

UCH-FC  
MAG - Q  
C265  
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS**

**“Mecanismo de la Reacción de Lactonización en  
la producción de Fitohormonas Diterpénicas por  
el Hongo *Gibberella Fujikuroi*”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile en cumplimiento  
parcial de los requisitos para optar al Grado Académico de

**MAGISTER EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**JOSÉ JAVIER CÁRCAMO VEGA**



Director de Tesis: Dra. María Cecilia Rojas Garrido

**Santiago, Chile**

**2006**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE GRADUADOS**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister presentada por el candidato:

**JOSÉ JAVIER CÁRCAMO VEGA**

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de tesis como requisito para optar al grado de Magister en Química en el examen de defensa rendido el día 22 de Agosto de 2006

**Director de Tesis**

Dra. María Cecilia Rojas Garrido

*M. Cecilia Rojas G.*

**Comisión de Evaluadora de Tesis**

Dr. Bruce Cassels N. (Presidente)

*Bruce N. Cassels*

Dr. Víctor Cifuentes G.

Dr. Hernán Pessoa M.

*[Signature]*



*A María, Javier, Marlene y Luna por ser los  
Pilares que sustentan a este científico  
En constante evolución.*

*Gracias.*





José Cárcamo Vega, nacido Santiago de Chile en 1976, hijo menor de 2 hermanos de una sencilla familia de comerciantes. Actualmente vive en la comuna de El Monte, pequeño poblado agrícola de no más de 25 mil habitantes, distante a 50 Km. de Santiago. Radicado allí desde 1981, cursó su enseñanza básica y media en el actual Liceo Luis Humberto Costa G. ex Liceo B N° 126 de esa misma comuna, entre los años 1981 y 1993. Estudió Químico Laboratorista con licenciatura en Química en la Universidad de Tarapacá entre los años 1995 y 2003. Allí, bajo la dirección de Marlene Morales C. y Oscar Weissbluth L. desarrolla su tesis titulada "Preparación y caracterización de quitosano hidrofóbicamente modificado con colato de sodio y desoxicolato de sodio". Fuertemente inspirado por sus directores de tesis, decide continuar estudios de postgrado. Ingresó al laboratorio de Bioorgánica de Universidad de Chile en el año 2004, donde conoce a la Dra. María Cecilia Rojas, quien lo introduce en el maravilloso mundo de los mecanismos de oxidación en sistemas biológicos, tema que lo lleva hoy a presentar esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS



Es preciso dar cumplido reconocimiento a una cantidad importante de personas sin cuya colaboración esta tesis no hubiera sido posible, ellos han ido aportando a lo largo de mucho tiempo, el mejor de los filtros para este texto: el estudio, la duda, la consulta.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros del grupo Bioorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile especialmente a quien ha sido mi tutora la Dra. Maria Cecilia Rojas por su constante apoyo, dedicación y confianza en este trabajo, gracias por darme la oportunidad, por sus invaluable comentarios, sugerencias y colaboración.

A la Dra. Bettina Tudzynski del Instituto de Botánica de la Universidad de Münster, Münster, Alemania, por su gentileza en donar alguna de las cepas de hongos de *Gibberella fujikuroi* utilizadas en esta tesis.

Al Dr. Peter Hedden de Rothamsted Research, UK, por su gentileza de donar algunos de los sustratos utilizados en esta tesis y los análisis de Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masa (GC/MS).

Con especial y cariñoso agradecimiento a Patricia Corrales por aquellos momentos de alegría y duro trabajo en todo el tiempo de estadia en el

laboratorio. Además a la Bioquímica Claudia Troncoso por ayudarme a dar los primeros pasos en el mundo de la Bioquímica experimental.

Esta tesis ha sido realizada gracias al financiamiento de Proyecto FONDECYT 1020104 dirigido por la Dra. María Cecilia Rojas.

Finalmente, persistirán las dudas y seguirán siendo oportunas las sugerencias; que esperaré y atenderé con la humilde certeza de que todo es perfectible.



## TABLA DE CONTENIDOS

		Página
<b>CAPITULO 1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
	<b>HIPÓTESIS</b>	12
	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	12
	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	13
<b>CAPITULO 2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
2.1.	Reactivos	15
2.2.	Síntesis de precursores de GAs marcados con [ <sup>14</sup> C] ó [ <sup>2</sup> H]	15
2.3.	Cepas de <i>Gibberella fujikuroi</i>	15
2.4.	Condiciones de cultivo	16
2.5.	Incubación con precursores isotópicamente marcados	16
2.6.	Condiciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	17
2.7.	Identificación de los productos de metabolización por GC/MS	17
2.8.	Cuantificación de radiactividad por centelleo líquido	18
2.9.	Cinética de utilización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por cultivos de las cepas: silvestre, SG138 y ΔCPR	18
2.10.	Incubación del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa con una mezcla de [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20: 80 (aire artificial)	18
2.11.	Metabolización de GA <sub>12</sub> por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en presencia de [ <sup>18</sup> O]H <sub>2</sub> O	20
2.12.	Metabolización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> en presencia de [ <sup>2</sup> H]H <sub>2</sub> O	21
		V

<b>CAPITULO 3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>22</b>
3.1.	Productos de metabolización de la giberelina [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por el complejo P450-2/CPR o el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	23
3.2.	Cinética de utilización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por el complejo P450-2/CPR o el complejo P450-2/ cit b5: cit b5 reductasa	28
3.3.	Secuencia de oxidación del carbono 20 de las giberelinas por la monooxigenasa P450-2	30
3.4.	Origen del átomo de oxígeno en los productos de oxidación del C20 por la monooxigenasa P450-2	34
3.5.	Comparación del patrón de fragmentación por espectrometría de masas del metil éster de la giberelina GA <sub>15</sub> obtenida desde GA <sub>12</sub> en presencia de [ <sup>18</sup> O]H <sub>2</sub> O y [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80.	46
3.6	Comparación del patrón de fragmentación por espectrometría de masa del metil éster de la giberelina GA <sub>15</sub> obtenida desde ácido <i>ent-kaurenoico</i> en presencia de [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80 y [ <sup>16</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	51
3.7.	Efecto del agua deuterada sobre la metabolización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	55
<b>CAPITULO 4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO 5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>CAPITULO 6.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>70</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Productos de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> por los complejos P450-2/CPR y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	26
<b>Tabla 2.</b> Velocidades relativas de utilización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> por la monooxigenasa P450-2 asociada a CPR o al sistema cit b5: cit b5 reductasa	29
<b>Tabla 3.</b> Productos de oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> , [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> y GAs con distintos grupos funcionales en C20, por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	31
<b>Tabla 4.</b> Metabolización de GAs C20 metilo, C20 alcohol y C20 aldehido por el complejo P450-2 /CPR	33
<b>Tabla 5.</b> Productos de metabolización de GA <sub>12</sub> por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, formados en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ]H <sub>2</sub> O o de [ $^{18}\text{O}$ ]O <sub>2</sub>	35
<b>Tabla 6.</b> Productos de metabolización del ácido <i>ent</i> -kaurenoico por el complejo P450-2 /cit b5: cit b5 reductasa en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	41
<b>Tabla 7.</b> Fragmentación en GC/MS para el metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente desde GA <sub>12</sub>	47
<b>Tabla 8.</b> Fragmentación en GC/MS para el metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente desde ác. <i>ent</i> -kaurenoico.	51
<b>Tabla 9.</b> Efecto de [ $^2\text{H}$ ]H <sub>2</sub> O sobre la síntesis de [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>15</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>24</sub> formados a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> .	56

<b>Figura 14.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente de GA <sub>12</sub> en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	38
<b>Figura 15.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>24</sub> proveniente de GA <sub>12</sub> en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	39
<b>Figura 16.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente de ác. <i>ent</i> -kaurenoico en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	42
<b>Figura 17.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>24</sub> proveniente de ác. <i>ent</i> -kaurenoico en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	43
<b>Figura 18.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente de ác. <i>ent</i> -kaurenoico en la incubación con [ <sup>16</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	44
<b>Figura 19.</b>	Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>24</sub> proveniente de ác. <i>ent</i> -kaurenoico en la incubación con [ <sup>16</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	45
<b>Figura 20.</b>	19 $\delta$ , 20 lactona de la giberelina GA <sub>15</sub>	46
<b>Figura 21.</b>	Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> , proveniente de GA <sub>12</sub> en la incubación con [ <sup>18</sup> O]H <sub>2</sub> O.	49
<b>Figura 22.</b>	Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> , proveniente de GA <sub>12</sub> en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80	50
<b>Figura 23.</b>	Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente de ác. <i>ent</i> -kaurenoico en la incubación con [ <sup>16</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80.	53

<b>Figura 24.</b>	Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA <sub>15</sub> proveniente de ác. ent-kaurenoico en la incubación con [ <sup>18</sup> O]O <sub>2</sub> : N <sub>2</sub> = 20 : 80.	54
<b>Figura 25.</b>	Reacciones catalizadas por el complejo P450-2/CPR	60
<b>Figura 26.</b>	Reacciones catalizadas por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	60
<b>Figura 27.</b>	Etapas en la oxidación secuencial del C20 de las giberelinas por la monooxigenasa P450-2 (C20 oxidasa)	62
<b>Figura 28.</b>	Etapas en la oxidación secuencial del C20 por la monooxigenasa P450-2 (C20 oxidasa), asociada al cit b5: cit b5 reductasa	63
<b>Figura 29.</b>	Mecanismo de oxidación secuencial postulado para la biosíntesis de las giberelinas 19γ, 10 lactónicas por P450-2 asociada a la CPR	64

## ABREVIATURAS

[ <sup>14</sup> C]	Isótopo 14 de Carbono
C7	Carbono 7
C10	Carbono 10
C13	Carbono 13
C20	Carbono 20
CPR	Citocromo P450 reductasa
C19 - GAs	Giberelinas de 19 átomo de carbono
C20 - GAs	Giberelinas de 20 átomos de Carbono
[ <sup>2</sup> H]	Isótopo 2 de hidrógeno (deuterio)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
GAs	Giberelinas
GC/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
GGPP	Geranylgeranyl difosfato
KA	Ácido <i>ent</i> -kaurenoico
MO	Monooxigenasa
[ <sup>16</sup> O]	Isótopo 16 de oxígeno
[ <sup>18</sup> O]	Isótopo 18 de oxígeno
dpm	Desintegraciones por minuto
v/v	Relación volumen - volumen

## RESUMEN

Las giberelinas (GAs) son una numerosa familia de ácidos tetracíclicos diterpénicos activos como fitohormonas, que son sintetizados en grandes cantidades por el hongo *Gibberella fujikuroi*. La actividad biológica de las GAs se encuentra asociada a la función 19 $\gamma$ , 10 lactona que se genera por oxidación del grupo metilo ubicado en la posición 20, reacción que es catalizada por una monooxigenasa P450 en este microorganismo (monooxigenasa P450-2 o C20 oxidasa). Las monooxigenasas P450 requieren oxígeno molecular y electrones para llevar a cabo su función catalítica, los que son aportados por nucleótidos de piridina a través de proteínas transportadoras asociadas, como la P450 reductasa (CPR) o el sistema citocromo b5: citocromo b5 reductasa (cit b5: cit b5 reductasa). Se ha demostrado que P450-2 cataliza la oxidación del metilo 20 de GA<sub>12</sub> o GA<sub>14</sub> hasta CO<sub>2</sub> más el producto lactónico o alternativamente hasta carboxilato, sin acumulación de intermediarios. En ausencia de CPR sin embargo, se forman GAs C20 alcohol y C20 aldehído que podrían ser intermediarios de la reacción de oxidación o bien podrían formarse por hidrólisis de intermediarios unidos covalentemente a la enzima.

En el presente trabajo se investigó la participación de intermediarios en la oxidación del C20 de las GAs, utilizando dos complejos enzimáticos con distintas proteínas transportadoras de electrones: P450-2/CPR y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. A través de los productos de metabolización de precursores marcados con [<sup>14</sup>C] y [<sup>2</sup>H] se demostró que el complejo P450-2/CPR cataliza la secuencia de oxidación del metilo 20 hasta CO<sub>2</sub> o el producto C20 carboxilato, en tanto que el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa cataliza la secuencia de oxidación C20 metilo  $\longrightarrow$  C20 alcohol  $\longrightarrow$  C20 aldehído  $\longrightarrow$  C20 ácido carboxílico. No se detectó la formación de producto 19 $\gamma$ , 10 lactónico en este

último complejo. La velocidad de utilización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por el complejo P450-2/CPR es 10 veces mayor que para el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, lo que sugiere que las diferencias en el patrón de productos se relacionarían con la eficiencia del flujo de electrones. Mediante incubaciones del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa con GA<sub>12</sub> en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O o de una mezcla de [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>= 20: 80 y análisis por GC/MS, se demostró que el átomo de oxígeno en C20 del producto GA<sub>15</sub>, proviene del oxígeno molecular y no del H<sub>2</sub>O. El átomo de oxígeno en el C20 del producto aldehído (GA<sub>24</sub>) también se encontró marcado con [ $^{18}\text{O}$ ] en las incubaciones en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>= 20: 80, a diferencia de las incubaciones de GA<sub>12</sub> en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O. Estos resultados demuestran que la oxidación secuencial del C20 de las GAs transcurre a través de intermediarios alcohol y aldehído unidos no covalentemente a la enzima, por lo que se descarta la participación de intermediarios covalentes en esta reacción. Los intermediarios C20 alcohol y C20 aldehído se disociarían de la monooxigenasa P450-2 en el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa debido a baja eficiencia en el flujo de electrones. En general los precursores C20 alcohol y C20 aldehído no son metabolizados lo que sugiere que presentan una baja afinidad por la enzima. Finalmente, la ausencia de producto 19γ, 10 lactónico en las reacciones catalizadas por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa sugiere que participaría un intermediario adicional en la secuencia de oxidación hasta CO<sub>2</sub>, que involucraría un residuo de aminoácido del sitio activo, a diferencia de la oxidación hasta C20 carboxilato.

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo contribuye a conocer en mayor profundidad las reacciones catalizadas por la monooxigenasa P450-2, y aportar a la comprensión de la ruta biosintética que forma las giberelinas en el hongo *Gibberella fujikuroi*. El mecanismo de oxidación secuencial encontrado para la monooxigenasa P450-2, en el que participa un centro de hierro hemínico

en la síntesis de 19 $\gamma$ , 10 lactónicas, es semejante al que presentan las C20 oxidasas de plantas que utilizan hierro no hemínico para catalizar esta reacción. La secuencia de oxidación, la naturaleza de los intermediarios, los productos finales y los requerimientos catalíticos son comparables en ambos sistemas debido a que ambas enzimas utilizan como especie oxidante al ión oxoferrilo.

## ABSTRACT

Gibberelins (GAs) are a large family of tetracyclic diterpenic acids active as phytohormones that are synthesized in high levels by the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi*. Biological activity is related to the GA 19 $\gamma$ , 10 lactone function generated by oxidation of the methyl group at C20 by a P450 monooxygenase (P450-2 or C20 oxidase). P450 monooxygenases require molecular oxygen and electrons for catalysis which are supplied from pyridin nucleotides through electron transport proteins such as P450 reductase (CPR) or cytochrome b5: cytochrome b5 reductase (cyt b5: cyt b5 reductase). P450-2 catalyzes oxidation of the C20 methyl of GA<sub>12</sub> or GA<sub>14</sub> to CO<sub>2</sub> plus the lactonic product or alternatively to a carboxylic acid function. No intermediates are detected in these reactions. In the absence of CPR however, C20 alcohol and C20 aldehyde GAs are formed which can correspond to oxidation intermediates or may result from hydrolysis of covalently enzyme-bound species.

In this work, participation of intermediates in GA C20 oxidation was investigated by utilizing two enzyme complexes containing different electron transport proteins: P450-2/CPR and P450-2/cyt b5: cyt b5 reductase. Through GC/MS identification of the products formed from labelled precursors it was shown that P450-2/CPR catalyzes the oxidation sequence from methyl to CO<sub>2</sub> or alternatively to a carboxylic acid while P450-2/cyt b5: cyt b5 reductase catalyzes the sequence: C20 methyl  $\longrightarrow$  C20 alcohol  $\longrightarrow$  C20 aldehyde  $\longrightarrow$  C20 carboxylic acid. No 19 $\gamma$ , 10 lactonic product was detected with the latter complex. The metabolization rate of [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> by P450-2/CPR was ten times higher than the corresponding rate in the presence of P450-2/cyt b5: cyt b5 reductase, which suggests that the different product pattern found would be related to the efficiency of electron flow. By incubation of P450-2/cyt b5: cyt b5



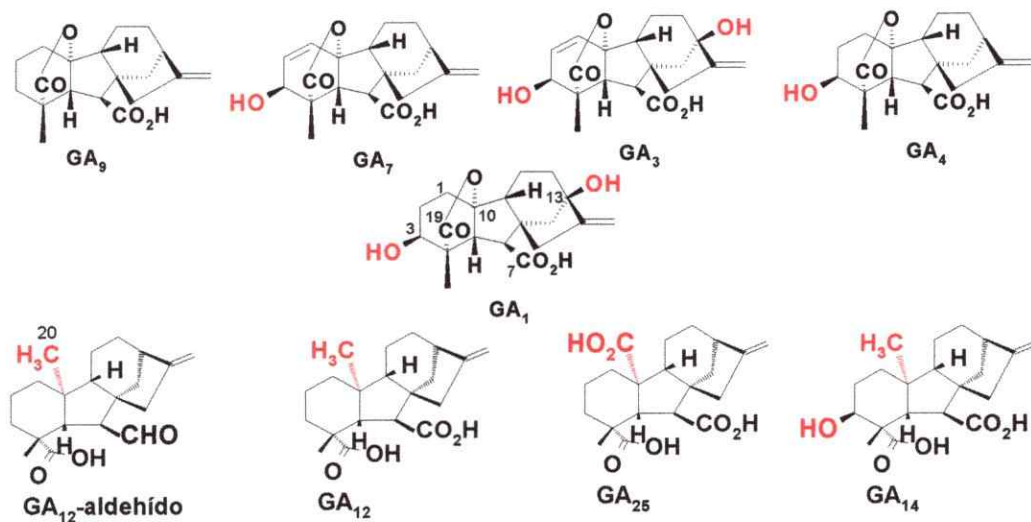
reductase with GA<sub>12</sub> in the presence of [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O or in the presence of a mixture of [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>= 20: 80 it was demonstrated, by GC/MS analysis of the products, that the oxygen atom at C20 of GA<sub>15</sub> comes from molecular oxygen and not from water. Similarly, the oxygen atom at C20 of the aldehyde product GA<sub>24</sub> was found labelled with [<sup>18</sup>O] in incubations with [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>= 20: 80 in contrast to incubations with [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O. These results demonstrate that sequential oxidation of the GA C20 occurs through alcohol and aldehyde intermediates that remain non-covalently bound to P450-2 and discard participation of covalently enzyme-bound intermediates in this reaction. Alcohol and aldehyde intermediates would dissociate from the enzyme under conditions of low electron flow as with P450-2/cyt b5: cyt b5 reductase. In general C20 alcohol and C20 aldehyde GAs were not metabolized when added externally which evidences low affinity of these precursors towards P450-2. Finally, the absence of lactonic product in the reactions catalyzed by P450-2/cyt b5: cyt b5 reductase suggests participation of an additional intermediate in the oxidation sequence to CO<sub>2</sub> that would involve an enzyme residue in contrast to oxidation to carboxylate.

The results obtained in this work contribute to the understanding of oxidation reactions catalyzed by P450-2 as well as to the chemical characterization of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. P450-2 sequential oxidation mechanism that involves an heme iron center in 19γ, 10 lactone synthesis, is similar to that of plant C20 oxidases that utilize a non heme iron to catalyze the same reaction. Oxidation sequence, intermediates, final products and catalytic requirements are comparable in both systems which can be attributed to the participation of the same oxidizing oxyferryl iron species.

