

4. Ergebnisse

4.1 Plazenta

4.1.1 Umsatzversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren und ungesättigten Fettsäuren

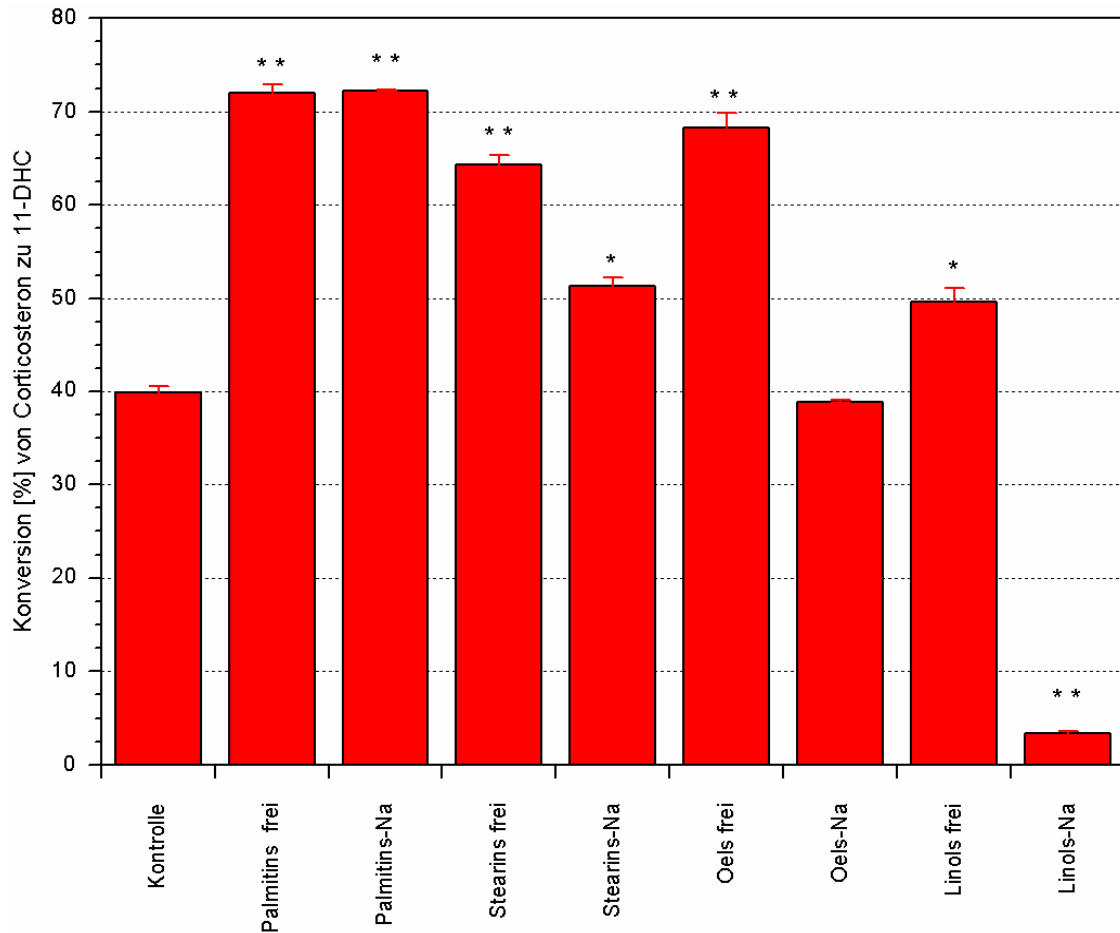


Abb. 4.1.1: Umsatzversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und als Na^+ -Salze. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l, Proteinkonzentration $20 \mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Die Umsatzversuche mit Plazenta-Homogenat unter Zugabe von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren ermittelten im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz von Fettsäuren eine signifikant erhöhte Konversionsrate von Corticosteron zu 11-DHC in den Versuchen mit freier Palmitinsäure (+81%, $p < 0,005$) und Palmitinsäure- Na^+ (+82%, $p < 0,005$) in fast identischem Ausmaß.

In geringerem Maße erhöht auch die Zugabe von Stearinsäure die Konversionsrate mit einem Überwiegen der freien Fettsäure (+62%, $p < 0,005$) gegenüber dem entsprechenden Na-Salz (+29%, $p < 0,05$).

Freie Ölsäure und freie Linolsäure steigern den Umsatz ebenfalls, wobei die steigernde Wirkung von freier Ölsäure (+71%, $p < 0,005$) ausgeprägter als die von freier Linolsäure (+25%, $p < 0,05$) ist.

Die Na^+ -Salze von Ölsäure und Linolsäure bewirken eine signifikante Verminderung der Konversionsrate mit einer deutlicheren Hemmwirkung von Linolsäure- Na^+ (-92%, $p < 0,005$) im Vergleich zu Ölsäure- Na^+ (-2%).

4.1.2 Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol in verschiedenen Konzentrationen.

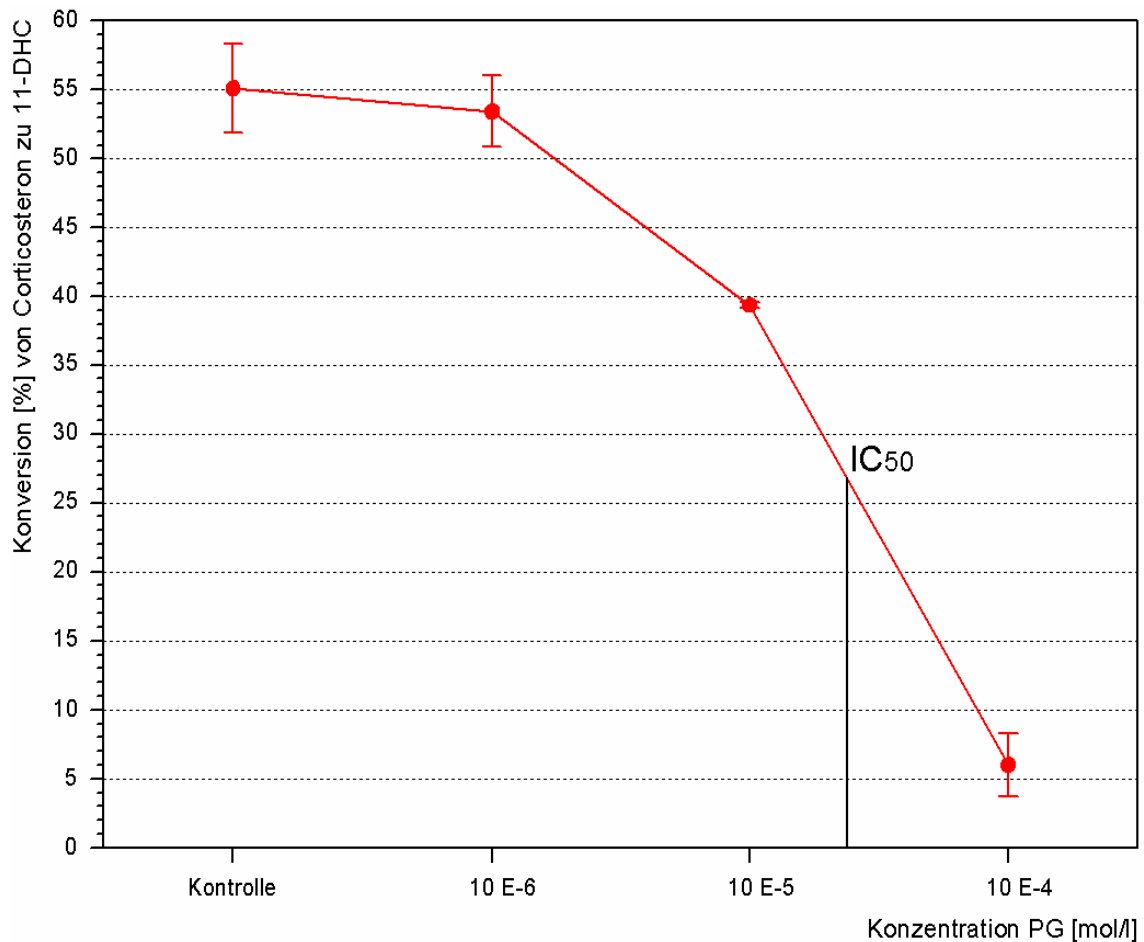


Abb. 4.1.2: Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG) in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Corticosteron-Konzentration $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 20 min., jeder Versuch $n=3$.

Die Hemmkinetik von Plazenta-Homogenat mit Zusatz von PG zeigte im Vergleich zur Kontrollprobe ohne PG eine konzentrationsabhängige Hemmung mit einem IC_{50} von ca. $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

4.1.3 Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol in Abhängigkeit der Zeit

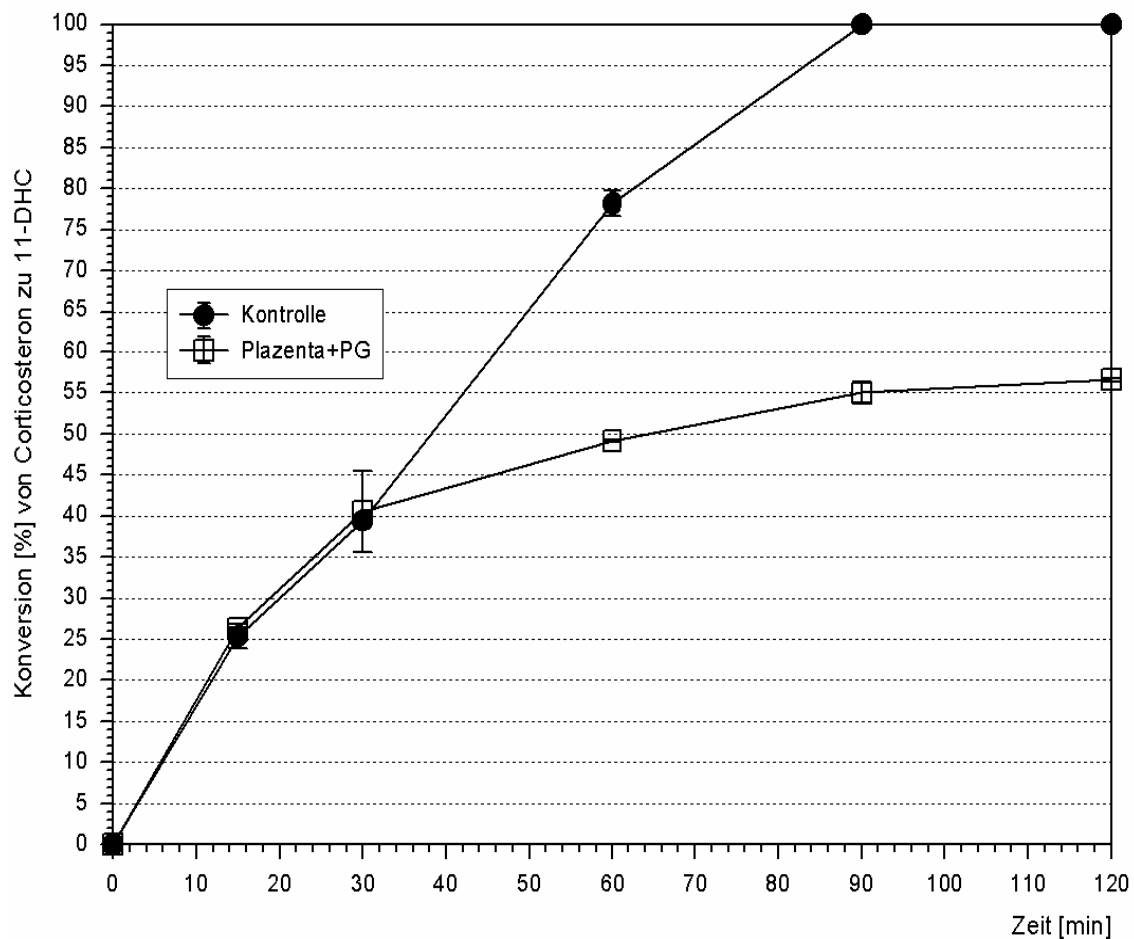
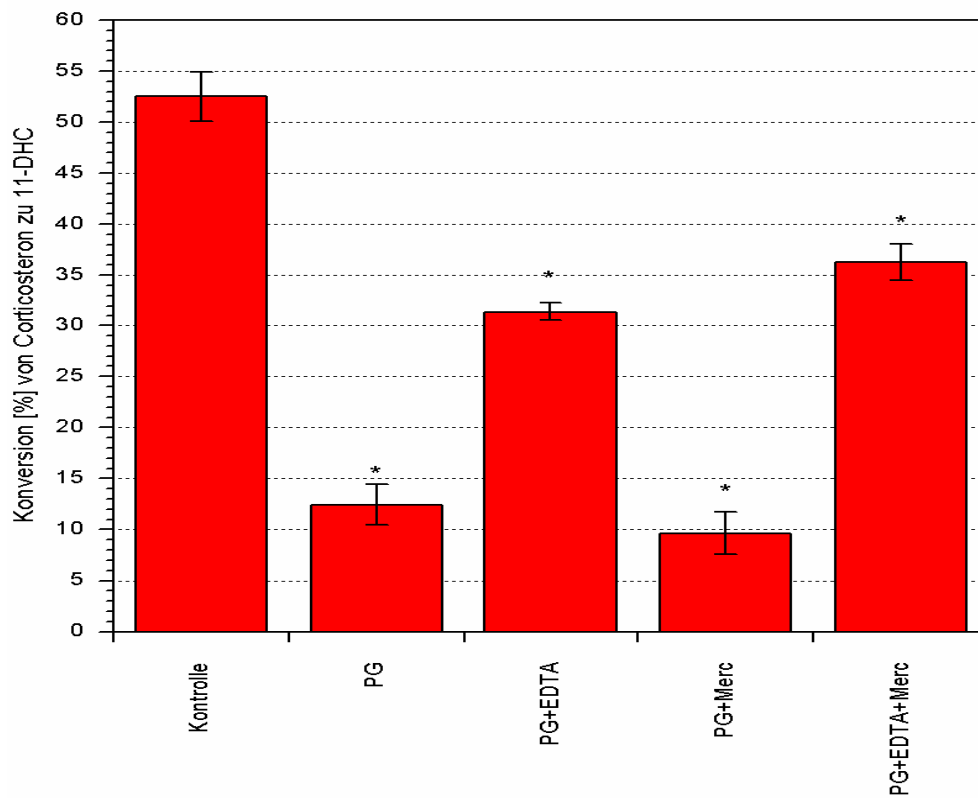
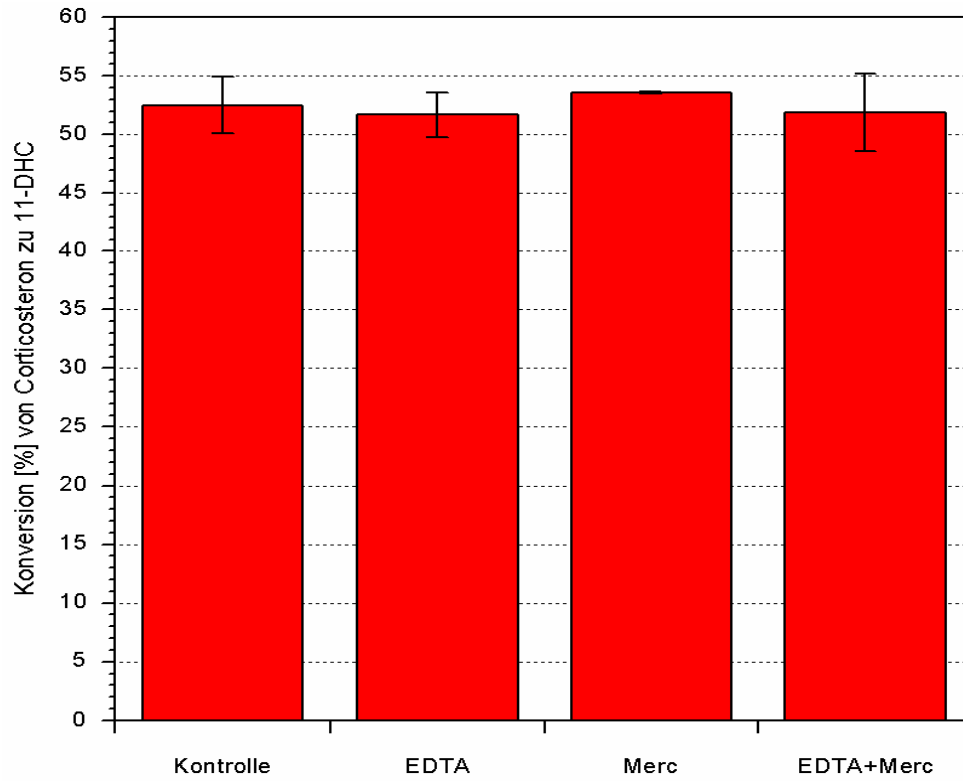


Abb. 4.1.3: Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG) in Abhängigkeit der Zeit. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM. Konzentration Phosphatidylglycerol $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 μ g/600 μ l, jeder Versuch n=3.

