

## SUR LA PRESENCE DE DERIVES $\epsilon$ -N-METHYLES DE LA LYSINE A L'ETAT LIBRE DANS *NEUROSPORA CRASSA*

VICTOR RAUL VILLANUEVA et EDGAR LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91190 Gif sur Yvette, France

(Received 22 February 1974)

**Key Word Index**—*Neurospora crassa*; fungus; *N*-methyl-lysine derivatives; biosynthesis; *N*-methylation of lysine.

**Abstract**—By using two different isotopically labelled precursors and ion exchange aminoacid analysis, it is shown that the methyl group of methionine is incorporated into  $\epsilon$ -*N*-mono-, di- and trimethylated derivatives of lysine found in the free state in the cells of *Neurospora crassa*. The possibility that lysine methylation can take place not only via protein bound-lysine but also directly on the free aminoacid, or a derivative is considered.

**Résumé**—En utilisant deux précurseurs marqués différemment ainsi que la chromatographie par échangeur d'ions, nous montrons que le groupe méthyle de la méthionine est incorporé dans les dérivés  $\epsilon$ -mono-, di- et triméthylés de la lysine contenus à l'état libre dans *Neurospora crassa*. La possibilité d'une méthylation de la lysine non seulement lorsqu'elle est contenue dans les protéines mais également sous sa forme libre ou sous forme d'un autre dérivé est envisagée.

### INTRODUCTION

LA PRÉSENCE de dérivés  $\epsilon$ -*N*-méthylés de la lysine, faisant partie des protéines tant d'origine animale que végétale a été signalée par divers auteurs. Ainsi, la  $\epsilon$ -*N*-méthylllysine ( $\epsilon$ -MeLys) a été trouvée dans les histones d'origine animale,<sup>1</sup> dans la myosine de lapin,<sup>2,3</sup> et dans les protéines de *Salmonella*<sup>4-6</sup> et de *Spirillum sispeus*.<sup>7</sup> La  $\epsilon$ -*N*-diméthylllysine ( $\epsilon$ -Me<sub>2</sub>Lys) a été trouvée dans les protéines de *Salmonella*<sup>7</sup> et la  $\epsilon$ -*N*-triméthylllysine ( $\epsilon$ -Me<sub>3</sub>Lys) dans la plupart des cytochromes C, des plantes et des champignons.<sup>8</sup> Toute la série de  $\epsilon$ -*N*-mono-, di- et triméthylllysine existe dans les histones du noyau des cellules d'origine animale.<sup>9-11</sup>

Rappelons que Paik et Kim<sup>12</sup> ont décrit un enzyme, la S-adénosyl-L-méthionine: protéine-lysine méthyl-transférase, qui méthyle le groupe  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des résidus lysine des chaînes

*Abréviations utilisées*:  $\epsilon$ -*N*-monométhylllysine ( $\epsilon$ -MeLys);  $\epsilon$ -*N*-diméthylllysine ( $\epsilon$ -Me<sub>2</sub>Lys);  $\epsilon$ -*N*-triméthylllysine ( $\epsilon$ -Me<sub>3</sub>Lys);  $\delta$ -hydroxylysine (OH-Lys).

<sup>1</sup> MURRAY, K. (1964) *Biochem.* **3**, 10.

<sup>2</sup> KUEHL, W. M. et ADELSTEIN, R. S. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 59.

<sup>3</sup> HUSZAR, G. et ELZINGA, M. (1969) *Nature* **223**, 834.

<sup>4</sup> AMBLER, R. P. et REES, M. W. (1969) *Nature* **184**, 56.

<sup>5</sup> MARTINEZ, R. J. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **12**, 180.

<sup>6</sup> McDONOUGH, M. W. (1965) *J. Mol. Biol.* **12**, 342.

<sup>7</sup> GLAZER, A. N., DE LANGE, R. J. et MARTINEZ, R. J. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **188**, 164.

