

Vom Verschwinden des Chlorophylls

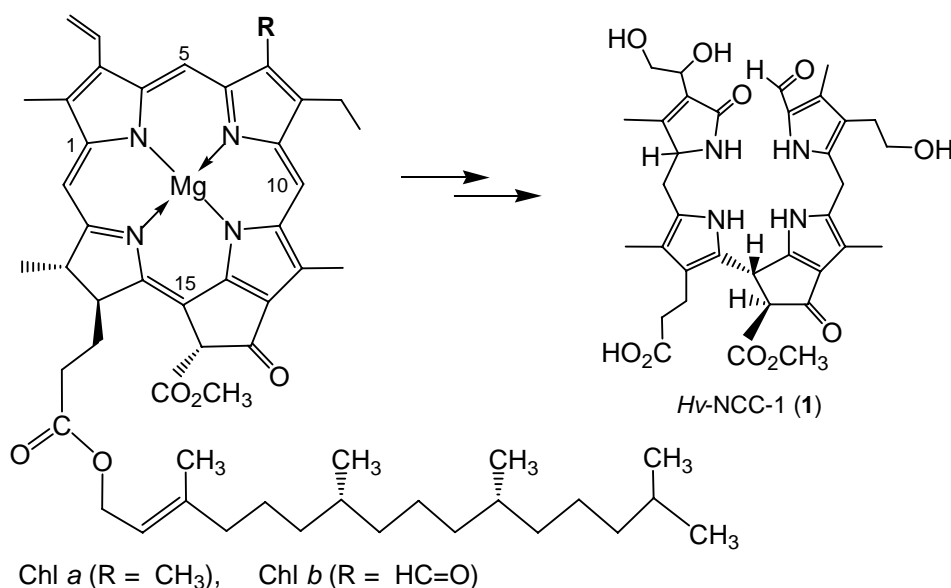
BERNHARD KRÄUTLER

Institut für Organische Chemie & Center of Molecular Biosciences, Universität Innsbruck

Innrain 52a, A-6020 Innsbruck, Österreich

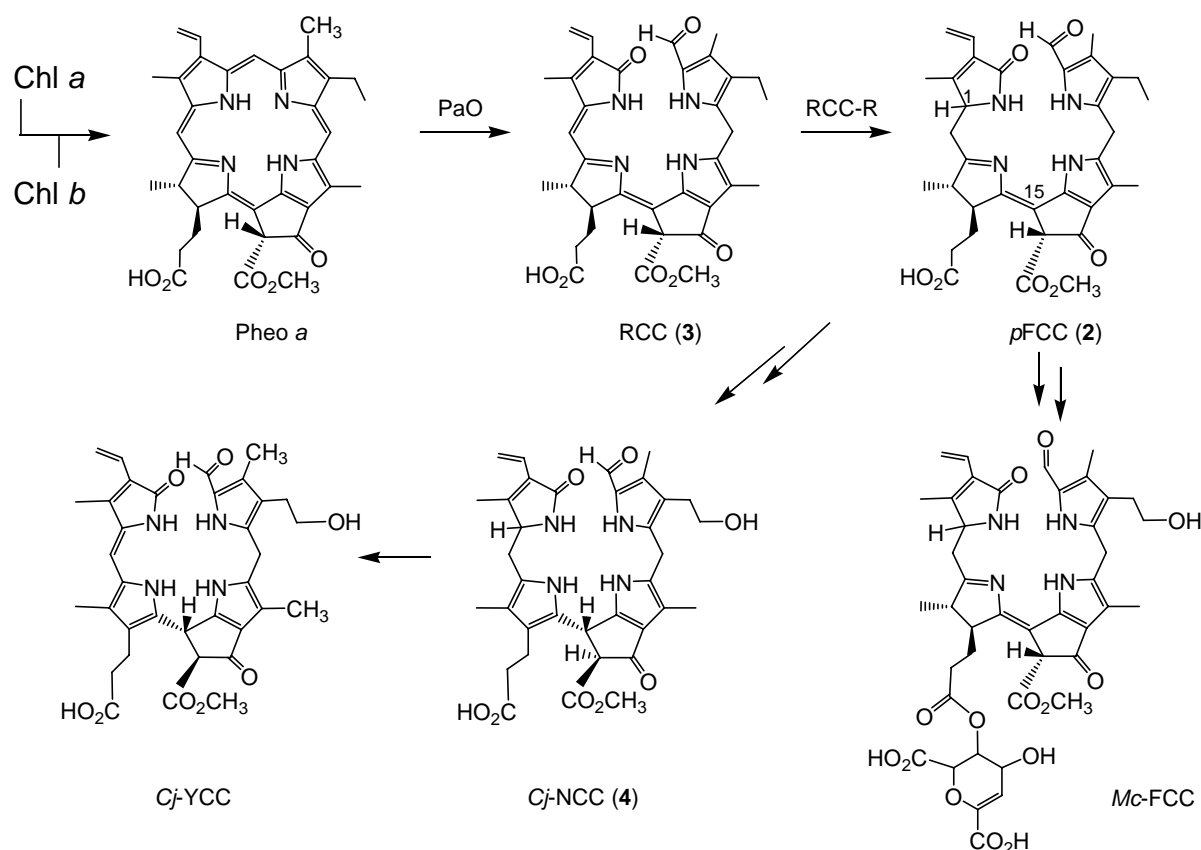
(Vortrag bei der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina am 28. April 2009)

