

Ein fluoreszierender Chlorophyll-Katabolit des Dioxobilin-Typs als transientes und frühes Zwischenprodukt des Dioxobilin-Astes des Chlorophyllabbaus in *Arabidopsis thaliana*

Iris Süssenbacher, Stefan Hörtensteiner und Bernhard Kräutler*

Professor Albrecht Berkessel zum 60. Geburtstag gewidmet

Abstract: Der Chlorophyllabbau findet in höheren Pflanzen über den „PaO/Phyllobilin“-Weg statt. Dabei werden zwei wichtige Phyllobilin-Typen gebildet, die charakteristischen 1-Formyl-19-oxobiline und die vor kurzem entdeckten 1,19-Dioxobiline. Die hypothetische Verzweigung ist immer noch unbekannt, an welcher sich die ursprünglich gebildeten 1-Formyl-19-oxobiline in 1,19-Dioxobiline umwandeln. Hier klären wir diesen hypothetischen und entscheidenden Übergang durch die Identifizierung des ersten natürlichen fluoreszierenden Chlorophyll-Kataboliten vom 1,19-Dioxobilin-Typ (DFCC) auf. Dieses kurzlebige Zwischenprodukt des Chlorophyllabbaus wurde aus Extrakten von *Arabidopsis thaliana*-Blättern isoliert, die sich in einem frühen Seneszenz-Stadium befanden. Dieser DFCC konnte als direkte Vorstufe des hauptsächlich entstehenden, nichtfluoreszierenden 1,19-Dioxobilins identifiziert werden, das sich in seneszenten Blättern anreichert.

Vor 25 Jahren, als man noch glaubte, Chlorophyll (Chl) verschwände in den Pflanzen, ohne eine Spur zu hinterlassen,^[1] konnte ein farbloser Chl-Katabolit als ein lineares Tetrapyrrol vom 1-Formyl-19-oxobilin-Typ identifiziert werden,^[2] was den Weg für die weitere strukturgeleitete Erforschung des „PaO/Phyllobilin“-Abbaus des Chlorophylls ebnete.^[3] Eine oxidative Spaltung des Chl-Makroringes führt demnach zu 1-Formyl-19-oxobilinen und öffnet damit den Weg zu den verschiedenen bilinartigen Kataboliten des Chls, den Phyllobilinen.^[3b,d] Vor kurzem wurde außerdem entdeckt, dass sich der Chl-Abbau „verzweigt“ und sich Chl-Kataboliten vom 1,19-Dioxobilin-Typ (DCCs) in einer zweiten Hauptfamilie der Phyllobiline entstehen.^[3c,d] Diese (Typ-II-)

Phyllobiline, zu denen etwa die nichtfluoreszierenden Chl-Kataboliten vom 1,19-Dioxobilin-Typ (DNCCs) gehören, sind überwiegend farblos.^[5] Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass DNCCs die Deformylierungsprodukte der „nichtfluoreszierenden“ Chl-Kataboliten (NCCs) darstellen,^[5a] aber bisher konnte der natürliche Schritt, der 1-Formyl-19-oxobiline in DCCs umwandelt, noch nicht geklärt werden.^[3d] Die rätselhafte stereochemische Vielfalt der natürlichen DNCCs ließ NCCs nicht als wahrscheinliche Vorstufen der DNCCs erscheinen.^[5b] Aus diesem Grund wurde eine frühere Abzweigung im „PaO/Phyllobilin“-Abbauweg von Chl vermutet, in der ein noch unbekannter fluoreszierender Chl-Katabolit des Dioxobilin-Typs (DFCC) die Vorstufe der DNCCs wäre (Abbildung 1).^[5b]

Ein außergewöhnliches Cytochrom-P450-Enzym (CYP89A9) wurde vor kurzem in *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) identifiziert, das die In-vitro-Deformylierung eines „primären“ fluoreszierenden Chl-Kataboliten (*p*FCC) zu epimeren „primären“ DFCCs (*p*DFCCs) katalysierte.^[6] In einer schwach sauren Lösung isomerisierten die epimeren *p*DFCCs schnell weiter zu einem entsprechenden Paar DNCCs. Die beiden Schlüsselschritte im „Dioxobilin-Zweig“ des Chl-Abbaus schienen also geklärt zu sein.^[6] Leider ließen diese Befunde weder einen Rückschluss auf das stereochemische Ergebnis der hypothetischen DFCC-DNCC Isomerisierung zu,^[5b] noch wurde dadurch ein wesentlicher Schritt im „natürlichen“ Dioxobilin-Weg durch die In-vitro-Enzymreaktion identifiziert. Wir waren nun jedoch in der Lage, einen transient existierenden, natürlichen DFCC in einem frühen Seneszenz-Stadium von Blättern der Modellpflanze *A. thaliana* abzufangen und dessen Isomerisierung zu einem DNCC zu beobachten. Diese Isomerisierung war schnell und führte äußerst stereoselektiv zum *At*-DNCC-33, dem wichtigsten natürlichen DNCC in den seneszenten *A. thaliana*-Blättern (dieser DNCC wurde früher als *At*-NDCC-1 bezeichnet).^[6]

