

BBA 68536

PURIFICATION ET DETECTION DE PLUSIEURS FORMES MOLECULAIRES DE L'HISTIDINE DECARBOXYLASE DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DE RAT

ALAIN SAVANY * et LUCIEN CRONENBERGER

*Laboratoire de Chimie Biologique, Bâtiment 406, Institut National des Sciences Appliquées,
20 Avenue Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex (France)*

(Received February 24th, 1978)

Summary

Purification and detection of multiple forms of histidine decarboxylase in rat gastric mucosa

A specific histidine decarboxylase from rat gastric mucosa has been obtained at high purity and good yield (purification about 600-fold). The purification procedure included double $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, ion-exchange chromatography, preparative isoelectric focusing in a granulated gel and gel filtration. Only the specific histidine enzyme was obtained by that procedure; DOPA decarboxylase, a non-specific enzyme, was absent in our final preparation. Each step of the purification was visualized by polyacrylamide gel electrophoresis and analytical isoelectric focusing. The purified enzyme was apparently homogeneous by criteria of electrophoresis and gel filtration and has a molecular weight of 94 000. Several protein bands appeared after isoelectric focusing and the enzyme activity was localized in 3 distinct peaks. The gastric enzyme consists of 3 active forms which could be distinguished by their isoelectric points: 5.4, 5.75 and 6. Molecular weights estimated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis were 97 000, 93 000 and 90 000, and no subunits were observed. Pyridoxal phosphate was required as a coenzyme and resolution of the holoenzyme agreed with a portion of the coenzyme tightly bound to the apoenzyme. The purified enzyme was stable at low ionic strength, near neutral pH; concentrated reducing agents inhibit the enzyme.

Introduction

La biosynthèse d'histamine chez les mammifères est catalysée par deux enzymes: l'histidine décarboxylase (L-histidine carboxy-lyase, EC 4.1.1.22)

* Ce mémoire constitue une partie de la thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques que doit soutenir A. Savany.

spécifique de l'histidine et la DOPA décarboxylase non spécifique. L'histidine décarboxylase est présente dans le foetus, le placenta, les tumeurs, la moelle osseuse, le cerveau [1-3]. C'est dans l'estomac de diverses espèces que les activités les plus importantes sont enregistrées, en particulier chez le rat [4-9]. La présence de l'enzyme chez les primates et l'homme est démontrée [10,11].

L'enzyme est localisée dans la muqueuse de la partie glandulaire de l'estomac, sa distribution parallèle à celle de l'histamine indique que l'histamine est formée dans le tissu [5,10]. L'activité DOPA décarboxylase, importante, est surtout localisée dans la partie pylorique. L'histidine décarboxylase est activée par des stimuli physiologiques ou pharmacologiques et des auteurs ont suggéré une relation entre l'activité de l'enzyme, le taux d'histamine et les fonctions gastriques [12]. Des travaux récents ont précisé le rôle de l'histamine et de cette enzyme dans la sécrétion acide gastrique et fait apparaître notamment que l'activité de l'enzyme est contrôlée par la concentration en gastrine du sérum [13-15].

La purification de l'enzyme fait apparaître une grande labilité des extraits partiellement enrichis [10,12,16]; c'est pourquoi la plupart des travaux sont effectués sur des préparations brutes ou faiblement purifiées. De ce fait il est à craindre, en particulier, des décarboxylations non spécifiques qui peuvent conduire à de fausses interprétations. L'objectif de ce travail est donc l'isolement de l'histidine décarboxylase de l'estomac de rat hautement purifiée pour permettre sa réelle caractérisation par ses propriétés physicochimiques.

Matériel et Méthodes

Produits. L-Histidine, pyridoxal-5'-phosphate, L-DOPA sont fournis par Fluka, Buchs, Switzerland; Sephadex G-75 superfine et DEAE-Sephadex A-50 par Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Sweden; Ultrogel AcA 44 et ampholines par LKB Produkter AB, Bromma, Sweden. Les réactifs pour électrophorèse et électrofocalisation sont des produits Merck, Darmstadt, RFA. DL-[carboxyl-¹⁴C]histidine (50 Ci/mol) et L-3,4-dihydroxyphényl[1-¹⁴C]alanine (23.5 Ci/mol) sont fournis par le Radiochemical Center, Amersham.

Activité histidine décarboxylase. Elle est déterminée par la mesure du ¹⁴CO₂ libéré à partir de DL-[carboxyl-¹⁴C]histidine selon la technique de Aurès et al. [7] modifiée. Dans une enceinte hermétique l'enzyme est incubée 90 min à 37°C avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8), 20 μM pyridoxal phosphate, 50 μM L-histidine et 0.1 μCi DL-[carboxyl-¹⁴C]histidine pour un volume total de 1.2 ml. La réaction est stoppée par 1 ml H₂SO₄, 2.5 M et le ¹⁴CO₂ libéré est absorbé sur papier Whatman GF/C imbibé de 10% NaOH. La radioactivité est mesurée après transfert du papier dans 5 ml de mélange scintillant Sochibo (Unisolve 1). La cinétique enzymatique est proportionnelle au temps pendant 3 ou 4 h et à la concentration en enzyme jusqu'à 15 mg protéines.