**CAPITULO 1**  
**INTRODUCCIÓN**

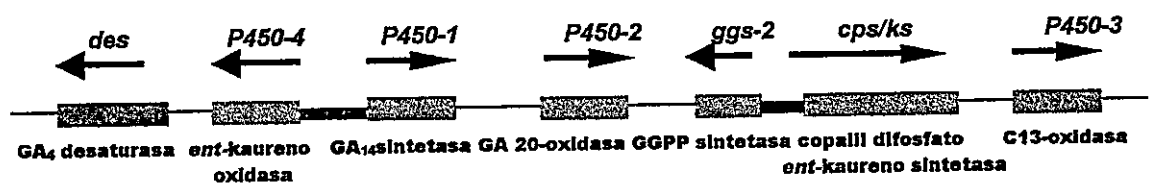
## 1. INTRODUCCIÓN

El hongo filamentoso *Gibberella fujikuroi* es un eficiente productor de metabolitos secundarios entre los que se encuentran las giberelinas, las moniliforminas y las bikaverinas (Leslie et. al., 1995; Brückner y Blechshmidt, 1991). Las giberelinas (GAs) son diterpenos tetracíclicos que se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas superiores y en algunos hongos (MacMillan, 2002). En las plantas son hormonas que regulan múltiples aspectos del desarrollo y crecimiento vegetal como el crecimiento de tallos, el crecimiento de frutos, la floración y la germinación de las semillas, en tanto que en hongos son metabolitos secundarios cuya función no se conoce (Hedden, 2003; Graebe, 1987). Hasta la fecha se han descrito más de 130 GAs pero solo 4, todas moléculas de 19 átomos de carbono que contienen la función 19 $\gamma$ ,10 lactona (C19-GAs), presentan actividad biológica (GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>7</sub>). El resto de las giberelinas tienen 20 carbonos (C20-GAs) y son precursoras de las GAs bioactivas o bien corresponden a productos del catabolismo de las giberelinas lactónicas (Fig. 1).



**Figura 1:** Estructura de las giberelinas bioactivas (C19-GAs) y de sus precursoras (C20-GAs).

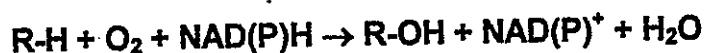
Sólo tres especies de hongos sintetizan giberelinas: *Gibberella fujikuroi*, *Sphaceloma manihoticola* y *Phaeosphaeria* sp. (Rademacher, 1994; 1997). Entre éstos *G. fujikuroi* es el más eficiente productor (Tudzynski et. al., 1999), acumulando en el medio de cultivo altas concentraciones del producto principal ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), del orden de gramos por litro en condiciones óptimas de producción (Brückner y Blechshmidt, 1991). Este hongo sintetiza además las giberelinas GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>, también activas como fitohormonas (MacMillan, 1997). Aunque en realidad no se conoce la función de las GAs en el hongo, éste ha sido utilizado durante décadas como un excelente productor de estos diterpenos, que se utilizan en distintos procesos agrícolas, para incrementar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Carlson y Croveti, 1988; Ben-Tal, 1990; Popeone y Barrit, 1988). Recientemente se ha caracterizado a escala molecular el proceso de síntesis de GA<sub>3</sub> en *G. fujikuroi*, aislándose y caracterizándose los respectivos genes y enzimas (Tudzynski y Hölter, 1998; Tudzynski et. al., 2001; Rojas et. al., 2001; Tudzynski et. al., 2002; Tudzynski et. al., 2003). Los genes de la síntesis de GAs se encuentran agrupados en el cromosoma IV del hongo formando un "cluster" (Tudzynski y Hölter, 1998; Hedden et. al., 2002). Son 7 genes que codifican para las enzimas que catalizan 15 etapas específicas de esta vía metabólica (Fig. 2 y Fig. 3).



**Figura 2:** Mapa físico del cluster de genes de la síntesis de GAs en *Giberella fujikuroi*

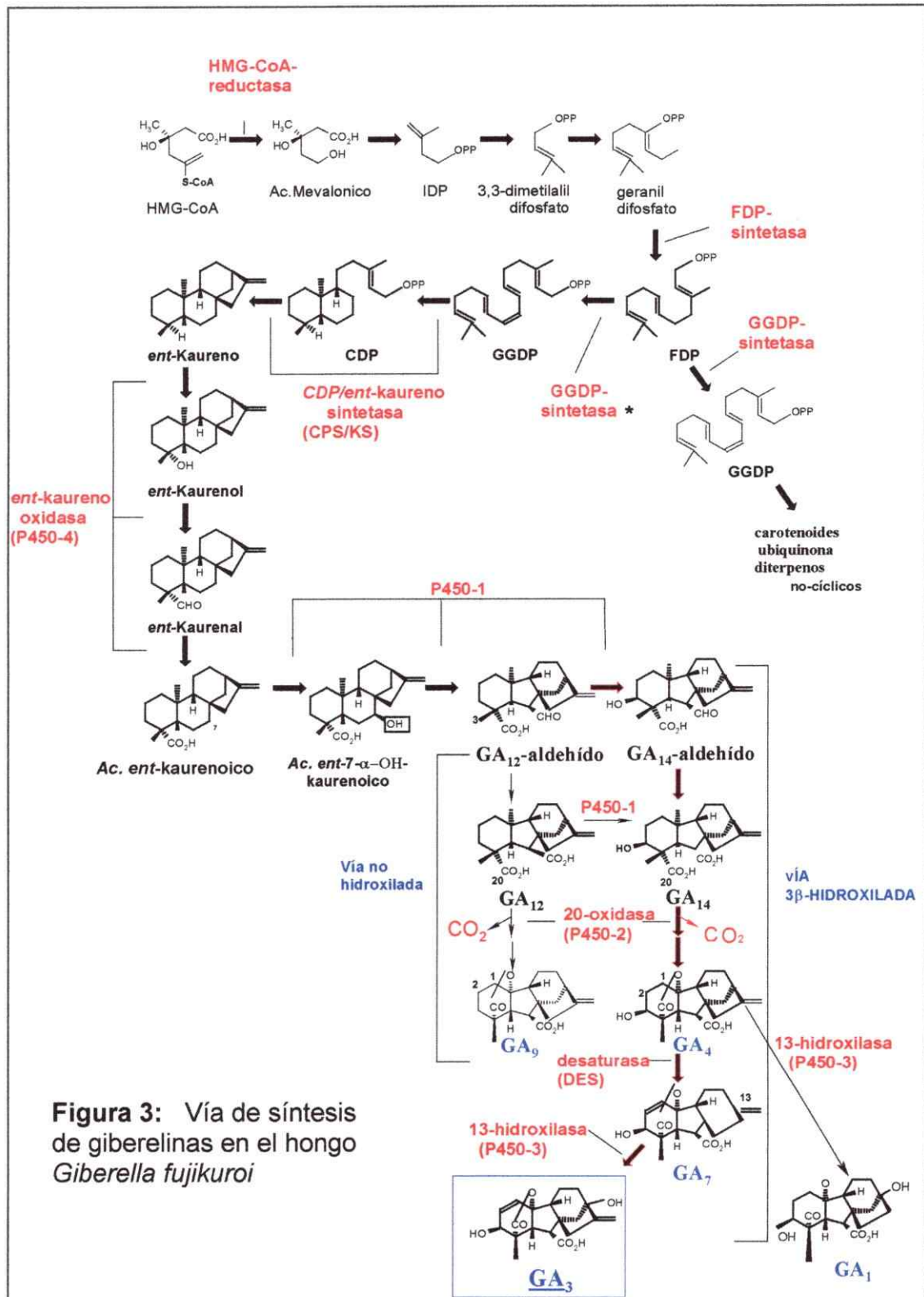
Cuatro de estos genes codifican para las monooxigenasas relacionadas con el citocromo P450 (P450-1, P450-2, P450-3 y P450-4), las que catalizan 11 de estas 15 etapas (Fig. 3). En *G. fujikuroi* la vía de síntesis de GAs es un

proceso que se lleva a cabo asociado a las membranas del retículo endoplásmico. Está organizado en base a monooxigenasas P450, enzimas que contienen hierro hemínico, utilizan oxígeno molecular y que requieren electrones para la oxidación. Los electrones son aportados por proteínas transportadoras asociadas a las monooxigenasas.



La citocromo P450 reductasa (CPR) es la principal proteína transportadora de electrones asociada a las monooxigenasas de GAs en *G. fujikuroi* y los transporta desde el NADPH hasta el centro hemínico de los P-450 para llevar a cabo la reacción de oxidación (Donaldson y Luster, 1991).

Las reacciones químicas involucradas en la secuencia de biosíntesis de GAs en *G. fujikuroi* fueron identificadas en los años 70 mediante la administración de precursores marcados con [<sup>14</sup>C] o [<sup>2</sup>H] a los cultivos del hongo e identificando los productos desde el medio extracelular (Cross et. al, 1968; Bearder et. al., 1975; Hedden, 1978). En general la ruta consiste en 2 reacciones de ciclación seguidas por numerosas reacciones de oxidación, partiendo con el geranylgeranyl difosfato (GGPP) que se forma a partir del ácido mevalónico (MacMillan, 1997). Se distinguen tres fases en la secuencia: a) la formación del primer intermediario tetracíclico, el *ent*-kaureno a partir de GGPP, b) la oxidación del *ent*-kaureno hasta GA<sub>12</sub> aldehído, el primer intermediario con el esqueleto del giberelano y c) la conversión de GA<sub>12</sub> aldehído en GAs lactónicas (Fig. 3).



La síntesis del *ent*-kaureno está asociada con el gen *cps/ks*, que codifica para la *ent*-kaureno sintetasa, que cataliza dos reacciones de ciclación a través del intermediario copalil difosfato (Tudzynski et. al., 1998). El producto de esta reacción, es oxidado en tres etapas hasta ácido *ent*-kaurenoico (KA) por la oxidasa codificada por el gen *P450-4* (Tudzynski et. al., 2001). Posteriormente la GA<sub>14</sub> sintetasa, codificada por el gen *P450-1*, cataliza la oxidación de la posición 7 del ác. *ent*-kaurenoico, la contracción del anillo B y la hidroxilación en la posición 3 para generar la giberelina GA<sub>14</sub>, precursora directa de las GAs lactónicas (Rojas et. al., 2001). La oxidación secuencial del carbono 20 que se encuentra como metilo en GA<sub>14</sub>, hasta CO<sub>2</sub> permite la formación de la función lactona. Esta reacción es catalizada por la monooxigenasa *P450-2* (Tudzynski et. al., 2002). Las etapas finales de la biosíntesis del ác. giberélico, consisten en la introducción de una insaturación en la posición 1,2 y la hidroxilación en C13 por la monooxigenasa *P450-3* (Tudzynski et. al., 2003), para dar el producto final GA<sub>3</sub>.

La generación de la función lactona mediante la oxidación de C20 por parte de la monooxigenasa *P450-2* (C20 oxidasa), es una de las etapas más importantes en la secuencia de síntesis de GAs, ya que esta característica es fundamental para que las GAs tengan una actividad biológica y puedan cumplir su rol en la planta como fitohormonas. Las reacciones catalizadas por la monooxigenasa *P450-2* fueron investigadas en la mutante de delección de *G. fujikuroi* SG139 la cual carece de los genes de la síntesis de GAs, pero que fue complementada con el gen *P450-2* (Tudzynski et. al., 2002; Hedden et. al, 2002). La transformante SG139-*P450-2* permitió estudiar a la C20 oxidasa sin interferencia de las otras enzimas de la vía. *P-450-2* cataliza la transformación del precursor 3β-hidroxilado [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> en dos productos: [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub>, la 19γ, 10 lactona, que es el producto principal y [<sup>14</sup>C]GA<sub>13</sub>, el ác. tricarbóxico, que se forma en menor concentración. La oxidación del metilo 20 hasta CO<sub>2</sub> genera el producto lactónico de 19 átomos de carbono, en tanto que la oxidación

alternativa del metilo hasta carboxilato produce la giberelina [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>13</sub> de 20 átomos de carbono. La C20 oxidasa del hongo también utiliza como sustrato el precursor no hidroxilado [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> dando los productos [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> (C19 lactona) y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub> (ác. tricarbóxico) en la proporción de 3:1. El patrón de GAs producidas por el hongo indica que no se acumulan intermediarios con el C20 parcialmente oxidado al estado de alcohol, aldehído o sus equivalentes (MacMillan, 1997) que se esperaba que participaran en las reacciones de oxidación mediadas por la monooxigenasa P450-2. Además, con la mutante B1-41a se encontró que las GAs C20 alcohol agregadas al medio de cultivo se recuperaron intactas después de una incubación de 3 días (Bearder et. al., 1975). No está claro para esta reacción que tipo de intermediarios se forman.

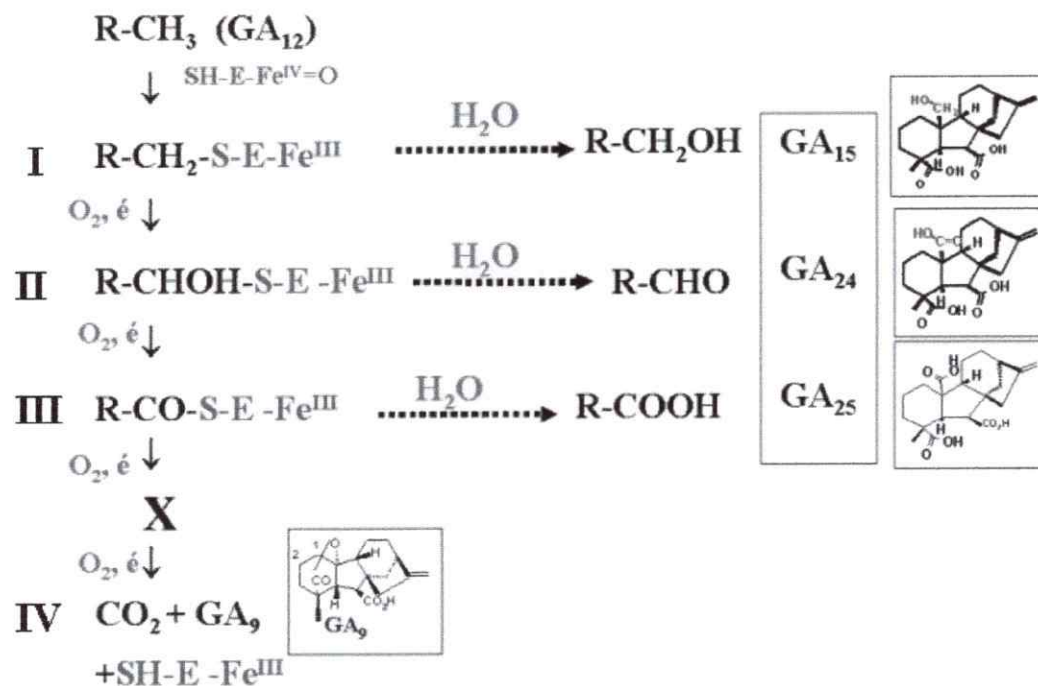
En plantas, la oxidación del C20 de las GAs es catalizada por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (MacMillan, 1997; Lange et. al., 1994; Hedden y Phillips, 2000; Hedden, 2003) que utilizan esencialmente la misma especie oxidativa que las monooxigenasas P450, la especie oxoferrilo (Sono et. al., 1996). A diferencia de la C20 oxidasa de *G. fujikuroi*, para las C20 oxidasas de plantas se ha demostrado inequívocamente que participan intermediarios C20 alcohol y C20 aldehído durante la síntesis de las GAs lactónicas (MacMillan, 1997). Éstos se acumulan en concentraciones apreciables en el medio de reacción cuando se incuban extractos enzimáticos vegetales parcialmente purificados, con precursores marcados (Lange et. al., 1994; 1997) y además son eficientemente metabolizados por las dioxigenasas para dar los productos finales 19 $\gamma$ ,10 lactona y ác. tricarbóxico (Lange et. al., 1997). La pérdida de CO<sub>2</sub> ocurre desde el C20 aldehído a través de un radical centrado en C10 que ha sido evidenciado por los productos de metabolización de análogos de GAs hemiacetálicos (Ward et. al., 2002). Se requieren dos ciclos oxidativos para formar CO<sub>2</sub> desde el aldehído, y se ha propuesto que participaría en esta secuencia un intermediario tioéster unido a la enzima (Hedden, 1997; Ward et. al., 2002).



Aunque se ha demostrado que la síntesis de la función 19 $\gamma$ ,10 lactona por el sistema fúngico involucra la oxidación hasta CO<sub>2</sub> como producto principal, no se ha establecido hasta la fecha el mecanismo detallado de esta reacción (Tudzynski et. al., 2002). Los primeros estudios con cultivos de *G. fujikuroi* demostraron que el carbono 20 se pierde como CO<sub>2</sub> (Dockerill y Hanson, 1978) y que ambos oxígenos de la lactona provienen del carboxilato en C19 (Bearder et. al., 1976). Sorprendentemente, las GAs C20 alcohol y C20 aldehído que no se forman durante la oxidación del C20 en cepas silvestres del hongo que contienen citocromo P450 reductasa (CPR; MacMillan, 1997) se encontraron como productos principales en las mutantes que carecen de CPR;  $\Delta$ CPR y SG138 (Malonek et. al., 2004). Las giberelinas C20 alcohol y C20 aldehído podrían corresponder a intermediarios de la C20 oxidasa, aunque esto no ha sido aun demostrado. El hecho de que no se encuentren intermediarios parcialmente oxidados en C20 entre las GAs endógenas y su falta de metabolización por la mutante B1-41a llevó a postular que la oxidación de C20 en el hongo transcurriría a través de intermediarios unidos covalentemente a un residuo de aminoácido del sitio activo de la monooxigenasa P450-2 (Tudzynski et. al., 2002, Malonek et. al., 2004). Estos intermediarios se hidrolizarían en ausencia de la CPR generando las GAs alcohol y aldehído detectadas (Fig. 4).

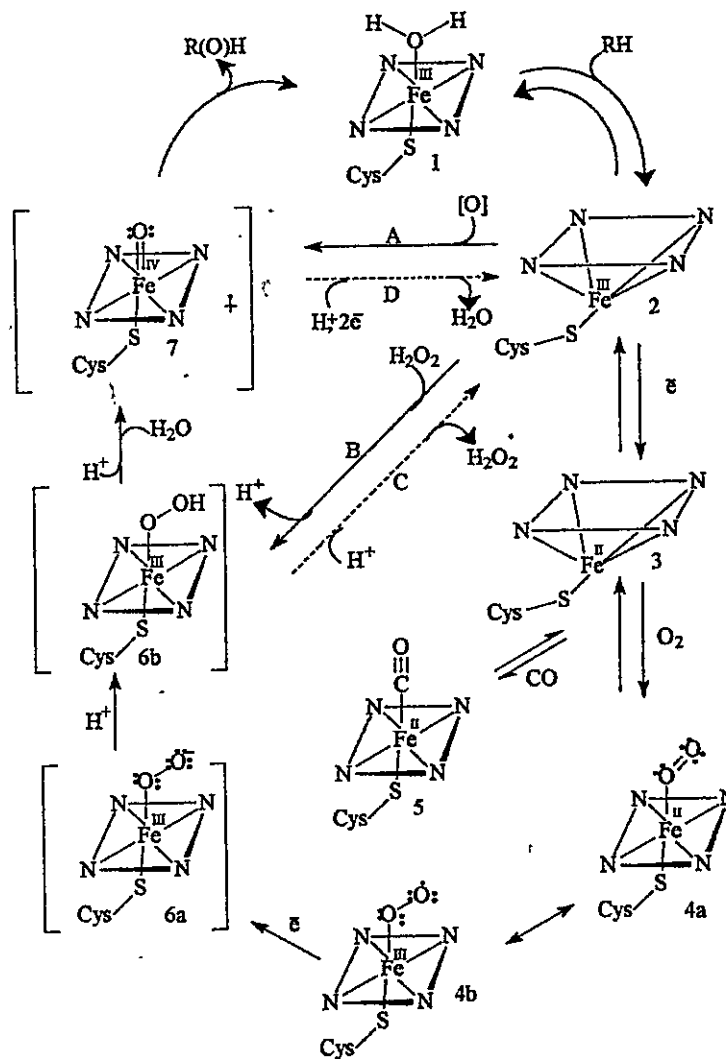
**COMPLEJO P450-2/CPR**

**COMPLEJO P450-2 /cit b5:b5 REDUCTASA**



**Figura 4:** Mecanismo, a través de intermediarios unidos covalentemente a la C20 oxidasa de *G. fujikuroi*, postulado para explicar la formación de giberelinas C20 alcohol, C20 aldehído y C20 carboxílico.

