

Chlorophyllabbau

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201508928
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201508928

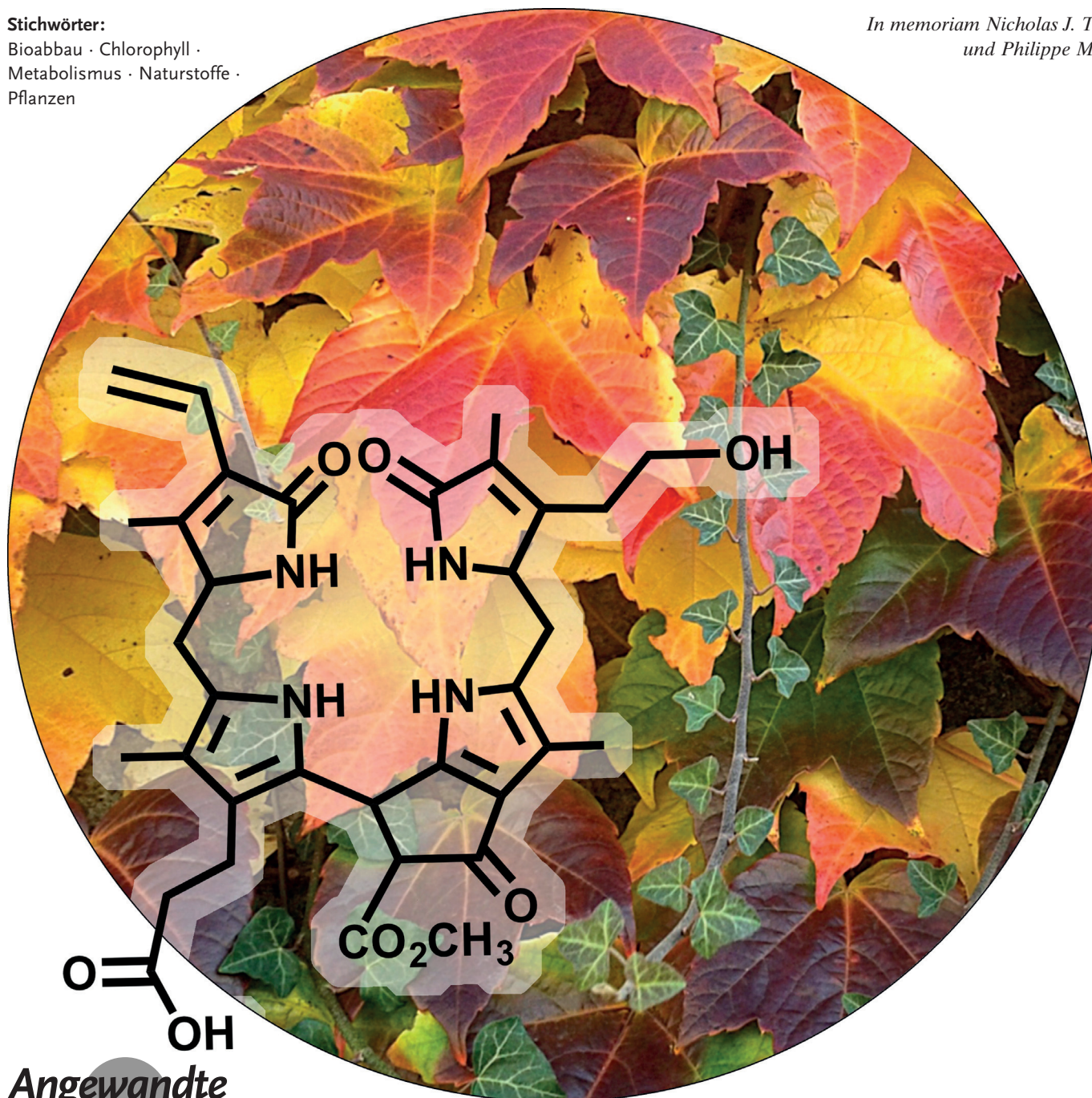
Der Chlorophyllabbau in höheren Pflanzen – Phyllobiline als weitverbreitete, aber kaum sichtbare Zeichen von Reifung, Seneszenz und Zelltod

Bernhard Kräutler*

Stichwörter:

Bioabbau · Chlorophyll ·
Metabolismus · Naturstoffe ·
Pflanzen

*In memoriam Nicholas J. Turro
und Philippe Matile*



Angewandte
Chemie

Die herbstlichen Farben sind von je her faszinierend und immer noch ein höchst rätselhaftes Phänomen. Vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass beim Abbau von Chlorophyll (Chl) in Blättern und Früchten Bilin-ähnliche Chl-Kataboliten gebildet werden, die als Phyllobiline bezeichnet werden. Dank intensiver chemisch-biologischer Zusammenarbeit ist es inzwischen gelungen, die Schlüsselprozesse des Chl-Abbaus in seneszenten Blättern und reifenden Früchten aufzuklären. Das Chl wird rasch zu farblosen und größtenteils photoinaktiven Phyllobilinen abgebaut, was offenbar primär ein Teil eines Entgiftungsprozesses ist. In manchen seneszenten Blättern und in den Schalen reifer Bananen reichern sich hingegen fluoreszierende Chl-Kataboliten an und bewirken dort ein eindrucksvolles, blaues Leuchten. Die strukturellen Besonderheiten, die chemischen Eigenschaften und die Häufigkeit der Phyllobiline in der Biosphäre lassen damit biologische Funktionen vermuten, die immer noch darauf warten, entdeckt zu werden.

1. Einleitung

Das Schauspiel des immer wieder im Frühling neu entstehenden Chlorophylls (Chl) und das prunkvolle Verschwinden der grünen Pflanzenpigmente in den herbstlichen Blättern der Bäume und Sträucher gehören zu den farbenprächtigsten natürlichen Phänomenen. Der jahreszeitlich bedingte Chl-Abbau war dabei immer schon bezaubernd, blieb aber lange auch ein Rätsel. Der Chl-Metabolismus stellt wahrscheinlich sogar das am besten sichtbare Zeichen für Leben auf der Erde dar, das sogar vom Weltall aus beobachtbar ist.^[1] Schätzungsweise werden jährlich mehr als 1000 Millionen Tonnen Chlorophyll gebildet und wieder abgebaut.^[2] Früher wurde angenommen, dass dabei gefärbte Chl-Abbauprodukte gebildet werden, die den Bilinen (den Abbauprodukten von Häm)^[3] oder den Produkten der Licht-induzierten oxygenolytischen Spaltung von Chl ähneln.^[4] Dies führte dazu, dass sich alle früheren Untersuchungen auf die Detektion solcher hypothetischen, gefärbten Reste des grünen Chl konzentrierten.^[5] Inzwischen wissen wir, dass all diese Bemühungen umsonst waren^[1a,6] und dass das Chl scheinbar verschwindet, ohne eine Spur zu hinterlassen.^[2] Gefärbte Chl-Kataboliten konnten hingegen in höheren Pflanzen erst vor kurzem nachgewiesen werden.^[7]

Erst vor 25 Jahren^[8] begann der Chl-Abbau in höheren Pflanzen einige seiner molekularen und zellulären Geheimnisse preiszugeben.^[1a,9] Der Durchbruch gelang mit der eindeutigen Identifikation und Strukturaufklärung von farblosen Chl-Kataboliten aus einer Gefäßpflanze.^[1a,8,10] Dadurch wurde der Weg für fundamentale Einblicke in den Chl-Abbau geebnet.^[9a,c,11] Kishi und Shimomura konnten in verwandten Studien Chl-Abbauprodukte als lumineszierende Verbindungen in marinen, phototrophen Organismen identifizieren,^[12] jedoch erwiesen sich diese linearen Tetrapyrrole^[12] in den frühen 1990er Jahren als grundsätzlich verschieden von den Chl-Kataboliten aus höheren Pflanzen.^[8a,10]

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4965
2. Chlorophyllabbau – ein zellulärer Drei-Kompartimenten-Weg	4967
3. Gemeinsame frühe Schritte des PaO/Phyllobilin-Weges	4967
4. Verzweigung des PaO/Phyllobilin-Weges in seinen späteren Stadien	4970
5. Chl-Abbau in der Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> – ein Modellfall	4977
6. Lange übersehene Chl-Kataboliten in Früchten und Gemüse	4979
7. Phyllochromobile durch Oxidation von Phylloleukobilinen	4981
8. Phyllobiline sind Naturstoffe mit bemerkenswerten Eigenschaften	4983
9. Die Rolle des Chlorophyllabbaus in höheren Pflanzen – Zeit für einen Paradigmenwechsel	4984
10. Zusammenfassung und Ausblick	4986

1.1. Der Durchbruch: Identifizierung des ersten farblosen Chl-Kataboliten aus höheren Pflanzen

Durch Vergleich der Pigmente der natürlichen, seneszenten Blätter des Wildtyps von Wiesenschwingel (*Festuca pratensis*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) mit den jeweiligen „stay-green“-Mutanten (die nicht vergilben) konnten Matile,

[*] Prof. Dr. B. Kräutler

Institut für Organische Chemie & Centrum für Molekulare-Biowissenschaften (CMBI), Universität Innsbruck
6020 Innsbruck (Österreich)
E-Mail: bernhard.kraeutler@uibk.ac.at

ORCID[®] der Autoren zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508928> zu finden.

© 2016 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.

Thomas und Mitarbeiter einige farblose Verbindungen identifizieren, die im seneszenten Wildtyp auftraten, aber in den Mutanten fehlten.^[5,13] Etliche dieser farblosen Verbindungen wurden als mögliche Produkte des Chl-Abbaus betrachtet. Einige von ihnen zersetzten sich schnell zu rostbraunen Komponenten und wurden deshalb als „rusty pigments“ klassifiziert.^[14]

Von „rusty pigment 14“ (**1**), einer farblosen Hauptfraktion in Extrakten von seneszenten Primärblättern der Gerste, wurde vermutet, dass es ein Chl-Katabolit sei.^[14,15] ¹⁴C-markierte δ -Aminolävulinsäure, die biosynthetische Vorstufe der natürlichen Porphyrinoide, wurde in das „rusty pigment 14“ eingebaut, was dessen angenommene Rolle als Chl-Katabolit noch weiter bekräftigte.^[15] Die Verbindung **1** konnte durch Kombination von Massenspektrometrie^[16] sowie UV/Vis-, Circular dichroismus (CD)- und heteronuklearer NMR-Spektroskopie^[17] tatsächlich als vom Chl abstammendes, lineares Tetrapyrrol identifiziert werden.^[8a] **1** wurde als ein optisch aktives, Metall-freies, farbloses und nichtfluoreszierendes lineares Tetrapyrrol mit dekonjugierten Pyrroleinheiten charakterisiert. Ein Merkmal von Chl und auch von linearem Tetrapyrrol **1** ist hierbei eine Cyclopentanoneinheit, die an die α - und β -Positionen eines Pyrrolrings anelliert ist und eine Methoxycarbonylgruppe trägt. Das farblose und nichtfluoreszierende, Bilin-ähnliche Tetrapyrrol **1** wurde somit als erster nicht grüner Chl-Katabolit aus höheren Pflanzen identifiziert.^[1a,8a,9a]

Das polare lineare Tetrapyrrol **1** aus der Gerste (*H. vulgare*) wurde dann als nichtfluoreszierender Chl-Katabolit (NCC) klassifiziert und als Hv-NCC-1 bezeichnet.^[9a,18] Die genaue Strukturanalyse etablierte **1** als ein 3²,18¹,18²-Trihydroxy-16,19-dihydro-1-formyl-19-oxophyllobilan (Abbildungen 1 und 2),^[8,19] dessen Benennung sich auf eine halbsystematische, strukturbasierte Nomenklatur bezieht, nach der lineare, tetrapyrrolische Chl-Kataboliten als Phyllobilinderivate bezeichnet werden.^[9c,10] Der Terminus „Phyllobilin“ verweist auf die grundlegend Bilin-ähnliche Struktur solcher Chl-Kataboliten und auf Chlorophyll als ihren Ursprung.^[10] Die namensgebende Verbindung ist das Phyllobilan (**1**; Abbildung 2). In Analogie zur Nomenklatur der linearen Tetrapyrrole und der Gallenfarbstoffe^[3] werden NCCs mit drei gesättigten *meso*-Positionen somit als 16,19-Dihydro-1-formyl-19-oxophyllobilane bezeichnet, z. B. das 16,19-Dihydro-1-formyl-19-oxo-*epi*-phyllobilan (**epi-5**), das in seneszen-

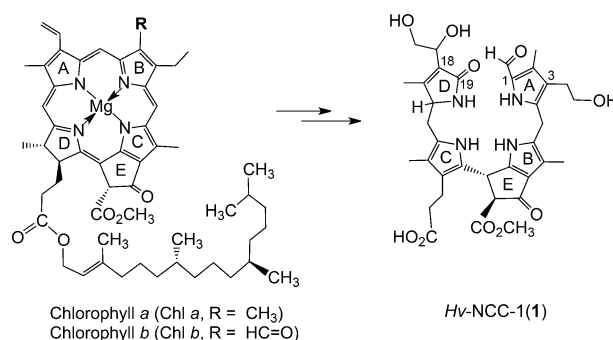


Abbildung 1. „Rusty pigment 14“, das aus seneszenten Blättern der Gerste (*Hordeum vulgare*) isoliert und später als Hv-NCC-1 (**1**) bezeichnet wurde, konnte als erster farbloser Chl-Katabolit identifiziert werden.^[8a]

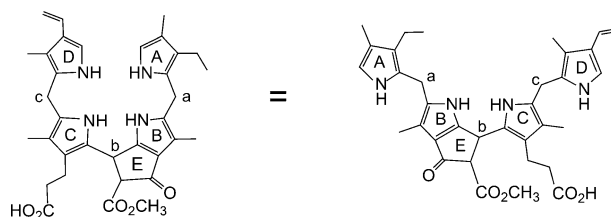


Abbildung 2. Die namensgebende Struktur, das Phyllobilan (**1**),^[10] in zwei Formeln, die pseudo-cyclische (links) und offene Konformationen (rechts) repräsentieren.

ten Blättern des japanischen Kuchenbaums (*Ceridiphyllum japonicum*; siehe Tabelle 1 in Abschnitt 4.1) entdeckt wurde.^[20]

Die Strukturaufklärung des 1-Formyl-19-oxophyllobilans **1** ergab einen ersten Fixpunkt für die Klärung des rätselhaften Weges des Chl-Abbaus während der Blattvergilbung.^[8a] Die chemische Konstitution von **1** ließ auf den Verlust des zentralen Magnesiumions und des Phytolrestes während des Chl-Abbaus schließen. Die Struktur von NCC **1** implizierte außerdem eine oxygenolytische Ringöffnung des porphyrinoiden Makrocyclus an der nördlichen *meso*-Position und wies auf eine (angesichts von Modellreaktionen mit Chl-Derivaten) völlig unerwartete Regioselektivität im Chl-Abbau hin.^[4b] Sie erinnerte auffallend an den Hämabbau,^[3] in dem der Makrocyclus von Häm an der analogen α -*meso*-Position geöffnet wird. Im Unterschied zum NCC **1** mit einer charakteristischen Formylgruppe, die aus der Oxidation der Methineinheit (von Chl) stammt, sind Häm-Kataboliten aber 1,19-Dioxobilane, denen das entsprechende Kohlenstoffatom an der Stelle der Öffnung des Makrocyclus fehlt (das in diesem Falle als CO bei der durch die Häm-Oxygenase katalysierten Reaktion abgespalten wird).^[21] Da der Katabolit **1** eine Methylgruppe an der C2-Position trug, war es wahrscheinlich, dass er eher von Chl a als von Chl b abstammte.^[22] Gegenüber Chl a wurden jedoch zusätzliche polare Funktionalitäten an der Peripherie von **1** eingeführt, die seine Wasserlöslichkeit verbessern. Die Bilin-ähnliche Verbindung **1** existiert, dank ihrer Flexibilität an den drei gesättigten *meso*-Positionen, in einer Vielzahl stabiler Konformationen.



Bernhard Kräutler studierte Chemie an der ETH Zürich, wo er 1976 auch bei Prof. Albert Eschenmoser promovierte. Nach Postdoktoraten bei Prof. Allen J. Bard (University of Texas, Austin) und Prof. Nicholas J. Turro (Columbia University, New York) kehrte er 1978 an die ETH zurück, wo er eine eigene Forschungsgruppe leitete (Habilitation 1985). 1991 wurde er als Ordentlicher Professor für Organische Chemie an die Universität Innsbruck berufen. Seit Oktober 2015 ist er Professor Emeritus. Seine Forschungsgebiete sind Chlorophyllabbau, chemische Biologie des Vitamins B₁₂ sowie funktionalisierte Fullere und Porphyrinoide.

1.2. Nichtfluoreszierende Chl-Kataboliten sammeln sich in seneszenten Blättern an

Der ursprünglich identifizierte Katabolit, *Hv*-NCC-1 (**1**), wurde aus Blättern gewonnen, die durch Aufbewahren in Dunkelheit gelb wurden. Die Verwendung dieser konventionellen Methode, um künstlich die Seneszenz einzuleiten, warf die Frage nach der allgemeineren Relevanz der unerwarteten Struktur des NCC **1** auf. Glücklicherweise konnten kurze Zeit später *Bn*-NCC-1 (**2**), *Bn*-NCC-2 (**3**) und *Bn*-NCC-3 (**4**) (Abbildung 3) als verwandte, polare NCCs aus natürlich seneszenten Rapsblättern (*Brassica napus*) identifiziert werden, die die Rolle von NCCs als farblose Produkte des natürlichen Chl-Abbaus bekräftigten.^[18a,23]

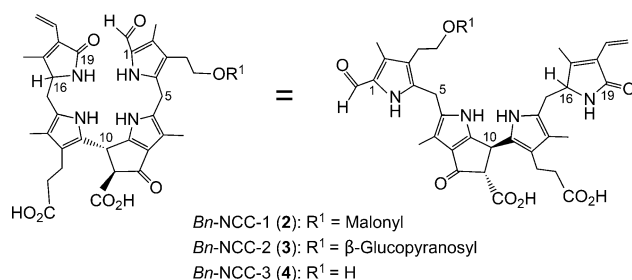


Abbildung 3. NCCs aus natürlich seneszenten Keimblättern von *Brassica napus* (*Bn*-NCCs **2–4**)^[23] in Formeln, die pseudo-cyclische (links) und offene Konformationen (rechts) repräsentieren.

2. Chlorophyllabbau – ein zellulärer Drei-Kompartimenten-Weg

Matile und Mitarbeiter fanden Indizien für das Vorkommen der NCCs in den Vakuolen.^[24] Also müssten Chl-Kataboliten, deren Ursprung in den Chloroplasten liegt, das Cytosol durchqueren, um Zugang zu den Vakuolen zu erhalten.^[9c,24] Deshalb wurde vorgeschlagen, dass der Chl-Abbau metabolische Prozesse in den drei Hauptkompartimenten der Blattzellen benötigt, inklusive des (einseitig gerichteten) Transportes zwischen ihnen.^[1a,9a] Spätere Untersuchungen ließen einen fluoreszierenden Chl-Kataboliten (**6**, *p*FCC, ein 1-Formyl-19-oxobilen-*b*)^[25] als farbloses Produkt des Chl-Abbaus in den Chloroplasten vermuten. Es wurde angenommen, dass FCCs (wie **6**) ins Cytosol transportiert werden und dort in modifizierte FCCs (*m*FCCs) umgewandelt werden.^[9c] Anschließend werden die typischen *m*FCCs entweder in die Vakuolen transportiert, wo sie rasch zu entsprechenden NCCs isomerisieren, oder sie verlieren ihre charakteristische Formylgruppe und werden Dioxobilin-artige fluoreszierende Chl-Kataboliten (DFCCs,^[26] die Vorstufen entsprechender Dioxobilin-

artiger nichtfluoreszierender Chl-Kataboliten, DNCCs),^[26,27] oder sie werden in persistente hypermodifizierte FCCs (*hm*FCCs) umgewandelt, die sich in manchen Blättern und Früchten anreichern (und reifen Bananen ihr blaues Leuchten verleihen,^[6b,28] Abbildung 4). Ein Vierteljahrhundert gemeinsamer chemischer und biologischer Forschung zum Thema Chl-Abbau hat aber nicht nur eine unerwartete, strukturelle Vielfalt von natürlichen Chl-Kataboliten offenbart, sondern auch zur Entdeckung von Schlüsselenzymen geführt, die an der Bildung dieser Kataboliten beteiligt sind (siehe Abschnitte 3 und 4).^[1a,8a,9a,c,10,11b]

3. Gemeinsame frühe Schritte des PaO/Phyllobilin-Weges

3.1. Von Chl *a* und *b* zu Phäophorbid *a*

Die offensichtliche strukturelle Verwandtschaft der NCCs mit Chl *a* warf die Frage auf, wo die Reste vom Chl *b*-Abbau verbleiben. Diese Frage erhielt durch die beobachtete Selektivität der Ringöffnungsreaktion für Phäophorbid *a* (Pheo *a*) während des Chl-Abbaus zusätzliches Gewicht.^[29] Experimente von Folley und Engel ließen bei Verwendung von deuteriertem Wasser (D₂O) als Medium auf einen signifikanten Grad der Deuterierung der C2-Methylgruppe von *Hv*-NCC-1 (**1**) schließen, was zeigte, dass **1** sowohl von Chl *a* als auch von Chl *b* abstammte und eine Reduktion der C2-Formylgruppe von Chl *b* im Spiel war.^[30] Chl *a/b*-Interkonversionen konnten tatsächlich nicht nur für den biosynthetischen, oxidativen Weg von Chlorophyllid *a* zu Chlorophyllid *b* gezeigt werden,^[31] sondern auch in dem unerwarteten reduktiven katabolischen Gegenstück, das Chl *b* in Chl *a* umwandelt und dabei 7¹-Hydroxy-Chl *a* als Intermediat bildet.^[32] So wurde gezeigt, dass der so genannte Chl-Zyklus^[11b,33] die relativen Mengen an Chl *a* und Chl *b* sowohl in der gesamten Entwicklung der Pflanze als auch in den anfänglichen Stufen des Chl-Abbaus in seneszentem Pflanzengewebe reguliert.^[9c,32]

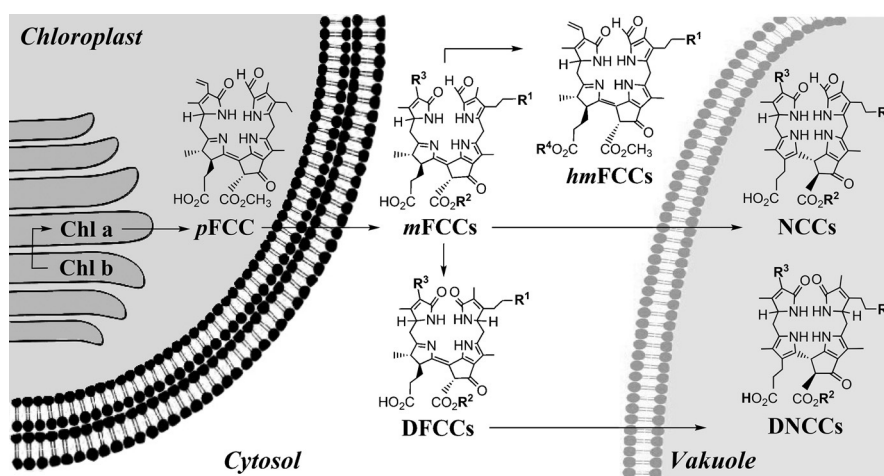


Abbildung 4. Ein vereinfachtes, topographisches Modell des Chl-Abbaus in Blattzellen, das die Organellen und repräsentative Typen von Chl-Kataboliten darstellt.