Der zeitabhängige Hemmversuch mit Plazenta-Homogenat und PG zeigt im Vergleich zu den Versuchen ohne Zugabe von PG eine Hemmwirkung, die sich erst nach Ablauf von ca. 30 Minuten einstellt.

4.1.4 Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol, Linolsäure-Na⁺, Stearinsäure-Na⁺ und EDTA bzw. Mercaptoethanol



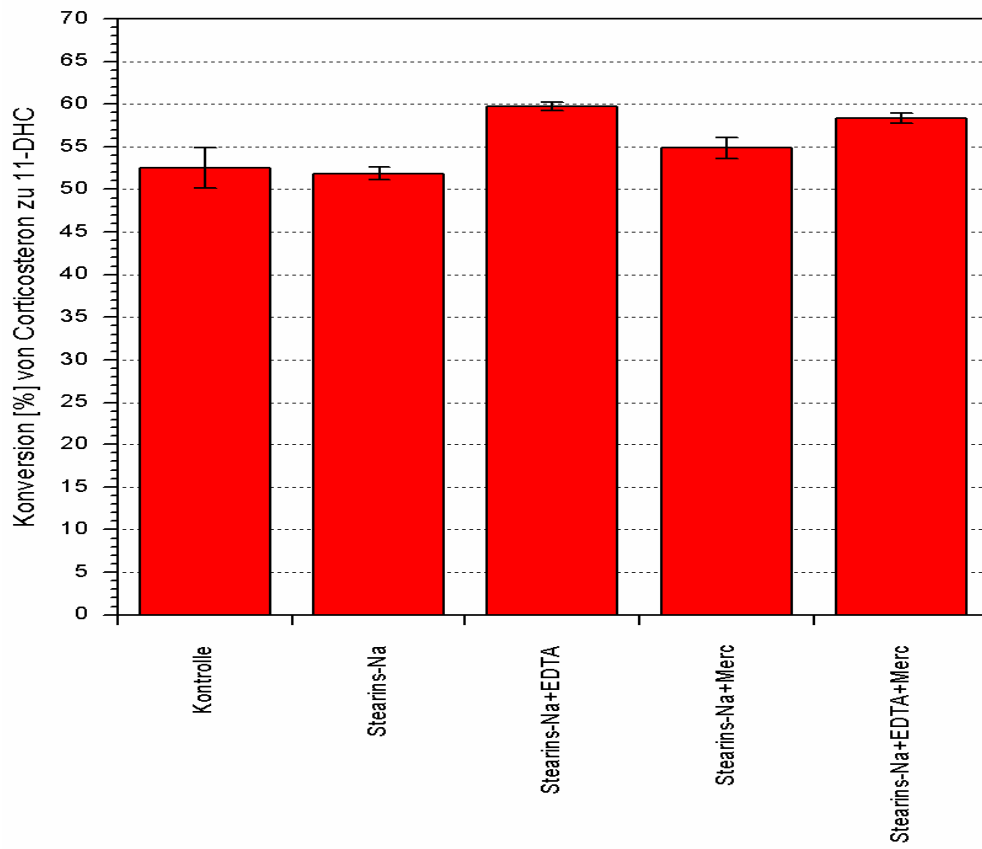
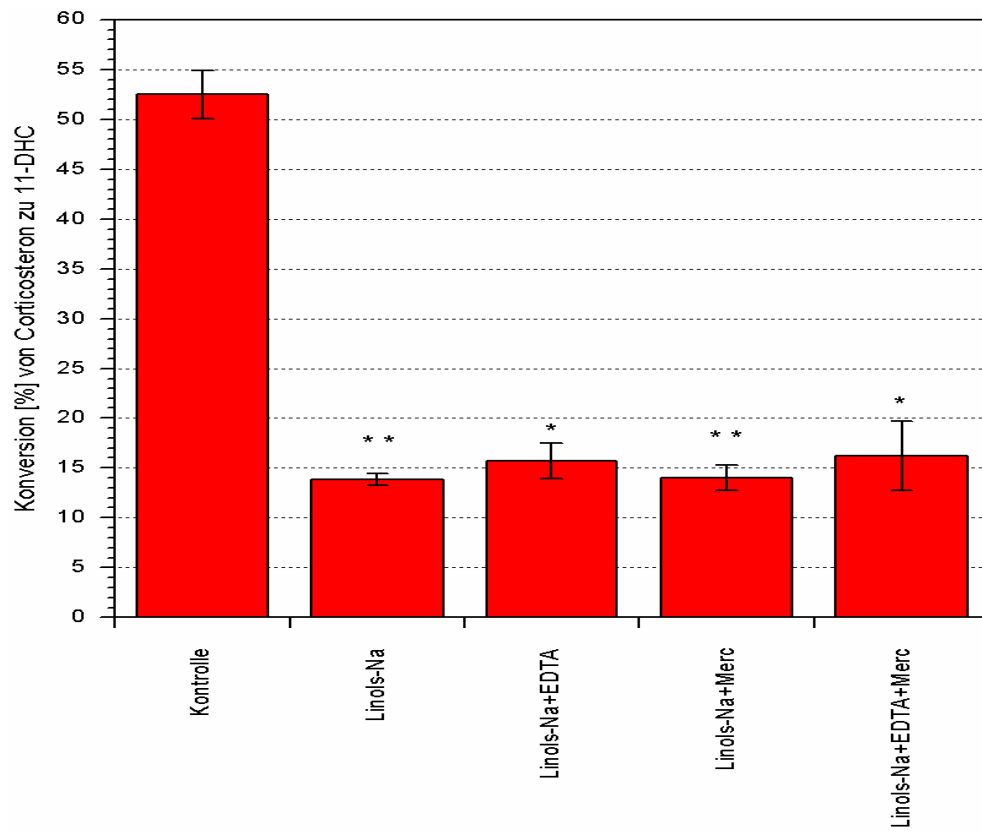


Abb. 4.1.4: Hemmversuch Plazenta-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG), Linolsäure-Na⁺, Stearinsäure-Na⁺ und EDTA bzw. Mercaptoethanol (Merc).
 Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM.
 * = p < 0,05, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Lipide 5*10⁻⁵ mol/l,
 Corticosteron-Konzentration 2*10⁻⁷ mol/l, Proteinkonzentration 20 µg/600 µl,
 Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Die Umsatzversuche von Plazenta-Homogenat mit Zusatz von EDTA, Mercaptoethanol bzw. beider Substanzen in der Konzentration von je 1*10⁻³ mol/l ermittelten keine signifikanten Änderungen der Konversionsrate im Vergleich zur Kontrollprobe, der weder EDTA noch Mercaptoethanol zugesetzt war.

Bei Zugabe von PG in der Konzentration von 5*10⁻⁵ stellte sich eine starke Hemmung ein (-76%, p < 0,05), die deutlich geringer in den Proben ausfiel, denen zusätzlich EDTA (-40%, p < 0,05) bzw. EDTA und Mercaptoethanol (-31%, p < 0,05) zugefügt war. Mercaptoethanol als alleiniger Zusatz zu PG hatte hingegen keine Verringerung der Hemmwirkung (-82%, p < 0,05) zur Folge.

Die entsprechenden Versuche mit Linolsäure als Hemmstoff zeigten alle die deutliche Hemmwirkung der Fettsäure (-74%, p < 0,005), jedoch ohne eine signifikante Abweichung in den Proben, denen EDTA (-70%) bzw. Mercaptoethanol (-73%) oder beide Substanzen (-69%) zugefügt war.

Bei Zugabe von Stearinsäure liegt die Konversionsrate im Bereich der Referenzprobe, der Zusatz von Mercaptoethanol (+4%), EDTA (+14%) bzw. beider Substanzen (+11%) zeigt einen leichten Anstieg der Umsätze, die aber noch im Rahmen der natürlichen Streubreite gesehen werden können.

4.1.5 Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Phosphatidylglycerol in verschiedenen Konzentrationen

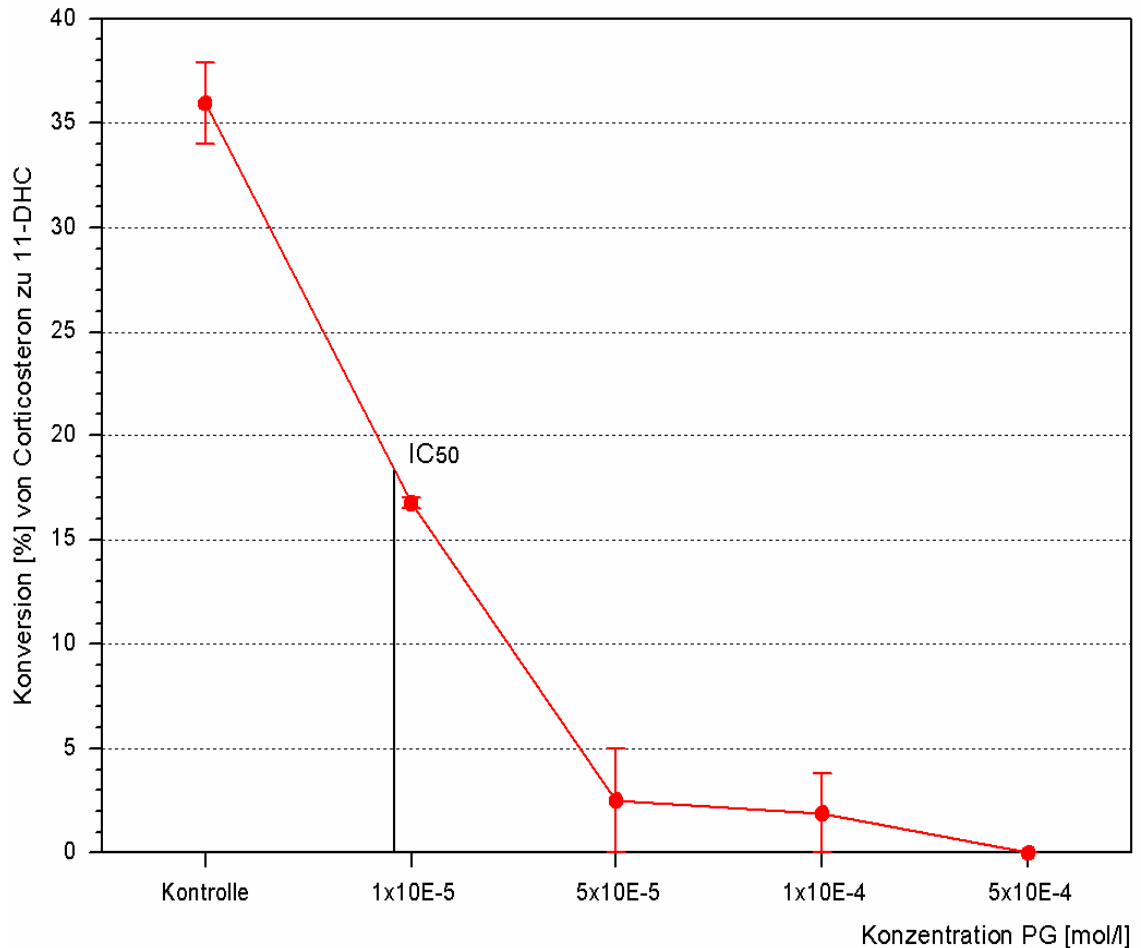


Abb. 4.1.5: Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG) in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM. Corticosteron-Konzentration $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 μ g/600 μ l, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Die Hemmkinetik von Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von PG ermittelte eine halbmaximale Hemmung im Bereich einer PG-Konzentration von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

4.1.6 Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen

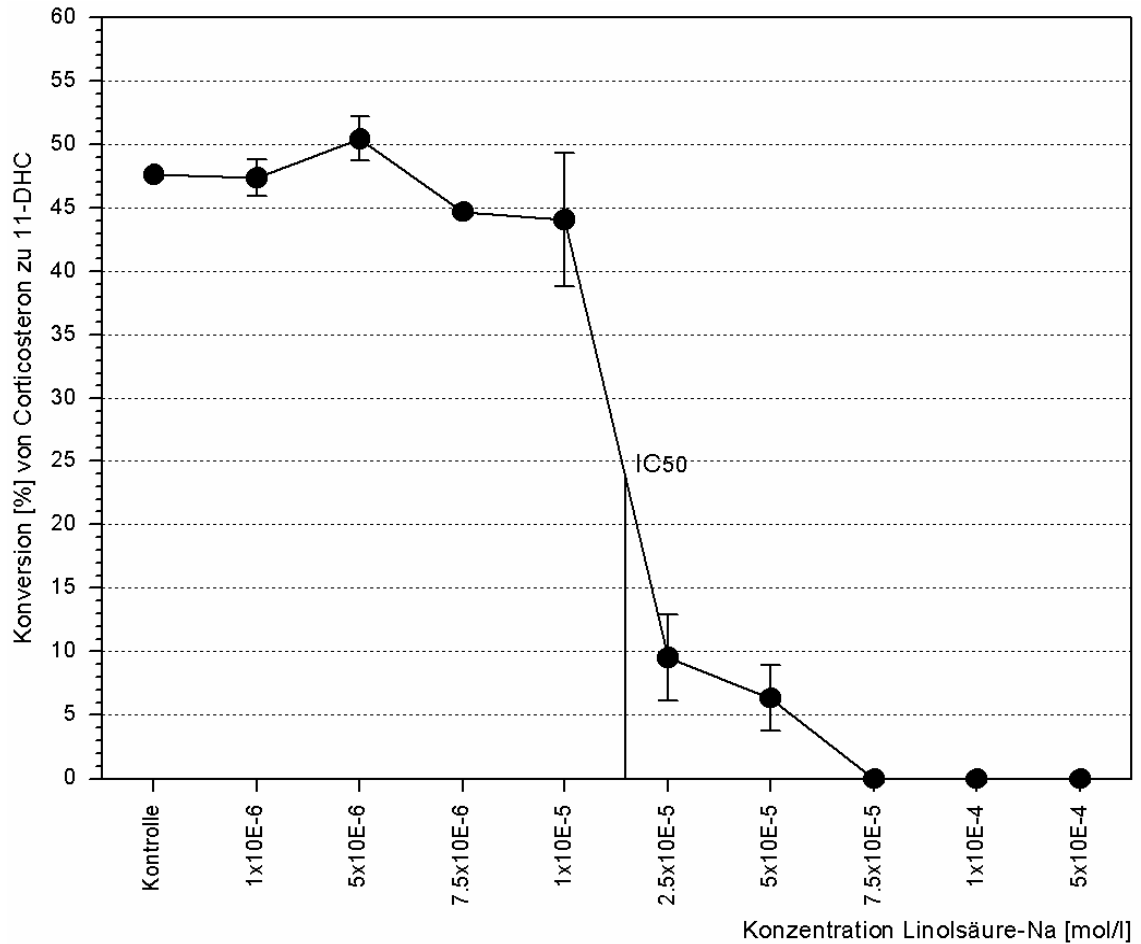


Abb. 4.1.6: Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM. Corticosteron-Konzentration $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 µg/600 µl, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Der für Linolsäure-Na⁺ ermittelte IC₅₀-Wert lag bei Hemmversuchen mit Plazenta-Mikrosomen bei ca. $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