Una dificultad en la demostración de los intermediarios que participan en esa reacción se refiere al mecanismo de acción de las monooxigenasas P450 (Sono et. al., 1996), en que la giberelina es el primer sustrato y el último producto de cada ciclo catalítico, por lo que los intermediarios no necesitarían disociarse de la enzima durante la oxidación secuencial del metilo (Fig. 5; Sono et. al., 1996).



**Figura 5:** Ciclo catalítico de las monooxigenasas P450 (RH = giberelina).

Además, en presencia de la CPR, el principal sistema transportador de electrones presente en el hongo, el eficiente flujo de electrones contribuiría a que las GAs parcialmente oxidadas no se disocien desde la enzima. Recientemente se demostró que existe un segundo sistema transportador de

electrones asociado a las monooxigenasas de giberelinas en *G. fujikuroi* que correspondería al sistema citocromo b5: citocromo b5 reductasa (cit b5: cit b5 reductasa (Rojas et al, resultados no publicados). Este sistema, que aporta electrones desde el NADH, da cuenta de la biosíntesis de GAs en ausencia de la P450 reductasa.

En este trabajo de Tesis se abordó la demostración de intermediarios para la reacción de oxidación de C20 de las GAs en *G. fujikuroi* utilizando dos tipos de complejos enzimáticos: el complejo P450-2/CPR y el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. Para esto, utilizando precursores marcados con [ $^{14}\text{C}$ ] y [ $^2\text{H}$ ], se investigó la formación de productos oxidados en C20 y se caracterizaron cada una de las etapas de la secuencia de oxidación. Además, se determinó en ambos complejos la eficiencia de la reacción de oxidación, así como el origen del átomo de oxígeno en C20 de las GAs alcohol y aldehído a través de la metabolización de  $\text{GA}_{12}$  en presencia de [ $^{18}\text{O}$ ] $\text{H}_2\text{O}$  ó de una atmósfera de [ $^{18}\text{O}$ ] $\text{O}_2$ :  $\text{N}_2 = 20: 80$ . El conjunto de resultados obtenidos permitió identificar los intermediarios que participan en la síntesis de las giberelinas 19 $\gamma$ , 10 lactónicas en *G. fujikuroi*.

## HIPÓTESIS

La oxidación del grupo metilo ubicado en la posición 20 de las giberelinas en *Gibberella fujikuroi*, que lleva a la formación de las giberelinas lactónicas bioactivas, ocurriría a través de intermediarios unidos covalentemente a la monooxigenasa que cataliza esta reacción (P450-2; C20 oxidasa). Las giberelinas C20 alcohol y C20 aldehído se formarían por hidrólisis de estos intermediarios covalentes.

## OBJETIVO GENERAL

Demostrar la participación de intermediarios en la reacción de formación de la función 19 $\gamma$ , 10 lactona de las giberelinas catalizada por la C20 oxidasa en *Gibberella fujikuroi*.



## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los productos de oxidación del metilo 20 de las GAs [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> por la oxidasa P450-2 asociada a la P450 reductasa (CPR). Aislar los productos e identificarlos por GC/MS. Investigar la formación de intermediarios.

Investigar la metabolización de las GAs C20 alcohol ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub>) y C20 aldehído ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub>) por el mismo complejo enzimático.

Identificar los productos de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> por la C20 oxidasa asociada al sistema citocromo b5: citocromo b5 reductasa. En estas condiciones la oxidación del C20 funciona a velocidad reducida con respecto al complejo P450-2/CPR. Investigar la acumulación de intermediarios.

Identificar los productos de oxidación de las GAs C20 alcohol ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub>) y C20 aldehído ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub>) por el complejo P450-2/citocromo b5: citocromo b5 reductasa.

Investigar el origen del oxígeno presente en el grupo C20 alcohol de las GAs GA<sub>15</sub> y/o GA<sub>37</sub> formadas a partir de GA<sub>12</sub> y GA<sub>14</sub> respectivamente, en medios de reacción conteniendo: a) [ $^{18}\text{O}$ ]H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>; b) H<sub>2</sub>O + [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub>; c) H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>. Después de una incubación de tres días se aislarán los productos y analizará en ellos el contenido de [ $^{18}\text{O}$ ] por GC/MS.

Determinar el efecto de [ $^2\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O sobre el patrón de productos formados a partir de GA<sub>12</sub> por la C20 oxidasa.

**CAPITULO 2**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron son de grado pro análisis, exceptuando al metanol que es grado HPLC.

### 2.2. Síntesis de precursores de GAs marcados con [ $^{14}\text{C}$ ] ó [ $^2\text{H}$ ]

Los precursores ácido *ent*-[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi-[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub>-aldehído y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> fueron sintetizados a partir de ácido 2-[ $^{14}\text{C}$ ]mevalónico con un preparado enzimático de endosperma de calabaza, que contiene altos niveles de las enzimas de la biosíntesis de GAs (Graebe et al., 1974). El precursor [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> se preparó incubando [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> aldehído con un cultivo de la transformante SG139-P450-1 de *G. fujikuroi* (Rojas et al., 2001). La giberelina [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> fueron sintetizadas químicamente y donadas por el Dr. Peter Hedden (Rothamsted Research, UK). Las giberelinas deuteradas [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub>, fueron gentilmente facilitadas por el Dr. Peter Hedden.

### 2.3. Cepas de *Gibberella fujikuroi*

La cepa silvestre ACC917 de *G. fujikuroi*, que contiene el complejo P4502/CPR, fue obtenida de la colección de cultivos fúngicos (Weimar, Alemania). La mutante de disrupción  $\Delta\text{CPR}$ , que contiene el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa fue preparada por la Dra. Bettina Tudzynski (Instituto de Botánica, Universidad de Münster, Münster, Alemania). En la mutante de disrupción  $\Delta\text{CPR}$  el gen completo *cpr* se reemplazó por un vector de disrupción (Malonek et al., 2004), por lo tanto no contiene P450 reductasa. La mutante



SG138 que contiene una CPR no funcional fue donada por el Dr. J. Avalos (Universidad de Sevilla, España). Esta mutante SG138 tiene una mutación puntual en el gen *cpr*, en el sitio de NADPH (Barrero et. al., 2001).

#### 2.4. Condiciones de cultivo

Las cepas fueron mantenidas en agar papa dextrosa a 4°C y posteriormente fueron inoculadas a 100 mL de medio líquido 40 % ICI (Geissman et al., 1966). Este contiene 1.92 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 80 g/L de glucosa, 5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% de solución de elementos traza (100 mL contiene: 0.01g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.015 g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.161 g de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.01 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ). El cultivo se mantuvo por 3 días con agitación orbital (150 rpm) a 28° C para permitir el crecimiento del micelio y se traspasó luego a un medio ICI 0% (sin  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), condiciones en que se induce la síntesis de giberelinas. El traspaso se realizó separando el micelio por filtración y luego lavándolo con medio 0% ICI, para transferir finalmente una alícuota a un matraz erlenmeyer de 25mL, completando hasta 10 mL con el mismo medio fresco.

#### 2.5. Incubación con precursores isotópicamente marcados.

Los cultivos se hicieron crecer en 40% ICI por tres días y luego fueron transferidos a un medio 0% ICI. Se agregó una alícuota de 1 mL a matraces erlenmeyer de 25 mL, completando hasta 10 mL con el mismo medio y luego se agregaron soluciones metanólicas de los sustratos marcados con  $[^{14}\text{C}]$  (20000 dpm o bien 200000 dpm) o con  $[^2\text{H}]$  (0.1 – 1  $\mu\text{g}$ ) a los cultivos, y se incubaron por 3 días a 28° C con agitación. La reacción se detuvo separando los sustratos no metabolizados y los productos del micelio por filtración en un tubo cónico Falcon provisto de una jeringa que contiene un filtro de papel. El filtrado fué

acidificado hasta pH 3.0 con HCl 2N y se extrajo con acetato de etilo tres veces. Las fases orgánicas se evaporaron a presión reducida en un Rotavapor R10 (Büchi). Las GAs obtenidas, se disolvieron en 2 mL de una solución 20 % metanol/agua acidificada a pH 3,0 y se aplicaron a columnas C18 (cartuchos Bakerbond C18 J. T. Baker). Las columnas se activaron con 2 mL de metanol, se equilibraron con 2 mL de agua acidificada a pH 3.0, luego se aplicó la muestra, se lavó la columna con 2 mL de agua acidificada a pH 3.0 y finalmente se eluyeron las GAs con 2 mL de metanol. Las GAs purificadas por extracción en fase sólida fueron separadas por HPLC.

## **2.6. Condiciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Los análisis de HPLC se realizaron en un instrumento Waters 600 usando una columna de fase reversa C18 (Symmetry, Waters). Las GAs se separaron usando una gradiente lineal de 60 a 100 % de MeOH/H<sub>2</sub>O pH 3.0 de 30 min. El flujo fué de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió la radiactividad por centelleo líquido. Los productos se identificaron por co-cromatografía con estándares de GAs marcadas con [<sup>14</sup>C] o bien fueron derivatizados para identificarlos por GC/MS.

## **2.7. Identificación de los productos de metabolización por GC/MS**

Los productos separados por HPLC fueron metilados con diazometano y silylados con N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) para obtener los derivados volátiles (Urrutia et al., 2001). Éstos fueron analizados en base a los espectros de masa, comparándolos con los espectros de estándares, y a sus índices de retención de Kovats (Gaskin y MacMillan, 1992). Los análisis se llevaron a cabo en Rothamsted Research, Harpenden, U.K.

## **2.8. Cuantificación de radiactividad por centelleo líquido**

Se utilizó un contador Tracor Analytic modelo delta 300.

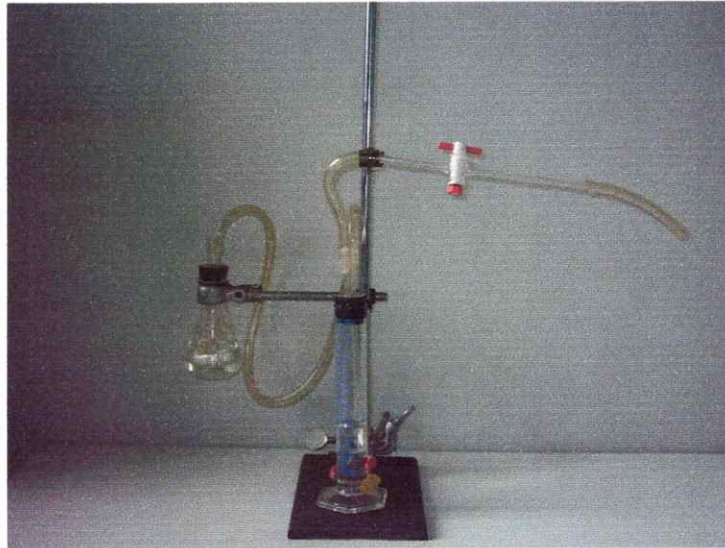
El líquido de centelleo contiene 0.125 g de (1,4-bis[2-(feniloxazolil)]-benceno (POPOP) y 4 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) en 1L de tolueno grado técnico. Esta mezcla se diluyó con 500 mL de detergente (Arcopal) después de su disolución. La eficiencia de conteo para [ $^{14}\text{C}$ ] (muestras metanólicas) es de 97 %.

## **2.9. Cinética de utilización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por cultivos de las cepas: silvestre, SG138 y $\Delta\text{CPR}$**

Se preparó una suspensión del micelio (13 mg/mL de peso seco) en medio 0% ICI y a 10 mL de esta suspensión se le agregó [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> (50.000 dpm). El cultivo se incubó a 30° C y tiempos variables, se sacaron alícuotas de 2 mL las que fueron filtradas para separar el micelio. Los productos marcados y el sustrato residual se aislaron desde el filtrado con acetato de etilo. El solvente se evaporó a sequedad, la muestra se limpió por extracción en fase sólida y las GAs fueron separadas por HPLC.

## **2.10. Incubación del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa con una mezcla de [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub>: N<sub>2</sub> = 20: 80 (aire artificial)**

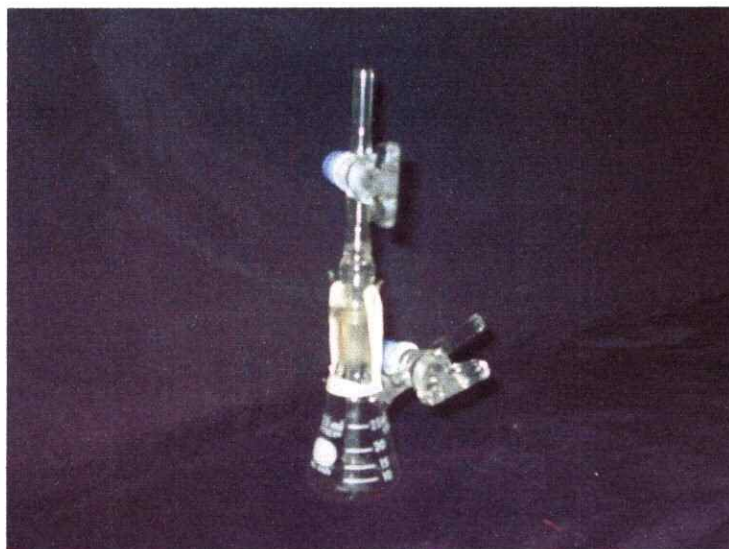
En una probeta conteniendo NaCl saturado (Fig. 6), se preparó una mezcla de aire artificial compuesta por 20 % [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub> y 80 % de N<sub>2</sub>.



**Figura 6:** Equipo utilizado para preparar el aire artificial.

Se preparó desplazando todo el aire atmosférico que se encontraba en el interior de la probeta con una solución saturada de NaCl. Luego se conectó la llave de la probeta a la línea de nitrógeno y se desplazó la solución hasta alcanzar 72 mL. Posteriormente, el mismo procedimiento se utilizó para incorporar el oxígeno molecular (18 mL). El aire artificial fué traspasado a un matraz erlenmeyer acondicionado para este experimento, con salidas esmeriladas conectadas por llaves de paso (Fig. 7), el que contenía una suspensión de micelio de  $\Delta$ CPR (10 mL) en medio 0 % ICI con AMO 1618 como inhibidor de la síntesis endógena de GAs. El matraz se conectó a la trampa de agua por medio de la llave lateral y se aplicó vacío por 30 segundos. Luego se cerró la llave y se conectó el matraz por medio de la llave superior al cilindro de  $N_2$ , para burbujear nitrógeno durante 30 segundos. Este procedimiento de purga se repitió 3 veces. A continuación se agregó el sustrato (50 – 150  $\mu$ L de  $GA_{12}$  ó KA en forma de solución metanólica), se volvió a purgar con vacío y burbujeo de  $N_2$  sucesivamente. El matraz con vacío se conectó al recipiente con aire

artificial y luego de equilibradas las presiones se cerró herméticamente. Se incubó a 28° C con agitación por 1,5 días renovando el aire artificial cada 8 horas. Los productos de metabolización se aislaron como se describió antes y se identificaron por GC/MS



**Figura 7:** Matraz utilizado para las incubaciones en presencia de  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2:\text{N}_2$ .

### **2.11. Metabolización de $\text{GA}_{12}$ por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en presencia de $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ .**

El micelio de la mutante  $\Delta\text{CPR T15}$  que contiene el complejo, crecido durante 3 días en medio 40 % ICI, fue lavado con medio 0 % ICI, el que contenía AMO 1618 (inhibidor de la síntesis endógena de GAs). El micelio fue filtrado para eliminar la mayor cantidad de agua posible, se transfirió a un tubo de ensayo estéril y se adicionó 1 mL de  $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  y 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{GA}_{12}$  (40  $\mu\text{L}$  de solución metanólica). La muestra se agitó a 28° C durante 3 días. Las GAs fueron separadas del medio de cultivo líquido e identificadas por GC/MS.

## 2.12. Metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> en presencia de [ $^2\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O.

El micelio de la mutante  $\Delta\text{CPR T15}$  que contiene el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, crecido durante 3 días en medio 40 % ICI, fue lavado con medio 0 % ICI que contenía AMO 1618, filtrado para eliminar el agua, transferido a un tubo de ensayo estéril y se adicionó [ $^2\text{H}$ ]H<sub>2</sub>O en diferentes porcentajes v/v: 0 %, 30 %, 50 % y 80 %. La diferencia en volumen se completó con medio 0 % ICI. Finalmente se adicionó el sustrato [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> (20.000 dpm) y la muestra se agitó a 28° C durante 3 días. Las GAs obtenidas fueron separadas del medio de cultivo líquido e identificados por GC/MS.

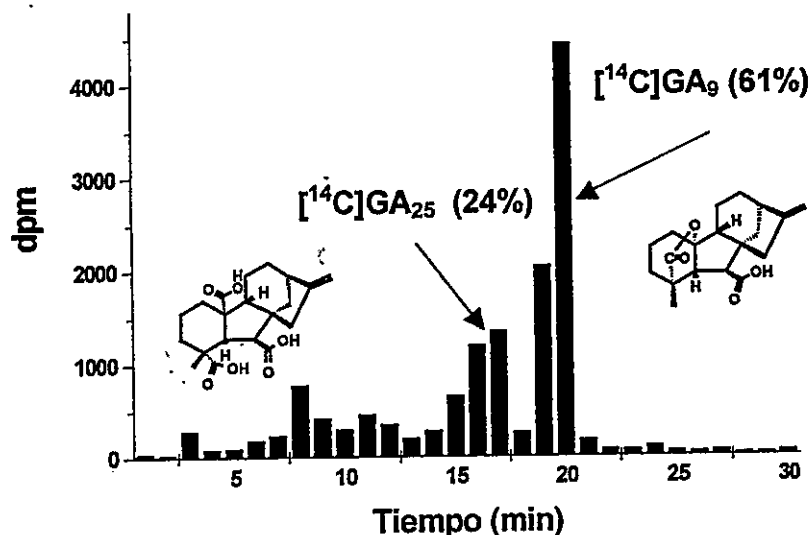
**CAPITULO 3**  
**RESULTADOS**

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PRODUCTOS DE METABOLIZACIÓN DE LA GIBERELINA [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> POR EL COMPLEJO P450-2/ CPR O EL COMPLEJO P450-2/CIT b5: CIT b5 REDUCTASA.

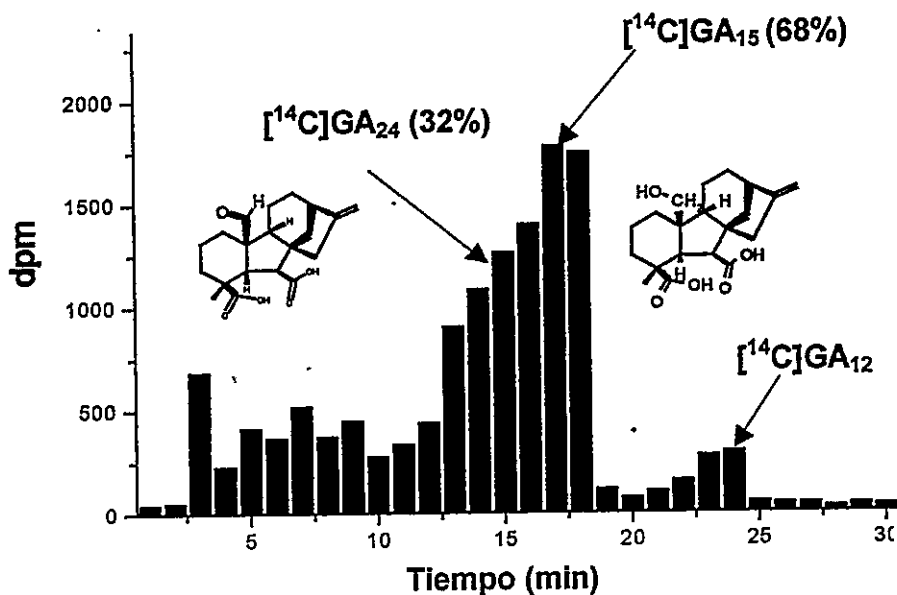
Con el objeto de establecer cómo influye la presencia de P450 reductasa sobre las funciones catalíticas de la C20 oxidasa (P450-2), se determinó el patrón de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por las cepas ACC917 y  $\Delta\text{CPR}$  T15 (mutante de disrupción) de *G. Fujikuroi*, que contienen los complejos P450-2/CPR y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, respectivamente. Se administró [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> a los cultivos líquidos y las GAs generadas fueron aisladas del medio sin nitrógeno después de 3 días de incubación. El análisis por HPLC (Fig. 8) mostró que para el complejo P450-2/CPR los productos de metabolización corresponden a: [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> formado en un 61% (giberelina 19 $\gamma$ ,10 lactónica), y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub> formado en un 24% (C20 carboxilato), los que fueron identificados por GC/MS. [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> se forma por pérdida del carbono 20 debido a la oxidación desde metilo hasta CO<sub>2</sub> con formación de la función 19 $\gamma$ ,10 lactona, en tanto que [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub> mantiene el carbono 20, pero en forma de ác. carboxílico. Este patrón de productos (Tabla 1) coincide con el descrito para la cepa SG139-P450-2 que contiene CPR, en que el principal producto de oxidación de C20 es la giberelina lactónica GA<sub>9</sub> (Tudzynski et.al. 2002). No se detectaron productos parcialmente oxidados en C20 en estas condiciones.