Überraschenderweise gibt es zwei unterschiedliche Wege in höheren Pflanzen für den Abbau von Chl *a* zu Pheo *a* (Abbildung 5).^[9c] Einer dieser Wege ist in reifenden Zitrusfrüchten relevant, wo die Phytolsterfunktion von Chl *a* durch Chlorophyllase hydrolysiert wird,^[34] wobei Chlorophyllid *a* (Chlide *a*) entsteht. Anschließend wird das Mg-Ion entfernt, wobei Pheo *a* als Produkt gebildet wird.^[35] Diese Abfolge wurde jedoch in verschiedenen seneszenten Blättern nicht gefunden. Stattdessen wurde dort Phäophytin *a* (Phein *a*) als Intermediat des Chl-Abbaus beobachtet, das Produkt der direkten Entfernung des Mg-Ions aus Chl.^[36] In *A. thaliana* wurde vor kurzem Phäophytinase identifiziert, eine Hydrolase vom Serintyp, die Phein *a* in Pheo *a* umwandelt, Chl *a* jedoch nicht hydrolysiert.^[37] Es wird also in seneszenten Blättern einiger Pflanzen in vivo zuerst das Mg-Ion aus Chl *a* entfernt und anschließend der Phytylester gespalten.^[9c]

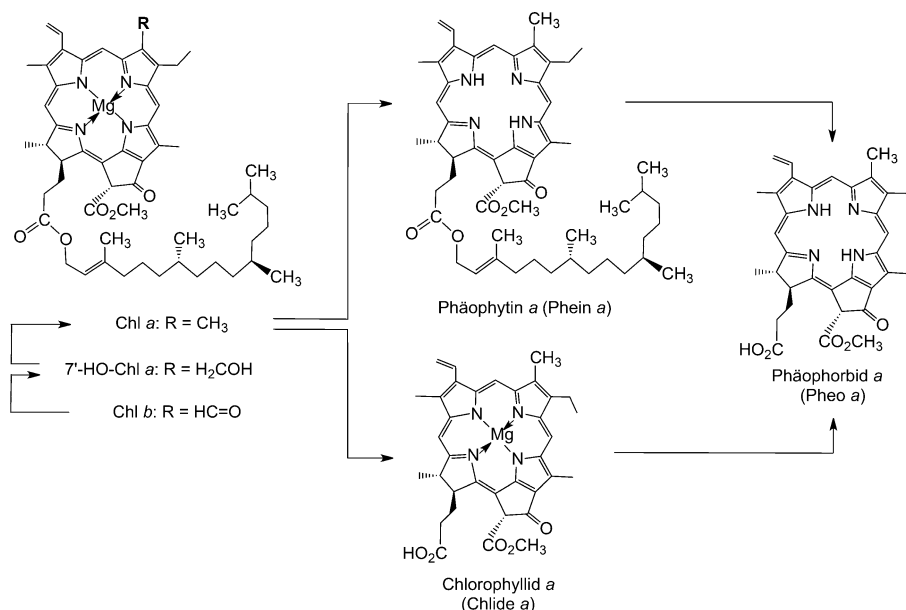


Abbildung 5. Die frühen Schritte des Chl-Abbaus in den Chloroplasten produzieren Phäophorbid *a* (Pheo *a*).

3.2. Der rote Chlorophyllkatabolit – das ursprüngliche Phyllobilin

Die faszinierenden Strukturen der NCCs (1-Formyl-19-oxobilane) als späte Abbauprodukte erforderten die Identifikation von früheren Intermediaten des Chl-Abbaus.^[38] Lipofuszin-ähnliche fluoreszierende Verbindungen, die in Extrakten seneszenten Blätter aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden konnten, wurden verdächtigt, Zwischenprodukte des Chl-Abbaus zu sein.^[39] Die blau fluoreszierende Verbindung **6** (ursprünglich als *Bn*-FCC-2 bezeichnet) wurde erstmals aus Pheo *a* durch Verwendung eines Enzym-aktiven Extraktes seneszenten Rapsblättern (*Brassica napus*) hergestellt.^[25] Ihre Molekülformel, C₃₅H₄₀N₄O₇,^[40] ließ auf eine nahe Verwandtschaft mit Pheo *a* schließen und machte die Nettoaddition von zwei O-Atomen und vier H-Atomen an Pheo *a* notwendig. Deswegen wurde der blau fluoreszierende *Bn*-FCC-2 (**6**) als Intermediat des Chl-Abbaus angesprochen,

das vorschlagsgemäß als Produkt einer oxygenolytischen Spaltung von Pheo *a* entstünde.^[25] Tatsächlich schien Pheo *a* durch einen Prozess abgebaut zu werden, der molekularen Sauerstoff erforderte.^[29] Außerdem wurde Pheo *a* als letztes noch grünes Intermediat des Chl-Abbaus in seneszenten Blättern angesehen, da es in Abwesenheit von Sauerstoff angehäuft wurde (und nicht Pheo *b*).^[29] Diese Rolle von Pheo *a* erfordert die Reduktion von Chl *b* zu Chl *a* bereits in einem früheren Schritt des Chl-Abbaus.^[31,33]

Was wäre ein rationelles Produkt des Sauerstoff-abhängigen Abbaus von Pheo *a*, und wie wäre dieses mit dem *p*FCC **6** verknüpft? Der unbekannte rote Bilin-ähnliche Katabolit **7** (Abbildungen 6 und 7) schien solch eine rationelle, hypothetische Vorstufe von **6** zu sein, obwohl gefärbte Überbleibsel von Chl in natürlichen Pflanzenquellen unauffindbar waren.^[25] Studien von Gossauer und Engel^[41] über Chl-Kataboliten in *Auxenochlorella protothecoides* (vorher als *Chlorella protothecoides* bezeichnet) offenbarten die Existenz von ähnlichen roten, vom Chl abstammenden linearen Tetrapyrrolen in Sekreten dieser Grünalge.

Es wurde nun nötig, die Rolle solch eines hypothetischen, roten Intermediates in der frühen Phase des Chl-Abbaus zu überprüfen. Deshalb wurde das rote 12,13-Dihydro-1-formyl-19-oxophyllobiladien-*b,c* **7** (jetzt allgemein als roter Chl-Katabolit (RCC) bekannt) aus Pheo *a* durch partielle chemische Synthese hergestellt.^[42] In Analogie zu den Experimenten, die in Gossauers Labor mit Cd^{II}-Komplexen von Pyrophäophorbid *a* (13²-Desmethoxycarbonyl-Pheo *a*) durchgeführt wurden,^[43] wurde der Cd^{II}-Komplex von Pheo *a*-Methylester (**II**) photochemisch oxidiert, wobei das Cd^{II}-[4,5]-Dioxo-[4,5]-seco-4,5-dihydromethylpheophorbidat **III** in

einer Ausbeute von etwa 30 % erhalten wurde (Abbildung 6). Dieses bräunliche und recht instabile Oxidationsprodukt wurde zügig mit NaBH₄ zum roten RCC-Methylester (**7-Me**)

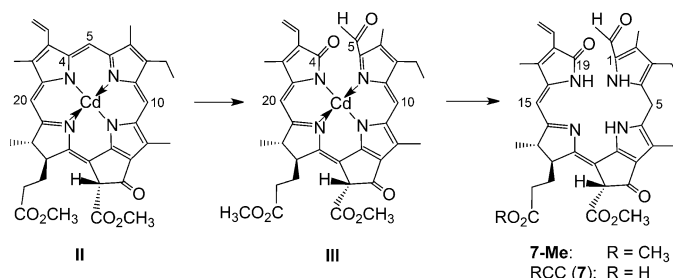


Abbildung 6. Photooxidation des Cd^{II}-Phäophorbidats **II** und Reduktion des 4,5-Dioxosecophytoporphyryns **III** führen über den Methylester **7-Me** zum RCC (**7**).^[42]

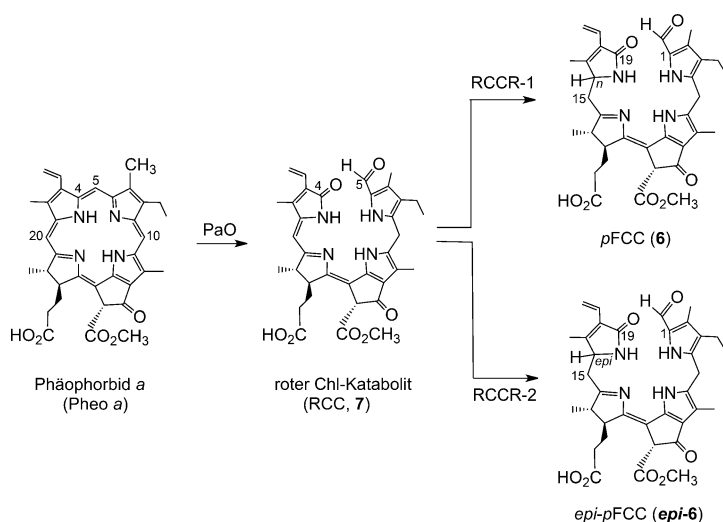


Abbildung 7. Der Chl-Abbau von Pheo *a* über RCC (7) zu den „primären“ FCCs (6/*epi-6*) wird durch Pheo *a*-Oxygenase (PaO) und zwei Klassen von RCCR-Reduktasen (RCCR-1 oder RCCR-2) katalysiert.^[9c]

reduziert.^[42] Die enzymatische Hydrolyse von **7-Me** mit Schweineleberesterase führte nahezu quantitativ zu einer ersten Probe von authentischem RCC (7).^[42]

Nun, da die präparativ hergestellte Verbindung **7** als Referenz verfügbar war, konnten Spuren derselben (früher in Pflanzen unauffindbaren) roten Verbindung nachgewiesen werden, wenn Pheo *a* mit Chloroplastenextrakten von seneszenten Raps-Keimblättern inkubiert wurde.^[44] RCC (7) wurde schließlich als Produkt einer Rieske-Typ-Monooxygenase identifiziert. Diese wird nun als Pheo *a*-Oxygenase (PaO) bezeichnet,^[45] da sie Pheo *a* selektiv als Substrat verwendet und durch Pheo *b* inhibiert wird.^[46] Somit markiert der RCC (7) die charakteristische, PaO-katalysierte, oxygenolytische Ringöffnung, die den Schlüsselschritt des PaO/Phyllobilin-Weges im Chl-Abbau darstellt (Abbildung 7).^[9c,29] In diesem Enzym-katalysierten Prozess wird der Chlorin-artige Makroring von Pheo *a* zwischen C4 und C5 geöffnet, wobei ein Sauerstoffatom spezifisch in die neue, typische Formylgruppe des (Enzym-gebundenen) RCC (7) eingebaut wird.^[46] Somit ist der rote Chl-Katabolit **7** das ursprüngliche 1-Formyl-19-oxobilin-artige native Phyllobilin.

3.3. Primäre fluoreszierende Chl-Kataboliten – ein Epimerenpaar als natürliche Phyllobilin-Vorfahren

Der synthetisierte RCC (7) konnte in Extrakten von seneszenten *B. napus*-Blättern tatsächlich zum vermuteten Chl-Katabolit **6** reduziert werden, der vorläufig *Bn*-FCC-2 genannt wurde.^[44] Mithilfe von NMR-spektroskopischen Studien^[17] war *Bn*-FCC-2 (**6**) als ein 12,13,16,19-Tetrahydro-1-formyl-19-oxophyllobilin-*b* identifiziert worden (Abbildung 7). Da **6** dasselbe Muster der peripheren funktionellen Gruppen wie Pheo *a* aufwies und somit nicht weiter durch Einführung polarer Gruppen modifiziert war, die von den NCC-Strukturen her bekannt waren, wurde **6** als primärer FCC (*p*FCC) bezeichnet.^[25] Außer der charakteristischen

Absorption der α -Formylpyrroleinheit am Ring A bei $\lambda = 315$ nm (Abbildung 8)^[8a] zeigte das UV/Vis-Spektrum von **6** auch ein neues Maximum bei $\lambda = 360$ nm, das durch den neuen, vergrößerten Chromophor der Ringe B und C hervorgerufen wird.^[6b,25] Im Unterschied zum nichtlumineszierenden NCC zeigen Lösungen des FCC **6** eine starke und charakteristische blaue Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum im Bereich von $\lambda = 450$ nm. Diese Eigenschaft war der Grund für die ursprüngliche phänomenologische Klassifizierung der FCCs als fluoreszierende Chl-Kataboliten.^[6b,25]

Pheo *a* wurde bei Verwendung einer belüfteten Suspension von Paprika-Chloroplasten (*Capsicum annum*) in eine zweite blau fluoreszierende Verbindung umgewandelt, den *Ca*-FCC-2, der sich als ein Isomer von *p*FCC (**6**) erwies.^[47] Eine sorgfältige NMR-spektroskopische Analyse von *Ca*-FCC-2 lokalisierte den Unterschied in der Konfiguration an C16 (das in der früheren, Phytoporphyrin-basierten Namensgebung C1 hieß^[47]). Somit wurde *Ca*-FCC-2 als *epi-p*FCC (*epi-6*; Abbildung 7) identifiziert.^[47]

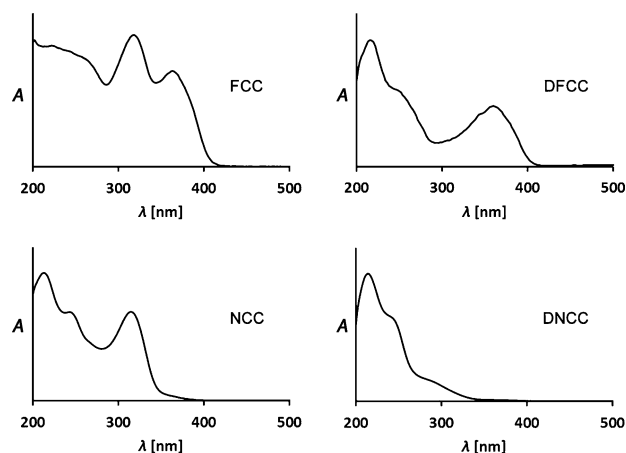


Abbildung 8. Repräsentative UV-Spektren von farblosen Typ-I-Phyllobilinen (FCC und NCC) und von Typ-II-Phyllobilinen (DFCC und DNCC).^[26a]

Es konnte gezeigt werden, dass die natürliche Reduktion vom RCC (7) zum *p*FCC (**6**) durch eine Kofaktor-freie RCC-Reduktase (RCCR) katalysiert wird.^[48] Die Identifikation von **6** und von seinem C16-Epimer *epi-6* ließ auf die Aktivität von zwei stereospezifischen RCCR-Typen in höheren Pflanzen schließen. Diese Schlussfolgerung konnte durch Studien der Aktivität dieser beiden RCCR-Typen, heute als RCCR Typ-1 und Typ-2 bezeichnet, in einer Vielzahl von Pflanzen verifiziert werden.^[49] Die RCCR aus *B. napus* entspricht dem Typ-1, da sie den RCC (7) stereo- und regioselektiv zum *p*FCC (**6**) reduziert.^[25,48] Die gleiche (Regio- und) Stereoselektivität wurde auch für RCCRs aus anderen Pflanzen beobachtet, z.B. aus *A. thaliana*.^[49b] Im Unterschied dazu konnte in einer zweiten Gruppe von Pflanzen, zu denen Spinat (*Sp. oleracea*)^[50] und Bananen (*M. acuminata*)^[51] gehören, C16-epimere NCCs gefunden werden, die von *epi-*

*p*FCC (*epi*-6) abstammen, der seinerseits durch Reduktion des RCC (7) durch eine Typ-2-RCCR entsteht.^[49a] Die RCC-Reduktase (RCCR) ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das zur Familie der (Ferredoxin-abhängigen) Bilinreduktasen gehört.^[52] Die Kristallstruktur des RCCR aus *A. thaliana* konnte in Substrat-freier und in RCC-gebundener Form erhalten werden (siehe Lit. [53,54] für Strukturdetails der RCCR).

3.4. Partielle Synthese von *p*FCC und *epi*-*p*FCC – ein chemisches Intermezzo

Die Potential-kontrollierte elektrochemische Reduktion des RCC-Methylesters (7-Me) in einer protischen Lösung führte mit einer Ausbeute von 25 % und vernachlässigbarer Stereoselektivität zu den beiden FCC-Methylestern 6-Me und *epi*-6-Me.^[55] Diese (chemische) Reaktion repräsentierte eine erste Modellreaktion für die RCC-Reduktion durch Kofaktor-freie RCCRs, die auf die leichte Reduzierbarkeit von 7-Me in Ein-Elektronen-Transferreaktionen hinwies. Ähnlich konnten auch *p*FCC (6) und *epi*-*p*FCC (*epi*-6) durch eine elektrochemische Reduktion des synthetisierten RCC (7) erhalten werden, wobei wiederum eine nützliche Regioselektivität für die Wasserstoffaddition an die C15- und C16-Positionen beobachtet wurde, aber keine wesentliche Stereoselektivität (Abbildung 9).^[20b] Durch dieses Experiment waren somit beide C16-Epimere der natürlichen primären FCCs erhältlich.

Die einfache elektrochemische Reduktion von 7 zu 6 und *epi*-6 in schwach sauren Lösungen war im Einklang mit einer Ferredoxin-abhängigen, RCCR-katalysierten Reduktion.^[52,56] Tatsächlich wurde für die enzymatische Reduktion von RCC durch RCCR eine verwandte mechanistische Sequenz von Protonierungs- und Ein-Elektronen-Transferreduktions-Schritten angenommen.^[54]

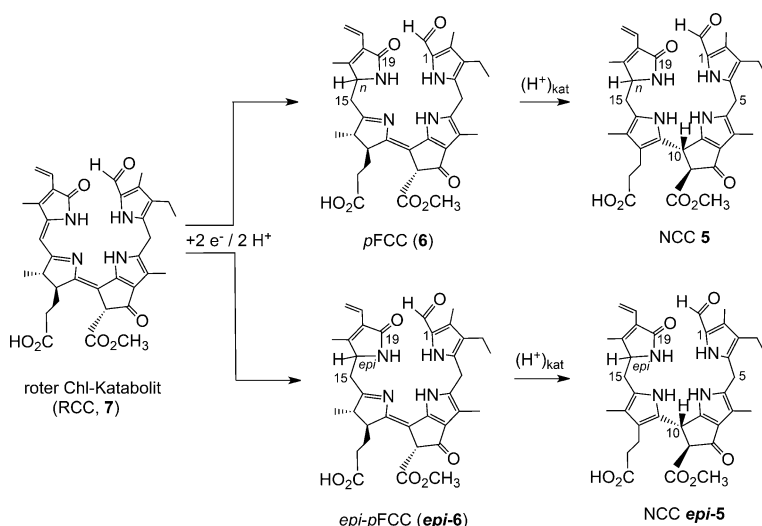


Abbildung 9. Biomimetische chemische Partialsynthese der NCCs 5 und *epi*-5 über elektrochemische Reduktion des RCC (7) zu *p*FCC und *epi*-*p*FCC (6 und *epi*-6) und deren anschließende stereoselektive, säurekatalysierte Isomerisierung zu 5 und *epi*-5.^[20b]

4. Verzweigung des PaO/Phyllobilin-Weges in seinen späteren Stadien

Gelbe senescente Blätter der Gerste (*H. vulgare*) waren die erste Quelle nicht nur für den farblosen NCC 1, sondern auch für einen zweiten wichtigen Typ von nichtfluoreszierenden und farblosen Chl-Kataboliten, die urobilinogenoiden Chl-Kataboliten (UCCs).^[57] Die epimeren UCCs 8a und 8b,^[57] die so in Extrakten von Gerstenblättern gefunden wurden, schienen beide direkte Folgeprodukte von *Hv*-NCC-1 (1) zu sein.^[57] In den UV/Vis-Spektren dieser neuen Phyllobilane konnte die typische Absorptionsbande der NCCs im Bereich von $\lambda = 315$ nm nicht beobachtet werden, was in Einklang mit dem Fehlen der Formylgruppe ist. Die Tetrapyrrole 8a und 8b werden nun struktur-basiert als 1,19-Dioxobilin-artige NCCs (DNCCs; Abbildung 10) bezeichnet.^[10] Vor kurzem konnte das farblose Chl-Abbauprodukt *ent*-8a im Spitzahorn (*Acer platanoides*) als zu 8a/8b isomerer DNCC identifiziert werden, wobei es sich durch sein CD-Spektrum als Enantiomer des DNCC 8a aus der Gerste auswies.^[58] Aufgrund dieses beeindruckenden stereochemischen Befundes wurde angenommen, dass DNCCs vielleicht doch nicht von NCCs, sondern wahrscheinlich von einem früheren Intermediat des Chl-Abbaus abstammen, was auf einen abweichenden Chl-Abbauweg hinwies (siehe Abschnitt 4.2).^[58]

In einer Vielzahl von seneszenten Blättern und reifenden Früchten, etwa in Spinatblättern,^[50] Äpfeln und Birnen,^[59] konnten ausschließlich Chl-Kataboliten vom 1-Formyl-19-oxobilin-Typ gefunden werden. Im Unterschied dazu wurde in seneszenten Spitzahornblättern nur der bemerkenswerte 1,19-Dioxobilin-artige Chl-Katabolit *ent*-8a detektiert.^[58] In seneszenten Blättern von *Arabidopsis thaliana*^[27,60] oder in Brokkoliröschchen (*B. oleracea*)^[61] konnten hingegen beide Linien der farblosen Phyllobilane identifiziert werden.

Wir wissen heute, dass 1,19-Dioxobilin-artige Chl-Kataboliten (DCCs), die nun als Typ-II-Phyllobiline bezeichnet werden, von der ursprünglichen Linie der 1-Formyl-19-oxophyllobiline (auch Typ-I-Phyllobiline) abzweigen. Die Verzweigung findet dabei auf dem Niveau von FCCs statt, wo die oxidative Deformylierung mit dem herkömmlichen Weg zu anderen späteren Typ-I-Phyllobilinen (wie *hm*FCCs, NCCs) konkurriert und hauptsächlich zu 1,19-Dioxobilin-artigen NCCs (DNCCs) führt.^[10,26a] Zwei Verzweigungspunkte konnten bis jetzt in *A. thaliana* identifiziert werden (Abbildung 11).^[26c]

4.1. Die ursprünglichen Typ-I-Phyllobiline – farblose 1-Formyl-19-oxobiline

Im Laufe der Jahre wurden ungefähr 20 strukturell verschiedene (nichtfluoreszierende) 1-Formyl-19-oxophyllobilane (NCCs oder Typ-I-Phyllobilane) charakterisiert, wodurch ihre Relevanz als Endprodukte des Chl-Abbaus in seneszenten Blättern verschiedener Pflanzen eta-

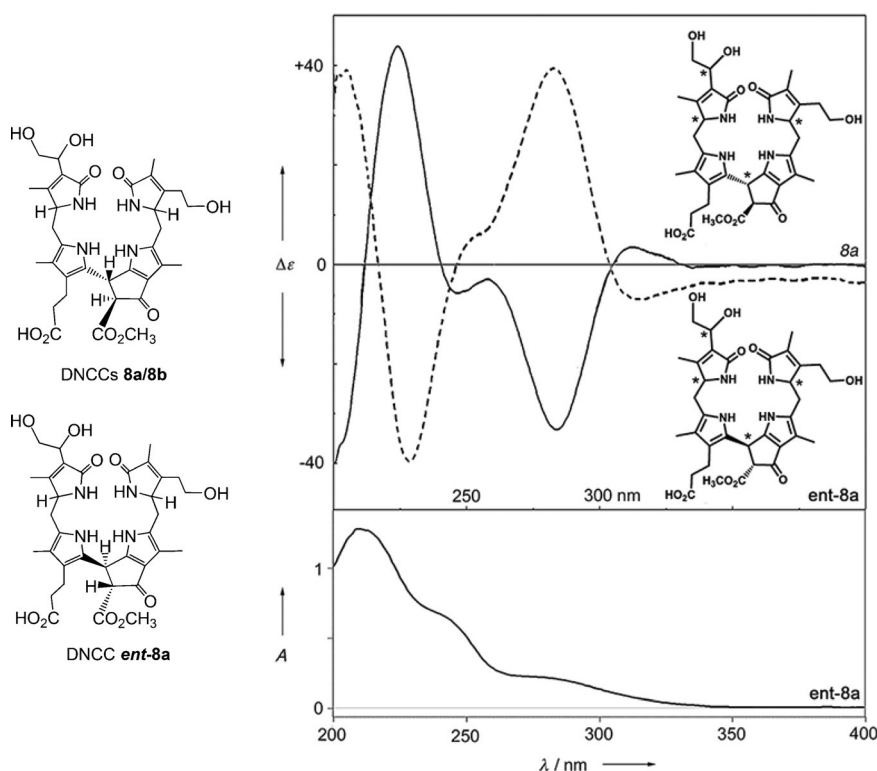


Abbildung 10. Strukturformeln der DNCCs **8a/8b** (aus der Gerste)^[57] und von **ent-8a** (aus Spitzahornblättern),^[58] dessen CD- und UV/Vis-Spektren (rechts) ihm die Eigenschaften eines rätselhaften Enantiomers von **8a** zuweisen.