Activité DOPA décarboxylase. Elle est déterminée par la même technique que celle utilisée pour l'histidine décarboxylase mais avec 50 μM L-DOPA et 25 nCi L-[1-¹⁴C]DOPA [17,18].

Dosage des protéines. La méthode employée est celle de Lowry et al. [19] ou celle du biuret [20] avec l'ovalbumine comme standard.

Electrophorèse. Toutes les électrophorèses en disque sur gel de polyacrylamide (7.5% acrylamide) sont effectuées selon la méthode décrite par Ornstein [21], Davis [22] et Bloemendal [23] avec le tampon 25 mM Tris/0.2 M glycine (pH 8.5). La migration est réalisée avec 2 mA par gel à 4°C, le bleu de bromophénol est utilisé comme marquer. Les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie. Pour localiser l'enzyme les gels sont découpés en disques de 2 mm d'épaisseur, homogénéisés dans le tampon d'incubation et le dosage effectué après 2 h de diffusion dans ce milieu.

SDS électrophorèse. Elle est conduite suivant une technique analogue à celle de Weber et Osborn [24]. Avant électrophorèse les protéines sont chauffées à 100°C pendant 4 min dans le tampon Tris/glycine (pH 8.5) en présence de 1% SDS 1% mercaptoéthanol. La migration est effectuée à 4°C avec 2.5 mA par gel.

Electrofocalisation. L'électrofocalisation préparative est inspirée de la méthode décrite par Radola [25,26] et réalisée suivant la technique présentée par LKB [27] avec quelques modifications.

En électrofocalisation analytique nous utilisons principalement les ampholines polyacrylamide gel plates fournies par LKB, gradient de pH 3.5—9.5, en application de la méthode présentée par Karlsson et al. [28] et Vesterberg [29]. Les dépôts sont effectués près de la cathode et l'électrofocalisation est réalisée en 2 h à 4°C sur un appareil Multiphor LKB 2117 avec une tension maximum de 1000 V. Les pH sont mesurés à 20°C [30,31] sur des sections régulières du gel, parallèles aux électrodes, de 2 mm de large et homogénéisées dans 1 ml d'eau distillée. Des sections de gel analogues homogénéisées dans 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) permettent la détection de l'activité enzymatique. Les protéines sont colorées par le bleu de Coomassie.

Détermination du poids moléculaire. Par filtration sur gel d'acrylamide agarose AcA 44 (2.5 × 88.5 cm) les protéines natives sont éluées à 4°C avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) contenant 10 µM pyridoxal phosphate et un débit de 50 ml/h.

Spectres. Les spectres sont tracés à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DB-G dans des cuves en quartz de 1 cm de chemin optique et de 1 ml.

Résultats

Purification de l'enzyme. Toutes les étapes de purification sont effectuées à 2—4°C sauf indications contraires.

Etape 1. Des rats Sprague-Dawley mâles adultes (250—350 g), librement nourris, sont tués après absorption d'aliments [7,32]. Des estomacs soigneusement nettoyés, seule la muqueuse qui recouvre la partie glandulaire [15] est prélevée. Les conditions employées par Lévine et Watts [6] quant au pH d'extraction sont adoptées et les tissus sont homogénéisés au polytron avec 0.1 M tampon acétate (pH 5.5) contenant 10 µM pyridoxal phosphate, 1 mM mercaptoéthanol, 10 mM EDTA (6 vols. par gramme de tissu). L'homogénat est centrifugé à 50 000 ×g pendant 1 h. La totalité de l'enzyme était dans le surnageant.

Etape 2. Après élimination de la fraction lipidique, le surnageant est préci-

pité à 43% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par addition lente sous agitation de ce sel cristallisé [33], le pH est maintenu à 5.7 par addition de 0.5 M NaOH. Après agitation pendant 20 min le milieu est centrifugé à $30\ 000 \times g$ pendant 20 min. Le surnageant qui contient notamment une partie de l'activité DOPA décarboxylase est éliminé. Le précipité est solubilisé avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8), 10 μM pyridoxal phosphate, 1 mM mercaptoéthanol, 10 mM EDTA.

Etape 3. L'extrait précédent est précipité à 27% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à pH constant (6.8). Le surnageant de centrifugation ($30\ 000 \times g$, 20 min) est précipité à 40% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les protéines qui précipitent entre 27 et 40% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sont collectées par centrifugation ($30\ 000 \times g$, 30 min) et solubilisées avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8).

Etape 4. Cette fraction (35 ml) est déposée directement sur une colonne de gel DEAE-Sephadex A-50 (2.5×17.5 cm). L'élution a lieu avec 330 ml de gradient linéaire 50—500 mM tampon phosphate (pH 6.8) au débit de 25 ml/h (Fig. 1). L'activité enzymatique est élueée en deux pics bien distincts: le 'pic 1' contient surtout l'activité DOPA décarboxylase, le 'pic 2' contient l'activité histidine décarboxylase. Ce deuxième pic très large présente deux maxima vers 0.25 et 0.28 M, il contient 75—80% de l'activité initiale.

