

Tankred Schewe

Enzymatische Lipidperoxidation durch 15-Lipoxygenase-1: Flavonoide als Mikronährstoffe und ihre Wechselwirkungen mit Lipoxygenasen

Zu einigen Aspekten der Biochemie des Sauerstoffs

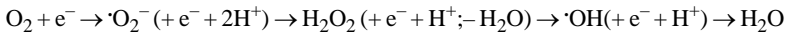
Als mein verehrter Lehrer, Samuel Mitja Rapoport, 1953 nach Berlin kam, widmete er seine ersten Forschungsarbeiten unter anderem der biologischen Oxidation. Schon zuvor als Student und junger Wissenschaftler begeisterte er sich für die bahnbrechenden Arbeiten von Otto Warburg, Hans A. Krebs, Albert Szent-György und anderen zur Aufklärung der Grundzüge der biologischen Oxidation. Er hat dies später vor seinen Studenten immer wieder betont.

Die Anpassung des Lebens an die Gegenwart von Sauerstoff und die Nutzung O₂-abhängiger Reaktionen war ein wesentlicher Fortschritt der Evolution. Nur einige Mikroorganismen sind in der Lage, ohne Sauerstoff zu wachsen und sich zu vermehren. Für alle höher entwickelten Organismen hingegen ist die Bioverfügbarkeit von Sauerstoff eine unabdingbare Voraussetzung des Lebens. Wir wissen seit geraumer Zeit, dass die biologische Oxidation des aus den Nährstoffen stammenden Wasserstoffs über eine Folge von Elektronenübertragungsreaktionen – die *Atmungskette* – stufenweise auf den molekularen Sauerstoff übertragen wird und dabei Wasser entsteht. Die den einzelnen Schritten innewohnende freie Energie aufgrund entsprechender Differenzen im elektrochemischen Potential wird dadurch konserviert, dass dabei Adenosintriphosphat als universelle „Energiewährungseinheit“ synthetisiert wird („*oxidative Phosphorylierung*“).

Nun ist die Reduktion des molekularen Sauerstoffs durch gebundenen Wasserstoff aus chemischer Sicht nicht so einfach wie man es auf den ersten Blick annehmen könnte. Der Autor erinnert sich an ein Kolloquium im Emil-Fischer-Hörsaal der Chemischen Institute der Humboldt-Universität im Jahre 1967. Der Direktor des 1. Chemischen Instituts und heutige Vizepräsident der Leibniz-Sozietät, Prof. Lothar Kolditz, lud damals Rapoport zu einem Vor-

trag über die biologische Oxidation ein. In der Diskussion wurde Rapoport von Kolditz gefragt, wie denn die Reduktion des Sauerstoffs vor sich gehe, es müssten doch dabei peroxidische Intermediate auftreten. Rapoport antwortete, dass man sehr sorgfältig danach gesucht, aber keine gefunden hätte. Das war damals der aktuelle Wissenstand. Kolditz ließ aber nicht locker und betonte, ohne peroxidische oder andere reaktive Zwischenprodukte sei das für ihn als Chemiker nicht plausibel. Heute wissen wir, dass Kolditz damit durchaus Recht hatte. Später konnten mit speziellen Methoden tatsächlich verschiedene Zwischenprodukte bei der Reaktion des Cytochrom a/a_3-O_2 -Komplexes nachgewiesen werden. Diese sind allerdings so kurzlebig, dass es sehr tiefer Temperaturen bedarf, um solche Intermediate sicher nachweisen zu können. Es ist gerade die Besonderheit des strukturell und funktionell ausgeklügelten Cytochrom a/a_3 -Systems, die stufenweise Reduktion des Sauerstoffs so auszuführen, dass die reaktiven Zwischenprodukte so gut gegenüber anderen Reaktionspartnern abgeschirmt sind und so schnell weiter reagieren, dass sie keinen Schaden anrichten können. Für die meisten anderen Enzymsysteme, die mit Sauerstoff reagieren, ist das leider nicht der Fall.

Prinzipiell erfolgt die stufenweise Reduktion des Sauerstoffs wie folgt:



Alle diese Zwischenverbindungen konnten in biologischen Systemen mit Sicherheit nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des Endproduktes Wasser sind sie ziemlich reaktiv, das Hydroxylradikal ist sogar außerordentlich aggressiv, da es mit nahezu fast jeder anderen chemischen Verbindung zu reagieren vermag. Auch der molekulare Sauerstoff ist keineswegs harmlos; er kann nämlich nicht nur im energiearmen Triplett-Zustand sondern auch in zwei sehr reaktiven angeregten Formen auftreten, die man unter dem Begriff *Singulett-Sauerstoff* fasst. Die hier genannten und verschiedene andere Verbindungen und freie Radikale werden heute als *reaktive Sauerstoffspezies* bezeichnet.

Aus diesen Darlegungen folgt, dass der Sauerstoff Lebenselixier und Gift zugleich ist. Daher bestand im Verlaufe der Evolution die Notwendigkeit, neben der Ausbildung der Maschinerie der biologischen Oxidation auch Schutzsysteme gegen die unvermeidlich außerdem entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu entwickeln. Für zwei dieser Spezies wurden spezielle Enzyme für deren Beseitigung entwickelt, so die *Superoxid-Dismutasen* für das $\cdot O_2^-$ sowie die Katalase und verschiedene Peroxidasen für das H_2O_2 . Enzyme zur Beseitigung des gefährlichen Hydroxylradikals gibt es hingegen nicht. Die Strategie des Organismus zur Abwehr dieser Noxe besteht vielmehr darin, die Vorstufenmoleküle zu beseitigen, die zur Bildung von $\cdot OH$

führen können. Zur Entaktivierung des Singulett-Sauerstoffs, der z.B. bei bestimmten Reaktionen stimulierter weißer Blutkörperchen entsteht, dienen niedermolekulare Verbindungen, die in der Nahrung vorkommen. Als besonders wirksam erwiesen sich einige Karotinoide, insbesondere das in Tomaten vorkommende *Lycopin*. Dem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies dienen außerdem Thiole, darunter das *Glutathion*, das über verschiedene Mechanismen wirkt. Seine Rolle im oxidativen Stoffwechsel wurde auch von S.M. Rapoport frühzeitig erkannt und speziell in unreifen roten Blutzellen untersucht [1].

Das Ensemble der verschiedenen antioxidativen Schutzsysteme gegenüber den reaktiven Sauerstoffspezies ist so ausgerichtet, dass seine Kapazitäten bei einer „normalen“ oxidativen Belastung gerade ausreichen, um eine größere Schädigung der Zellen und des Organismus zu verhindern. Sobald die oxidative Belastung aber größer ist, z.B. bei verschiedenen Erkrankungen, genetischen Defekten und bei Aufnahme giftiger Stoffe, werden mehr reaktive Sauerstoffspezies gebildet als beseitigt. Man spricht in einem solchen Falle vom *oxidativen Stress* [2].