Um dieses frühe Zwischenprodukt des Chl-Abbaus im *A. thaliana*-Wildtypus abzufangen, wurden frische Extrakte von 2 Tage dunkel-inkubierten Blättern (frühes Seneszenz-Stadium) analysiert. Die HPLC-Analyse zeigte, mit früheren Untersuchungen übereinstimmend, eine Vielfalt an Chl-Kataboliten (siehe Abbildung 2 und Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen).^[6,7] Neben nichtfluoreszierenden Fraktionen, die eine Absorption bei ca. 315 nm aufwiesen und als NCCs klassifiziert wurden, konnten auch wichtigere Fraktionen identifiziert werden, die schwache Absorptionen im

[*] I. Süssenbacher, Prof. Dr. B. Kräutler

Institut für Organische Chemie und Centrum für
Molekulare Biowissenschaften, Universität Innsbruck
Innrain 80/82, 6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

Prof. Dr. S. Hörtensteiner
Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich
Zollikerstrasse 107, 8008 Zürich (Schweiz)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506299> zu finden.

 © 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

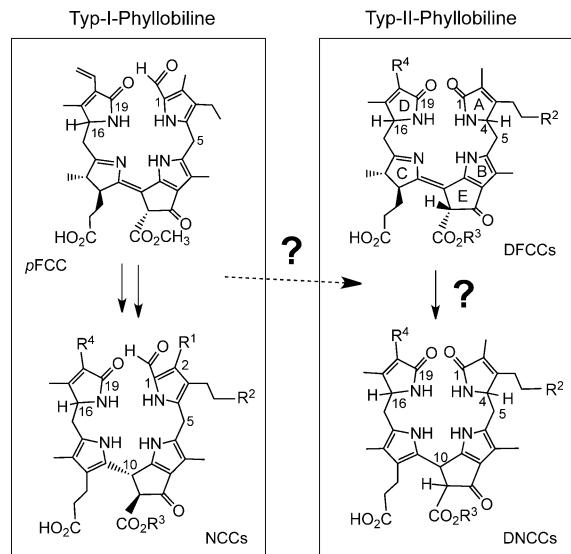
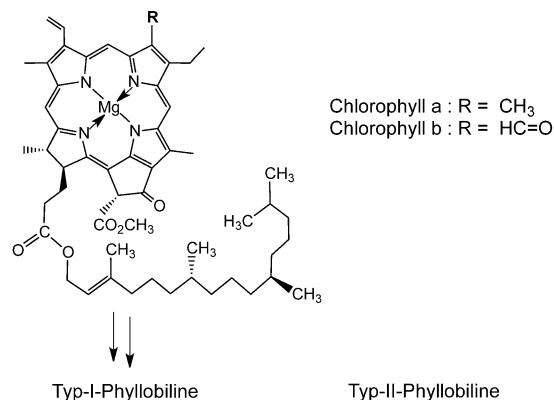


Abbildung 1. Die beiden Phyllobilin-Hauptzweige des Chl-Abbaus in höheren Pflanzen: Typ-I-Phyllobiline (1-Formyl-19-oxobilin) werden zuerst gebildet (links), die vom Typ II (1,19-Dioxobilin) anschließend (rechts). Die „natürliche“ Verzweigung von Typ-I- zu Typ-II-Phyllobilinen blieb aber erst noch zu identifizieren.

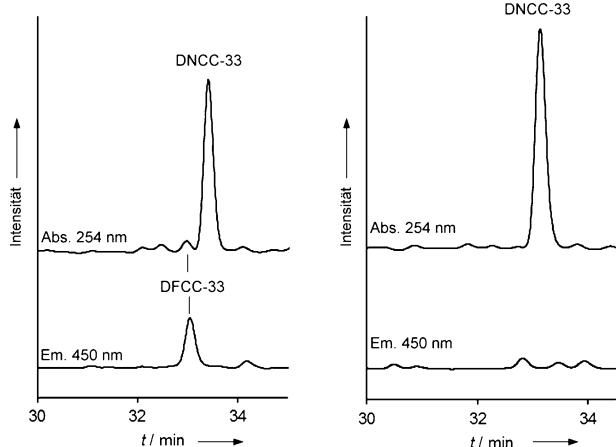


Abbildung 2. HPLC-Analyse der Chl-Kataboliten von einem *A. thaliana*-Blattextrakt (Wildtypus). Links: Analyse von Blättern in einem frühen Seneszenz-Stadium (2 Tage Lagerung in Dunkelheit). Rechts: Analyse von gelben, seneszenten Blättern, die 6 Tage lang dunkel inkubiert wurden (obere Spur: Absorption bei 254 nm, untere Spur: Lumineszenz bei 450 nm). Für weitere Details siehe die Hintergrundinformationen.

