

PROPRIETES CINETIQUES DE LA DOPAMINE- β -HYDROXYLASE MEMBRANAIRE

Maria Teresa MIRAS PORTUGAL, Antonio JORDA et Angel SANTOS RUIZ

Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Ciudad Universitaria, Madrid 3, Espagne

Received 13 October 1976

Revised version received 18 November 1976

SUMMARY

We studied membrane bound dopamine- β -hydroxylase (DBH) from chromaffin granules, in order to determine whether a biological form of immobilization of the enzyme altered its kinetic properties. The results obtained suggested that DBH either in soluble or solubilized form showed a ping-pong mechanism whereas the membrane bound DBH did not. Affinity for the substrate and the pH stability were lower in soluble or solubilized form than in membrane bound DBH.

1. Introduction

La dopamine- β -hydroxylase (-3,4 dihydroxy-phényléthylamine, ascorbate: O₂ oxydoréductase (β -hydroxylation) EC 1.14.17.1.) (DBH) catalyse la dernière étape de la synthèse de la noradrénaline par hydroxylation de la dopamine [1]. L'enzyme est localisée au niveau des granules chromaffines des cellules de la médullo-surrénale [2], des terminaisons synaptiques périphériques [3] et des terminaisons des neurones noradrénergiques centraux [4]. Dans ces organelles de stockage la DBH peut être soit soluble dans le liquide matriciel, soit liée aux membranes. Les granules chromaffines de bovidés contiennent respectivement 60% d'enzyme soluble et 40% d'enzyme liée aux membranes. En ce qui concerne les vésicules synaptiques ce pourcentage est plus difficile à établir [3].

Les études réalisées jusqu'à présent sur les mécanismes de cette réaction d'hydroxylation de la tyramine (la dopamine est peu employée comme substrat car elle s'oxyde très rapidement) par la DBH ont été effectuées avec l'enzyme de la fraction soluble des

granules chromaffines [5,6] et aussi avec l'enzyme soluble présente dans le sérum [7]. Un mécanisme ping-pong a été démontré pour ces enzymes solubles, ainsi qu'une étroite dépendance de l'activité à l'égard du pH [8,9].

Par contre l'enzyme dite membranaire n'a pas été étudiée jusqu'à présent et son étude peut contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme de synthèse de la noradrénaline et de l'adrénaline.

2. Matériel et méthodes

L'obtention des granules chromaffines a été réalisée selon la méthode précédemment décrite [6]. Dans les granules chromaffines deux parties peuvent être distinguées, la partie soluble (matrice) et la partie insoluble (membranes), séparables après lyse hypotonique des granules et centrifugation à 100 000 \times g. A partir de la fraction soluble, la DBH soluble est purifiée par la méthode utilisant de la Concanavalline A couplée au Sepharose (Pharmacia) [10]. La fraction membranaire brute est la source de l'enzyme membranaire. Pour obtenir la DBH solubilisée, on traite l'enzyme membranaire avec du Triton 0.1% v/v; après centrifugation à 100 000 \times g pendant une heure la DBH solubilisée se retrouve dans le surnageant.

Toute la correspondance doit être adressée à: Dr M. T. Miras Portugal, Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Madrid 3, Espagne

L'activité DBH est déterminée suivant la technique spectrophotométrique de Pisano et coll. [11], avec la tyramine (Sigma) comme substrat.

Pour les études sur l'action du pH, un tampon acétate 0.5 M et un tampon phosphate 0.2 M ont été utilisés. Pour chaque expérience le pH du mélange réactionnel a été contrôlé.

Les constantes de Michaelis (K_m) et les vitesses maximales (V) ont été déterminées selon Lineweaver-Burk [12], avec le programme Wilkinson [13] sur une Olivetti P-602.

