

ISOLEMENT D'UN NOUVEAU CETO-ACIDE, PRODUIT A PARTIR DE ϵ -N-TRIMETHYLLYSINE PAR *NEUROSPORA CRASSA*

Victor Raul VILLANUEVA and Edgar LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles. C.N.R.S., Gif sur Yvette, France

Received 4 February 1975

Summary

A new ϵ -N-trimethyllysine metabolite has been isolated from the mycelium of *Neurospora crassa*. The labelled compound produced from incubations in vivo and in vitro from ϵ -N-trimethyl ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)L-lysine has been identified as 2-keto- ϵ -N-trimethylhexanoic acid by reducing its 2,4-dinitrophenyl hydrazone back to ϵ -N-trimethyllysine by hydrogenolysis in a Parr bomb. Analyses on TLC and in four different ion exchange chromatographic systems show the appearance of a ninhydrin positive product having the same R_f and the same retention time as ϵ -N-trimethyllysine; it contains more than 85% of the radioactivity of the 2,4-dinitrophenylhydrazone of the keto acid.

1. Introduction

La présence de lysines ϵ -N-méthylées dans différents organismes, tant à l'état libre que faisant partie de protéines est connue [1-8]. Récemment nous les avons identifiées à l'état libre dans le mycélium de *Neurospora crassa* [9].

Broquist et al. [10-12] ainsi que Cox et al. [13,14] ont démontré le rôle de la ϵ -N-triméthyllysine (ϵ -Me₃Lys) (1) comme précurseur de la carnitine (4) par l'intermédiaire de la butyrobétaïne (3). Il semble que ce soient les deux seuls produits naturels dérivés de la ϵ -Me₃Lys signalés jusqu'à présent.

Nous rapportons ici l'isolement d'un nouveau ceto-acide, contenu dans le mycélium de *Neurospora crassa* formé par désamination de la ϵ -Me₃Lys; nous proposons pour cette substance la structure de l'acide α -ceto- ϵ -N-triméthyl hexanoïque. (2)

2. Matériaux et méthodes

ϵ -Me₃L-Lys et ϵ -Me₃ ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)L-Lys ont été synthétisées comme décrit par Cox et al. [13] à

Abbreviations: ϵ Me₃Lys: ϵ -N-triméthyllysine.

partir de l' α -N-acetyl L-lysine (Calbiochem). ICH₃-[¹⁴C] a été obtenu du CEA, Saclay. La pureté radiochimique de la ϵ -Me ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)Lys a été vérifiée par chromatographie sur couche mince de SiO₂ et Al₂O₃, solvant: butanol-méthanol-ammoniaque concentré (1:1:3) et par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions sur un appareil Beckmann Uni-chrom.

Neurospora crassa, lysine auxotrophe, FGSC 33933, a été cultivée comme décrit précédemment [9] mais avec un milieu 0.2 mM en ϵ -Me₃ ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)L-Lys. Le mycélium récupéré par filtration a été extrait soit au soxhlet par l'éthanol à 90°C soit par l'acide perchlorique à 6% suivi de passage de l'extrait neutralisé sur une colonne d'échangeurs anionique; l'élut contenant les bases quaternaires, qui ne sont pas retenues par la colonne [13] de même que les extraits éthanoliques ont été analysés par chromatographie automatique sur échangeurs d'ions, dans différentes conditions.

Les systèmes de chromatographie automatique sur échangeurs d'ions utilisés ont été les suivants:

1) Résine Beckmann M-71, colonne 9 X 0.9 cm, tampon citrate de sodium 0.35 M, pH 5.18 débit 70 ml/hr à 52°C.

2) Résine Beckmann M-72 colonne 54 X 0.9 cm,

deux tampons: A) citrate de sodium 0.2 N pH 3.05 pendant les premières 90 minutes, B) citrate de sodium 0.8 N pH 3.95 ensuite; débit 70 ml/hr à 54°C.

3) Résine Spinco A-15; colonne $8,1 \times 0,9$ cm, tampon citrate de sodium 0,35 N pH 5,80; débit 56 ml/hr à 56°C.