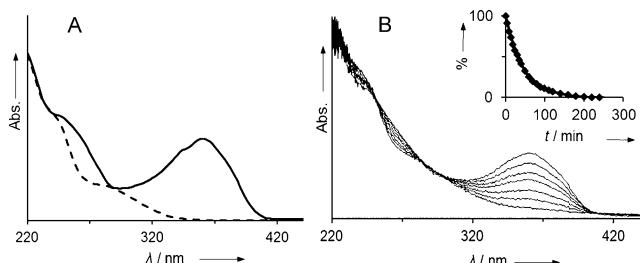


Abbildung 3. A) UV/Vis-Spektren des At-DFCC-33 (**1**, durchgezogene Linie) und des At-DNCC-33 (**2**, gestrichelte Linie). B) UV/Vis-Analyse des Isomerisierungsprozesses von At-DFCC-33 (**1**) zu At-DNCC-33 (**2**) in MeOH/Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 5) 1:1.4; Absorptionspektren registriert nach 1, 10, 20, 30, 50, 80 und 220 min. Rechts oben: beobachtete Änderung der Absorption bei 360 nm und Simulation mit Kinetik 1. Ordnung ($k = 0.022 \text{ min}^{-1}$).

Bereich von 237 nm und 274 nm (aber keine bei 315 nm) aufwiesen und früher phänomenologisch als NDCCs („nichtfluoreszierende“ DCCs) bezeichnet wurden. Außerdem konnte eine geringe Menge einer fluoreszierenden Fraktion detektiert werden, die zwei charakteristische Banden bei ca. 237 nm und bei ca. 360 nm aufwies (Abbildung 3). Dieses Absorptionsverhalten war ähnlich dem der DFCCs, die früher als Produkte der P450-katalysierten Deformylierung des pFCC beschrieben wurden.^[6]

Aus *A. thaliana*-Blättern, die für 2 Tage (212 g) oder 3 Tage (148 g) dunkel inkubiert wurden, konnten mittels halbpräparativer HPLC-System ungefähr 130 µg der unbekannten fluoreszierenden Verbindung **1** mit einer Retentionszeit von 32.8 min isoliert werden. Die Analyse des im positiven Modus gemessenen ESI-Massenspektrums dieses inzwischen als At-DFCC-33 (**1**) bezeichneten Chl-Kataboliten lieferte ein Pseudo-Molekülion $[M + H]^+$ bei einem m/z -Verhältnis von 619.0, was einer molekularen Formel von $C_{33}H_{38}N_4O_8$ entsprach. Fragmente bei m/z 575.1 und 434.2 wiesen auf die Abspaltung von CO_2 und des Ringes A hin. Diese Daten sprachen dafür, dass der DFCC **1** ein Isomer des At-DNCC-33 (**2**) war (der vorher als At-NDCC-1 bezeichnet wurde).^[6,8]

Im 600-MHz-¹H-NMR-Spektrum des At-DFCC-33 (in CD_3OD und bei 273 K gemessen) konnten 31 der 32 an Kohlenstoffatome gebundenen Wasserstoffatome beobachtet und deren Signale zugeordnet werden. Unter diesen befanden sich, im Hochfeldbereich, drei von Methylgruppen stammenden Singulets und ein Dublett bei $\delta = 1.15 \text{ ppm}$, das aufgrund der Korrelationen in den 2D-NMR-Spektren der H_3C13^1 -Methylgruppe zugeordnet werden konnte. Ein Multiplett bei $\delta = 2.79 \text{ ppm}$ konnte dem Proton an C13 und ein anderes, bei $\delta = 2.74 \text{ ppm}$, dem benachbarten HC12 zugeordnet werden. Die Analyse der Korrelationen der ¹H, ¹H-ROESY-, ¹H, ¹H-COSY-, ¹H, ¹³C-HSQC- und ¹H, ¹³C-HMBC-Spektren zeigte, dass die Konstitution der Ringe B und C jenen der bekannten FCCs entsprach.^[9] Zwei dd bei $\delta = 4.43 \text{ ppm}$ und bei $\delta = 4.83 \text{ ppm}$ deuteten auf Wasserstoffatome an den Positionen C4 und C16 hin, wie es schon früher in DNCC-Spektren beobachtet werden konnte.^[5,6] Zusätzlich konnte eine 2-Hydroxyethyl-Seitenkette an der Position C3 identifiziert werden. Die Analyse der 2D-NMR-Spektren

