

In reifen Früchten gefundene farblose tetrapyrrolische Chlorophyll-Kataboliten sind wirksame Antioxidantien**

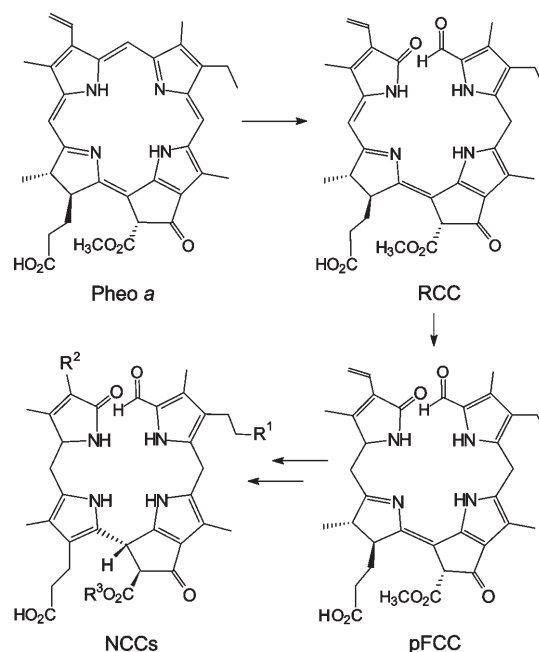
Thomas Müller, Markus Ulrich, Karl-Hans Ongania und Bernhard Kräutler*

Prof. Duilio Arigoni zum 80. Geburtstag gewidmet

Die Herbstverfärbung ist ein auffälliges Zeichen der Blattseneszenz, einer Form des programmierten Zelltodes in Pflanzen.^[1] Noch in den frühen neunziger Jahren war das Verschwinden des Chlorophylls in höheren Pflanzen ein Rätsel.^[2] Als die ersten Abbauprodukte des Chlorophylls in seneszenten Blättern identifiziert wurden,^[3] erwiesen sich diese als farblose Tetrapyrrole, die als „nichtfluoreszente“ Chlorophyll-Kataboliten (NCCs) bezeichnet wurden.^[4] In seneszenten Blättern wurden etwa 15 konstitutionell verschiedene NCCs gefunden, die ein gemeinsames Tetrapyrrol-Grundgerüst aufweisen, sich aber in ihrer Struktur oder der Position ihrer peripheren Substituenten unterscheiden.^[4–8] Die Blattseneszenz scheint tatsächlich von einem weitgehend einheitlichen und regulierten Chlorophyll-Abbau begleitet zu werden, als dessen Endprodukte die NCCs gelten können (Schema 1).^[4,9–11]

Das Verschwinden der grünen Farbe und das gleichzeitige Entstehen ansprechender Farbtöne sind auch Zeichen des Reifens von Früchten. Allerdings ist noch ungeklärt, wie Chlorophyll in reifenden Früchten abgebaut wird und welche Strukturen die dabei auftretenden Abbauprodukte haben. Wir berichten hier, dass der Chlorophyll-Abbau in reifenden Früchten ebenfalls NCCs liefert, die sich als identisch mit NCCs aus Blättern herausstellten. Die NCCs, die sowohl in Fruchtschalen wie auch im Fruchtfleisch beobachtet wurden, erwiesen sich zudem als bemerkenswert wirksame Antioxidantien.

Die Analyse der Extrakte von frisch abgetrennten Schalen einer gelben Birne (*b₁* in Abbildung 1) durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit UV/Vis-spektroskopischer Detektion (Abbildung 2) wies auf zwei Fraktionen mit für NCCs charakteristischen UV/Vis-Spektren hin.^[11,12]



Schema 1. Übersicht zum Chlorophyll-Abbau in seneszenten Blättern:^[11] Die Chlorophylle werden über Pheophorbide *a* (Pheo *a*) zum „roten“ Chlorophyll-Kataboliten (RCC) abgebaut, dann über primäre „fluoreszente“ Chlorophyll-Kataboliten (pFCC) zu „nichtfluoreszenten“ Chlorophyll-Kataboliten (NCCs, die sich durch die Reste *R*¹, *R*² und *R*³ unterscheiden).^[11,13–15]