Eine Anzahl verschiedener Enzyme ist in der Lage, direkt mit molekularem Sauerstoff zu reagieren. Je nach Art der Reaktion unterscheidet man dabei drei Typen:

1. *Oxidasen*. Hierbei dient der Sauerstoff als Dehydrierungsmittel für Substrate. Je nachdem, ob dem Substrat dabei ein, zwei oder vier Wasserstoffatome bzw. Elektronen entzogen werden, entsteht dabei Superoxid-Anionradikal, Wasserstoffperoxid oder Wasser.
2. *Monoxygenasen* (Hydroxylasen). Hier dient nur eines der beiden Sauerstoffatome als Dehydrierungsmittel, das zweite hingegen wird in das Substrat eingebaut. Aufgrund der Stellung zwischen den Oxidasen und den Dioxygenasen, nannte man diese Enzyme ursprünglich auch „mischfunktionelle Oxidasen“.
3. *Dioxygenasen*. Hier werden beide Sauerstoffatome in das organische Substrat eingebaut. Dioxygenasen spielen beim Endabbau des Kohlenstoffskeletts der Substrate eine wichtige Rolle, z.B. beim Abbau aromatischer Aminosäuren. Zu den Dioxygenasen gehören auch die *Lipoxygenasen*, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Rapport und die Entdeckung der 15-Lipoxygenase-1

Die Entdeckung dieses wichtigen Enzyms des Stoffwechsels mehrfach ungesättigter Fettsäuren hat ihren Ursprung in Arbeiten Rapoport's über die Reifung roter Blutzellen. Bei seinen Untersuchungen Mitte der Fünfziger Jahre

machte er die Beobachtung, dass die Atmung dieser Zellen in einem biologisch gesehen kurzen Zeitraum von 1 bis 3 Tagen bis auf fast Null absinkt, wohingegen andere Stoffwechselreaktionen aufrechterhalten werden. Er schloss auf die Gegenwart spezifischer Faktoren in diesen Zellen, die für die Abschaltung der Atmung verantwortlich sein müssten. Er suchte nach ihnen in stromafreien Überständen von Kaninchenretikulozyten und wurde fündig. Er konnte 1955 eine Proteinfraction isolieren, welche die Atmung eines Präparates aus Rinderherzmuskeln hemmte [3]. Die Wirkungsweise dieses „*RÜ-Hemmstoffes*“ blieb noch lange Zeit ungeklärt, bevor dieses Protein schließlich als *Lipoxygenase* identifiziert werden konnte. Es zeugt aber von der Scharfsinnigkeit des Forschers Rapoport, dass er wichtige Eigenschaften dieser Lipoxygenase bereits vor ihrer eigentlichen Entdeckung richtig erkannte. Er fand nämlich heraus, dass sie Nichthämeisen enthält, mit Phospholipiden reagiert und ungewöhnlich hoch empfindlich gegenüber Oxidanzien ist – ein Umstand, der ihre Erforschung außerordentlich erschwerte. Rapoport glaubte zunächst nicht an eine Enzymwirkung, da die Wirkung nach Bindung an das Herzmuskelpräparat verloren ging. Wir wissen aber heute, dass Lipoxygenasen suizidale Enzyme sind, d. h. sie inaktivieren sich selbst bei ihrer Reaktion mit entsprechenden Substraten.

Übrigens wurde Rapoport im selben Jahr schon vorher auf andere Weise mit der Lipoxygenase aus Kaninchenretikulozyten konfrontiert, ohne das damals schon erkennen zu können. Er beobachtete in Vollbluthomogenaten anämischer Kaninchen eine ungewöhnlich starke Sauerstoffzehrung, die nichts mit der Zellatmung zu tun hatte [4]. Er erkannte richtig, dass es sich um Lipidperoxidation handeln musste. Auch darüber war damals noch wenig bekannt. Er interpretierte dieses Phänomen als hämin-katalysierten Prozess, obwohl er einige Beobachtungen machte, die nicht im Einklang mit einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation standen. So schrieb er in diesem Artikel: „*Die bedeutend geringere Aktivität von erhitzten Ansätzen verglichen mit nicht erhitzten wirft auch die Frage einer echten Enzymwirkung auf.*“ Eine zweite Auffälligkeit war die Unwirksamkeit von Vitamin E in diesem System, die nicht zum hämin-katalysierten Prozess passte. Heute wissen wir, dass es sich bei diesen frühen Beobachtungen Rapoport's um die Reaktion der 15-Lipoxygenase-1 mit den Lipoproteinen des Plasmas gehandelt haben musste. Man muss aber berücksichtigen, dass damals zwar die Lipoxygenase der Sojabohnen bereits bekannt war, man glaubte aber noch bis Mitte der Siebziger Jahre, dass solche Enzyme nicht in tierischen Materialien vorkämen.

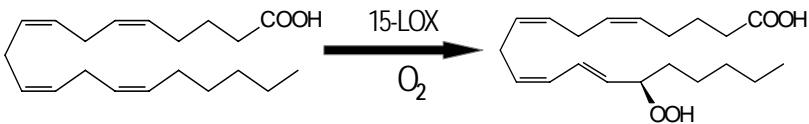
Der Autor dieses Beitrags stieß Ende 1966 als Diplomand der Biochemie zur Arbeitsgruppe von Rapoport (er gehörte übrigens zur ersten Gruppe von Studenten, die in Deutschland den Grad Diplom-Biochemiker erlangt hatten, lange bevor in Tübingen die ersten Diplom-Biochemiker der alten Bundesrepublik ausgebildet wurden). Die Aufgabe bestand in der Aufklärung der Wirkungsweise des RÜ-Hemmstoffes. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung mit Elektronentransfer-Partikeln (ETP) stellte sich heraus, dass dieses Protein bestimmte Teilreaktionen der Atmungskette unterdrückte, die auf eine Bindung an Orten auf der Innenseite der Mitochondrieninnenmembran schließen ließ. Daraus ergab sich die Frage, wie denn ein solches Protein mit einer Molmasse von ca. 80 kDa die beiden Mitochondrienmembranen passieren kann. Wir untersuchten die Wirkung von Fraktionen des Retikulozytenhämolsats auf isolierte Rattenlebermitochondrien und beobachteten dabei eine Wirkung, die wir Mitochondrienlysefaktor (MLF) nannten. Sie bestand in drastischen morphologischen Strukturveränderungen mit Freisetzung von Mitochondrienmatrixenzymen [5]. Damit schienen wir die Antwort gefunden zu haben. Wir glaubten zunächst, dass MLF und RÜ-Hemmstoff verschiedene Proteine seien, die sich in ihren Wirkungen ergänzen würden. Später stellte sich aber ihre Identität heraus. Die Auffindung der MLF-Wirkung war schließlich der Schlüssel zur Entdeckung der Lipoxygenase, denn der MLF war kaum anders als über eine Enzymwirkung zu erklären. Die naheliegende Vermutung, dass es sich um ein phospholipid- oder proteinspaltendes Enzym handeln könnte, wurde nicht bestätigt. Uns fiel aber auf, dass die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der Mitochondrien sehr ähnlich waren mit denen nach Auslösung einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation durch Eisensalze plus Vitamin C. Also prüften wir mittels des Thiobarbiturtests, ob bei der Wirkung des MLF auf die Mitochondrien Lipid-Peroxide entstehen. Der Test fiel eindeutig positiv aus; Hitzeinaktivierung des Proteins beseitigte die Wirkung. Wir wechselten das Substrat und verwendeten statt der Mitochondrien reine Phospholipide oder Linolsäure – jedesmal mit demselben positiven Ergebnis. Damit bestand kein Zweifel mehr – wir hatten es mit einer Lipoxygenase zu tun, wobei ihre Fähigkeit, außer mit freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch mit Phospholipiden und sogar biologischen Membranen zu reagieren, allerdings recht ungewöhnlich war [6]. Diese Publikation erschien nur wenige Monate nach der Beschreibung der ersten isolierten tierischen Lipoxygenase in Blutplättchen [7]. Letztere wurde jedoch in einem ganz anderen Fahrwasser entdeckt – der damals gerade aufkeimenden Eikosanoidforschung.