offenbarte die Struktur des *At*-DFCC-33 (**1**, siehe Abbildung S6). Die abgeleitete Struktur stimmte mit der Absorptionsbande bei ca. 360 nm im UV-Spektrum überein, die für den Chromophor der Ringe B/C von FCCs und DFCCs charakteristisch ist. Des Weiteren trat keine Absorptionsbande bei 320 nm auf, die charakteristisch für Typ-I-Phyllo-biline (FCCs und NCCs) wäre. Somit konnte der erste natürliche DFCC aus Pflanzen identifiziert werden.

Der *At*-DFCC-33 (**1**) zeigte die bei Raumtemperatur erwartete Instabilität bei Lagerung in ungepufferten oder leicht sauren Medien. Ein derartiges Verhalten war schon aus analogen früheren Studien mit typischen FCCs bekannt, die in schwach sauren wässrigen Lösungen, wie sie auch in den Vakuolen herrschen, nach kurzer Zeit stereoselektiv zu den entsprechenden NCCs isomerisierten.^[10] Bei pH 5 isomerisierte auch eine Probe von *p*DFCCs (aus der In-vitro-Deformylierung des *p*FCC) zu einem Paar von DNCCs.^[6] Um den Isomerisierungsprozess des isolierten natürlichen *At*-DFCC-33 (**1**) und dessen Isomerisierungsprodukt zu erfassen, wurde eine Lösung des DFCC **1** in wässrigem Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 5) bei Raumtemperatur gelagert. Dabei konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie eine hochselektive Umwandlung des DFCC **1** beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen wies **1** eine Halbwertszeit von 32 min auf und die Isomerisierung eine Kinetik 1. Ordnung ($k = 0.022 \text{ min}^{-1}$). Nach 220 min zeigte die Lösung das typische UV-Spektrum eines DNCCs (Abbildung 3B). Laut HPLC-Analyse wurde nur ein einziges Produkt gebildet, welches die gleiche Retentionszeit wie der *At*-DNCC-33 aufwies (**2**, siehe Abbildung S8). Ein ESI-Massenspektrum des mutmaßlichen Isomerisierungsproduktes zeigte das Pseudo-Molekül $[M + H]^+$ bei m/z 619.0, was der Summenformel von $C_{33}H_{38}N_4O_8$ entsprach. Die CD-Spektren des Isomerisierungsprodukts von *At*-DFCC-33 (**1**), von *At*-DNCC-33 (**2**) und anderer aus Blättern von *A. thaliana* isolierter DNCCs zeigte alle die gleichen Charakteristika (siehe Abbildung S1).^[8] Somit war das nichtfluoreszierende Produkt der säurekatalysierten Isomerisierung des *At*-DFCC-33 nicht unterscheidbar von *At*-DNCC-33, dem Hauptabbauprodukt von Chl in seneszenten Blättern von Wildtypus *A. thaliana*.^[6,8]

Die Entdeckung eines natürlichen 1,19-Dioxobilin-artigen FCCs (des DFCC **1**), wie auch seine hier beschriebene selektive Isomerisierung zum DNCC **2**, unterstützt die essenzielle Rolle solcher kurzlebiger fluoreszierender Zwischenprodukte im Chl-Abbau in höheren Pflanzen, wie etwa im Wildtypus von *A. thaliana*. Interessanterweise konnte kürzlich in einer Arbeit über die Chl-Kataboliten in seneszenten Blättern einer *A. thaliana*-Mutante ein modifizierter „fluoreszierender“ 1,19-Dioxobilin-Typ Chl-Katalysator (ein FDCC) identifiziert werden, der eine rätselhafte zusätzliche Hydroxymethylgruppe trug. Die gleiche Modifikation konnte auch in einigen NDCCs, sowohl dieser Mutante^[11] als auch des Wildtypus von *A. thaliana* beobachtet werden.^[8] Der *At*-DFCC-33 (**1**) wurde hingegen als einziges Stereoisomer erhalten und es wurde kein Epimer von **1** im Blattextrakt gefunden. Basierend auf diesen Ergebnissen wird davon ausgängen, dass die hypothetische stereoselektive Ausbildung von **1** über eine enzymatische oxidative In-vivo-Deformylierung eines Vorläufer-FCCs stattfindet. Die „rätselhaften“

Hydroxymethylierungen, die in vivo, aber nicht in vitro mit der Deformylierung des *p*FCC einhergehen, sind keine Bestandteile des natürlichen Abbauweges, der zum DFCC **1** führt.