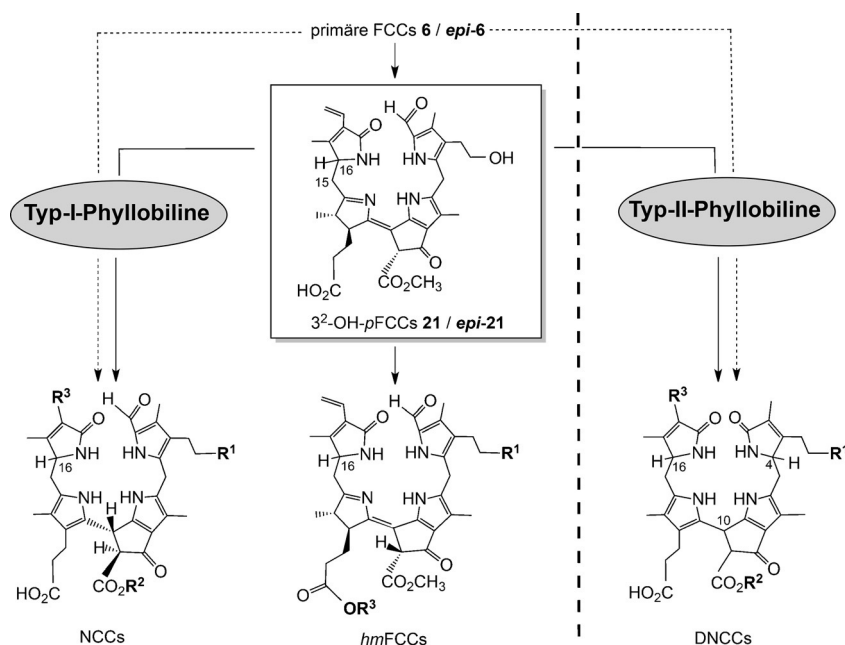


Abbildung 11. Eine grundlegende Verzweigung im Chl-Abbau setzt auf dem Niveau der FCCs ein und eröffnet den Zugang zu Typ-I und Typ-2 Phyllobilinen (siehe Tabellen 1–3 für Beispiele von R^1 , R^2 und R^3).^[10]

bliert wurde. Dazu zählten u.a. die NCCs **1–4** (siehe Abschnitt 1), **epi-9** und **epi-10** aus dem Tabak (*Nicotiana rustica*),^[62] **epi-5** und **epi-11** aus *C. japonicum*,^[20a,63] **epi-1**, **epi-5**, **epi-11**, **epi-12** und **epi-13** aus Spinat (*Spinacia oleracea*),^[50,64] **epi-9** und **epi-14** aus Mais (*Zea mays*)^[65] sowie **3**, **4**, **15–17** aus *A. thaliana*^[60,66] (Tabelle 1 und Abbildung 12).^[10] In Extrakten seneszenten Blätter konnten NCCs mittels ihres charakteristischen UV-Spektrums mit Absorptionsmaximum bei $\lambda \approx 315$ nm klassifiziert werden (Abbildung 8).^[8] ESI-Massenspektren halfen, die Molekülformeln zu bestimmen. Charakteristische Fragmente gaben Aufschluss über mögliche funktionelle Gruppen.^[16c] ^1H -NMR-Spektren der NCCs zeigten das charakteristische Singulett einer $\text{CH}=\text{O}$ -Gruppe im Tieffeld.^[8a] Konstitution und Teile der relativen Konfiguration von Phyllobilinen konnten durch Analyse von zweidimensionalen ^1H , ^1H -homonuklearen und ^1H , ^{13}C -heteronuklearen Spektren bestimmt werden.^[8a,10,17a]

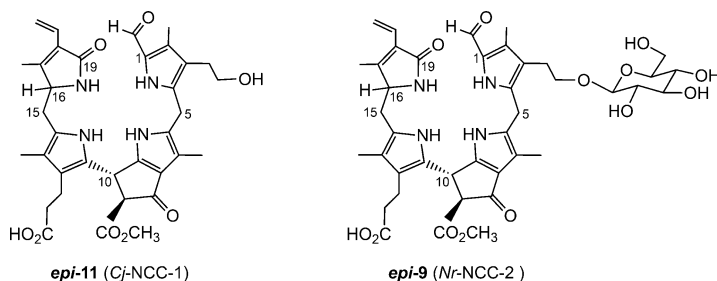
Alle NCCs (oder 16,19-Dihydro-1-formyl-19-oxophyllobilane^[10]) sind flexible, lineare Tetrapyrrole mit dekonjugierten Pyrroleinheiten. Als Abkömmlinge des pFCC (**6**) und des epi-pFCC (**epi-6**), die sich nur in der absoluten Konfiguration an C16 (pflanzen-spezifisch) unterscheiden, treten auch die NCCs in zwei epimeren Klassen auf (vgl. dazu Lit. [64] und Tabelle 1). Mit einer bemerkenswerten Ausnahme weisen alle NCCs eine Methylgruppe an C2 auf.^[10] Diese Ausnahme ist At-NCC-3 (**15**, aus seneszenten *A. thaliana*-Blättern isoliert), der eine Hydroxymethylgruppe an der C2-Position trägt.^[66] Außerdem weisen alle NCCs und auch die anderen bekannten, natürlichen Phyllobilinen aus höheren Pflanzen eine Methoxycarbonyl- oder Carboxygruppe an der C8²-Position auf (Tabelle 1). Die Struktur ihres Ringes E schließt somit Pyrophäophorbid *a* (13²-Desmethoxycarbonyl-Pheoa) als realistische biologische Vorstufe aus.

Der amphiphile NCC 3²-Hydroxy-16,19-dihydro-1-formyl-19-oxo-epi-phyllobilan (**epi-11**) konnte in verschiedenen Pflanzen beobachtet werden,^[6a] etwa als *Cj*-NCC-1 in Blättern von *C. japonicum*.^[20a,63] Dieser NCC trägt eine Hydroxygruppe an der ter-

Tabelle 1: Strukturen der natürlichen 1-Formyl-19-oxophyllobilane, die nichtfluoreszierenden Chl-Kataboliten (NCCs).

Nr. ^[a]	R ^{1[b]}	R ^{2[b]}	R ^{3[b]}	C16 ^[c]	urspr. Name (identisch mit) ^[d]	Lit.
17	H	H	CH=CH ₂	n	Bo-NCC-2 (<i>At</i> -NCC-5/ <i>Bn</i> -NCC-4 ^[e])	[60, 61]
15	H	H	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -NCC-3 ^[f]	[66]
<i>epi</i> -5	H	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Cj</i> -NCC-2 (<i>So</i> -NCC-5)	[20a,b50]
4	OH	H	CH=CH ₂	n	<i>Bn</i> -NCC-3 (<i>At</i> -NCC-2 ^[e])	[23, 60]
<i>epi</i> -13	OH	H	CH=CH ₂	epi	<i>So</i> -NCC-3 (<i>Mc</i> -NCC-49/ <i>Ej</i> -NCC-3 ^[e])	[50, 51, 83]
<i>epi</i> -12	OH	H	CH(OH)-CH ₂ OH	epi	<i>So</i> -NCC-1 (<i>Mc</i> -NCC-26)	[50, 51]
11	OH	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>Sw</i> -NCC-58	[91]
<i>epi</i> -11	OH	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Cj</i> -NCC-1 (<i>So</i> -NCC-4/ <i>Pc</i> -NCC-2/ <i>Md</i> -NCC-2/ <i>Mc</i> -NCC-61/ <i>Ej</i> -NCC-4 ^[e])	[50, 51, 59, 63] [83]
1	OH	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	n	<i>Hv</i> -NCC-1	[8]
<i>epi</i> -1	OH	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	epi	<i>So</i> -NCC-2 (<i>Mc</i> -NCC-42/ <i>Ej</i> -NCC-1 ^[e])	[50, 51, 64, 83]
3	O-Glc	H	CH=CH ₂	n	<i>Bn</i> -NCC-2 (<i>At</i> -NCC-1 ^[e] / <i>Bo</i> -NCC-1)	[23, 60, 61]
16	O-Glc	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -NCC-4 ^[e]	[60]
<i>epi</i> -9	O-Glc	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Nr</i> -NCC-2 (<i>Zm</i> -NCC-2/ <i>Pc</i> -NCC-1/ <i>Md</i> -NCC-1/ <i>Tc</i> -NCC-2/ <i>Mc</i> -NCC-59)	[51, 59, 62, 65, 92]
<i>epi</i> -14	O-Glc	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	epi	<i>Zm</i> -NCC-1 (<i>Tc</i> -NCC-1/ <i>Co</i> -NCC-1 ^[e])	[65, 82, 92]
<i>epi</i> -18	O-Glc	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ O-Glc	epi	<i>Pd</i> -NCC-32	[68]
<i>epi</i> -10	O-MalGlc	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Nr</i> -NCC-1	[62]
2	O-Mal	H	CH=CH ₂	n	<i>Bn</i> -NCC-1	[18a, 23]
<i>epi</i> -29	O-Mal	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Ej</i> -NCC-2 ^[e]	[83]
<i>epi</i> -20	OH	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Mc</i> -NCC-58 ^[g,h]	[51]
<i>epi</i> -21	OH	CH ₃	CH=CH ₂	epi	<i>Mc</i> -NCC-55 ^[h,i]	[51]

[a] Substanznummer (siehe Text). [b] R¹ bis R³ beziehen sich auf die in Abbildung 13 dargestellte, allgemeine NCC-Formel. Mal = Malonyl; Glc = β -Glucopyranosyl, MalGlc = O6'-(Mal)Glc. [c] Die absolute Konfiguration am C16-Atom von NCCs ist noch unbekannt; C16 der NCCs als „n“ oder als „epi“ spezifiziert, je nachdem, ob sie von *p*FCC (**6**) oder *epi-p*FCC (**epi-6**) abstammen. [d] *Bo*-NCCs: *B. oleracea* var. *italica* (Brokkoli),^[61] *At*-NCCs: *A. thaliana*,^[60, 66] *Bn*-NCCs: *B. napus* (Raps),^[18a, 23] *Cj*-NCCs: *C. japonicum* (japanischer Kuchenbaum),^[20a, 63] *So*-NCCs: *Sp. oleracea* (Spinat),^[50, 64] *Mc*-NCCs: *M. acuminata* (Banane, Cavendish Cultivar),^[51] *Sw*-NCC-58: *Sp. wallisii* (Friedenslilie),^[91] *Pc*-NCCs: *P. communis* (Birne),^[59] *Md*-NCCs: *M. domestica* (Apfel),^[59] *Hv*-NCC-1: *H. vulgare* (Gerste),^[8] *Nr*-NCCs: *N. rustica* (Tabak),^[62] *Zm*-NCCs: *Z. mays* (Mais),^[65] *Tc*-NCCs: *T. cordata* (Linde),^[92] *Ej*-NCCs: *E. japonica* (japanische Wollmispel),^[83] *Co*-NCCs: *C. oblonga* (Quitte),^[82] *Pd*-NCCs: *P. domestica* (Zwetschgenbaum).^[68] [e] Vorläufige Klassifizierung auf Grundlage von UV/Vis- und Massenspektren. [f] *At*-NCC-3 (**15**) trägt eine HOCH₂-Gruppe an C2.^[66] [g] R-Konfiguration an C10 abgeleitet aus dem CD-Spektrum.^[51] [h] S-Konfiguration an C10 abgeleitet aus dem CD-Spektrum.^[51] [i] Propionylseitenkette mit einer Daucyleinheit verestert.^[28a, 85]

**Abbildung 12.** Konstitutionsformeln von zwei typischen natürlichen NCCs. Die Kataboliten **epi-11** und **epi-9** (ursprünglich als *Cj*-NCC-1 und *Nr*-NCC-2 identifiziert), die auch in Äpfel- und Birnenschalen vorhanden sind (siehe Tabelle 1).

minalen C3²-Position der Ethylseitenkette am Ring A, welche die Polarität erhöht. Das Phyllobilan **epi-11** wurde z. B. auch in reifenden Äpfeln und Birnen sowie in deren seneszenten Blättern gefunden und dort als *Pc*-NCC-2 und als *Md*-NCC-2 bezeichnet.^[59] Sein Epimer, das 3²-Hydroxy-16,19-dihydro-1-formyl-19-oxophyllobilan **11**, wurde (als *So*-NCC-4) in seneszenten Blättern von Spinat und (als *Sw*-NCC-58) in der Friedenslilie (*Spathiphyllum wallisii*) gefunden. Die 3²-OH-Funktion kann auch als Anker für weitere hydrophile Gruppen fungieren, wie in 3²-(β -Glucopyranosyl)oxy-1-formyl-19-oxo-*epi*-phyllobilan (**epi-9**), das in seneszenten Blättern des Tabaks entdeckt und als *Nr*-NCC-2 bezeichnet wurde.^[62] 1-

Formyl-19-oxophyllobilane (auch als NCCs bezeichnet; siehe Tabelle 1) weisen zusätzliche konstitutionelle Unterschiede an den Seitenketten der C3-, C8- und C18-Position auf, die alle durch verschiedene periphere Modifikationen während des Katabolismus durch Malonylierung,^[18a] Methylesterhydrolyse^[23, 67] und/oder Dihydroxylierung an der C18-Vinylgruppe^[8a] zustande kommen. Einzigartige NCC-Strukturen konnten kürzlich sowohl in Blättern des Zwetschgenbaumes (*Prunus domestica*) identifiziert werden, wo der an den O3³- und O18³-Positionen zweifach glucopyranosylierte *Pd*-NCC-32 (**epi-18**) vorkommt,^[68] wie auch in Blättern der Ulme (*Ulmus glabra*), wo eine überbrückende Glucopyranosylgruppe ein beispielloses, makrozyklisches [17.3.1]-Bicycloglykosyl-Motiv im *Ug*-NCC-3 (**epi-19**)^[69] bildet (Abbildung 13). Zusätzlich konnten in der reifen Bananenschale Spuren von neuartigen, natürlichen NCC-Estern (*Mc*-NCC-58, **epi-20**, und sein C10-Epimer *Mc*-NCC-55, **epi-21**) durch Vergleich der HPLC-Spuren mit authentischen Proben nachgewiesen werden, die durch säurekatalysierte Isomerisierung von *Mc*-FCC-56 hergestellt wurden (siehe Abschnitt 6.2).^[51] Die Strukturen der NCCs lassen auf ein breites Spektrum an relevanten Enzym-katalysierten Reaktionen wie Hydroxylierung, Glykosylierung, Malonylierung,^[70] Dihydroxylierung, Methylesterhydrolyse^[67] und Propionatveresterung im Chl-Abbau schließen. Die Hydroxy-

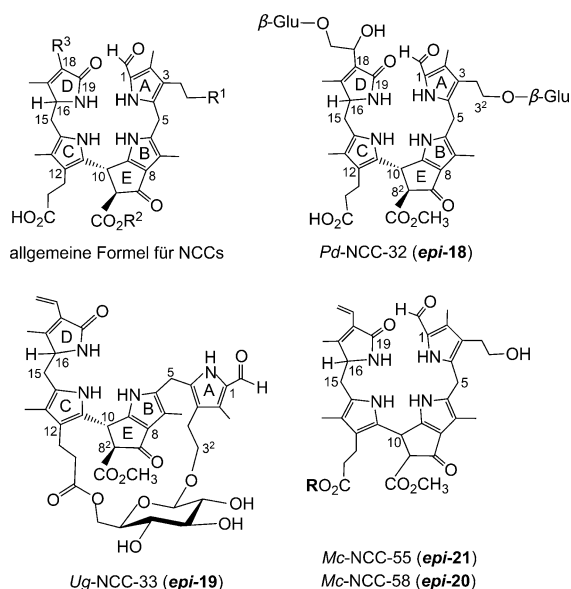


Abbildung 13. Allgemeine NCC-Formel mit Atom-Nummerierung (oben links) und Formeln von natürlichen NCCs, die eine einzigartige Struktur aufweisen, wie der zweifach glykosylierte *Pd*-NCC-32 (**epi-18**), der bicyclo-glycosidische *Ug*-NCC-3 (**epi-19**) und die epimeren NCC-Ester **epi-20/epi-21** aus der Bananenschale (*Mc*-NCC-58 mit *R*-Konfiguration an C10 und sein *S*-Epimer *Mc*-NCC-55).

lierung an der Position C3^{2[51]} sowie die Hydrolyse der Methylsterfunktion an O8^{4[60,67]} konnten bereits an den entsprechenden FCC-Vorstufen festgestellt werden. Analog wird angenommen, dass auch die an einigen NCCs beobachtete Glykosylierung, Malonylierung, Propionatveresterung und Dihydroxylierung der Seitenkette an C18 von Enzym-katalysierten Reaktionen an den entsprechenden FCCs herrühren. Tatsächlich scheint es, als würden die modifizierten FCCs (*m*FCCs) bereits mit den polaren Gruppen ausgestattet, bevor sie in die Vakuolen transportiert werden und dort direkt zu NCCs isomerisieren.^[9c,20]

Fluoreszierende Chl-Kataboliten (FCCs oder 12,13,16,19-Tetrahydro-1-formyl-19-oxophyllobilene-*b*) und entsprechende (nichtfluoreszierende) NCCs (16,19-Dihydro-1-formyl-19-oxophyllobilane) sind Isomere. Diese strukturelle Verwandtschaft ließ vermuten, dass sich FCCs – durch Aromatisierung des Ringes C in ein Pyrrol angetrieben – in NCCs umwandeln könnten,^[20a] wie es ähnlich von Hydroporphyrinen bekannt ist.^[71] Die hypothetische, nichtenzymatische Isomerisierung der FCCs zu NCCs wurde sowohl mit dem primären FCC (**6**) als auch mit seinem C16-Epimer, **epi-6**, getestet.^[20a,b] Zuerst wurde die säureinduzierte Isomerisierung des *epi*-pFCC (**epi-6**) studiert, der sich hoch stereoselektiv in den natürlichen *Cj*-NCC-2 (**epi-5**) umwandelte.^[20a] Die Isomerisierung von **epi-6** zu **epi-5** (Abbildung 9) ging zügig bei pH 4.9 vonstatten, wobei **epi-6** eine Halbwertszeit von weniger als 30 min aufwies.^[20a] Ähnlich isomerisierten pFCC **6** und **epi-6** bei pH 4 stereoselektiv zu ihren entsprechenden NCCs **5** und **epi-5** (vgl. Abbildung 9) mit Kinetik erster Ordnung und Geschwindigkeiten von 0.020 bzw. 0.039 min⁻¹.^[6b,20b]

Im Einklang mit ihrer raschen Isomerisierung zu NCCs kommen typische FCCs in seneszenten Blättern nur kurz-

zeitig vor. Die freie Propionsäurefunktion an der C12-Position des Ringes C aktiviert und steuert die (säurekatalysierte) FCC-zu-NCC-Isomerisierung auf eine beachtlich stereoselektive Art (Details zur mechanistischen Diskussion siehe Lit. [20a]). Das pH-Profil der Reaktionsgeschwindigkeit stimmte hierbei mit der Beteiligung eines Protonendonors mit einem pK_a-Wert bei etwa 5 überein, was die mechanistische Ansicht bestärkt, dass die Isomerisierung über eine intramolekulare Protonierung durch die Propionsäurefunktion am C10 zustandekommt. Die zweite freie Carbonsäurefunktion an der C8²-Position des natürlich vorkommenden *At*-FCC-2 (**22**) beschleunigte die FCC-zu-NCC-Isomerisierung bei pH 5 weiter um den Faktor 7 (eine wahrscheinliche Konsequenz eines lokalen Ladungseffektes).^[67] Somit wurde eine nichtenzymatische FCC-zu-NCC-Isomerisierung auch für die natürliche Bildung der NCCs im sauren Milieu der Vakuolen vorgeschlagen, wo die freie Propionsäurefunktion partiell protoniert vorliegen würde. Der intramolekulare Protonierungsschritt würde die dabei gebildeten NCCs präferenziell mit einer *R*-Konfiguration an C10 erzeugen. Im Einklang mit dem vorgeschlagenen Mechanismus der Isomerisierung von natürlichen FCCs zu den entsprechenden NCCs weisen die natürlichen NCCs – mit ganz wenigen Ausnahmen – alle ein grundsätzlich ähnliches CD-Spektrum auf, was auf die gleiche absolute Konfiguration an der *meso*-Position (C10) zwischen den Ringen B und C schließen lässt.^[20a,b] Die vorgeschlagene *R*-Konfiguration für den NCC **epi-11** wurde jüngst durch eine detaillierte Strukturanalyse, inklusive Röntgenstrukturanalyse, eines gelben Chl-Kataboliten (YCC) bestätigt, der aus dem NCC **epi-11** erhalten wurde (siehe Abschnitt 7).^[72]

Die entscheidende Rolle der Propionsäureseitenkette bei der FCC-zu-NCC-Isomerisierung wurde durch Isomerisierungsstudien mit den analogen, partialsynthetisch erhaltenen FCC-Methylestern **6-Me** und **epi-6-Me** weiter bestärkt.^[20b] Beide epimeren FCC-Methylester isomerisierten schließlich mit einer niedrigen Stereoselektivität an C10, einer niedrigen Geschwindigkeit und geringen Umwandlungsrate und lieferten dadurch die entsprechenden stereoisomeren NCC-Methylester **5-Me/ent-epi-5-Me** (aus **6-Me**) und **epi-5-Me/ent-5-Me** (aus **epi-6-Me**; Abbildung 14).^[20b] Auch die Spiegelbilder der (Methylester der) natürlichen NCCs konnten also leicht generiert werden. Offensichtlich wird die Aktivierung der Isomerisierung durch Veresterung der freien Propionsäurefunktion blockiert. Dieser bemerkenswerte Befund half später, die unerwartete Ansammlung von persistenten FCCs in reifen Bananen zu erklären (siehe Abschnitt 6), die ja eine Propionsäureesterfunktion tragen und damit biologisch „verkappte“ FCCs sind.^[28a]

Bisher wurde die Konfiguration an C10 für natürlich vorkommende NCCs als *R* abgeleitet. Vor kurzem konnten jedoch zwei NCCs aus Blättern der Birke isoliert werden, die ein spiegelverkehrtes CD-Spektrum gegenüber dem von **1** aufwiesen, was auf eine umgekehrte Konfiguration an C10 schließen ließ.^[73] Dieser Befund regt an, auch die Relevanz von alternativen Wegen in Betracht zu ziehen, die die Bildung von NCCs mit einer umgekehrten C10-Konfiguration hervorrufen. Möglicherweise wird in den Blättern der Birke die FCC-zu-NCC-Isomerisierung durch einen Enzym-kontrol-

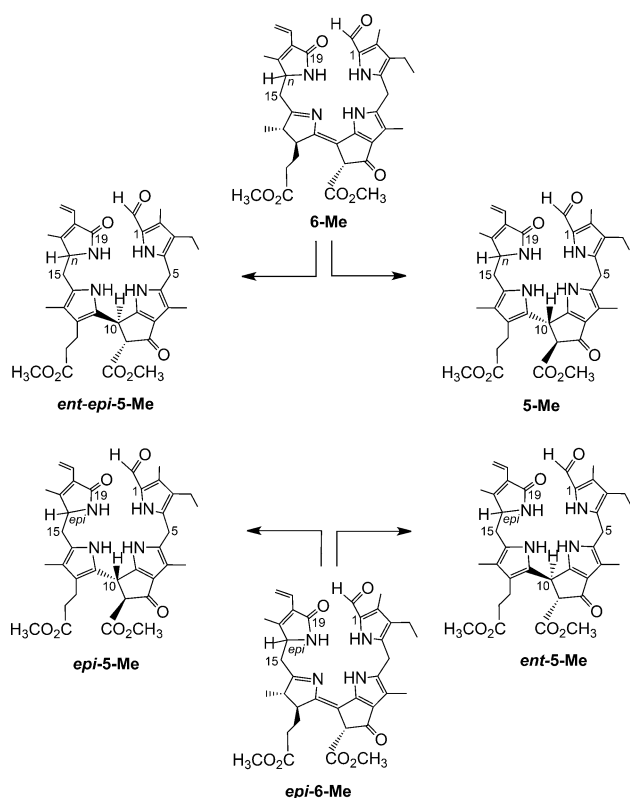


Abbildung 14. Die säureinduzierte Isomerisierung des Methylesters der primären FCCs (**6-Me/epi-6-Me**) zu analogen NCCs ist langsam und verläuft nicht stereoselektiv; dabei werden die NCC-Methylester **5-Me/epi-5-Me** sowohl der *n*- als auch der *epi*-Reihe wie auch ihre beiden Enantiomere (**ent-5-Me/ent-epi-5-Me**) gebildet.^[20b]

lierten, stereochemisch abweichenden Prozess katalysiert. Die Beobachtung der abweichenden Konfiguration in Birken-NCCs betont die Wichtigkeit von CD-Spektren für die Charakterisierung neuer NCCs.

Verschiedene fluoreszierende Chl-Kataboliten (FCCs) oder Typ-I-Phyllobilomobile konnten in Extrakten von seneszenten Blättern durch ihre Fluoreszenz mühelos beobachtet werden. Wie oben beschrieben, werden primäre fluoreszierende Chl-Kataboliten in höheren Pflanzen direkt durch die Enzym-katalysierte Reduktion des Protein-gebundenen RCC (**7**) gebildet. Die absolute Konfiguration der C16-Position des primären FCC **6**^[10,25] und seines Epimers, **epi-6**,^[21a,47] konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Deshalb werden FCCs entweder zur normalen (*n*-)Reihe (wie **6** und *m*FCCs, die aus **6** entstehen) oder zur *epi*-Reihe zugehörig (gilt für **epi-6** und seine Derivate) klassifiziert. Die auf dem Niveau der primären FCCs eingeführte Konfiguration an C16 scheint in *m*FCCs und ihren Abkömmlingen (NCCs, DNCCs usw.) unter physiologischen Bedingungen beibehalten zu werden. Deshalb gehören NCCs, DNCCs usw. ihrerseits entweder zur *n*- oder *epi*-Reihe (Tabellen 1 und 2 in diesem Abschnitt sowie Tabelle 3 in Abschnitt 4.2).