<sup>8</sup> DAYHOFF, M. O., ed. (1972) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 5.

<sup>9</sup> HEMPEL, K., LANGE, H. W. et BIRKOFER, L. (1968) *Z. Physiol. Chem.* **349**, 603.

<sup>10</sup> HNILICA, L. S. (1967) *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **7**, 25.

<sup>11</sup> PAIK, W. K. et KIM, S. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 479.

<sup>12</sup> PAIK, W. K. et KIM, S. (1971) *Science* **174**, 114.

protéiques. Par contre, à notre connaissance, aucun système enzymatique responsable de la présence de ces dérivés méthylés de la lysine, sous forme libre, n'a encore été signalé. Cependant la présence de la  $\epsilon\text{-Me}_3\text{Lys}$  dans quelques plantes a été rapportée<sup>13</sup> de même que celle de la  $\epsilon\text{-MeLys}$  dans le cerveau de boeuf.<sup>14</sup> Les trois dérivés ont été trouvés dans l'urine humaine.<sup>15</sup>

Récemment Broquist *et al.*<sup>16-18</sup> ont étudié la biosynthèse de la carnitine à partir de la lysine. Ces travaux ont mis en relief l'importance que ses dérivés  $\epsilon\text{-N-méthylés}$  pourraient jouer en tant que précurseurs d'autres produits du métabolisme.

Nous rapportons ici l'incorporation du groupe méthyle de la méthionine dans les trois dérivés  $\epsilon\text{-N-méthylés}$  de la lysine contenus à l'état libre dans le mycélium de *Neurospora crassa* et envisageons à la lumière des résultats obtenus la possibilité d'une voie de transméthylation de la lysine ne passant pas nécessairement par un résidu lysine d'une protéine.

#### RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse sur échangeur d'ions des acides aminés libres provenant des extraits alcooliques du mycélium de *Neurospora crassa*, cultivé pendant trois jours en présence de L-Met-<sup>14</sup>Me ou de DL-Lys-6-<sup>14</sup>C montre trois substances (Fig. 1) dont les temps de rétention correspondent à ceux des échantillons témoins des dérivés  $\epsilon\text{-N-mono-}$ , di- et triméthylés de la lysine. Les courbes de radioactivité montrent également trois pics qui se superposent par leur position à ceux des trois dérivés  $\epsilon\text{-N-méthylés}$  de la lysine (Fig. 1).

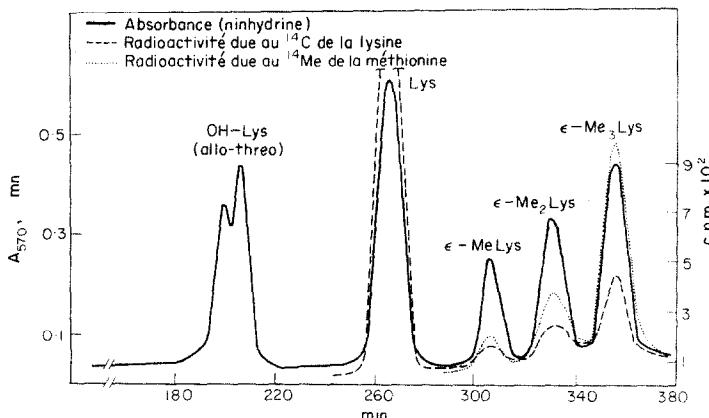


FIG. 1.

Les hydrolysats des protéines de *Neurospora crassa* ont été aussi étudiés. Nous avons observé qu'ils contiennent non seulement la  $\epsilon\text{-Me}_3\text{Lys}$ , comme il a été signalé pour le cytochrome C<sup>19</sup> mais aussi la  $\epsilon\text{-MeLys}$  et la  $\epsilon\text{-Me}_2\text{Lys}$ .