In diesem Zusammenhang scheint die Gegenwart einer primären Hydroxygruppe an der Ethylseitenkette der C3-Position im *At*-DFCC-33 (**1**) ein wichtiges Element zu sein,^[8] was auf einen dazu passenden, schon hydroxylierten FCC als Vorstufe von **1** schließen lässt. Hydroxylierung des *p*FCCs an der C3-Seitenkette könnte im Chloroplasten unter Ausbildung des bekannten 3²-OH-*p*FCC^[10c] stattfinden.^[3b] Nach dem Transport aus der Organelle wäre dieser FCC ein ausgezeichnetes Substrat für CYP89A9 (Abbildung 4). Die enzymkatalysierte Deformylierung des 3²-OH-*p*FCC^[10c] würde den 3²-OH-DFCC (**3**) geben.^[6] Die Hydrolyse der Methylesterfunktion von **3** durch die MES16, einer sehr aktiven Methylesterase im *A. thaliana*-Wildtypus, würde den *At*-DFCC-33 (**1**) erzeugen, der nach dem Transport in die leicht saure Vakuole (Abbildung 5) zum DNCC **2** isomerisierte.

Das weitere „Schicksal“ der FCCs nach ihrem Transport aus den Chloroplasten hängt hauptsächlich von ihrer Wechselwirkung mit CYP89A9 und/oder MES16 ab, zweier konkurrierender Enzyme im Zytosol. Die Methylesterase MES16 wandelt FCCs in polarere FCCs um, die aber dank zweier freier Säurefunktionen ineffiziente Substrate von CYP89A9 sein dürften. So wurde der O⁸⁴-Desmethyl-*p*FCC (*At*-FCC-2)^[7b] in vitro nicht von CYP89A9 deformyliert.^[6] Deshalb ist der alternative Weg der Bildung des DFCC **1** auch sehr unwahrscheinlich, bei dem **1** durch Deformylierung des 3²-OH-O⁸⁴-Desmethyl-*p*FCC mittels CYP89A9 gebildet würde.

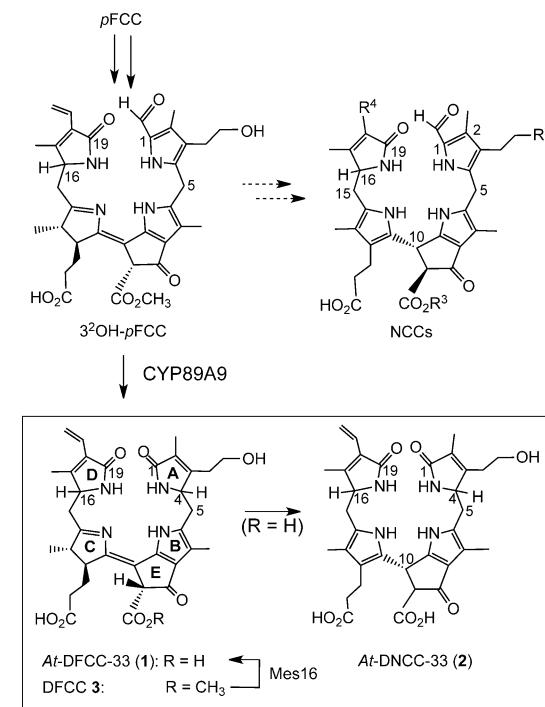


Abbildung 4. Hypothetische In-vitro-Umwandlung des DFCC **1** in den DNCC **2** und Übersicht über den vorgeschlagenen Bildungsweg von **1** aus *p*FCC über Hydroxylierung zum 3²-OH-*p*FCC, Deformylierung zum hypothetischen 3²-OH-DFCC **3** und Hydrolyse der Methylesterfunktion von **3**.