Im Massenspektrum von **1^{Pc}**, dem weniger polaren NCC aus der Birne (*Pyrus communis*, *Pc*), trat das Ion $[M+H]^+$ bei $m/z = 645.292$ auf, woraus die Molekülformel $C_{35}H_{40}N_4O_8$ ($m/z_{\text{ber.}}(M+H)^+ = 645.292$) abgeleitet wurde. Nach weiteren Analysen (siehe Hintergrundinformationen) konnte man **1^{Pc}** die in Schema 2 dargestellte Strukturformel für **1** zuordnen. Der NCC **1^{Pc}** erwies sich identisch mit **1^{Cj}**, einem NCC aus verfärbten Blättern des Baumes *Cercidiphyllum japonicum* (*Cj*), der auch als *Cj*-NCC-1 bezeichnet wurde.^[5,7]

Im Massenspektrum von **2^{Pc}**, des polareren NCC aus der Birne, trat das Pseudo-Molekülion $[M+H]^+$ bei $m/z = 807.341$ auf, was in Einklang mit der Molekülformel $C_{41}H_{50}N_4O_{13}$ ($m/z_{\text{ber.}}(M+H)^+ = 807.345$) ist. Weitere spektroskopische Analysen ermöglichten es, **2^{Pc}** die in Schema 2 gezeigte Struktur für **2** zuzuordnen. Der NCC **2^{Pc}** erwies sich als identisch mit **2^{Nr}**, einem in Extrakten von Tabakblättern (*Nicotiana rustica*, *Nr*) gefundenen NCC, der als *Nr*-NCC-2 bezeichnet wurde.^[6]

In der Schale der gelben Birne (*b₁*) kamen die NCCs **1^{Pc}** und **2^{Pc}** in einer Menge von jeweils etwa 300 ng cm⁻² (oder etwa 7 µg g⁻¹) vor. Im Vergleich mit der Menge Chlorophyll in

[*] Dr. T. Müller, M. Ulrich, Prof. Dr. K.-H. Ongania, Prof. Dr. B. Kräutler
Institut für Organische Chemie und Zentrum für Molekulare Bio-
wissenschaften
Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
Innrain 52 a, 6020 Innsbruck (Österreich)
Fax: (+43) 512-507-2892
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

[**] Wir danken Stefan Hörtensteiner (Universität Zürich) und Dr. J. Dallavia (Laimburg) für hilfreiche Diskussionen, Sigrid Gschösser für die Aufnahme von NMR-Spektren sowie Simone Moser und Sonja Berger für weitere experimentelle Unterstützung. Unsere Arbeiten wurden vom Österreichischen Wissenschafts-Fonds (FWF, Projektnr. P-16097 und 19596) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

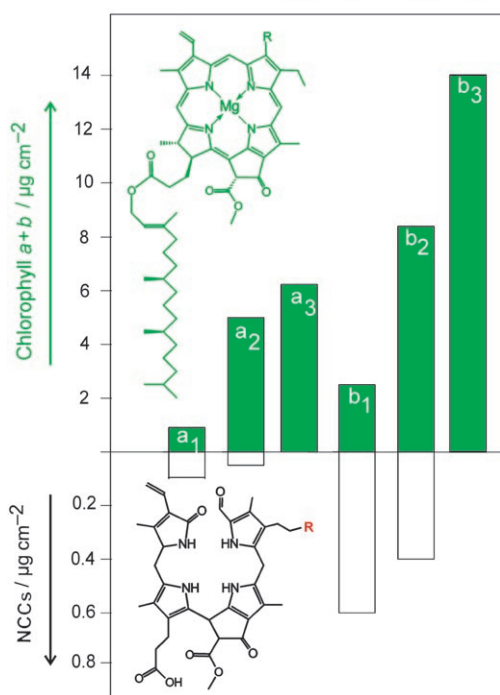


Abbildung 1. Reifende Früchte vom Markt enthalten „nichtfluoreszenzente“ Chlorophyll-Kataboliten (NCCs). Oben: Photos der in dieser Arbeit verwendeten grünen und gelben Birnen und Äpfel, unmittelbar vor ihrer weiteren Analyse (a₁/a₂: „Golden Delicious“-Äpfel; b₁/b₂: „Williams“-Birnen). Unten: relative Mengen der Chlorophylle (oberer Teil) und der NCCs (unterer Teil, andere Skalierung) aus Extrakten der Schalen von reifenden Äpfeln und Birnen (a₁/a₂ bzw. b₁/b₂) sowie von unreifen Äpfeln/Birnen (a₃/b₃, nicht abgebildet), die drei Wochen vor der üblichen Erntezeit gepflückt wurden.