Die Entdeckung der Lipoxygenase in Kaninchenretikulozyten war der eigentliche Startpunkt einer bis heute andauernden erfolgreichen Lipoxygenaseforschung am Institut für Biochemie der Charité. Ohne die frühen Vor-

arbeiten Rapoports jedoch wäre es sicherlich nicht dazu gekommen. 1979 wurde die Retikulozyten-Lipoxygenase als erstes gereinigtes mammaliäres Enzym dieser Familie der Fachwelt in einer ausführlichen Publikation vorgestellt [8]. Wie der Autor dieses Beitrags später erfahren konnte, wurde sie von US-amerikanischen Eikosanoid-Experten „the GDR enzyme“ genannt.

Lipoxygenasen im Stoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren

Lipoxygenasen sind nichthämisen-enthaltende Enzyme, die den molekularen Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren einlagern, wodurch ein Hydroperoxid entsteht. Als Beispiel sei die Reaktion der 15-Lipoxygenase mit der Arachidonsäure angeführt:



Arachidonsäure (5Z,8Z,11Z,14Z-Eikosatetraensäure) ist eine für den Säugerorganismus besonders wichtige Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen, die isoliert zueinander sind und sich durchweg in *cis*-Geometrie befinden. Viele ihrer Oxygenierungsprodukte üben wichtige regulatorische Wirkungen auf die Atemwege, auf das Herz-Kreislaufsystem und viele andere wichtige Organ- und Gewebefunktionen aus. Sie werden unter dem Sammelnamen *Eikosanoide* zusammengefasst. Während die *Prostaglandine* und *Thromboxane* über eine Reaktion der Arachidonsäure mit *Cyclooxygenasen* gebildet werden, entstehen einige andere Gruppen von Eikosanoiden über lipoxygenase-abhängige Stoffwechselwege. Hier sind vor allem die *Leukotriene* zu nennen, die aus weißen Blutzellen und anderen Entzündungszellen freigesetzt werden und an einer Reihe von Erscheinungen bei Entzündungen beteiligt sind.

Strukturelle Voraussetzung für ein Lipoxygenase-Substrat ist das Vorhandensein einer 1,4-Pentadien-Struktur. Wie aus der obigen Formel ersichtlich ist, hat die Arachidonsäure dieses Strukturmerkmal gleich dreifach. Außerdem kann die Lipoxygenierung an diesem Strukturelement an zwei verschiedenen Stellen erfolgen, so dass der Sauerstoff an insgesamt 6 verschiedenen Kohlenstoffatomen (in den Positionen 5, 8, 9, 11, 12, und 15) eingebaut werden könnte. Berücksichtigt man noch die Tatsache, dass bei der Lipoxygenierung ein asymmetrisches C-Atom entsteht, wäre unter Einbeziehung der

Stereoisomeren mit 12 verschiedenen primären Lipoxygenaseprodukten der Arachidonsäure zu rechnen. Allerdings werden aufgrund der Enzymspezifitäten beim Menschen nur vier davon über echte Lipoxygenasereaktionen gebildet (die 5*S*-, 12*S*-, 12*R*- und 15*S*-Hydroperoxyeikosatetraensäuren).

Ursprünglich glaubte man, dass für jedes dieser Eikosanoide eine spezielle Lipoxygenase zuständig sei. Dies trifft aber nur eingeschränkt zu, da manche Lipoxygenasen verschiedene Produkte gleichzeitig bilden können, andererseits aber ein bestimmtes Eikosanoid durch verschiedene Lipoxygenasen entstehen kann. Die dadurch ausgelöste Verwirrung konnte durch Analyse der Lipoxygenase-Gene weitgehend beseitigt werden. Demnach besitzt der Mensch mindestens 5 verschiedene Lipoxygenasen: die 5-Lipoxygenase, die 12*S*-Lipoxygenase (Plättchentyp), die 12*R*-Lipoxygenase (Epidermistyp), die 15-Lipoxygenase-1 (Retikulozytentyp) und die 15-Lipoxygenase-2 (epidermal-epithelialer Typ). Sie bilden eine Familie strukturell verwandter Proteine, für die ein Stammbaum aufgestellt werden kann. Hinsichtlich der biologischen Funktionen einiger Lipoxygenasen gibt es lediglich Vermutungen. Am deutlichsten hebt sich die Rolle der 5-Lipoxygenase für die Biosynthese der biologisch aktiven Leukotriene und damit für Entzündungsvorgänge heraus.

Einige Lipoxygenasen reagieren nicht nur mit Arachidonsäure, sondern auch mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere mit der *Linolsäure* und der α -*Linolensäure*. Die entsprechenden Oxygenierungsprodukte werden in Analogie zu den Eikosanoiden als *Oktadekanoide* bezeichnet. Alle Oxygenierungsprodukte der Fettsäuren zusammen werden *Oxylipine* genannt; ihre Bildung in Pilzen, Algen und höheren Pflanzen erfolgt ebenfalls über lipoxygenase-abhängige Stoffwechselwege.

Hinsichtlich der Details über Vorkommen, Struktur, Genetik, Nomenklatur und Reaktionsmechanismen von Lipoxygenasen sei auf kürzliche Übersichtsarbeiten verwiesen [9–12].

Die 15-Lipoxygenase-1 – ein einzigartiges Enzym der enzymatischen Lipidperoxidation

Die an der Biosynthese von Oxylipinen beteiligten Lipoxygenasen reagieren ebenso wie die Cyclooxygenasen mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Regel nur in deren unveresterter Form. Das trifft insbesondere auf viele Eikosanoidsynthesen in Zellen des Säugerorganismus zu. Daraus folgt, dass die Arachidonsäure oder andere Fettsäuren erst durch lipidsplattendes Enzyme, wie z.B. Phospholipasen, freigesetzt werden müssen. Dies erfolgt meist über rezeptorabhängige Zellaktivierungen. Die dadurch ausgelöste Reaktionsfolge

der Eikosanoidsynthese bezeichnet man als *Arachidonsäurekaskade*. Die Arachidonsäurekaskade hat ein besonderes Interesse der modernen pharmakologischen Forschung erfahren, da in ihr die Angriffspunkte einer Reihe altbekannter (z.B. Aspirin) und neuerer entzündungshemmender Arzneimittel zu suchen sind. Auch mit Hilfe der 15-Lipoxygenasen können über die Arachidonsäurekaskade verschiedene Eikosanoide gebildet werden. Allerdings ist die biologische Bedeutung derselben umstritten, obwohl eine Reihe von biologischen Aktivitäten dieser Verbindungen beschrieben wurden [13].