**Figura 8:** Perfil cromatográfico en HPLC de los productos de metabolización de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  por el complejo P450-2/CPR. Los tiempos de retención de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_9$  y  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{25}$  son: 24 min; 20 min y 17 min, respectivamente.

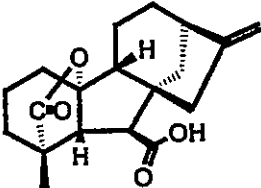
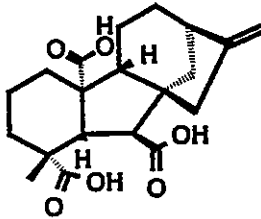
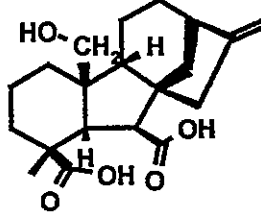
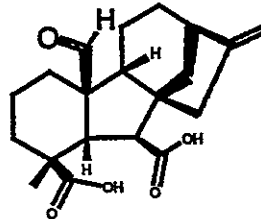
Por otra parte, en la incubación de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  con el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa el análisis de los productos de metabolización demostró que corresponden a GAs parcialmente oxidadas en C20 (Fig. 9). Estos fueron identificadas por GC/MS como:  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$  formado en un 68 % (C20 alcohol) y  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$  formado en un 32 % (C20 aldehído). No se forman GAs  $19\gamma,10$  lactónicas, indicando con esto, que el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa es incapaz de oxidar el metilo 20 hasta  $\text{CO}_2$ , oxidándolo solo hasta C20 alcohol y C20 aldehído. Esto concuerda con las GAs endógenas formadas por la mutante  $\Delta\text{CPR}$ , descritas en estudios previos (Malonek et.al. 2004), que corresponden principalmente a  $\text{GA}_{15}$  y  $\text{GA}_{24}$  (77% y 20% respectivamente), junto a un 0,5 – 2 % de C19-GAs ( $\text{GA}_4$  y  $\text{GA}_7$ ).



**Figura 9:** Perfil cromatográfico en HPLC de los productos de metabolización de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. Los tiempos de retención de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$  y  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$  son: 24 min, 17 min y 15 min, respectivamente:

Los resultados obtenidos resumidos en la tabla 1 muestran grandes diferencias en lo que respecta a las funciones catalíticas de P450-2 en presencia o ausencia de CPR, las que podrían atribuirse a la interacción de la C20 oxidasa con la P450 reductasa o el sistema cit b5: cit b5 reductasa respectivamente.

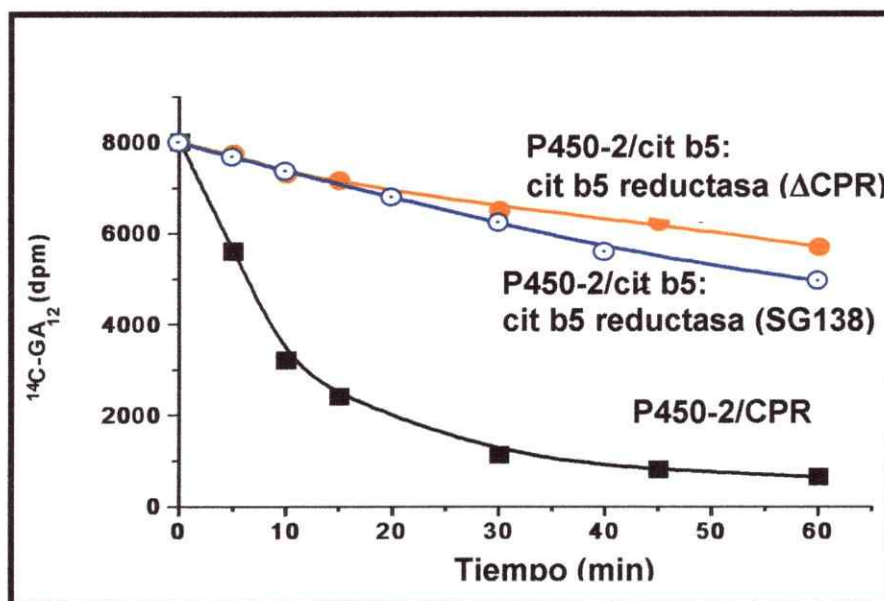
**Tabla 1:** Productos de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por los complejos P450-2/CPR y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa.

COMPLEJO ENZIMÁTICO	SUSTRATO	PRODUCTOS (%)	ESTRUCTURA PRODUCTOS
P450-2/CPR	[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub>	[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>9</sub> (61 %)	
		[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>25</sub> (24 %)	
P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub>	[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>15</sub> (68 %)	
		[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>24</sub> (32 %)	

La acumulación de los productos parcialmente oxidados en C20, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa permitió investigar si estos productos son intermediarios de la reacción de oxidación de C20, aspecto que no se había podido demostrar con el complejo P450-2/CPR, que oxida directamente el C20 metilo hasta CO<sub>2</sub> o alternativamente hasta carboxilato sin acumulación de intermediarios. Además, los productos de metabolización formados por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa sugieren que P450-2 presentaría una baja eficiencia catalítica cuando se encuentra asociada al sistema transportados de electrones cit b5, lo que permitiría la disociación de productos parcialmente oxidados durante la oxidación secuencial.

## 2.2. CINÉTICA DE UTILIZACIÓN DE [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{12}$ POR EL COMPLEJO P450-2/CPR O EL COMPLEJO P450-2/CIT b5: CIT b5 REDUCTASA.

Se investigó la velocidad de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{12}$  por los complejos P450-2/CPR y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, midiendo el decaimiento de este sustrato a distintos tiempos de reacción. [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{12}$  es utilizado por el complejo P450-2/CPR con una velocidad de 400 dpm/min, en tanto que P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, presente en las mutantes  $\Delta\text{CPR}$  y SG138, transforma este sustrato con una velocidad reducida, de 50 dpm/min, un orden de magnitud menor (Fig. 10 y Tabla 2).



**Figura 10:** Cinética de utilización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{12}$  por los complejos P450-2/CPR (—■) y P450-2/cit b5: cit b5 reductasa ( $\Delta\text{CPR}$  —○) y SG138 (—○). 50.000 dpm de [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{12}$  se incubaron con los respectivos complejos y se sacaron alícuotas a distintos tiempos para cuantificar el sustrato remanente por HPLC.

**Tabla 2:** Velocidades relativas de utilización de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> por la monooxigenasa P450-2 asociada a CPR o al sistema cit b5: cit b5 reductasa.

COMPLEJO ENZIMÁTICO	VELOCIDAD RELATIVA	CEPA
P450-2/CPR	1	ACC917
P450-2/cit b5: cit b5 reductasa	0.13	ΔCPR
P450-2/cit b5: cit b 5 reductasa	0.13	SG138

Estos resultados sugieren que el sistema cit b5: cit b5 reductasa es más ineficiente que la CPR en aportar electrones a la monooxigenasa P450-2, y apoya la hipótesis que la asociación de P450-2 con diferentes proteínas transportadoras determinaría la eficiencia catalítica. Se ha descrito que el cit b5 puede tener un rol inhibitor o estimulador al interactuar con algunas citocromo P450 asociado a la CPR, por ejemplo en el metabolismo de metoxiflurano, un fármaco utilizado como anestésico, catalizado por CYP2B4 asociado a la NADPH – citocromo P450 reductasa, muestra un absoluto requerimiento por citocromo b5 (Canova-Davis et. al., 1985). En cambio el metabolismo sostenido por NADPH de benzofetamina por CYP2B4 fue inhibido en presencia de citocromo b5 (Imai y Sato, 1977; Morgan y Coon, 1984). En el caso de P450 – 2 no se encuentran evidencias de este tipo de comportamiento y más bien el cit b5 asociado a la cit b5 reductasa aportaría electrones en ausencia de la CPR.

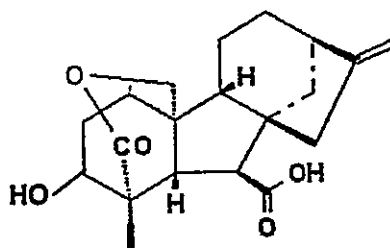
### 3.3. SECUENCIA DE OXIDACIÓN DEL CARBONO 20 DE LAS GIBERELINAS CATALIZADO POR LA MONOOXIGENASA P450-2.

Con el objeto de obtener mayor información acerca de la reacción de oxidación del C20, particularmente acerca de la participación de intermediarios, se investigó en mayor detalle la metabolización de los sustratos [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> (C20 metilo no hidroxilado) y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> (C20 metilo hidroxilado) por ambos complejos enzimáticos. Además, se incubaron ambos complejos con las GAs C20 alcohol y C20 aldehído marcadas isotópicamente ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub>, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub>, [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub> y [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub>), para investigar la posible formación de productos de oxidación posteriores al C20 aldehído detectado en el experimento descrito en la sección anterior con el complejo b5: b5 reductasa (Tabla 3 y Tabla 4). La giberelina 3 $\beta$ -hidroxilada [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> (C20 metilo) fué convertida por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>13</sub> (C20 carboxilato), y el C20 aldehído [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>36</sub>, los que fueron identificados por GC/MS después de derivatizarlas como metil éster ó trimetilsililéter. Este resultado junto con la metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> a [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> más [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> (Tabla 3), demuestra que el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa cataliza la secuencia de oxidación C20 metilo  $\longrightarrow$  C20 alcohol  $\longrightarrow$  C20 aldehído  $\longrightarrow$  C20 ácido carboxílico. El alcohol 3 $\beta$ -hidroxilado [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub> fue también transformado por P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en los productos C20 aldehído [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub> (principal) y C20 carboxilato [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>13</sub> (Tabla 3). No se encontraron C19-GAs en ninguna de estas incubaciones, lo que confirma la incapacidad del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa de catalizar la oxidación del metilo 20 hasta CO<sub>2</sub>. La conversión de [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub> fue mayor a pH = 3,0 que a pH = 5,4 o 6,4, lo que sugiere que la 19 $\delta$ , 20 lactona de GA<sub>37</sub> (Fig. 11) es la especie utilizada por P450-2. El aldehído [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>36</sub> no fue metabolizado por P450-2/cit b5: cit b5 reductasa (Tabla 3), al igual que el C20 alcohol no hidroxilado [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub>.

**Tabla 3:** Productos de oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub>, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> y GAs con distintos grupos funcionales en C20, por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa.

PRECURSOR	Grupo funcional en C20	Productos identificados por GC/MS	Grupo funcional en C20
[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>14</sub>	-CH <sub>3</sub>	[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>14</sub> [ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>36</sub> [ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>13</sub>	-CH <sub>3</sub> -CHO -COOH
[ $^2\text{H}$ ]GA <sub>37</sub>	-CH <sub>2</sub> OH	[ $^2\text{H}$ ]GA <sub>37</sub> [ $^2\text{H}$ ]GA <sub>36</sub> (principal) [ $^2\text{H}$ ]GA <sub>13</sub>	-CH <sub>2</sub> OH -CHO -COOH
[ $^2\text{H}$ ]GA <sub>36</sub>	-CHO	[ $^2\text{H}$ ]GA <sub>36</sub>	No hubo transformación
[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>12</sub>	-CH <sub>3</sub>	[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>15</sub> [ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>24</sub>	-CH <sub>2</sub> OH -CHO
[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>15</sub>	-CH <sub>2</sub> OH	[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>15</sub> [ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>37</sub> (traza)	-CH <sub>2</sub> OH -CH <sub>2</sub> OH (3-OH)
[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>24</sub>	-CHO	[ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>24</sub> [ $^{14}\text{C}_4$ ]GA <sub>25</sub> (baja cantidad)	-CHO -COOH





**Figura 11:** 19 $\delta$ , 20 lactona de la giberelina GA<sub>37</sub>.

La giberelina C20 aldehído no hidroxilada [<sup>14</sup>C]GA<sub>24</sub> fue metabolizada aunque con baja eficiencia al producto C20 carboxilato ([<sup>14</sup>C]GA<sub>25</sub>), lo que confirma la secuencia de oxidación desde C20 metilo al C20 ác. carboxílico para el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa (Tabla 3).

Las trazas de [<sup>14</sup>C]GA<sub>37</sub> (C20 alcohol 3 $\beta$ -OH) detectadas en la incubación con [<sup>14</sup>C]GA<sub>15</sub>, se deben a la actividad residual de 3 $\beta$ -hidroxilasa que presenta la monooxigenasa P450-1, presente en la mutante  $\Delta$ CPR (Tabla 3), que utiliza aunque con baja velocidad a este sustrato.

La tabla 4 muestra la metabolización de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>, [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> y las GAs C20 alcohol y C20 aldehído no hidroxiladas y 3 $\beta$ -hidroxiladas, por el complejo P450-2/CPR. [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> fue metabolizado eficientemente a [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> junto a [<sup>14</sup>C]GA<sub>25</sub>, mientras que [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> se transformó en [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub> y [<sup>14</sup>C]GA<sub>13</sub>. Estos productos corresponden a las 19 $\gamma$ ,10 lactonas y ac. tricarbóxicos, respectivamente (Tabla 4). Con respecto a los intermediarios, éstos no son utilizados por el complejo P450-2/CPR, excepto [<sup>14</sup>C]GA<sub>24</sub>, a diferencia de lo que ocurre con el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. [<sup>14</sup>C]GA<sub>24</sub> fue transformado en el producto C20 carboxilato [<sup>14</sup>C]GA<sub>25</sub> y no en la C19-GA [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> (Tabla 4).

Los resultados anteriores indican que en presencia del sistema transportador de electrones asociado al cit b5: cit b5 reductasa, P450-2 cataliza

Los resultados anteriores indican que en presencia del sistema transportador de electrones asociado al cit b5: cit b5 reductasa, P450-2 cataliza la oxidación del metilo 20 principalmente hasta C20 alcohol y C20 aldehído, junto a una concentración menor del producto C20 carboxilato. Esta secuencia de oxidación es muy diferente a la que presenta el complejo P450-2/ CPR en la que el metilo 20 forma directamente CO<sub>2</sub> como producto mayoritario y C20 carboxilato como producto lateral, sin acumulación de las GAs C20 alcohol y C20 aldehído.

**Tabla 4:** Metabolización de GAs C20 metilo, C20 alcohol y C20 aldehído por el complejo P450-2 /CPR.

PRECURSOR	Grupo funcional en C20	PRODUCTOS (%)	Grupo funcional en C20
[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>12</sub>	-CH <sub>3</sub>	[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>9</sub> (69) [ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>25</sub> (31)	CO <sub>2</sub> -COOH
[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>15</sub>	-CH <sub>2</sub> OH	No hubo transformación	
[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>24</sub>	-CHO	[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>25</sub> (54)	-COOH
[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>14</sub>	-CH <sub>3</sub>	[ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>4</sub> (80) [ <sup>14</sup> C <sub>4</sub> ]GA <sub>13</sub> (20)	CO <sub>2</sub> -COOH
[ <sup>2</sup> H]GA <sub>37</sub>	-CH <sub>2</sub> OH	No hubo transformación	
[ <sup>2</sup> H]GA <sub>36</sub>	-CHO	No hubo transformación	

### 3.4. ORIGEN DEL ÁTOMO DE OXÍGENO EN LOS PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE C20 POR LA MONOOXIGENASA P450-2.

Para definir si los productos C20 alcohol y C20 aldehído son intermediarios en la oxidación del carbono 20 o bien se forman por hidrólisis de intermediarios unidos covalentemente a la enzima, se investigó el origen del átomo de oxígeno en GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> formados, por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa.

Se agregó GA<sub>12</sub> no marcado (10 µg) a cultivos de la mutante ΔCPR, que contiene el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, suspendidos en [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O o alternativamente mantenidos bajo una atmósfera de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80, en presencia de AMO 1618 como inhibidor de la síntesis endógena de GAs (Tabla 5). Paralelamente se hicieron incubaciones con [<sup>16</sup>O]H<sub>2</sub>O o bien bajo una atmósfera de [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80, como controles del experimento anterior. La hidrólisis de intermediarios unidos covalentemente a P450-2 debería dar incorporación de [<sup>18</sup>O] a GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> desde [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O, a diferencia de la oxidación secuencial sobre intermediarios unidos no covalentemente a la enzima, en que el oxígeno incorporado en C20 de GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> provendría de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub>.

En presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O, el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa metabolizó completamente el GA<sub>12</sub>, para dar los productos GA<sub>15</sub> (Fig. 12), GA<sub>24</sub> (Fig. 13) y bajos niveles de las GAs 3β- hidroxiladas GA<sub>36</sub>, GA<sub>37</sub> y GA<sub>13</sub> (Tabla 5). En presencia de [<sup>16</sup>O]H<sub>2</sub>O se formaron los mismos productos.

**Tabla 5:** Productos de metabolización de GA<sub>12</sub> por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa, formados en presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O o de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub>.

Sustrato	Condiciones de reacción	Productos	Contenido de <sup>18</sup> O*
GA <sub>12</sub>	H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O	GA <sub>12</sub> (traza); GA <sub>15</sub> ; GA <sub>24</sub> ; GA <sub>38</sub> (traza); IsoGA <sub>14</sub> GA <sub>37</sub> (traza)	No se detectó <sup>18</sup> O en estos productos
GA <sub>12</sub>	H <sub>2</sub> <sup>16</sup> O	GA <sub>12</sub> (traza); GA <sub>15</sub> ; GA <sub>24</sub> ; GA <sub>38</sub> (traza) GA <sub>37</sub> (traza)	(-)
GA <sub>12</sub>	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> = 20:80	*GA <sub>15</sub> *GA <sub>24</sub> *GA <sub>25</sub> (traza)	Un átomo de <sup>18</sup> O (100%) Un átomo de <sup>18</sup> O Un átomo de <sup>18</sup> O
GA <sub>12</sub>	<sup>16</sup> O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> = 20:80	GA <sub>15</sub> GA <sub>24</sub> GA <sub>25</sub> GA <sub>13</sub> (traza)	(-)

La comparación de los espectros de masa obtenidos bajo ambas condiciones, demostró que no hubo incorporación de [<sup>18</sup>O] desde [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O al GA<sub>15</sub> (Fig. 12) o al GA<sub>24</sub> (Fig. 13). Por el contrario, GA<sub>15</sub> (Fig. 14) o GA<sub>24</sub> (Fig. 15) formados bajo una atmósfera de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub>, contenían la marca de [<sup>18</sup>O]. La comparación de sus espectro de masa con los de GA<sub>15</sub> (no mostrado) o GA<sub>24</sub> (no mostrado) formados en presencia de [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 y con los formados en presencia de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub>, demostró que GA<sub>15</sub> contiene un átomo de [<sup>18</sup>O] el que fue incorporado con un 100 % de eficiencia (Fig. 14). El producto C20 aldehído también incorporó un átomo de [<sup>18</sup>O] en C20 aunque con una menor eficiencia (Fig. 15), probablemente debido al intercambio con el [<sup>16</sup>O]H<sub>2</sub>O de la solución.



Figura 12: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de GA<sub>12</sub> en la incubación con <sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O.