der grünen Birnenschale von b₃ (etwa 14 µg cm⁻¹) entsprach die Menge an NCCs der gelben Schale nur etwa 7% des ursprünglich vorhandenen Chlorophylls. Durch HPLC und UV/Vis-Spektroskopie konnten auch im Extrakt des geschälten Fruchtkörpers einer zweiten reifen Birne die zwei NCCs **1**^{Pc} und **2**^{Pc} nachgewiesen werden (Abbildung 2, Einschub). Die NCCs **1**^{Pc} und **2**^{Pc} kamen im Fruchtfleisch nahe der Schale in größerer Menge vor (etwa 1.2 µg g⁻¹) als in einer Probe aus einer inneren Schicht (< 0.2 µg g⁻¹). Im Fruchtfleisch nahe der Schale einer grünen Birne (b₃) fanden sich Chlorophylle in einer Menge von ca. 10 µg g⁻¹; dies bedeutet, dass in diesem Teil der Birne die Menge an NCCs einer reifen Frucht etwa 10% derjenigen des Chlorophylls einer unreifen Frucht entspricht.

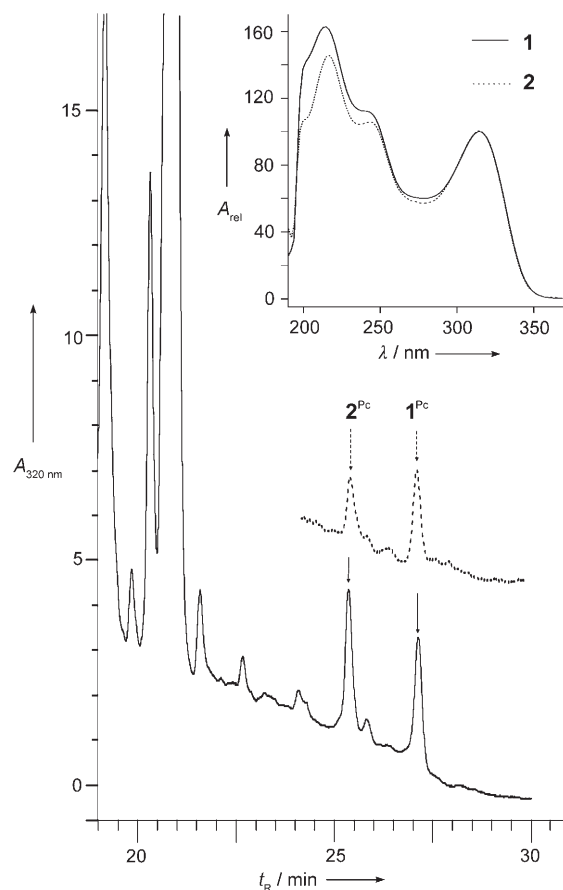
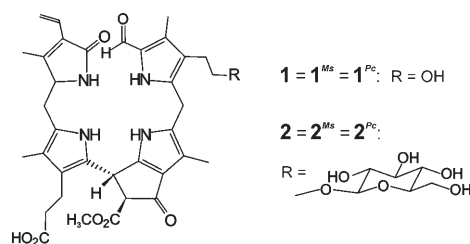


Abbildung 2. Analyse der NCCs in Extrakten einer reifen Birne. HPLC-Analyse des Extraktes aus der Schale (—) und des Fruchtfleisches (----) der reifen Birne; die Fraktionen von **1**^{Pc} und **2**^{Pc} sind hervorgehoben. Einschub: UV-Spektren der HPLC-Fractionen von **1**^{Pc} (= **1**) und **2**^{Pc} (= **2**) aus der Birne; identische Spektren wurden für die HPLC-Fractionen von **1**^{Ms} und **2**^{Ms} (aus Äpfeln) erhalten, wie auch von **1**^{Cj} und **2**^{Nr} (siehe Hintergrundinformationen).^[5–7]



Schema 2. Strukturformeln der NCCs **1** und **2**.