Chlorophyll (Chl), das grüne Pigment der Pflanzen, gibt dem Leben auf der Erde eine gut sichtbare Farbe, deren saisonales Kommen und Gehen sogar aus dem Weltraum beobachtbar ist (KRÄUTLER, B. und MATILE, P. 1999). Man schätzt, dass jedes Jahr auf der Erde etwa 10^9 t Chl erzeugt und wieder abgebaut werden (BROWN, S. B. et al. 1991). Das Entstehen des Pflanzenfarbstoffs im Frühjahr und sein Verschwinden im Herbstlaub gehören zu den farbenfreudigsten Phänomenen der Natur. Währendem vor etwa 20 Jahren die Grundzüge der Chl-Biosynthese schon weitgehend geklärt waren (LEEPER, F. J. 1991), schien das Chl im Herbst noch einfach spurlos zu verschwinden (MATILE, P. 1987). Der faszinierende und ökologisch wichtige natürliche Chl-Abbau war ein Rätsel, das erst in den letzten zwei Jahrzehnten gelöst werden konnte (KRÄUTLER, B. und HÖRTENSTEINER, S. 2006, KRÄUTLER, B. et al. 1991, KRÄUTLER, B. und MATILE, P. 1999, MOSER, S. et al. 2009).



Schema 1. Ein farbloser Chlorophyll-Katabolit in seneszenten Gerstenblättern. Chlorophyll wird in seneszenten Primärblättern der Gerste (*Hordeum vulgare*) zum 'nichtfluoreszenten' Chlorophyll Kataboliten Hv-NCC-1 (1) abgebaut (KRÄUTLER, B. und MATILE, P. 1999).

In diesem Vortrag werde ich Ihnen erzählen, wie die Frage nach dem Verschwinden des Chls inzwischen gelöst wurde. Sie werden das heutige diesbezügliche Wissen primär aus der chemischen Perspektive vorgestellt bekommen. Die Kenntnisse über die Strukturen und Reaktivitäten von Chl-Kataboliten gaben einen soliden 'chemischen' Leitfaden für die biologischen Überlegungen zum Chlorophyll Abbau in höheren Pflanzen (Schema 1 und 2) (HÖRTENSTEINER, S. 2006, KRÄUTLER, B. und HÖRTENSTEINER, S. 2006, KRÄUTLER, B. und MATILE, P. 1999, MATILE, P. et al. 1996, MOSER, S. et al. 2009).



Schema 2. Chlorophyll Abbau in höheren Pflanzen. Pflanzliche Chlorophylle (Chl *a* und Chl *b*) werden via Phäophorbid *a* (Pheo *a*) durch die Pheo *a* Mono-oxygenase (PaO) zum 'roten' Chlorophyll Kataboliten (RCC, 3) oxygeniert, der mittels der RCC-Reduktase (RCC-R) in 'primäre fluoreszente' Chlorophyll Kataboliten (pFCCs, 2) reduziert wird. Aus diesen entstehen 'nichtfluoreszente' Chlorophyll Kataboliten (NCCs), wie *Hv*-NCC-1 (1) bzw. *Cj*-NCC-1 (4) (KRÄUTLER, B. und HÖRTENSTEINER, S. 2006). Als oxidative Folgeprodukte von NCCs entstehen gelbe Chlorophyll Kataboliten (YCCs), wie der *Cj*-YCC, der direkt zur Farbe in Herbstblättern des Baumes *Cercidiphyllum japonicum* beiträgt; in den Schalen von reifen Bananen (*Musa cavendish*) treten modifizierte FCCs auf (wie der *Mc*-FCC) (MOSER, S. et al. 2009).