Etape 5. L'extrait précédent est précipité à 52% de saturation en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à pH 6.8, puis centrifugé à $30\ 000 \times g$ pendant 30 min, enfin dialysé pendant 16 h contre 2 mM tampon phosphate (pH 6.8), 10 μM pyridoxal phosphate. Ce milieu (15 ml) est concentré à 3 ml par ultrafiltration dans un concentrateur minicon B-15 Amicon.

Etape 6. L'électrofocalisation est réalisée dans un gradient de pH 3.5—9.5 sur une plaque de gel Sephadex G-75 superfine ($23 \times 11 \times 0.3$ cm) contenant 2% ampholines. La fraction issue de l'étape précédente est déposée en une bande à

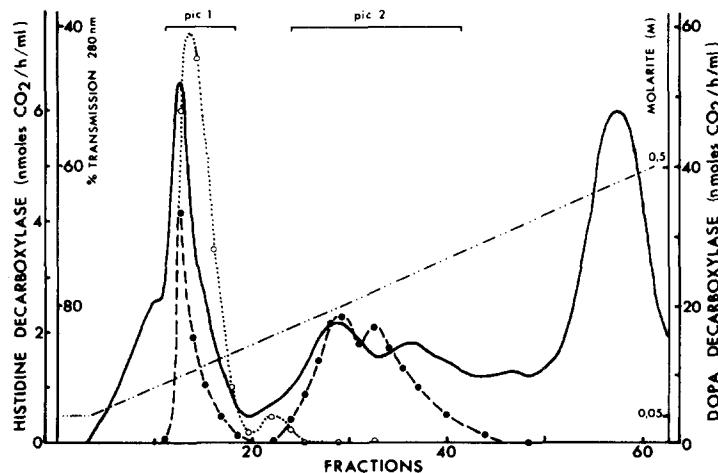


Fig. 1. Chromatographie sur résine anionique DEAE-Sephadex A-50. L'extrait 27—40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (35 ml) est déposé sur la colonne (2.5×17.5 cm) équilibrée avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8). Elution avec un gradient linéaire 50—500 mM tampon phosphate (pH 6.8) (---). Débit 25 ml/h. Fractions 6.5 ml. Les activités enzymatiques sont exprimées en nmoles CO_2 formé/h/ml. (—) Pourcentage de transmission à 280 nm. (●---●) Activité histidine décarboxylase. (○---○) Activité DOPA décarboxylase.

TABLEAU I

PURIFICATION DE L'HISTIDINE DECARBOXYLASE DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DE RAT

Etapes	Histidine décarboxylase					DOPA décarboxylase	
	Protéines totales (mg)	Activité totale (pkat)	Activité spécifique (pkat/mg)	Rendement activité (%)	Purification	Activité spécifique (pkat/mg)	Rendement activité (%)
Homogénat	5460	140.83	0.026	100	1		
Surnageant 50 000 \times g	1274	134.33	0.105	95.4	4.09	0.725	100
0-43% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	591.8	135.32	0.229	96	8.86		
27-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	292.2	142.40	0.487	101	18.9	1.855	58.6
Pic 1	43.8	12.27	0.280	8.7	10.85	11.124	52.7
DEAE-Sephadex	75.4	112.18	1.488	79.7	57.7	0.036	2.9
Extrait dialysé concentré	60.6	90.70	1.497	64.4	58	0.040	2.6
Focalisation	6.7 *	48.03	7.139	34.1	276.8	0	0
Ultrogel AcA 44	2.4	37.02	15.422	26.3	598	0	0

* Dosage des protéines après élimination des ampholines par filtration sur gel Sephadex G-50 Fine. 1 pkatal = 1 pmol CO_2 formé/s.

égale distance des électrodes sur toute la largeur de la plaque. L'électrofocalisation est effectuée en 7 h d'abord à 300 V pendant 3 h, la tension est ensuite augmentée pour atteindre 900 V en fin d'expérience. La gel est fractionné parallèlement aux électrodes en raies de 0.7 cm de large, les pH sont mesurés à 20°C sur un faible volume du gel de chaque raie auquel est ajouté 1 ml d'eau distillée (gel/eau = 1 : 5). L'enzyme focalise sous forme d'un pic assez large entre pH 5.3 et 6.1, elle est éluee avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) par centrifugation à 1500 $\times g$ pendant 15 min puis le pH est ajusté à 6.8.

L'élimination des ampholines qui interfèrent dans le dosage des protéines est réalisée par filtration sur gel Sephadex G-50 fine (2.5 \times 32 cm) avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8), 10 μ M pyridoxal phosphate.