Im Unterschied zu den sich oft anreichernden NCCs und mit Ausnahme der außergewöhnlich persistenten hypermodifizierten FCCs (siehe Abschnitt 6)^[28a] treten typische FCCs nur flüchtig in den Blättern seneszenten Pflanzen auf, und ihre

Identität konnte nur gelegentlich geklärt werden.^[10] Zudem scheint der primäre FCC rasch weiter funktionalisiert zu werden. Die Hydroxylierung von *p*FCC/*epi-p*FCC an der C3²-Position scheint ein frühes Geschehen im Chl-Abbau höherer Pflanzen zu sein und findet wahrscheinlich schon in den Chloroplasten statt.^[9c] Eine solche frühe und effiziente Hydroxylierung der C3²-Position stimmt mit dem Auftreten der isomeren 3²-Hydroxy-1-formyl-19-oxophyllobilane (NCC **11** oder sein C16-Epimer, **epi-11**) als typische Hauptfraktionen unter den NCCs in seneszenten Blättern überein. Natürliche NCCs, denen diese 3²-OH-Modifikation fehlt, wurden bislang selten (**epi-5**) oder nie (**5**) detektiert.^[20a] In Extrakten seneszenten Blättern von *A. thaliana* konnte jedoch ein natürlich gebildeter *p*FCC (**6**, *At*-FCC-3) nachgewiesen werden.^[60] Der 3²-Hydroxy-*p*FCC **23** (3²-Hydroxy-12,13,16,19-tetrahydro-1-formyl-19-oxophyllobilen-*b*) wurde in seneszenten Blättern der Methylesterasemutante (MES16) von *A. thaliana* detektiert, in der die Aktivität für die Methylesterhydrolyse von Phyllobilinen ausgeschaltet wurde.^[67] Sein Epimer, 3²-Hydroxy-*epi-p*FCC (**epi-23**, 3²-Hydroxy-12,13,16,19-tetrahydro-1-formyl-19-oxo-*epi*-phyllobilen-*b*) wurde als *Mc*-FCC-62 in Bananenschalen identifiziert.^[51] In seneszenten *A. thaliana*-Blättern konnten zwei weitere polare FCCs tentativ als 3²-Hydroxy-O8⁴-desmethyl-12,13,16,19-tetrahydro-1-formyl-19-oxophyllobilen-*b* (*At*-FCC-1, **24**) und O8⁴-Desmethyl-12,13,16,19-tetrahydro-1-formyl-19-oxophyllobilen-*b* (*At*-FCC-2, **22**) identifiziert werden (Tabelle 2), die durch die Hydrolyse der Methylesterfunktion des 3²-Hydroxy-*p*FCC (**23**) bzw. des *p*FCC (**6**) gebildet werden.^[60]

Das Vorhandensein von (anderen) modifizierten FCCs mit einer freien Propionsäurefunktion *in vivo* ist hingegen kaum belegt. Deshalb wurde das Auftreten dieser natürlichen Zwischenstufen bisher aus den Strukturen der vorkommenden NCCs abgeleitet, die als direkte Isomerisierungsprodukte der jeweils zugehörigen *m*FCCs angesehen werden (Abbildung 15).^[6b,9c,10] Die NCC-Strukturen lassen eine Reihe von Modifizierungen an FCCs vermuten, die wahrscheinlich (oder wie man weiß) von Enzymen im Cytosol katalysiert werden.^[9c] Interessanterweise lässt die einzigartige Modifizierung des *At*-NCC-3 (**15**) an C2 auf einen abweichenden katabolischen Weg in *A. thaliana* schließen,^[66] der auf eine Seitenkettenhydroxylierung ohne die sonstige hohe Selektivität für C3² zurückzuführen sein dürfte.

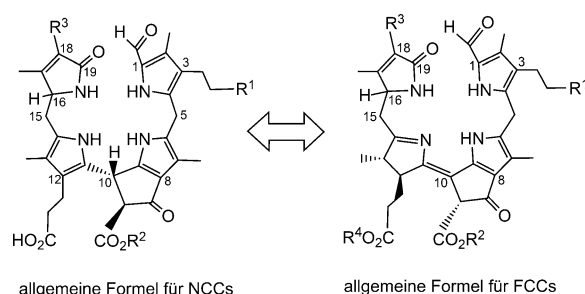


Abbildung 15. Die Strukturen von hypothetischen modifizierten FCCs (*m*FCCs, rechts) werden üblicherweise von jenen der zugehörigen isomeren NCCs (links) abgeleitet.

Tabelle 2: Strukturen der natürlich gebildeten fluoreszierenden Typ-I-Phyllobiline (FCCs, oberer Abschnitt) und der fluoreszierenden Typ-II-Phyllobiline (DFCCs und *iso*-DFCC, unterer Teil): Die Reste R¹, R² und R⁴ beziehen sich auf die allgemeinen FCC-Formeln (inklusive der Nummerierung); siehe Abbildung 15.

Nr. ^[a]	R ¹	R ²	R ⁴	C16 ^[b]	vorläufige Namen ^[c]	Lit.
22	H	H	H	n	At-FCC-2	[60]
6	H	CH ₃	H	n	Bn-FCC-2 (<i>p</i> FCC)	[25, 60]
<i>epi</i> -6	H	CH ₃	H	epi	Ca-FCC-2 (<i>epi-p</i> FCC)	[47]
24	OH	H	H	n	At-FCC-1	[60]
23	OH	CH ₃	H	n	3 ² -OH- <i>p</i> FCC	[27]
<i>epi</i> -23	OH	CH ₃	H	epi	Mc-FCC-62	[51]
23-Me	OH	CH ₃	CH ₃	epi	Mc-FCC-71 ^[e]	[51]
<i>epi</i> -41	OH	CH ₃	5'-Daucyl ^[f]	epi	Mc-FCC-56	[28a]
<i>epi</i> -42	OH	CH ₃	4'-Daucyl ^[g]	epi	Mc-FCC-53	[28a, 85]
25	OH	CH ₃	^[h]	n	Sw-FCC-62	[74]
<i>epi</i> -25	OH	CH ₃	^[h]	epi	Ma-FCC-69	[76]
<i>epi</i> -26	OH	CH ₃	^[i]	epi	Ma-FCC-61	[28b]
<i>epi</i> -27	OH	CH ₃	^[i]	epi	Ma-FCC-63	[76]
<i>epi</i> -28	OH	CH ₃	^[k]	epi	Ma-FCC-64	[76]
<i>epi</i> -43	O-Glc ^[d]	CH ₃	5'-Daucyl ^[f]	epi	Mc-FCC-49	[85]
<i>epi</i> -44	O-Glc ^[d]	CH ₃	4'-Daucyl ^[g]	epi	Mc-FCC-46	[85]
45	O-Glc ^[d]	CH ₃	H	n	At _{MES} -FCC	[67]
34	OH	H	H	n	At-DFCC-33	[26c]
35	OH	CH ₃	H	n		[27]
40	H	CH ₃	H	n	At _{MES} -2HM- <i>iso</i> -DFCC	[26a]

[a] Substanznummer (siehe Text), R³=Vinyl. [b] Relative Konfiguration an C16: n=normal, wenn von *p*FCC, oder epi=epimer, wenn von *epi-p*FCC abgeleitet. [c] Bn-FCC-2 (aus Raps, *B. napus*),^[25] Ca-FCC-2 (aus Paprika, *C. annuum*),^[47] At-FCCs (aus *A. thaliana*),^[60] Mc-FCCs (aus Schalen von Bananen)^[28a, 51] und Ma-FCCs (aus Bananenblättern, *M. acuminata*, Cavendish Cultivar),^[28b, 76] Sw-FCC-62 (aus seneszenten *S. wallisii*-Blättern).^[74] [d] Glc = β -Glucopyranosyl. [e] Vermutlich ein Artefakt der Methanolyse persistenter FCC-Daucylester. [f] Daucinsäure an 5'-OH gebunden. [g] Daucinsäure an 4'-OH gebunden. [h] R⁴ = 6- β -Glucopyranosyl-(1-1')-2-[3,4-dihydroxyphenyl]ethyl. [i] R⁴ = 6- α -Galactopyranosyl-(1-6)- β -galactopyranosyl-(1-1)-glyceryl. [j] R⁴ = 6- β -Glucopyranosyl. [k] R⁴ = 6- α -Glucopyranosyl.

Im Unterschied zu den kurzlebigen, typischen FCCs ist ein in den natürlich seneszenten Blättern der tropischen, immergrünen Pflanze *Spathiphyllum wallisii* gefundener FCC erstaunlich persistent und in recht großen Mengen (> 13 % des Chl in den grünen Blättern) vorhanden.^[74] Dieser hypermodifizierte FCC (*hm*FCC), inzwischen als Sw-FCC-62 (**25**) bekannt, ist an der entscheidenden Propionylseitenkette am Ring C mit einer β -Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl-Gruppe verestert (Abbildung 16). Da derartige Propionsäureester *hm*FCCs gegen die säureinduzierte Isomerisierung zu NCCs schützen, stellen *hm*FCCs eine beachtenswerte Gruppe von biologisch „verkappten“ Versionen der normalen FCCs dar.

Die persistenten *hm*FCCs wurden ursprünglich in Bananenfrüchten entdeckt (siehe Abschnitt 6).^[28a] In seneszenten (gelben) Blättern der Bananenpflanze (*Musa acuminata*, Cavendish cultivar) sammelte sich ebenfalls eine Reihe von *hm*FCCs an, während nichtfluoreszierende Chl-Kataboliten (NCCs) dort nicht detektiert werden konnten. Durch die Akkumulation von *hm*FCCs in den gelben Bananenblättern zeigten diese eine diffuse blaue Lumineszenz, sobald die Blätter mit UV-Licht bei $\lambda \approx 360$ nm bestrahlt wurden. Ein erster, polarer *hm*FCC aus den Bananenblättern (Ma-FCC-61, *epi*-26) wurde als Propionylester einer 6- α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-glyceryl-Einheit charakterisiert (Abbildung 16).^[28b] Diese außergewöhnliche Esterfunktion stellt die polare Kopfgruppe von in Thylakoiden

häufig vorkommenden Membrankomponenten dar. Ma-FCC-61 (*epi*-26) könnte folglich ein Spaltungsprodukt eines bisher nicht identifizierten, deutlich komplexeren FCC-artigen Pigmentes sein.^[28b] Tatsächlich zeigt die α -Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-glyceryl-Einheit starke Affinität zu Lipasen, die Esterfunktionen von Digalactosyldiacylglycerolen spalten und die polare Kopfgruppe freisetzen.^[75] Eine kleine, zusätzliche Gruppe von weniger polaren *hm*FCCs in Bananenblättern konnte ebenfalls charakterisiert werden und repräsentiert FCC-Ester mit β -Glucopyranosyleinheiten, die über O6' (ihre primäre OH-Gruppe) an der entscheidenden Propionylseitenkette der FCCs hängen. Einer dieser *hm*FCCs, Ma-FCC-69, weist ein 3,4-Dihydroxyphenylethyl-Aglycon an seiner Glucopyranosylestereinheit auf und stellt somit das C16-Epimer (*epi*-25)^[76] von Sw-FCC-62 (**25**) aus den Blättern von *Sp. wallisii* dar.^[74] Dieser n/*epi*-Unterschied resultiert aus unterschiedlichen Klassen von RCC-Reduktasen: Während in Bananenblättern (und auch in Bananenfrüchten, siehe Abschnitt 6) eine Reduktase der RCCR-2-Typs aktiv ist, produziert eine RCCR-1 in *Sp. wallisii* farblose Chl-Kataboliten der n-Reihe.^[74]

In seneszenten Bananenblättern kommen FCCs mit einer verblüffenden Häufigkeit vor, während NCCs nicht detektiert werden konnten und auch keine Anzeichen für das Vorhandensein von Typ-II-Phyllobilinen gefunden wurden.^[76] In zwei weniger polaren *hm*FCCs in Bananenblättern, Ma-FCC-63 (*epi*-27) und Ma-FCC-64 (*epi*-28), war eine β - bzw. eine α -Glucopyranosyleinheit jeweils über ihre primäre 6'-OH-Gruppe an die Propionylseitenketten geknüpft. Die freien anomeren Zentren von *epi*-27 und *epi*-28 ermöglichen eine gegenseitige Umwandlung über eine spontane Anomerisierung in wässriger Lösung.^[76] Die Gegenwart dieser *hm*FCCs in Extrakten von seneszenten Bananenblättern bestärkte die Vermutung, dass es sich dabei entweder um Vorstufen oder möglicherweise auch um Überreste oder partielle Abbauprodukte von noch nicht identifizierten, zusätzlich modifizierten *hm*FCCs handelt. Die Veresterung der entscheidenden Propionylgruppe von FCCs mit Glucopyranosyl- oder, alternativ, mit Galactopyranosyleinheiten über deren primäre 6'-OH-Gruppen ergibt zwei unterschiedliche Linien von persistenten Ma-FCCs im Bananenblatt. Die Zuckereinheiten dieser *hm*FCCs präsentieren verschiedene Positionen für das Anknüpfen weiterer Gruppen. Tatsächlich zeigten Analysen von noch unpolaren FCC-Fractionen, die in geringen Mengen vorkommen, dass es sich dabei um Derivate der

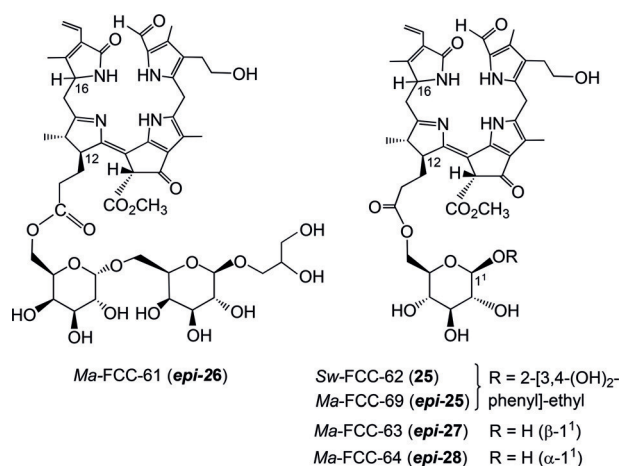


Abbildung 16. Oben: Strukturformeln von *hmFCCs* aus den Blättern von Bananen (*Ma-FCCs*) und *Sp. wallisii* (*Sw-FCC-62*). Unten: Wiedergabe eines Titelbildes, das ein gelbes Bananenblatt bei Tageslicht und unter Schwarzlicht zeigt.^[28b]

hmFCCs epi-27/ epi-28 handelt, die unerwartete, terpenoide Aglycone mit β -glycosidischer Verknüpfung zum Zuckerrest aufweisen.^[77]

4.2. Der Typ-II-Phyllobilin-Zweig – farblose 1,19-Dioxobiline

Die Entdeckung von 1,19-Dioxobilin-artigen NCCs (DNCCs) warf die Fragen nach ihrer Bildung und ihrer Relevanz für den Chl-Abbau auf.^[57–58] Die ursprünglich gebildeten bilinartigen Produkte des PaO/Phyllobilin-Weges sind 1-Formyl-19-oxobiline, die Typ-I-Phyllobiline.^[9c,10] DNCCs werden in späteren Schritten des Chl-Abbaus gebildet und deshalb als Typ-II-Phyllobiline klassifiziert. Die 1,19-Dioxobilin-Struktur der DNCCs (Abbildungen 11 und 17)^[57,58] zeigt eine beachtliche Ähnlichkeit zu jener der von Häm abstammenden Biline, der Hämobiline.^[3] Neuere Studien eröffneten damit eine konstitutionelle und stereochemische Vielfalt an DNCCs, die mit jenen der besser untersuchten NCCs vergleichbar ist und dem Zweig der Typ-II-Phyllobiline weiteres Gewicht verleiht.^[10]

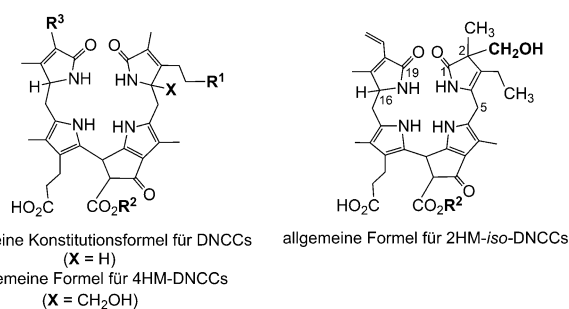


Abbildung 17. Allgemeine Formeln der farblosen und nichtfluoreszierenden Typ-II-Phyllobiline: DNCCs, 4-Hydroxymethyl-DNCCs und 2-Hydroxymethyl-iso-DNCCs.^[26]

1,19-Dioxobilin-artige nichtfluoreszierende Chl-Kataboliten (DNCCs) sind das formale Produkt der oxidativen Entfernung der Formylgruppe von NCCs.^[57] Die Abwesenheit der für NCCs charakteristischen Absorption bei $\lambda \approx 315$ nm (Abbildung 8) erschwert die Detektion von DNCCs durch ihre UV-Absorption. Solche farblosen Dioxobilin-artigen Chl-Kataboliten (DCCs) treten in einer Vielzahl von seneszenten Blättern auf. DCCs kommen in manchen Blättern zusammen mit Typ-I-Phyllobilinen vor, wie in *A. thaliana*. In Blättern des Wildtyps von *A. thaliana* stellt das polare 1,19-Dioxophyllobilan *At*-DNCC-33 (**30**) das mengenmäßig bei weitem häufigste Phyllobilin dar, während *At*-DNCC-45 (**31a**) und sein Isomer *At*-NCC-48 (**31b**) nur in geringen Mengen auftreten.^[27] In Extrakten der *A. thaliana*-MES16-Mutante wurden neben geringeren NCC-Fractionen weitere 1,19-Dioxophyllobilane identifiziert, wie *At*_{MES}-DNCC-47 (**32**) und *At*_{MES}-DNCC-38 (**33**) (Tabelle 3).^[26a] Der letztere ist ein C16-Epimer des aus seneszenten Weinblättern isolierten *Vv*-DNCC-51 (**epi-33**).^[78] In den seneszenten Blättern der Gerste^[57] und des Spitzahorns^[58] wurden die DNCC-Isomere **8a**, **8b** und **ent-8a** (Abbildung 10 und Tabelle 3) entdeckt.

Die mehrfache Beobachtung der DNCCs verlieh den Fragen nach ihrer Bildung und ihrer metabolischen Relevanz im PaO/Phyllobilin-Weg des Chl-Abbaus zunehmendes Gewicht.^[57,58] Aufgrund der frappierenden stereochemischen Abweichung der abgeleiteten Struktur des DNCC **ent-8a** aus Blättern des Spitzahorns von bekannten NCCs schlugen wir für die Bildung von Typ-II-Phyllobilinen die im Chl-Abbaupfad wirksame Entfernung der Formylgruppe auf dem Niveau von fluoreszierenden Chl-Kataboliten (FCCs) vor. Deshalb sollten im Chl-Abbau auch 1,19-Dioxobilin-artige fluoreszierende Chl-Kataboliten (DFCCs) als Intermediate auftreten können.^[58]

Tatsächlich konnte ein Cytochrom-P450-Enzym (CYP89A9) in *A. thaliana* identifiziert werden, das die Deformylierung des *epi*-pFCC (**epi-6**) zu vier DFCC-Epimeren katalysiert.^[27] In einer schwach sauren Lösung isomerisierte ein Paar dieser epimeren DFCCs rasch weiter zu einem entsprechenden Paar an DNCCs. Diese In-vitro-Experimente erklärten die grundlegenden konstitutionellen Konsequenzen der FCC-Deformylierung und der DFCC-zu-DNCC-Isomerisierung, der beiden Schlüsselschritte im Dioxobilin-Zweig des Chl-Abbaus.^[27] Natürlich erforderte die interessante, CYP89A9-katalysierte Deformylierungsreaktion weitere Untersuchungen. Die oxidative Abspaltung einer Formyl-

Tabelle 3: Strukturen der natürlich vorkommenden Dioxobilin-artigen nichtfluoreszierenden Chl-Kataboliten (DNCCs, obere Tabellenhälfte) und der *iso*-DNCCs (unterer Tabellenteil): R1, R2 und R3 stellen die Reste der Positionen wie in Abbildung 17 beschrieben dar.

Nr. ^[a]	R ¹	R ²	R ³	C16 ^[b]	vorläufige Namen ^[c]	Lit.
31 a/31 b	H	H	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -DNCC-45/ <i>At</i> -DNCC-48	[26c]
32	H	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>At</i> _{MES} -DNCC-47	[26a]
33	OH	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>At</i> _{MES} -DNCC-38	[26a]
<i>epi</i>-33	OH	CH ₃	CH=CH ₂	<i>epi</i>	UNCC- <i>Pvir/Vv</i> -DNCC-51	[78]
30	OH	H	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -DNCC-33/ <i>Bo</i> -DNCC-3	[27, 61]
8 a	OH	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	n	–	[57]
8 b	OH	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	n	–	[57]
<i>ent</i>-8 a	OH	CH ₃	CH(OH)-CH ₂ OH	<i>epi</i>	<i>Ap</i> -DNCC	[58]
36	H	H	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -2HM- <i>iso</i> -DNCC-43 ^[d]	[26b]
37	H	H	CH=CH ₂	n	<i>At</i> -4HM-DNCC-41 ^[e]	[26b]
38	H	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>At</i> _{MES} -2HM- <i>iso</i> -DNCC-46 ^[c]	[26a]
39	H	CH ₃	CH=CH ₂	n	<i>At</i> _{MES} -4HM-DNCC-44 ^[d]	[26a]

[a] Substanznummer (siehe Text). [b] Konfiguration an C16: n = normal, wenn von *p*FCC, oder *epi* = epimer, wenn von *epi-p*FCC abgeleitet; Konfiguration an C4 ist nicht bestimmt. [c] *Ap*-DNCC (aus *Acer platanoides*);^[58] *At*-DNCCs (aus *A. thaliana*, Wildtyp)^[26b] oder *At*_{MES}-DNCCs (aus *A. thaliana*, *MES16*-Mutante).^[26a] [d] Hydroxymethylgruppe an C2; UNCC-*Pvir/Vv*-DNCC-51 (aus Wein).^[78] [e] Hydroxymethylgruppe an C4 (siehe Abbildung 17 für die allgemeinen Formeln von DNCCs und *iso*-DNCCs).

oder Acylgruppe durch ein P450-Enzym ist schon bekannt.^[79] Allerdings konnte bisher noch keine durch P450 katalysierte oxidative Deformylierung an der α -Position einer Pyrroleinheit beobachtet werden. Das nukleophile (Hydro)peroxo-Fe^{III}-Intermediat des P450-Zyklus wurde für die Induktion der oxidativen C-C-Bindungsspaltung vorgeschlagen.^[79b, 80] Eine derartig ausgelöste Sauerstoffinsertion in die C-C-Bindung würde die Bildung eines Ameisensäureesters ergeben, was an eine Baeyer-Villiger-Reaktion erinnert (Abbildung 18). Die Hydrolyse des vermuteten Esterintermediates, der Verlust des bis jetzt unbekannten C1-Fragmentes (möglicherweise als Ameisensäure) und die Protonierung der C4-Position könnten alle ohne das Zutun des P450-Enzyms stattfinden, was den Mangel an Stereoselektivität bei den In-vitro-Experimenten mit CYP89A9 erklären würde.^[27]

Leider ließen die In-vitro-Versuche mit dem CYP89A9 weder einen klaren Rückschluss auf das stereochemische Ergebnis der DFCC-zu-DNCC-Isomerisierung zu, noch konnte dadurch ein echter Schritt im natürlichen Dioxobilin-Weg eindeutig identifiziert werden. Die sorgfältige Analyse eines Extrakts von *A. thaliana*-Blättern in einem frühen Seneszenzstadium gab aber Hinweise auf eine blau fluoreszierende Fraktion, deren UV-Spektrum eine charakteristische Absorption bei $\lambda = 360$ nm zeigte (auch bei FCCs beobachtet, wo sie durch die Konjugation der Ringe B/C hervorgerufen wird), aber keine Absorption im Bereich von $\lambda = 320$ nm, die typisch für die α -Formylpyrrole ist (Abbildung 8). Eine Probe des kurzlebigen natürlichen DFCC **34** (ein 3²-Hydroxy-1,4,12,13,16,19-hexahydro-1,19-dioxophyllobilin-*b*) wurde kürzlich isoliert. Die Struktur der Verbindung **34** konnte durch massenspektrometrische und extensive NMR-spektro-

skopische Analysen aufgeklärt werden.^[26c] Dieser DFCC **34** ging bei pH 5 eine schnelle säureinduzierte, stereoselektive Isomerisierung ein, wobei ein einziger DNCC als Produkt gebildet wurde (Abbildung 18). Das Isomerisierungsprodukt konnte als *At*-DNCC-33 (**30**) identifiziert werden,^[26c] der wichtigste natürliche DNCC in seneszenten *A. thaliana*-Blättern.^[27] Der DFCC **34** scheint das Hydrolyseprodukt des immer noch unbekannten DFCC-Methylesters (**35**) zu sein, der bei der CYP89A9-katalysierten Deformylierung des 3²-OH-*p*FCC (**23**) entsteht.^[26c] Es konnten also ein natürlich vorkommender, funktionalisierter DFCC und darüber hinaus ein wichtiger

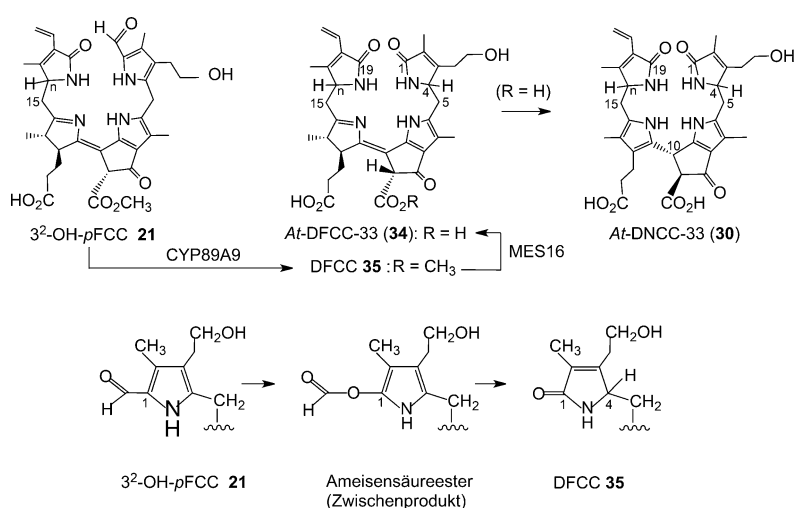


Abbildung 18. Oben: Die Deformylierung des 3²-OH-*p*FCC durch die CYP89A9 ist der vorgeschlagene Eintrittspunkt zu den Typ-II-Phyllobilinen, wobei der hypothetische DFCC **35** gebildet wird. Seine Esterfunktion würde durch MES16 hydrolysiert, wodurch der DFCC **34** (*At*-DFCC-33) gebildet würde, der anschließend zum DNCC **30** (*At*-DNCC-33) isomerisieren würde.^[26c] Unten: kurze Übersicht über einen möglichen Mechanismus (anhand der Darstellung des Ringes A) der Deformylierung von FCC **21** zu DFCC **35**, die durch das Cytochrom-P450-Enzym CYP89A9 katalysiert wird.^[26a]

Verzweigungspunkt zu den Typ-II-Phyllobilinen in höheren Pflanzen identifiziert werden.