Die von uns ursprünglich in Kaninchenretikulozyten entdeckte Lipoxygenase wird heute als 15-Lipoxygenase-1 oder 15-Lipoxygenase des Retikulozytentyps bezeichnet. Diese Spezifizierung machte sich erforderlich, weil beim Menschen eine zweite 15-Lipoxygenase vorkommt, die sich aber sowohl molekulargenetisch als auch hinsichtlich der Reaktionsspezifität und in der Gewebeverteilung vom Enzym des Retikulozytentyps deutlich unterscheidet [9]. Das Vorkommen der 15-Lipoxygenase-1 ist beim Menschen nicht auf die Retikulozyten beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf die Epithelien der Atemwege und die eosinophilen weißen Blutzellen. In einigen Zellen, wie z.B. den Monozyten des Blutes und den Lungenmakrophagen, wird die Expression dieses Enzyms durch bestimmte Mediatoren mit Peptidnatur, nämlich den Cytokinen Interleukin-4 und Interleukin-13 induziert [12]. Soweit sich derzeit einschätzen lässt, kommt dieses Enzym vermutlich bei allen Säugern vor; bemerkenswerterweise zeigen aber die entsprechenden Enzyme von Maus, Ratte, Schwein und Rind im Gegensatz zu Mensch und Kaninchen vorwiegend 12-Lipoxygenaseaktivität, wobei die Fähigkeit zur Reaktion mit Phospholipiden und biologischen Membranen trotzdem vorhanden ist.

Bereits in der ersten Publikation über die 15-Lipoxygenase-1 konnte über die Besonderheit berichtet werden, dass sie mit Phospholipiden und biologischen Membranen ohne Mitwirkung einer Phospholipase zu reagieren vermag [6]. Die Charakterisierung der Reaktion mit Arachidonsäure und damit die Klassifizierung als vorwiegend 15-Lipoxygenase erfolgte erst sieben Jahre später in gemeinsamer Arbeit der Berliner und einer Washingtoner Gruppe [14]. Damit hätten eigentlich ähnliche Eigenschaften bei der Lipoxygenase L-1 aus Sojabohnen, dem am besten charakterisierten pflanzlichen Enzym dieser Familie, erwartet werden müssen, die mit unveresterter Arachidonsäure oder Linolsäure ähnlich reagiert. Vergleichende Untersuchungen ergaben jedoch, dass dies nicht der Fall ist; nur unter ganz speziellen Bedingungen, wie z.B. nach Zusatz von Detergenzien, reagiert auch das pflanzliche Enzym mit Phospholipiden. Die 5-Lipoxygenase und die 12-Lipoxygenase sind als typische Enzyme der Arachidonsäurekaskade dazu überhaupt nicht in der Lage.

Später wurde in Berlin auch die Reaktion der 15-Lipoxygenase-1 und verwandter Enzyme mit *Cholesterolestern* und *Lipoproteinen* des Blutplasmas nachgewiesen [15]. Damit wird deutlich, dass die Lipoxygenasen vom Retikulozytentyp im Gegensatz zu den anderen Unterfamilien tierischer Lipoxygenasen mit sehr komplexen Substraten bis hin zu übergeordneten biologischen Strukturen reagieren. Zudem können anscheinend sämtliche natürlich vorkommenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren in freier oder veresterter Form oxyniert werden. Damit erreichen die Vertreter dieser Enzym-Unterfamilie hinsichtlich ihres Substratspektrums die höchst mögliche Universalität unter allen Lipoxygenasen. Aufgrund dieser Charakteristik erweisen sich die 15-Lipoxygenase-1 und ihre Verwandten als Katalysatoren einer *enzymatischen Lipidperoxidation*.

Die enzymatische Lipidperoxidation ist das Gegenstück zur *nicht-enzymatischen Lipidperoxidation*. Letztere kann durch reaktive Sauerstoffspezies (siehe oben) und andere freie Radikale, einige Umweltgifte (Xenobiotika) durch Spuren von Übergangsmetallionen (Cu, Fe, Mn u.a.) sowie UV-Strahlen (vor allem in der Haut) ausgelöst werden. Auf den ersten Blick sind der enzymatische und der nicht-enzymatische Prozess einander sehr ähnlich, in beiden Fällen entstehen primär *Hydroperoxylipide*. Aufgrund der fehlenden Reaktionsspezifität nicht-enzymatischer Reaktionen ist das Produktspektrum bei letzteren jedoch weitaus mannigfaltiger. Ein sicheres Kriterium für die Beteiligung von Lipoxygenasen ist daher das Überwiegen bestimmter optischer Isomeren, die mit speziellen analytischen Verfahren nachgewiesen werden können. So erbrachten H. Kühn und Mitarbeiter über die Identifizierung *stereospezifischer Lipidperoxidationsprodukte* in intakten Kaninchenretikulozyten den endgültigen Nachweis, dass die 15-Lipoxygenase-1 auch *in vivo* die Membranphospholipide direkt angreift und damit im Sinne einer enzymatischen Lipidperoxidation wirkt [16]. Diese Untersuchungen deckten aber noch eine weitere Besonderheit auf: Während in den Plasmamembranen der Zellen fast ausschließlich Lipoxygenaseprodukte nachgewiesen wurden, traten in den Mitochondrienmembranen auch Produkte auf, die dem nicht-enzymatischen Prozess zuzuordnen sind. Dies ließ sich auch *in vitro* mit reiner 15-Lipoxygenase-1 simulieren. Die plausible Erklärung dafür ist, dass die lipoxygenase-vermittelte Lipidperoxidation eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation sekundär nach sich zieht. Interessanterweise gilt auch das Umgekehrte: Damit die Lipoxygenase aus ihrem Ruhezustand in das aktive Enzym überführt wird, werden geringe Mengen Hydroperoxylipide benötigt, die durchaus über den nicht-enzymatischen Weg entstehen können. Weiterhin können unspezifische Lipidperoxidationsprodukte über einen Mischtyp von enzymatischer und nicht-enzymatischer Katalyse entstehen, nämlich indem zwar der erste Reaktionsschritt enzymatisch abläuft, die folgenden hin-

gegen nicht-enzymatisch nach Abdissoziation des Zwischenprodukts vom aktiven Zentrum des Enzyms. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen enzymatischer und nicht-enzymatischer Lipidperoxidation, welche unter den Bedingungen des oxidativen Stresses begünstigt sind [12], erschweren natürlich die Untersuchung solcher Vorgänge. Wie bereits erwähnt, ist der Nachweis der entsprechenden spezifischen Produkte ein eindeutiges Kriterium für eine Beteiligung von Lipoxygenasen; umgekehrt schließt aber der Nachweis unspezifischer Lipidperoxidationsprodukte eine solche nicht aus.