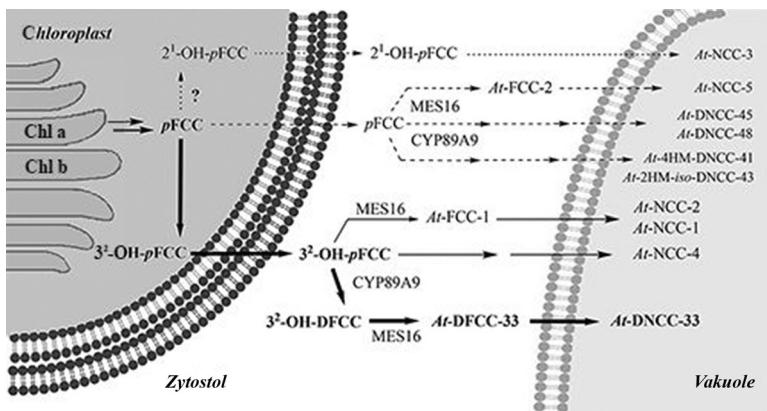


Abbildung 5. Topographisches Modell der hypothetischen Schritte im Chl-Abbau in seneszenten Blättern von *A. thaliana*. Die Hauptschritte sind mit abgekürzten Namen der bekannten Chl-Kataboliten gekennzeichnet.

Zwar wird $3^2\text{-OH-}p\text{FCC}$ durch MES16 zu $3^2\text{-OH-}O^{8^4}\text{-Desmethyl-}p\text{FCC}$ hydrolysiert, der als *At-FCC-1* bekannt^[7b] und rationelle Vorstufe von zwei in Blättern von *A. thaliana* gefundenen NCCs ist.^[7b]

At-DFCC-33 (**1**) konnte unter Standard-Extraktions- und -Isolierungsbedingungen^[11b] nicht unverändert isoliert werden. Aus diesem Grund wurden die Extrakte mit **1** bei tieferen Temperaturen (0°C oder weniger) gelagert, um die Isomerisierung von **1** zu **2** zu minimieren. Die schnelle Umwandlung des DFCC **1** zu einem DNCC war nicht unerwartet, wenn man sich die schnelle Isomerisierung von FCCs zu NCCs vor Augen führt. Frühere Experimente wiesen darauf hin, dass solche Isomerisierungen vor allem bei solchen FCCs schnell von statt gehen, die auch eine freie 8^2 -Carbonsäurefunktion aufweisen.^[10c] Der DFCC **1** trägt ebenfalls eine freie 8^2 -Carbonsäurefunktion. Wie schon beim „primären“ FCC (*pFCC*) gezeigt,^[10a,b] wird auch hier angenommen, dass die Propionsäure-Gruppe am C12 eine rasche stereoselektive Isomerisierung von **1** zu **2** induziert. Dies würde bedeuten, dass **2** mit *R*-Konfiguration an der C10-Position gebildet würde. Die Isomerisierung von **1** bei pH 5 produzierte jedenfalls den natürlichen DNCC **2**, dessen chiroptische Eigenschaften mit denen der meisten identifizierten DNCCs übereinstimmen.^[5a,6,11] Dieses stereochemische Ergebnis steht aber im Widerspruch zur Stereochemie des DNCCs aus dem Spitzahorn,^[5b] dessen Bildung somit noch einer alternativen Erklärung bedarf.

Durch die Charakterisierung des *At-DFCC-33* (**1**) konnte ein frühes echtes Zwischenprodukt des Haupt-Dioxobilin-zweiges des Chl-Abbaus in *A. thaliana* identifiziert werden. Der DFCC **1** wird als kurzlebiges Zwischenprodukt nahe der hypothetischen Abzweigung des „*PaO/Phyllobilin*“-Weges erzeugt, an dem Typ-II-Phyllobilin aus den zuerst gebildeten 1-Formyl-19-oxobilin-artigen Phyllobilinen entstehen, die auch als Typ-I-Phyllobilin bezeichnet werden. Die Identifizierung von **1** bekräftigt die hypothetische Rolle der DFCCs als kurzlebiger natürlicher Vorstufe der nichtfluoreszierenden Typ-II-Phyllobilin, wie etwa der DNCCs. Die transiente Existenz des *At-DFCC-33* (**1**) machte es notwendig, diesen Kataboliten aus Blättern bei einem frühen Seneszenz-Stadi-

um zu isolieren. In voll seneszenten, gelben *A. thaliana*-Blättern konnten fluoreszierende Phyllobiline kaum noch detektiert werden, jedoch konnte eine Vielzahl farbloser nichtfluoreszierender Chl-Kataboliten (NCCs, DNCCs und NDCCs) von beiden Abbauästen identifiziert werden.^[6-8]

Wie schon von der natürlichen Bildung der NCCs aus den entsprechenden FCCs her bekannt,^[10a,b] unterstützt eine leicht saure Umgebung, wie sie in den Vakuolen vorliegt, die schnelle Isomerisierung von DFCCs zu entsprechenden DNCCs. Bei pH 5 isomerisiert der DFCC **1** schnell und stereoselektiv zum DNCC **2**, was **1** als die natürliche Vorstufe von **2** in *A. thaliana* erscheinen lässt. Da **2** bei weitem die Hauptfraktion der Phyllobiline in den seneszenten Blättern dieser Pflanze ist (siehe Abbildung 2 und Abbildung S3),^[6] kommt dem kurzlebigen

DFCC **1** eine wichtige Position im Chl-Abbau in solchen seneszenten Blättern zu. Das Modell des Chl-Abbaus in höheren Pflanzen^[3c,d] setzt aber den Transport von **1** in die Vakuolen voraus, der erst dort zu **2** isomerisieren dürfte.

