

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 butyrobétaine (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. Matériels 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

Abréviations: ϵ Me₃Lys: ϵ -N-triméthyllysine.

partir de l' α -N-acetyl L-lysine (Calbiochem). ICH_3 - $[^{14}\text{C}]$ 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 SiO_2 et Al_2O_3 , solvant: butanol-méthanol-ammoniacque 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'éluat 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 × 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 × 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 × 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 × 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. Resultats 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 butyrobétaine et de la carnitine et le troisième c) au niveau de la ϵ -N-triméthyllysine. 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-

hydrazine, ce qui nous a fait soupçonner la présence d'un composé cétonique pouvant dériver de la désamination en α de la $\epsilon\text{-Me}_3$ Lys.

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-ammoniaque 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 PtO_2 à l'aide de l'appareil de Parr, à 2 bar de pression pendant 24 heures. Le produit attendu était la $\epsilon\text{-Me}_3$ Lys radioactive.

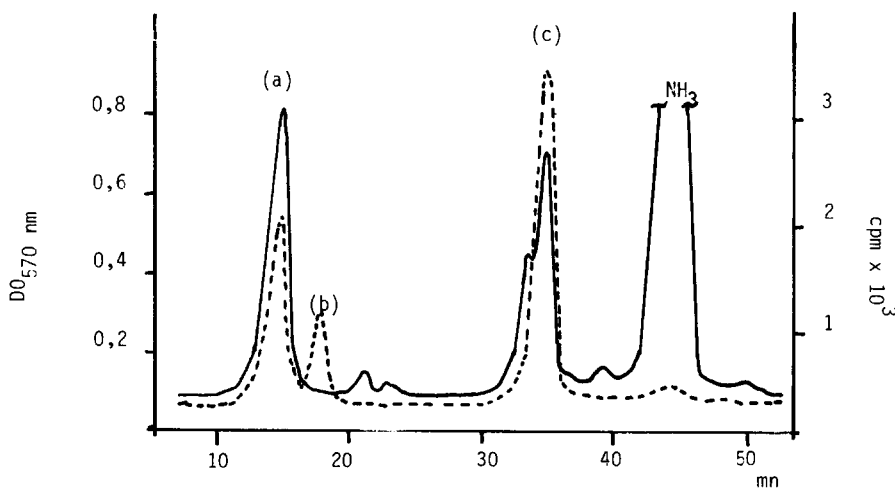
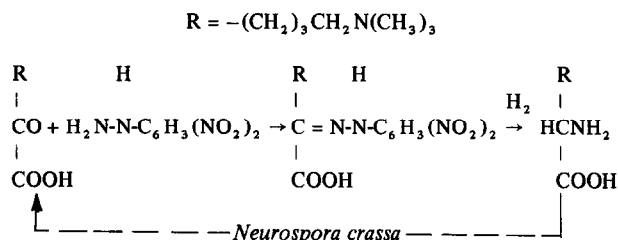


Fig.1. Analyse de l'extrait éthanolique obtenu à partir du mycélium de *Neurospora crassa* cultivée en présence de $\epsilon\text{-Me}_3$ ($[^{14}\text{C}]\text{H}_3$)Lys. Appareil Beckmann 'Unichrom', colonne 9 × 0.9 cm, résine M-71, DO à 570 nm (réaction avec la ninhydrine); (---) Radioactivité.

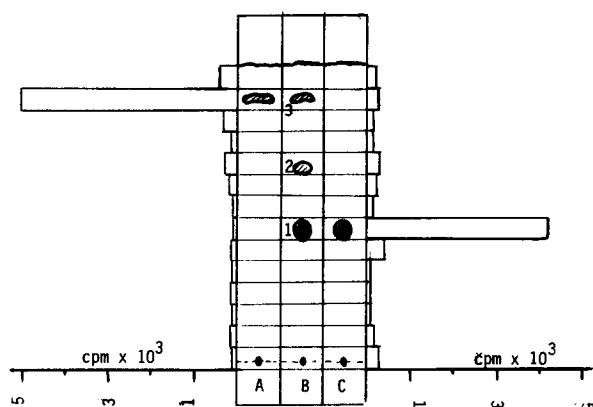


Fig. 2. Histogramme de la chromatographie sur couche mince d'acide silicique. A) 2,4 dinitrophénylhydrazone du céto-acide (avant hydrogénolyse). B) Témoins de: 1) ϵ -Me₃ Lys; 2) céto-acide; 3) céto-acide sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone. C) Produit obtenu après hydrogénolyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone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

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

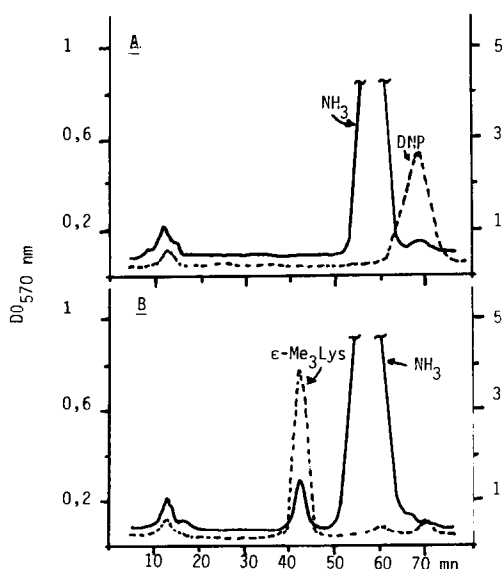


Fig. 3. Analyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide. A) avant hydrogénolyse; B) après hydrogénolyse. Colonne 8.1 x 0.9 cm de résine Spinco A-15. DO à 570 nm; (---) Radioactivité.

Nous remarquons toujours l'apparition d'une 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 ([¹⁴C]H₃)-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:

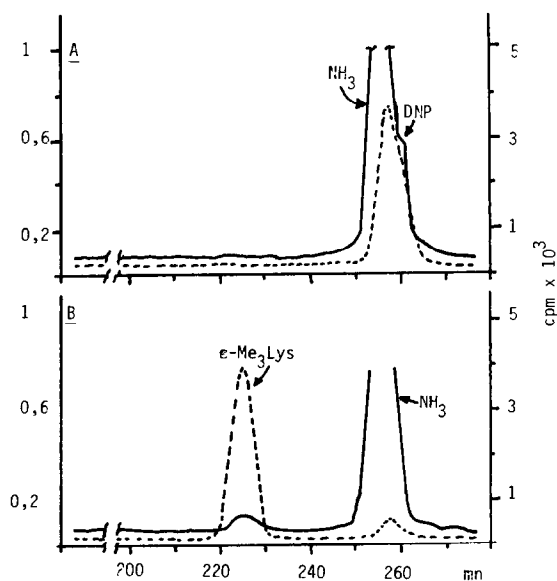
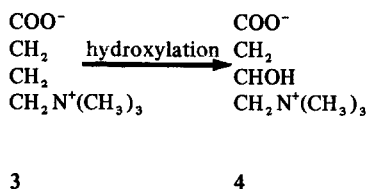
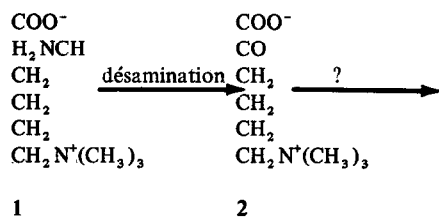


Fig. 4. Analyse de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du céto-acide. A) avant hydrogénolyse; B) après hydrogénolyse. Colonne 51 x 0.9 cm de résine spinco 50 A. DO à 570; (---) Radioactivité.



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 Birkofer, 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] Kuehl, 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.