Des essais préliminaires *in vivo*, en vue d'étudier le mécanisme de biogénèse de ces lysines  $\epsilon\text{-N-méthylées}$  ont été réalisés à l'aide d'un inhibiteur de biosynthèse protéique: la

<sup>13</sup> OLSEN-LARSEN, P. (1968) *Acta Chem. Scand.* **22**, 1369.

<sup>14</sup> MATSUOKA, Y., KUMON, A., NAKAJIMA, T., KAKIMOTO, Y. et SANO, I. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **192**, 136.

<sup>15</sup> KAKIMOTO, Y. et AKAZAWA, S. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 5751.

<sup>16</sup> HORNE, D. W., TANPHAICHITR, V. et BROQUIST, H. P. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 4373.

<sup>17</sup> HORNE, D. W. et BROQUIST, H. P. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2170.

<sup>18</sup> TANPHAICHITR, V. et BROQUIST, H. P. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2176.

<sup>19</sup> DE LANGE, R. J., GLAZER, N. J. et SMITH, E. L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 1385.

cycloheximide.<sup>20,21</sup> Ceci dans le but de vérifier si la lysine pouvait être méthylée directement sous sa forme libre (ou sur un dérivé) ou uniquement après incorporation dans une protéine.

Nous avons cultivé *Neurospora crassa* lysine auxotrophe (en présence soit de lysine-<sup>14</sup>C soit de méthionine-<sup>14</sup>Me) dans un milieu contenant ou non de la cycloheximide (voir tableau). Nous avons par la suite extrait les aminoacides libres et les protéines de *Neurospora crassa* provenant de chacune de ces expériences et procédé à leur analyse.

Nous constatons la présence de dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés de la lysine dans les deux types d'essais (avec et sans cycloheximide); la comparaison des radioactivités totales des protéines en provenance des deux expériences (1 et 2) faites en présence de lysine-<sup>14</sup>C (avec et sans cycloheximide) montre que l'inhibition de synthèse protéique est de presque 94% (voir Tableau 1).

TABLEAU 1.

Exp. no.	Cyclo- heximide ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ milieu)			Radioactivité totale (cpm)		Ensemble des lysines méthylées Radioactivité spécifique (cpm/ $\mu\text{mol}$ )		Lysine (non méthylée) Radioactivité spécifique (cpm/ $\mu\text{mol}$ )	
		L-Lys-U- <sup>14</sup> C	L-Met- <sup>14</sup> Me	Acides- aminés libres	Protéines	Acides- aminés libres	Protéines	Acides- aminés libres	Protéines
1	—	25 $\mu\text{Ci}$	—	$8 \times 10^6$	$20 \times 10^6$	$46.8 \times 10^3$	$13.7 \times 10^3$	$63.5 \times 10^3$	$27.6 \times 10^3$
2	10 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{Ci}$	—	$37 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$82.4 \times 10^3$	$11.9 \times 10^3$	$214.8 \times 10^3$	$15.6 \times 10^3$
3	—	—	20 $\mu\text{Ci}$	$28.7 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$40.5 \times 10^3$	$59.5 \times 10^3$	—	—
4	10 $\mu\text{g}$	—	20 $\mu\text{Ci}$	$30.5 \times 10^6$	$0.3 \times 10^6$	$41.7 \times 10^3$	$19.7 \times 10^3$	—	—

Le tableau montre que (sauf pour l'expérience 3) la radioactivité spécifique de l'ensemble des lysines méthylées trouvées à l'état libre est supérieur à celle des mêmes substances trouvées dans les protéines. Il faut remarquer en particulier que dans l'expérience 2, faite en présence de cycloheximide, la radioactivité spécifique des lysines méthylées libres est presque sept fois plus élevée que celle des protéines et presque le double de celle trouvée dans les lysines méthylées libres dans l'expérience correspondante sans cycloheximide.

L'ensemble des résultats de nos expériences semblent donc indiquer qu'une voie de transméthylation, autre que celle passant par la N-méthylation de la protéine<sup>12</sup> est à envisager dans le cas de *Neurospora crassa*.