Der entscheidende In-vivo-Übergang von Typ-I- zu Typ-II-Phyllobilinen findet zum Großteil über die Deformylierung des $3^2\text{-OH-}p\text{FCC}$ statt, der ein ausgezeichnetes Substrat für die FCC-Deformylase CYP89A9 ist (Abbildung 5).^[6] Das Deformylierungsprodukt, $3^2\text{-OH-}p\text{DFCC}$ (**3**), wird vermutlich rasch durch die zytosolische Methylesterase MES16 zum DFCC **1** umgewandelt und konnte bis jetzt nicht in *A. thaliana*-Extrakten identifiziert werden. Auch die direkte Deformylierung des *pFCC* findet in seneszenten *A. thaliana*-Blättern statt, ist aber Teil eines weniger wichtigen Abbauweges.^[8] Nach einem früheren Vorschlag wird *pFCC* zu *pDFCC* und zu hydroxymethylierten *iso-DFCCs* umgesetzt, welche die „rätselhafte“ direkte Vorstufe der entsprechenden außergewöhnlichen NDCCs darstellen.^[8,11] Die Verästelung des „*PaO/Phyllobilin*“-Weges in Richtung Typ-II-Phyllobilin kommt demnach mehr als nur einmal im Anschluss an die Bildung des *pFCC* vor. Zwei wesentliche Abzweigungen von Typ-I- zu Typ-II-Phyllobilinen konnten nun identifiziert werden, die der niedrigen (In-vitro-)Selektivität der CYP89A9-Deformylase zuzuschreiben sind. Unsere hier beschriebenen Ergebnisse liefern einen tiefen Einblick in den Chl-Abbau in *A. thaliana* nach dem „*PaO/Phyllobilin*“-Weg, der in späteren Abschnitten unterschiedliche Richtungen nimmt.

Der Abbau von Chl in seneszenten *A. thaliana*-Blättern weist Merkmale eines „Entgiftungsprozesses“ auf.^[3a] Er führt schnell zu einer Vielzahl zunehmend polarer, farbloser und nichtfluoreszierender Kataboliten, wobei die Typ-II-Phyllobilinen dominieren, z. B. der DNCC **2**. Der faszinierende 1,19-Dioxobilin-Strukturtyp kommt sowohl in Typ-II-Phyllobilinen vor, als auch in den vom Häm abgeleiteten Bilinen.^[12] Dieses gemeinsame Strukturmerkmal beider Abbauwege ist in Anbetracht der wichtigen biologischen Funktionen der von Häm abstammenden Gallenfarbstoffe sehr bemerkenswert.^[12] Dank ihrer einzigartigen Chemie, sind deshalb auch die ubiquitären Phyllobiline^[3d,4b] Kandidaten für relevante

biologische Prozesse in höheren Pflanzen und vielleicht sogar in pflanzenfressenden Tieren und in Menschen.^[5b,13] Ein physiologischer Effekt der Phyllobiline ist aber bisher erstaunlicherweise noch unbekannt.

Experimentelles

HPLC-Analyse: 207 mg frische *A.-thaliana*(Wildtypus)-Blätter, die für 2 Tage in Dunkelheit inkubiert wurden, wurden mithilfe von flüssigem N₂ verrieben, mit 41 µL MeOH extrahiert und für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand (160 µL) wurde 1:1 mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7) verdünnt. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min wurde ein Aliquot von 20 µL mit HPLC (Standardbedingungen, Details siehe die Hintergrundinformationen) analysiert.

Charakterisierung von *At*-DFCC-33 (**1**): UV/Vis (MeOH, *c* = ca. 3.5×10^{-5} M): λ_{max} (ϵ_{rel}) = 360 (1.00), 244 sh (1.63). CD (MeOH, *c* = ca. 3.5×10^{-5} M): $\lambda_{\text{max/min}}$ [nm] (ϵ_{rel}) = 357 (2.5), 285 (-0.37), 264 (1.4), 240 (-1.6), 224 (0.21). LC-ESI-MS: *m/z* (%): 657.0 (4, [M + K]⁺); 621.0 (9), 620.0 (37), 619.0 (100, C₃₃H₃₉N₄O₈, [M + H]⁺); 613.1 (8, [M-CO₂ + K]⁺); 601.1 (8, [M-H₂O + H]⁺); 597.2 (9, [M-CO₂ + Na]⁺); 577.1 (9), 576.1 (36), 575.1 (98, [M-CO₂ + H]⁺); 434.2 (60, [M-CO₂-C₇H₁₁NO₂ (Ring A) + H]⁺). Für ¹H- und ¹³C-NMR-Daten (600 MHz, CD₃OD, 275 K) und weitere Details siehe die Hintergrundinformationen.