Etape 7. L'extrait obtenu après focalisation (8 ml) est déposé sur une colonne de gel d'acrylamide agarose AcA 44 (2.5 \times 89 cm). L'élution est assurée avec 50 mM tampon phosphate (pH 6.8), 10 μ M pyridoxal phosphate (débit 50 ml/h). Les fractions contenant l'histidine décarboxylase sont rassemblées.

Une purification supplémentaire peut être obtenue après une deuxième chromatographie sur AcA 44 (2.5 \times 89 cm) de l'extrait précédent concentré à 1 ml. Cette étape peut multiplier par 1.5 l'activité spécifique si on ne recueille que les fractions les plus riches en enzyme; mais à ce stade l'enzyme est plus instable même à -20°C.

Bilan de purification. A partir de 26 g de muqueuse gastrique l'histidine décarboxylase est obtenue purifiée en moyenne 600 fois avec un rendement de 25-30% et une activité spécifique finale voisine de 15 pkatals/mg protéines (Tableau I). La préparation ne révèle pas d'activité DOPA décarboxylase; la séparation des deux enzymes est réalisée en choisissant un pH d'extraction acide puis en effectuant un double fractionnement par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, elle est achevée à l'issue de la chromatographie d'échange d'ions (Fig. 1). L'emploi d'inhibiteurs spécifiques des deux enzymes α -méthyl DOPA et α -méthyl histidine confirme la distribution des activités élues. L'élution de l'histidine décarboxylase suggère la présence de plusieurs formes de cette enzyme.

Electrophorèses. Les étapes de la purification et la pureté de l'enzyme sont suivies par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Fig. 2). La protéine enzymatique est identifiable après le stade chromatographie d'échange d'ions. La préparation finale présente deux bandes protéiques diffuses dont l'absorption se décompose en 3 petits pics (Fig. 3). L'augmentation de la quantité de protéines déposée sur le gel ne révèle pas de bande supplémentaire significative. L'activité enzymatique est localisée au niveau de ces bandes sous la forme d'un pic unique.

SDS electrophorèse. L'histidine décarboxylase purifiée, apparemment homogène après électrophorèse, est ici résolue en une douzaine de bandes protéiques distinctes, d'intensités variables, parmi lesquelles on compte 7 bandes principales (Fig. 4). Le traitement par le SDS, dénaturant pour l'enzyme, ne permet pas d'identifier par dosage les bandes qui correspondent à l'enzyme.

Comparativement aux mobilités électrophorétiques de sous unités de protéines de poids moléculaires connus [24], le résultat de 5 déterminations montre que les 3 protéines de plus faible mobilité ont des poids moléculaires de 97 000, 93 000 et 90 000, et pour les 4 autres protéines 74 000, 72 000 et 56 000, 52 000. Les bandes de plus faible intensité correspondent à des pro-

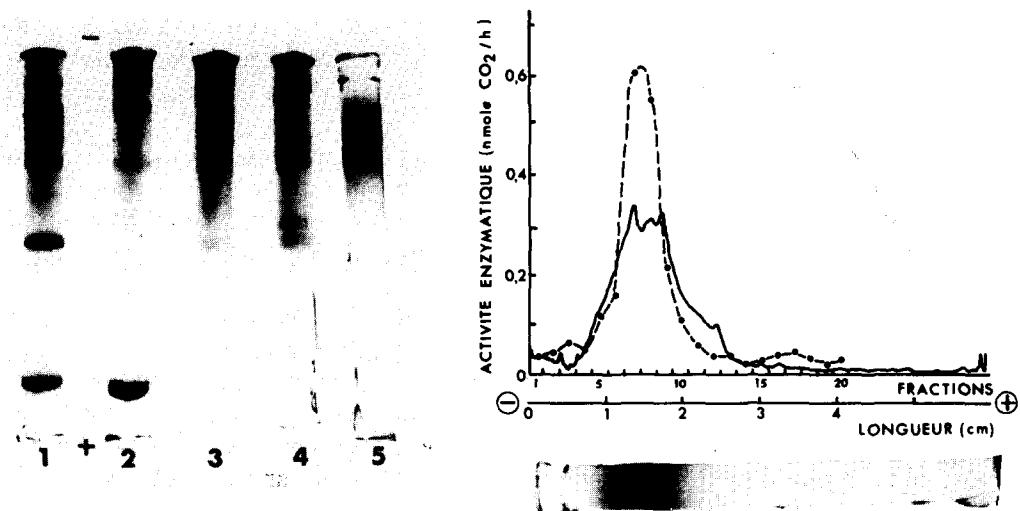


Fig. 2. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide (7.5% acrylamide) des étapes de la purification. Tampon Tris/glycine (pH 8.5); dépôts 70—80 µg protéines. Révélation par le bleu de Coomassie. Cathode et dépôts en haut. 1 = surnageant 50 000 X g. 2 = 27—40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 3 = DEAE-Sephadex A 50. 4 = électrofocalisation préparative. 5 = Ultrogel AcA 44.