Die NCCs **1**^{Pc} und **2**^{Pc} wurden auch in Extrakten seneszenten Blätter des Birnenbaumes in einer geschätzten Menge von etwa 29 bzw. 4.9 µg cm⁻² gefunden. Grüne Blätter des Birnenbaumes enthielten etwa 50 µg cm⁻² Chlorophylle (a und b): Die beiden NCCs entsprachen damit etwa 70% der Chlorophylle im grünen Blatt.

In frisch gewonnenen und extrahierten gelben Schalen eines reifen Apfels (a₁ in Abbildung 1) wurden ebenfalls zwei Verbindungen mit den Charakteristika der NCCs aus der Birne gefunden. Der weniger polare und in größeren Mengen vorkommende NCC aus der Apfelschale (*Malus sylvestris*), **1**^{Ms}, war identisch mit **1**^{Pc} (und mit **1**^{Cj}, siehe Abbildung 3 und

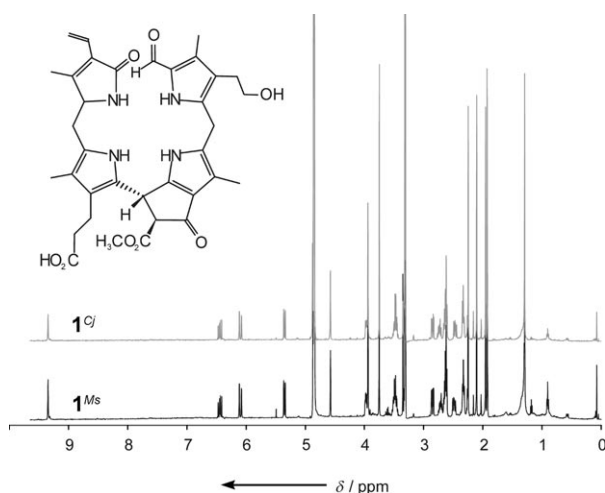


Abbildung 3. ¹H-NMR-Spektroskopischer Vergleich (500 MHz; in CD₃OD, 26 °C) von 1^{Ms} (unten) mit 1^G (oben).

Hintergrundinformationen). Ebenso erwies sich der polarere und im reifen Apfel (a₁) seltenere NCC 2^{Ms} als identisch mit 2^{Pc}. Eine systematischere Studie mit Äpfeln wies 1^{Ms} (und in geringerer Menge 2^{Ms}) nicht nur in den Schalen, sondern auch im Fruchtfleisch nach, und zwar mit einem ähnlichen Konzentrationsprofil wie in der Birne. Senescente Blätter vom Apfelbaum enthielten ebenfalls signifikante Mengen an 1^{Ms} und geringere an 2^{Ms}.

Der NCC 1, der weniger polare der zwei Chlorophyll-Kataboliten, wurde in einem Standard-Autoxidationsexperiment untersucht, das auch schon für die Analyse von Bilirubin verwendet worden war (Abbildung 4).^[16] Die Bildungsgeschwindigkeit der Hydroperoxide von Linolsäure wurde dabei (HPLC-analytisch) in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration der zugegebenen Antioxidantien analysiert.^[16] In Gegenwart von 1 war die Bildungsgeschwindigkeit der Hydroperoxide der Linolsäure stark reduziert. Die Wirkung des zugegebenen 1 war nur geringfügig kleiner als jene von Bilirubin.^[16] Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung, denn Bilirubin ist ein Tetrapyrrol-Katabolit des Häm, der strukturell den NCCs ähnelt.^[11] Bilirubin ist nicht nur ein außerordentliches Antioxidans,^[16] sondern wurde auch als ein Zellschutzfaktor beschrieben, der bei der Verringerung von Erkrankungen der Herzkranzgefäße, von Retinaschäden, sowie der Sterblichkeit bei Krebserkrankungen wichtig ist.^[17]

Die Identifizierung von zwei „nichtfluoreszenten“ Chlorophyll-Kataboliten (NCCs) in Früchten gab erste Einblicke in Strukturen, die beim Abbau von Chlorophyll in reifenden Früchten auftreten. In Äpfeln und Birnen wurden dieselben zwei NCCs (1 und 2) gefunden, deren Mengen ungefähr mit dem sichtbaren Ausmaß der Frucht reife korrelierten. Die NCCs kamen in größerer Menge in den Schalen vor, traten aber auch im Fruchtfleisch auf. Eine reife Birne (b₁) enthielt insgesamt etwa 300 µg an NCCs, was etwa 7–10 % der Chlorophyll in einer unreifen Birne (b₃) entspricht.