Für Details zur Isolierung von **1**, zur Isomerisierung von **1** bei pH 5 (Abbildung 3), zur Charakterisierung von *At*-DNCC-33 (**2**), gebildet durch die Isomerisierung von **1**, sowie für Details zur Spektroskopie siehe die Hintergrundinformationen.

Danksagung

Wir danken Thomas Müller und Christoph Kreutz für Hilfestellung bei Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie. Wir sind außerdem dem Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF, Proj. Nr. L-472 und I-563 an B.K.) und dem Schweizerischen Nationalfonds (SNF Proj. Nr. 31003A_149389/1 an S.H.) für die finanzielle Unterstützung dankbar.

Stichwörter: Chlorophyll · Isomerisierungen · Phyllobiline · Strukturaufklärung · Tetrapyrrole

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13777–13781
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13981–13985

- [1] a) P. Matile, *Chimia* **1987**, *41*, 376–381; b) G. A. F. Hendry, J. D. Houghton, S. B. Brown, *New Phytol.* **1987**, *107*, 255–302.
[2] a) B. Kräutler, B. Jaun, K. Bortlik, M. Schellenberg, P. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1315–1318; *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1354–1357; b) B. Kräutler, P. Matile, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 35–43.

- [3] a) P. Matile, S. Hörtensteiner, H. Thomas, B. Kräutler, *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 1403–1409; b) S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **2011**, *1807*, 977–988; c) S. Hörtensteiner, *Plant Mol. Biol.* **2013**, *82*, 505–517; d) B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6227–6238.
[4] a) S. Hörtensteiner, K. L. Wüthrich, P. Matile, K. H. Onganía, B. Kräutler, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15335–15339; b) S. Moser, T. Müller, M. Oberhuber, B. Kräutler, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *21*–31.
[5] a) F. G. Losey, N. Engel, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8643–8647; b) T. Müller, M. Rafelsberger, C. Vergeiner, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10724–10727; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10912–10916.
[6] B. Christ, I. Süssenbacher, S. Moser, N. Bichsel, A. Egert, T. Müller, B. Kräutler, S. Hörtensteiner, *Plant Cell* **2013**, *25*, 1868–1880.
[7] a) T. Müller, S. Moser, K. H. Onganía, A. Pruzinska, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 40–42; b) A. Pruzinska, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, T. Müller, K. H. Onganía, B. Kräutler, J.-Y. Youn, S. J. Liljegren, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 52–63.
[8] I. Süssenbacher, C. Christ, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 11664–11670.
[9] W. Mühlecker, K. H. Onganía, B. Kräutler, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 401–404; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 401–404.
[10] a) M. Oberhuber, J. Berghold, K. Breuker, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6910–6915; b) M. Oberhuber, J. Berghold, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3057–3061; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3100–3104; c) B. Christ, S. Schelbert, S. Aubry, I. Süssenbacher, T. Müller, B. Kräutler, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 628–641.
[11] I. Süssenbacher, B. Christ, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 87–92.
[12] a) H. Falk, *Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, Wien, **1989**; b) D. A. Lightner, *Bilirubin: Jekyll and Hyde Pigment of Life*, Springer, Wien, **2013**; c) K. E. Overkamp, N. Frankenberg-Dinkel in *Handbook of Porphyrin Science*, Bd. 28 (Hrsg.: G. C. Ferreira, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific, Hackensack, **2014**, S. 187–226; d) K. H. Zhao, R. J. Porra, H. Scheer in *Handbook of Porphyrin Science*, Bd. 22 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific, Hackensack, **2013**, S. 1–66.
[13] a) D. Moser, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1997**, *150*, 759–761; b) T. Müller, M. Ulrich, K.-H. Onganía, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8699–8702; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8854–8857; c) M. Roiser, T. Müller, B. Kräutler, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1385–1392; d) J. J. Ríos, A. Pérez-Gálvez, M. Roca, *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 255–262; e) J. J. Ríos, M. Roca, A. Pérez-Gálvez, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10576–10584.

Eingegangen am 8. Juli 2015

Online veröffentlicht am 1. Oktober 2015