Fig. 3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'enzyme purifiée. L'extrait est dialysé et concentré, 80 µg protéines sont déposés sur gel (7.5% acrylamide). Après électrophorèse en tampon Tris/glycine (pH 8.5) le gel est fractionné à partir de la cathode (à gauche) en disques de 2 mm d'épaisseur. (•—•—•—•) Activité enzymatique en nmole CO_2 formé/h pour chaque disque. (—) Densitogramme de gel, protéines colorées par le bleu de Coomassie.

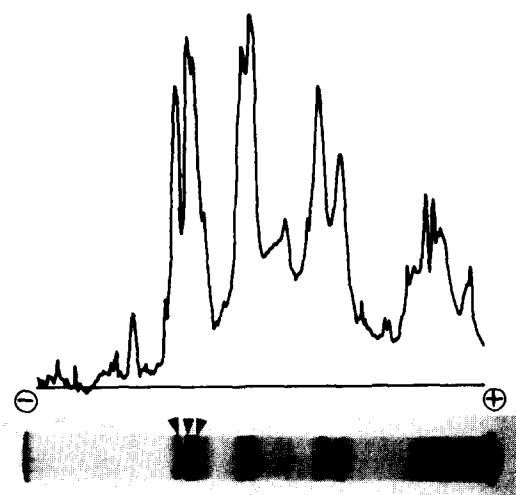


Fig. 4. SDS électrophorèse. L'enzyme purifiée (20 µg protéines) est soumise à électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7.5% acrylamide) avec 0.1% SDS (matériel et méthodes). Coloration par le bleu de Coomassie. Cathode et dépôt à gauche. (—) Densitogramme à 580 nm du gel. (►) Histidine décarboxylase.

téines de poids moléculaires voisins de 35 000, 62 000, 85 000 et 130 000.

Détermination du poids moléculaire de l'enzyme. Par filtration sur gel comparativement à des protéines standards le poids moléculaire de la forme native de l'enzyme purifiée est $94\ 000 \pm 4000$ (3 déterminations), l'enzyme est élueée sous forme d'un pic unique.

Electrofocalisation. L'extrait de départ est un mélange complexe de protéines qui focalisent dans tout le gradient de pH 3.5—9.5 (Fig. 5). Après l'élimination des protéines étrangères, au dernier stade de la purification l'enzyme est constituée de nombreuses bandes protéiques, 13 d'intensités variables, qui focalisent entre pH 5 et 6.25.

L'activité enzymatique est localisée sensiblement dans toute la zone protéique; elle apparaît sous forme de 3 pics distincts qui correspondent aux bandes de protéines et à leur intensité (Fig. 6). Le premier pic a son maximum à pH 5.4, le second d'intensité légèrement plus faible à pH 5.75, le troisième d'intensité la plus faible à pH 6. L'électrofocalisation dans une gamme de pH plus réduite que 3.5—9.5 n'améliore pas la résolution car les bandes sont plus espacées mais plus diffuses.

Spectres de l'enzyme. Le spectre dans 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) présente un pic d'absorption à 280 nm, un deuxième pic à 410 nm et un épaulement à 325 nm ($A_{280}/A_{410} = 15/1$). L'absorption à 410 nm confirme la présence de pyridoxal phosphate comme coenzyme dont la fonction aldéhyde forme une liaison avec un groupement aminé de la protéine. Le coenzyme est solidement fixé à l'apoenzyme car le spectre est indépendant du pH entre 6 et

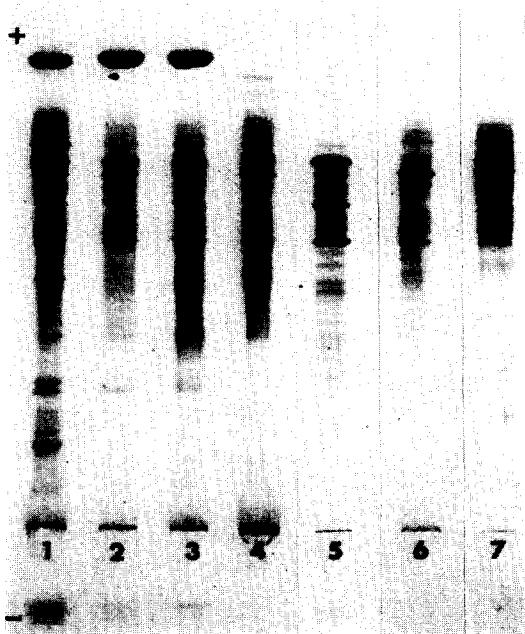


Fig. 5. Electrofocalisation sur ampholines polyacrylamide gel plate LKB pH 3.5—9.5 des étapes de purification. Dépôt: 60 μ g protéines près de la cathode (en bas). Révélation des protéines par le bleu de Coomassie. 1 = surnageant 50 000 \times g. 2 = 0—43% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 3 = 27—40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 4 = DEAE-Sephadex A-50 dialysé concentré. 5 = pic 1.6 = électrofocalisation préparative. 7 = Ultrogel AcA 44.