3. Resultats

3.1. Effets du pH

La DBH membranaire présente un K_m pour la

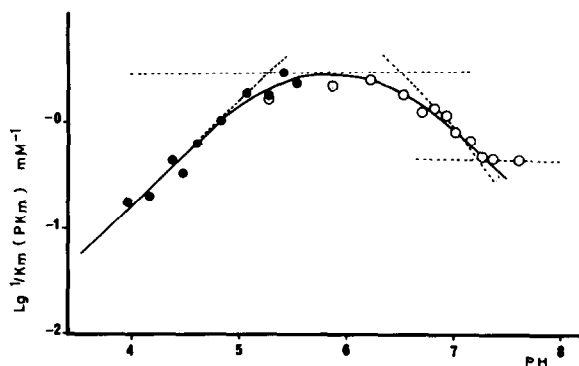


Fig. 1. Effet du pH sur la K_m de la dopamine- β -hydroxylase membranaire des granules chromaffines, avec la tyramine comme substrat variable. La détermination a été réalisée en 0.5 M de tampon acétate (cercles noirs) et 0.2 M de tampon phosphate (cercles blancs).

tyramine dépendante du pH (fig. 1), V (fig. 2B) et la vitesse à non saturation (fig. 2A) sont aussi dépendantes du pH. La théorie des pH développée par Dixon [14] nous a permis déterminer les valeurs des pK_a et pK_b des groupes ionisables au niveau du site actif (Tableau 1). La gamme de pH utilisée permet peut-être de négliger les effets du pH sur l'ionisation des substrats ascorbate et tyramine. Le changement de pente des tangentes qui encadrent les courbes de pH nous indique non seulement les pK des groupes ionisables, mais aussi le nombre de ces groupements. Il y a pourtant un seul groupe ionisable pour chaque pK , car la pente varie d'une seule unité à la fois.

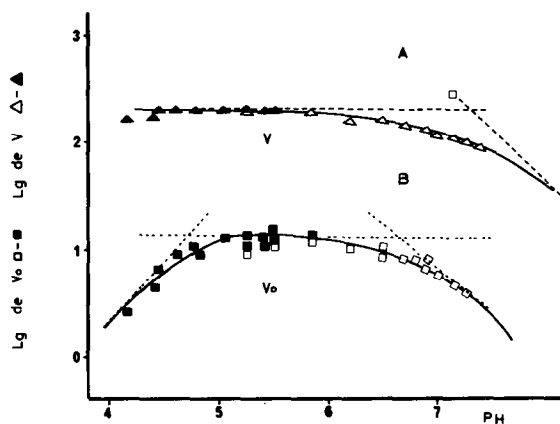


Fig. 2. Effet du pH sur la vitesse maximale (V) et (B) effet du pH sur la vitesse initiale à non saturation en tyramine (V_o , à 0.5 mM en tyramine). Le tampon acétate à une concentration de 0.5 M (triangles et carreaux noirs), le tampon phosphate 0.2 M (triangles et carreaux blancs).

Tableau 1
Valeurs de pK obtenues de la représentation de pK_m , \log de V et \log de V_o en fonction du pH

Courbe	pK de l'enzyme libre		pK du complexe enzyme-substrat	
	E. soluble ^a	E. membranaire	E. soluble ^a	E. membranaire
pK_m	5.4 6.2	5.2 6.5	6.6	7.2
$\log V$			6.6	7.3
$\log V_o$		4.75 6.6		7.3

^a de la référence [8]

3.2. Détermination du mécanisme enzymatique de la réaction et des K_m vrais

La détermination du mécanisme enzymatique de la DBH membranaire et de la DBH solubilisée au Triton 0.1% a été réalisée par la méthode cinétique de Cleland [15]. Les résultats obtenus pour l'enzyme membranaire sont représentés dans la fig.3. Cette enzyme contrairement à l'enzyme soluble et à l'enzyme solubilisée au Triton, présente un mécanisme qui n'est pas du type ping-pong, mais nous ne pouvons pas préciser si ce mécanisme est du type ordonné, ou bien au hasard. A partir des V_m apparentes pour la tyramine et pour l'ascorbate obtenues à partir des données représentées dans la fig.3 nous avons obtenu les K_m vraies, K_a et K_t , pour l'ascorbate et pour la tyramine (fig.4), qui sont résumées dans le tableau 2.