4.1.7 Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Phosphatidylglycerol in Abhängigkeit der Zeit

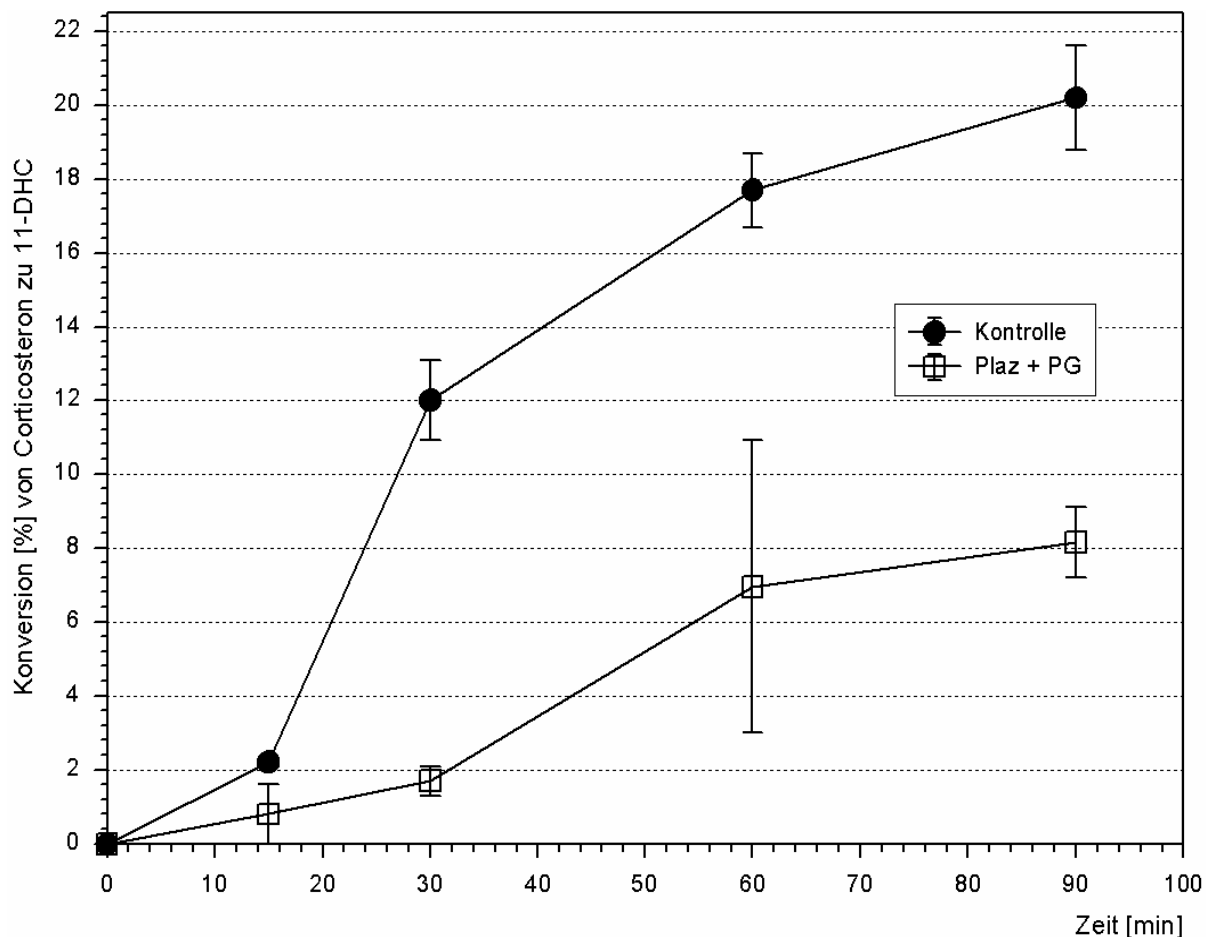


Abb. 4.1.7: Hemmversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (Plaz + PG) in Abhängigkeit der Zeit. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Konzentration Phosphatidylglycerol $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 μ g/600 μ l, jeder Versuch n=3.

Die Inkubation von Plazenta-Mikrosomen mit PG zeigt im Unterschied zu Versuchen mit Plazenta-Homogenat eine Hemmwirkung der Fettsäure, die bereits nach 15 Minuten eine deutliche Differenz in der Konversionsrate von Corticosteron zu 11-DHC aufweist.

4.1.8 Umsatzversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

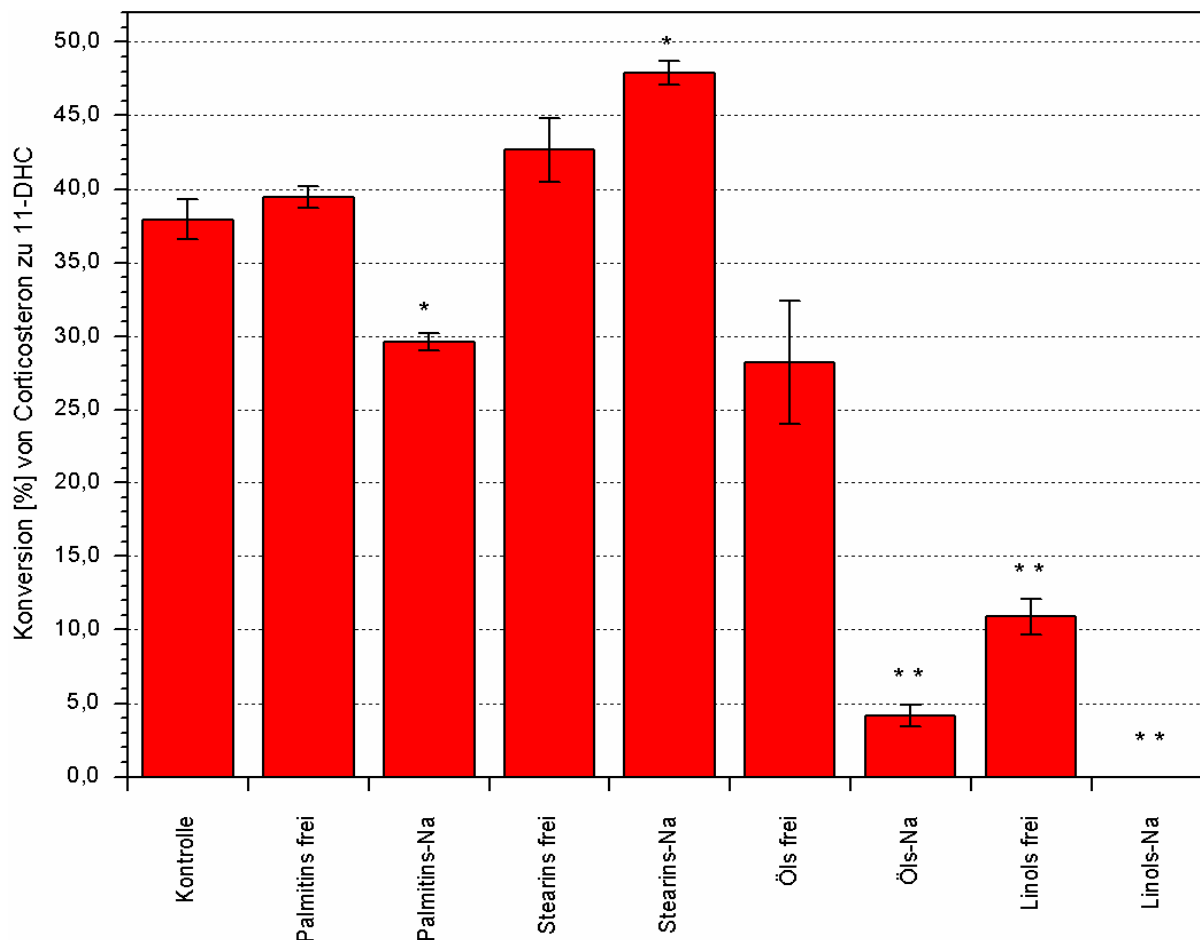


Abb. 4.1.8: Umsatzversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und Na^+ -Salze. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Bei der Untersuchung von Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren zeigte sich im Vergleich zum Kontrollwert ohne Fettsäure-Zusatz eine signifikante Steigerung der Konversion von Corticosteron zu 11-DHC bei den Versuchen mit Stearinsäure als freie Fettsäure (+12%) und als Na^+ -Salz (+26%, $p < 0,05$).

Der Zusatz von freier Palmitinsäure ergab keine signifikante Umsatzsteigerung (+4%), hingegen führt Palmitinsäure- Na^+ zu einer verminderten Konversionsrate von -22% ($p < 0,05$).

Eine deutliche Hemmung stellte sich bei Zusatz von freier Ölsäure ein (-26%), die von Ölsäure- Na^+ (-89%, $p < 0,005$) übertroffen wird.

Die stärkste hemmende Potenz der eingesetzten Fettsäuren besitzt Linolsäuren, wobei wiederum die Wirkung von Linolsäure- Na^+ (-100%, $p < 0,005$) stärker als die von freier Linolsäure (-71%, $p < 0,005$) ist.

4.1.9 Protein- und Substratabhängigkeit Plazenta-Mikrosomen

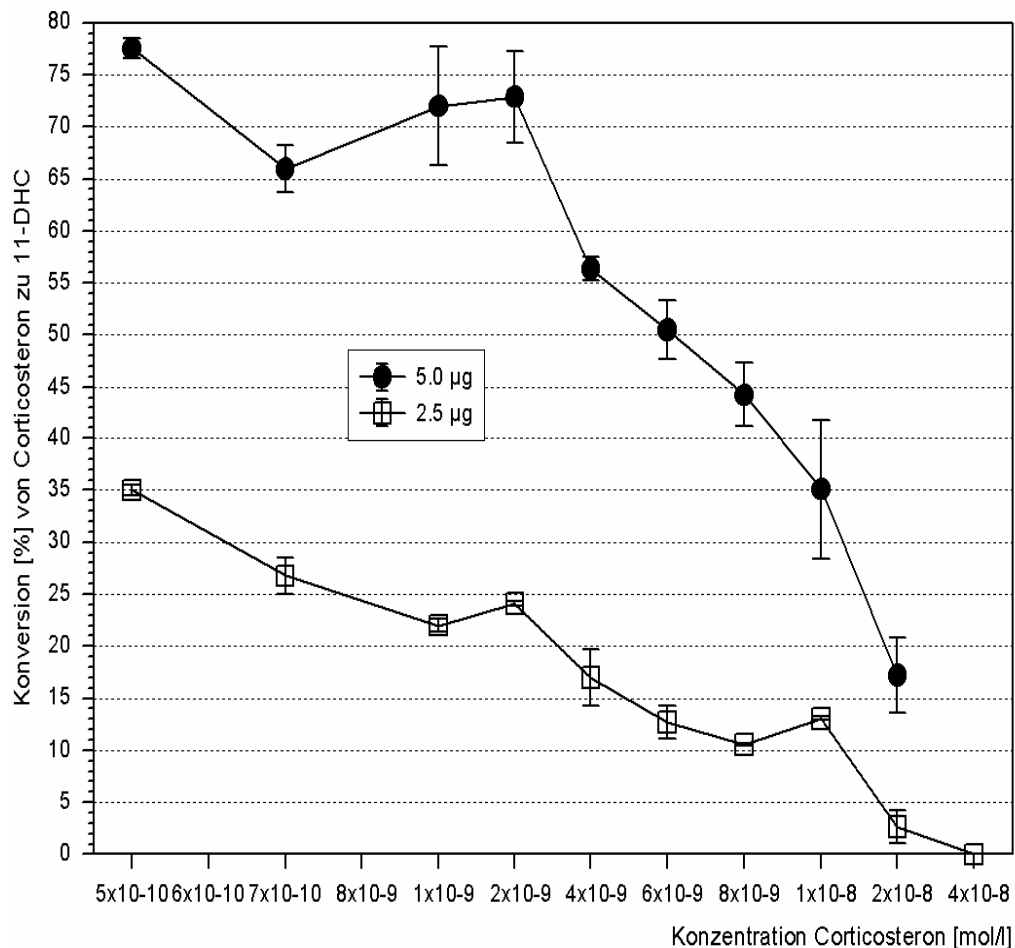


Abb. 4.1.9: Protein- und Substratabhängigkeit Plazenta-Mikrosomen, Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Corticosteron in verschiedenen Konzentrationen, Proteinkonzentration 5 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$ bzw. 2,5 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 30 min., jeder Versuch $n=3$.

Zur Ermittlung der optimalen Substrat- und Protein-Konzentration für die Hemmversuche nach Lineweaver-Burk wurden Umsatzversuche mit Plazenta-Mikrosomen mit einer Proteinkonzentration von 2,5 bzw. 5,0 μg pro Assay bei verschiedenen Corticosteron-Konzentrationen getestet. Die angestrebte optimale Konversionsrate in den folgenden Versuchen sollte dabei zwischen ca. 15-30% liegen.