Die 15-Lipoxygenase-1 und die Reifung roter Blutzellen

Die Beobachtung, dass außer Lipoxygenaseprodukten auch Produkte einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation in den Mitochondrien, nicht aber in den Plasmamembranen unreifer roter Blutzellen auftreten, ist wohl der Schlüssel zur Antwort auf eine Frage, die sich uns frühzeitig aufdrängte, als Rapoport und der Autor dieses Beitrags über die Rolle der 15-Lipoxygenase-1 beim reifungsbedingten Abbau der Mitochondrien in Retikulozyten nachzudenken begannen [17, 18]: Wie erklärt sich, dass bei der Reifung der Zellen selektiv die Mitochondrien, nicht aber die Plasmamembranen verschwinden, wo doch die 15-Lipoxygenase-1 beide Membrantypen angreift? Die Gegenwart von Cholesterol in den Plasmamembranen erhöht zwar deren Resistenz gegenüber der 15-Lipoxygenase-1, kann dies allein aber nicht befriedigend erklären. Die entscheidende Rolle dürfte eher der lipoxygenase-induzierten *nicht*-enzymatischen Lipidperoxidation zukommen, die selektiv bei den Mitochondrienmembranen auftritt. Das erhebliche Ausmaß der letzteren konnte nicht nur aus der Menge der entsprechenden Lipidperoxidationsprodukte abgeleitet werden, sondern auch aufgrund des Auftretens eines überschüssigen Sauerstoffverbrauchs sowie einer Kooxidation von Proteinen ausschließlich in den Mitochondrienmembranen; für die mitochondriale Selektivität dieser Prozesse ist allem Anschein nach über seine Semichinonradikalform das Ubichinon verantwortlich [19], das in den Plasmamembranen nicht vorkommt. Bemerkenswerterweise ist das Ubichinon ein essentieller Bestandteil des Elektronentransfersystems der Atmungskette und übt über seine reduzierten Formen auch antioxidative Funktionen aus, indem es bestimmte Formen der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation zu hemmen vermag und so die empfindliche Maschinerie der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung schützt. Seine Rolle beim Abbau der Mitochondrien im Wechselspiel mit der 15-Lipoxygenase-1 ist hingegen als prooxidativ einzuordnen.

Nun bestehen Mitochondrien sowohl aus Proteinen als auch aus Lipiden. Primäres Substrat der Lipoxygenase sind ausschließlich die Lipide. Daraus folgt, dass der Abbau der Proteine in den Mitochondrien irgendwie mit dem Angriff der 15-Lipoxygenase-1 auf die Lipide gekoppelt sein muss. Dies konnte Rapoport in Zusammenarbeit mit W. Dubiel und M. Müller direkt nachweisen; eine Reihe von Lipoxygenasehemmern unterdrücken nämlich die ATP- und ubiquitin-abhängige Proteolyse der Mitochondrienproteine, ohne auf dieses proteasomale System direkt zu wirken [8]. Schon zuvor war von anderen Autoren postuliert worden, dass eine Funktion der proteasomalen Proteolyse darin bestehen könnte, fehlerhafte und geschädigte Proteine zu eliminieren. Dabei wurde eher an zufällig entstandene Fehlbildungen der Proteine gedacht. Sie entstehen offenbar aber auch als biologisch programmierter Prozess durch oxidative Modifizierung der Mitochondrienproteine als Folge des Angriffs der 15-Lipoxygenase-1 auf die Mitochondrienlipide und dadurch bedingter sekundärer Kooxidation.

Über eine solche kooxidative Veränderung von Proteinen erklärt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Inaktivierung des mitochondrialen Elektronentransfersystems – eine Eigenschaft der 15-Lipoxygenase-1, die zu ihrer Entdeckung führte (siehe oben). Eine Reihe von Beobachtungen belegen, dass es sich dabei um einen sekundären Effekt handeln muss. Zum einen schützen bestimmte Komplexbildner wie EDTA vor der Inaktivierung des Elektronentransfersystems, die jedoch ohne Wirkung auf die Lipoxygenaseaktivität selbst sind; aus diesem Grunde zweifelte Rapoport anfangs noch an der Identität von „RÜ-Hemmstoff“ und 15-Lipoxygenase-1. Zum anderen verstärken Autoxidationskatalysatoren, wie z.B. Hämoglobin, die Inaktivierung des Elektronentransfersystems durch 15-Lipoxygenase-1 [20].

Der Angriff der 15-Lipoxygenase-1 auf die Mitochondrien in Retikulozyten ist seiner Natur nach eine Lipidperoxidation, die in den Lehrbüchern zumeist als ein unerwünschter Schadprozess definiert wird. Für den reifungsbedingten Abbau der Mitochondrien in Retikulozyten kommt man aber man mit einer Betrachtung als Schadprozess in Schwierigkeiten. Dieser Vorgang ist biologisch programmiert und ähnelt in dieser Hinsicht der heute viel untersuchten Apoptose von Zellen, worunter man den biologisch programmierten Zelluntergang versteht. Der reife Erythrozyt benötigt als hoch spezialisierte Zelle keine Mitochondrien mehr. Die Verzögerung ihres Abbaus würde eher eine Funktionsbeeinträchtigung der roten Blutzelle nach sich ziehen. Außerdem setzt nach dem Angriff der Lipoxygenase auf die Mitochondrien auch ein Abbau der Proteine ein. Dabei werden Aminosäuren freigesetzt, die teils zur Energiegewinnung, teils als Bausteine für die Hämoglobinsynthese in Retikulozyten herangezogen werden. Rapoport nannte einmal diese „nützliche“ Art einer Schädigung „teleonomic regulated

damage to mitochondria“ und überschrieb so einen Vortrag, den er 1983 auf einem EMBO-Workshop zum Thema „Oxidative damage and related enzymes“ hielt. Da die Teilnehmer dieses Workshops aus zumeist westlichen Ländern keine Kenntnisse der Leninschen Philosophie hatten, kannten sie den Begriff „teleonomic“ nicht und Rapoport musste ihnen den Unterschied zwischen „teleonomic“ und „teleologic“ erklären.