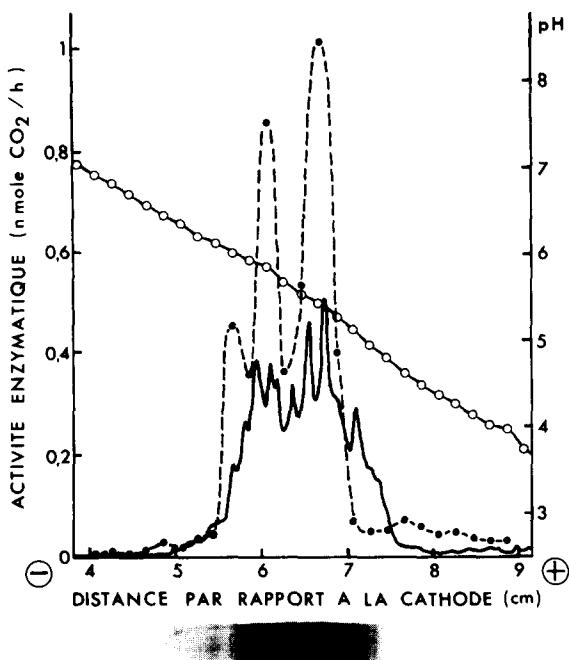


Fig. 6. Electrofocalisation analytique de l'enzyme purifiée. L'enzyme est dialysée et concentrée, 280 μ g sont déposés sur ampholines polyacrylamide gel plate LKB pH 3.5—9.5. (○—○—○) Gradient de pH. (—) Densitométrie à 580 nm de l'enzyme focalisée (coloration au bleu de Coomassie). (●—●—●) Activité histidine décarboxylase pour des sections de gel de 2 mm de large entre l'anode (à droite) et la cathode.

9.5. L'addition de 10 mM histidine augmente légèrement les absorptions à 280 nm et 325 nm comme lors de la formation du complexe entre pyridoxal phosphate et histidine [34]; la liaison entre l'apoenzyme et le coenzyme serait ainsi remplacée par une liaison entre le coenzyme et le substrat.

La résolution en apoenzyme et coenzyme par dialyse pendant 3 jours contre 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) contenant 1 mM EDTA 1 mM mercaptoéthanol puis pendant 40 h contre 5 mM tampon phosphate (pH 6.8) contenant 5 mM semi-carbazide conduit dans les deux cas à une activité résiduelle qui représente 7% de l'activité initiale; l'addition de 20 μ M pyridoxal phosphate restaure 90% de cette activité [35] mais des concentrations supérieures à 100 μ M provoquent une inhibition. Le spectre de l'enzyme après ces dialyses reste inchangé; un phénomène analogue est observé avec l'arginine décarboxylase [36].

Stabilité de l'enzyme. A 4°C et -20°C l'instabilité de l'enzyme en solution a nécessité l'addition au tampon d'extraction de 10 mM EDTA, 10 μ M pyridoxal phosphate, 1 mM mercaptoéthanol. Dans un tel milieu à pH 6.8 le surnageant de départ (5 mg protéines/ml) conserve 60—70% d'activité à 4°C et 100% d'activité à -20°C après 1 mois. Ajouté séparément au milieu EDTA, pyridoxal phosphate ou mercaptoéthanol à un pouvoir stabilisateur faible. L'extrait final purifié (40 μ g protéines/ml) dans 50 mM tampon phosphate (pH 6.8) contenant 10 μ M pyridoxal phosphate a une stabilité identique à 4°C ou -20°C et conserve 75—85% d'activité après 12 jours.

A 4°C et à forte force ionique l'enzyme perd rapidement son activité, elle est plus stable dans 50 mM tampon phosphate. La perte d'activité est également plus importante en présence de NaCl qu'avec le tampon phosphate.

Aux pH inférieurs à 6 la dénaturation de l'enzyme est rapide (90% de perte d'activité en 24 h à 4°C); autour du pH optimum la stabilité est bonne et à pH 6.8 elle conserve 90% d'activité après 6 jours à 4°C.

Les agents réducteurs 1 mM mercaptoéthanol ou glutathion, sans effet sur l'activité enzymatique, deviennent inhibiteurs pour des concentrations supérieures à 1 mM; 10 mM cystéine provoque une inhibition totale. La dégradation de l'enzyme peut intervenir par clivage de ponts disulfures.

Discussion

L'histidine décarboxylase de la muqueuse gastrique de rat est obtenue purifiée environ 600 fois par rapport à l'homogénat avec un rendement de 30%. La DOPA décarboxylase, enzyme non spécifique pouvant décarboxyler l'histidine est absente de nos préparations enrichies. Bien que le pyridoxal phosphate protège l'enzyme contre la dénaturation par la chaleur, ce procédé de purification employé par Aurès et al. [7] n'a pas été retenu car il place l'enzyme dans des conditions trop dénaturantes pour un faible taux de purification. C'est également le cas pour la précipitation acide [16]. La chromatographie d'affinité, plus spécifique que la chromatographie hydrophobe [37], mettant à profit l'interaction apoenzyme coenzyme selon la technique de Ryan et al. [38] n'a pas permis un enrichissement appréciable de l'enzyme.

