

3. Tschiersch, B. and Mothes, K. (1963) in *Comparative Biochemistry*, Vol. V (Florkin, M. and Mason, H. S., eds.), p. 48. Academic Press, New York.
4. Steward, F. C. and Durzan, D. B. (1965) in *Plant Physiology*, Vol. IV A (Steward, F. C., ed.), p. 379. Academic Press, New York.
5. *Handbook of Biochemistry* (1970) (Sober, H. A., ed.), 2. Edition, CRC Press, Cleveland OH, p. B11.
6. Møller, B. L. (1974) *Plant Physiol.* **54**, 638.
7. Cheshire, R. M. and Mifflin, B. J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 695.

*Phytochemistry*, 1976, Vol. 15, pp. 1762-1764. Pergamon Press. Printed in England.

### $\epsilon$ -N-TRIMETHYLLYSINE DESAMINASE DE *NEUROSPORA CRASSA*

VICTOR RAUL VILLANUEVA et KIM HO DIEP LÊ

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif-sur-Yvette, France

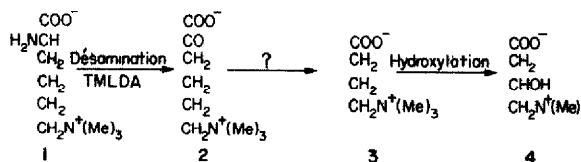
(Received 27 March 1976)

**Key Word Index**—*Neurospora crassa*; fungus;  $\epsilon$ -N-trimethyllysine deaminase;  $\epsilon$ -N-trimethyllysine; 2-keto-6-N-trimethylhexanoic acid.

**Abstract**— $\epsilon$ -N-Trimethyl-L-lysine is transformed into 2-keto-6-N-trimethylhexanoic acid by a soluble deaminase present in the mycelium of *Neurospora crassa*. The activity of the enzyme increases with the age of the mycelium with an optimum after 10 days of culture.  $\epsilon$ -N-Trimethyllysine deaminase has been purified 200-fold by differential centrifugation and successive column chromatography on DEAE Sephadex and Ultrogel AcA-34. Some of its properties have been studied. This is the first enzyme reported to metabolise  $\epsilon$ -N-trimethyllysine.

#### INTRODUCTION

Nous avons récemment isolé à partir de *Neurospora crassa*, l'acide 2-céto-6-N-triméthylhexanoïque (2) et à l'aide de la  $\epsilon$ -N-triméthyl ( $^{14}\text{CH}_3$ ) lysine montré par des expériences *in vivo* et *in vitro* que ce céto-acide provenait bien de la  $\epsilon$ -N-triméthyllysine (1) (TML). Ces expériences ont permis en même temps la mise en évidence d'un système enzymatique capable de désaminer la TML [1,2]. La détection de l'acide 2-céto-6-N-triméthylhexanoïque dans le mycélium de *Neurospora crassa*, laisse penser qu'il est un intermédiaire dans la biosynthèse de la carnitine (4), qui provient aussi de la TML via butyrobétaine (3) [3,4]. Nous avons entrepris la purification de la  $\epsilon$ -N-triméthyllysine désaminase (TMLDA) afin d'essayer de préciser si elle joue un rôle dans la biosynthèse de la carnitine ou un rôle régulateur de la concentration intracellulaire de la TML.



Nous rapportons ici nos résultats préliminaires sur la purification et quelques unes des propriétés de cette désaminase, isolée à partir de *Neurospora crassa*. A notre connaissance c'est la première enzyme intervenant dans le métabolisme de la TML mise en évidence.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

TMLDA a été isolée à partir du mycélium de *Neurospora crassa* cultivé pendant dix jours. Des essais préliminaires

ont montré que l'activité enzymatique augmentait avec l'âge de la culture (avec un rendement optimal au dixième jour).