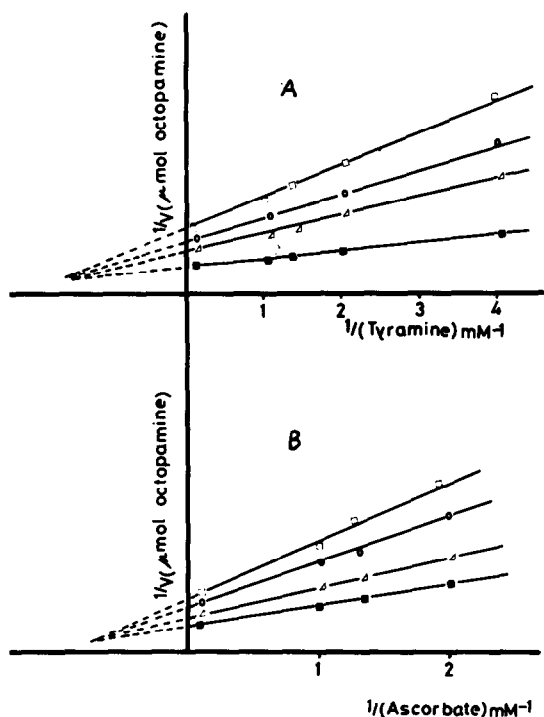


Fig.3. Représentation selon Lineweaver-Burk de l'activité de la dopamine- β -hydroxylase membranaire. (A) Etude de la vitesse initiale avec tyramine comme substrat variable, à des concentrations d'ascorbate de (□ - □) 0.5 mM, (○ - ○) 0.75 mM, (Δ - Δ) 1 mM, (■ - ■) 10 mM. (B) Etude de la vitesse initiale avec l'ascorbate comme substrat variable, à des concentrations de tyramine de (□ - □) 0.25 mM, (○ - ○) 0.5 mM, (Δ - Δ) 1 mM (■ - ■) 10 mM.

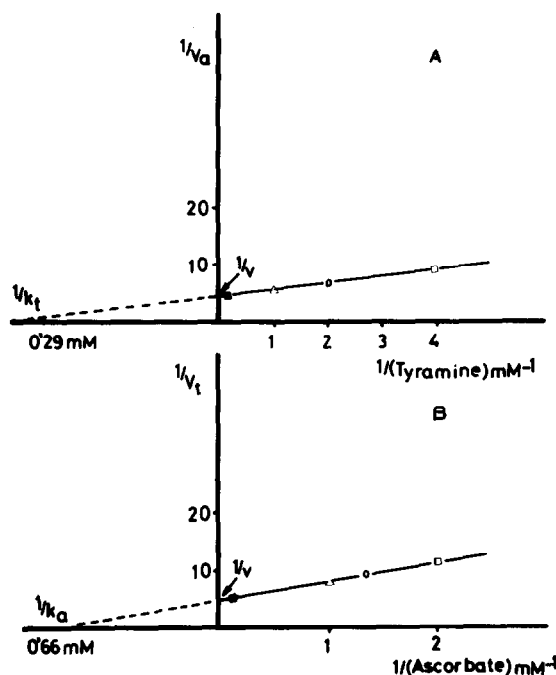


Fig.4. Détermination des constantes de Michaelis vraies de la dopamine- β -hydroxylase membranaire pour la tyramine et pour l'ascorbate. Les inverses des vitesses maximales d'un substrat ($1/V_a$, ascorbate; $1/V_t$, tyramine) obtenues de la fig.3 ont été représentées en fonction de l'inverse de concentration pour l'autre substrat.

4. Discussion

Le but de cette étude était de déterminer si les propriétés d'une enzyme immobilisée dans les membranes des granules chromaffines sont les mêmes que celles de l'enzyme soluble ou de l'enzyme rendue soluble par le Triton 0.1%.