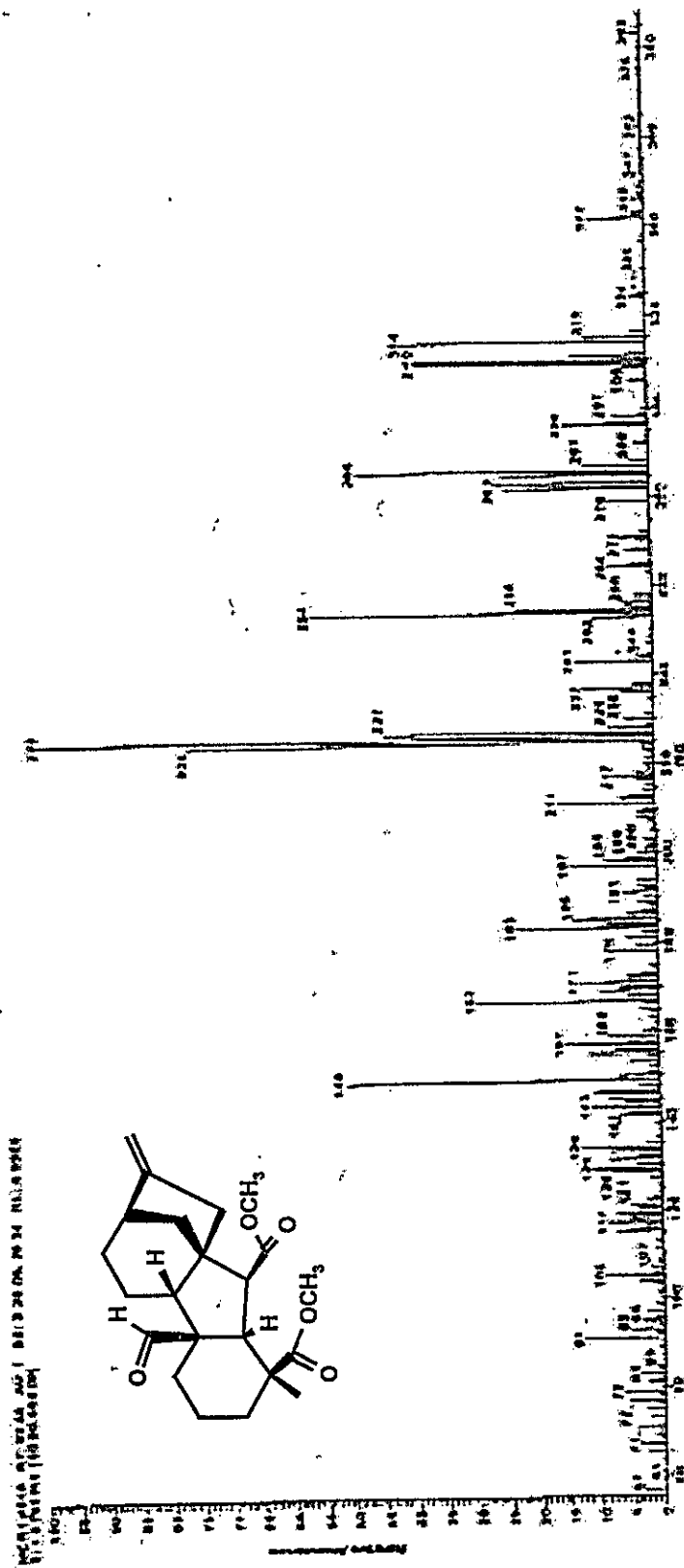


Figura 13: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>12</sub> proveniente de GA<sub>24</sub> proveniente de la incubación con [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O.

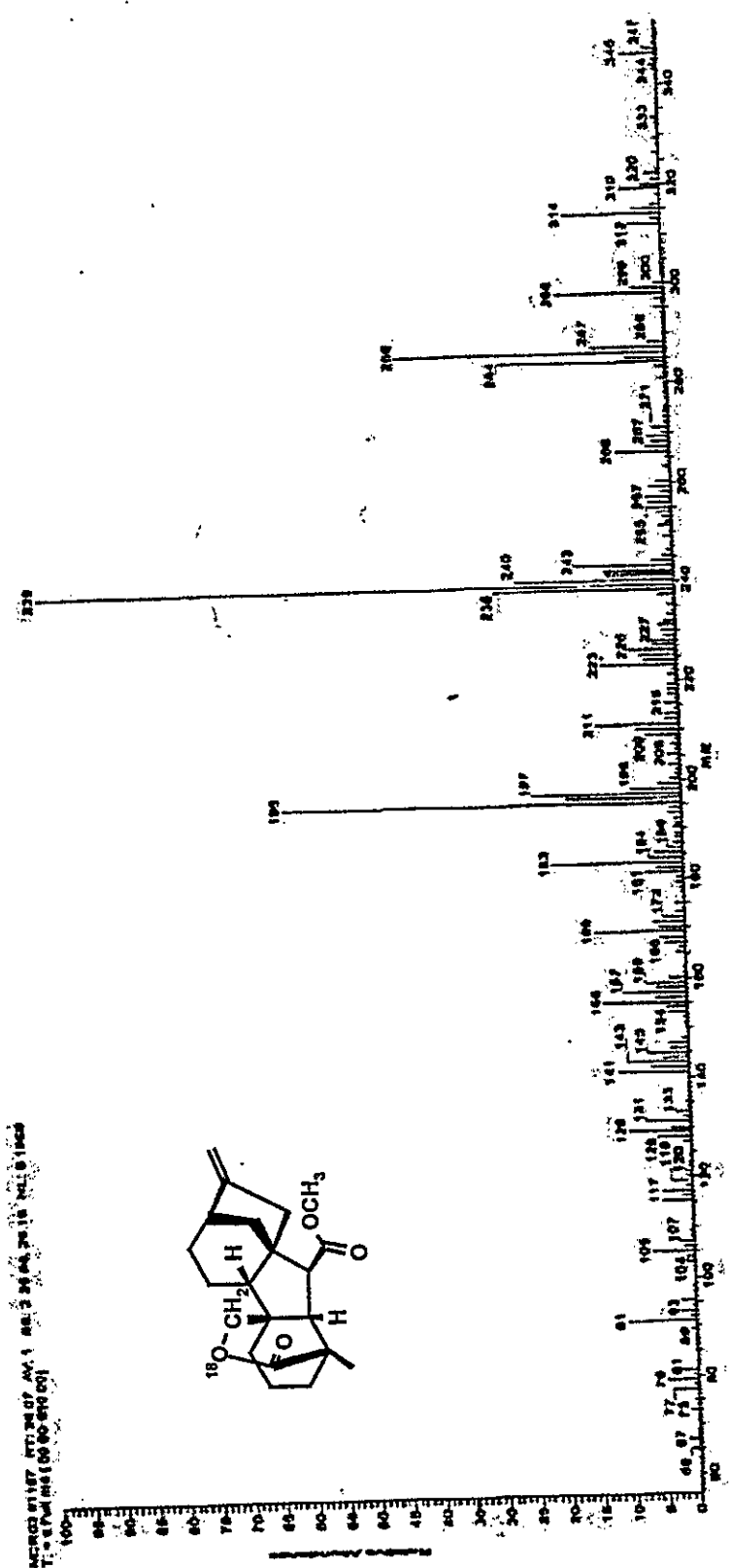


Figura 14: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de GA<sub>12</sub> en la incubación con  $[^{18}O]O_2 : N_2 = 20 : 80$ .

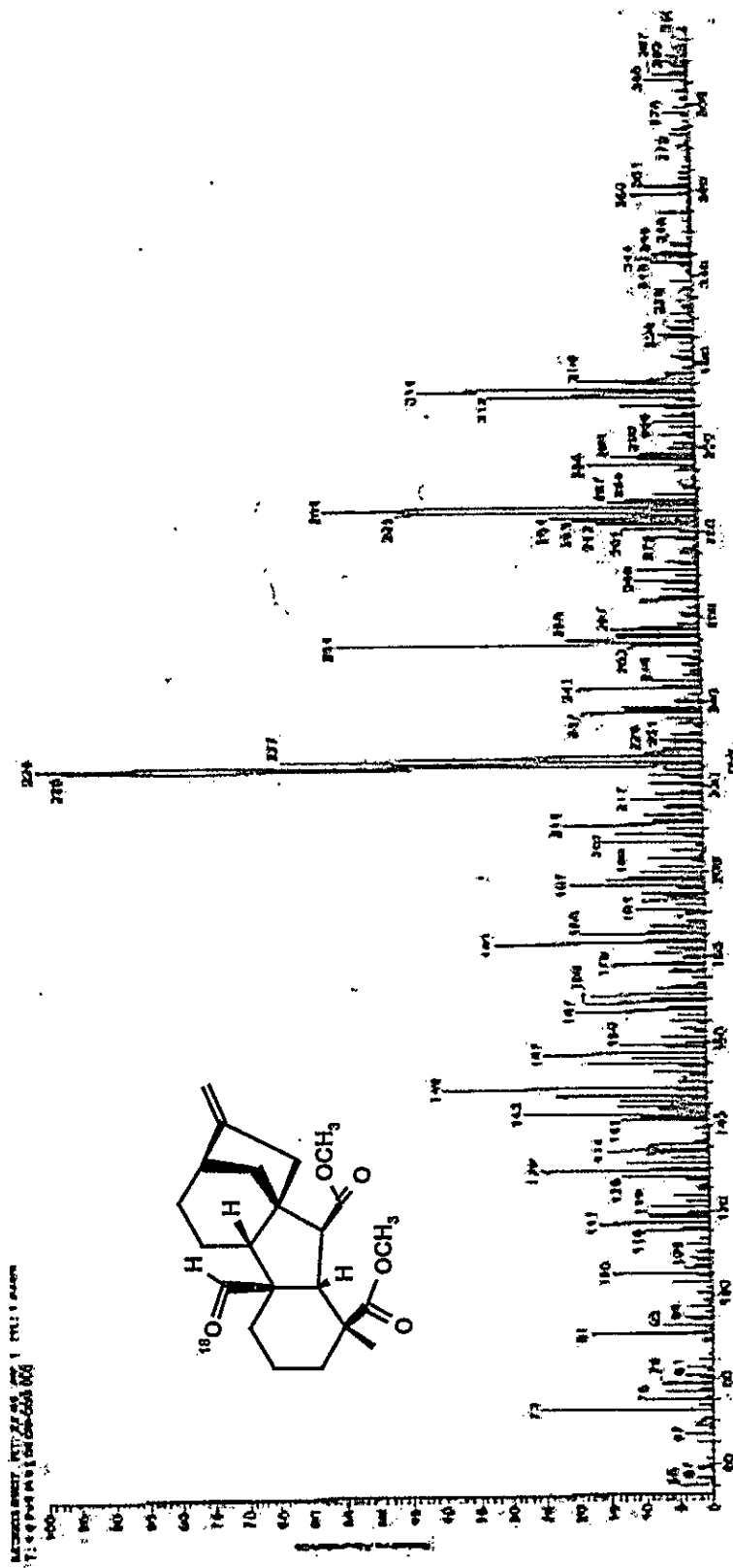


Figura 15: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>24</sub> proveniente de GA<sub>12</sub> en la incubación con  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$  : N<sub>2</sub> = 20 : 80.



El producto C20 carboxilato obtenido en presencia de  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$  podría contener también  $[^{18}\text{O}]$ , aunque no fue posible establecerlo en forma exacta, debido a los niveles traza de este producto (Tabla 5). El intercambio con el solvente también podría disminuir la eficiencia de incorporación de  $[^{18}\text{O}]$  en este producto.

Además de los experimentos con  $\text{GA}_{12}$  se incubó como control el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa con *ác. ent-kaurenoico* bajo una atmósfera de  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2 : \text{N}_2 = 20 : 80$ , para demostrar la incorporación de  $[^{18}\text{O}]$  en el *ác. ent-7 $\alpha$ -hidroxi-kaurenoico*, reacción en la que el [O] en C7 proviene de  $\text{O}_2$  (Rojas et. al. 2001; Rojas et. al., 2004). Como se esperaba, se encontró *ác. ent-7 $\alpha$ -hidroxi-kaurenoico* marcado con  $[^{18}\text{O}]$  junto a varios otros productos que también contienen  $[^{18}\text{O}]$  (Tabla 6). Estos corresponden a las GAs no hidroxiladas  $\text{GA}_{12}$ ,  $\text{GA}_{15}$  (Fig. 16) y  $\text{GA}_{24}$  (Fig. 17) y bajos niveles de GAs 3 $\beta$ -hidroxiladas ( $\text{GA}_{36}$  y  $\text{GA}_{13}$ ) (Tabla 6). Los productos obtenidos para la incubación en atmósfera de  $[^{16}\text{O}]\text{O}_2 : \text{N}_2 = 20 : 80$  fueron también las GAs no hidroxiladas  $\text{GA}_{12}$ ,  $\text{GA}_{15}$  (Fig. 18) y  $\text{GA}_{24}$  (Fig. 19) y las GAs 3 $\beta$ -hidroxiladas ( $\text{GA}_{36}$  y  $\text{GA}_{13}$ ) (Tabla 6). Estos productos confirman que el producto final de la oxidación del carbono 20 por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa es el *ác. tricarbóxico* y no las GAs 19 $\gamma$ , 10 lactónicas.

**Tabla 6:** Productos de metabolización del ácido *ent*-kaurenóico por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en presencia de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

Sustrato	Condiciones de reacción	Productos	Contenido de <sup>18</sup> O*
Ác. <i>ent</i> -Kaurenóico	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> =20:80	Ác. <i>ent</i> -Kaurenóico (traza) *GA <sub>12</sub> ; *GA <sub>12</sub> 15-eno *GA <sub>15</sub> ; *GA <sub>24</sub> ; *GA <sub>24</sub> 15-eno *ác. <i>ent</i> -7β-OH-kaurenóico *GA <sub>36</sub> ; *GA <sub>13</sub>	*Los productos marcados contienen <sup>18</sup> O
Ác. <i>ent</i> -Kaurenóico	<sup>18</sup> O <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> =20:80	Ác. <i>ent</i> -Kaurenóico (traza); GA <sub>12</sub> ; GA <sub>15</sub> ; GA <sub>24</sub> ; GA <sub>24</sub> 15-eno-GA <sub>25</sub> ; Ác. <i>ent</i> -7β -OH-kaurenóico; GA <sub>37</sub> (traza); GA <sub>36</sub> ; GA <sub>13</sub>	(-)

El análisis de los espectros de masa y la asignación de la evidencia de incorporación de [<sup>18</sup>O] en los productos GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub>, se analiza en mayor detalle en la sección siguiente.

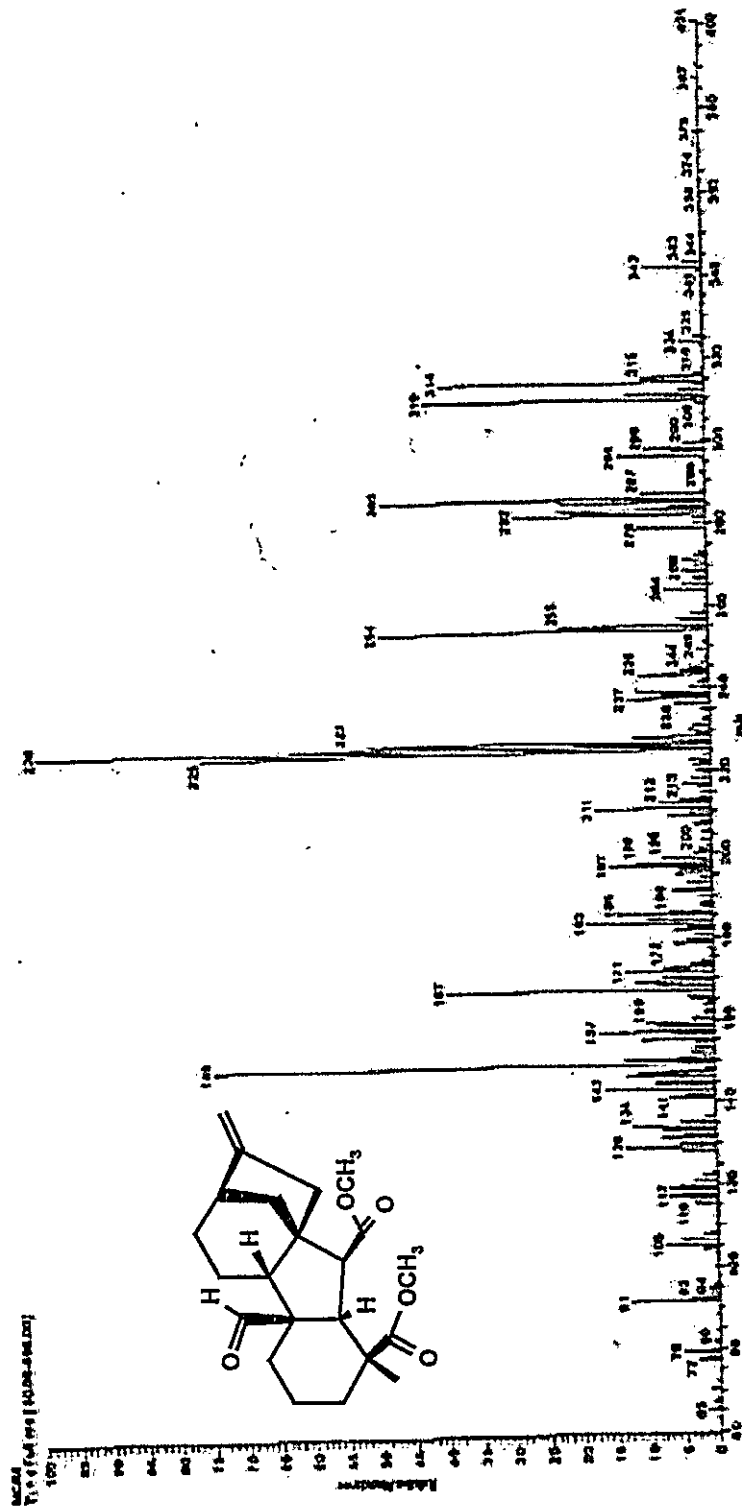


Figura 19: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>24</sub> proveniente de ác. *enf*-kaurenoico en la incubación con [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

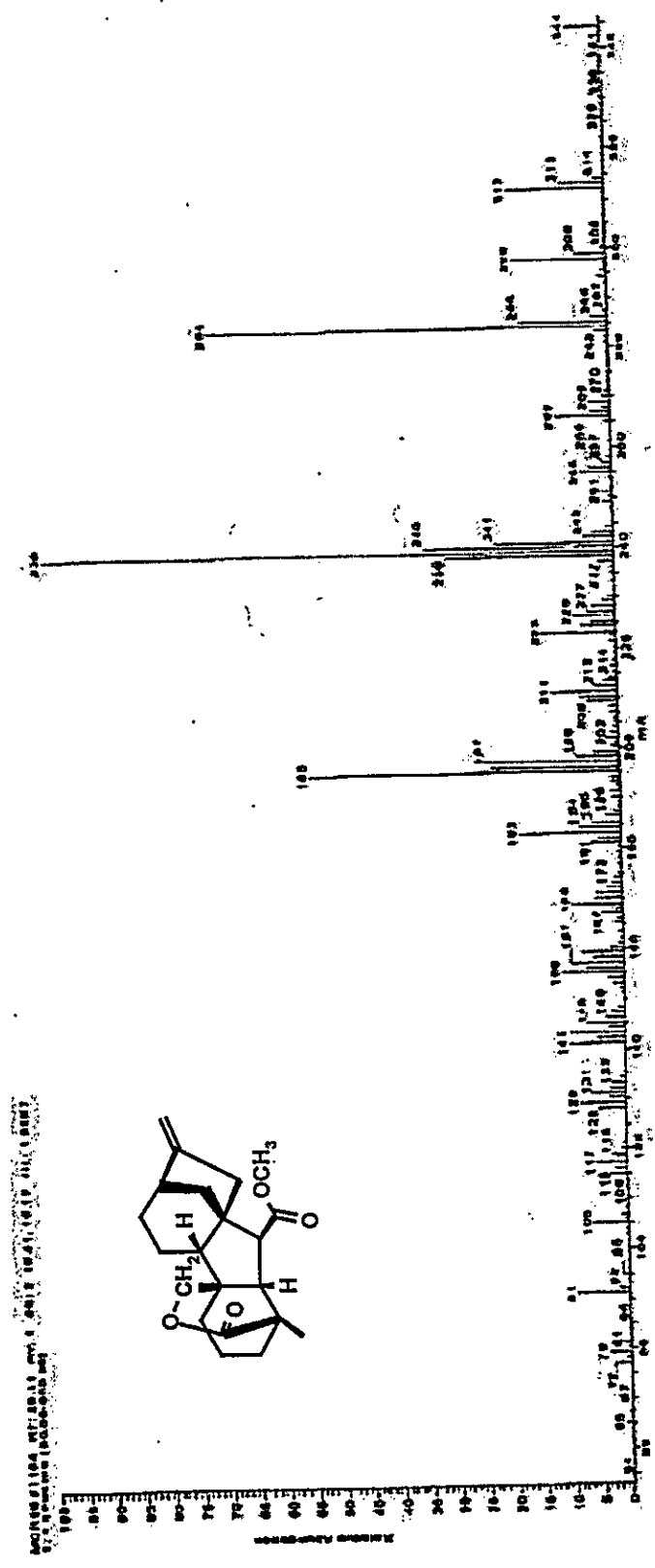


Figura 18: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de ác. *ent*-kaurenoico en la incubación con [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