L'enzyme a été purifiée par centrifugation différentielle de l'extrait obtenu par broyage avec du sable dans un mortier en présence de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1 M; le surnageant est chromatographié sur une colonne de DEAE Sephadex-50 (équilibrée avec le même tampon) qui retient l'enzyme; l'activité enzymatique est éluée avec du tampon phosphate contenant 0,4 M de KCl. Les fractions contenant l'enzyme sont réunies et précipitées par le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 90%; le précipité, récupéré par centrifugation, est redissous et chromatographié sur colonne d'Ultrogel AcA-34 et élué avec du phosphate 0,1 M. Les fractions contenant la désaminase sont réunies. Les résultats de ce procédé de purification sont indiqués dans le Tableau 1. La préparation enzymatique obtenue après ces manipulations possède une activité spécifique environ 200 fois supérieure à celle de l'extrait de départ.

Une relation linéaire entre l'activité enzymatique et le temps d'incubation est obtenue pour des temps allant de 0 à 75 min. Un temps d'incubation de 30 min a été choisi pour nos expériences. L'activité optimale est obtenue vers pH 9,5; cependant toutes nos expériences ont été réalisées à pH 8,9.

Une série d'incubations avec des concentrations initiales différentes de TM ( $^{14}\text{CH}_3$ )L a été effectuée afin de déterminer le  $K_m$ . Il est de 0,33 mM, calculé à partir de la représentation de Lineweaver-Burk. L'introduction de KCl dans le milieu d'incubation stimule l'activité enzymatique avec un maximum à 0,8 M (Tableau 2).

Des expériences en vue de préciser le mécanisme d'action de la TMLDA ont été réalisées; ainsi nous avons testé le FAD, FMN, NAD et le Pyridoxal phosphate

Tableau 1. Purification de la  $\epsilon$ -N-triméthyllysine désaminase

Fractions	Protéine totale (mg)	Activité spécifique* TML transformée nmol/mg/min	Enrichissement
Surnageant (10000 g)	205,6	0,70	1
Surnageant (170000 g)	125,5	1,10	1,6
Chromatographie DEAE-Sephadex 50	34,6	10,2	14,6
Chromatographie Ultrogel Aca 34	1,95	138,1	197

\* Les unités utilisées pour exprimer l'activité spécifique correspondent au nombre de nmoles de TML transformée par mg de protéine par min.

en tant que cofacteurs. Parmi ceux-ci le FMN stimule presque de 50% la réaction enzymatique.

De même des études comparées avec des L-aminooxydases (E.C. 1.4.3.2) connues telles qu'celles de *Crotalus terr. terr.* (Boehringer Mannheim) et celle de *Neurospora crassa* [5] ont été réalisées. Aucune de ces enzymes ne réagit avec la TML dans les conditions utilisées avec la TMLDA.

La TMLDA après contrôle par électrophorèse sur gel de polyacrylamide [6] n'est pas encore homogène. En effet, on observe une bande principale et deux autres plus faibles. Des travaux sont en cours pour améliorer son degré de purification afin de mieux la caractériser et de préciser son mécanisme d'action et son rôle biologique. De même la recherche de la TMLDA dans d'autres sources naturelles se poursuit.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

**Cultures.** *Neurospora crassa*, lysine auxotrophe 33933 a été cultivée comme précédemment [7] mais pendant 10 jours.

**Purification de la TMLDA.** Toutes les manipulations ont été faites à 4°. *Neurospora crassa* (20 g poids humide) est broyée avec la moitié de son poids en sable dans un mortier en présence de phosphate de potassium 0,1 M, pH 8,9. L'homogénat est centrifugé à 10000 g pendant 15 min et le surnageant éliminé, car il contient beaucoup de protéines mais une activité enzymatique négligeable. Le culot est repris et extrait à nouveau 2 fois par le même tampon et après centrifugation les deux surnageants sont réunis et centrifugés à 170000 g pendant 90 min. Le surnageant qui contient l'activité enzymatique est chromatographié sur colonne de DEAE Sephadex A-50 (35 × 2 cm) équilibré avec du phosphate de potassium 0,1 M pH 8,9. On lave la colonne jusqu'au moment où il n'y a plus d'élution de protéine; on élue ensuite avec du KCl 0,4 M contenu dans le même tampon et les fractions contenant l'enzyme sont réunies. On ajoute (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 90%, on centrifuge et le précipité est redissous dans 2 ml de tampon et chromatogra-

phié sur une colonne d'Ultrogel Aca-34 (35 × 2 cm) équilibré avec du phosphate de potassium 0,1 M pH 8,9 et élué avec le même tampon.