15-Lipoxygenase-1 und Atherosklerose

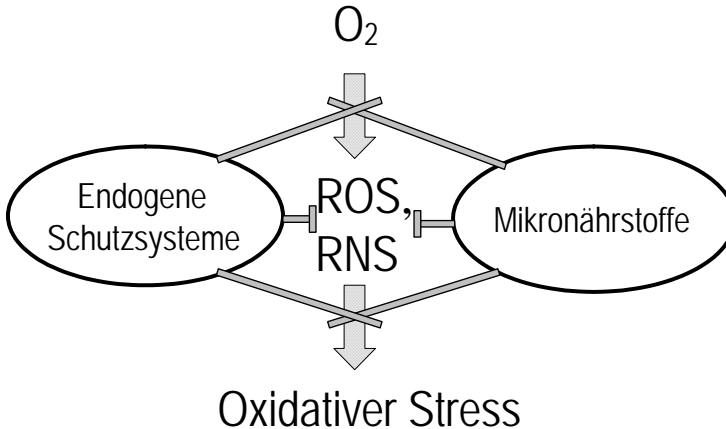
Als Enzym der enzymatischen Lipidperoxidation wurde die 15-Lipoxygenase-1 auch mit der Entstehung der *Atherosklerose* in Verbindung gebracht. Die Entstehungsursachen dieser ziemlich weit verbreiteten Zivilisationskrankheit sind trotz intensiver Forschung noch umstritten. Unter den verschiedenen Vorstellungen findet heute die *Oxidationshypothese* [21] besondere Beachtung. Danach liegt der Schlüssel im Low-density Lipoprotein (LDL), das in Frühstadien der Atherosklerose oxidativ modifiziert wird und dadurch anstatt über die gut regulierten LDL-Rezeptoren über sogenannte Scavenger-Rezeptoren von den Zellen des Aortaendothels aufgenommen wird. Unklar ist jedoch, wodurch das LDL oxidiert wird und wie dieser Prozess ausgelöst wird. Es wurden verschiedene Faktoren herausgefunden, die für die Oxidation des LDL *in vivo* in Frage kommen. Neben Übergangsmetallionen, Thiolen und Peroxynitrit gehören auch einige prooxidative Enzyme dazu, vor allem Lipoxygenasen und die Myeloperoxidase [22].

Die Beteiligung der 15-Lipoxygenase-1 an der Ausbildung der atherosklerotischen Schädigungsariele in den Blutgefäßen wird durch die Arbeiten der Berliner Gruppe von H. Kühn und anderer Autoren stark gestützt. Unklar ist jedoch, ob dieses Enzym ursächlich mit der Entstehung der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden kann oder eher Ausdruck einer Gegenregulation ist, da die experimentellen Daten sowohl auf proatherogene als auch antiatherogene Wirkungen hindeuten [23]. Die Klärung dieser Frage ist von prinzipieller Bedeutung für die Medizin, denn es kann daraus abgeleitet werden, ob es Sinn hat, spezifische Hemmer der 15-Lipoxygenase-1 für die Prävention und Therapie atherosklerotischer Erkrankungen einzusetzen. Kürzliche Arbeiten an Mäusen, bei denen das Gen für das entsprechende Enzym zerstört wurde („Knockout-Mäuse“) stützen die Annahme der antiatherogenen Wirkung, die aber aufgrund der neuesten Arbeit einer Erfurter Gruppe für den Menschen wieder in Zweifel gestellt werden muss [24].

Die Nahrung als Quelle antioxidativer Schutzstoffe

Wie eingangs erwähnt, gehen die biochemischen Reaktionen des Sauerstoffs mit einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einher, die bei verstärkter Bildung zum oxidativen Stress führen können. Der oxidative Stress steht im Zusammenhang mit der Genese vieler Krankheiten, darunter den häufigen Herzkreislauferkrankungen. Dass gerade bei der Prävention dieser die Ernährung eine wichtige Rolle spielt, ist seit langem bekannt. Man hat aber neben den Nahrungsfetten zunächst nur den antioxidativen Vitaminen C, E und A besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Wir wissen aber inzwischen, dass gerade in pflanzlichen Nahrungsmitteln außerdem eine Reihe von Polyphenolen unterschiedlicher chemischer Struktur vorkommen, die maßgeblich am antioxidativen Schutz unter den Bedingungen eines oxidativen Stresses beteiligt sind; denn die endogenen antioxidativen Schutzsysteme reichen nicht immer aus, das gestörte Gleichgewicht zwischen Bildung und Beseitigung der reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) wieder herzustellen. Hier hilft uns aber die Nahrung, sofern wir uns gesundheitsbewusst ernähren. So enthalten insbesondere pflanzliche Nahrungsmittel eine Vielzahl von natürlichen Antioxidanzien. Sie werden heute unter dem Begriff *Mikronährstoffe* zusammengefasst. Manche Autoren vergleichen sie sogar mit Arzneimitteln und haben deshalb den Namen „*Nutraceuticals*“ (aus „*nutrient*“ und „*pharmaceuticals*“) geprägt [25]. Die Verhältnisse werden in nachfolgendem Schema dargestellt. Die antioxidativen Schutzsysteme verhindern entweder die Bildung der ROS und RNS (obere Balken), beseitigen sie durch

Abfangreaktionen (mittlere Balken) oder blockieren die schädigenden Wirkungen der ROS und RNS (untere Balken).



Eine wichtige Gruppe dieser Mikronährstoffe sind die Flavonoide (zur chemischen Struktur und Bedeutung der Flavonoide siehe auch den Beitrag von Frau G. Jacobasch in diesem Band). Sie sind neben anderen Polyphenolen (darunter versteht man Verbindungen, die mehr als eine Hydroxylgruppe am aromatischen Ringsystem enthalten) in pflanzlichen Nahrungsmitteln ziemlich weit verbreitet. Die täglich aufgenommene Menge an Polyphenolen ist nicht unbeträchtlich. Eine kürzliche niederländische Studie hat ergeben, dass durchschnittlich 50 mg *Flavanole* (auch Catechine genannt), 23 mg *Flavonole* und *Flavone* (hauptsächlich Quercetin) sowie etwa 500 bis 1000 mg *Zimtsäurederivate* (Kaffeensäure und verwandte Verbindungen) täglich aufgenommen werden. Damit übersteigt die Zufuhr von Polyphenolen die tägliche Aufnahme der Vitamine C und E um eine Größenordnung. Sie hängt natürlich stark von individuellen Ernährungsgewohnheiten und regionalen Traditionen ab. Wichtigste Quellen für Flavonoide sind roter Traubensaft und Rotwein, grüner und schwarzer Tee, Kakao und Schokolade, diverse Obstarten und Fruchtsäfte sowie grüne Pflanzenteile und Zwiebeln, wohingegen Kaffee und wiederum Tee außerordentlich reichhaltige Quellen für Zimtsäurederivate sind.

Diese Polyphenole entfalten ihre antioxidativen Wirkungen auf drei Ebenen:

1. Abfangen von freien Radikalen sowie von reaktiven O- und N-Spezies;

2. Komplexierung von Metallionen (Fe, Cu u.a.) und somit Maskierung ihrer prooxidativen Eigenschaften;
3. Hemmung von prooxidativen Enzymen: Lipoxygenasen, PGH-Synthasen, NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase, Xanthinoxidase, Cytochrom P-450-Enzyme.

Während die beiden erstgenannten Ebenen sehr intensiv untersucht wurden und Gegenstand zahlreicher Publikationen und Monographien sind [26], besteht hinsichtlich der dritten Ebene noch ein Nachholbedarf. Unsere Arbeitsgruppe in Düsseldorf wandte sich deshalb den Lipoxygenasen und der Myeloperoxidase zu.