5. Chl-Abbau in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* – ein Modellfall

Das zunehmende biologische Wissen über *Arabidopsis thaliana* wurde auch im Bereich des Chl-Abbaus sehr nützlich^[27] und half, eine Vielzahl an beteiligten Enzymen in dieser Modellpflanze zu identifizieren,^[9c, 11a] ergänzt durch unsere Arbeiten, die der Entdeckung und Strukturanalyse

einer außerordentlichen Vielfalt an Chl-Kataboliten in dieser Pflanze gewidmet waren.^[26,27,60,67] In früheren Analysen von Extrakten seneszenten *A. thaliana* (Wildtyp)-Blätter konnte eine Vielzahl an farblosen Typ-I-Phyllobilinen gefunden werden, darunter fünf *At*-NCCs (**3**, **4**, **15–17**;^[60,66] vgl. dazu Tabelle 1) und drei *At*-FCCs (**6**, **22**, **25**; Tabelle 2).^[60] Jüngst konnten außerdem noch farblose Typ-II-Phyllobiline in *A. thaliana* entdeckt werden. Die *At*-DNCCs **30**, **31a** und **31b** (Tabelle 3)^[26b,37] und auch der kurzlebige DFCC **34** wurden charakterisiert.^[26c]

Außerdem konnten in den Extrakten von *A. thaliana*-Blättern (sowohl des Wildtyps^[26b] als auch der MES16-Mutante^[26a]) weitere farblose, nichtfluoreszierende Phyllobiline beobachtet werden, die anscheinend mit den DNCCs verwandt sind. Diese wurden vorläufig aufgrund ihrer UV-Spektren, die ähnlich denen der strukturell charakterisierten DNCCs (**30** und **31a/31b**) sind, als nichtfluoreszierende DCCs (NDCCs) bezeichnet. Einige dieser NDCCs, die massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch untersucht wurden, wiesen eine rätselhafte Kohlenstoff-Hydroxymethylierung auf und hatten deshalb auch nicht die korrekte chemische Konstitution echter DNCCs.^[26a,b] In Extrakten seneszenten Blätter des Wildtyps wurden der 2-Hydroxymethyl-*iso*-DNCC *At*-2HM-*iso*-DNCC-43 (**36**) und ein 4-Hydroxymethyl-DNCC (*At*-4HM-DNCC-41, **37**) gefunden (Abbildung 19 und Tabelle 3).^[26b] In Extrakten der MES16-Mutante traten die zugehörigen Methylester 2-Hydroxymethyl-*iso*-DNCC (*At*_{MES}-2HM-*iso*-DNCC 46, **38**) und 4-Hydroxymethyl-DNCC (*At*_{MES}-4HM-DNCC-44, **39**) auf.^[26b] Des Weiteren wurde in den Blättern der MES16-Mutante die Fraktion eines farblosen, blau fluoreszierenden Phyllobilins entdeckt, der die Absorption bei $\lambda = 315$ nm fehlte, die aber das für FCCs charakteristische Absorptionsmaximum bei $\lambda \approx 360$ nm zeigte.^[26a] Somit wurde diese fluoreszierende Verbindung vorläufig als fluoreszierender DCC (FDCC) bezeichnet. Diese Komponente wurde isoliert und konnte als 2-Hydroxymethyl-*iso*-DFCC *At*_{MES}-2HM-*iso*-DFCC (**40**, = 2HM-*iso*-pDFCC, Abbildung 19)^[26a] charakterisiert werden, der sich von echten DFCCs durch die Struktur des Ringes A unterscheidet (Abbildung 19). Die Struktureigenschaften dieses DFCC **40** wiesen ihn als direkte Vorstufe seines nichtfluoreszierenden Isomers aus, des *At*_{MES}-2HM-*iso*-DNCC-46 (**38**).^[26a] In allen an einem Kohlenstoffatom hydroxymethylierten Typ-II-Phyllobilinen fehlt die für viele Phyllobiline typische 3²-OH-Funktion. Somit sind sie

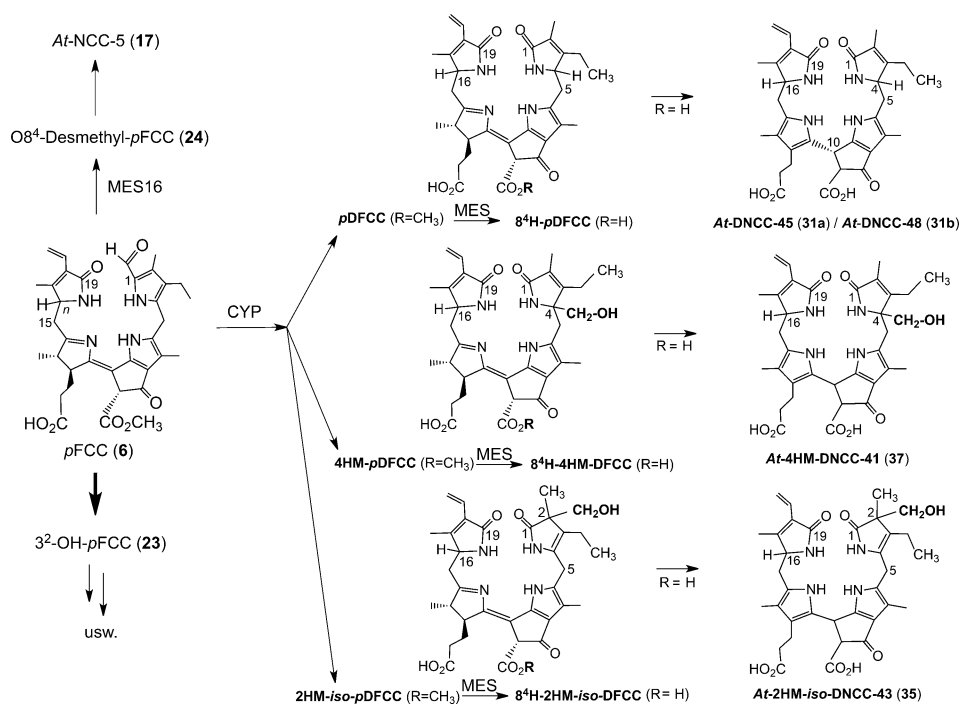


Abbildung 19. Phyllobiline von *A. thaliana*, denen die 3²-OH-Gruppe fehlt, stammen direkt vom pFCC (**6**) ab. Die In-vivo-Deformylierung des pFCC (**6**) durch CYP89A9 (CYP) und die anschließende Hydrolyse mithilfe der Methylesterase MES16 (MES) ebnet den Weg zu drei Typen von nichtfluoreszierenden DCCs (rechts: die beiden echten DNCCs **31a/31b**, 2HM-*iso*-DNCC **35** und 4HM-DNCC **37**). Es wird angenommen, dass sie alle durch die Isomerisierung ihrer entsprechenden hypothetischen, fluoreszierenden DCCs mit R = H entstehen (vgl. Bildmitte: 8⁴H-pDFCC, 8⁴H-2HM-*iso*-DFCC und 8⁴H-4HM-DFCC).^[26b]

eng mit dem pFCC (**6**) verwandt, und **6** dürfte ihre direkte Vorstufe sein. Die Hydroxymethylierungsreaktion scheint eng mit der oxidativen Deformylierung der pFCCs unter Bildung der Typ-II-Phyllobiline verknüpft zu sein. Möglicherweise ist die Hydroxymethylierung eine Art „Rettungsaktion“ im Cytosol, die die benötigte polare Funktionalität am Ring A der Kataboliten einführt. In diesem Sinne wurde diese Hydroxymethylierung (am Kohlenstoffatom) als „biosynthetisches Intermezzo“ im Laufe des Typ-II-Astes des PaO/Phyllobilin-Wegs angesehen.^[26a,b]

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Vielfalt an farblosen Phyllobilinen in *A. thaliana* während des Chl-Abbaus gebildet wird, die aus pFCC (**6**) und vermutlich auch aus 3²-Hydroxy-pFCC (**23**) in den Chloroplasten hervorgeht.^[9c,26c] Die vielfältig strukturierten Abkömmlinge des pFCC (**6**), denen die OH-Gruppe an der C3²-Position fehlt, entsprechen nur einer geringen Menge der Chl-Kataboliten in *A. thaliana* (Abbildungen 19 und 20). Die hauptsächlich gebildeten Phyllobiline in *A. thaliana* (sowohl des Wildtyps als auch der MES16-Mutante) sind Derivate des 3²-OH-pFCC (**23**). Dessen Typ-II-Phyllobilin-Abkömmlinge überwiegen auch gegenüber den Typ-I-Analoga bei weitem. Den Hinweis für den Export der FCCs **6** und **23** in das Cytosol (die dort unabhängig weiter zu modifizierten FCCs, DFCCs und FDCCs umgewandelt werden) liefern sowohl die Strukturen der FCCs **22**, **24**, des DFCC **34** und FDCC **40** als auch die Strukturen ihrer diversen nichtfluoreszierenden Abkömmlinge. Von letzteren wird angenommen, dass sie durch eine säurekatalysierte Isomerisierung in die Vakuolen nach dem

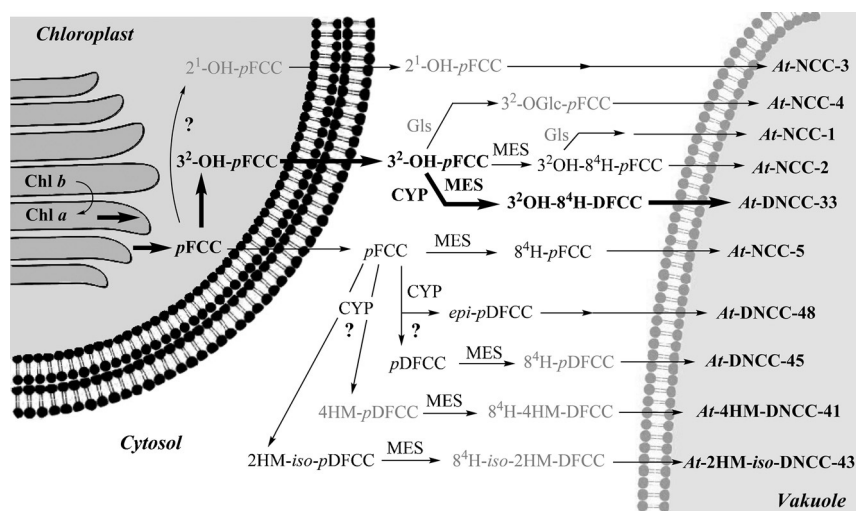


Abbildung 20. Überblick über den Chl-Abbau in den Blättern von *A. thaliana* (Wildtyp). Der vorgeschlagene Hauptweg von Chl a zu At-DNCC-33^[26c] wird durch dicke Pfeile symbolisiert (CYP = CYP89A9, MES = MES16, GlS = hypothetische Glykosidase; siehe Abbildung 19 für die Strukturen der vom pFCC abstammenden Typ-II-Phyllobiline).

Transport der fluoreszierenden Vorstufen dorthin gebildet werden. Die abgeleiteten (parallelen) In-vivo-Deformulierungen des pFCC (6), wie auch des 3²-OH-pFCC (23), ergeben zwei natürliche Verzweigungspunkte von Typ-I- zu Typ-II-Phyllobilinen in den Blättern von *A. thaliana*.^[26c]

6. Lange übersehene Chl-Kataboliten in Früchten und Gemüse

Das Verschwinden des Chlorophylls wird üblicherweise vorrangig mit dem Erscheinen der Herbstfarben verbunden. Aber auch reife Früchte (sowie Gemüse) durchlaufen Verfärbungsprozesse (Chl-Abbau), deren sichtbare Zeichen denen in seneszenten Blättern ähnlich sind (Abbildung 21).^[9c,11c] Es drängte sich also die Frage auf: Was passiert mit Chl in reifenden Früchten und bei der Verfärbung von grünem Gemüse?

6.1. Farblose Chl-Kataboliten in Früchten und Gemüse

Wenn Äpfel, Birnen oder andere Früchte reifen, stellt das damit verbundene Auftreten der appetitanregenden Farben üblicherweise einen visuellen Indikator für den Reifezustand der Früchte dar.^[81] Zugleich wird das Chlorophyll, das in den ursprünglich grünen, unreifen Früchten vorhan-

den war, abgebaut und vermutlich in Phyllobiline umgewandelt. Für den Chl-Abbau sowohl in Golden-Delicious-Äpfeln (*Malus domestica*) als auch in Williams-Birnen (*Pyrus communis*) konnte gezeigt werden, dass die nicht-fluoreszierenden Typ-I-Phyllobiline *epi-9* und *epi-11* entstanden, dann als *Md-NCCs* und *Pc-NCCs* benannt.^[59] Die gleichen *epi*-Typ-NCCs (also von RCCR-2 gebildet) wurden auch in Blättern der zugehörigen Apfel- und Birnbäume gefunden und ließen auf einen gemeinsamen Weg des Chl-Abbaus in Blättern und Früchten dieser Obstbäume schließen.^[59] In der Quitte (*Cydonia oblonga*, Miller)^[82] und der japanischen Wollmispel (*Eriobotrya japonica*)^[83] wurden ebenfalls (auf Basis von massenspektrometrischen und UV-spektroskopischen Daten) einige NCCs identifiziert, unter ihnen der neuartige *Ej-NCC-2* (*epi-29*; Tabelle 1). In gelb werdenden Brokkoliröschen (*Brassica oleracea*, var. Ital.) wurden die NCCs *Bo-NCC-1* (3) und *Bo-NCC-2* (17) sowie *Bo-DNCC-3* (30) charakterisiert, drei bekannte Vertreter der stereochemisch normalen Reihe der Typ-I- und Typ-II-Phyllobiline.^[61] In seneszenten Spinatblättern (*Spinacia oleracea*) wurden bereits früher fünf NCCs gefunden, die so genannten *So-NCCs* (*epi-1*, *epi-5*, *epi-11*, *epi-12*, *epi-13*), die zur *epi*-Serie der NCCs gehören.^[50,64] Wie erwartet folgt der Chl-Abbau in reifen (den) Früchten und (gelb werdendem) Gemüse dem üblichen PaO/Phyllobilin-Weg und führt Art-spezifisch zur Bildung von farblosen Typ-I- und Typ-II-Phyllobilinen. Offensichtlich sind diese pflanzlichen Bestandteile unseres Essens eine geläufige Quelle für Chl-Kataboliten, die folglich Teil unserer täglichen Nahrung sind.^[6a]

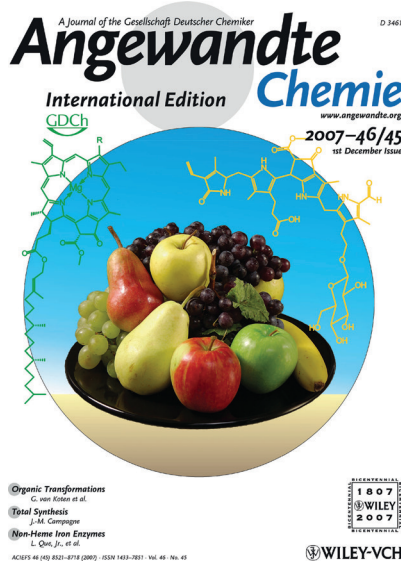
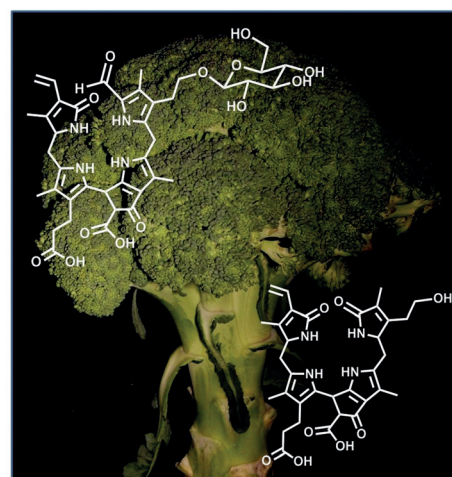


Abbildung 21. Reifende Früchte (links) und gelb werdende Brokkoliröschen (rechts) bauen Chl ab und reichern farblose Phyllobiline an.^[59,61]



6.2. Persistente, blau leuchtende Chl-Kataboliten in Bananen

Das Reifen von Bananen ist mit dem typischen Erscheinen einer leuchtend gelben Farbe verbunden, die ihrerseits wiederum als häufig entscheidender visueller Indikator für den Reifegrad der Bananenfrucht betrachtet wird. Offensichtlich wird Chl, das in den unreifen Früchten vorhanden ist, während des Reifungsprozesses abgebaut. Es war deshalb naheliegend, Bananen auf Chl-Kataboliten hin zu untersuchen.^[28a] Überraschenderweise stellen einige der Kataboliten, die in den Schalen von reifen (den) Bananen (*Musa acuminata*, Cavendish cultivar) gefunden wurden, persistente FCCs dar und gehören zu der neuartigen Gruppe der hypermodifizierten FCCs (*hmFCCs*). Diese FCCs verursachen ein blaues Leuchten der reifenden Bananen, das am besten bei Anregung unter Schwarzlicht in einem abgedunkelten Raum beobachtet werden kann (Abbildung 22).^[28a] Etliche persistente *hmFCCs* werden in den Schalen von reifen (den) Bananen angereichert; die *Mc-FCCs epi-23*, *epi-41* und *epi-42* stellen dort einen beträchtlichen Teil der Phyllobiline dar. Die häufigsten *hmFCCs* in der Schale reifer Bananen, *Mc-FCC-56 (epi-41)* und *Mc-FCC-53 (epi-42)*, weisen dabei an ihrer Propionsäurefunktion einen Ester der Daucinsäure^[84] auf.^[28a] Die polareren Kataboliten *Mc-FCC-49 (epi-43)* und *Mc-FCC-46 (epi-44)* sind zusätzlich mit einer β -Glucopyranosyleinheit an ihrer 3²-Position modifiziert (Tabelle 2 und Abbildung 22).^[28a,85] Sie unterscheiden sich somit deutlich von den bisher etwa in seneszenten Blättern der Banane^[51] und der Friedenslilie^[74] gefundenen *hmFCCs*, die alle mit charakteristischen, natürlichen Hexopyranosyleinheiten verestert sind.

In der frühen Phase des Reifungsprozesses von Bananen stellt der klassische FCC 3²-Hydroxy-*epi-pFCC* (*Mc-FCC-62, epi-23*) als Vorstufe der hypermodifizierten FCCs (*hmFCCs*) ebenfalls eine wesentliche FCC-Fraktion in der Bananenschale dar.^[51] Darüber hinaus wurde noch eine Vielzahl an *Mc-NCCs* in den Extrakten von Bananenschalen identifiziert. Ähnlich wie in Bananenblättern konnten keine Typ-II-Phyllobiline detektiert werden.^[51] Diese Resultate deuten auf die exklusive Rolle der Typ-I-Phyllobiline (des *epi*-Typs) in Bananenschalen hin und lassen auf einen Weg des Chl-Abbaus schließen, der sich auf der Stufe der FCCs in zwei Typ-I-Phyllobilin-Zweige aufspaltet (Abbildung 23). Dieser Schritt des Chl-Abbaus wird im Cytosol vermutet, wo die Bildung spezifischer *hmFCCs* über Veresterung des 3²-Hydroxy-*epi-pFCC (epi-23)* mit einer Daucylgruppe mit anderen Modifikationen konkurriert, aus denen die typischen *mFCCs* hervorgehen. Letztere werden vermutlich in die Vakuolen transportiert, um dort schließlich rasch zu *Mc-NCCs* zu isomerisieren (Tabelle 1).^[51]

Häufig kann das Auftreten von dunklen, Seneszenz-assoziierten Flecken auf den Schalen von sehr reifen Bananen beobachtet werden.^[87] Dieser Verderb kann durch den Schutz vor Luft

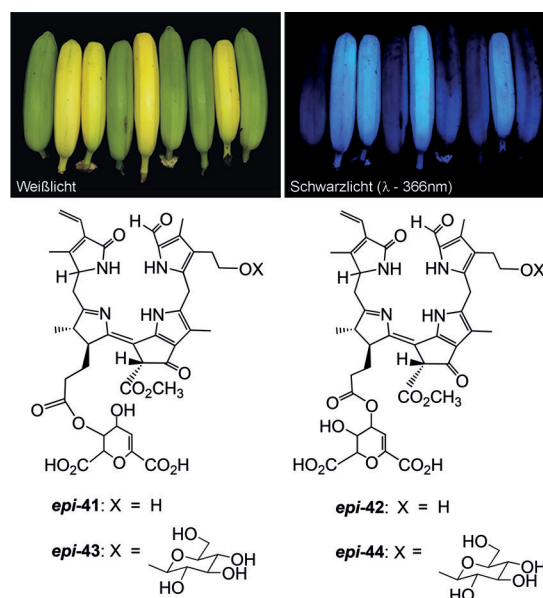


Abbildung 22. Oben: Gelbe, reife Bananen zeigen eine blaue Lumineszenz. Wenn gelbe Bananen mit UV-Licht (Schwarzlicht) bestrahlt werden, kann mit bloßem Auge ein blaues Leuchten der Bananen beobachtet werden, das von den darin enthaltenen *hmFCCs* ausgeht^[86] (Bilder aus Lit. [28a] übernommen). Unten: Die wichtigsten *hmFCCs* aus Bananenschalen sind FCC-Daucylester.^[28a,85]

(oder Sauerstoff) verhindert werden.^[88] Die Flecken treten rund um Stomata auf und stellen Zeichen lokaler Seneszenz und des späteren Zelltodes dar.^[85] Seltsamerweise häufen sich glucosylierte *hmFCCs* (speziell *epi-43* und *epi-44*) in den seneszenten Regionen um die dunklen Flecken an, was müheles in abgedunkelten Räumen beobachtet werden kann, wenn nur Schwarzlicht als Lichtquelle verwendet wird.^[85] Ihr Auftreten in Form von blau fluoreszierenden Ringen auf den Bananenschalen kann durch kreisförmig lokal aufkonzentrierte FCCs rund um die nekrotischen Flecken erklärt werden. Die blau fluoreszierenden Ringe wurden deshalb als „blaue Vorboten des Zelltodes“ bezeichnet.^[85]

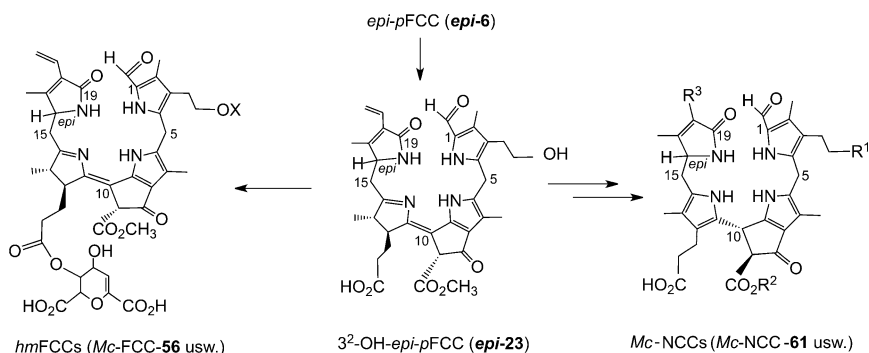


Abbildung 23. In den Schalen reifender Bananen werden *hmFCCs* und *NCCs* gebildet. Dies lässt auf einen Chl-Abbau schließen, der sich auf der Stufe des 3²-Hydroxy-*epi-pFCC (epi-23)* verzweigt.^[51]