4.1.10 Umsatzversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen

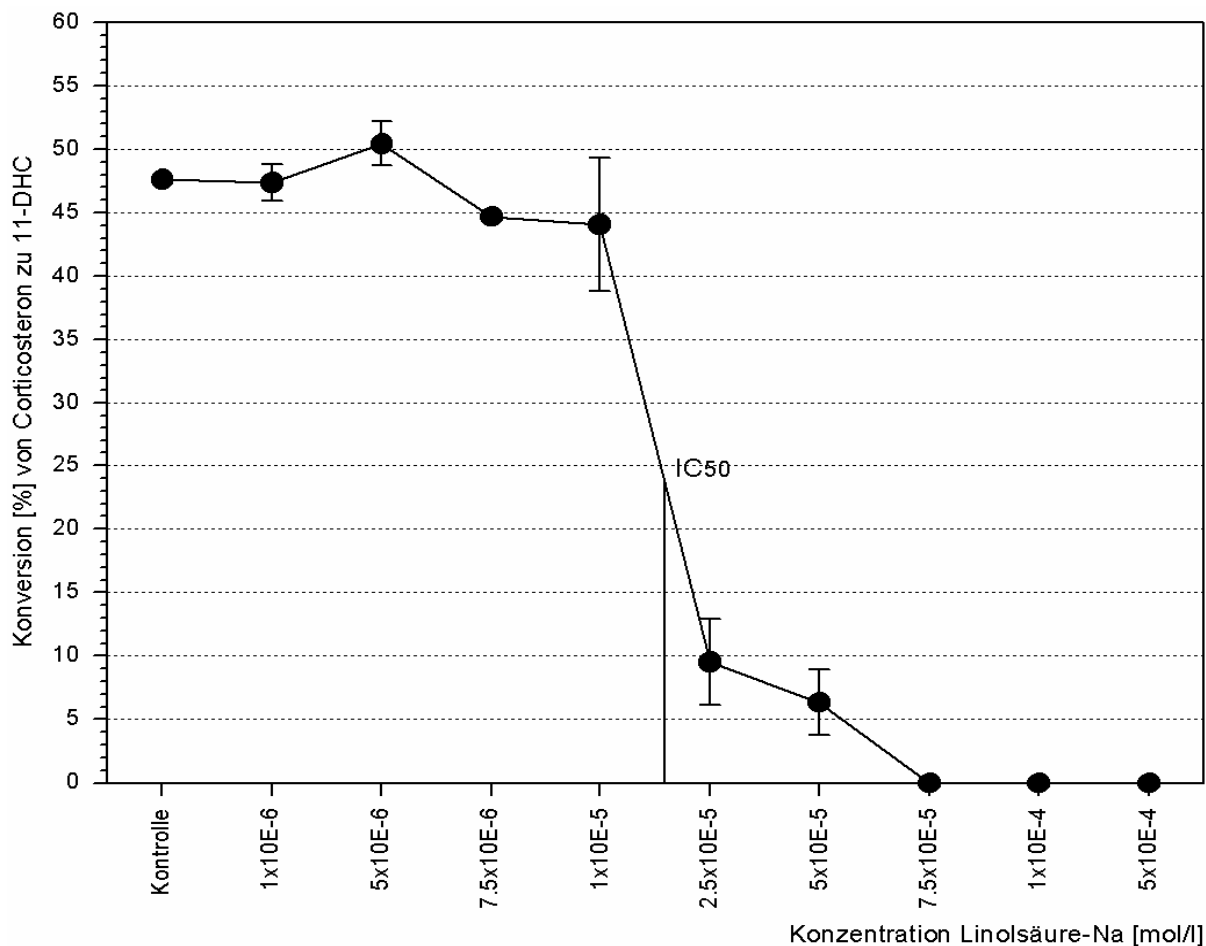


Abb. 4.1.10: Umsatzversuch Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Corticosteron-Konzentration 6×10^{-8} mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Zur Ermittlung der optimalen Hemmkonzentration von Linolsäure- Na^+ für die Lineweaver-Burk-Kinetik wurde Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen dem Assay mit Plazenta-Mikrosomen zugefügt. Die Kontrollproben enthielten Plazenta-Mikrosomen ohne Zusatz von Linolsäure- Na^+ . Die Hemmkonzentrationen für die Lineweaver-Burk-Kinetik wurden im Bereich der halbmaximalen Hemmkonzentration ($\text{IC}_{50} = \text{ca. } 2 \times 10^{-5}$) gewählt.

4.1.11 Hemmkinetik Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen

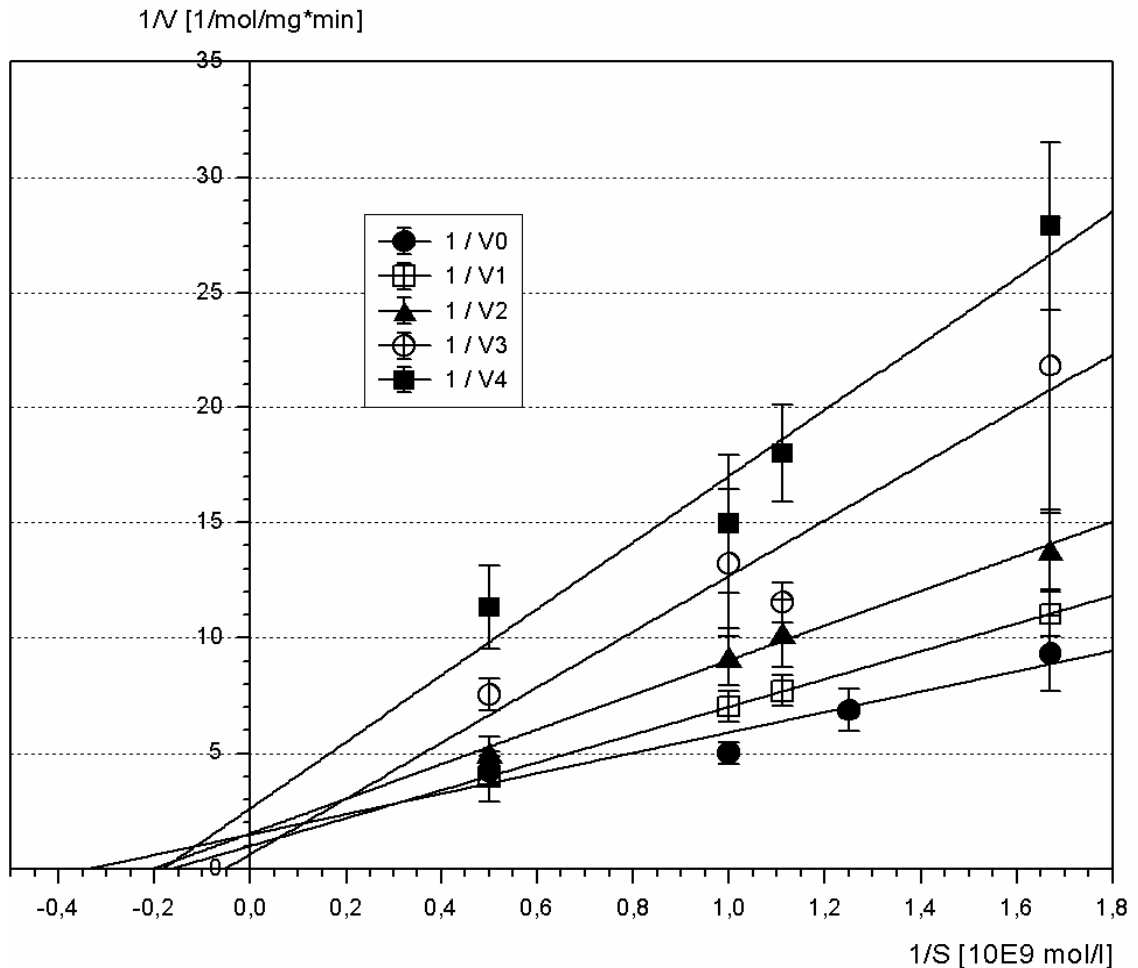


Abb. 4.1.11: Hemmkinetik Plazenta-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen.
Darstellung nach Lineweaver-Burk. Mittelwert +/- SEM.
Abzisse: reziproke Auftragung der Corticosteron-Konzentration [1/S]
Ordinate: reziproke Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit [1/V] Linolsäure-Na⁺ in folgenden Konzentrationen: V0 = ohne Zusatz, V1 = $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, V2 = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, V3 = $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l, V4 = $4 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Proteinkonzentration 2,5 µg/600 µl, Inkubationszeit 30 min., jeder Versuch n=9.

Die Hemmkinetik mit Plazenta-Mikrosomen und Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen ermittelte bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk einen allosterischen Hemmtyp mit einem mittleren $-1/K_m$ -Wert von $-1,9 \cdot 10^8$ ($\pm 1,4$) mol/l, entsprechend einem K_m -Wert von $5,3 \cdot 10^{-9}$ mol/l.

4.2 Niere

4.2.1 Umsatzversuch Nieren-Homogenat mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

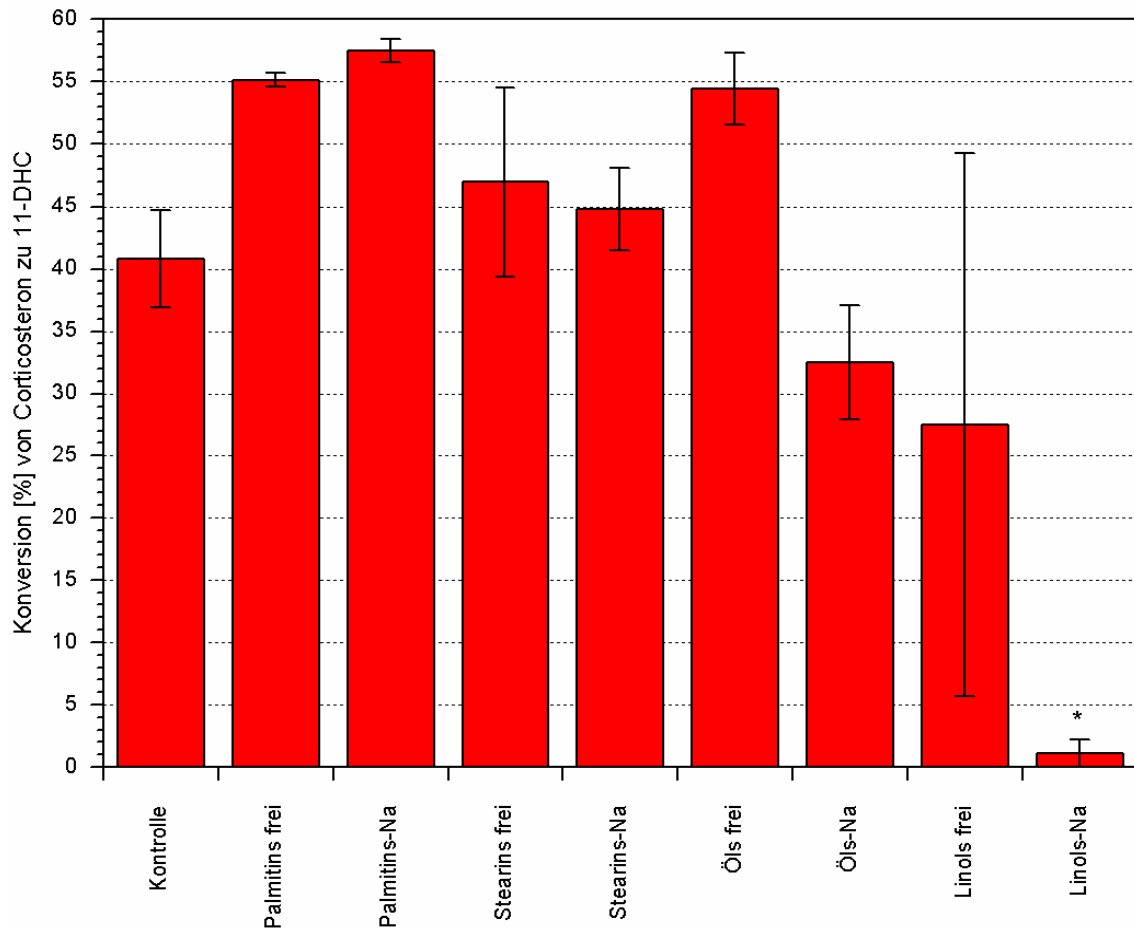


Abb. 4.2.1: Umsatzversuch Nieren-Homogenat mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und als Na⁺-Salze.
 Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM.
 * = p < 0,05 bezogen auf Kontrolle.
 Konzentration der Fettsäuren 5*10⁻⁴ mol/l, Corticosteron-Konzentration 2*10⁻⁷ mol/l, Proteinkonzentration 20 µg/600 µl, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Bei den Umsatzversuchen mit Nieren-Homogenat zeigte sich eine deutliche Zunahme der Konversionsrate von Corticosteron zu 11-DHC bei Zusatz von Palmitinsäure als freie Fettsäure (+35%) wie auch als Na⁺-Salz (+41%), in geringerem Maße bei Zugabe von freier Ölsäure (+33%), sowie von freier Stearinsäure (+15%) und Stearinsäure-Na⁺ (+10%). Eine deutliche Verminderung der Konversionsrate bewirkt die Zugabe von Ölsäure-Na⁺ (-20%) freier Linolsäure (-33%) und Linolsäure-Na⁺ (-97%, p < 0,05).

4.2.2 Umsatzversuch Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

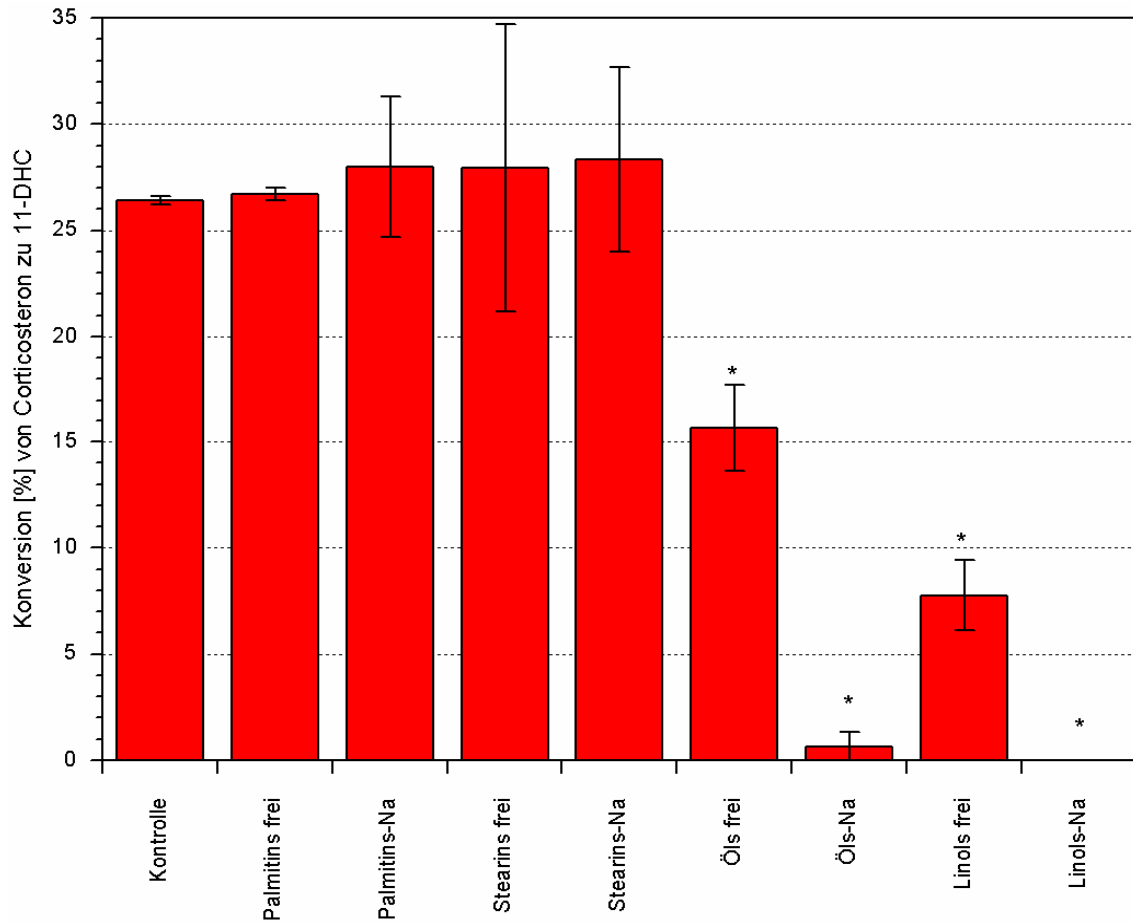


Abb. 4.2.2: Umsatzversuch Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und als Na⁺-Salze. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM. * = p < 0,05 bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren 1,5*10⁻⁴ mol/l, Corticosteron-Konzentration 2*10⁻⁷ mol/l, Proteinkonzentration 6,5 µg/600 µl, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Bei den Umsatzversuchen mit Nieren-Mikrosomen führt die Zugabe der gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (+1%) bzw. Stearinsäure (+6%) als freie Fettsäuren und als Na⁺-Salze (+6% bzw. +7%) zu keiner wesentlichen Veränderung der Konversionsrate.