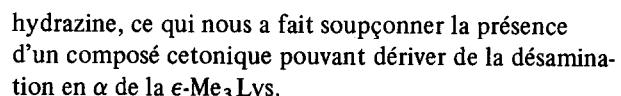
4) Résine Spinco 50 A; colonne 51 X 0,9 cm; tampon citrate de sodium 0,38 N, pH 7,02; débit 36 ml/hr à 32°C pendant les premières 3 heures et 56°C ensuite.

Les mesures de radioactivité ont été effectuées sur un appareil Nuclear Chicago Mark 1 à l'aide de la solution scintillante de Bray [15].

3. Résultats et discussion

Les résultats des analyses des extraits de *Neurospora crassa* cultivée en présence de ϵMe_3 ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)Lys montrent toujours trois pics radioactifs principaux: un produit a) à peine retenu par l'échangeur d'ions, un deuxième b) correspondant à la zone des témoins de la butyrobétaire et de la carnitine et le troisième c) au niveau ce la $\epsilon\text{-N}$ -triméthylllysine. La figure 1 montre à titre d'exemple les analyses obtenues avec une colonne de résine Beckmann M-71.

Le produit radioactif (a) passant en tête de colonne a donné un test positif avec la 2,4-dinitrophenyl-



Afin de corroborer notre hypothèse, nous avons entrepris l'isolement de ce produit radioactif par chromatographie sur échangeur d'ions. Après l'avoir dessalé et amené à sec nous l'avons fait réagir *in situ* [16,17] sur une plaque d'acide silicique, avec la 2,4-dinitrophenylhydrazine; après développement de la plaque dans le système méthanol-butanol-amoniaque concentré (1:1:1), elle a été passée sous un détecteur de radioactivité (chromoscan Berthold). La radioactivité se trouve au niveau de la 2,4-dinitrophenylhydrazone formée. Celle-ci a été élue de la plaque, amenée à sec, redissoute dans un mélange méthanol-eau (2,5:0,5) et soumise à l'hydrogénolyse [18] en présence de PtO₂ à l'aide de l'appareil de Parr, à 2 bar de pression pendant 24 heures. Le produit attendu était la ϵ -Me₂Lys radioactive.

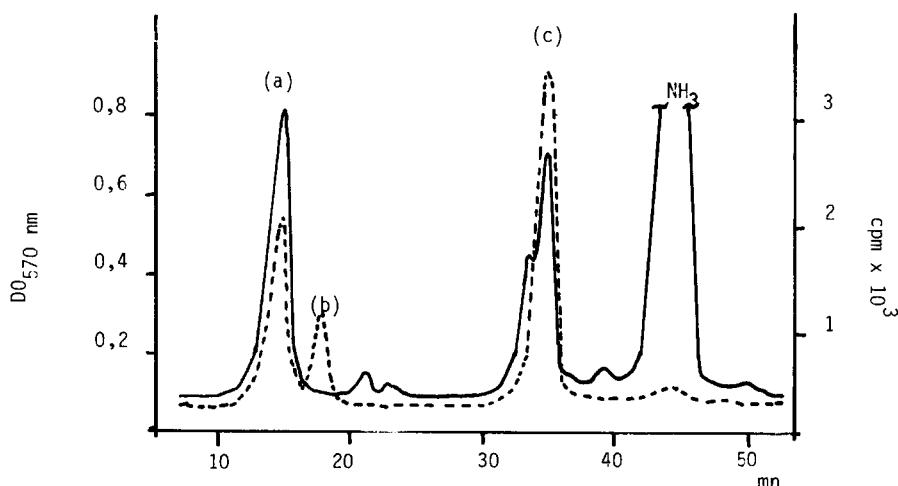
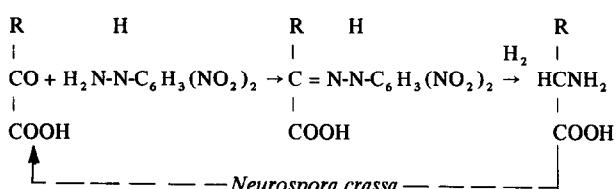
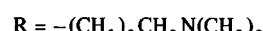


Fig. 1. Analyse de l'extrait éthanolique obtenu à partir du mycélium de *Neurospora crassa* cultivée en présence de ϵ -Me₃(¹⁴C)H₃-Lys. Appareil Beckmann 'Unichrom', colonne 9 × 0.9 cm, résine M-71, DO à 570 nm (réaction avec la ninhydrine); (---) Radio-activité.