Der Botaniker Matile und seine Mitarbeiter stießen um 1985 auf erste Indizien für das Auftreten von farblosen Chl-Kataboliten in seneszenten Blättern (MATILE, P. et al. 1988). Der farblose 'Haupt-Katabolit' 1 aus der Gerste (*Hordeum vulgare*) ließ sich in unserem

Laboratorium strukturell charakterisieren, was seine vorerst angenommene Abstammung von Chl entscheidend bekräftigte (Schema 1) (KRÄUTLER, B. et al. 1991). Das lineare Tetrapyrrol **1** (= *Hv*-NCC-1) bekam so die Rolle des ersten eindeutig identifizierten Chl-Kataboliten aus höheren Pflanzen. Er erwies sich als ein 3¹,3²,8²-Trihydroxy-1,4,5,10,15,20-(22*H*,24*H*)-octahydro-13²-[methoxycarbonyl]-4,5-dioxo-4,5-seco-phytoporphyrinat. Die chemische Struktur dieses 'nicht-fluoreszierenden' Chl-Kataboliten (NCC) gab erste Hinweise über notwendige Schritte beim Abbau des Chls, aus welchem **1** (formal) durch eine oxygenolytische Öffnung des Makrorings an der 'nördlichen' 5-Position entstehen sollte (KRÄUTLER, B. et al. 1991) (und nicht an der 'westlichen', wie erwartet (BROWN, S. B. et al. 1991)).

Die Identifikation des farblosen Chl-Kataboliten **1** (KRÄUTLER, B. et al. 1991) löste eine intensive Suche nach weiteren NCCs in höheren Pflanzen aus. NCCs wurden u.a. in Ölrapis identifiziert (MÜHLECKER, W. und KRÄUTLER, B. 1996), in Tabak (BERGHOLD, J. et al. 2004), in Mais (BERGHOLD, J. et al. 2006), in Spinat (BERGHOLD, J. et al. 2002), in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (MÜLLER, T. et al. 2006, PRUŽINSKA, A. et al. 2005) und im Katsura Baum (*Cercidiphyllum japonicum*) (CURTY, C. und ENGEL, N. 1996, OBERHUBER, M. et al. 2003). Die NCCs wurden unter Anwendung moderner Methoden der Massen-Spektrometrie und der Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie strukturell charakterisiert. Sie sind alle verwandte Formyl-bilane und haben dasselbe Gerüst wie **1**. Mit einer Ausnahme (MÜLLER, T. et al. 2006) tragen sie an der 7-Position eine Methylgruppe und sind daher mit Chl *a* näher verwandt als mit Chl *b*. Die natürlichen NCCs haben alle ein ähnliches Cirkulardichroismus Spektrum, was auf eine einheitliche absolute Konfiguration an der asymmetrischen 15-Position hinweist. Sie können sich aber durch die Konfiguration der 1-Position untereinander unterscheiden (MOSER, S. et al. 2009, OBERHUBER, M. et al. 2003, OBERHUBER, M. et al. 2008).

In seneszenten Blättern wurden neben den farblosen NCCs Spuren fluoreszierender Verbindungen (mit Lumineszenz bei etwa 450 nm) entdeckt, die tentativ als 'fluoreszierende' Chl-Kataboliten (FCCs) bezeichnet wurden. Ein wenig polarer FCC konnte strukturell charakterisiert und tatsächlich als rationeller Vorläufer der NCCs identifiziert werden (MÜHLECKER, W. et al. 1997). Das UV/Vis-Spektrum des FCCs **2** zeigte neben der Bande bei etwa 315 nm, die auch für NCCs charakteristisch ist, ein Absorptionsmaximum bei etwa 360 nm. Die in seneszenten Blättern natürlich auftretenden FCCs sind (unter schwach sauren Bedingungen) nur kurzlebig und isomerisieren zu NCCs (OBERHUBER, M. et al. 2003). Die Struktur des FCC **2** war mit einer oxygenolytischen Ringöffnung von Phäophorbid *a* (Pheo *a*)