Flavonole des Kakaos als Lipoxygenasehemmer

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war ein Bericht in der Literatur, wonach nach Gabe einer besonders flavanolreichen Schokoladensorte bei den Probanden deutliche Veränderungen in den Plasmaspiegeln der Eikosanoide auftraten, und zwar in einer Richtung, die für das Herzkreislaufsystem günstig erschien. Während die Konzentration der sogenannten *Cysteinylleukotriene* erniedrigt wurde, stieg der *Prostacyclinmetabolit* an [27]. Die Leukotriene sind Entzündungsmediatoren und schädlich für das Blutgefäßsystem. Das Prostacyclin hingegen ist ein kurzlebige Eikosanoid, welches das Gefäßsystem und die Herzfunktionen in mehrfacher Weise schützt. So können z.B. seine Wirkungsmechanismen einem Herzinfarkt vorbeugen. Da das entsprechende Enzym für die Prostacyclinsynthese besonders oxidationsempfindlich ist, kann oxidativer Stress eine verminderte Prostacyclinbildung mit erhöhtem Herzinfarktisiko zur Folge haben.

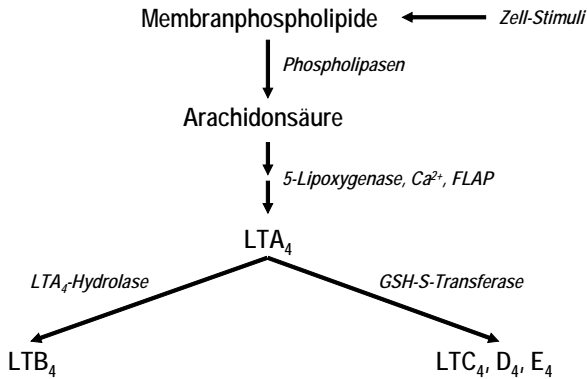
Während der Anstieg des Prostacyclins nach Flavonoidzufuhr vermutlich auf einem antioxidativen Schutz des betreffenden Enzyms beruht, war die Ursache der Erniedrigung der Leukotriene unklar. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Biosynthese der Leukotriene über den 5-Lipoxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade (siehe nachfolgendes Schema). Die 5-Lipoxygenase katalysiert dabei zwei aufeinanderfolgende Schritte der Umwandlung der durch Phospholipasen freigesetzten Arachidonsäure zu Leukotrien A₄ (LTA₄). Damit drängte sich uns die Frage auf, ob der Anti-Leukotrien-Effekt von flavanolreicher Schokolade die Folge einer Hemmung der 5-Lipoxygenase ist. Wie aus dem Schema ersichtlich ist, kämen prinzipiell auch andere Schritte der Arachidonsäurekaskade als Angriffspunkt der Flavonole in Frage. Wir prüften dies an rekombinanter humaner 5-Lipoxygenase, die bei H. Kühn verfügbar war.

Die Flavanole des Kakaos stellen ein Gemisch von Monomeren und Oligomeren dar. Die Monomerenfraktion besteht hauptsächlich aus (–)-Epicatechin und (+)-Catechin. Die Oligomeren werden auch Procyanidine genannt und entstehen durch kovalente Verknüpfung von Epicatechinmolekülen [28]. Im Gegensatz zu den monomeren Flavanolen und in geringem Maße den Dimeren werden die übrigen Procyanidine anscheinend nicht im Dünndarm resorbiert. Allerdings werden die Procyanidine bei der Magen-Darm-Passage gespalten. Daher findet man im Blutplasma hauptsächlich Metabolite des (–)-Epicatechins.

Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass (–)-Epicatechin dosisabhängig beide lipoxygenase-katalysierten Teilschritte der LTA_4 -Synthese im vergleichbaren Ausmaß hemmt [29].

Diese Beobachtung sprach dafür, dass das Flavanol direkt mit dem Enzymprotein in Wechselwirkung tritt. Damit war zu vermuten, dass auch andere Lipoxygenasen gehemmt würden. Erwartungsgemäß konnten wir entsprechende Hemmungen der 12-Lipoxygenase der Blutplättchen des Menschen sowie der 15-Lipoxygenase-1 aus Kaninchenretikulozyten nachweisen [30]. Lediglich die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 erwies sich als unempfindlich, wurde aber durch andere Flavonoide wie das im grünen Tee vorkommende (–)-Epigallocatechingallat gehemmt [30].

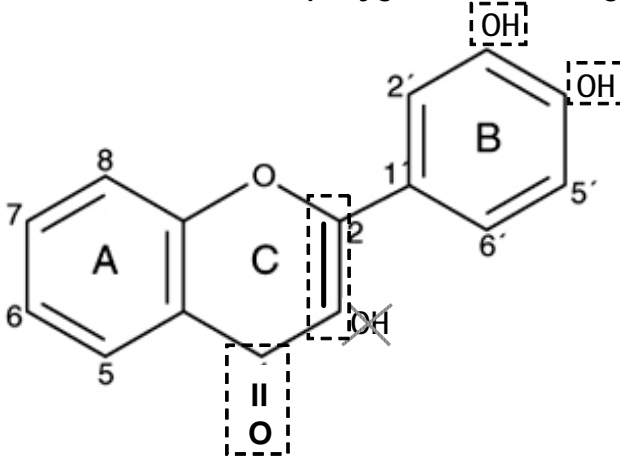
Der 5-Lipoxygenase-Weg



Sehr unterschiedlich verhielten sich die aus den Samen des Kakaobaums isolierten Fraktionen von Procyanidinen. Während die 5-Lipoxygenase nur durch die Dimeren-Fraktion und die anderen kürzeren Oligomeren nennenswert gehemmt wurde [29], nahm die Wirksamkeit auf die 15-Lipoxygenase-1 vom Monomer zu den Tetrameren ebenfalls ab, stieg aber nach Durchlaufen dieses Minimums mit den höheren Oligomeren wieder an, so dass bei der Nonameren- und Dekameren-Fraktion die stärksten Hemmungen beobachtet wurden [30]. Ob dieser Wirkung der höheren Procyanidine eine biologische Bedeutung zukommt, ist unbekannt. Allerdings stellten wir bei Untersuchungen zum Lipoxygenasestoffwechsel intakter Zellen in Übereinstimmung mit anderen Autoren fest, dass die höheren Procyanidine nicht ohne weiteres in die Zellen einzudringen vermögen. Da sie mit Ausnahme einer sehr niedrigen Konzentration an Dimeren auch nicht im Blutplasma zu finden sind, müsste ihre direkte biologische Wirkung auf den gastrointestinalen Raum beschränkt sein, sofern es überhaupt eine gibt.

Um Einblicke darüber zu bekommen, welche strukturellen Merkmale der sehr heterogenen Naturstoffklasse der Flavonoide zur Hemmung von Lipoxygenasen beitragen, untersuchten wir ein repräsentatives Spektrum von Flavonoiden sowohl auf die 15-Lipoxygenase-1 als auch auf die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 [31]. Die aus diesen Daten sich ableitenden Schlussfolgerungen sind im folgenden Schema dargestellt:

Strukturelle Voraussetzungen der Flavonoide für die Lipoxygenasehemmung



Die mit den gestrichelten Kästchen gekennzeichneten Gruppierungen begünstigen die Lipoxygenasehemmung. Es sind dies die Carbonylgruppe am C-4 und die 2,3- Doppelbindung im C-Ring sowie die Catecholgruppierung am B-Ring. Dagegen ist die OH-Gruppe am C-3, die ein Charakteristikum der Flavonole ist, zu der das ubiquitäre Quercetin gehört, eher störend. So erwies sich das zu den Flavonen zählende *Luteolin*, das sich vom Quercetin lediglich durch das Fehlen eben dieser Gruppe unterscheidet, als das wirksamste von uns getestete Flavonoid. *Luteolin* kommt in Artischocken, Sellerie, Petersilie, Löwenzahn, Rosmarin und einigen Arzneipflanzen (Johanniskraut, Kamille, Melisse, Reseda) vor.