Le degré de purification élevé est atteint grâce à la séparation des protéines selon le critère des différences de points isoélectriques. Parmi les techniques d'électrofocalisation préparative [25,26,39] celle sur gel Sephadex en couche mince est préférée surtout pour sa rapidité. Une perte d'activité de l'enzyme pouvant intervenir par suite d'une exposition prolongée à des pH défavorables, la durée d'électrofocalisation a été éduite à 7 h sans affecter la résolution; une bonne linéarité du gradient de pH est obtenue avec un voltage initial faible et une puissance maximum de 11 W. Dans un gradient de pH 5—7.5 l'enzyme focalise sous forme de 2 pics mal séparés, ce qui laisse supposer l'existence de plusieurs formes, mais l'enrichissement de la préparation n'est pas amélioré. De même une nouvelle électrofocalisation en gradient de pH 3.5—9.5 ou 5—7.5 n'augmente pas l'activité spécifique du fait de l'instabilité de l'enzyme. Un fractionnement supplémentaire est néanmoins réalisé, par une méthode moins dénaturante pour cette enzyme que l'électrofocalisation, selon le critère des différences de poids moléculaires des protéines.

Le coenzyme, indispensable à l'activité enzymatique, est le pyridoxal phosphate; comme c'est le cas avec d'autres enzymes pyridoxal phosphate dépendantes [17] une partie du coenzyme serait très fortement liée à l'apoenzyme tandis qu'une autre partie plus labile serait éliminée par dialyse.

La préparation purifiée d'histidine décarboxylase gastrique, apparemment homogène après électrophorèse et filtration sur gel, est en fait hétérogène après SDS électrophorèse et électrofocalisation analytique. Cette dernière méthode permet d'identifier 3 formes actives de l'enzyme distinctes par leur point isoélectrique: 5.4, 5.75 et 6. Les faibles activités récupérées et l'instabilité de

l'enzyme soumise à une nouvelle électrofocalisation ne permettent pas de cette façon une meilleure caractérisation.

La présence de ces trois formes n'est pas un artefact de manipulation. En effet l'élution de la chromatographie d'échange d'ions révèle déjà leur existence avec une courbe d'activité qui présente deux maxima. Le stockage des tissus ou leur altération sous forme congelée est hors de cause puisque ces résultats sont obtenus aussi bien avec des tissus frais que congelés depuis plusieurs semaines. Après électrophorèse il apparaît un seul pic large d'activité enzymatique car les diverses formes ont alors des charges voisines donc des mobilités peu différentes. Le poids moléculaire de l'enzyme native est voisin de 94 000, ainsi une forme n'est pas le polymère d'une autre. Toutefois si les trois formes ont des poids moléculaires distincts, mais proches de cette valeur, leur séparation après filtration sur gel n'est pas permise. La mobilité électrophorétique étant fonction à la fois de la charge et du poids moléculaire, il n'est pas surprenant de ce fait que la résolution ne soit pas meilleure après électrophorèse. Les trois formes de l'enzyme sont encore identifiables après SDS électrophorèse: leur poids moléculaire 97 000, 93 000, 90 000, est en accord avec la valeur trouvée après filtration sur gel. Ces formes ne sont pas dissociables en sous unités car aucune bande correspondante de poids moléculaire sous multiple n'est décelable. Les autres bandes, de poids moléculaires inférieurs aux précédents, sont attribuées à des contaminants protéiques dissociés ou non en sous unités sous l'influence du SDS. Ces protéines, dont à l'état natif les points isoélectriques et poids moléculaires sont voisins de ceux de l'histidine décarboxylase, sont présentes dans la préparation purifiée. L'homogénéité de cette préparation n'est donc pas aussi parfaite que l'électrophorèse simple le laisse supposer. Une justification est apportée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide à gradient 4—30% effectuée selon la technique Pharmacia (résultats non publiés). Les protéines se répartissent suivant leur poids moléculaire: en plus des bandes caractéristiques de l'enzyme il apparaît d'autres protéines dont les poids moléculaires correspondent à des multiples de ceux trouvés après SDS électrophorèse. En définitive l'histidine décarboxylase purifiée de la muqueuse gastrique se présente sous plusieurs formes: les trois formes actives sont caractérisées par des points isoélectriques et des poids moléculaires différents. Leur isolement et leur purification encore plus spécifique par chromatographie d'affinité est à l'étude.