kompatibel und der Absättigung zweier weiterer meso-Positionen (Schema 2). Der FCC **2** wies aber keine weiteren peripheren Veränderungen auf, wie sie z.B. in *Hv*-NCC-1 (**1**) vorlagen. Dieser Befund ließ uns die Bezeichnung 'primärer' FCC (*p*FCC, **2**) vorschlagen, da dieser *p*FCC durch einen minimalen Satz von (enzymatischen) Reaktion aus Pheo *a* entstehen dürfte. Als den Vorläufer von **2** postulierten wir einen (in höheren Pflanzen) bis dato unauffindbaren 'roten Chlorophyll Kataboliten' (RCC, **3**), dessen Reduktion direkt **2** ergeben sollte (MÜHLECKER, W. et al. 1997). Um der möglichen Rolle von **3** beim Chl-Abbau nachzugehen, wurde **3** durch chemische Partialsynthese aus Pheo *a* hergestellt (KRÄUTLER, B. et al. 1997). Authentischer RCC (**3**) wurde tatsächlich durch einen Extrakt aus seneszenten Blättern zum *p*FCC (**2**) reduziert. Dieser Extrakt enthielt offenbar eine zunächst unbekannte, im Abbauweg aber notwendige Reduktase, die nun als RCC-Reduktase (RCC-R) identifiziert ist (Schema 2) (HÖRTENSTEINER, S. et al. 2000). Auch das Enzym, welches die kritische Ringöffnung von Pheo *a* zu RCC (**3**) bewerkstelligt, wurde inzwischen gefunden und als Pheo *a* Monooxygenase (PaO) identifiziert (Schema 2) (HÖRTENSTEINER, S. 2006, KRÄUTLER, B. and HÖRTENSTEINER, S. 2006).

Mit der Identifikation der RCC-R als ein cofaktorfreies, ferredoxinabhängiges Enzym wurde der Mechanismus der enzymatischen Reduktion des RCC (**3**) zum *p*FCC (**2**) ein interessantes Problem. Elektrochemische Experimente wiesen die leichte Reduzierbarkeit von **3** zu **2** ohne Enzym nach. Diese Reduktion verlief nahe dem nun postulierten natürlichen Bildungsweg von **2**, d.h. sie zeigte damit eine bio-mimetische Umwandlung von **3** zu **2** auf. Die synthetischen Arbeiten lieferten auch tetrapyrrolische Abbau-Zwischenstufen (wie z.B. **2** und **3**), die nur schwerlich aus natürlichen Quellen zugänglich waren (KRÄUTLER, B. et al. 1997, OBERHUBER, M. et al. 2003, OBERHUBER, M. et al. 2008).

Kenntnisse über die Chemie von Hydroporphyrinen (ESCHENMOSER, A. 1988) erlaubten es vorzuschlagen, dass FCCs durch eine 'chemische' Isomerisierung in NCCs umwandelbar sein sollten (OBERHUBER, M. et al. 2003). Diese Hypothese wurde am Beispiel des *p*FCC aus Paprika getestet, der sich in einer schwach sauren Lösung schnell und stereoselektiv in einen natürlichen NCC umwandelte. Diese Isomerisierung ließ auch den stereochemisch einheitlichen Aufbau am C-15 der NCCs rationalisieren und wurde bei der biomimetischen Partialsynthese von NCCs genutzt (OBERHUBER, M. et al. 2008). Damit war wahrscheinlich gemacht, dass FCCs im schwach sauren Milieu der Vakuolen 'nicht-enzymatisch' in die entsprechenden NCCs isomerisieren und der sog. 'letzte' Schritt des (bekannten) Chl-Abbaues eine 'spontane' chemische Reaktion ist (OBERHUBER, M. et al. 2003). Die Vakuolen enthalten ja tatsächlich die aus dem Chl-Abbau resultierenden NCCs (MATILE, P. et al. 1988 & 1996).