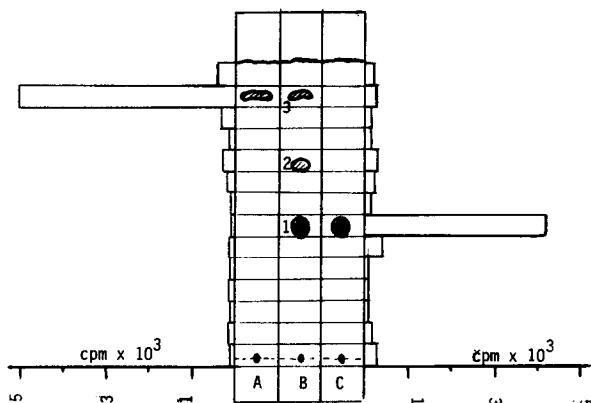


Fig.2. Histogramme de la chromatographie sur couche mince d'acide silicique. A) 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide (avant hydrogénolyse). B) Témoins de: 1) ϵ -Me₃ Lys; 2) céto-acide; 3) céto-acide sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone. C) Produit obtenu après hydrogénolyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide.

Le produit d'hydrogénolyse a été analysé par chromatographie sur couche mince d'acide silicique (méthanol:butanol:ammoniaque, 1:1:3) et par chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions (4 systèmes différents, voir matériel et méthodes).

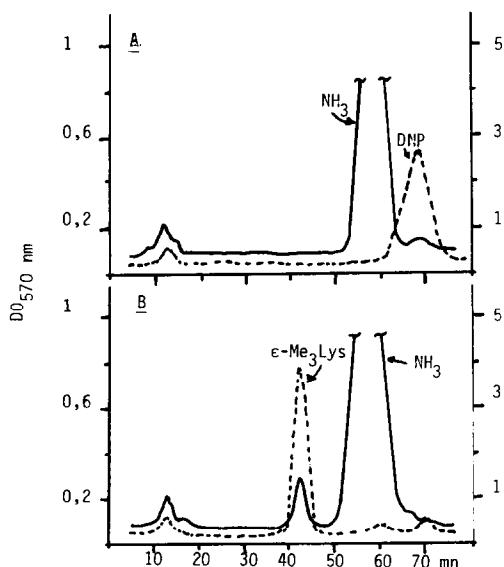


Fig.3. Analyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide. A) avant hydrogénolyse; B) après hydrogénolyse. Colonne 8,1 x 0,9 cm de résine Spinco A-15. DO à 570 nm; (- - -) Radioactivité.

Nous remarquons toujours l'apparition d'un substance réagissant avec la ninhydrine et ayant le même R_f (fig.2) et le même temps d'élution que la ϵ -Me₃ Lys authentique et qui contient plus de 85% de la radioactivité contenue dans la 2,4-dinitrophénylhydrazone avant hydrogénolyse. (voir figs. 3 et 4). L'obtention de la ϵ -N-triméthyllysine radioactive par hydrogénolyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du produit radioactif isolé prouve qu'il s'agit bien de l'acide α céto, ϵ -N triméthyl-hexanoïque.

Par ailleurs, nous avons incubé la ϵ -Me₃ ($[^{14}\text{C}]H_3$)-Lys avec un extrait acellulaire de *Neurospora crassa*, préparé par broyage du mycélium dans un mortier avec du sable. Après six heures d'incubation, la réaction a été arrêtée avec de l'acide trichloroacétique; après centrifugation le surnageant a été soumis aux mêmes analyses que celles décrites pour les expériences *in vivo*. Les résultats obtenus ont été les mêmes montrant qu'il existe bien un système enzymatique capable d'oxyder le groupe α aminé de la ϵ -Me₃ Lys pour produire le cétoacide correspondant.

