúvica por bacitracina ()*

a) Efecto de la hidrólisis ácida	
para concentración de piruvato.	0,045 M/l.
y de bacitracina	0,04 M/l.
Antibiótico sin hidrolizar	
Antibiótico sometido a hidrólisis clorhídrica	
57	
62	
b) Efecto de la incubación previa con el enzima	
para concentración de piruvato.	0,045 M/l.
y de bacitracina	0,04 M/l.
Antibiótico sin incubar	
Antibiótico incubado con el enzima	
57	
60	

(*) *Condiciones experimentales:*

Tampón citrato pH = 6,0.

Volumen final = 3,0 ml.

Atmósfera = aire.

Temperatura = 30° C.

EXPERIMENTO CON OTROS ANTIBIÓTICOS DE ESTE GRUPO.

Hemos encontrado que la argicilina y la actinomicina C, no ejercen acción sobre el sistema enzimático de la carboxilasa pirúvica a las concentraciones en que habitualmente hemos llevado a cabo estas investigaciones.

Agradecimiento. — Damos las gracias a las casas Antibióticos, S. A.; Bayer, S. A., de Leverkusen; Boizot, S. A.; Diamant, de París; Pan-Química Farmacéutica, de Madrid, y muy especialmente a Alter, S. A., por habernos suministrado generosamente muestras de antibióticos puros.

Resumen

Empleando la técnica manométrica de WARBURG, se han estudiado los efectos de bacitracina, polimixina B, tirotricina, actinomicina C, argicilina y viomicina sobre el sistema enzimático purificado de la carboxilasa pirúvica. Se ha encontrado que la bacitracina inhibe reversiblemente respecto al sustrato, polimixina B inhibe por un mecanismo más complejo, tirotricina inhibe no competitivamente, viomicina inhibe por mecanismo desacoplador y argicilina y actinomicina C no inhiben apreciablemente.

Summary

Studies on carboxilases. — X. Enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by the antibiotics of the protein nature

Continuing the study of the enzymatic inhibition of pyruvic carboxylase by antibiotics of therapeutic importance, the antibiotics bacitracin, polymyxine B, tyrotrycin, viomycin and chloramphenicol have been tested.

The results obtained have been the following:

1) *Bacitracin*. Inhibits considerably and substrate concentration has a marked influence on the quantity of inhibition. Theoretical consideration suggests a reversible inhibition of a competitive kind and the possibility that the antibiotic unites with the enzyme in positions which impede the access of the substrate to the active centre of the enzymatic protein; operating with bacitracin submitted to gentle hydrolysis, in conditions in which it is known to liberate sulphhydryl groups, a marked increase in inhibitory capacity has been noted. Previous incubation of the antibiotic with the enzyme causes an increased inhibition.

2) *Polymyxine B*. Appreciably inhibits pyruvic carboxylase and inhibition is reversible with respect to the substrate. The mechanism of inhibition does not seem to fit into any of the types established in the theoretical treatise of LINEWEAVER and BURKE for enzymatic inhibition. The results suggest the formation of a complex, and that a certain state of saturation of the enzyme with the antibiotic is reached, in such a manner that an increase in concentration of the latter does not show an increase in inhibition.

3) *Tyrotrycin*. It inhibits strongly and the inhibition is markedly influenced by the concentration of substrate. Theoretically a reversible but not competitive mechanism with respect to the substrate is indicated. The addition of excess of coenzyme has no effect on inhibition.

4) *Viomycin*. Inhibits by a coupling mechanism that is, it unites with the free enzyme.

5) *Chloramphenicol*. Inhibition by this antibiotic is irreversible with respect to the substrate, on the other hand, addition of cocarboxylase markedly reduces inhibition, addition of thiamine has not the same effect.

Bibliografía

- (1) MARTÍN HERNÁNDEZ, D., DE LA FUENTE, G., y SANTOS RUIZ, A. : *R. esp. Fisiol.*, 12, 93, 1956.
- (2) MARTÍN HERNÁNDEZ, D., DE LA FUENTE, G., y SANTOS RUIZ, A. : *R. esp. Fisiol.*, 12, 117, 1956.