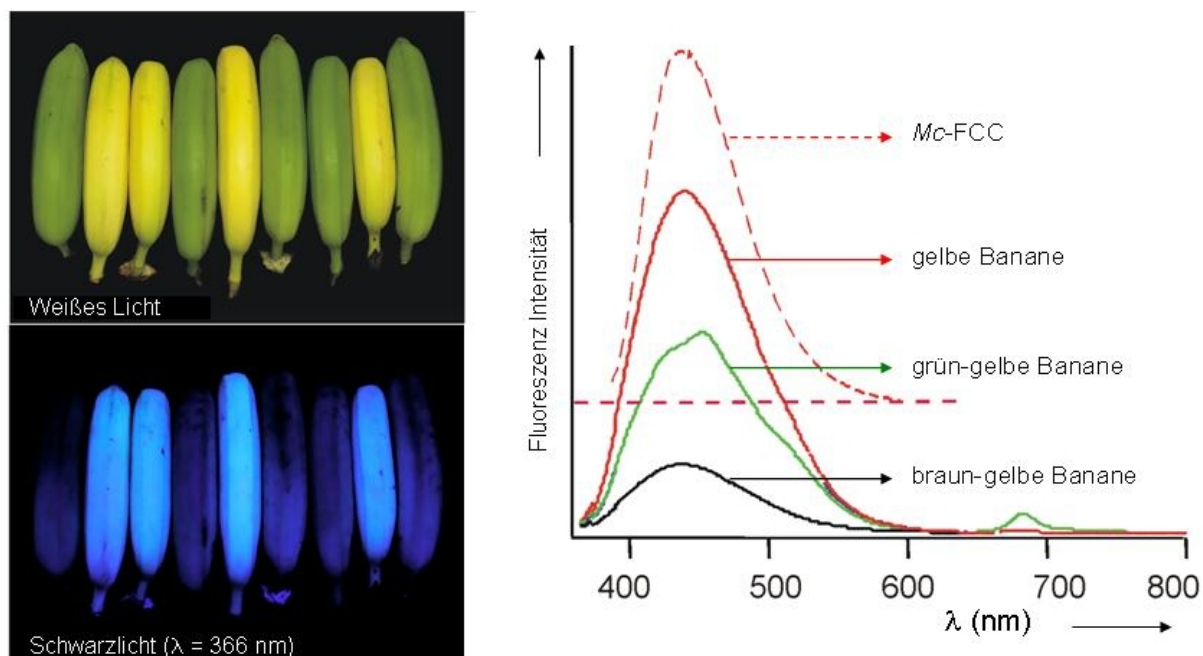


Figur 1. Die charakteristischen Verfärbungen von Obst und von Obstbaumblättern zeigen visuell das Verschwinden des Chlorophylls an, welches nach einem gemeinsamen Abbauweg zu erfolgen scheint (MOSER, S. et al. 2009).

Die Entwicklung von gelben und roten Farben in der Schale vieler reifender Früchte wurde schon länger als indirektes Zeichen des Chl-Abbaues gesehen (Figur 1), es fehlte aber die Identifikation von Chl-Kataboliten in Früchten (MÜLLER, T. et al. 2007). Diese Situation änderte sich erst durch die Analyse von frisch gewonnenen Extrakten von reifen 'Golden Delicious' Äpfeln (*Malus sylvestris*) und 'Williams' Birnen (*Pyrus communis*). Durch Flüssigchromatographie wurden zwei Fraktionen mit für NCCs typischen spektralen Charakteristika gefunden. Durch weitere Analysen konnten die beiden Fraktionen aus Apfel- und Birnen-Schalen untereinander identifiziert werden. Die beiden NCCs aus den Früchten und auch die aus gelben Blättern von Apfel- und Birn-Bäumen, erwiesen sich als identisch mit dem bekannten *Cj*-NCC-1 (**4**, von *C. japonicum*, vgl. Schema 2), bzw. dessen Glukosylierungsprodukt, das wiederum einem NCC aus Tabak entsprach (MÜLLER, T. et al. 2007). Offenbar wird das Chl in diesen Früchten und in den seneszenten Blättern der beiden Obstbäume unter Bildung derselben farblosen Tetrapyrrole abgebaut. Diese Beobachtung wies auf eine weitgehende Ähnlichkeit des Chl-Abbaues bei der Blatt-Seneszenz und bei der Frucht-Reifung hin (MÜLLER, T. et al. 2007). Der weniger polare (und häufigere) NCC (**4**) aus Äpfeln und Birnen wurde auf seine antioxidative Wirkung untersucht (MÜLLER, T. et al. 2007), wobei ein Experiment zum Einsatz kam, das auch für das strukturell verwandte Häm-Abbauprodukt Bilirubin verwendet worden war (STOCKER, R. et al. 1987): Der NCC **4** unterdrückte die Autoxidation von Linolsäure beinahe so effektiv wie Bilirubin (MÜLLER, T.

et al. 2007). Diese bislang unbeachteten Antioxidantien in Äpfeln und Birnen (und womöglich anderen Früchten) könnten nun dem alten Sprichwort 'An apple a day keeps the doctor away' eine neue Bedeutung geben.