Des travaux sont en cours pour mieux préciser le mécanisme de la transméthylation intervenant dans la formation des dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés de la lysine ainsi que le rôle qu'ils pourraient jouer en tant que précurseurs d'autres produits du métabolisme, notamment de la carnitine.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

*Cultures.* *Neurospora crassa*, lysine auxotrophe 33933 a été cultivée dans un milieu synthétique<sup>22</sup> contenant 0.2 mM de L-lysine à 30° et avec agitation. Des précultures ont été obtenues en ensemencant des erlenmeyers de 300 ml contenant 50 ml de milieu avec 2 ml d'une suspension de mycélium ( $7.5 \times 10^7$  cellules/ml) et incubé pendant 20 hr à 30° avec agitation. Ces précultures (50 ml) ont été transvasées dans des erlenmeyers de 2 l. contenant 300 ml de milieu additionnés des précurseurs radioactifs. Pour les premières expériences qui nous ont servis à mettre en évidence la présence des dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés de la lysine le temps d'incubation a été de trois

<sup>20</sup> SEBALD, W., SCHWAB, A. J. et BUCHER, TH. (1969) *FEBS Letters* **4**, 243.

<sup>21</sup> NEUPERT, W., SEBALD, W., SCHWAB, A. J., MASSINGER, P. et BUCHER, TH. (1969) *European J. Biochem.* **10**, 589.

<sup>22</sup> HOROWITZ, N. H. et BEADLE, G. W. (1943) *J. Biol. Chem.* **150**, 325.

jours. Pour les expériences 1, 1A, 2 et 2A (voir Tableau 1) on a ensemencé les cultures de 300 ml avec les précultures de 50 ml et on a incubé à 30° avec agitation. Au bout de 15 hr de croissance, nous avons ajouté de la cycloheximide (1A et 2A) et continué l'incubation pendant 1 hr. On a ensuite ajouté les précurseurs radioactifs et l'incubation s'est poursuivie encore 5 hr.

*Extraction.* Après la période d'incubation, le mycélium est filtré, rincé abondamment à l'eau distillée et séché sur papier filtre. Il est ensuite extrait dans un Soxhlet par l'éthanol à 90° pendant 48 hr. La solution éthanolique contient les acides aminés libres et le résidu solide les protéines.

*Délipidation.* L'éthanol est éliminé par évaporation sous vide à 40° et le résidu chauffé à 50° avec une solution 0,1 N de KOH dans l'éthanol à 50% pendant 30 min. Après avoir amené à sec, le résidu est dissous dans l'eau et délipidé avec le mélange pétrole-éther (1:1); la phase aqueuse est ensuite amenée à pH 2 avec HCl 6 N, puis extraite à nouveau par le mélange pétrole-éther.

*Hydrolyse des protéines.* Le résidu solide qu'on obtient après extraction du mycélium dans le Soxhlet et qui contient les protéines est pulvérisé dans un mortier et traité deux fois par NaOH 1 N, à la temp ambiante et avec agitation. On récupère par centrifugation les surnageants, et on neutralise avec HCl; la solution neutralisée est traitée par une sol. d'acide trichloroacétique pour donner une concn finale de 5%. On laisse en contact 20 mn à 90° et on centrifuge. Le culot est homogénéisé dans l'acetone, centrifugé à nouveau et séché sous un courant d'azote. Des parties aliquotes sont soit hydrolysées dans HCl 6 N dans une ampoule scellée pendant 24 hr à 110° soit dissoutes dans NaOH 0,5 N pour mesure de la radioactivité dans la solution Bray.<sup>23</sup>

*Chromatographie sur papier.* Au cours des essais préliminaires, des parties aliquotes de la phase aqueuse délipidée ont été étudiées par chromatographie sur papier Whatman No. 1. On développe soit par le système *i*-PrOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (4:1:1)<sup>15</sup> soit par CHCl<sub>3</sub>-MeOH-conc NH<sub>3</sub> (4:4:1).<sup>24</sup> Le premier système sépare la méthionine (*R*<sub>f</sub> 0,69) de la lysine et ses dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés (*R*<sub>f</sub> 0,36). Nous l'avons utilisé pour l'analyse des échantillons provenant de la culture de *Neurospora crassa* en présence de méthionine-<sup>14</sup>Me.