Flavonoide und Myeloperoxidase

Wie bereits erwähnt, ist an der zur Atherosklerose führenden oxidativen Modifizierung des LDL anscheinend auch die *Myeloperoxidase* (MPO) beteiligt. Dieses Enzym kommt in weißen Blutzellen vor und erfüllt eine wichtige Funktion bei der Abtötung von in den Organismus eingedrungenen Fremdkörpern. Bei Entzündungen jedoch wird dieses Enzym aus den Zellen freigesetzt und kann Schädigungen der betroffenen Gewebe verursachen. Bis vor kurzem glaubte man noch, dass die Wirkung der MPO ausschließlich auf der

Bildung von unterchloriger Säure (HOCl) aus Chlorid und Wasserstoffperoxid beruhe. Inzwischen gilt jedoch als sicher, dass dieses Enzym außerdem Nitrit (NO_2^-) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zum sehr reaktiven NO_2^- -Radikal oxidiert. Wir konnten zeigen, dass das MPO/Nitrit-System eine Lipidperoxidation im LDL verursacht, wohingegen das entsprechende System mit Chlorid kaum eine Wirkung zeigt. Epicatechin, Quercetin und einige andere Flavonoide hemmten dosisabhängig die MPO/Nitrit-abhängige Lipidperoxidation im LDL [32]. Interessanterweise konnten wir auch zeigen, dass die Flavonoide selbst Substrate der MPO sind. Damit konnten wir erstmals Wechselwirkungen der Flavonoide mit diesem prooxidativen Enzym nachweisen, die zu den gesundheitsfördernden Wirkungen dieser Mikronährstoffe beitragen könnten.

Literatur

- [1] Rapoport, S.M., Müller, M. (1974): The influence of methylene blue on the respiratory metabolism of the reticulocyte. *Eur. J. Biochem.* 46: 335–340.
- [2] Sies, H. (1985): Oxidative stress: Introductory remarks. In: *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.) Academic Press, London, UK, pp.1–8.
- [3] Rapoport, S., (1955): Biochemische Vorgänge bei der Erythrocytenreifung: Über einen Hemmstoff des Succinatyoxdase-Systems in Reticulocyten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 302: 167–173.
- [4] Rapoport, S., Gerischer-Mothes, W., Nieradt, C. (1955): Hämin-katalysierte Oxidation ungesättigter Fettsäuren im Blut anämischer Kaninchen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 200: 174–187.
- [5] Schewe, T., Krause, W., Halang, W., Rapoport, S.M (1975): On a factor lysing mitochondria in rabbit reticulocytes. VII. Internationales Symposium über Struktur und Funktion der Erythrozyten, Berlin, 1973 In: *Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR, Akademie-Verlag Berlin*, pp. 609–615.
- [6] Schewe, T., Halang, W., Hiebsch, C., Rapoport, S.M. (1975): A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett.* 60: 149–152.
- [7] Nugteren, D.H. (1975): Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 280: 299–307.
- [8] Rapoport, S.M., Schewe, T., Wiesner, R., Halang, W., Ludwig, P., Janicke-Höhne, M., Tannert, C., Hiebsch, C., Klatt, D. (1979): The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur. J. Biochem.* 96: 545–561.
- [9] Brash, A.R. (1999): Minireview: Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274: 23679–23682.

- [10]Kühn, H., Thiele, B.J. (1999): Minireview: The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 449: 7–11.
- [11]Kühn, H., Borchert, A. (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation. The regulatory interplay between lipid peroxidizing and peroxy-lipid reducing enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 154–172.
- [12]Schewe, T. (2002): 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol. Chem.* 383: 365–374.
- [13]Kühn, H. (1996): Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog. Lipid Res.* 35: 203–226.
- [14]Bryant, R.W., Bailey, J.M., Schewe, T., Rapoport, S.M. (1982): Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 257: 6050–6055.
- [15]Belkner, J., Wiesner, R., Rathman, J., Barnett, J., Sigal, E., Kühn, H. (1993): Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. *Eur. J. Biochem.* 213: 251–261.
- [16]Kühn, H., Belkner, J., Wiesner, R. (1990): Subcellular distribution of lipoxygenase products in rabbit reticulocyte membranes. *Eur. J. Biochem.* 191: 221–227.
- [17]Rapoport, S.M. Schewe, T. (1986): The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 864: 471–495.
- [18]Rapoport, S.M., Schewe, T., Thiele, B.J. (1990): Maturational breakdown of mitochondria and other organelles in reticulocytes. In: *Blood Cell Biochemistry, Vol. 1: Erythroid Cells* (Harris, J.R., ed.), Plenum Press, New York, pp. 151–194.
- [19]Schnurr, K., Hellwing, M., Seidemann, B., Jungblut, P., Kühn, H., Rapoport, S.M., Schewe T. (1996): Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases: the role of ubiquinone. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 11–21.
- [20]Schewe, T., Hiesch, C., Ludwig, P., Rapoport, S.M. (1983): Haemoglobin potentiates the respiration-inhibitory action of lipoxygenases via its pseudolipohydroperoxidase activity. *Biomed. Biochim. Acta* 42: 789–803.
- [21]Steinberg, D. (1997): Low-density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272: 20963–20966.
- [22]Berliner, J.A., Heinecke, J.W. (1996): The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 707–727.
- [23]Kühn, H., Chan, L. (1997): The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis. Pro- and/or antiatherogenic action. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 111–117.
- [24]Spanbroek, R., Gräbner, R., Lötzer, K., Hildner, M., Urbach, A., Rühling, K., Cohnert, T.O., Wahlers, T., Zieske, A., Plenz, G., Robenek, H., Salbach, P., Kühn, H., Rådmark, O., Samuelsson, B., Habenicht, A.J.R. (2003): The 5-lipoxygenase pathway constitutes circuits of inflammation during human atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck.

- [25]Krämer, K., Hoppe, P.-P., Packer, L., eds. (2001): *Neutraceuticals in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [26]Rice-Evans, C.A., Packer, L., eds. (1997): *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [27]Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L. (2001): Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 36–40.
- [28]Haslam, E. (1998): *Practical Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- [29]Schewe, T., Kühn, H., Sies, H. (2002): Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* 132: 1825–1829.
- [30]Schewe, T., Sadik C., Klotz L.O., Yoshimoto, T., Kühn, H., Sies, H. (2001): Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol. Chem.* 382: 1687–1696.
- [31]Sadik, C.D., Sies, H., Schewe, T. (2003): Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids. Structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* 65: im Druck.
- [32]Kostyuk, V.A., Kraemer, T., Sies, H., Schewe, T. (2003): Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. *FEBS Lett.*, im Druck.