Résumé

L'histidine décarboxylase de la muqueuse gastrique de rat est obtenue hautement purifiée, avec un bon rendement (purification 600 fois). La purification est réalisée par double fractionnement au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, chromatographie d'échange d'ions, électrofocalisation préparative sur gel Sephadex, et filtration sur gel. Seule l'enzyme spécifique de l'histidine est isolée; la DOPA décarboxylase, enzyme non spécifique, est absente de nos préparations. La purification est suivie par électrophorèse et électrofocalisation analytique sur gel de polyacrylamide. L'enzyme purifiée apparaît homogène après électrophorèse et filtration sur gel, son poids moléculaire est estimé à 94 000. L'électrofocalisation révèle que l'enzyme est en fait constituée de nombreuses bandes protéiques et que l'activité est localisée en 3 pics. L'histidine décarboxylase gastrique est

composée de 3 formes actives caractérisées par leurs points isoélectriques: 5,4, 5,75 et 6; leurs poids moléculaires 97 000, 93 000, 90 000 sont distincts après SDS électrophorèse, il n'est pas observé de sous unité. Le coenzyme est le pyridoxal phosphate et la résolution de l'holoenzyme révèle qu'une partie du pyridoxal phosphate reste fortement liée à l'apoenzyme. L'enzyme présente une relative stabilité à faible force ionique et pH neutre; les agents réducteurs à forte concentration inhibent l'enzyme.

References

- 1 Håkanson, R. (1967) *Eur. J. Pharmacol.* 1, 34-41
- 2 Håkanson, R. (1967) *Eur. J. Pharmacol.* 1, 42-46
- 3 Schwartz, J.C., Lampart, C. et Rose, C. (1970) *J. Neurochem.* 17, 1527-1534
- 4 Aurès, D., Davidson, W.D. et Håkanson, R. (1969) *Eur. J. Pharmacol.* 8, 100-107
- 5 Håkanson, R. et Owman, C. (1966) *Biochem. Pharmacol.* 15, 489-499
- 6 Lévine, R.J. et Watts, D.E. (1966) *Biochem. Pharmacol.* 15, 841-849
- 7 Aurès, D., Håkanson, R. et Schauer, A. (1968) *Eur. J. Pharmacol.* 3, 217-234
- 8 Leinweber, F.J. et Braun, G.A. (1970) *Mol. Pharmacol.* 6, 146-155
- 9 Ellenbogen, L. et Engel, R.H. (1971) *J. Pharm. Pharmacol.* 23, 634-636
- 10 Lorenz, W., Halbach, St., Gerant, M. et Werle, E. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18, 2625-2637
- 11 Noll, W.W. et Lévine, R.J. (1970) *Biochem. Pharmacol.* 19, 1043-1053
- 12 Håkanson, R. (1970) *Acta Physiol. Scand., Suppl.* 340, 77-134
- 13 Maudsley, D.V., Kobayashi, Y., Bovaird, L. et Zeidel, M. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 2963-2967
- 14 Håkanson, R., Hedenbro, J., Liedberg, G., Rehfeld, J.F. et Stadil, F. (1975) *Br. J. Pharmac.* 53, 127-130
- 15 Henman, F.D. (1975) *Digestion* 12, 157-178
- 16 Aurès, D. et Håkanson, R. (1971) dans *Methods in Enzymology* (Tabor, H. and Tabor, C.W., eds.), Vol. 17 B, pp. 667-677, Academic Press, New York
- 17 Christenson, J.G., Dairman, W. et Udenfriend, S. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 356-367
- 18 Corgier, M. et Pachéco, H. (1975) *Biochimie* 57, 1005-1017
- 19 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 20 Jacobs, E. et Jacobs, M. (1956) *J. Biol. Chem.* 223, 147-156
- 21 Ornstein, L. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-349
- 22 Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- 23 Bloemendal, H. (1967) dans *Electrophoresis* (Bier, M., ed.), Vol. 2, pp. 379-421, Academic Press, New York
- 24 Weber, K. et Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- 25 Radola, B.J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 295, 412-428
- 26 Radola, B.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 386, 181-195
- 27 Winter, A., Perlmutter, H. et Davies, H. (1975) application Note LKB No. 198, LKB Produkter AB, Sweden
- 28 Karlsson, C., Davies, H., Öhman, J. et Andersson, V.B. (1973) Application Note LKB No. 75, LKB Produkter AB, Sweden
- 29 Westerberg, O. (1973) *Sci. Tools* 20, 22-28
- 30 Vesterberg, O. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 257, 11-19
- 31 Righetti, P.G. et Caravaggio, T. (1976) *J. Chromatogr.* 127, 1-28
- 32 Håkanson, R. et Liedberg, G. (1971) *Experientia* 27, 1279-1280
- 33 Green, A. et Hughes, W. (1955) dans *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. et Kaplan, N.O., eds.), Vol. 1, pp. 67-90, Academic Press, New York
- 34 Kierska, D. et Mäslinski, Cz. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 1951-1959
- 35 Håkanson, R. (1967) *Eur. J. Pharmacol.* 1, 383-390
- 36 Blethen, S.L., Boeker, E.A. et Snell, E.E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1671-1677
- 37 Hammar, L., Pahlman, S. et Hjerten, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 403, 554-562
- 38 Ryan, E. et Fottrell, P.F. (1972) *FEBS Lett.* 23, 73-76
- 39 Righetti, P.G. et Drysdale, J.W. (1974) *J. Chromatogr.* 98, 271-321