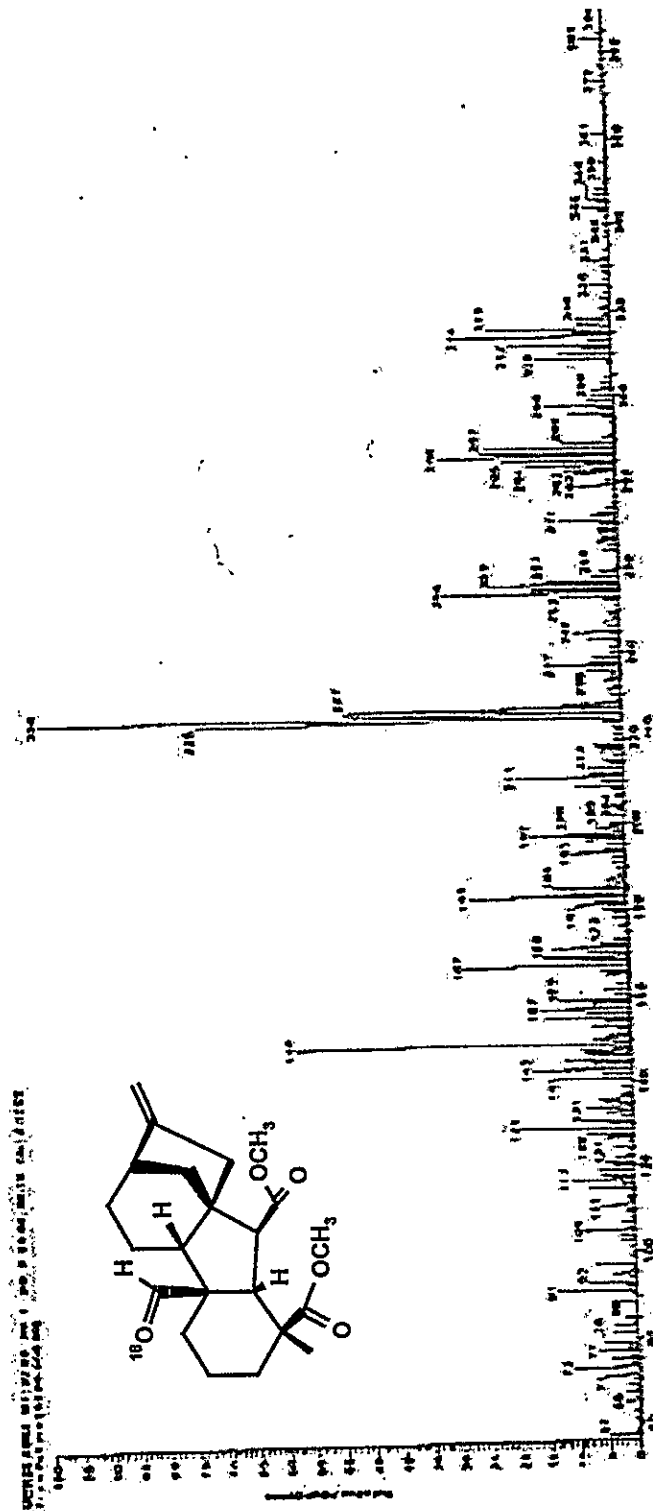


Figura 17: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>24</sub> proveniente de ác. ent-kaurenoico en la incubación con [1<sup>8</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

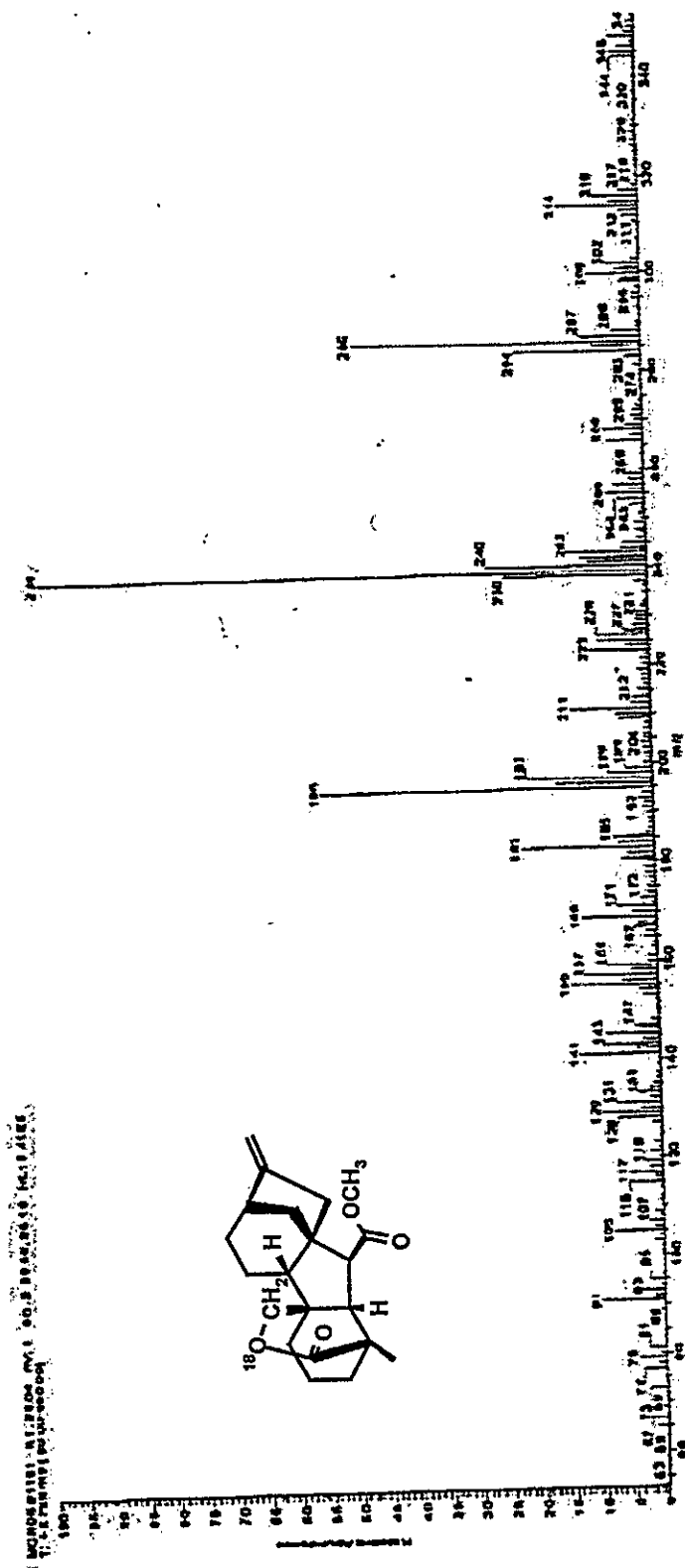
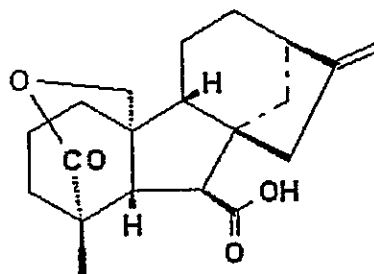


Figura 16: Espectro GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de ác. ent-kaurenoico en la incubación con [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

**3.5. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DEL METIL ÉSTER DE LA GIBERELINA GA<sub>15</sub> OBTENIDA DESDE GA<sub>12</sub> EN PRESENCIA DE [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O Y [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.**

Para ilustrar el análisis por GC/MS de los productos obtenidos en la metabolización de GA<sub>12</sub> bajo estas condiciones se describe en detalle la interpretación del patrón de fragmentación de GA<sub>15</sub> (forma 19 $\delta$ , 20 lactona; Fig. 20) proveniente de las incubaciones en presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O o [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.



**Figura 20:** 19 $\delta$ , 20 lactona de la giberelina GA<sub>15</sub>.

Los resultados indican claramente que tanto el ión molecular como los fragmentos obtenidos en presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O no contienen marca de [<sup>18</sup>O]. En tanto que en presencia de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> se detectan varios fragmentos con 2 unidades de m/z más que el anterior. La tabla 7 resume la fragmentación en GC/MS de metil éster GA<sub>15</sub> (19 $\delta$ , 20 lactona) proveniente de GA<sub>12</sub>.

**Tabla 7:** Fragmentación en GC/MS para el metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente desde GA<sub>12</sub>.

M/z	Identificación	Pérdida	Fórmula fragmento
344	M <sup>+</sup> (Ión molecular)	-----	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>4</sub>
346	M <sup>+</sup> + 2 (Ión Molecular)	-----	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub> <sup>18</sup> O
312	M <sup>+</sup> - 32	CH <sub>3</sub> O + H	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>
314	(M <sup>+</sup> + 2) - 32,	CH <sub>3</sub> O+ H	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> <sup>18</sup> O
284	M <sup>+</sup> - 60	CH <sub>3</sub> O+ H + CO	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>
286	(M <sup>+</sup> + 2) - 60	CH <sub>3</sub> O+ H + CO	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sup>18</sup> O
226	M <sup>+</sup> - 118	CH <sub>3</sub> O+H+CO+COOCH <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub>
226	(M <sup>+</sup> + 2) - 120	CH <sub>3</sub> O+ H + CO +CO <sup>18</sup> OCH <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub>
211	M <sup>+</sup> - 133	CH <sub>3</sub> O+H+CO+COOCH <sub>2</sub> +CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>
211	(M <sup>+</sup> + 2) - 135	CH <sub>3</sub> O+H+CO+CO <sup>18</sup> OCH <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>

### Interpretación:

El ión molecular de derivado metil éster de la forma 19 $\delta$ , 20 lactona de GA<sub>15</sub> presenta un valor de m/z igual a 344 (Fig. 21). Este corresponde a un ión de baja intensidad (aprox. 10 %) que corresponde al ión molecular (M<sup>+</sup>) de formula C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>, obtenido en presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O. El espectro del derivado de GA<sub>15</sub> obtenido con [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> (Fig. 22), presenta un ión molecular de m/z 346 que difiere en 2 unidades de m/z con respecto al ión molecular anterior correspondiente al ión molecular que contiene un átomo de [<sup>18</sup>O]. La pérdida de 32 m/z. (CH<sub>3</sub>O + H) desde el ión molecular genera fragmentos que difieren en 2 m/z obtenidas en los 2 modos de incubación: m/z 312 desde [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O (Fig. 21) y 314 desde [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> (Fig. 22) de formula C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub> y C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub><sup>18</sup>O (15 % de



respectivamente. Este fragmento de 32 m/z se asocia a la ruptura del grupo metil éster en el carbono 7 de GA<sub>15</sub>, lo que indica que la marca de [<sup>18</sup>O] se mantiene en el resto de la molécula que contiene el C20 en forma de lactona. La pérdida adicional de 28 m/z (CO) desde el C7 genera otros fragmentos de m/z 284 y 286 para ambas condición de incubación, de formula C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> y C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>1</sub><sup>18</sup>O (65 % y 45 % de intensidad relativa, respectivamente). La pérdida de 58 y 60 m/z en los fragmentos m/z 284 y 286 de ambas incubaciones, generan un mismo ión de m/z 226 con formula C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>; 5 % abundancia relativa. Los fragmentos m/z 58 y 60, corresponderían a la función 19δ, 20 lactona (COOCH<sub>2</sub>) de GA<sub>15</sub>. La comparación de los respectivos valores indica que el fragmento eliminado contiene la marca de [<sup>18</sup>O], lo cual es consistente con la incorporación de un átomo de O desde <sup>18</sup>O<sub>2</sub> al C20, como resultado de la acción de la MO P450-2. Finalmente, el fragmento m/z 226 pierde 15 m/z (CH<sub>3</sub>) desde el C18 y genera un fragmento de m/z 211 de formula C<sub>16</sub>H<sub>20</sub> en ambos casos.

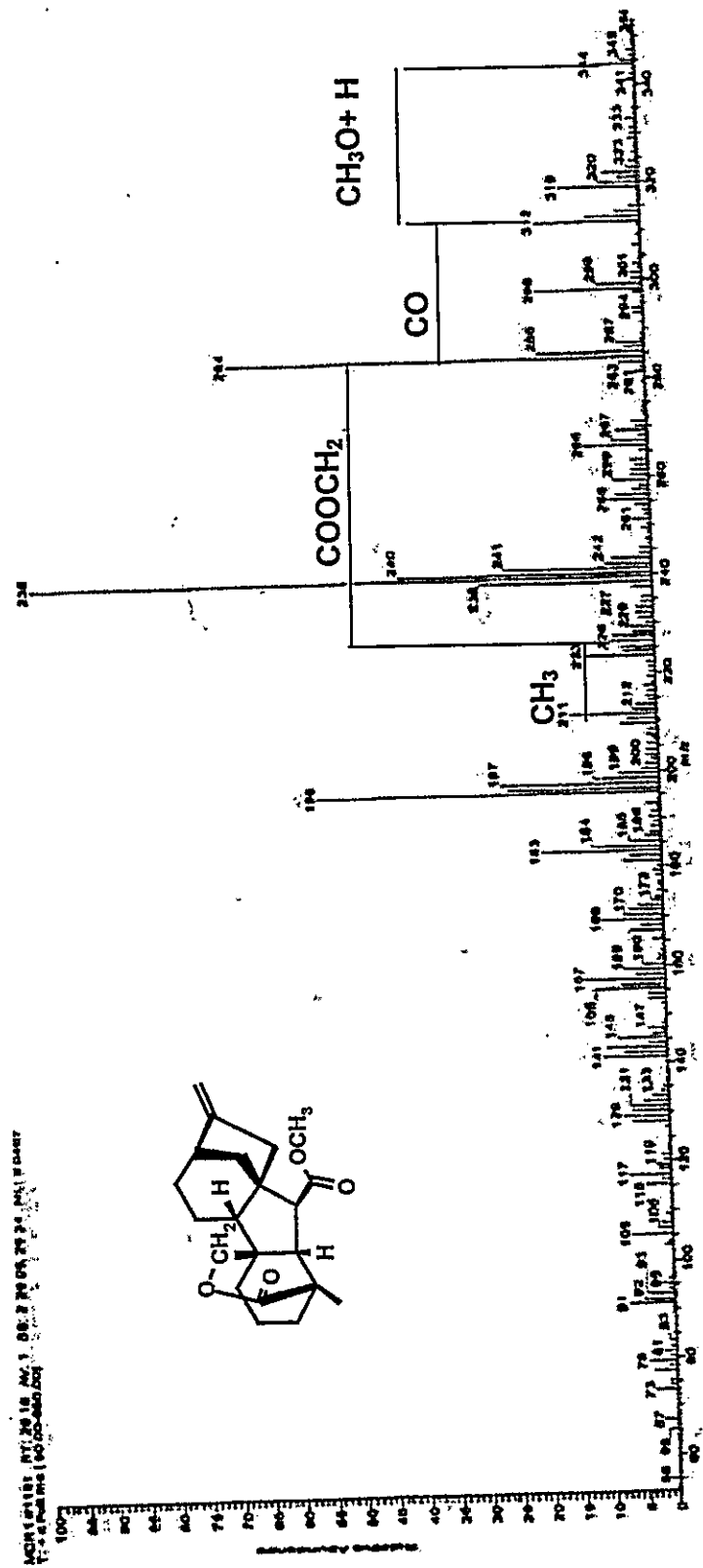


Figura 21: Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub>, proveniente de GA<sub>12</sub> en la incubación con [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O.

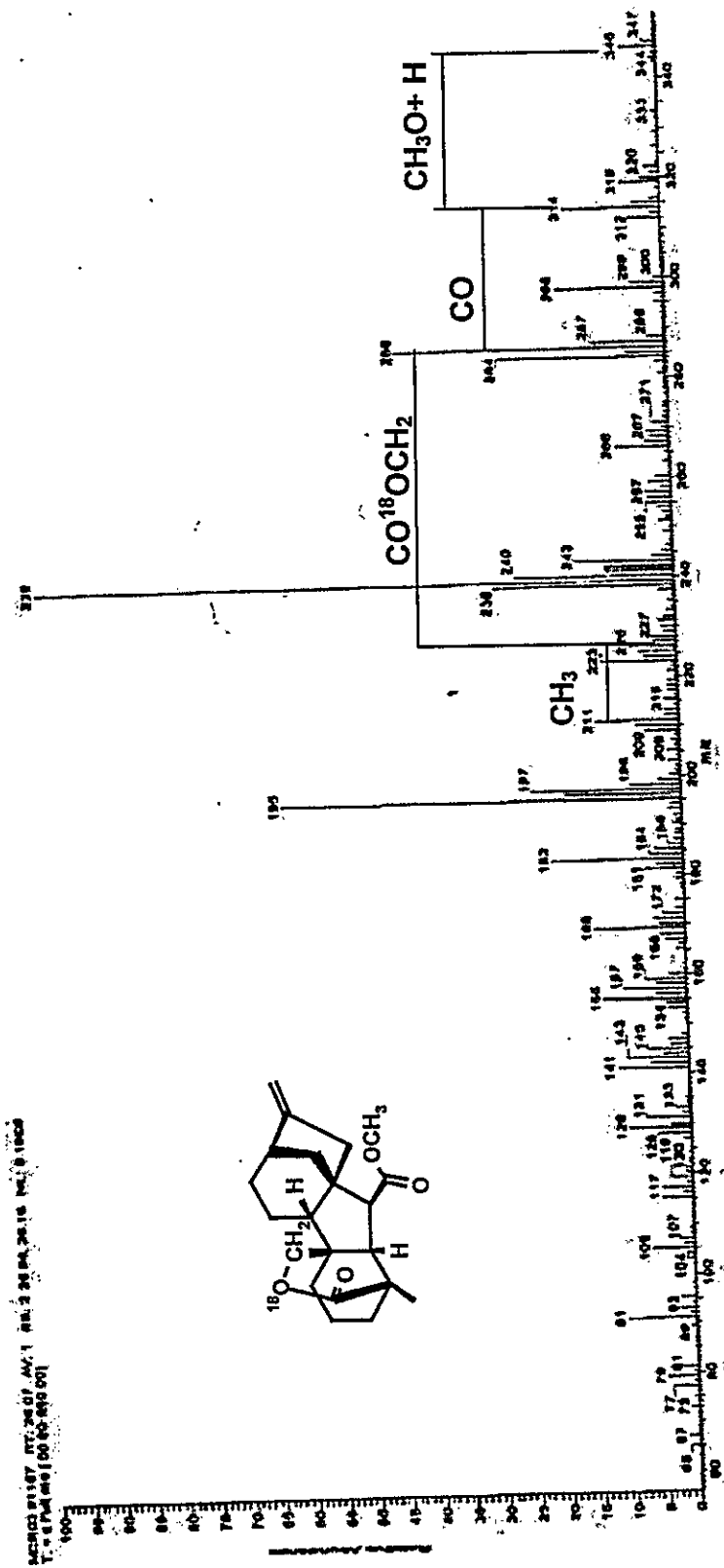


Figura 22: Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub>, proveniente de GA<sub>12</sub> en la incubación con [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

**3.6. COMPARACIÓN DEL PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DEL METIL ÉSTER DE LA GIBERELINA GA<sub>15</sub> OBTENIDA DESDE ÁCIDO ENT-KAURENOICO EN PRESENCIA DE [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 Y [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.**

El análisis por GC/MS de GA<sub>15</sub>, obtenida de la incubación de KA con [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 Y [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80, indica que tanto el ión molecular como los fragmentos obtenidos en presencia de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 contienen la marca de [<sup>18</sup>O] con 2 unidades de m/z mayor que los encontrados en presencia de [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80. La tabla 8 resume el análisis de fragmentación para GA<sub>15</sub> proveniente de KA

**Tabla 8:** Fragmentación en GC/MS para el metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente desde ác. *ent*-kaurenoico.