Des travaux sont en cours en vue de vérifier si ce céto-acide 2 est un intermédiaire dans la biosynthèse de la carnitine à partir de la ϵ -Me₃ Lys:

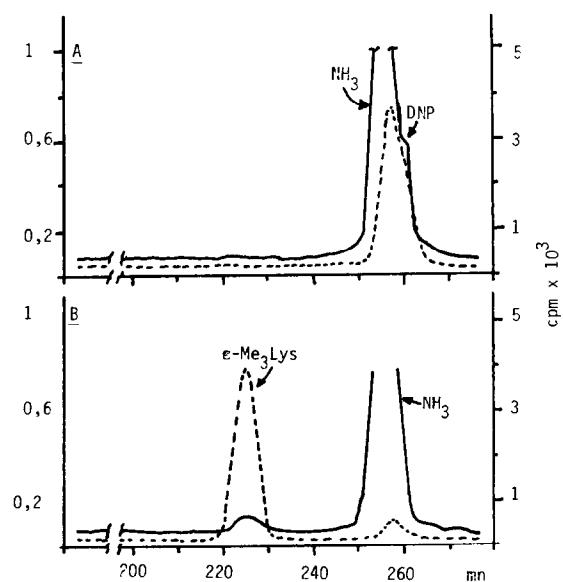
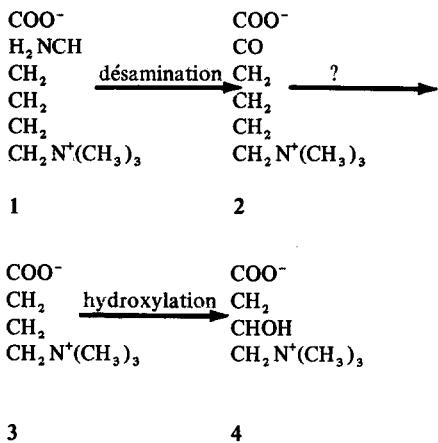


Fig.4. Analyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide. A) avant hydrogénolyse; B) après hydrogénolyse. Colonne 51 x 0,9 cm de résine spinco 50 A. DO à 570; (- - -) Radioactivité.



Remerciements

Nous remercions Mme Lê et M. Ibanez pour leur collaboration expérimentale ainsi que le Fungal Genetic Stock Center (FGSC), Dartmouth College, Hannover (USA) qui nous a généreusement envoyé la souche de *Neurospora crassa* 33933 et le Commissariat à l'Energie Atomique (C.E.A.) Saclay, pour une subvention ayant facilité l'achat de molécules marquées.

Bibliographie

- [1] Hnilica, L. S. (1967) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 7, 25-106.
- [2] Paik, W. K. et Kim, S. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27, 479-483.
- [3] Hempel, K., Lange, H. W. et Birkofe, L. (1968) *Z. Physiol. Chem.* 349, 603-607.
- [4] Glazer, A. N., De Lange, R. J. et Martinez, R. J. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, 188, 164-165.
- [5] Ambler, R. P. et Ress, M. W. (1965) *Nature*, 184, 56-57.
- [6] Huzlar, G. et Elzinga, M. (1969) *Nature*, 223, 834-835.
- [7] Kuelhl, W. M. et Adelstein, R. S. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37, 59-65.
- [8] Dayhoff, M. O., ed. (1972) *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. 5, The National Biomedical Res. Found., Silver Spring, Md.
- [9] Villanueva, V. R. et Lederer, E. (1974) *Phytochemistry*, 13, 2157-2160.
- [10] Tanphaichitr, V., Horne, D. W. et Broquist, H. P. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 6364-6366.
- [11] Horne, D. W. et Broquist, H. P. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2170-2175.
- [12] Tanphaichitr, V. et Broquist, H. P. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2176-2181.
- [13] Cox, R. A. et Hoppel, Ch. L. (1973) *Biochem. J.*, 136, 1075-1090.
- [14] Cox, R. A. et Hoppel, Ch. L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 362, 403-413.
- [15] Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, 1, 279-285.
- [16] Miller, J. M. et Kirchner, J. G. (1953) *Analytic. Chem.*, 25, 1107-1109.
- [17] Mathis, C. et Ourisson, G. (1963) *J. Chromatogr.*, 12, 94-96.
- [18] Towers, G. H. N., Thompson, J. F. et Steward, F. C. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 2392-2396.