7. Phyllochromobiline durch Oxidation von Phylloleukobilinen

Anfänglich wurden NCCs als „rostende Pigmente“ („rusty pigments“) bezeichnet.^[8a,14] Tatsächlich werden diese farblosen scheinbaren Endprodukte des Chl-Katabolismus, die sich häufig in den seneszenten Blättern höherer Pflanzen anreichern, schnell rostfarben, wenn sie ungefiltertem Sonnenlicht ausgesetzt werden.^[7] In Analysen einer solchen farbigen Mischung, die durch Bestrahlung einer Lösung des häufig vorkommenden NCC **epi-11** mit Sonnenlicht in Gegenwart von Luft erhalten wurde, wurden die gelben Komponenten **46Z** und **46E** sowie die rosarot gefärbte Substanz **47** entdeckt. Sie wurden entsprechend ihrer Farben als gelbe Chl-Kataboliten (yellow Chl-catabolites, YCCs) und rosarote Chl-Kataboliten (pink Chl-catabolites, PiCCs) klassifiziert (Abbildung 24).^[6b,7,89]

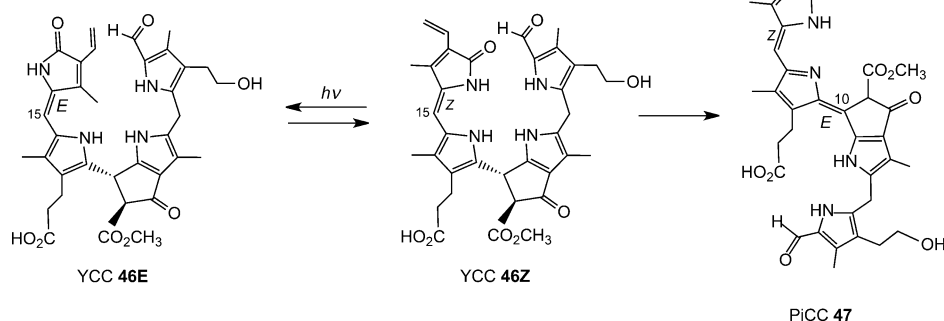


Abbildung 24. Gelbe Chl-Kataboliten (YCCs) und rosarote Chl-Kataboliten (PiCCs) tragen zur Farbe der seneszenten Blätter von Laub-werfenden Bäumen bei.^[89]

7.1. Gelbe Phyllobiline – die Phylloxanthobiline

Interessanterweise konnten in frisch hergestellten Extrakten von gelben *Cercidiphyllum-japonicum*-Blättern die beiden *E/Z*-isomeren YCCs **46Z** und **46E** identifiziert werden. Diese Beobachtung sprach für deren tatsächliches Vorkommen auch in seneszenten Blättern und damit für einen Beitrag zu deren gelber Farbe.^[7] In polaren Lösungsmitteln zeigen YCCs eine typische Absorptionsbande im langwelligen Bereich bei $\lambda \approx 430\text{--}440\text{ nm}$,^[7] wie sie auch von Bilirubin (BR)^[90] und Modell-Dipyrinonen bekannt ist.^[3] Bewahrt man Lösungen von YCC **46Z** im Tageslicht auf, isomerisiert dieser (zum Teil) zu seinem *E*-Isomer **46E**.^[89] Strukturanalysen der YCCs **46Z** und **46E** mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie deuteten auf eine ungesättigte „westliche“ *meso*-Position und als Konsequenz auf einen Chromophor mit π -Konjugation über die Ringe C und D hin. Formal gesehen entstehen **46Z** und **46E** aus dem NCC **epi-11** durch oxidative Desaturierung unter Bildung einer C15=C16-Doppelbindung. Dieser Teil des Chromophors von YCCs zeigt damit bemerkenswerte (lokale) Ähnlichkeit zum C/D-Teil des Chromophors von BR.^[3,90] Die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen von **46Z-Me** (dem Methylester von **46Z**) bestätigte die Struktur von **46Z-Me** (und damit von

46Z), die bereits aus den Spektren abgeleitet wurde.^[72] Dabei trat **46Z-Me** in den Kristallen als ein über H-Brücken verknüpftes Dimer auf, dessen Struktur die bereits früher für **46Z**^[7] und für dessen Vorstufe **epi-11**^[20a] hergeleitete *R*-Konfiguration an C10 verifizieren ließ.^[72]

Die Oxidation des NCC **epi-11** mit Dicyandichlorbenzoquinon (DDQ) eröffnete einen semipräparativen Zugang zu den YCCs **46Z** und **46E**.^[89] Im Zuge dieser präparativen Umwandlung sowie, höchst überraschend, bei der Oxidation von endogenem NCC **11** oder von zugegebenem **epi-11** mithilfe wässriger Homogenate von grünen oder seneszenten *Sp.-wallisii*-Blättern in der Gegenwart von Luft (oder molekularem Sauerstoff), wurden **11** bzw. **epi-11** stereoselektiv zu 15-OH-**11** oder zu 15-OH-**epi-11** hydroxyliert (Abbildung 25). Beide oxidierten NCCs, 15-OH-**11** und 15-OH-**epi-11**, sind dank einer selektiven Säure-induzierten Eliminierung von Wasser an C15 und C16 effiziente Vorstufen desselben

YCC, **46Z**.^[91] Homogenate von (grünen oder seneszenten) *Sp.-wallisii*-Blättern weisen eine bislang noch unzureichend erforschte oxidative Aktivität auf (die vermutlich auf ein Enzym zurückzuführen ist), die einen Zugang zur endogenen Bildung der YCCs **46Z** aus **11** und **epi-11** sowie anderer YCCs aus entsprechend anderen NCCs ermöglicht.^[91] Der Anwendungsbereich dieser „grünen Synthese mit Blättern“ auf Basis der immer noch rätselhaften oxidativen Aktivität bleibt zu erkunden, ebenso wie die Selektivität und die präparativen Randbedingun-

gen dieser Art der oxidativen Umwandlung. Die Oxidation von DNCCs (analog jener, wie sie an den NCCs **11** und **epi-11** beobachtet wurde^[91]) könnte ein möglicher Weg zu den entsprechenden Dioxobilin-artigen YCCs (DYCCs) sein. YCC-artige Komponenten wurden dabei nicht nur in seneszenten Blättern von *C. japonicum* gefunden,^[7] sondern auch in frischen Extrakten einer Vielzahl von seneszenten Blättern, z. B. der Laub-werfenden Linde^[92] und des *Egeria-densa*-Baumes,^[93] sowie in den Schalen reifer Bananen.^[51]

7.2. Rosarote Phyllobiline – die Phylloroseobiline

Ähnlich Bilirubin (BR)^[90] werden YCCs in Gegenwart von Luft oder molekularem Sauerstoff leicht oxidiert. Aus dieser Oxidation von YCCs resultieren rosarot gefärbte Chl-Kataboliten, die als PiCCs bezeichnet werden.^[89] Für Synthesezwecke kann die Oxidation etwa vom YCC **46Z** effektiv in Gegenwart von Zn^{II} -Ionen durchgeführt werden. Als Produkt erhält man dann den leuchtend blauen Zn^{II} -Komplex **Zn-47**.^[94] Durch Umsetzung von **Zn-47** mit Essigsäure oder Phosphat können die Zn -Ionen entfernt werden, und PiCC **47** lässt sich fast quantitativ erhalten (Abbildung 26).^[94a] Das rosarot gefärbte Phyllobiladien-*b,c* **47** zeigt eine Absorpti-

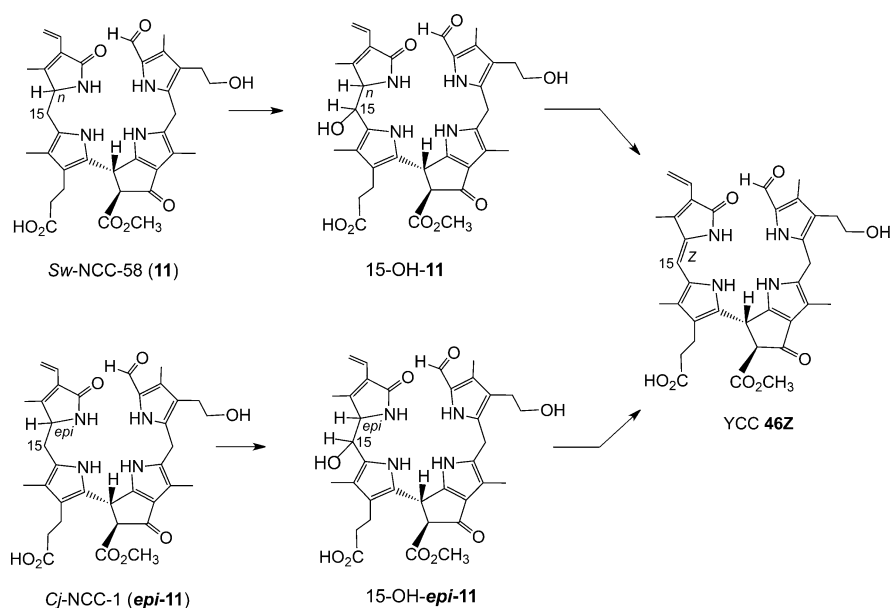


Abbildung 25. Die NCCs 11 und *epi*-11 werden von frischen Homogenaten von *Sp. wallisii*-Blättern zu epimeren 15-OH-NCCs oxidiert, die unter schwach sauren Bedingungen zum YCC 46Z dehydratisiert werden.^[91]

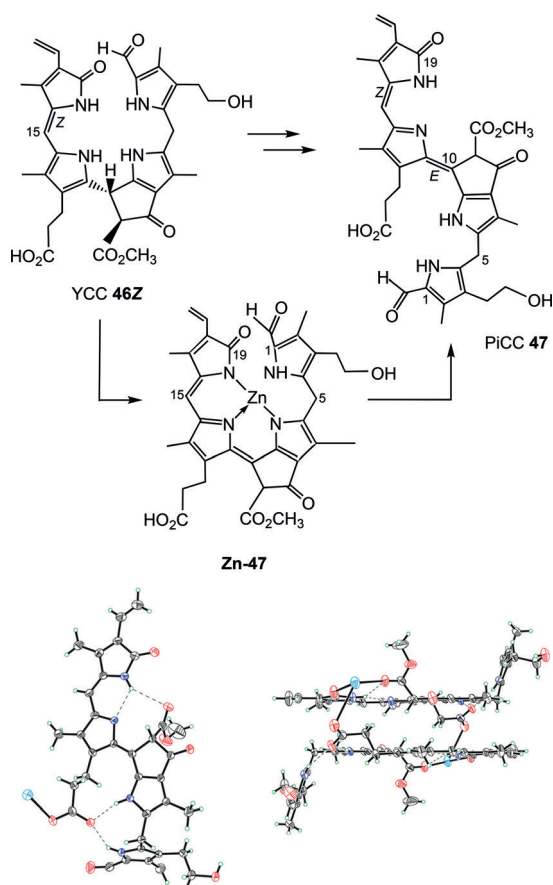


Abbildung 26. Oben: Die Oxidation des YCC 46Z in Gegenwart von Zn^{II} -Ionen ergibt den blauen Zn^{II} -Komplex Zn-47, aus dem der PiCC 47 mittels Säure oder Phosphat erhalten wird. Unten: Molekülstruktur des PiCC 47 nach einer Röntgenkristallstrukturanalyse (C grau, grün H, rot O, blau N; links: Draufsicht, rechts: Seitenansicht).^[94a]

onsbande im langwelligen Bereich bei $\lambda \approx 520$ nm, die mit einer weiteren Vergrößerung des konjugierten π -Systems über Ring B erklärt werden kann (Abbildung 27). Der Chromophor des PiCC 47 weist dabei eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zum (vom Häm abstammenden) Bilin Phycoviolobilin auf.^[3,56] Die Desaturierung der „südlichen“ C10-Position des YCC 46Z bedingt dabei, dass PiCC 47 als Racemat erhalten wird: Das einzige asymmetrische Zentrum ($C8^2$) ist durch die angrenzenden Funktionalitäten acidifiziert, was zur raschen Racemisierung beiträgt.^[94a] Eingehende NMR-spektroskopische Analysen des PiCC 47 ließen auf die überraschende *E*-Konfiguration seiner C10=C11-Doppelbindung schließen. Eine Röntgenstrukturanalyse bestätigte die Struktur und zeigte das oxidierte Phyllobiladien-*b,c* 47 in den Kristallen als H-überbrücktes Enantiomerenpaar, weiter verbunden über „ π -Stapelung“

dank seines ausgedehnten, planaren Chromophorsystems (Abbildung 26).^[94a]

Die neueren Beobachtungen von natürlich vorkommenden YCCs und PiCCs sprechen für eine allgemeinere Bedeutung der weiteren endogenen Umwandlungen der Chl-Kataboliten in seneszenten Pflanzen, die über die Stufe der häufigen Typ-I- und Typ-II-Phylloleukobiline hinausgehen. Solche endogenen Prozesse könnten weitere wichtige Schritte des Chl-Abbaus repräsentieren und die deutliche Verringerung des Gehaltes an farblosen Phyllobilin-artigen Chl-Ka-

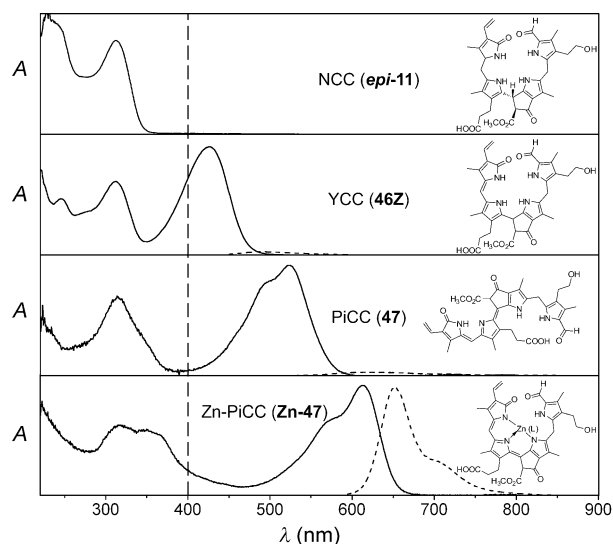


Abbildung 27. UV/Vis-Spektren (—, linke Achse) und Fluoreszenz-emissionsspektren (----, rechte Achse) des NCC *epi*-11 (oben), der Phyllochromobiline 46Z (ein YCC) und 47 (ein PiCC) sowie des blauen Zn^{II} -Komplexes Zn-47.^[94]

taboliten in Blättern erklären helfen, die häufig nach über mehrere Tage oder Wochen fortschreitender Seneszenz von Blättern beobachtet werden kann.

8. Phyllobiline sind Naturstoffe mit bemerkenswerten Eigenschaften

Phyllobiline, die linearen Tetrapyrrole aus dem Abbau von Chl, weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu den (Hämo-)Bilinen aus dem Abbau des Häms auf.^[3,90] Folglich sollten sie wie diese vielfältige Photo-, Koordinations- und Redoxchemie zeigen. Dennoch sind die chemischen Eigenschaften der Phyllobiline bisher kaum erforscht.^[10,94b,95]

8.1. Phyllobiline als photoaktive Tetrapyrrole

Die photochemischen Eigenschaften der Abbauprodukte des grünen Photosynthesepigmentes Chl sind von vorrangigem Interesse. Die beobachtete zügige katabolische Umwandlung von Chl in farblose Phyllobiline wurde vor allem mit einer Chl-Vernichtung erklärt. Die beobachtete rasche Bildung der nichtfluoreszierenden und farblosen Typ-I- und Typ-II-Phyllobiline (NCCs und DNCCs) ist tatsächlich völlig konform mit dem Aspekt des Chl-Abbaus als Entgiftungsprozess. NCCs und DNCCs reichern sich üblicherweise in seneszenten Blättern an. Mit ihrer Absorption, die auf den UV-Bereich beschränkt ist (Abbildung 8), nehmen NCCs und DNCCs aber nur einen sehr kleinen Teil des Sonnenlichtes auf und sind praktisch photoinaktiv.

Bemerkenswerterweise werden üblicherweise während des raschen Chl-Abbaus keine photoaktiven Zwischenstufen auf dem Weg zu den nichtfluoreszierenden Phyllobilinen angehäuft. Fluoreszierende Chl-Kataboliten wie *p*FCC (**6**) und 3²-Hydroxy-*p*FCC (**23**) sowie deren C16-Epimere sind wichtige Zwischenstufen des PaO/Phyllobilin-Weges.^[9c] Der FCC **6** absorbiert aber wenig Licht des sichtbaren Bereiches (Abbildung 8). Wie die Klassifizierung der FCCs bereits vermuten lässt, emittieren sie hingegen äußerst effektiv eine blaue Fluoreszenz.^[28a,95] Der FCC *epi*-**23-Me**, der semisynthetische Methylester des 3²-Hydroxy-*epi*-*p*FCC (*epi*-**23**), zeigt eine Emission mit einem Maximum bei $\lambda = 437$ nm und eine Fluoreszenzquantenausbeute von 0.21 (Lebensdauer 1.6 ns, in Ethanol).^[95] Das Licht-angeregte *epi*-**23-Me** geht Intersystem Crossing in den Triplettzustand (mit einer Quantenausbeute von 0.6) ein, der die Bildung von Singulett-Sauerstoff effektiv sensibilisiert. Der FCC *epi*-**23-Me** ist also ein bemerkenswert wirksamer Sensibilisator für Singulett-Sauerstoff (¹O₂). FCCs treten in seneszenten Blättern aber nur flüchtig auf, außer wenn sie als persistente, hypermodifizierte FCCs (*hm*FCCs) „verkappt“ sind.^[28a] Derartige photochemische Eigenschaften von *hm*FCCs sind beachtenswert, da sie vielleicht eine physiologische Rolle in (seneszentem oder reifendem) Pflanzengewebe spielen (siehe Abschnitt 9).

Durch Desaturierung an der C15-Position werden farblose NCCs in gelbe YCCs überführt (z. B. **11** in **46Z**). Ähnlich ihrem entfernten Verwandten BR^[90] absorbieren YCCs blaues Licht (Absorptionsmaxima bei $\lambda \approx 430$ –440 nm) und

zeigen nur schwache Emission mit einem Maximum bei $\lambda \approx 500$ nm (Abbildung 27), was auf rasche Desaktivierung des angeregten Zustandes schließen lässt.^[94b] Wie für BR wird auch für den YCC **46Z** eine Licht-induzierte *E/Z*-Isomerisierung zu **46E** beobachtet.^[89] Oxidation und Desaturierung von **46Z** an der C10-Position ergeben den PiCC **47**, der Licht bei $\lambda \approx 520$ nm absorbiert und sehr schwach emittiert (mit einem Maximum bei $\lambda \approx 620$ nm; Abbildung 27).^[94]

8.2. Phyllobiline als Antioxidantien

Wie es für Bilane und reduzierte Hydroporphinoide typisch ist,^[96] werden auch die amphiphilen NCCs leicht oxidiert.^[89] Dank dieser Eigenschaft sind sie bemerkenswerte Antioxidantien^[59] und inhibieren die klassische Autoxidationsreaktion von Linolsäure sehr effektiv.^[97] In solchen Analysen zeigte der NCC *epi*-**11** eine lediglich fünfmal geringere Kapazität als BR,^[59] das als effektives und physiologisch wichtiges Antioxidans bekannt ist.^[97] Analoge Versuche am zugehörigen YCC **46Z** bezüglich des Autoxidationsprozesses von Linolsäure zeigten, dass dieser YCC etwa 3–5-mal effektiver ist als BR, was wegen der ähnlichen Eigenschaften der Chromophore der beiden Substanzen nicht unerwartet ist.^[98] Erfahrungen zu den antioxidativen Effekten anderer Phyllobiline (etwa FCCs, DNCCs und DYCCs) wären ebenfalls interessant. Dieser Aspekt der Eigenschaften von Phyllobilinen bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

8.3. Phyllobiline als Liganden in Übergangsmetallkomplexen

Ganz im Gegensatz zu den cyclischen Tetrapyrrolen, welche die Natur mit den wichtigen Metalloporphyrinen als Kofaktoren versorgen,^[71,99] wird die Fähigkeit, Metallionen zu binden, eher als eine untypische Eigenschaft der linearen Tetrapyrrole betrachtet.^[3,100] Die vom Häm abstammenden Biline und die entsprechenden Phyllobiline können jedoch als mehrzählige Liganden für (Übergangs-)Metallionen fungieren.^[94b,100] Vier Stickstoffzentren sind hierfür in linearen Tetrapyrrolen für die Koordination an Metallionen verfügbar.^[94b] Allerdings können N-Atome von isolierten Pyrrolringen kaum mit polaren Lösungsmittelmolekülen um die Koordination an Metallionen konkurrieren. Deshalb fehlt bei den photoinaktiven nichtfluoreszierenden NCCs und DNCCs die Kapazität für die Bildung von üblichen Metallkomplexen.^[94] Im Unterschied dazu stellt das Vorhandensein von Imin- und Enaminstrukturen Zentren für die Koordination von Übergangsmetallionen zur Verfügung. Bis jetzt hat der Mangel an entsprechenden Phyllobilinen die Studien zu deren Koordinationsverhalten auf den PiCC **47** sowie teilweise den YCC **46Z** und dessen Methylester **46Z-Me** eingeschränkt.^[94] Der PiCC **47** bindet die Übergangsmetallionen Zn^{II}, Cd^{II}, Ni^{II}, Cu^{II} und Pd^{II} mit hoher Affinität in 1:1-Komplexen mit Geschwindigkeitskonstanten von etwa 100 M⁻¹ s⁻¹ (Abbildung 28). Das Binden dieser Übergangsmetallionen kann leicht durch eine deutliche Rotverschiebung der Absorptionsbanden im sichtbaren Bereich verfolgt werden, z. B. um etwa $\Delta\lambda = 100$ nm auf $\lambda \approx 620$ nm im Fall des

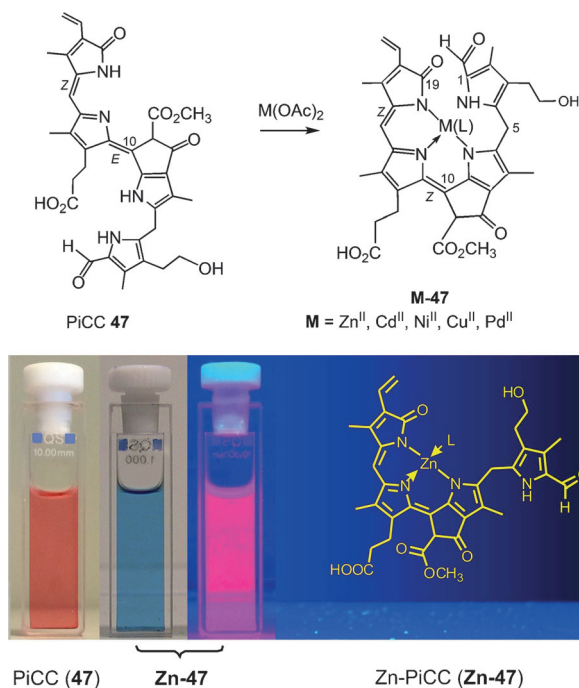


Abbildung 28. Komplexierung von Übergangsmetallionen mit PiCC **47** strukturiert den Liganden in seine Z/Z-Konfiguration um und führt zu blauen Metallkomplexen. **Zn-47** und **Cd-47** sind Komplexe mit Metallionen mit geschlossenen Schalen und zeigen eine starke rote Lumineszenz.^[94]

Komplexes **Zn-47**. Dreizähniges Binden der Zn^{II} -Ionen durch **47** wurde aus NMR-Daten in Lösung abgeleitet, ebenso wie eine (in diesem Fall) sehr hohe Affinität für Zn^{II} unter 1:1-Stöchiometrie bei Konzentrationen bis zu 1 nM.^[94a] Das Binden bei derart niedrigen Konzentrationen konnte hierbei durch Fluoreszenzemissionsanalysen quantifiziert werden. Im Unterschied zum sehr schwach emittierenden Fluorophor von **47** zeigt der monomere, diamagnetische Komplex **Zn-47** eine starke Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 650$ nm (Abbildungen 27 und 28).^[94a] Die Koordination an Übergangsmetalle restrukturiert das E,Z-Phyllobiladien-b,c **47** in seine Z,Z-Konfiguration und somit zu einem effektiven dreizähnigen Liganden um (Abbildung 26).^[94] In **Zn-47** zwingt das koordinierte Metallion den Chromophorteil des Liganden in diese Konfiguration und festigt diese, wodurch die Desaktivierung über Licht-induzierte E/Z-Isomerisierung blockiert wird, die für den freien PiCC **47** vermutlich noch möglich ist.^[94a]