M/z	Identificación	Pérdida	Fórmula fragmento
344	M <sup>+</sup> (Ión molecular)	-----	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>4</sub>
346	M <sup>+</sup> + 2 (Ión molecular)	-----	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub> <sup>18</sup> O
284	M <sup>+</sup> - 60	CH <sub>3</sub> O+ H + CO	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>
286	(M <sup>+</sup> + 2) - 60	CH <sub>3</sub> O+ H + CO	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sup>18</sup> O
226	M <sup>+</sup> - 118	CH <sub>3</sub> O+H+CO+COOCH <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub>
226	(M <sup>+</sup> + 2) - 120	CH <sub>3</sub> O+H+CO+CO <sup>18</sup> OCH <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub>
211	M <sup>+</sup> - 133	CH <sub>3</sub> O+H+CO+COOCH <sub>2</sub> +CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>
211	(M <sup>+</sup> + 2) - 135	CH <sub>3</sub> O+H+CO+CO <sup>18</sup> OCH <sub>2</sub> + CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>

### Interpretación.

El ión molecular del derivado metil éster de GA<sub>15</sub> obtenido de [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 presenta un valor de m/z 344 (Fig. 23). Este corresponde a un ión de baja intensidad (10 % de abundancia relativa) de fórmula C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>. El espectro de GA<sub>15</sub> obtenido en presencia [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 (Fig. 24), presenta un ión molecular m/z 346 de fórmula C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub><sup>18</sup>O, que difiere en 2 unidades con respecto al ión molecular anterior correspondiente a la incorporación de un átomo de [<sup>18</sup>O]. La pérdida de 60 m/z (CH<sub>3</sub>O+H+CO) desde el ión molecular genera fragmentos que difieren en 2 unidades obtenidos en ambas condiciones de incubación: m/z 284 desde [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 (Fig. 23) y m/z 286 desde [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80 (Fig. 24) de fórmula C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> y C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sup>18</sup>O (70 % y 60 % de abundancia relativa), respectivamente. La pérdida de 58 y 60 m/z desde los fragmentos m/z 284 y 286, respectivamente generan ambos un mismo fragmento de baja intensidad con m/z 226 (5% de abundancia relativa), de fórmula C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>. Se asocia la pérdida de los fragmentos con m/z 58 y 60 con la pérdida de la función lactona, generada entre los carbonos 19 y 20. La diferencia en las 2 unidades se asocia a la presencia de [<sup>16</sup>O] y [<sup>18</sup>O] unidos al carbono 20 en GA<sub>15</sub>. Finalmente, la pérdida de 15 m/z genera un fragmento de mediana intensidad con m/z 211 (13 % de abundancia relativa). No se detectó [<sup>18</sup>O] en el C7, posición que se oxida con [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> desde KA, probablemente debido a intercambio con el solvente.

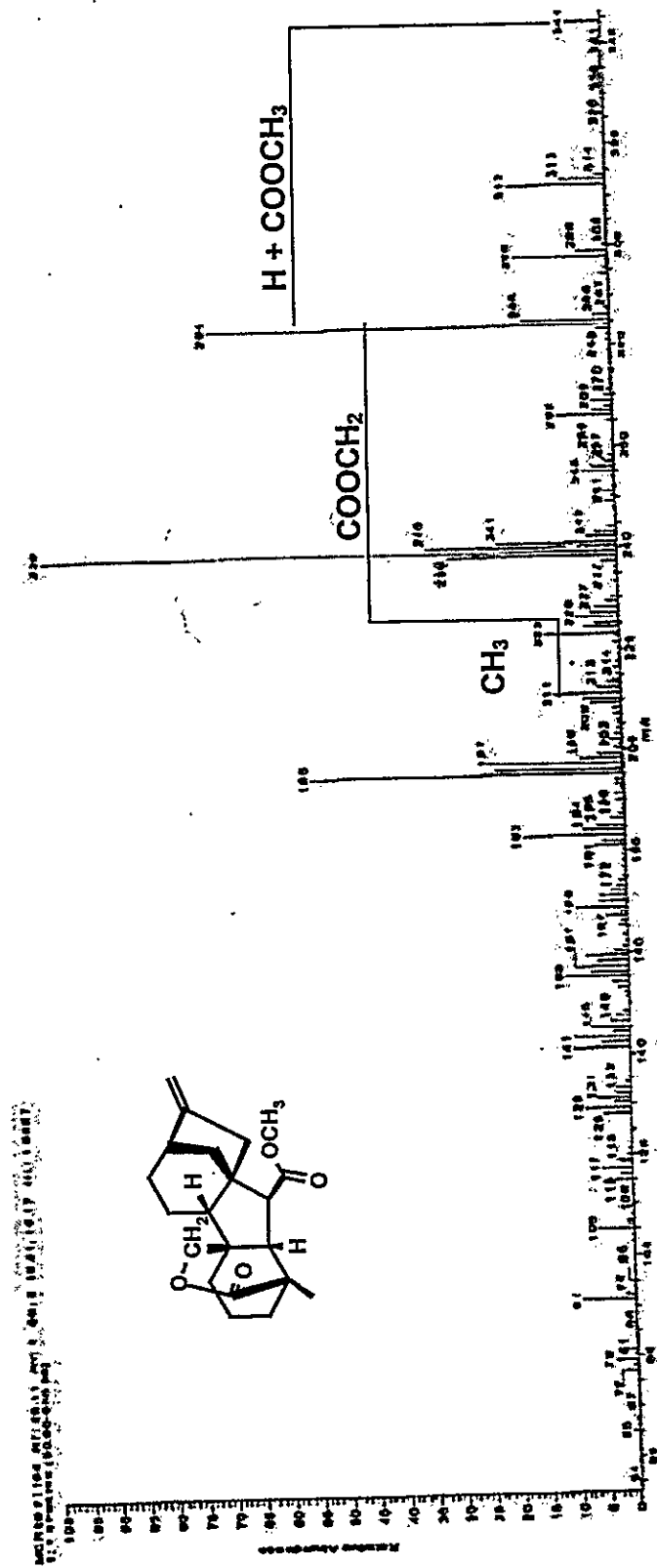


Figura 23: Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de ác. *ent*-kaurenoico en la incubación con [<sup>16</sup>O]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.



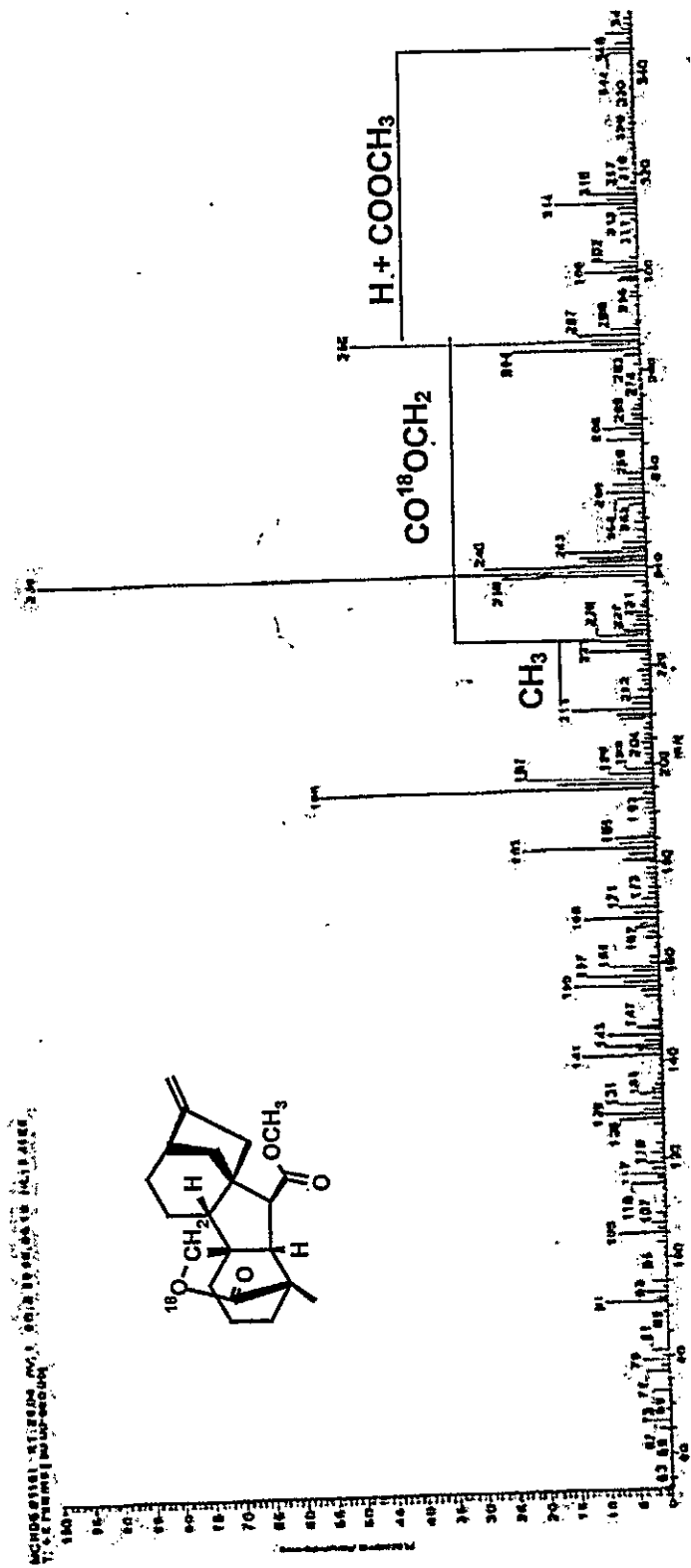


Figura 24: Esquema de fragmentación en GC/MS para el derivado metil éster de GA<sub>15</sub> proveniente de ác. ent-kaurenoico en la incubación con [ $^{18}\text{O}$ ]O<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> = 20 : 80.

### 3.7. EFECTO DEL AGUA DEUTERADA SOBRE LA METABOLIZACIÓN DE $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$ POR EL COMPLEJO P450-2/CIT b5: CIT b5 REDUCTASA.

La reacción de oxidación de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  a  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$  más  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$  no se vió afectada por la acción de  $[^2\text{H}]\text{H}_2\text{O}$  (30 – 80 %) en el medio de reacción. En la tabla 9 se muestran las proporciones de los productos obtenidos en presencia de  $[^2\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ , los que no se vieron alterados con respecto al control,  $[^1\text{H}]\text{H}_2\text{O}$ .

Este resultado es consistente con un mecanismo de oxidación a través de intermediarios alcohol y aldehído unidos no covalentemente a la enzima, en que el  $\text{H}_2\text{O}$  no participaría directamente en la formación de los productos de la reacción. Este experimento fue programado de acuerdo a la hipótesis de que los productos C20 alcohol y C20 aldehído se formarían por hidrólisis de intermediarios unidos covalentemente a la enzima, hipótesis que quedó descartada con el experimento descrito en la sección anterior.



**Tabla 9:** Efecto de  $[^2\text{H}]\text{H}_2\text{O}$  sobre la síntesis de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$  y  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$  formados a partir de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$

$\%[^2\text{H}]\text{H}_2\text{O}$	productos	%
0	$[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$ $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$	76 24
30	$[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$ $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$	68 32
50	$[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$ $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$	72 28
80	$[^{14}\text{C}]\text{GA}_{15}$ $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{24}$	73 27

Tiempo de incubación = 72 hrs.

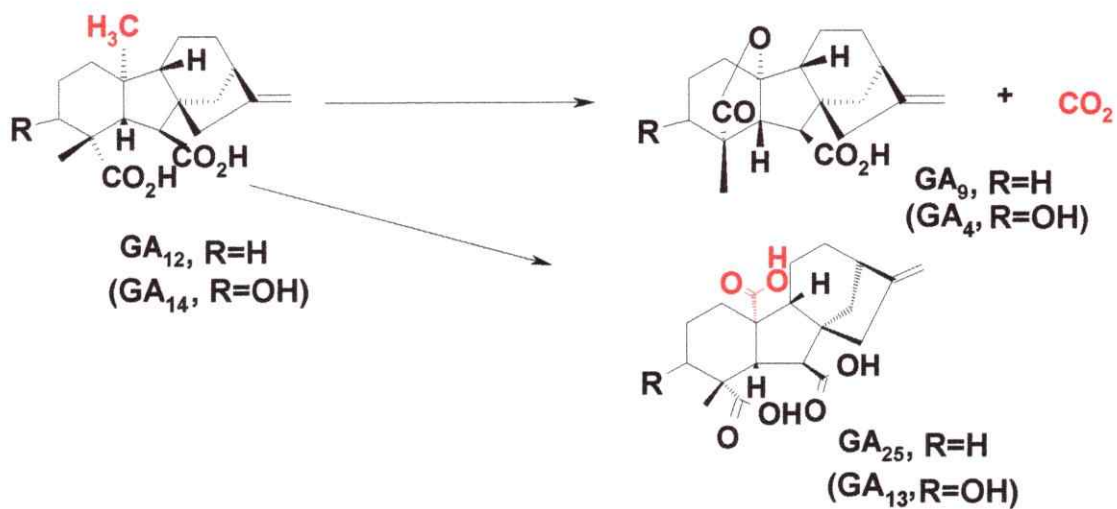
**CAPITULO 4**  
**DISCUSIÓN**

#### 4. DISCUSIÓN

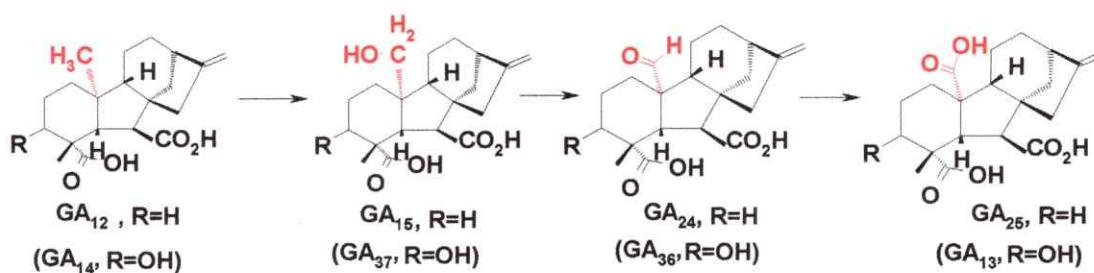
La generación de la función 19 $\gamma$ ,10 lactona de las GAs es catalizada por una monooxigenasa asociada al citocromo P450 en *G. fujikuroi* (P450-2 o C20 oxidasa). La reacción consiste en la oxidación secuencial del metilo 20 de los sustratos GA<sub>12</sub> o GA<sub>14</sub> hasta CO<sub>2</sub>, o alternativamente hasta ác. carboxílico, en un proceso dependiente de oxígeno molecular y de NADPH o NADH. La función 19 $\gamma$ ,10 lactona es un rasgo estructural esencial para la actividad biológica que presentan algunas GAs fúngicas, como reguladores del crecimiento y el desarrollo de las plantas, por lo que la comprensión del mecanismo de esta reacción presenta un especial interés, particularmente en cuanto a la participación de intermediarios que permitan definir la secuencia de oxidación.

En este trabajo se investigó el mecanismo de la reacción catalizadas por la oxidasa del C20 de las GAs utilizando dos complejos de la monooxigenasa P450-2 con proteínas transportadoras de electrones: el complejo P450-2/CPR y el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. La NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR) es la principal proteína transportadora de electrones asociada a las monooxigenasas en *G. fujikuroi* (Malonek et al., 2004) en tanto que el sistema cit b5: cit b5 reductasa se encuentra asociado a P450-2 en ausencia de la CPR (Rojas et al., no publicado). Ambos complejos metabolizaron al sustrato [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> (C20 metilo) aunque con velocidades muy diferentes. La velocidad de utilización de este sustrato por el complejo P450-2/CPR es 10 veces mayor que la del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa presente en las cepas carentes de CPR,  $\Delta$ CPR y SG138, lo que puede atribuirse a la eficiencia del transporte de electrones que presentan ambas proteínas asociadas a P450-2. La eficiencia catalítica de las monooxigenasas P450 está determinada principalmente por la transferencia de electrones (Miller, 2005) y se ha descrito para otras monooxigenasas P450 que el sistema cit b5: cit b5 reductasa es menos

eficiente en aportar electrones que la CPR ( Venkateswarlu et al., 1998; Mokashi et al., 2003). Para la C20 oxidasa de GAs se encontró que además de las diferencias en la velocidad de utilización, ambos complejos forman distintos productos de oxidación a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> o [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub>. El complejo P450-2/CPR oxida al metilo 20 principalmente hasta CO<sub>2</sub> para formar la giberelina [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> junto con cantidades menores del producto C20 carboxilato, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub>, en tanto que el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa forma el alcohol C20 [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> como producto principal y niveles más bajos del C20 aldehído [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub>. El producto final de la secuencia de oxidación catalizada por este último complejo es el ácido tricarbóxico, que se forma en menor proporción que los productos anteriores, como lo demostró la metabolización del sustrato 3β-hidroxiado [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> así como la metabolización del precursor C20 alcohol [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>37</sub> que dan como producto final el ácido tricarbóxico [ $^2\text{H}$ ]GA<sub>13</sub>. No se obtuvo producto 19γ,10 lactónico en ninguna de las incubaciones con P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. Por otra parte, los productos parcialmente oxidados en C20 [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> no fueron detectados en la reacción catalizada por el complejo P450-2/CPR, lo que evidenció importantes diferencias en las funciones catalíticas de P450-2 asociada a ambas proteínas transportadoras. Las reacciones secuenciales de oxidación del C20 catalizadas por el complejo P450-2/CPR o por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa se resumen en las figuras 25 y 26.



**Figura 25:** Reacciones catalizadas por el complejo P450-2/CPR.

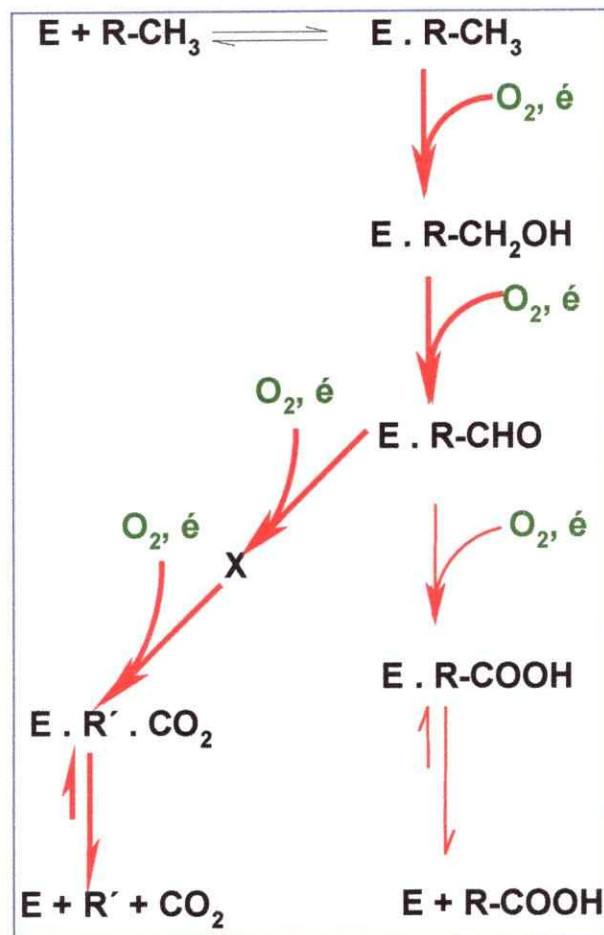


**Figura 26:** Reacciones catalizadas por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa

La formación de intermediarios parcialmente oxidados en C20 a partir de los sustratos marcados en presencia del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa concuerda con el patrón de GAs endógenas descrito para las cepas  $\Delta$ CPR y SG138, que contienen este complejo enzimático. Este incluye a GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> como productos principales y finales de la vía biosintética de GAs en estas condiciones (Malonek et al., 2004). Las GAs C20 alcohol y C20 aldehído podrían corresponder a intermediarios de la secuencia de oxidación del metilo

hasta CO<sub>2</sub> como para las C20, oxidasas de plantas, o alternativamente estos productos podrían generarse por hidrólisis de intermediarios unidos covalentemente a la C20 oxidasa a través de un residuo de aminoácido del sitio activo (Fig. 4). Esta última alternativa podría verse favorecida en las condiciones de baja velocidad de oxidación que presenta el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa.