Die NCCs in zwei reifen Früchten erwiesen sich als identisch mit den jeweiligen NCCs aus verfärbten Blättern der Obstbäume. Der polarere NCC 2 entsteht (formal) aus dem weniger polaren 1 durch Glucosylierung. Ähnliche strukturelle Beziehungen bestehen auch zwischen den NCCs

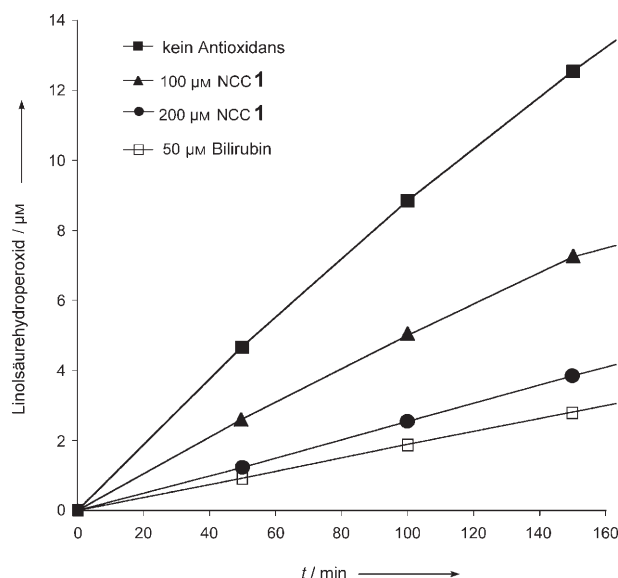


Abbildung 4. Der „Früchte-NCC“ 1 und Bilirubin als Antioxidantien. Verminderung der Autoxidation von Linolsäure durch 1 oder Bilirubin,^[16] die durch Analyse der Menge der gebildeten Hydroperoxide bestimmt wurde (siehe Experimentelles und Hintergrundinformationen).

aus seneszenten Blättern.^[8,11,12] Unsere Beobachtungen weisen auf einen biochemisch einheitlichen Weg des Chlorophyll-Abbaus in reifenden Früchten und in seneszierenden Blättern hin und stützen so die Ansicht, dass der Chlorophyll-Abbau bei beiden Phänomenen einem gemeinsamen Grundmuster folgt.^[1,19,20]

Dem Chlorophyll-Abbau wird die Rolle eines wichtigen Entgiftungsprozesses in seneszenten Pflanzen zugeschrieben, in dessen Verlauf (potenziell) phototoxische grüne Pflanzenpigmente zerstört und farblose Kataboliten gebildet werden.^[9,10] In der Tat korrelierte die fehlende Aktivität von Chlorophyll abbauenden Enzymen in *Arabidopsis thaliana* (die in Zusammenhang mit den „accelerated cell death“-Genen *acd-1* und *acd-2* gebracht wurden) mit der Beobachtung von nekrotischen Verkümmern.^[21] Die Abbau-Zwischenstufen Pheo *a* und RCC sind photoaktive Verbindungen, deren Bindung an Proteine und Weiterabbau im Laufe des „intakten“ Chlorophyll-Abbauweges helfen dürften, die senescente Pflanze zu schützen.^[22] In Übereinstimmung mit dieser These hat der endogene Entgiftungsprozess in seneszenten Blättern farblose NCCs als „Endprodukte“,^[10,11] die dem größten Teil der in grünen Blättern vorhandenen Chlorophylle entsprechen.^[7,18]