Der YCC-Methylester **46Z-Me** ist ein wirksamer zweizähniger Ligand für Zn^{II} -Ionen. Ein ^1H -NMR-NOE-Experiment mit dem diamagnetischen Zn-Komplex von **46Z-Me** zeigte Abstände zwischen den Liganden, die stark auf eine 1:2-Anordnung in einem symmetrischen $\text{Zn}(\text{46Z-Me})_2$ hinweisen (Abbildung 29).^[94b] Ähnlich wie beim PiCC **47** verschob das Binden von Zn^{II} -Ionen mit ihren geschlossenen Schalen an **46Z-Me** in DMSO das Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich von $\lambda = 430$ auf 484 nm. Die Lumineszenz von **46Z-Me** (mit einem schwachen Emissionsmaximum bei $\lambda = 495$ nm) wurde ebenfalls rotverschoben und zeigte im Komplex $\text{Zn}(\text{46Z-Me})_2$ ein etwa 100-mal intensiveres Maximum bei $\lambda = 538$ nm.^[94b] Die kaum erforschte Eigenschaft

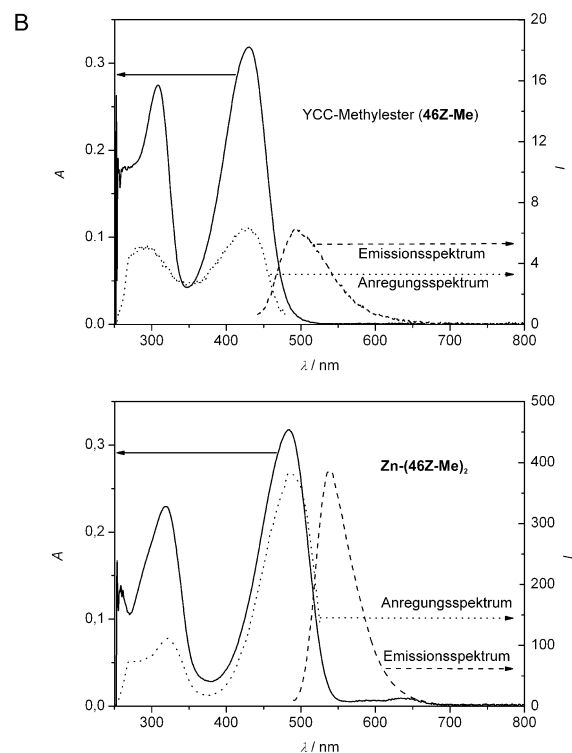
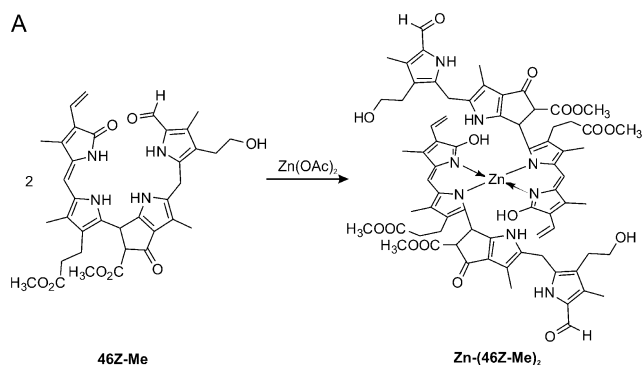


Abbildung 29. Durch Binden von Zn^{II} -Ionen an den schwach lumineszierenden YCC-Methylester **46Z-Me** erhält man den stark fluoreszierenden 2:1-Komplex $\text{Zn}(\text{46Z-Me})_2$.^[94b,c]

einiger Phyllobiline, etwa des PiCC **47** und des YCC **46Z**, Übergangsmetallionen zu koordinieren, spricht für ein erhebliches Potential, Metallionen selbst noch bei niedrigen Konzentrationen zu binden und auch als effiziente Indikatoren von Metallionen zu fungieren.^[94b]

9. Die Rolle des Chlorophyllabbaus in höheren Pflanzen – Zeit für einen Paradigmenwechsel

Nachdem wir bis zu einem gewissen Grad entschlüsseln konnten, wie Chl in höheren Pflanzen abgebaut wird, sollte es uns nun auch leichter möglich sein, die schwierige Frage nach dem Warum des Chl-Abbaus zu thematisieren.^[9a,c] Betrachtet man die riesigen Mengen an Chl, die jedes Jahr auf unserem Planeten abgebaut werden, kann das Phänomen des Chl-

Abbaus nicht nur als sichtbares Schauspiel der Natur und als einzigartige Tourismus-Gratisattraktion in einigen Gebieten unserer Erde verstanden werden.^[101] Der Chl-Abbau sollte im Gegenteil eher unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Pflanzen selbst daraus ihren Nutzen ziehen können müssen.^[101b] Außerdem profitieren (indirekt) möglicherweise auch andere Organismen davon, die mit Pflanzen interagieren, z. B. Tiere und Menschen, die sich von Pflanzen ernähren. Allein schon aufgrund der unglaublichen Mengen an Phyllobilinen, die erzeugt werden, wenn das Chl verschwindet,^[10] verdient der Chl-Abbau deshalb weitergehende Beachtung nicht nur vom Standpunkt der fundamentalen und angewandten wissenschaftlichen Forschung, sondern auch aus agrobiologischer und ökologischer Sicht.^[9–11]

9.1. Chl-Entgiftung und Destabilisierung von Proteinen als klassische Rollen des Chl-Abbaus

In einer historischen Interpretation wurde der Chl-Abbau als Möglichkeit zur direkten Rückgewinnung der vier Stickstoffatome des Chl aus den Blättern gesehen.^[2] Aufgrund der Kenntnis des inzwischen etablierten Aufbaus der Phyllobiline als lineare Tetrapyrrole kann dies jedoch nicht länger angenommen werden.^[1a,8a,9c] Eine direkte Folge des Chl-Abbaus in seneszenten Blättern ist jedoch die Zerstörung des weitverbreiteten und in hohem Maße photoaktiven grünen Pflanzenpigmentes, wodurch die Pflanze sich eines zellulären Bestandteils mit großem phototoxischem Potential entledigt.^[9a] Zusätzlich macht das Entfernen des Chl aus seinen Protein-Bindungspartnern diese leichter angreifbar für die Proteolyse.^[102] Diese Konsequenz des Chl-Abbaus wird durch Untersuchungen an „stay-green“-Mutanten (die ihr Chl zurückhalten) bestätigt, in denen die Verlagerung des proteinogenen Stickstoffs und seine Rückgewinnung stark verringert waren. Mit diesem Wissen kann die ambivalente Rolle des Chl-Abbaus nicht überschätzt werden.^[2,5,101b] Zum einen werden dadurch klarerweise die Photosyntheseleistung eliminiert und so die metabolische Aktivität reduziert; andererseits werden dabei wichtige Nährstoffkomponenten, etwa reduzierter Stickstoff, verfügbar. Dies trägt zur Anreicherung von Proteinen in Getreide und Gemüse sowie zur Bildung von nahrhaften Früchten bei, was alles aus ökonomischer Sicht sehr wichtig ist.^[11c,103]

9.2. Zu physiologischen Rollen von Chlorophyllkataboliten in Pflanzen

Anstatt in seneszenten Blättern spurlos zu verschwinden, liefert das Chl (wie wir heute wissen) die weitverbreiteten Phyllobiline. Letztere sollen nicht mehr als (nur wertlose) Produkte einer Chl-Entgiftung betrachtet werden,^[1a, 9a] sondern ihre möglichen physiologischen Rollen in Pflanzen verdienen unsere Aufmerksamkeit. Erstaunlicherweise sind allerdings bisher keine klaren biologischen Funktionen der Bilin-ähnlichen Chl-Kataboliten bekannt. Dies liegt vermutlich zum Teil am Fehlen von zuverlässigen Proben typischer Chl-Kataboliten wie auch an Schwierigkeiten bei deren

praktischer Handhabung. Typischerweise sind Phyllobiline komplexe und recht instabile Substanzen. In dieser Hinsicht repräsentieren aber die „persistenten“ *hmFCCs*^[28a] einen beachtenswerten Spezialfall: In *hmFCCs* ist die inhärente Tendenz der FCCs, zu NCCs isomerisieren, blockiert (*hmFCCs* sind biologisch „verkappte“ FCCs), wobei der dabei betriebene biochemische Aufwand der (Bananen-)Pflanze ohne eine weitere biologische Funktion nutzlos und nicht gerechtfertigt erschiene.^[85]

Für einige Phyllobiline, etwa die nichtfluoreszierenden Typ-I-Phyllobiline (NCCs), wurden effiziente antioxidative Wirkungen nachgewiesen.^[59] YCCs sind ebenfalls exzellente Antioxidantien.^[98] Derartige Eigenschaften der amphiphilen Phyllobiline sind von beträchtlichem Interesse.^[59] Auch DNCCs, die strukturell verwandten Typ-II-Analoga der NCCs, zeigen wahrscheinlich grundlegend ähnliche Wirkungen. Antioxidantien finden sich sehr häufig in Pflanzen, speziell in reifen Früchten,^[81a] und könnten entscheidend für die Verlängerung der Lebensfähigkeit von Zellen während Seneszenz^[24] und Reifung^[103] sein.

Mit Ausnahme von NCCs und DNCCs sind die meisten Phyllobiline außergewöhnliche, photoaktive Substanzen. Phyllobiline könnten deshalb auch als zelluläre Metaboliten in Betracht gezogen werden, die möglicherweise als Lichtfilter wirken. Phyllochromobile (YCCs, PiCCs usw.) und deren Metallkomplexe könnten hierbei besondere Beiträge leisten. Die Farben der Phyllochromobile tragen zur Pigmentierung von Blättern^[7] und Früchten^[51] bei. Die Farben von Blättern^[104] und Früchten^[105] werden als wichtige Signale an eine Vielzahl von Tieren angesehen. Die Fluoreszenz von FCCs könnte außerdem eine spezielle Rolle als optischer Aufheller in Bananen und Bananenblättern^[104a,106] spielen oder auch als direktes Fluoreszenzsignal an Tiere fungieren.^[107]

FCCs sind äußerst effiziente Sensibilisatoren für die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$): Der FCC *epi-23-Me* weist für die Licht-induzierte Bildung von $^1\text{O}_2$ eine Quantenausbeute von 0.6 auf.^[95] Die photochemische Fähigkeit von FCCs zur Bildung von $^1\text{O}_2$ könnte sicherlich eine physiologische Rolle in (seneszenten oder reifenden) Pflanzen-geweben spielen. $^1\text{O}_2$ kann etwa bei der Abwehr von Pathogenen helfen oder aber als kurzlebiges Signalmolekül mit Wirkung auf Rezeptoren im Zellkern fungieren.^[108] Für wichtige von $^1\text{O}_2$ übermittelte Signale werden bislang die Chloroplasten als die eigentliche zelluläre Quelle angenommen.^[109] Durch Licht angeregte FCCs könnten als alternative Produktionsstätten für $^1\text{O}_2$ im Cytosol wirken. Im Hinblick auf die wichtigen Rollen des vorübergehend auftretenden $^1\text{O}_2$ ^[110] in Pflanzen^[108] könnte die Anhäufung der persistenten *hmFCCs* in reifenden Bananen^[28a,85] und in den Blättern einiger immergrüner Pflanzen^[28b,74,76] auf eine physiologisch wichtige Rolle der FCCs als $^1\text{O}_2$ -Sensibilisator hindeuten.^[95] Den blau fluoreszierenden Ringen um Seneszenz-assoziierte dunkle Flecken auf den Schalen reifer Bananen könnte, dank lokaler Anhäufung von *hmFCCs*, eine Funktion beim Kampf gegen Pathogene und damit auch bei der Verlängerung der Lebensfähigkeit des Bananenschalengewebes zukommen.^[85]

Phyllobiline zeigen umfassende Fähigkeiten, in Übergangsmetallkomplexen als Liganden zu fungieren. Der rosa-

rote Chl-Katabolit (PiCC) **47** bindet einige Übergangsmetallionen sogar bei nM Konzentrationen.^[94a] Diese chemische Eigenschaft, die ähnlich auch anderen Phyllochromobilinen zugeschrieben wird,^[94b,c] könnte weiteren physiologischen Rollen dienen, speziell in Schwermetall akkumulierenden Pflanzen.^[111] Letztere konzentrieren Zn-, Cd-, Hg- und Ni-Ionen in ihren Vakuolen auf, genau dort, wo auch natürliche Phyllobiline in ihren späteren Stadien zu finden sind.^[13c] Die Bildung von Metallkomplexen ist also wahrscheinlich. Außerdem wurde gezeigt, dass dreizählige drei-Pyrrol-haltige Übergangsmetallkomplexe Eigenschaften aufweisen, die medikamentös genutzt werden könnten.^[112] Aus diesem Grund könnte die Eigenschaft von PiCCs, als dreizähliger Ligand Metallionen zu binden, auch aus physiologischer und pharmakologischer Sicht von spezieller Bedeutung sein.^[94b]

10. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten fünfundzwanzig Jahren konnten durch die Identifikation von Chl-Kataboliten (oder Phyllobilinen) und durch die Erforschung ihrer chemischen Eigenschaften grundlegende, Struktur-basierte Antworten auf die Frage gefunden werden, wie Chl in einigen höheren Pflanzen abgebaut wird. Die meisten Untersuchungen haben sich hierbei mit dem Chl-Abbau in Angiospermen beschäftigt,^[9c] in denen der verbreitete PaO/Phyllobilin-Weg des natürlichen Chl-Abbaus gefunden wurde. Die Monooxygenase PaO bildet dabei, als Schlüsselenzym in den Chloroplasten, den schwer nachweisbaren RCC, der als das ursprüngliche „Typ-I-Phyllobilin“ bezeichnet wird. Der schnell ablaufende weitere Abbau ergibt farblose, blau fluoreszierende lineare Tetrapyrrole (FCCs). Hierbei wird Spezies-abhängig einer der beiden epimeren primären FCCs (**6/epi-6**) gebildet. Auf der Stufe der FCCs spaltet sich der PaO/Phyllobilin-Weg in (mindestens) zwei große sowie mehrere kleine Äste auf (Abbildung 30). Dieser Teil des Katabolismus wird vorrangig von Cytosol-ständigen Enzymen absolviert. In einigen Pflanzen wird dabei über die oxidative Deformylierung von FCCs ein wichtiger, zweiter Pfad beschritten, aus dem die 1,19-Dioxobilin-artigen (oder Typ-II-)Phyllobiline resultieren. Der Chl-Abbau scheint mit der Umwandlung von fluoreszierenden Phyllobilinen in der sauren Vakuole zu farblosen und praktisch photoinaktiven zu enden, nichtfluoreszierenden Analoga, die sich meist in seneszenten Blättern anreichern. In einigen Pflanzen werden die üblicherweise kurzlebigen FCCs allerdings durch komplexe Esterfunktionen biosynthetisch zu persistenten hypermodifizierten FCCs (*hmFCCs*) „verknüpft“. Die Anreicherung der *hmFCCs* in Bananen bewirkt eine leuchtend blaue Fluoreszenz, ein rätselhaftes und beeindruckendes Phänomen, das etwa als Signal an Früchte fressende Tiere dienen könnte.

Mit dem Wissen um den Abbau von Chl in einigen höheren Pflanzen zu farblosen Kataboliten, die sich zwischenzeitlich anhäufen, stellt sich logischerweise die Frage: Was geschieht anschließend mit diesen Phyllobilinen? Werden sie in kontrollierten metabolischen Prozessen weiter abgebaut? Die vor kurzem entdeckte endogene Bildung von Phyllochromobilinen könnte dabei eine besondere Rolle spielen

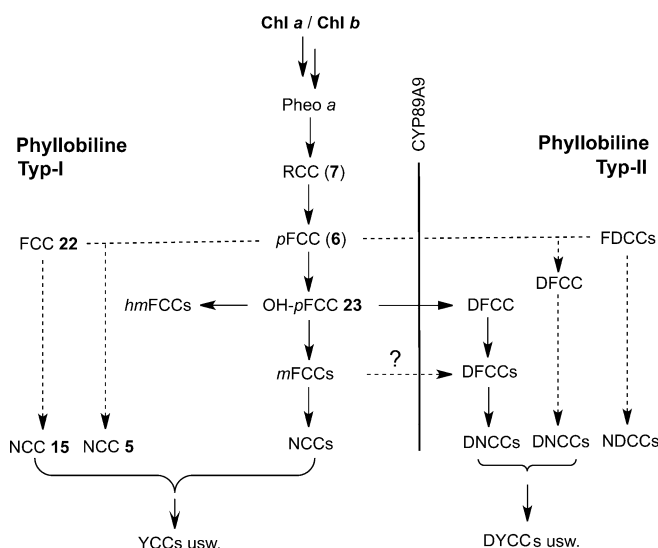


Abbildung 30. Kurzer Überblick über den PaO/Phyllobilin-Weg in einigen höheren Pflanzen.^[10,11] Chl wird in einem linearen Ablauf von Phäophorbid *a* (Pheo *a*) zu den primären FCCs (*pFCCs*) abgebaut. Aus Verzweigungen auf der Stufe der FCCs ergeben sich einige parallele spätere Linien von Typ-I- und Typ-II-Phyllobilinen. Farblose Phyllobiline (NCCs und DNCCs) reichern sich in seneszenten und reifenden Pflanzengewebe an. Die farblosen, nichtfluoreszierenden NCCs und DNCCs können weiter zu gelben (und diese anschließend zu rosaroten) Phyllochromobilinen oxidiert werden.

und ein möglicher Schlüssel zur Antwort auf diese Frage sein. In unseren Laboratorien wird derzeit nach weiteren Hinweisen hierauf gesucht.

Der Chl-Abbau wurde bisher nur an einem kleinen Teil des riesigen Pflanzenreiches untersucht. Die Analysen von natürlich seneszenten Blättern eng verwandter Arten lassen dabei teilweise auf ein sehr ähnliches Muster an farblosen Phyllobilinen schließen, etwa bei verschiedenen Laubwerfenden, zur Familie der *Rosaceae* gehörenden Obstbäumen.^[59,68] Hingegen führt der PaO/Phyllobilin-Weg zu andersgearteten Phyllobilinen in verschiedenen anderen untersuchten Pflanzen, wie in *A. thaliana* und verwandten *Brassicaceae* oder auch in den tropischen Monokotyledonen *Musa acuminata* und *Spathiphyllum wallisii*.

Bei unseren bisherigen Untersuchungen ging es primär um die Entdeckung von grundlegend relevanten Phyllobilintypen in höheren Pflanzen, nicht aber um die Erforschung des Chl-Abbaus auf biologisch-systematische Art. Natürlich wäre auch das Wissen um den Chl-Abbau in höheren Pflanzen außerhalb der Angiospermen von großem Interesse. Im spezifischen Fall der Grünalge *Auxenochlorella protothecoides* ähneln die frühen Stadien des Chl-Abbaus erstaunlich denen des PaO/Phyllobilin-Weges in höheren Pflanzen.^[11a]

Die meisten unserer Studien über Bilin-artige Chl-Kataboliten beruhten auf der Analyse von pflanzlichen Extrakten. Zusätzlich zu derartigen aufschlussreichen In-vitro-Studien könnte auch die Beobachtung von Chl-Kataboliten in vivo weitere Einblicke in die genaue Lokalisierung von Prozessen liefern, die relevant für den Chl-Abbau im Gewebe von Blättern und Früchten sind. Exploratorische methodische Studien mittels Massenspektrometrie^[113] und Fluoreszenz-

spektroskopie^[85] haben inzwischen den Weg für erste detaillierte In-vivo-Analysen des Chl-Abbaus anhand von spezifischen Chl-Kataboliten geebnet.

Entfernt verwandte neuere Studien beschäftigten sich mit der Frage des Chl-Abbaus in pflanzenfressenden Protisten und Insekten. Im Darm und Verdauungstrakt von herbivoren Raupen wurde Pheo *a* als dominantes Überbleibsel des aufgenommenen Chl detektiert.^[114] Im aquatischen Ökosystem bauen (und entgiften) pflanzenfressende Protisten mit der Nahrung aufgenommenes Chl zu einem außergewöhnlichen Chl-Abkömmling ab, dem nichtfluoreszierenden Cyclophäophorbid-*a*-Enol.^[115] Sicherlich lässt sich hier zwanglos die nicht weniger faszinierende und wichtige Frage anschließen: Was passiert mit Chl im Metabolismus von höheren Tieren und in dem des Menschen? Ihre umfassende Beantwortung steht noch aus.^[9d,10]

Die Entdeckung von hypermodifizierten FCCs^[28a] sowie die unerwartet weite Verbreitung von Typ-II-Phyllobilinen, wie den 1,19-Dioxophyllobilinen (DNCCs),^[57,58] ist besonders faszinierend. Die 1,19-Dioxobiline und die vom Häm abstammenden (Hämo-)Biline zeigen beachtliche Ähnlichkeiten; sie unterscheiden sich (vor allem) durch den vom Chl stammenden, zusätzlichen Ring E der Typ-II-Phyllobiline. Wesentliche chemische Eigenschaften der beiden Linien von Bilin-artigen Naturstoffen könnten sehr ähnlich sein. Phyllobiline sind deshalb Anwärter auf eine Vielzahl von wichtigen biologischen Rollen, die bis jetzt eine Domäne der (Hämo-)Biline darstellen.^[116] Physiologische Rollen von Phyllobilinen etwa als externe Signale^[28a,117] in intra- oder interzellulärer Kommunikation^[108b,118] oder als Pflanzenabwehrstoffe können nicht ausgeschlossen werden.^[119] In dieser Hinsicht könnten Phylochromobile von speziellem experimentellem Interesse sein. Es ist beachtlich, dass biologische Rollen von Phyllobilinen noch immer darauf warten, entdeckt zu werden.

Der Chl-Abbau ist das auffallende, sichtbare Zeichen der Seneszenz von Blättern und der Reifung von einigen Früchten, wobei Seneszenz üblicherweise mit Apoptose verbunden wird, Reifung hingegen nicht. Seneszenz kann dabei von endogenen Entwicklungsprozessen^[120] oder durch (Stress-)Faktoren aus der Umgebung (etwa niedrige Temperaturen sowie Mangel an Licht,^[121] Wasser oder bestimmten Nährstoffen) verursacht werden.^[122] Die jahreszeitliche Kombination einiger dieser Faktoren könnte der Grund für die Synchronisation des Chl-Abbaus in herbstlichen Blättern sein.^[101b,123] Die Seneszenz und das Ausbleichen von Blättern können aber auch durch (oben nicht genannte) externe Faktoren lokal induziert werden, etwa durch mechanische oder chemische Schäden oder auch durch die Infektion mit Pathogenen.^[124] Abhängig von der Art der Seneszenzinduktion können Pflanzen auf unterschiedliche Weise reagieren.^[125] Die Reifung sollte dabei als grundsätzlich anderer Prozess gesehen werden, mit dem häufig der Abbau von Chl einhergeht.^[11c] Aus diesem Grund ist es interessant, die natürlichen Phyllobiline strukturell und mengenmäßig zu erfassen, die als Resultat des Chl-Abbaus bei unterschiedlichen Mechanismen der Seneszenzinduktion gebildet werden.

Wie in den vergangenen Jahren gezeigt, tritt in seneszenten Blättern, in Gemüse und in reifenden Früchten eine

Vielfalt an Produkten des Chl-Abbaus auf. Der metabolische Wert von Phyllobilinen als Nahrungskomponenten für Blatt- und Früchte-fressende Lebewesen, von Insekten, Schnecken und Vögeln bis zu Säugetieren und Menschen, wurde bisher kaum thematisiert.^[6b,59,61,126] Man ist jedenfalls versucht, das Vorkommen von NCCs in Früchten als für unsere Gesundheit förderlich zu sehen, heißt es doch schon in einem alten Sprichwort: „An apple a day keeps the doctor away“.^[59]

Zweifellos kennen wir bis jetzt nur die Spitze des Eisberges des biologischen Phänomens des Chl-Abbaus in höheren Pflanzen.^[6c,9c,10,11] Die Suche nach den immer noch unbekannten physiologischen Rollen der Phyllobiline bleibt ein wichtiges Thema, ebenso wie die Frage der Regulierung des Chl-Abbaus bei natürlicher und künstlich eingeleiteter Seneszenz und Reifung sowie der Rollen und biologischen Wechselwirkungen von Chl-Kataboliten bei Infektionen der Pflanzen mit Pathogenen. Aber auch die Auswirkungen der farblosen Phyllobiline (die häufig in Früchten und Gemüse zu finden sind) auf unsere Gesundheit und unser Wohlbefinden sollten durch pharmakologische Studien noch besser abgedeckt werden. Ohne Zweifel hinterlassen die zeitweise reichlich vorhandenen Überreste des natürlichen Chl-Abbaus wichtige Spuren und haben grundlegende Auswirkungen auf die Biosphäre unserer Erde. Ähnlich den vom Häm abstammenden Bilinen (den Hämobilinen) werden die Phyllobiline auch weiterhin faszinierend bleiben, und die „Sage von den beiden Bilinen“ wird wohl noch viele weitere Jahre brauchen, um fertig erzählt zu werden.