Ölsäure und Linolsäure hingegen bewirken eine starke Konversionshemmung, wobei die Wirkung von Linolsäure die der Ölsäure übertrifft und jeweils die Na⁺-Salze eine stärker hemmende Wirkung als die freien Fettsäuren entfalten (freie Ölsäure -41%, p < 0,05, Ölsäure-Na⁺ -98%, p < 0,05, freie Linolsäure -71%, p < 0,05, Linolsäure-Na⁺ -100%, p < 0,005).

4.2.3 Protein- und Substratabhängigkeit Nieren-Mikrosomen

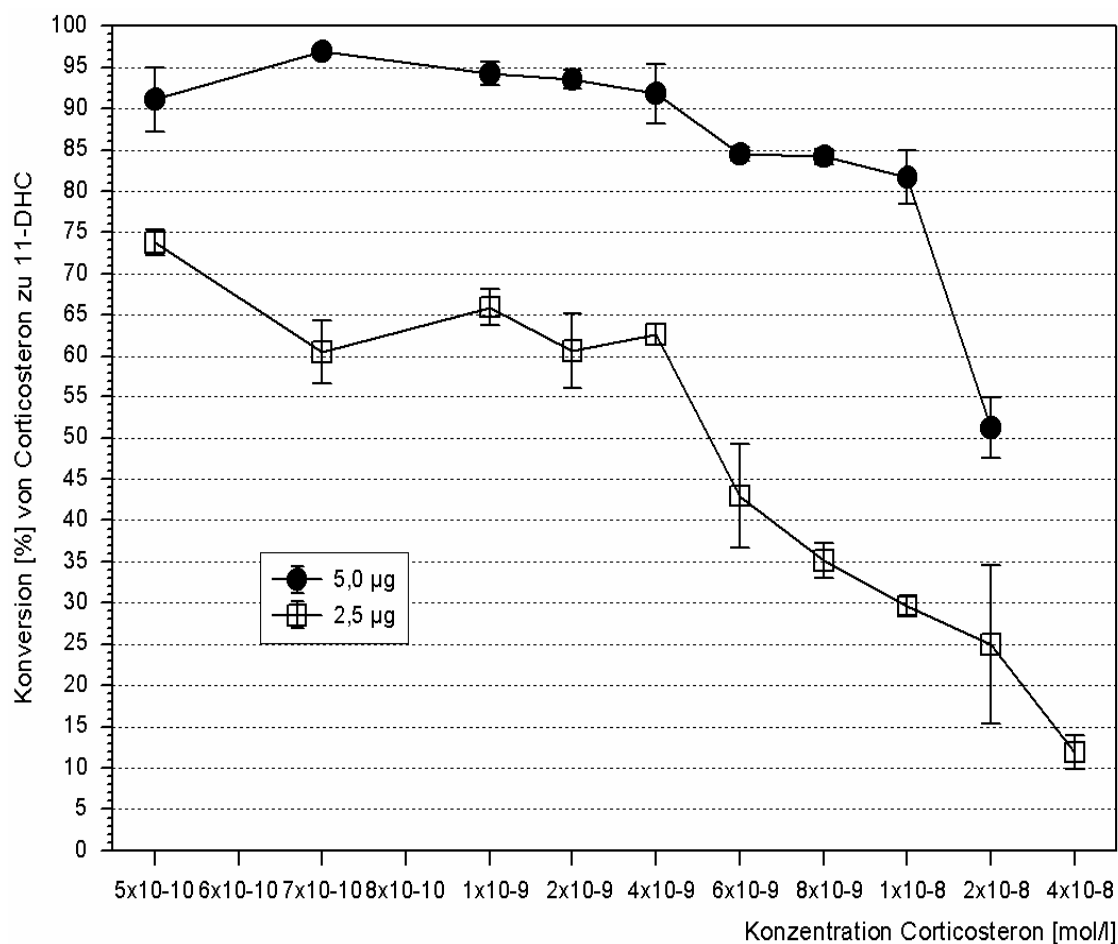


Abb. 4.2.3: Protein- und Substratabhängigkeit Nieren-Mikrosomen, Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Corticosteron in verschiedenen Konzentrationen, Proteinkonzentration $5 \mu\text{g} / 600 \mu\text{l}$ bzw. $2,5 \mu\text{g} / 600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 30 min., jeder Versuch $n=3$.

Zur Ermittlung der optimalen Protein- bzw. Substrat-Konzentration für die Lineweaver-Burk-Kinetik wurden Umsatzversuche mit 2,5 bzw. 5,0 μg Protein pro Assay (Gesamtvolumen $600 \mu\text{l}$) und verschiedenen Corticosteron-Konzentrationen durchgeführt. Die optimalen Konzentrationen wurden dabei im Bereich einer Konversionsrate von 15-30% gewählt.

4.2.4 Hemmversuch Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen

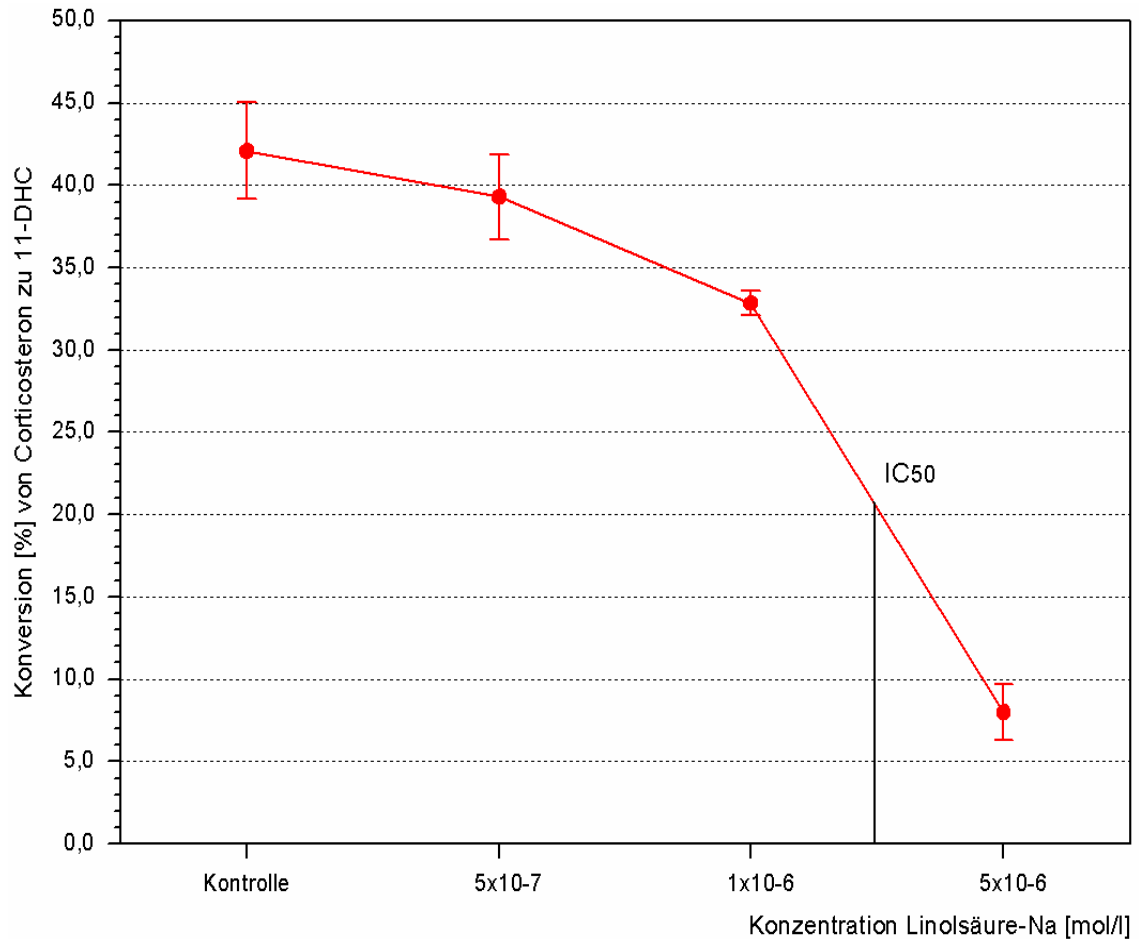


Abb. 4.2.4 : Hemmversuch Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen.
Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM.
Corticosteron $8 \cdot 10^{-9}$ mol/l, Proteinkonzentration 2,5 µg/600 µl, Inkubationszeit 30 min., jeder Versuch n=3.

Die Hemmkinetik mit Nieren-Mikrosomen und Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen zeigt eine halbmaximale Hemmkonzentration von ca. $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Dieser Wert entspricht dem rechnerisch ermittelten Wert aus den Hemmversuchen mit Nieren-Mikrosomen bei einer Proteinkonzentration von 20 µg/600 µl.

4.2.5 Hemmversuch Nieren-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol bzw. Distearyl-Phosphatidylglycerol und EDTA bzw. Mercaptoethanol

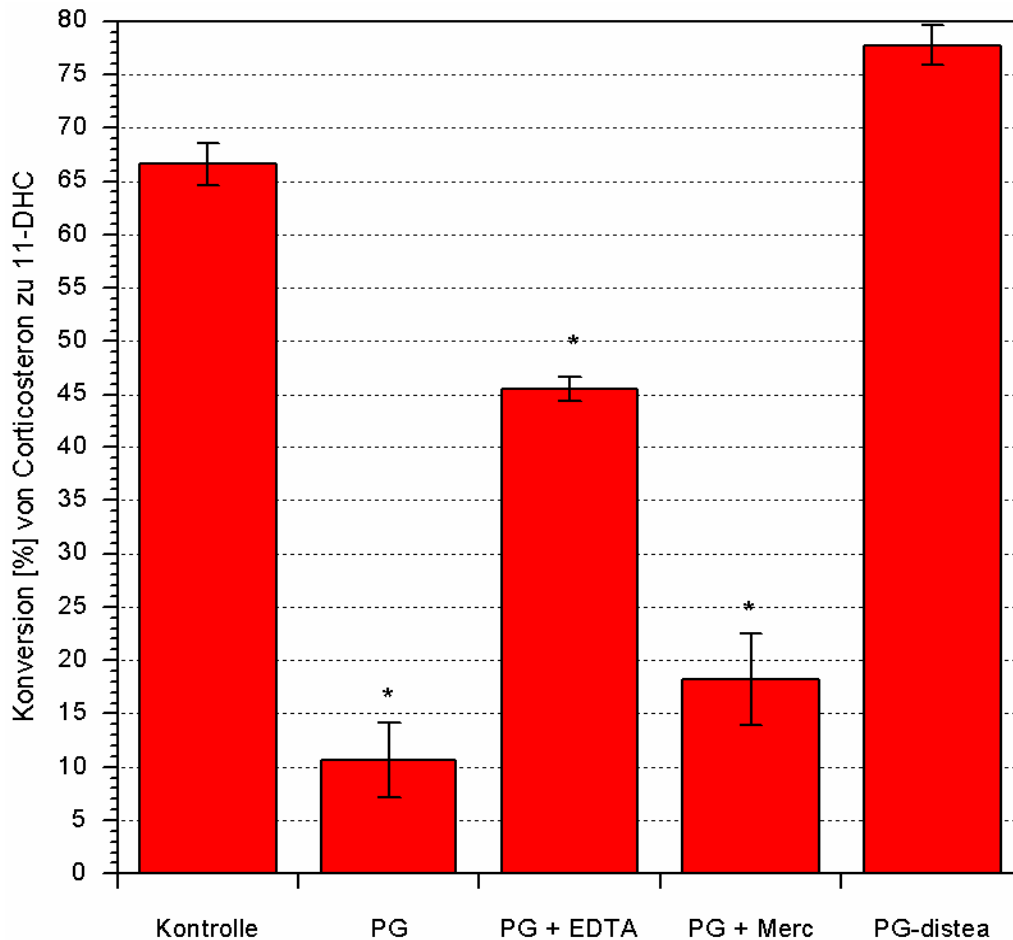


Abb. 4.2.5: Hemmversuch Nieren-Homogenat mit Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG) bzw. Distearyl-Phosphatidylglycerol (PG-distea) und EDTA bzw. Mercaptoethanol (Merc). Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert +/- SEM. * = $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $1,5 \cdot 10^{-7}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Bei den Versuchen mit Nieren-Homogenat und Zusatz von Phosphatidylglycerol (PG) stellt sich eine starke Hemmung der 11 β -HSD ein (-84%, $p < 0,05$). Der Zusatz von Distearyl-Phosphatidylglycerol (PG-distea) bewirkt eine Erhöhung der Konversionsrate (+17%) im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze. Entsprechend den Ergebnissen mit Plazenta-Homogenat ist die Hemmwirkung von PG teilweise reversibel, wenn die Proben zusätzlich EDTA enthalten (-32% im Vergleich zu -84% ohne EDTA). Mercaptoethanol bewirkt eine nur geringgradige Erholung der Konversionsrate (-73%, $p < 0,05$) im Vergleich mit PG ohne Zusatz von Mercaptoethanol.