Die in den Früchten gefundenen NCCs entsprechen hingegen nur einem kleinen Teil des abgebauten Chlorophylls. Über den weiteren Verbleib der NCCs ist nichts bekannt. Bemerkenswert ist aber, dass sie wirksame Antioxidantien sind. Dieser Befund könnte auf (weitere) physiologische Rollen der NCCs in seneszenten Pflanzen und in Früchten hinweisen, z. B. bei der Verlängerung lebenswichtiger Funktionen.^[23]

Früchte gehören zu den am weitest verbreiteten Bestandteilen der menschlichen Nahrung. Das Vorkommen von NCCs in pflanzlicher Kost weist darauf hin, dass NCCs eine physiologische Bedeutung für den Menschen und höhere

Tiere haben könnten. Zahlreiche Verbindungen aus Pflanzen (Vitamine, Antioxidantien) sind nützliche Bestandteile der menschlichen Nahrung,^[24–26] allerdings sind noch viele Fragen zu den Wirkungsweisen von Speisekomponenten ungeklärt, insbesondere die Frage, wie diese Verbindungen das Risiko (chronischer) Erkrankungen vermindern können.^[27] Krankheitsvorbeugende Wirkungen von Äpfeln und Birnen werden üblicherweise auf die antioxidative Wirkung von Flavonoiden zurückgeführt,^[27–31] die besonders in den Schalen der Früchte vorkommen.^[27,32,33] Die Entdeckung von Abbauprodukten des Chlorophylls als Bestandteil reifer Früchte ist somit von besonderem Interesse: Für Säuger wird Chlorophyll heutzutage als phototoxisch eingestuft (man nimmt an, dass es im Verdauungstrakt nicht resorbiert wird); bemerkenswerterweise verfügen Säuger über ein ATP-bindendes Transportsystem (ein ABC-drug transporter), das spezifisch bei der Ausscheidung von photoaktivem Pheo *a* hilft.^[34] Dagegen haben NCCs – die farblosen Tetrapyrrole und natürlichen Antioxidantien in Früchten – möglicherweise für den Menschen nützliche physiologische Eigenschaften. Das Vorkommen von NCCs in reifen Früchten könnte damit dem Sprichwort „An apple a day keeps the doctor away“^[35] eine neue Bedeutung verleihen.

Experimentelles

Isolierung und spektroskopische Charakterisierung der NCCs **1**^{Pc} und **2**^{Pc} aus der Schale von Birnen (*Pyrus communis*): 450 g Schalen von reifen „Williams-Birnen“ (vom Markt in Innsbruck, frisch geschält) wurden püriert und extrahiert (Details siehe Hintergrundinformationen). Die gesammelten Rohextrakte wurden mit präparativer HPLC getrennt. Zwei Fraktionen wurden bei *t* = 15.5 und 19 min gesammelt, „entsalzt“ (siehe Hintergrundinformationen) und isoliert. Es fielen reine NCC-Proben an (312 µg **1**^{Pc} und 190 µg **2**^{Pc}), die durch Vergleich mithilfe von HPLC und spektroskopischen Analysen als identisch mit **1**^{Cj}^[5,7] und **2**^{Nr}^[6] nachgewiesen werden konnten (siehe Hintergrundinformationen).

Bestimmung der antioxidativen Aktivität von **1**.^[16] Lösungen von Linolsäure, 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN), **1** (isoliert als **1**^{Cj}^[5,7]) und Bilirubin wurden verdünnt und gemischt, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erhalten (0.15 M Linolsäure, 2 mM AIBN und 0–200 µM **1** oder Bilirubin). Die luftgesättigten Lösungen wurden auf 37°C temperiert, und die Bildung der Linolsäure-Hydroperoxide wurde mithilfe von UV/Vis-Spektroskopie und HPLC beobachtet (Abbildung 4, siehe auch Hintergrundinformationen).

Eingegangen am 7. August 2007

Online veröffentlicht am 17. Oktober 2007

Stichwörter: Antioxidantien · Chlorophyll · Naturstoffe · Porphyrinoide · Strukturaufklärung

- [1] J. L. Dangel, R. A. Dietrich, H. Thomas in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Hrsg.: B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones), Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, **2001**, S. 1044–1100.
- [2] S. B. Brown, J. D. Houghton, G. A. F. Hendry in *Chlorophylls* (Hrsg.: H. Scheer), CRC, Boca Raton, **1991**, S. 465–489.
- [3] B. Kräutler, B. Jaun, K. Bortlik, M. Schellenberg, P. Matile, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1354–1357; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1315–1318.