**Test enzymatique.** La purification de la TMLDA a été suivie en mesurant le nombre de nmoles de TM (<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)L transformée en acide 2-céto-6-N-triméthylhexanoïque. Le mélange réactionnel contient dans un volume de 0,5 ml: 750 nmol de TM(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)L ayant une activité spécifique de 1076 dpm/nmol, phosphate de potassium à pH 8,9 (0,1 M) et enzyme (de 100 à 1000 µg de protéine, sauf pour la fraction d'Ultrogel où les essais ont été faits avec des quantités allant de 4 à 10 µg). Les incubations sont faites à 37° pendant 30 min avec agitation, et terminées par l'addition de 50 µl d'une solution d'acide trichloroacétique à 80%. Après refroidissement et centrifugation, des parties aliquotes du surnageant sont analysées par chromatographie automatique sur une colonne de résine échangeuse d'ions, Beckman M-71, (0,9 × 9 cm) à l'aide du tampon citrate de sodium 0,35 M, pH 5,15 pour isoler le céto-acide formé [1]. La radioactivité de celui-ci est mesurée en utilisant la solution de Bray [8] et les dpm comptés permettent d'évaluer les nombres de nmoles de céto-acide obtenu ou de TML transformée.

**Détermination du K<sub>m</sub>.** Une série d'incubations avec de la TM(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)L à des concentrations allant de 0,03 à 3 mM ont été effectuées pendant 20 min à 37°. Le dosage de protéines a été fait par la méthode de Lowry [9] en utilisant comme standard le sérum albumine bovine. La TM(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)L ou froide, a été synthétisée, purifiée et titrée comme précédemment [1]. L'étude en fonction du pH a été faite en utilisant le tampon phosphate 0,1 M avec une gamme de pH allant de 7 à 10,5 à des intervalles de 0,5 unités de pH. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été effectuée à pH 8,35 sur un appareil GE-4 Pharmacia [6] et sur la fraction enzymatique obtenue après chromatographie sur Ultrogel. Les mesures de radioactivité ont été faites sur un appareil Nuclear Chicago Mark-I.

**Remerciement.**—Nous remercions M. le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et le Dr J. Cosson du Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif sur Yvette, pour des discussions très fructueuses. Nous remercions le Fungal Genetic Stock Center (FGSC), Dartmouth College, Hanover (U.S.A.) qui nous a envoyé la souche de *Neurospora crassa* 33933, le Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) Saclay, pour une subvention ayant facilité l'achat de molécules marquées.

Tableau 2. Effet du KCl sur la transformation de TML par TMLDA

Concentration de KCl (dans K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 M)	TML transformée
0	5,5
0,2	7,5
0,4	8,6
0,8	13,8
1	9,2
1,5	8,1
2	6,5

#### REFERENCES

- Villanueva, V. R. et Lederer, E. (1975) *FEBS Letters* **52**, 308.
- Villanueva, V. R. et Lederer, E. (1975) *Neurospora News Letters* **22**, 7.
- Horne, D. W. et Broquist, H. P. (1973) *J. biol. Chem.* **248**, 2170.
- Cox, R. A. et Hoppel, C. L. (1973) *Biochem. J.* **136**, 1083.

5. Aurich, H., Lippa, D. et Schucker, G. (1972) *Acta biol. Med. Germ.* **28**, 209.
6. Davis, B. J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404.
7. Villanueva, V. R. et Lederer, E. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2157.
8. Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 279.
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. biol. Chem.* **193**, 265.