Abkürzungen

Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
Chlide <i>a</i>	Chlorophyllid <i>a</i>
DCC	Dioxobilin-artiger Chl-Katabolit
DFCC	Dioxobilin-artiger FCC
DNCC	Dioxobilin-artiger NCC
DYCC	Dioxobilin-artiger YCC
FCC	fluoreszierender Chl-Katabolit vom Typ I
FDCC	fluoreszierender DCC
NCC	nichtfluoreszierender Chl-Katabolit vom Typ I
NDCC	nichtfluoreszierender DCC
Phein <i>a</i>	Phäophytin <i>a</i>
Pheo <i>a</i>	Phäophorbid <i>a</i>
PiCC	rosaroter Chl-Katabolit vom Typ I
RCC	roter Chl-Katabolit
YCC	gelber Chl-Katabolit vom Typ I

Danksagung

Ich möchte Thomas Müller und meinen Mitarbeitern in Innsbruck, Chengjie Li, Matthias Roiser, Mathias Scherl, Gerhard Scherzer, Iris Süssenbacher und Clemens Vergeiner, sowie den früheren Mitarbeitern für ihre hervorragenden Beiträge zu dem vorliegenden Thema danken. Ich danke Iris Süssenbacher und Clemens Vergeiner für die Übersetzung ins Deutsche sowie Clemens und Thomas für einen graphischen

Beitrag. Ich bin auch Stefan Hörtensteiner und Michael Oberhuber und ihren Gruppen an der Universität Zürich bzw. am Versuchszentrum Laimburg (Italien) sehr dankbar für fruchtbare Zusammenarbeiten. Unsere Arbeit wurde vom Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF-Projekte: P 19596, L-472 und I-563) und von einem interregionalen österreichisch/italienischen EU-Projekt (ERDF Interreg-IV Projekt ID 5345) finanziell unterstützt.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4882–4907
Angew. Chem. **2016**, 128, 4964–4990

- [1] a) B. Kräutler, P. Matile, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 35–43; b) A. Morel in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry Biophysics, Functions and Applications* (Hrsg.: B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer), *Adv. Photosynth. Res.*, Vol. 25, Springer, Dordrecht, **2006**, S. 521–534.
- [2] G. A. F. Hendry, J. D. Houghton, S. B. Brown, *New Phytol.* **1987**, 107, 255–302.
- [3] H. Falk, *Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, Wien, **1989**.
- [4] a) S. B. Brown, K. M. Smith, G. M. F. Bisset, R. F. Troxler, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 8063–8068; b) S. B. Brown, J. D. Houghton, G. A. F. Hendry in *Chlorophylls* (Hrsg.: H. Scheer), CRC, Boca Raton, FL, **1991**, S. 465–489.
- [5] P. Matile, *Chimia* **1987**, 41, 376–381.
- [6] a) B. Kräutler, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 1114–1120; b) S. Moser, T. Müller, M. Oberhuber, B. Kräutler, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 21–31.
- [7] S. Moser, M. Ulrich, T. Müller, B. Kräutler, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 1577–1581.
- [8] 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, B. Jaun, W. Amrein, K. Bortlik, M. Schellenberg, P. Matile, *Plant Physiol. Biochem.* **1992**, 30, 333–346.
- [9] a) P. Matile, S. Hörtensteiner, H. Thomas, B. Kräutler, *Plant Physiol.* **1996**, 112, 1403–1409; b) B. Kräutler, S. Hörtensteiner in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry Biophysics, Functions and Applications* (Hrsg.: B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer), *Adv. Photosynth. Res.*, Vol. 25, Springer, Dordrecht, **2006**, S. 237–260; c) S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **2011**, 1807, 977–988; d) B. Kräutler, S. Hörtensteiner in *Handbook of Porphyrin Science*, Vol. 28 (Hrsg.: G. C. Ferreira, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific Publishing, Singapore, **2013**, S. 117–185.
- [10] B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6227–6238.
- [11] a) S. Hörtensteiner, *Plant Mol. Biol.* **2013**, 82, 505–517; b) R. Tanaka, A. Tanaka, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **2011**, 1807, 968–976; c) C. S. Barry, *Plant Sci.* **2009**, 176, 325–333.
- [12] a) H. Nakamura, B. Musicki, Y. Kishi, O. Shimomura, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2683–2685; b) H. Nakamura, Y. Kishi, O. Shimomura, D. Morse, J. W. Hastings, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7607–7611.
- [13] a) P. Matile, S. Ginsburg, M. Schellenberg, H. Thomas, *J. Plant Physiol.* **1987**, 129, 219–228; b) H. Thomas, K. Bortlik, D. Rentsch, M. Schellenberg, P. Matile, *New Phytol.* **1989**, 111, 3–8; c) P. Matile, S. Ginsburg, M. Schellenberg, H. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 9529–9532.
- [14] K. Bortlik, C. Peisker, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1990**, 136, 161–165.
- [15] C. Peisker, H. Thomas, F. Keller, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1990**, 136, 544–549.
- [16] a) H. M. Schiebel, H. R. Schulten, *Mass Spectrom. Rev.* **1986**, 5, 249–311; b) T. Matsuo, R. M. Caprioli, M. L. Gross, Y. Seyama, *Biological Mass Spectrometry Present and Future*, Wiley, New York, **1994**; c) T. Müller, S. Vergeiner, B. Kräutler, *Int. J. Mass Spectrom.* **2014**, 365–366, 48–55.
- [17] a) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One & Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, **1987**; b) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 490–536; *Angew. Chem.* **1988**, 100, 507–554.
- [18] a) W. Mühlecker, B. Kräutler, S. Ginsburg, P. Matile, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2976–2980. b) NCCs (und anderen Kataboliten) wurden zweckmäßige, provisorische Namen bezogen auf ihre pflanzliche Herkunft gegeben, z.B. Hv-NCC aus seneszenten Gerstenblättern (*Hordeum vulgare*) oder Bn-NCCs aus gelben Rapsblättern (*Brassica napus*).^[19,22] NCCs wurden basierend auf ihrer relativen Polarität, die durch Umkehrphasen-HPLC-Experimente bestimmt wurde, indexiert (z.B. Bn-NCC-1, Bn-NCC-2). Da diese Benennungen teilweise unzureichend waren, wurden Retentionszeiten (in Minuten) als neue Indizes eingeführt, die aus standardisierten HPLC-Analysen erhalten wurden, z.B. Sw-NCC-58 aus *Sp. wallisii* mit der Standard-Retentionszeit von 58 min.^[10,74]
- [19] Siehe Abschnitt 1.2 für die nun empfohlene semisystematische Nomenklatur der Phyllobiline auf der Basis der Struktur von Phyllobilan (**1**).^[10]
- [20] 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) NCCs und andere offenkettige Chl-Kataboliten wurden früher auf eine andere halb-systematische Weise als Derivate von Phytoporphyrin benannt:^[21] NCC **1** war ein 3¹,3²,8²-Trihydroxy-1,4,5,10,15,20-(22H,24H)-octahydro-13²-[methoxycarbonyl]-4,5-dioxo-4,5-secophytoporphyrinat.^[8a]
- [21] a) P. R. Ortiz de Montellano, K. Auclair, in *The Porphyrin Handbook*, Vol. 12 (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, Amsterdam, **2003**, S. 183–210; b) A. Wilks in *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death* (Hrsg.: M. J. Warren, A. G. Smith), Landes Bioscience, Austin, Texas, **2008**, S. 101–115.
- [22] H. Scheer in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry Biophysics, Functions and Applications* (Hrsg.: B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer), *Adv. Photosynth. Res.*, Vol. 25, Springer, Dordrecht, **2006**, S. 1–26.
- [23] W. Mühlecker, B. Kräutler, *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, 34, 61–75.
- [24] P. Matile in *Advances in Botanical Research*, Vol. 25 (Hrsg.: J. A. Callow), Academic Press, New York, **1997**, S. 87–112.
- [25] W. Mühlecker, K. H. Ongania, B. Kräutler, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 401–404; *Angew. Chem.* **1997**, 109, 401–404.
- [26] a) I. Süssenbacher, B. Christ, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 87–92; b) I. Süssenbacher, C. Kreutz, B. Christ, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 11664–11670; c) I. Süssenbacher, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 13777–13781; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 13981–13985.
- [27] B. Christ, I. Süssenbacher, S. Moser, N. Bichsel, A. Egert, T. Müller, B. Kräutler, S. Hörtensteiner, *Plant Cell* **2013**, 25, 1868–1880.
- [28] a) S. Moser, T. Müller, M.-O. Ebert, S. Jockusch, N. J. Turro, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8954–8957; *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9087–9091; b) S. Banala, S. Moser, T. Müller, C. Kreutz, A. Holzinger, C. Lütz, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5174–5177; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5300–5304.
- [29] S. Hörtensteiner, F. Vicentini, P. Matile, *New Phytol.* **1995**, 129, 237–246.

- [30] P. Folly, N. Engel, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 21811–21816.
- [31] A. Tanaka, R. Tanaka, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, 9, 248–255.
- [32] a) V. Scheumann, S. Schoch, W. Rüdiger, *Planta* **1999**, 209, 364–370; b) H. Ito, T. Ohtsuka, A. Tanaka, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1475–1479.
- [33] W. Rüdiger, B. Grimm in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry Biophysics, Functions and Applications* (Hrsg.: B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger, H. Scheer), *Adv. Photosynth. Res.*, Vol. 25, Springer, Dordrecht, **2006**, S. 133–146.
- [34] T. Azoulay Shemer, S. Harpaz-Saad, E. Belausov, N. Lovat, O. Krokhin, V. Spicer, K. G. Standing, E. E. Goldschmidt, Y. Eyal, *Plant Physiol.* **2008**, 148, 108–118.
- [35] Y. Shioi, N. Tomita, T. Tsuchiya, K. Takamiya, *Plant Physiol. Biochem.* **1996**, 34, 41–47.
- [36] a) D. Amir-Shapira, E. E. Goldschmidt, A. Altman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 1901–1905; b) L. Guyer, S. S. Hofstetter, B. Christ, B. S. Lira, M. Rossi, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **2014**, 166, 44–56.
- [37] S. Schelbert, S. Aubry, B. Burla, B. Agne, F. Kessler, K. Krupinska, S. Hörtensteiner, *Plant Cell* **2009**, 21, 767–785.
- [38] P. Matile, B. Kräutler, *Chem. Unserer Zeit* **1995**, 29, 298–306.
- [39] a) T. Düggelein, K. Bortlik, H. Gut, P. Matile, H. Thomas, *Physiol. Plant.* **1988**, 74, 131–136; b) T. Düggelein, M. Schellenberg, K. Bortlik, P. Matile, *J. Plant Physiol.* **1988**, 133, 492–497.
- [40] M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Anal. Chem.* **1982**, 54, A645–A650.
- [41] A. Gossauer, N. Engel, *J. Photochem. Photobiol. B* **1996**, 32, 141–151.
- [42] B. Kräutler, W. Mühlecker, M. Anderl, B. Gerlach, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1355–1362.
- [43] a) J. Iturraspe, A. Gossauer, *Tetrahedron* **1992**, 48, 6807–6812; b) K. M. Smith in *Chlorophylls* (Hrsg.: H. Scheer), CRC, Boca Raton, **1991**, S. 115–144.
- [44] S. Rodoni, W. Mühlecker, M. Anderl, B. Kräutler, D. Moser, H. Thomas, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **1997**, 115, 669–676.
- [45] A. Pruzinska, G. Tanner, I. Anders, M. Roca, S. Hörtensteiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15259–15264.
- [46] S. Hörtensteiner, K. L. Wüthrich, P. Matile, K. H. Ongania, B. Kräutler, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15335–15339.
- [47] W. Mühlecker, B. Kräutler, D. Moser, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 278–286.
- [48] S. Rodoni, F. Vicentini, M. Schellenberg, P. Matile, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **1997**, 115, 677–682.
- [49] a) S. Hörtensteiner, S. Rodoni, M. Schellenberg, F. Vicentini, O. I. Nandi, Y. L. Qui, P. Matile, *Plant Biol.* **2000**, 2, 63–67; b) K. L. Wüthrich, L. Bovet, P. E. Hunziker, I. S. Donnison, S. Hörtensteiner, *Plant J.* **2000**, 21, 189–198.
- [50] J. Berghold, K. Breuker, M. Oberhuber, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Photosynth. Res.* **2002**, 74, 109–119.
- [51] S. Moser, T. Müller, A. Holzinger, C. Lütz, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 10873–10885.
- [52] N. Frankenberg, K. Mukougawa, T. Kohchi, J. C. Lagarias, *Plant Cell Physiol.* **2001**, 13, 965–978.
- [53] M. Sugishima, Y. Kitamori, M. Noguchi, T. Kohchi, K. Fukuyama, *J. Mol. Biol.* **2009**, 389, 376–387.
- [54] M. Sugishima, Y. Okamoto, M. Noguchi, T. Kohchi, H. Tamiaki, K. Fukuyama, *J. Mol. Biol.* **2010**, 402, 879–891.
- [55] M. Oberhuber, B. Kräutler, *ChemBioChem* **2002**, 3, 104–107.
- [56] T. Dammeyer, N. Frankenberg-Dinkel, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 1121–1130.
- [57] F. G. Losey, N. Engel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8643–8647.
- [58] T. Müller, M. Rafelsberger, C. Vergeiner, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10724–10727; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10912–10916.
- [59] T. Müller, M. Ulrich, K.-H. Ongania, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8699–8702; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8854–8857.
- [60] A. Pruzinska, G. Tanner, S. Aubry, I. Anders, S. Moser, T. Müller, K.-H. Ongania, B. Kräutler, J.-Y. Youn, S. J. Liljegren, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **2005**, 139, 52–63.
- [61] M. Roiser, T. Müller, B. Kräutler, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 1385–1392.
- [62] J. Berghold, C. Eichmüller, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 657–668.
- [63] C. Curty, N. Engel, *Phytochemistry* **1996**, 42, 1531–1536.
- [64] M. Oberhuber, J. Berghold, W. Mühlecker, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 2615–2627.
- [65] J. Berghold, T. Müller, M. Ulrich, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *Monatsh. Chem.* **2006**, 137, 751–763.
- [66] T. Müller, S. Moser, K. H. Ongania, A. Pruzinska, S. Hörtensteiner, B. Kräutler, *ChemBioChem* **2006**, 7, 40–42.
- [67] B. Christ, S. Schelbert, S. Aubry, I. Süssenbacher, T. Müller, B. Kräutler, S. Hörtensteiner, *Plant Physiol.* **2012**, 158, 628–641.
- [68] T. Erhart, C. Vergeiner, G. Scherzer, C. Mittelberger, P. Robatscher, M. Oberhuber, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [69] M. Scherl, T. Müller, R. G. Huber, C. Kreutz, E. Zass, K. R. Liedl, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [70] S. Hörtensteiner, *Phytochemistry* **1998**, 49, 953–956.
- [71] A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 5–39; *Angew. Chem.* **1988**, 100, 5–40.
- [72] C. Li, K. Wurst, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [73] T. Müller, R. Treichel, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [74] B. Kräutler, S. Banala, S. Moser, C. Vergeiner, T. Müller, C. Lütz, A. Holzinger, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 4215–4221.
- [75] D. Lafont, F. Carriere, F. Ferrato, P. Boullanger, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 695–704.
- [76] C. Vergeiner, S. Banala, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 12294–12305.
- [77] C. Vergeiner, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [78] a) N. Djapic, A. Djuric, A. Pavlovic, *Res. J. Agr. Sci.* **2009**, 41, 256–260; b) G. Scherzer, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [79] a) P. R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450—Structure, Mechanisms, and Biochemistry*, 3. Aufl., Kluwer Academic, New York, **2004**, S. 689; b) I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, I. Schlichting, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2253–2277.
- [80] M. Gregory, P. J. Mak, S. G. Sligar, J. R. Kincaid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 5342–5345; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 5450–5453.
- [81] a) G. B. Seymour, M. Poole, J. J. Giovannoni, G. A. Tucker, *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*, Wiley-Blackwell, Malaysia, **2013**; b) B. W. Shirley, *Trends Plant Sci.* **1996**, 1, 377–382.
- [82] J. J. Ríos, A. Pérez-Gálvez, M. Roca, *Food Res. Int.* **2014**, 65, 255–262.
- [83] J. J. Ríos, M. Roca, A. Pérez-Gálvez, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 10576–10584.
- [84] A. J. Keys, C. L. Leaver, D. H. R. Barton, B. D. Brown, D. A. Widdowson, *Nature* **1971**, 232, 423–424.
- [85] S. Moser, T. Müller, A. Holzinger, C. Lütz, S. Jockusch, N. J. Turro, B. Kräutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 15538–15542.
- [86] Wir interessierten uns für die visuellen Eindrücke verschiedener Testpersonen, nachdem sie in einem abgedunkelten Raum frisch gereifte Bananen betrachteten, die mit 360-nm-Schwarzlicht bestrahlt wurden. Vierzig Personen verschiedener Altersgruppen wurden an der Universität Innsbruck befragt. Dabei wurde direkt nach dem Verlassen des abgedunkelten Raumes von allen Teilnehmern die Wahrnehmung einer blauen

- Farbe der Bananen berichtet, bei deutlicher Streuung der persönlichen Erinnerungen an Intensität und genauen Farbton. Die blau fluoreszierenden Ringe um Seneszenz-assoziierte, dunkle Flecken auf den Schalen überreifer Bananen konnten sogar in einfach abgedunkelten Räumen mit bloßem Auge gut wahrgenommen werden.
- [87] F. Mendoza, J. M. Aguilera, *J. Food Sci.* **2004**, *69*, E471–E477.
- [88] R. Choehom, S. Ketsa, W. G. van Doorn, *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *31*, 167–175.
- [89] M. Ulrich, S. Moser, T. Müller, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2330–2334.
- [90] D. A. Lightner, *Bilirubin: Jekyll and Hyde Pigment of Life*, Springer, Wien, **2013**.
- [91] C. Vergeiner, M. Ulrich, C. Li, X. Liu, T. Müller, B. Kräutler, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 136–149.
- [92] M. Scherl, T. Müller, B. Kräutler, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 2605–2617.
- [93] D. Wakana, H. Kato, T. Momose, N. Sasaki, Y. Ozeki, Y. Goda, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2982–2985.
- [94] a) C. Li, M. Ulrich, X. Liu, K. Wurst, T. Müller, B. Kräutler, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3388–3395; b) C. Li, B. Kräutler, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 10116–10127; c) C. Li, K. Wurst, B. Kräutler, *J. Porph. Phthal.* **2016**, im Druck.
- [95] S. Jockusch, N. J. Turro, S. Banala, B. Kräutler, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 407–411.
- [96] A. Eschenmoser, *Chem. Soc. Rev.* **1976**, *5*, 377–410.
- [97] R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames, *Science* **1987**, *235*, 1043–1046.
- [98] M. Ulrich, B. Kräutler, unveröffentlichte Ergebnisse; siehe M. Ulrich, Dissertation, Universität Innsbruck **2011**.
- [99] a) A. R. Battersby, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 507–526; b) B. Kräutler, *Chimia* **1987**, *41*, 277–292; c) B. Kräutler, B. Jaun in *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry* (Hrsg.: H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 177–212; d) *Handbook of Porphyrin Science, Vol. 1–30* (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific Publication, Singapore, **2010**; e) K. M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier Science, Amsterdam, **1975**.
- [100] a) A. L. Balch, F. L. Bowles in *Handbook of Porphyrin Science, Vol. 8* (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific Publishing, Singapur, **2010**, S. 293–342; b) M. Bröring in *Handbook of Porphyrin Science Vol. 8* (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), World Scientific Publishing, Singapur, **2010**, S. 343–501.
- [101] a) C. R. Bell, A. H. Lindsey, *Fall Colors and Woodland Harvests*, Laurel Hill Press, Chapel Hill, USA, **1990**; b) P. Matile, *Exp. Gerontol.* **2000**, *35*, 145–158; c) P. O. Lim, H. J. Kim, H. G. Nam, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58*, 115–136.
- [102] a) P. Matile, S. Hörtensteiner, H. Thomas, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 67–95; b) B. Hauck, A. P. Gay, J. Macduff, C. M. Griffiths, H. Thomas, *Plant Cell Environ.* **1997**, *20*, 1007–1018.
- [103] J. Giovannoni, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, *52*, 725–749.
- [104] a) E. W. Stiles, *Am. Nat.* **1982**, *120*, 500–509; b) M. Archetti, S. P. Brown, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2004**, *271*, 1219–1223.
- [105] a) M. Archetti, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2009**, *276*, 2575–2580; b) E. Cazzetta, H. M. Schaefer, M. Galetti, *Evol. Ecol.* **2009**, *23*, 233–244; c) D. Osorio, A. C. Smith, M. Vorobyev, H. M. Buchanan-Smith, *Am. Nat.* **2004**, *164*, 696–708.
- [106] H. Zollinger, *Color Chemistry*, 3. Aufl., Wiley-VCH, Zürich & Weinheim, **2003**.
- [107] a) K. E. Arnold, I. P. F. Owens, N. J. Marshall, *Science* **2002**, *295*, 92–92; b) C. H. Mazel, T. W. Cronin, R. L. Caldwell, N. J. Marshall, *Science* **2004**, *303*, 51–51; c) M. L. M. Lim, M. F. Land, D. Li, *Science* **2007**, *315*, 481–481; d) F. Hausmann, K. E. Arnold, N. J. Marshall, I. P. F. Owens, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **2003**, *270*, 61–67.
- [108] a) D. Wagner, D. Przybyla, R. O. D. Camp, C. Kim, F. Landgraf, K. P. Lee, M. Wursch, C. Laloi, M. Nater, E. Hideg, K. Apel, *Science* **2004**, *306*, 1183–1185; b) C. Triantaphylidès, M. Havaux, *Trends Plant Sci.* **2009**, *14*, 219–228; c) J. P. Knox, A. D. Dodge, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 889–896.
- [109] M. J. Terry, A. G. Smith, *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 1–14.
- [110] P. R. Ogilby, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181–3209.
- [111] U. Krämer, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 517–534.
- [112] A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3582–3603; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3706–3728.
- [113] T. Müller, S. Oradu, D. R. Ifa, R. G. Cooks, B. Kräutler, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5754–5761.
- [114] A. Badgaa, J. Aiqun, R. Büchler, K. Ploss, W. Boland, *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40*, 1232–1240.
- [115] a) Y. Kashiwama, A. Yokoyama, Y. Kinoshita, S. Shoji, H. Miyashita, T. Shiratori, H. Suga, K. Ishikawa, A. Ishikawa, I. Inouye, K.-i. Ishida, D. Fujinuma, K. Aoki, M. Kobayashi, S. Nomoto, T. Mizoguchi, H. Tamiaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17328–17335; b) H. Falk, G. Hoornaert, H. P. Isenring, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 2347–2357.
- [116] N. Frankenberg, J. C. Lagarias in *The Porphyrin Handbook, Vol. 13* (Hrsg.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Elsevier Science Oxford, **2003**, S. 211–235.
- [117] P. Sumner, J. D. Mollon, *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 1987–2000.
- [118] a) J. Chory, *Plant J.* **2010**, *61*, 982–991; b) M. Heil, J. Ton, *Trends Plant Sci.* **2008**, *13*, 264–272.
- [119] a) N. Eckardt, *Plant Cell* **2008**, *20*, 241–243; b) H. H. Felle, A. Herrmann, P. Schäfer, R. Hückelhoven, K.-H. Kogel, *J. Plant Physiol.* **2008**, *165*, 52–59.
- [120] a) S. Balazadeh, S. Parlit, B. Mueller-Roeber, R. C. Meyer, *Plant Biol.* **2008**, *10*, 136–147; b) A. M. Price, D. F. A. Orellana, F. M. Salleh, R. Stevens, R. Acock, V. Buchanan-Wollaston, A. D. Stead, H. J. Rogers, *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 1898–1912; c) H. Zhang, C. Zhou, *Plant Mol. Biol.* **2012**, *82*, 539–545.
- [121] L. M. Weaver, R. M. Amasino, *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 876–886.
- [122] B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, **2001**.
- [123] J. Keskitalo, G. Bergquist, P. Gardestrom, S. Jansson, *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1635–1648.
- [124] a) J. T. Greenberg, A. Guo, D. F. Klessig, F. M. Ausubel, *Cell* **1994**, *77*, 551–563; b) J. T. Greenberg, N. Yao, *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 201–211.
- [125] a) V. Buchanan-Wollaston, *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 181–199; b) J. L. Dangl, R. A. Dietrich, H. Thomas in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Hrsg.: B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones), American Society Plant Physiologists, Rockville, Md, USA, **2001**, S. 1044–1100.
- [126] M. Roca, *Food Chem.* **2012**, *130*, 134–138.

Eingegangen am 23. September 2015
Online veröffentlicht am 25. Februar 2016