Eine weitere Überraschung brachte die Analyse der gelben Schalen reifer Bananen (*Musa cavendish*), in welchen polare fluoreszierende Chlorophyll Kataboliten (FCCs) unter den Produkten des Chl-Abbaues bei weitem überwogen (MOSER, S. et al. 2008a). Üblicherweise sind FCCs nur kurzlebige Zwischenprodukte des Chl-Abbaues (siehe oben). Offenbar liegt in den Bananen eine andere Situation vor: die spektroskopische Strukturanalyse des *Mc*-FCC, wies diesen in gelben Bananen Schalen dominant vorliegenden FCC überraschenderweise als einen Di-Ester aus, in welchem auch die (von Pheo *a* stammende) Propionsäure-Funktion mit einer Estergruppe ausgestattet war (Schema 2) (MOSER, S. et al. 2008a). In natürlichen FCCs (oder NCCs) war eine derartige Modifikation der Propionsäure-Seitenkette bislang unbekannt. Die Existenz der freien Säure-Funktion in den anderen FCCs war dort ja deshalb von besonderem Interesse, da sie die Isomerisierung zu NCCs in schwach saurem Milieu schnell ablaufen ließ (OBERHUBER, M. et al. 2008). Die präzedenzlose (zweite) Esterfunktion im *Mc*-FCC erlaubte damit, die Ansammlung von FCCs in gelben Bananen Schalen chemisch zu rationalisieren (MOSER, S. et al. 2008a).



Figur 2. Reife Bananen lumineszieren blau. Photographien von gelben (reifen) und grünen (unreifen) Bananen, die unter weißem Licht (links oben) oder unter UV-Licht (366 nm, links unten) aufgenommen wurden. Fluoreszenzspektren (rechts) einer Lösung des *Mc*-FCC und von intakten reifen (gelben), wenig gereiften (grün-gelben) und überreifen (braun-gelben) Bananen (*Musa cavendish*) (MOSER, S. et al. 2008a, MOSER, S. et al. 2009).

Die Anreicherung von FCCs in reifen(den) Bananen erklärt ihre von uns entdeckte blaue Lumineszenz. Bei Beobachtung unter UV-Licht (siehe Figur 2) (MOSER, S. et al. 2008a, MOSER, S. et al. 2009) fluoreszieren intakte gelbe Bananen blau (mit einem Emissionsmaximum bei 447 nm). Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz in frisch gereiften Bananen am höchsten. Die Lumineszenz der gelben Bananen hat praktische dieselben Charakteristika, wie jene von Lösungen des *Mc*-FCC. Das Auftreten der veresterten *Mc*-FCCs in reifen(den) Bananen und deren blaue Fluoreszenz ist eine überraschende, neue Facette des natürlichen Chl-Abbaues (MOSER, S. et al. 2009).

Die Suche nach farbigen Chl-Kataboliten im Herbstlaub war durch Jahrzehnte hindurch erfolglos (MATILE, P. 1987). Dies wurde durch die Feststellung erklärbar, dass die farblosen NCCs die typischen Überbleibsel des Chl-Abbaues in höheren Pflanzen sind (KRÄUTLER, B. und HÖRTENSTEINER, S. 2006). Auch die in seneszenten Gerstenblättern entdeckten 'urobilinogenoidischen' Chl-Kataboliten waren farblos und ließen ihr Entstehen auf eine (nicht-enzymatische ?) De-formylierung des *Hv*-NCC-1 (**1**) zurückführen (LOSEY, F. G. und ENGEL, N. 2001). Vor sehr kurzer Zeit gelang es uns ein gelbes lineares Tetrapyrrol in frisch gesammelten, seneszenten Blättern von *C. japonicum* zu identifizieren (siehe Schema 2) (MOSER, S. et al. 2008b). Die Strukturformel des YCC zeigt einen Chromophor-Typus (MOSER, S. et al. 2008b), wie er auch in Bilirubin (zweimal pro Molekül) vorhanden ist (FALK, H. 1989). Dieser natürliche gelbe Chl-Katabolit (YCC) war mit einem Oxidationsprodukt des *Cj*-NCC-1 (**4**) identisch (MOSER, S. et al. 2008b). Diese unsere Arbeiten zeigten wie NCCs chemisch oxidiert werden können (z.B. wenn sie als Antioxidanten wirken) und ergaben auch erste Hinweise auf einen aktiven Beitrag von (gelben) Chl-Kataboliten zu den Herbstfarben in seneszenten Blättern.