*Phytochemistry*, 1976, Vol. 15, pp. 1764–1767. Pergamon Press. Printed in England.

## A SURVEY FOR CYANOGENESIS IN FERNS AND GYMNOSPERMS

NICOLA L. HARPER,\* GILLIAN A. COOPER-DRIVER† and T. SWAIN†‡

\*Dept. of Biochemistry, Oxford University, Oxford; †ARC Biochemical Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, England

(Received 3 May 1976)

**Key Word Index**—Ferns; gymnosperms; survey; cyanogenesis.

**Abstract**—298 species of ferns and 48 species of gymnosperms were tested for cyanogenic activity. 5% of the fern species examined gave positive results, but these showed no correlation with taxonomic groupings. None of the gymnosperms surveyed gave a positive result. The limitations of a survey of this type for detecting cyanogenesis in plants is discussed.

### INTRODUCTION

Compounds liberating hydrogen cyanide upon hydrolysis with either acids or appropriate hydrolases are extremely widespread in nature. Cyanogenic glycosides are known to occur in at least 800 species of plants representing 70–80 families [1]. They have been found in bacteria and fungi, ferns, a few gymnosperms and in both monocotyledonous and dicotyledonous angiosperms. This cyanogenic ability of plants has importance as a human poison, one of the best known examples being cassava, the prime constituent of the diet in many parts of Africa [2]. It is also being increasingly shown to be important to the plant as a defence mechanism against animal [3,4] and insect [4–6] predation. The isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds has been recently reviewed [7] and the release of hydrogen cyanide can be readily detected by simple and reasonably specific colour tests [8,9].

As a continuation of our work on the biochemical systematics of ferns [10] and the role of secondary plant compounds as feeding deterrents [4,6], it was decided to expand the work of Eyjólfsson [11] and to see whether cyanogenesis was common among fern species. Gymnosperm and fern species were chosen at random from the living collection at Kew and were screened for their ability to produce HCN. This paper discusses the results of screening 298 fern species and 48 species of gymnosperms for cyanogenic activity.

### RESULTS AND DISCUSSION

The results of the cyanogenic tests on ferns are listed in Table 1, and those for gymnosperms in Table 2. Out of the 298 fern species tested only sixteen gave a positive result, approximately 5%, suggesting that cyanogenesis is not a common phenomenon among fern species. There was no particular correlation between cyanogenesis and fern taxonomy, positive species being present in the Davalliaceae (5 positive species in the 10 examined, *Davallia* and *Humata*), Polypodiaceae (2 out of 40, *Phlebodium* and *Campyloneuron*), Pteridaceae (2 out of 19, *Actiniopteris* and *Pteris*), Sinopteridaceae (2 out of 16, *Cheilanthes*), Dennstaedtiaceae (3 out of 16, *Microlepia* and *Pteridium*) and isolated examples in the Vittariaceae (1 out of 1, *Pteridanetium*), Aspidiaceae (1 out of 48, *Pteridrys*) and Blechnaceae (1 out of 13, *Stenochlaena*). Of the 48 species of gymnosperms tested, all gave negative results. These results reflect the low frequency of cyanogenic plants in the gymnosperms [11,13,14].

It must be emphasized, however, that when screening for cyanogenic plants positive results are much more important than negative ones. Many factors are involved in the production of cyanogenic compounds, amongst which are the age of the plant, young plants usually being more cyanogenic than old ones [4], the season of the year, parts of the plant examined, as there are often differences between cyanogenesis in the stem, root or leaves, ecological factors [3], including temperature changes, stress conditions and genetic variation. Most if not all plants examined have been shown to be polymorphic for cyanogenesis [15] including *Pteridium aquilinum* [16] and to possess several phenotypes. Random

‡ Present address: Biological Science Center, 2 Cummington Street, Boston, MA 02215, U.S.A.