- [4] B. Kräutler, P. Matile, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 35–43.
- [5] M. Oberhuber, J. Berghold, K. Breuker, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 6910–6915.
- [6] J. Berghold, C. Eichmüller, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 657–668.
- [7] C. Curty, N. Engel, *Phytochemistry* **1996**, 42, 1531–1536.
- [8] T. Müller, S. Moser, K. H. Ongania, A. Pruzinska, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *ChemBioChem* **2006**, 7, 40–42.
- [9] P. Matile, S. Hörtensteiner, H. Thomas, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, 50, 67–95.
- [10] S. Hörtensteiner, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, 57, 55–77.
- [11] B. Kräutler, S. Hörtensteiner in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, Vol. 25 (Hrsg.: H. Scheer, B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger), Springer, Dordrecht, **2006**, S. 237–260.
- [12] J. Berghold, T. Müller, M. Ulrich, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Monatsh. Chem.* **2006**, 137, 751–763.
- [13] W. Mühlecker, K. H. Ongania, B. Kräutler, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 401–404; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 401–404.
- [14] S. Hörtensteiner, K. L. Wüthrich, P. Matile, K. H. Ongania, B. Kräutler, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15335–15339.
- [15] W. Rüdiger in *The Porphyrin Handbook*, Vol. 13 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Elsevier Science, Amsterdam, **2003**, S. 71–108.
- [16] R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames, *Science* **1987**, 235, 1043–1046.
- [17] D. E. Baranano, M. Rao, C. D. Ferris, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 1609–1698.
- [18] W. Mühlecker, B. Kräutler, *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, 34, 61–75.
- [19] D. Moser, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1997**, 150, 759–761.
- [20] J. Giovannoni, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, 52, 725–749.
- [21] J. M. Mach, A. R. Castillo, R. Hoogstraten, J. T. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 771–776.
- [22] N. Yao, J. T. Greenberg, *Plant Cell* **2006**, 18, 397–411.
- [23] P. Matile in *Regulation of Photosynthesis* (Hrsg.: E.-M. Aro, B. Andersson), Kluwer, Dordrecht, **2001**, S. 277–296.
- [24] J. Sabate, S. Rajaram, *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 78, 501S.
- [25] W. C. Willett, *Science* **1994**, 264, 532–537.
- [26] E. Riboli, R. Lambert, *Scientific Publication No. 156 ed.*, IARC Press, Lyon, **2002**.
- [27] J. Boyer, R. H. Liu, *Nutr. J.* **2004**, 3, 5–19.
- [28] P. A. Davis, J. A. Polagruto, G. Valacchi, A. Phung, K. Soucek, C. L. Keen, M. E. Gershwin, *Exp. Biol. Med.* **2006**, 231, 594–598.
- [29] R. Tsao, R. Yang, S. Xie, E. Sockovie, S. Khanizadeh, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4989–4995.
- [30] R. H. Liu, J. Liu, B. Chen, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2341–2343.
- [31] S. B. Lotito, B. Frei, *Free Radical Biol. Med.* **2004**, 36, 201–211.
- [32] M. V. Eberhardt, C. Y. Lee, R. H. Liu, *Nature* **2000**, 405, 903–904.
- [33] M. Leontowicz, S. Gorinstein, H. Leontowicz, R. Krzeminski, A. Lojek, E. Katrich, M. Ciz, O. Martin-Belloso, R. Soliva-Fortuny, R. Haruenkit, S. Trakhtenberg, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 5780–5785.
- [34] J. W. Jonker, M. Buitelaar, E. Wagenaar, M. A. van der Valk, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, T. Plosch, F. Kuipers, R. P. J. O. Elferink, H. Rosing, J. H. Beijnen, A. H. Schinkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 15649–15654.
- [35] Ein walisisches Sprichwort aus dem 19. Jh. (aus *Random House Dictionary of Popular Proverbs and Sayings*; Hrsg.: G. Y. Titelman, **1996**).