Der Chl-Abbau in seneszenten höheren Pflanzen und in reifenden Früchten führt zu einer neuen Gruppe von natürlichen linearen Tetrapyrrolen, die mit dem Häm-Abbauprodukt Bilirubin und ähnlichen natürlichen Bilinen verwandt sind. Weitere Studien über die Strukturen und chemische Reaktivität von Chl-Kataboliten sind nun angezeigt, wie auch über mögliche physiologische Rollen in Pflanzen. Es interessiert uns ebenfalls zu erfahren, ob Chl-Kataboliten als Antioxidantien oder durch andere Effekte im menschlichen Metabolismus eine günstige Wirkung entfalten, wie auch in Tieren, die Pflanzenmaterialien als Komponenten ihrer Nahrung verwenden.

Dank. Ich möchte meinen Mitarbeitern in Innsbruck, sowie Prof. PHILIPPE MATILE und PD Dr. STEFAN HÖRTENSTEINER (Universität Zürich) für hervorragende experimentelle, graphische und intellektuelle Beiträge danken. Unsere Arbeiten wurden vom Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF) großzügig unterstützt.

Literatur

- BERGHOLD, J., BREUKER, K., OBERHUBER, M., HÖRTENSTEINER, S. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll breakdown in spinach: on the structure of five nonfluorescent chlorophyll catabolites. *Photosynth. Res.* 74, 109-119 (2002).
- BERGHOLD, J., EICHMÜLLER, C., HÖRTENSTEINER, S. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll breakdown in tobacco: On the structure of two nonfluorescent chlorophyll catabolites. *Chem. Biodiv.* 1, 657-668 (2004).
- BERGHOLD, J., MÜLLER, T., ULRICH, M., HÖRTENSTEINER, S. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll Breakdown in Maize: On the Structure of Two Nonfluorescent Chlorophyll Catabolites. *Monatsh. Chem.* 137, 751-763 (2006).
- BROWN, S. B., HOUGHTON, J. D. and HENDRY, G. A. F. Chlorophyll Breakdown. pp. 465-489 in SCHEER, H., ed. *Chlorophylls*. 1991. CRP-Press, Boca Raton, USA,
- CURTY, C. and ENGEL, N.: Chlorophyll catabolism. 9. Detection, isolation and structure elucidation of a chlorophyll a catabolite from autumnal senescent leaves of *Cercidiphyllum japonicum*. *Phytochem.* 42, 1531-1536 (1996).
- ESCHENMOSER, A.: Vitamin-B₁₂ - Experiments Concerning the Origin of Its Molecular-Structure. *Angew. Chem. Int. Ed.* 27, 5-39 (1988).
- FALK, H.: *Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, Wien, 1989.
- HÖRTENSTEINER, S.: Chlorophyll Degradation During Senescence. *Annu Rev Plant Biol* 57, 55-77 (2006).
- HÖRTENSTEINER, S., RODONI, S., SCHELLENBERG, M., VICENTINI, F., NANDI, O. I., QUI, Y. L. and MATILE, P.: Evolution of chlorophyll degradation: the significance of RCC reductase. *Plant Biol.* 2, 63-67 (2000).
- KRÄUTLER, B. and HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll Catabolites and the Biochemistry of Chlorophyll Breakdown. pp. 237-260 in GRIMM, B., PORRA, R., RÜDIGER, W., SCHEER, H., ed. *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. 25, 2006. Springer, Dordrecht, The Netherlands, *Advances in Photosynthesis and Respiration*
- KRÄUTLER, B., JAUN, B., BORTLIK, K., SCHELLENBERG, M. and MATILE, P.: On the enigma of chlorophyll degradation - the constitution of a secoporphanoid catabolite. *Angew. Chem. Int. Ed.* 30, 1315-1318 (1991).
- KRÄUTLER, B. and MATILE, P.: Solving the riddle of chlorophyll breakdown. *Acc. Chem. Res.* 32, 35-43 (1999).
- KRÄUTLER, B., MÜHLECKER, W., ANDERL, M. and GERLACH, B.: Breakdown of chlorophyll: Partial synthesis of a putative intermediary catabolite - Preliminary communication. *Helv. Chim. Acta* 80, 1355-1362 (1997).
- LEEPER, F. J. Intermediate Steps in the Biosynthesis of Chlorophylls. pp. 407-432 in SCHEER, H., ed. *Chlorophylls*. 1991. CRC-Press, Boca Raton, USA,
- LOSEY, F. G. and ENGEL, N.: Isolation and characterization of a urobilinogenoidic chlorophyll catabolite from *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 276, 8643-8647 (2001).
- MATILE, P.: Senescence in Plants and Its Importance for Nitrogen-Metabolism. *Chimia* 41, 376-381 (1987).