4.2.6 Hemmkinetik Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen

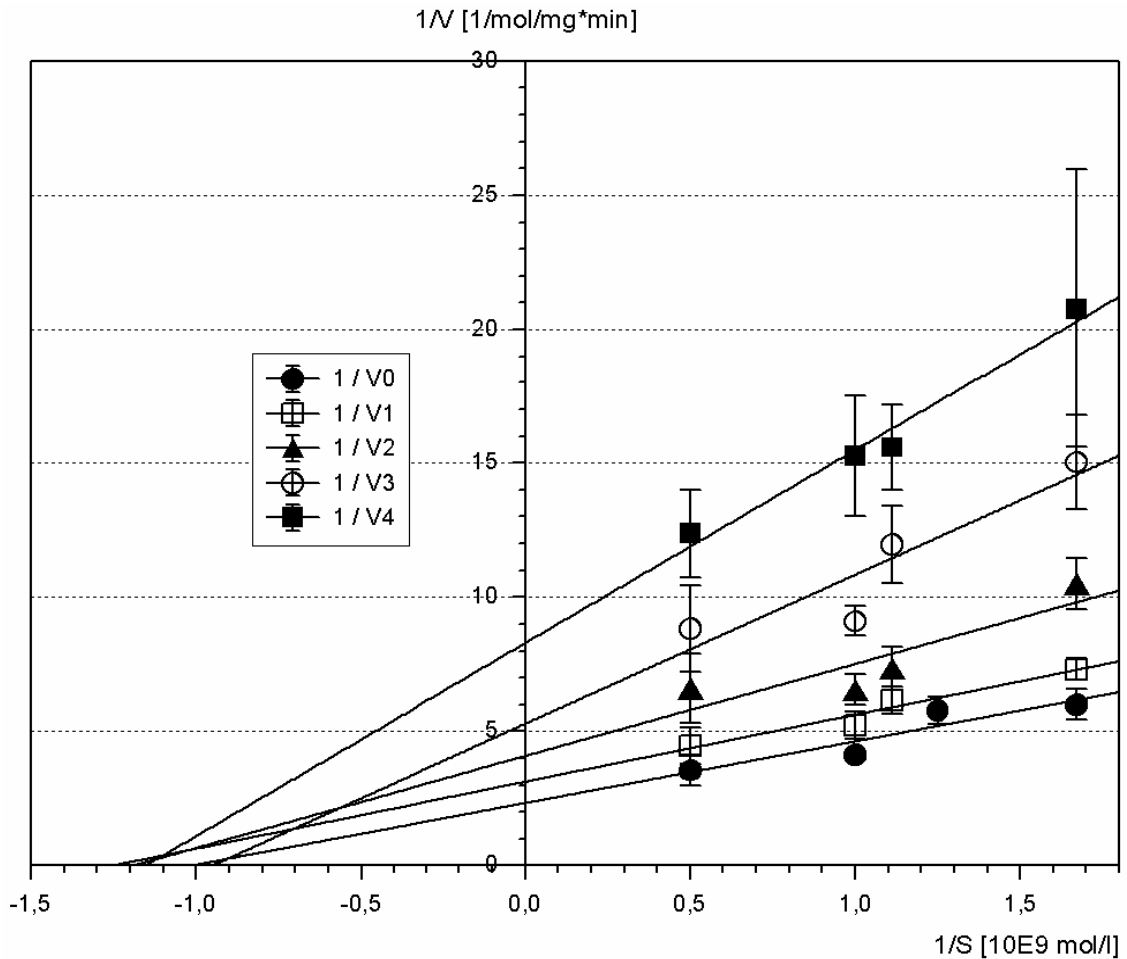


Abb. 4.2.6: Hemmkinetik Nieren-Mikrosomen mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen.
 Darstellung nach Lineweaver-Burk. Mittelwert +/- SEM.
 Abzisse: reziproke Auftragung der Corticosteron-Konzentration [1/S]
 Ordinate: reziproke Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit [1/V]
 Linolsäure-Na⁺ in folgenden Konzentrationen: V0 = ohne Zusatz, V1 = 1*10⁻⁶ mol/l, V2 = 2*10⁻⁶ mol/l, V3 = 3*10⁻⁶ mol/l, V4 = 4*10⁻⁶ mol/l.
 Proteinkonzentration 2,5 µg/600 µl, Inkubationszeit 30 min., jeder Versuch n=9.

Bei der Hemmkinetik mit Nieren-Mikrosomen und Linolsäure-Na⁺ zeigte sich eine Hemmung vom allosterischen Typ mit einem $-1/K_m$ -Wert von $-1,1 \cdot 10^9$ ($\pm 0,15$) mol/l, entsprechend einem K_m -Wert von $9,1 \cdot 10^{-10}$ mol/l.

4.3 Lunge

4.3.1 Umsatzversuch Lungen-Homogenat (Oxidase) mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

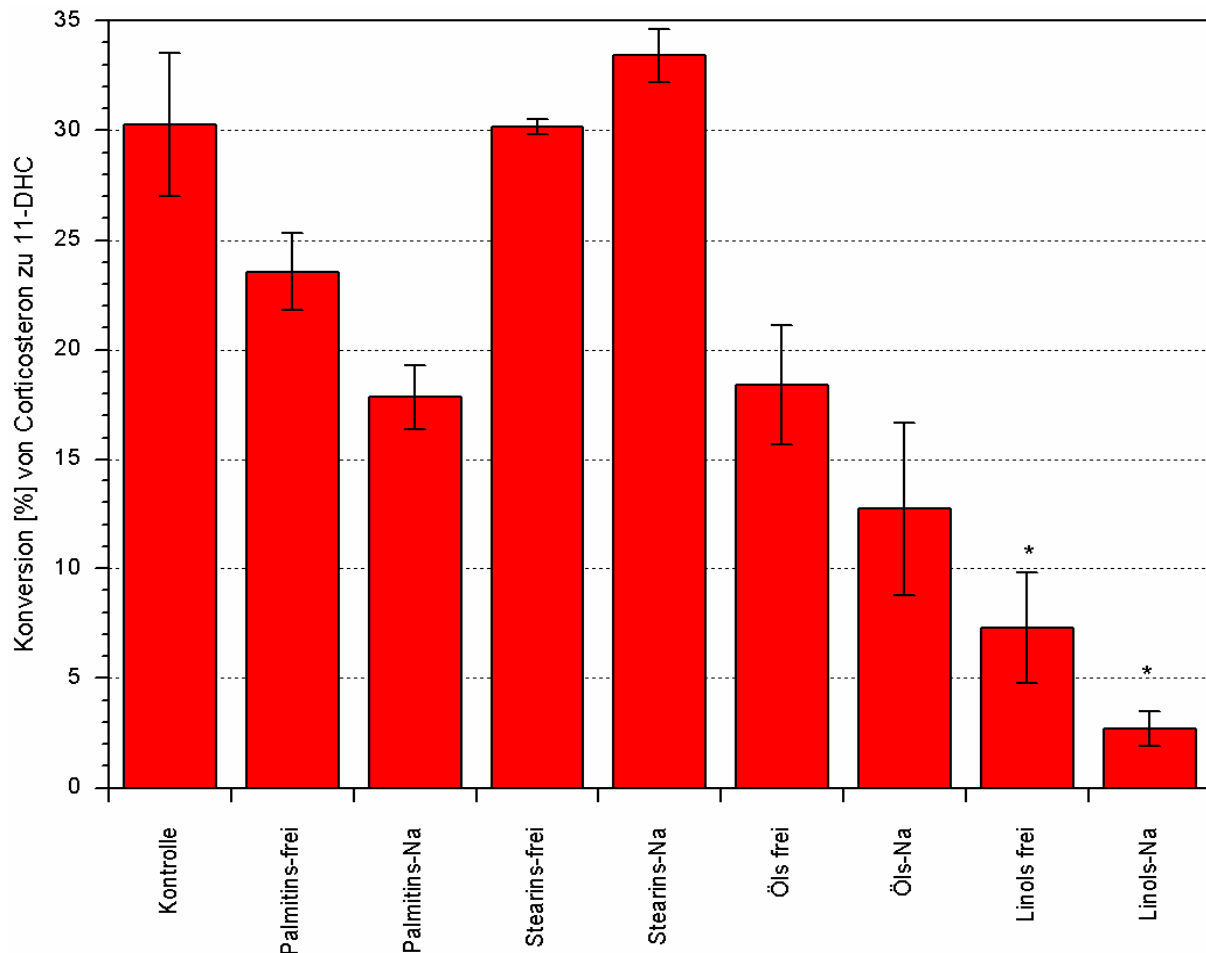


Abb. 4.3.1: Umsatzversuch Lungen-Homogenat (Oxidase) mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und als Na^+ -Salze. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$ bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Die Umsatzversuche mit Lungen-Mikrosomen und verschiedenen Fettsäuren ermittelte die stärkste Hemmwirkung bei Zusatz von Linolsäure- Na^+ (-91%, $p < 0,05$) und freier Linolsäure (-76%, $p < 0,05$).

Eine ebenfalls starke Hemmwirkung entfaltet Ölsäure, wobei auch hier die Hemmwirkung von Ölsäure- Na^+ (-58%) stärker als die von freier Ölsäure (-39%) ist.

Beim Zusatz von Palmitinsäure- Na^+ (-41%) bzw. freier Palmitinsäure (-22%) ist immer noch eine deutliche Hemmung erkennbar.

Zugesetzte freie Stearinsäure bewirkt keine Veränderung der Konversionsrate im Vergleich zu den Kontrollproben, denen keine Fettsäuren zugegeben waren. Als einzige der getesteten Fettsäuren vermag freie Stearinsäure den Umsatz zu erhöhen (+10%).

4.3.2 Umsatzversuch Lungen-Homogenat (Reduktase) mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

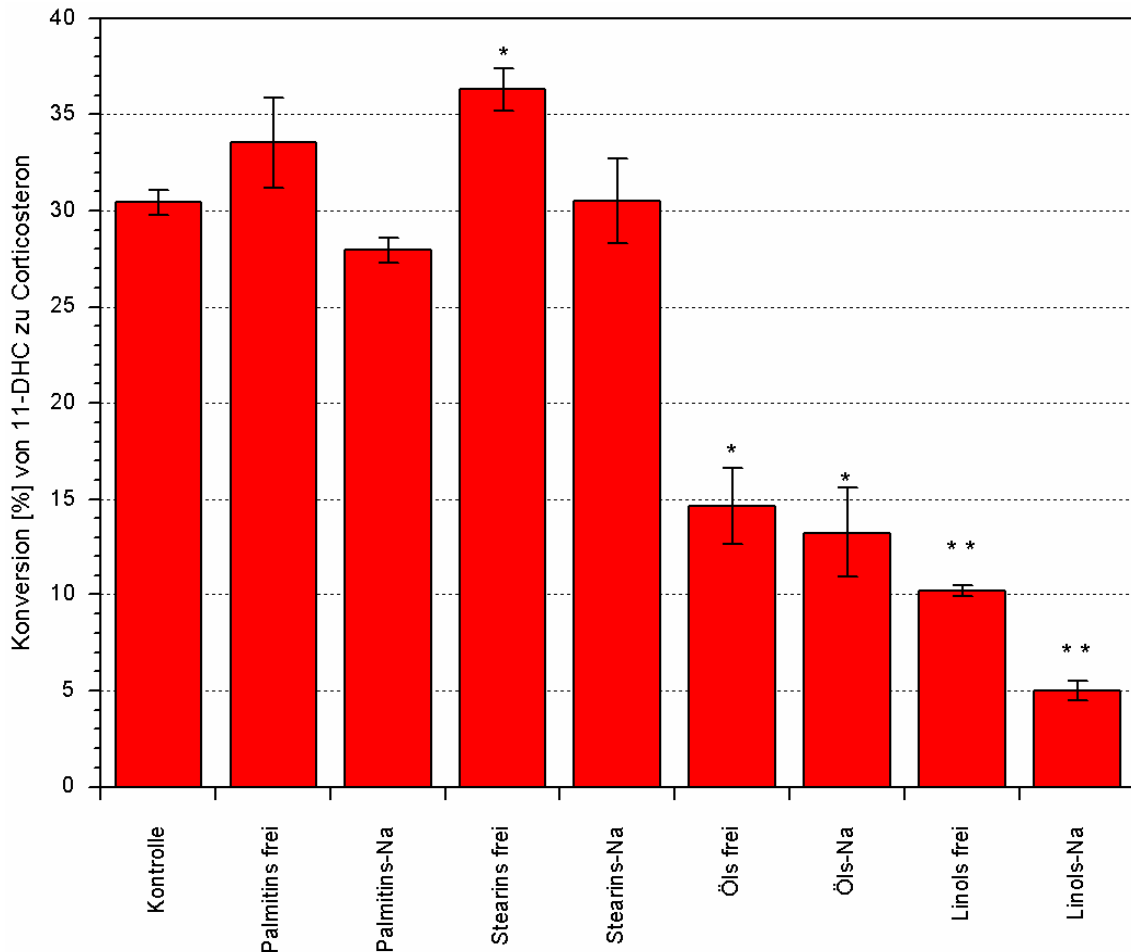


Abb. 4.3.2: Umsatzversuch Lungen-Homogenat (Reduktase) mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und als Na⁺-Salze. Konversion in % von 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC) zu Corticosteron. Mittelwert +/- SEM. * = p < 0,05, ** = p < 0,005 bezogen auf Kontrolle. Konzentration der Fettsäuren 5*10⁻⁴ mol/l, 11-Dehydrocorticosteron-Konzentration 2*10⁻⁹ mol/l, Proteinkonzentration 20 µg/600 µl, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Bei den Umsatzversuchen mit Lungen-Homogenat und verschiedenen Fettsäuren zeigte sich eine deutliche Umsatzsteigerung bei Zusatz von freier Stearinsäure (+19%, p < 0,05) und freier Palmitinsäure (+10%). Die entsprechen-

enden Na^+ -Salze beeinflussen die Konversionsrate nicht oder nur gering (Stearinsäure- Na^+ 0%, Palmitinsäure- Na^+ -8%).

Ölsäure bewirkt eine starke Verminderung der Konversionsrate, wobei Ölsäure- Na^+ eine stärkere Hemmwirkung (-56%, $p < 0,05$) entfaltet als freie Ölsäure (-52%, $p < 0,05$).

Linolsäure- Na^+ besitzt von allen zugesetzten Fettsäuren die größte Hemmpotenz (-84%, $p < 0,005$), gefolgt von freier Linolsäure (-67%, $p < 0,005$).

4.3.3 Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

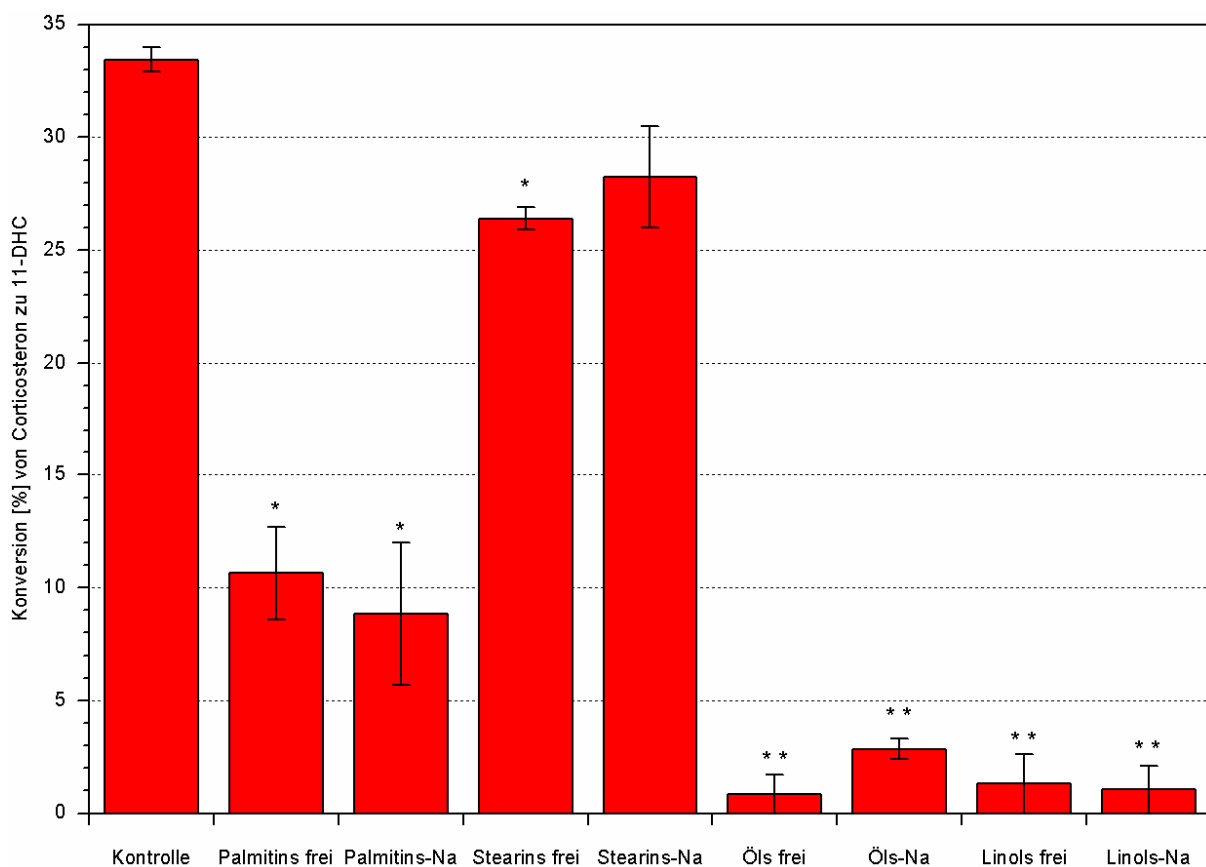


Abb. 4.3.3: Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und Na^+ -Salze. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC).

Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ bezogen auf Referenzwert.

Konzentration der Fettsäuren $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Bei den Umsatzversuchen mit Lungen-Mikrosomen (Oxidase) zeigte sich bei allen Fettsäuren, die dem Assay zugegeben worden waren, eine Hemmwirkung. Die stärkste Hemmung entfaltet Linolsäure- Na^+ (-97%, $p < 0,005$), freie Linolsäure (-96%, $p < 0,005$) und freie Ölsäure (-97%, $p < 0,005$) in etwa gleichem Maße, gefolgt von Ölsäure- Na^+ (-91%, $p < 0,005$), Palmitinsäure- Na^+ (-74%, $p < 0,05$) und freier Palmitinsäure (-68%, $p < 0,05$).

Der Zusatz von freier Stearinsäure und Stearinsäure- Na^+ bewirkte hingegen eine vergleichsweise geringe Verminderung der Konversionsrate (-21%, $p < 0,05$ bzw. -16%).

4.3.4 Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren

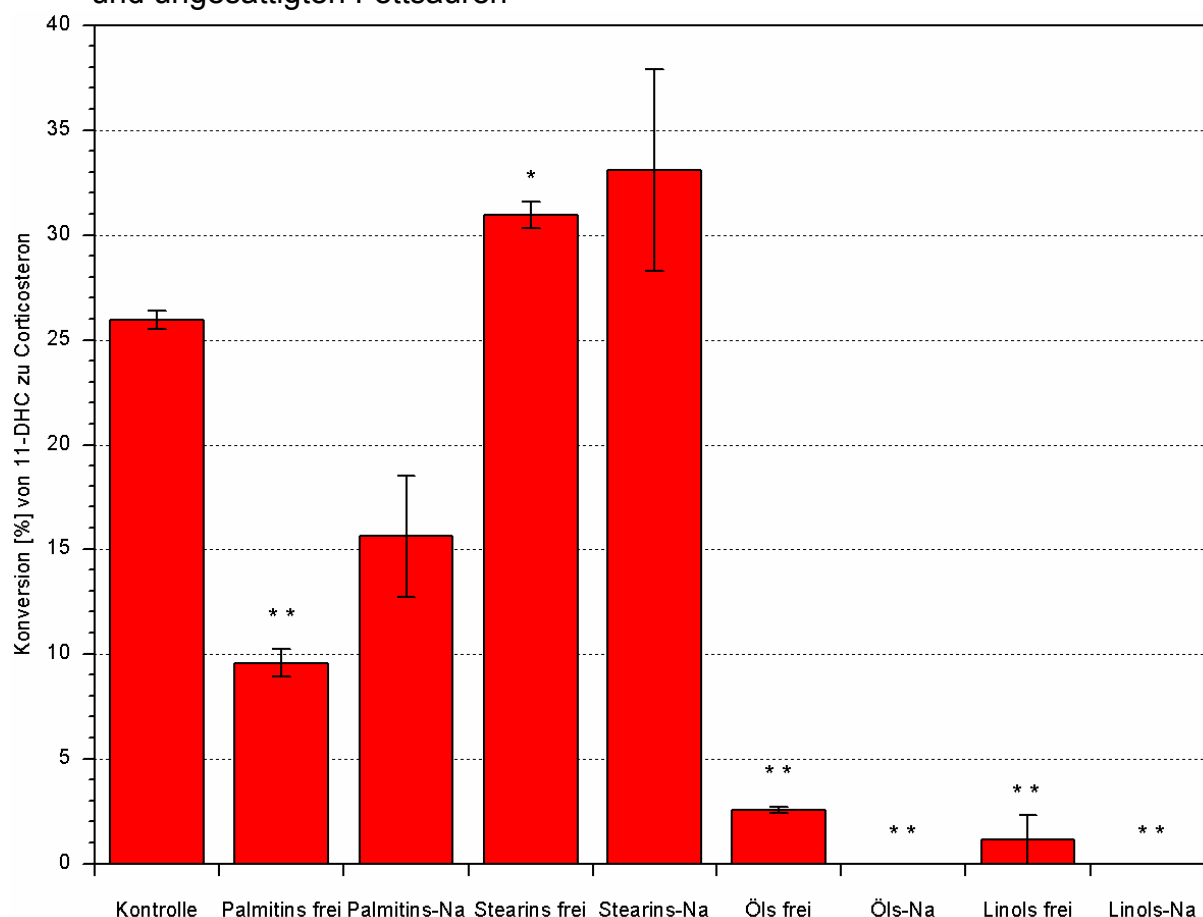


Abb. 4.3.4: Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure C16, Stearinsäure C18) und ungesättigten Fettsäuren (Ölsäure C18:1, Linolsäure C18:2), jeweils als freie Fettsäuren und Na^+ -Salze. Konversion in % von 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC) zu Corticosteron. Mittelwert \pm SEM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$ bezogen auf Referenzwert. Konzentration der Fettsäuren $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, Corticosteron-Konzentration $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$

Der Zusatz von freier Stearinsäure und Stearinsäure- Na bewirkte bei Umsatzversuchen mit Lungen-Mikrosomen (Reduktase) eine deutliche Steigerung der Konversionsrate (freie Stearinsäure +19%, $p < 0,05$, Stearinsäure- Na^+ +28%). Alle übrigen untersuchten Fettsäuren zeigten eine Aktivitätsminderung der 11 β -HSD. Dabei kam es zur völligen Hemmung der 11 β -HSD-Aktivität bei Zugabe von Ölsäure- Na^+ und Linolsäure- Na^+ (-100%, $p < 0,005$). Die entsprechenden freien Fettsäuren wiesen immer noch eine deutliche Hemmwirkung auf (freie Ölsäure -90%, $p < 0,005$, freie Linolsäure -96%, $p < 0,005$).

Die Hemmwirkung von freier Palmitinsäure (-63%, $p < 0,005$) übertraf die von Palmitinsäure- Na^+ (-40%).

4.3.5 Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen

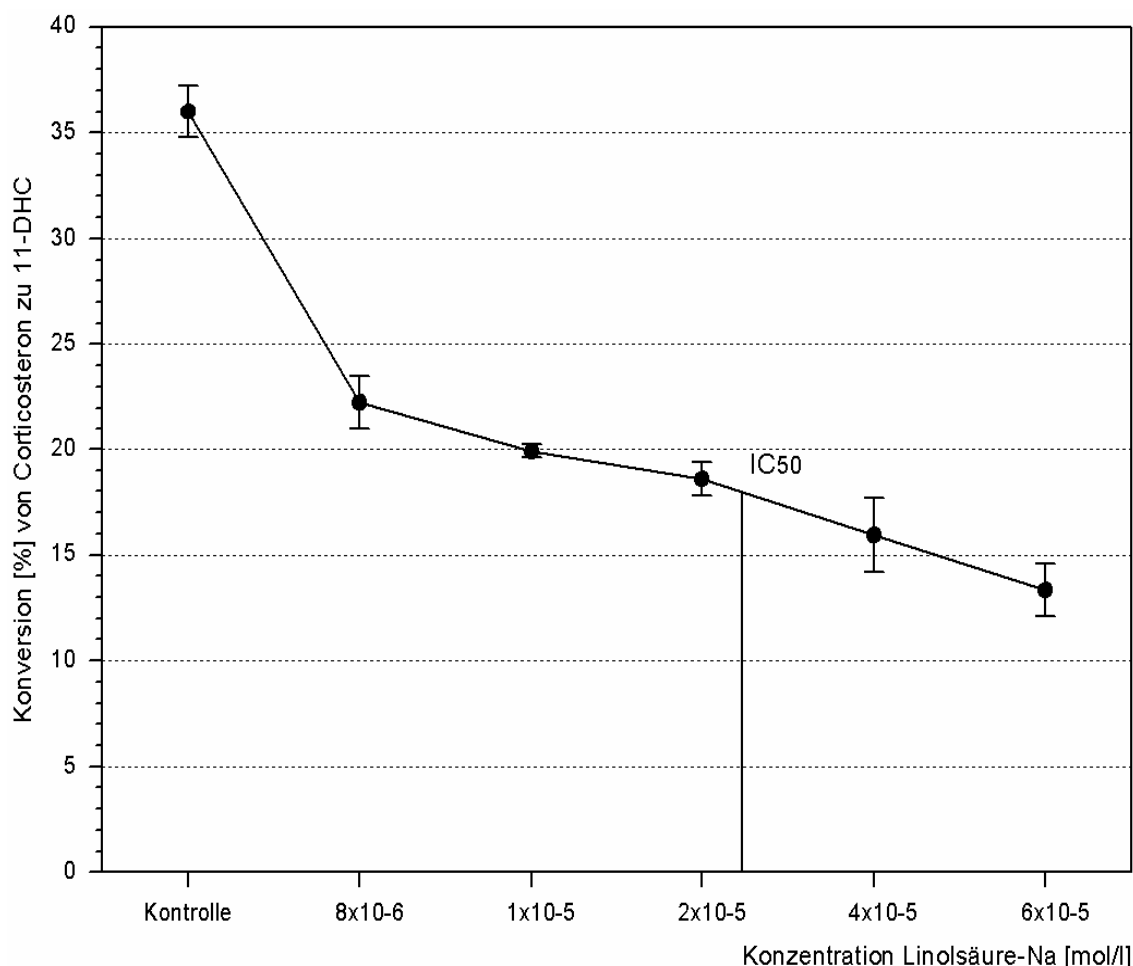


Abb. 4.3.5: Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von Corticosteron zu 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC). Mittelwert \pm SEM. Corticosteron-Konzentration 6×10^{-8} mol/l, Proteinkonzentration 20 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Zur Ermittlung der optimalen Hemmkonzentration für die Lineweaver-Burk-Kinetik wurde Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen dem Assay zugefügt. Die verwendeten Hemmkonzentrationen wurden im Bereich des IC_{50} -Wertes von $2,4 \times 10^{-5}$ gewählt.

4.3.6 Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen

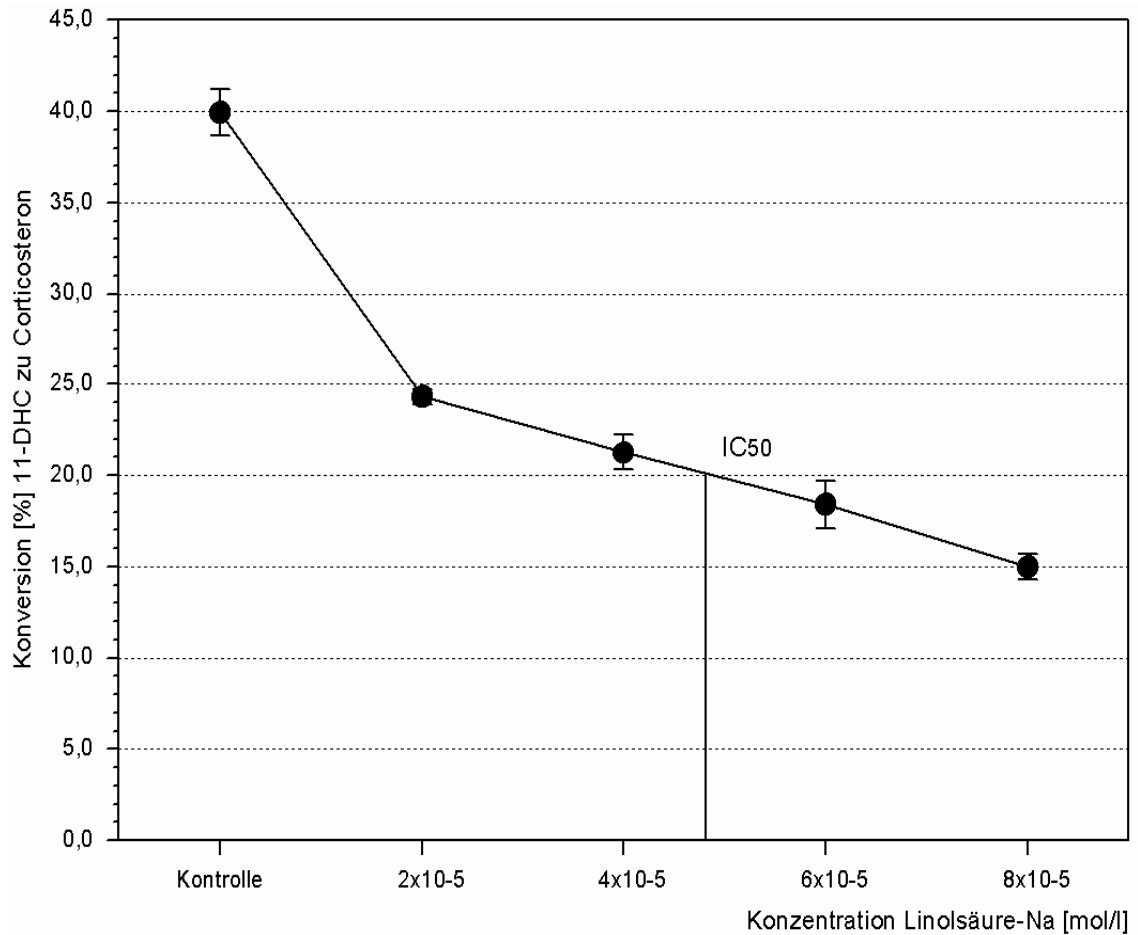


Abb. 4.3.6: Umsatzversuch Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen. Konversion in % von 11-Dehydrocorticosteron (11-DHC) zu Corticosteron. Corticosteron-Konzentration 6×10^{-8} mol/l, Proteinkonzentration $20 \mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch $n=3$.

Zur Ermittlung der optimalen Hemmkonzentration für die Lineweaver-Burk-Kinetik wurde Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen dem Assay zugefügt. Die verwendeten Hemmkonzentrationen wurden im Bereich des IC_{50} -Wertes von ca. $4,8 \times 10^{-5}$ gewählt.