Les groupements ionisables présents au niveau du site actif de l'enzyme libre, avec des pK_a de 5.2 et de 6.5 sont très proches des pK_a pour l'enzyme soluble [8]; il est possible qu'ils appartiennent à un groupement carboxylique et à un noyau imidazole, comme cela démontré pour l'enzyme soluble [6,9]. Cependant le groupement impliqué surtout dans le processus même de l'hydroxylation (courbe $\lg(V) = f(\text{pH})$), présente un pK_b très différent, 7.3 alors que celui mesuré pour l'enzyme soluble est de 6.6. L'enzyme membranaire à pH 7.0 présente une activité qui est la moitié de celle à pH 5.0; dans le cas de l'enzyme soluble

Tableau 2
Constantes de Michaelis vraies, et mécanisme d'action de la dopamine- β -hydroxylase des granules chromaffines

	Enzyme soluble ^a	Enzyme solubilisée	Enzyme membranaire
K_t	2 mM	1 mM	0.29 mM
K_a	1 mM	2.6 mM	0.66 mM
Mécanisme de la réaction	ping-pong	ping-pong	non ping-pong

^aValeurs de la référence [6]

Toutes les valeurs de K_m ont été déterminées au même pH (pH 5.0).

cette activité est dix fois moindre [8], d'où l'intérêt de l'enzyme membranaire dans des conditions de pH physiologiques.

Les études cinétiques effectuées sur la dopamine- β -hydroxylase membranaire ont montré que cette enzyme ne présente pas un mécanisme ping-pong contrairement à l'enzyme soluble et à l'enzyme solubilisée au Triton 0.1%. La dopamine- β -hydroxylase membranaire pouvait alors présenter un mécanisme similaire à celui d'autres hydroxylases membranaires [16]. Il faut souligner à ce propos que dans la membrane des granules chromaffines il existe une micro-chaine de transport électronique [17,18], mais pour l'instant nos expériences de substitution de l'acide ascorbique par un autre cofacteur tel que NADH ou NADPH, employées dans d'autres réactions d'hydroxylation microsomaux, ont été infructueuses.

Du point de vue physiologique le fait que l'affinité pour la tyramine et pour l'ascorbate soit nettement supérieure dans le cas de l'enzyme membranaire par rapport à l'enzyme soluble ou à l'enzyme solubilisée au Triton, indique que cette enzyme jouerait un rôle plus important du point de vue physiologique que celui de l'enzyme soluble dans la synthèse de la noradrénaline et de l'adrénaline.

References

- [1] Friedman, S. and Kaufman, S. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4763–4773.
- [2] Viveros, O. H., Arqueros, L. and Kirshner, N. (1968) *Life Sci.* 7, 609–618.
- [3] Klein, R. L. and Thureson-Klein, A. K. (1974) *Fed. Proceed.* 33, 2195–2206.
- [4] Hartman, B. K. and Udenfriend, S. (1972) *Pharmacol. Rev.* 24, 311–330.
- [5] Goldstein, M., Joh, T. H. and Gravey, T. Q. (1968) *Biochemistry* 7, 2724–2730.
- [6] Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. and Mandel, P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 327, 313–327.
- [7] Miras-Portugal, M. T., Aunis, D. and Mandel, P. (1975) *Biochimie* 57, 669–675.
- [8] Miras-Portugal, M. T., Aunis, D. and Mandel, P. (1973) *FEBS Lett.* 34, 140–142.
- [9] Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. and Mandel, P. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 1192–1199.
- [10] Aunis, D., Miras-Portugal, M. T. and Mandel, P. (1975) *J. Neurochem.* 24, 425–431.
- [11] Pisano, J. J., Creveling, C. R. and Udenfriend, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 43, 566–568.
- [12] Lineweaver, H. and Burk, D. L. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658–666.
- [13] Wilkinson, G. N. (1961) *Biochem. J.* 80, 324–332.
- [14] Dixon, D. (1953) *Biochem. J.* 55, 161–170.
- [15] Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104–137.
- [16] Gunsalus, T. C., Pederson, T. C. and Sligar, S. G. (1975) *Ann. Revicw. Biochem.* 44, 377–407.
- [17] Flatmark, T., Terland, O. and Helle, K. B. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 226, 9–19.
- [18] Silsand, T. and Flatmark, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 395, 257–266.