Le second système permet de séparer la lysine et ses dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés entre eux (Lysine, *R*<sub>f</sub> 0,20;  $\epsilon$ -MeLys, *R*<sub>f</sub> 0,40;  $\epsilon$ -Me<sub>2</sub>Lys, *R*<sub>f</sub> 0,60;  $\epsilon$ -Me<sub>3</sub>Lys, *R*<sub>f</sub> 0,25). Ce second système a été utilisé pour l'analyse des échantillons provenant des cultures de *Neurospora crassa* en présence de lysine radioactive. La détection de la radioactivité dans chaque chromatogramme a été effectuée à l'aide d'un compteur à circulation gazeuse, marque Berthold.

*Chromatographie sur colonne d'échangeur d'ions.* Nous avons utilisé un appareil Beckman modèle 120 C (résine PA 35, colonne 0,9 × 40 cm, tampon citrate 0,35 N, pH 5,84 débit 34 ml/hr à 30°). Des fractions de 1,5 ml ont été collectées et leur radioactivité mesurée sur un appareil Nuclear Chicago Mark I à l'aide de la solution scintillante de Bray.<sup>23</sup> Ces analyses ont été répétées sur une colonne 0,9 × 54 cm, résine Spineo 50 B, tampon citrate 0,38 N, pH 7,05, débit 36 ml/hr à 32°. Dans les conditions utilisées, les acides aminés neutres et acides sont élus avant la OH-Lys et les dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés de la lysine sont convenablement séparés entre eux. Les résultats obtenus au cours de ces analyses dans deux conditions différentes sont tout à fait comparables.

L'isolement des lysines  $\epsilon$ -N-méthylées a été réalisé par chromatographie sur résine Spineo 50 B; nous avons recueilli des fractions de 1,5 ml; ensuite prélevé de chaque fraction 0,3 ml pour mesurer la radioactivité. La courbe de radioactivité ainsi obtenue, superposée à la courbe standard (Fig. 1) a permis d'identifier les fractions contenant ces dérivés méthylés de la lysine, lesquels ont été réunis afin de permettre leur dosage quantitatif. La concn en acide aminé a été déterminée par la méthode à la fluorescamine<sup>25</sup> (la méthode par la ninhydrine n'étant pas suffisamment sensible pour mesurer les très faibles quantités de ces produits) en utilisant la  $\epsilon$ -N-diméthyllysine comme standard.

*Remerciements.*—Nous remercions le Fungal Genetic Stock Center (FGSC), Dartmouth College, Hannover (U.S.A.) qui nous a généreusement envoyé la souche de *Neurospora crassa* 33933 et le Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Saclay, pour une subvention ayant facilité l'achat de molécules marquées.

Nous remercions le Dr. F. Lederer qui nous a permis l'utilisation de l'auto-analyseur d'acides aminés ainsi que pour des discussions fructueuses. Nous remercions Melle A. M. Simon qui a effectué ces analyses.

Nous remercions le Professeur N. L. Benoiton (Université d'Ottawa, Canada) et le Dr. E. Thihal (Research Institut for Medicinal Plants, Budapest, Hongrie) pour de généreux dons de dérivés  $\epsilon$ -N-méthylés de la lysine.

<sup>23</sup> BRAY, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279.

<sup>24</sup> TYIHAK, E. et VAGUFALVI, D. (1970) *J. Chromatogr.* **49**, 343.

<sup>25</sup> UDENFRIEND, S., STEIN, S., BOHLEN, P., DAIRMAN, W., LEIMGRUBER, W. et WEIGLE, M. (1972) *Science* **178**, 871.