4.3.7 Hemmkinetik Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen

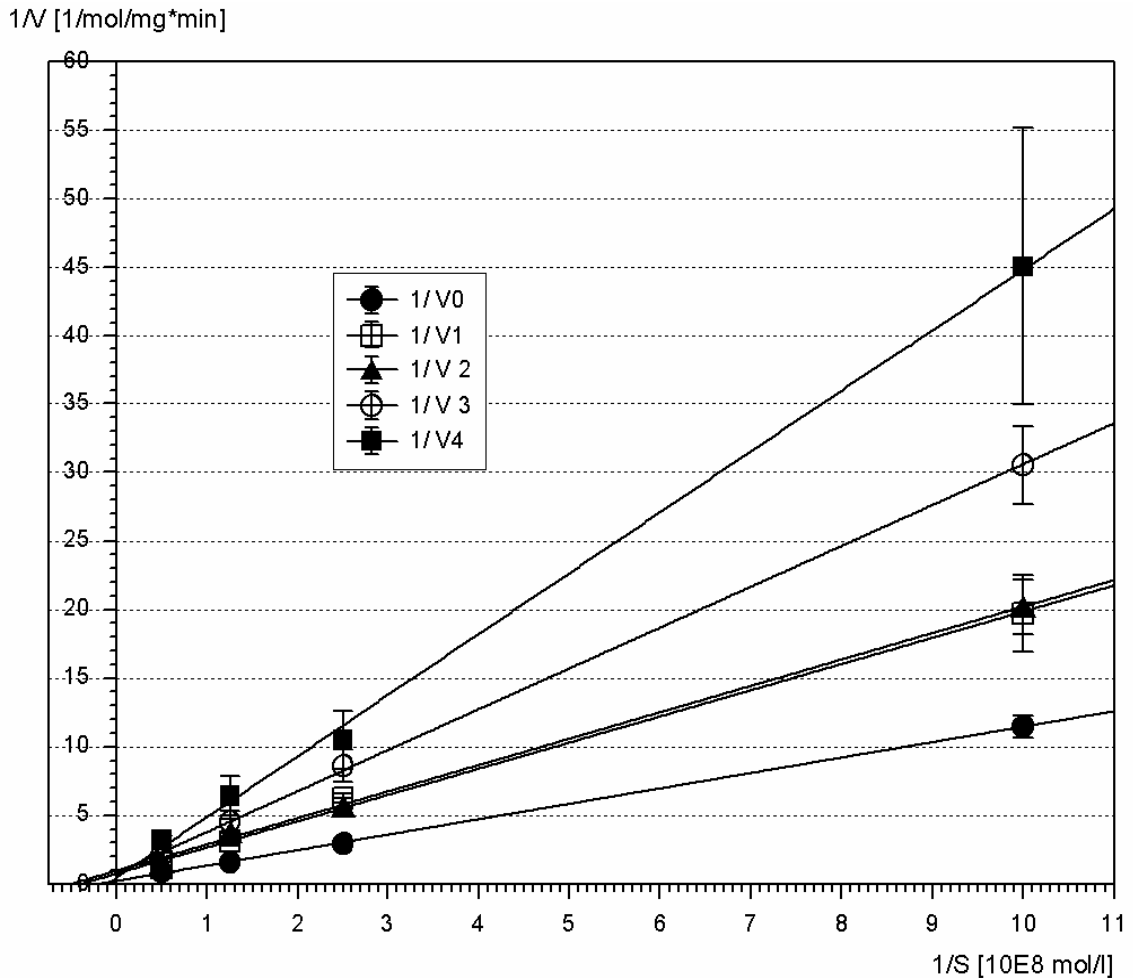


Abb. 4.3.7: Hemmkinetik Lungen-Mikrosomen (Oxidase) mit Zusatz von Linolsäure- Na^+ in verschiedenen Konzentrationen, Darstellung nach Lineweaver-Burk. Abzisse: reziproke Auftragung der Corticosteron-Konzentration [1/S]
 Ordinate: reziproke Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit [1/V] Linolsäure- Na^+ in folgenden Konzentrationen: V0 = ohne Zusatz, V1 = $9 \cdot 10^{-6}$ mol/l, V2 = $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, V3 = $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, V4 = $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l. Proteinkonzentration 100 $\mu\text{g}/600 \mu\text{l}$, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=3.

Bei der Hemmkinetik mit Lungen-Mikrosomen (Oxidase) und Linolsäure- Na^+ zeigte sich eine Hemmung vom allosterischen Typ mit einem $-1/K_m$ -Wert von $-0,3 \cdot 10^8$ ($\pm 0,2$) mol/l entsprechend einem K_m von $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol/l.

4.3.8 Hemmkinetik Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen

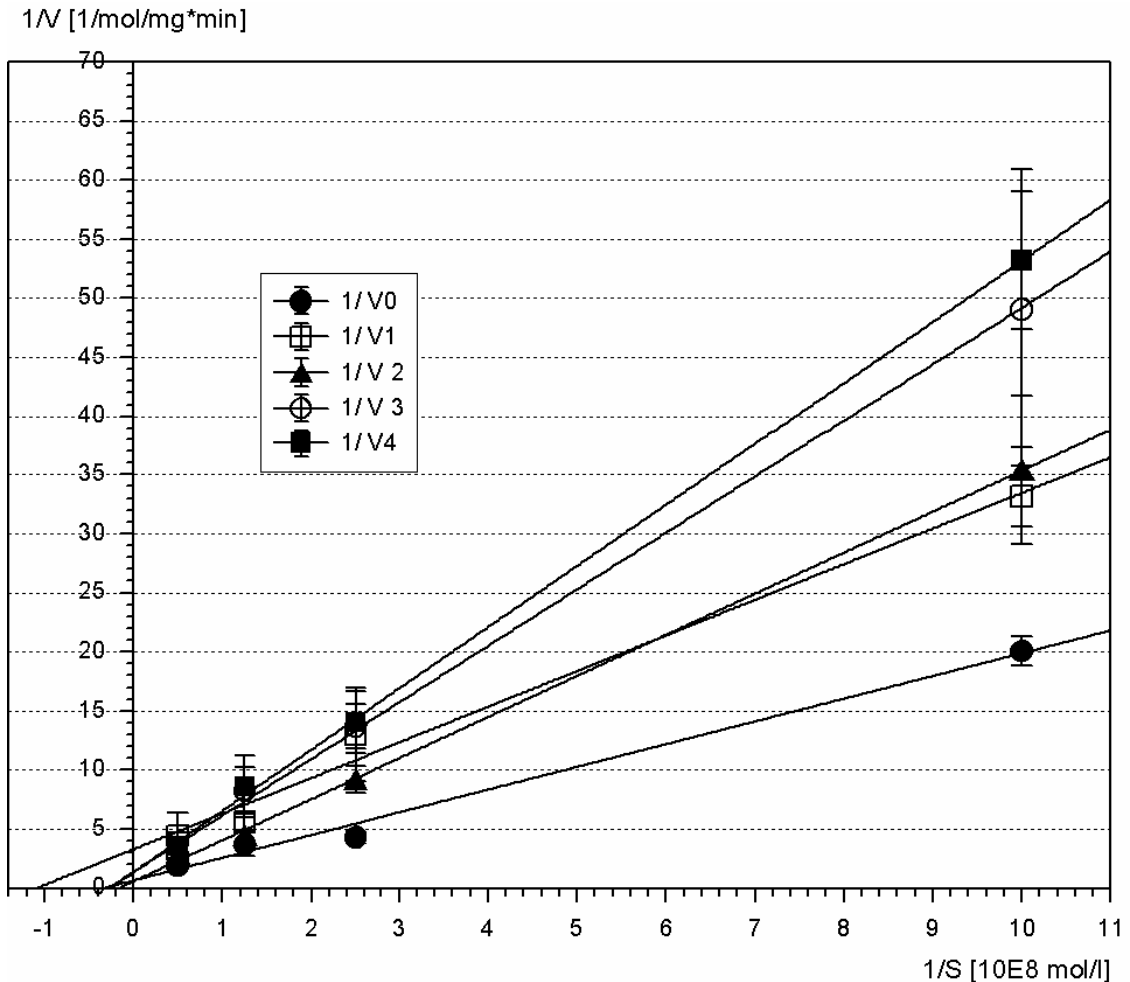


Abb. 4.3.8: Hemmkinetik Lungen-Mikrosomen (Reduktase) mit Zusatz von Linolsäure-Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen, Darstellung nach Lineweaver-Burk.

Abzisse: reziproke Auftragung der 11-Dehydrocorticosteron-Konzentration [1/S]

Ordinate: reziproke Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit [1/V]

Linolsäure-Na⁺ in folgenden Konzentrationen: V0 = ohne Zusatz, V1 = $9 \cdot 10^{-6}$ mol/l, V2 = $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, V3 = $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, V4 = $3 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Proteinkonzentration 100 µg/600 µl, Inkubationszeit 60 min., jeder Versuch n=6.

Bei der Hemmkinetik mit Lungen-Mikrosomen (Reduktase) und Linolsäure-Na⁺ zeigte sich eine Hemmung vom allosterischen Typ mit einem $-1/K_m$ -Wert von $-0,6 \cdot 10^8$ ($\pm 0,4$) mol/l entsprechend einem K_m von $1,7 \cdot 10^{-8}$ mol/l.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.4.1 Die Wirkung von Fettsäuren und Phosphatidylglycerol auf die Aktivität der 11 β -HSD Typ II in Homogenaten von Plazenta und Niere

Die Untersuchungen mit Homogenaten bzw. Mikrosomen aus humaner Plazenta und Niere weisen bei Inkubation mit verschiedenen Lipiden ein im Wesentlichen übereinstimmendes Muster auf.

So führt der Zusatz der langkettigen, gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure und Stearinsäure, respektive der entsprechenden Na⁺-Salze, zu einer deutlichen Aktivitätszunahme der 11 β -HSD Typ II in Gewebshomogenaten von Niere und Plazenta. Auffällig dabei ist die Tendenz, dass dieser Effekt bei den jeweiligen Na⁺-Salzen der Fettsäuren geringer ausgeprägt ist, als bei den freien Fettsäuren.

Dieses Phänomen setzt sich in der Reihe der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Linolsäure fort. Freie Ölsäure bewirkt noch eine Aktivitätszunahme der 11 β -HSD Typ II, während Ölsäure-Na⁺ keine Änderung bzw. eine geringe Aktivitätsabnahme bewirkt. Deutlicher noch zeigt sich bei Inkubation mit freier Linolsäure ein Aktivitätsniveau der 11 β -HSD, das um den Referenzwert streut, während Linolsäure-Na⁺ zu einer signifikanten Hemmung der 11 β -HSD Typ II führt. Vereinfachend kann die Wirkung von Fettsäuren auf die 11 β -HSD Typ II in Homogenaten von Plazenta und Niere folgendermaßen zusammengefasst werden:

1. Langkettige, gesättigte Fettsäuren wirken überwiegend aktivierend auf die 11 β -HSD Typ II-Aktivität.
2. Je kürzer die aliphatische Kette der Fettsäuren, umso größer die hemmende Wirkung bzw. umso geringer die aktivierende Potenz bei Versuchen mit Homogenaten.
3. Die zweifach ungesättigte, trans-konfigurierte Linolsäure besitzt eine höhere Hemmpotenz als die einfach gesättigte, cis-konfigurierte Ölsäure, die die gleiche Kettenlänge aufweist (Linolsäure C18:cis delta^{9,12} > Ölsäure C18:delta⁹).
4. Die Na⁺-Salze der Fettsäuren entfalten im Vergleich zu den entsprechenden freien Fettsäuren eine größere Hemmwirkung auf die 11 β -HSD Typ II.

PG übt in Homogenaten von Plazenta und Nierengewebe eine hemmende Wirkung auf die oxidative Aktivität der 11 β -HSD Typ II aus, mit einem IC₅₀-Wert, der im Bereich zwischen 10⁻⁵ – 5*10⁻⁵ mol/l liegt (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.2.4).

4.4.2 Die Wirkung von Fettsäuren und Phosphatidylglycerol auf die Aktivität der 11 β -HSD Typ II in Mikrosomen von Plazenta und Niere.

Der Einfluss gesättigter Fettsäuren (mit Ausnahme von Palmitinsäure-Na⁺, die signifikant hemmend auf die Aktivität der 11 β -HSD Typ II in Plazenta-Mikrosomen wirkt (siehe Kapitel 4.1.8) besteht in einer tendenziellen bis signifikanten

Zunahme der Konversionsrate. Alle ungesättigten Fettsäuren hingegen entfalten eine ausgeprägte Hemmwirkung, wobei wiederum die bereits oben genannte Hierarchie der Hemmpotenz festgestellt werden kann.

PG hemmt die 11 β -HSD Typ II in Mikrosomen von Plazenta und Niere mit einem IC₅₀-Wert von etwa 10^{-5} – $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l (siehe Kapitel 4.1.5 und 4.2.4)

4.4.3 Zusammenhang Proteinkonzentration und Hemmkonzentration

In der graphischen Auftragung der Hemmkurve von Linolsäure-Na⁺ konnte eine IC₅₀-Konzentration von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l ermittelt werden. Bei diesem Versuch betrug die Proteinkonzentration 20 μ g/600 μ l Assay-Volumen. Interessanterweise verschiebt sich die halbmaximale Hemmkonzentration etwa proportional zur Proteinkonzentration im Assay. So beträgt bei einer Verringerung der Proteinkonzentration auf 2,5 μ g die halbmaximale Hemmkonzentration ebenfalls nur etwa 1/8 der Ausgangskonzentration. Der graphisch ermittelte Wert lag bei ca. $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l (siehe Kapitel 4.2.4).

4.4.4 Die Wirkung von Fettsäuren auf die oxidative Aktivität der 11 β -HSD Typ I der Lunge in Homogenaten / Mikrosomen

Mit Ausnahme von Stearinsäure bzw. Stearinsäure-Na⁺, die in Homogenaten keine wesentliche Veränderung der Konversionsrate bewirken, reagiert die oxidative 11 β -HSD-Aktivität auf den Zusatz von Fettsäuren uniform mit einer Hemmung. Auch hier gelten im Wesentlichen die oben genannten Prinzipien:

1. Na⁺-Salze der Fettsäuren übertreffen in ihrer Hemmpotenz die entsprechenden freien Fettsäuren
2. die Hemmung nimmt mit der Länge der aliphatischen Kette ab und mit der Zahl der Doppelbindungen zu.

4.4.5 Die Wirkung von Fettsäuren auf die reduktive Aktivität der 11 β -HSD Typ I der Lunge in Homogenaten / Mikrosomen

Lediglich die freien Fettsäuren Stearinsäure und Palmitinsäure steigern die reduktive Konversionsrate der 11 β -HSD Typ I, ihre jeweiligen Na⁺-Salze belassen die Konversionsrate etwa im Bereich des Kontrollwertes in Versuchen mit Homogenaten. Alle anderen eingesetzten Fettsäuren hemmen die reduktive Aktivität der 11 β -HSD.

Stearinsäure und Stearinsäure-Na⁺ übten eine deutlich aktivierende Wirkung auf die reduktive Aktivität der 11 β -HSD Typ I in Mikrosomen der Lunge aus.

Alle übrigen getesteten Fettsäuren führten zur Hemmung der reduktiven Aktivität der 11 β -HSD Typ I nach dem oben bereits erwähnten Prinzip.

4.4.6 Hemmtyp in den Hemmkinetiken nach Lineweaver-Burk in Mikrosomenversuchen von Niere, Plazenta und Lunge bei Zusatz von Linolsäure-Na⁺

Die Hemmkinetik nach Lineweaver-Burk unter Verwendung von Linolsäure-Na⁺ zeigte bei allen untersuchten Organen eine Hemmung vom allosterischen Typ. Die Km-Werte betragen:

Niere: $9,1 (\pm 0,15) \cdot 10^{-10}$ mol/l

Plazenta: $5,3 (\pm 1,4) \cdot 10^{-9}$ mol/l

Lunge Oxidase: $3,3 (\pm 0,2) \cdot 10^{-8}$ mol/l

Lunge Reduktase: $1,7 (\pm 0,4) \cdot 10^{-8}$ mol/l