- MATILE, P., GINSBURG, S., SCHELLENBERG, M. and THOMAS, H.: Catabolites of Chlorophyll in Senescing Barley Leaves Are Localized in the Vacuoles of Mesophyll-Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9529-9532 (1988).
- MATILE, P., HÖRTENSTEINER, S., THOMAS, H. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* **112**, 1403-1409 (1996).
- MOSER, S., MÜLLER, T., EBERT, M.-O., JOCKUSCH, S., TURRO, N. J. and KRÄUTLER, B.: Blue luminescence of ripening bananas. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8954-8957 (2008a).
- MOSER, S., MÜLLER, T., OBERHUBER, M. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll catabolites – chemical and structural footprints of a fascinating biological phenomenon. *Eur. J. Org. Chem.*, 21-31 (2009).
- MOSER, S., ULRICH, M., MÜLLER, T. and KRÄUTLER, B.: A yellow chlorophyll catabolite is a pigment of the fall colours. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 1577-1581 (2008b).
- MÜHLECKER, W. and KRÄUTLER, B.: Breakdown of chlorophyll: Constitution of nonfluorescing chlorophyll-catabolites from senescent cotyledons of the dicot rape. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 61-75 (1996).
- MÜHLECKER, W., ONGANIA, K. H., KRÄUTLER, B., MATILE, P. and HÖRTENSTEINER, S.: Tracking down chlorophyll breakdown in plants: Elucidation of the constitution of a 'fluorescent' chlorophyll catabolite. *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**, 401-404 (1997).
- MÜLLER, T., MOSER, S., ONGANIA, K. H., PRUZINSKA, A., HÖRTENSTEINER, S. and KRÄUTLER, B.: A Divergent Path of Chlorophyll Breakdown in the Model Plant *Arabidopsis thaliana*. *ChemBiochem* **7**, 40-42 (2006).
- MÜLLER, T., ULRICH, M., ONGANIA, K.-H. and KRÄUTLER, B.: Colorless tetrapyrrolic chlorophyll catabolites found in ripening fruit are effective antioxidants. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8699-8702 (2007).
- OBERHUBER, M., BERGHOLD, J., BREUKER, K., HÖRTENSTEINER, S. and KRÄUTLER, B.: Breakdown of chlorophyll: A nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless 'nonfluorescent' chlorophyll catabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6910-6915 (2003).
- OBERHUBER, M., BERGHOLD, J. and KRÄUTLER, B.: Chlorophyll Breakdown by a Biomimetic Route. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3057-3061 (2008).
- PRUŽINSKA, A., TANNER, G., AUBRY, S., ANDERS, I., MOSER, S., MÜLLER, T., ONGANIA, K.-H., KRÄUTLER, B., YOUN, J.-Y., LILJEGREN, S. J. and HÖRTENSTEINER, S.: Chlorophyll breakdown in senescent *Arabidopsis* leaves. Characterization of chlorophyll catabolites and of chlorophyll catabolic enzymes involved in the degreening reaction. *Plant Physiol.* **139**, 52-63 (2005).
- STOCKER, R., YAMAMOTO, Y., MCDONAGH, A. F., GLAZER, A. N. and AMES, B. N.: Bilirubin is an Antioxidant of Possible Physiological Importance. *Science* **235**, 1043-1046 (1987).