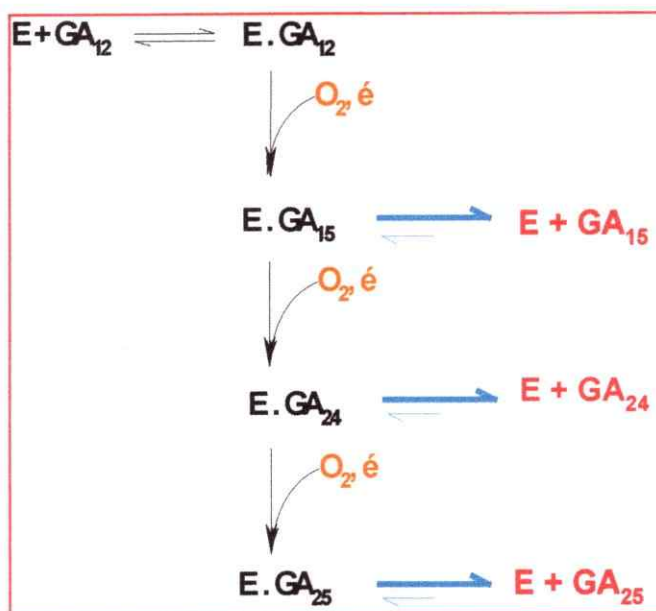
En este trabajo demostramos, mediante la incubación de GA<sub>12</sub> con este complejo en presencia de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> o de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O, que GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> son realmente especies intermediarias de la oxidación secuencial del metilo 20 de las GAs ya que se generan a partir de O<sub>2</sub> durante la catálisis y no a través de la hidrólisis de intermediarios covalentes como había sido sugerido anteriormente (Malonek et al., 2004; Tudzynski et. al., 2002). El análisis por GC/MS de los productos de metabolización demostró claramente que el C20 de GA<sub>15</sub>, GA<sub>24</sub> y GA<sub>25</sub> contenía un átomo de [<sup>18</sup>O] cuando se incubó el sustrato en una atmósfera de [<sup>18</sup>O]O<sub>2</sub> a diferencia de lo que se encontró para el mismo producto generado en presencia de [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O en que el C20 de estos productos no contenía este isótopo del oxígeno. Estos resultados permiten concluir que la oxidación secuencial del carbono 20 en *G. fujikuroi* transcurre a través de intermediarios C20 alcohol y C20 aldehído unidos no covalentemente a la monooxigenasa P450-2 (Fig. 27).



**Figura 27:** Etapas en la oxidación secuencial del C20 de las giberelinas por la monooxigenasa P450-2 (C20 oxidasa).

En el complejo P450-2/CPR el alcohol y el aldehído formados en sucesivos ciclos catalíticos no se disociarían de la enzima debido a la alta eficiencia del proceso de transferencia de electrones desde la P450 reductasa, lo que favorecería la oxidación sucesiva de los intermediarios. En el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa en cambio, los intermediarios se disociarían durante la catálisis debido a su baja afinidad por la enzima y a la baja eficiencia de la transferencia de electrones desde el citocromo b5 (Fig. 28). El alcohol 3 $\beta$ -hidroxilado [ $^2$ H]GA $_{37}$  fue parcialmente metabolizado por el complejo P450-2/cit

b5: cit b5 reductasa, además no se acumuló en el medio de reacción durante la oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA $_{14}$  lo que sugiere que su afinidad por la enzima sería más alta que la que presentan los demás intermediarios. Los intermediarios disociados no continuarían oxidándose debido a su baja afinidad por la enzima acumulándose en el medio de reacción, lo que explicaría la detección de GA $_{15}$  y GA $_{24}$  como productos principales así como la incapacidad de P450-2 de metabolizar estos sustratos.

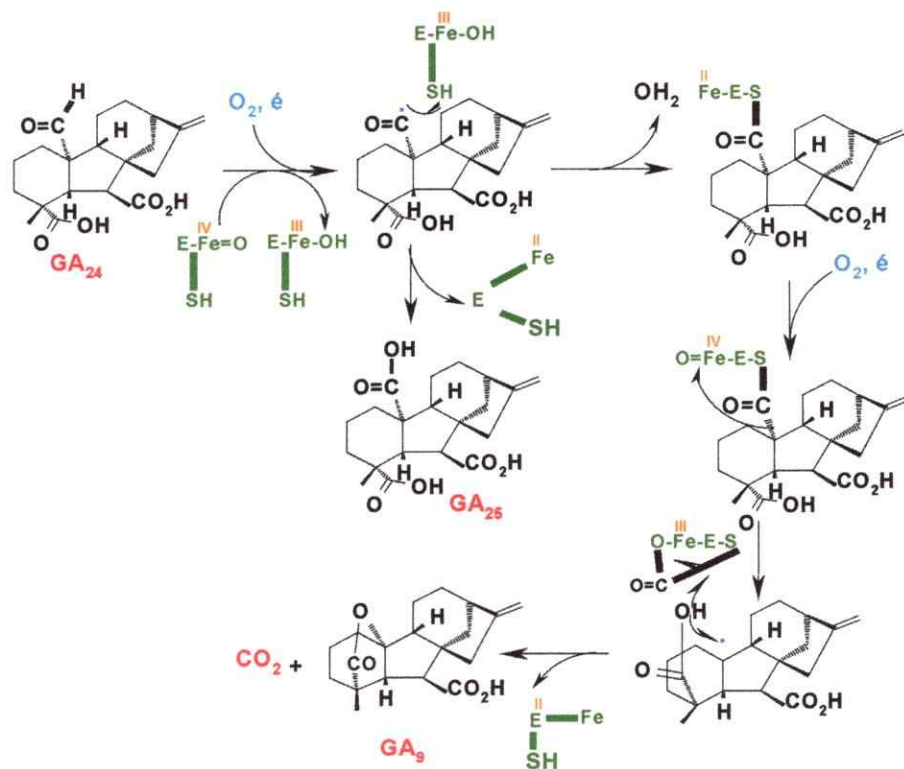


**Figura 28:** Etapas en la oxidación secuencial del C20 por la monooxigenasa P450-2 (C20 oxidasa), asociada al cit b5: cit b5 reductasa.

La oxidación del metilo 20 hasta ác. carboxílico por el complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa junto con la ausencia de producto 19 $\gamma$ ,10 lactónico proveniente de la oxidación hasta CO $_2$ , indica que la biosíntesis de cada uno de estos productos finales presenta distintos requerimientos catalíticos. Tanto el producto tricarboxilato como el producto 19 $\gamma$ ,10 lactónico se formarían a partir



del intermediario aldehído, pero la síntesis del tricarboxilato requeriría sólo una etapa adicional de hidroxilación, en tanto que la síntesis de la lactona requeriría dos ciclos de oxidación con la participación de un intermediario formado por reacción del aldehído con un residuo del sitio activo (Fig. 29, Hedden, 1997). Para las C20 oxidasas de plantas se ha postulado que una cisteína del sitio activo formaría un intermediario tioéster con el sustrato el que generaría un radical centrado en C10 que sería estabilizado por reacción con el carboxilato C19 para dar el producto lactónico (Ward et al., 2002; Hedden, 1997). Algo similar podría ocurrir durante la oxidación catalizada por P450-2, con la participación de un residuo del sitio activo en la síntesis del producto lactónico.



**Figura 29:** Mecanismo de oxidación secuencial postulado para la biosíntesis de las giberelinas 19 $\gamma$ , 10 lactónicas por P450-2 asociada a la CPR.

La orientación de este residuo podría verse afectada por la interacción de P450-2 con la CPR o con el sistema del citocromo b5: citocromo b5 reductasa por lo cual una orientación inadecuada de este residuo catalítico explicaría la ausencia de producto 19 $\gamma$ ,10 lactónico en las reacciones del complejo P450-2/cit b5: cit b5 reductasa. De la misma manera podrían explicarse las propiedades catalíticas alteradas que presenta la C20 oxidasa de *Cucurbita máxima*, que forma exclusivamente producto tricarbóxico, a diferencia de las otras C20 oxidasas de plantas que dan principalmente productos lactónicos (MacMillan, 1997). Estas diferencias podrían atribuirse a variaciones estructurales que afecten la participación de un residuo catalítico requerido para la oxidación del metilo hasta CO<sub>2</sub>. De hecho, se han encontrado diferencias en el extremo carboxilo terminal de la enzima de *C. máxima* que explicarían su incapacidad para sintetizar C19 giberelinas (Lange et al., 1997).

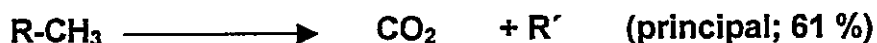
Esta es la primera vez que se describe la alteración de las funciones catalíticas en una monooxigenasa multifuncional por asociación con diferentes proteínas transportadoras de electrones. Para CYP17, una monooxigenasa P450 del metabolismo de esteroides que presenta dos actividades catalíticas asociadas a un mismo sitio activo (17-hidroxilasa y 17,20 liasa) se ha descrito un efecto modulador del citocromo b5 sobre estas actividades. Sin embargo esta enzima no es activa a menos que esté presente la CPR. Ambas reacciones requieren NADPH a través de la CPR pero la actividad de 17,20 liasa aumenta selectivamente por adición de citocromo b5 mientras que la actividad de 17-hidroxilasa no se ve afectada (Pandey y Miller, 2005). El cit b5 aumentaría el flujo electrónico desde la CPR actuando como un efector alostérico. Para la monooxigenasa P450-2 en cambio, el cit b5 no actúa como efector sino que es capaz de aportar los dos electrones requeridos para la catálisis y reemplazar a la CPR en la oxidación del C20 de las GAs aunque con una menor eficiencia. El mecanismo de las monooxigenasas P450 no requiere de la disociación del producto después de cada ciclo catalítico a diferencia del mecanismo de las

dioxigenasas en que la giberelina oxidada producto de la reacción debe disociarse después de cada ciclo para permitir la unión del 2-oxoglutarato que proporciona los electrones para la oxidación y que inicia la catálisis (Sono et al., 1996). Esta característica funcional de P450-2 no permitió identificar los intermediarios de la oxidación del C20 en el complejo P450-2/CPR. Sin embargo, utilizando el complejo P450-2/cit b5:cit b5 reductasa fue posible en este trabajo demostrar que las GAs C20 alcohol y C20 aldehído son de hecho los intermediarios de la secuencia de oxidación de metilo hasta CO<sub>2</sub> o hasta ác. carboxílico descartando así la hipótesis de que participarían en esta reacción intermediarios unidos covalentemente a la enzima.

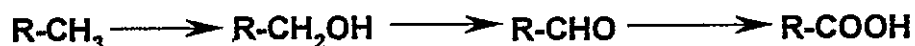
**CAPITULO 5**  
**CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

- Las propiedades catalíticas de la C20 oxidasa de GAs (monooxigenasa P450-2) de *G. fujikuroi* se ven alteradas por su interacción con distintas proteínas transportadoras de electrones.
- El complejo P450-2/CPR cataliza la oxidación del metilo 20 hasta CO<sub>2</sub> sin formación de intermediarios, y alternativamente la oxidación del metilo 20 hasta ác. carboxílico, como reacción lateral.



- El complejo P450-2/cit b5: b5 reductasa cataliza la oxidación secuencial del metilo 20 hasta ác. carboxílico a través de los intermediarios alcohol y aldehído.



No se forma producto lactónico.

- La velocidad de oxidación del C20 por el complejo P450-2/cit b5: b5 reductasa está reducida en un orden de magnitud con respecto al complejo P450-2/CPR.
- Los intermediarios se disocian de la enzima después de cada ciclo catalítico, y se acumulan en el medio de reacción probablemente como resultado de la baja eficiencia en el flujo de electrones desde la citocromo b5 reductasa.

- En general los intermediarios C20 alcohol y C20 aldehído no son utilizados por la monooxigenasa P450-2, lo que sugiere que su afinidad por la enzima es baja.
- El átomo de oxígeno presente en la función C20 alcohol, C20 aldehído y C20 carboxilato, no proviene del agua por lo tanto GA<sub>15</sub> y GA<sub>24</sub> no se generan por hidrólisis de los intermediarios unidos covalentemente a la enzima.
- La oxidación secuencial del metilo 20 hasta carboxilato ocurriría a través de intermediarios unidos no covalentemente a la enzima, que se disocian en condiciones en que el flujo de electrones es bajo. En el complejo P450-2/CPR, en que el flujo de electrones es más alto, los intermediarios no se disocian de la enzima después de cada ciclo catalítico, encontrándose solo los productos finales, 19 $\gamma$ , 10 lactona y C20 ác. carboxílico.
- El producto lactónico se formaría desde el intermediario C20 aldehído y requeriría de 2 ciclos catalíticos oxidativos. En este proceso participaría un residuo de la enzima cuya orientación estaría alterado en el complejo cit b5: b5 reductasa.

**CAPITULO 6**  
**REFERENCIAS**

## 6. REFERENCIAS

- Barrero, A., Oltra, J.E., Cabrera, E. Reyes, F. and Alvarez, M. (1999)** Metabolism of gibberellins and *ent*-kaurenoids in mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 50, 1133-1140
- Bearder, J.R., MacMillan, J. and Phinney, B.O. (1975)** Fungal products. Part XIV. Metabolic pathways from *ent*-kaurenoic acid to the fungal gibberellins in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 721-726
- Bearder, J.R., MacMillan, J., and Phinney, B.O. (1976)** Origin of the oxygen atoms in the lactone bridge of C<sub>19</sub>-gibberellins *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 834-835
- Ben-Tal, Y. (1990)** Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from Thompson seedless grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 142-146.
- Brückner, B. and Blechshmidt, D. (1991)** The gibberellin fermentation. *Crit. Rev. Biotech.* 11, 163-192
- Carlson, R.D. and Croveti, A.J. (1988)** Commercial uses of gibberellins and cytokinins and new areas of applied research. In "Plant Growth Sunstances". Ed. Pharis, R.P., Rood, S.B. Springer-Verlag, Berlin, pp.604-610
- Canova-Davis, E., Chiang, J. Y. L. y Waskell, L.A. (1985)** Obligatory role of cytochrome b5 in the microsomal metabolism of methoxyflurane, *Biochem Pharmacol* 34, 1907 - 1912
- Cross, B.E., Galt, R.H.B. and Norton, K. (1968)** The biosynthesis of gibberellins-II. *Tetrahedron* 24, 231-237 et al., 1968
- Donaldson, R.P. and Luster, D.G. (1991)** Multiple forms of cytochromes P-450. *Plant Physiol.* 96, 669-674.
- Dockerill, B., and Hanson, J.R. (1978)** The fate of C<sub>20</sub> in C<sub>19</sub> gibberellin biosynthesis. *Phytochemistry* 17, 701-704



- Gaskin, P. and MacMillan, J. (1991)** GC/MS of gibberellins and related compounds: Methodology and a library of reference spectra . Cantocks Enterprises, Ltd. University of Bristol, U.K.
- Geissman, T.A., Verbiscar, A.J., Phinney, B.O, Cragg, G. (1966)** Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*. 5, 933-947
- Graebe, J. E., Hedden, P., Gaskin, P. and MacMillan, J. (1974)** Biosynthesis of the gibberellins A12; A15, A24, A36 and A37 by a cell-free system from *Cucurbita maxima*. *Phytochem.* 13, 1344
- Graebe, J. E.(1987)** Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 419-65.
- Hedden, P. (1978)** The metabolism of the gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 149-192
- Hedden, P. (1997)** The oxidases of gibberellin biosynthesis: Their function and mechanism. *Physiologia Plantarum* 101, 709-719
- Hedden, P. and Phillips, A. (2000)** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Sci.* 5, 524
- Hedden, P., Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., and Tudzynski, B. (2002)** "Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J. Plant Growth Regul.* 20, 319-331.
- Hedden, P. (2003)** The genes of the green revolution. *Trends Genet.* 19, 5-9
- Imai, Y., Sato, R. (1977)** The role of cytochrome b5 in a reconstituted N – denathylase containing system caontaining cytochrome P- 450. *Biochem Biophys Res Commun* 75, 420 – 426
- Lange; T., Hedden, P. and Graebe, J.E. (1994)** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8552-8556
- Lange, T., Kegler , K., Hedden, P., Phillips, A., and Graebe, J. (1997)** Molecular characterization of gibberellin 20-oxidases. Structure-function studies on

- recombinant enzymes and chimaeric proteins. *Physiologia Plantarum* 100, 543-549.
- Leslie, J.** (1995) *Gibberella fujikuroi*: available population and variable traits. *Can.J.Bot.* 73, 282-291
- MacMillan, J.** (1997) Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Nat. Prod.Res.* 14, 221-243
- MacMillan, J.** (2002) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria *J. Plant Growth Regul.* 20, 387-442
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. and Tudzynski, B.** (2004) "The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis". *J. Biol. Chem.* 279, 25075-25084
- Miller, W.** (2005) Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology* 146, 2544-2550
- Mokashi, V., Li, L., and Porter, T.D.** (2003) Cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 support CYP2E1-mediated activation of nitrosamines in a recombinant Ames test. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 147-152
- Morgan, E., y Coon, M.** (1984). Effects of cytochrome b5 on cytochrome P-450-catalyzed reaction. Studien with manganese-substituted cytochrome b5. *Drug Metab Dispos* 12, 358-364
- Pandey, A.V., and Miller, W.L.** (2005) Regulation of 17,20 lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J. Biol. Chem.* 280, 13265-13271
- Popeone, J. and Barrit, B.H.** (1988) Branch induction by growth regulators and leaf removal in Delicious apple nursery stock *Hort. Sci.* 23, 859 1988

- Rademacher, W.** (1994) Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul.* 15, 303-314
- Rademacher, W** (1997) Gibberellins In: *Fungal Biotechnology*, T. Anke (Ed.) Chapman y Hall. Weinheim, pp.193-205
- Rojas, M.C., Hedden, P. Gaskin, P. and Tudzynski, B.** (2001) The *P450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98, 5828-5834
- Rojas, M.C., Urrutia, O., Cruz, C., Gaskin, P., Tudzynski, B. and Hedden, P** (2004) "Kaurenolides and fujenoic acids are side products of the P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*" *Phytochemistry* 65, 821-830
- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., Dawson, J.H.** (1996) Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2841-2887
- Tudzynski, B., Kawaide, H. and Kamiya, Y.** (1998) Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Curr. Genet.* 34, 234-240
- Tudzynski, B. and Hölter, K.** (1998) The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genetics and Biology* 25, 157-170
- Tudzynski, B.** (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol Biotechnol* 52, 298-310
- Tudzynski, B., Hedden, P., Carrera, E. and Gaskin, P.** (2001) The *P450-4* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthetic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3514-3522
- Tudzynski, B, Rojas, M.C., Gaskin, P. and Hedden, P.** (2002) "The *Gibberella fujikuroi* gibberellin 20-oxidase is a multifunctional monooxygenase" *J. Biol. Chem.* 277, 21246-21253
- Tudzynski, B., Mihlan, M., Rojas, M.C., Linnemanstöns, P and Hedden, P.** (2003) "Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis

gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and *P450-3* encode GA<sub>4</sub> desaturase and the 13-hydroxylase, respectively" J. Biol. Chem. 278, 28635-28643

**Urrutia, O., Hedden, P. and Rojas M.C.** (2001) Monooxygenases involved in GA<sub>12</sub> and GA<sub>14</sub> synthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 56, 5005-511

**Venkateswarlu, K., Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., and Kelly, S.L.** (1998) The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-cytochrome P450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. J. Biol. Chem. 273, 4492-4496

**Ward, J., Gaskin, P., Brown, R.G.S., Jackson, G.S., Hedden, P., Phillips, A., Willis, C.L., and Beale, M.H.** (2002) Probing the mechanism of loss of carbon-20 in gibberellin biosynthesis. Synthesis of gibberellin 3 $\alpha$ ,20-hemiacetal and 19,20-lactol analogues and their metabolism by a recombinant GA 20-oxidase. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 232-241