

# Methode zur Differenzierung insulinähnlicher Aktivitäten am trypsin-behandelten Rattendiaphragma

Method to Differentiate Insulin-like Activities in Rat-diaphragm

Wieland Stock

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. **28 c**, 319–321 [1973]; eingegangen am 6. Dezember 1972/5. Februar 1973)

Trypsin, insulin-receptor, diaphragm, agmatin, L-arginin-N,N-diethylamide

An *in-vitro*-method is described, which allows for a temporary suspension of the insulin sensitivity of rat-diaphragm by treatment with trypsin. The time, during which insulin shows no effects (20–30 min), is used to test compounds which may or may not have insulin-like activity. If their activity doesn't disappear, one may believe that the activity of the compounds in question is independent of the receptor.

Trypsin und andere proteolytische Enzyme zeigen in niedriger Konzentration insulinähnliche Effekte im Muskelgewebe<sup>1</sup> und in isolierten Fettzellen<sup>2–5</sup>. Wird die Enzymkonzentration erhöht, verschwinden diese Effekte<sup>2–6</sup>. Für Muskelgewebe<sup>7</sup> gilt, daß Trypsin in einer Endkonzentration von mehr als 1 mg/ml Inkubationsmedium keinen insulinähnlichen Effekt mehr ausübt. Statt dessen wird das Gewebe gegen Insulineinwirkung unempfindlich. Bei nicht zu hoher Konzentration von Trypsin jedoch spricht das Gewebe nach einiger Zeit wieder auf Insulin an\*. Man nimmt an, daß diesem Vorgang eine passagere Schädigung des Insulinrezeptors zugrunde liegt<sup>7</sup>.

Die nachstehende Methodik beantwortet die Frage, ob Verbindungen mit insulinähnlicher Aktivität ihre Wirkung mit Hilfe des Insulinrezeptors entfalten oder nicht.

## Material und Methoden

### I. Substanzen

Trypsin vom Rind (DCC behandelt – 2600 Anson-Einheiten/mg) und Sojabohnentrypsininhibitor (reinst) wurden von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen. Rinderinsulin, krist., 27 IE/mg, war eine Spende der Firma Hoechst AG, Frankfurt. Agmatinsulfat (decarboxyliertes Arginin), reinst, stammte von der Firma Serva, Heidelberg. L-Argi-

Sonderdruckanforderungen an W. Stock, D-7400 Tübingen, Hoppe-Seyler-Straße 1, Physiol.-Chem. Institut.

\* Dies geht auch aus Befunden hervor, die Dr. R. Renner 1969/1970 in unserem Arbeitskreis erhoben hat (Publikation im Druck).

nin-N,N-diäthylamid wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Hans Guglielmi überlassen, die Synthese wurde an anderer Stelle beschrieben<sup>8</sup>.

### 2. Methoden

#### A. Gewinnung der Diaphragmen

Die Gewinnung der Diaphragmen wurde bereits ausführlich beschrieben<sup>9</sup>. Lediglich die Anzahl der Hemidiaphragmen wurde von zwei auf vier je Ansatz erhöht, um so die Effekte besser erfassen zu können. Das Zerschneiden der Diaphragmen in viertel Teile und das Verteilen nach dem in l. c.<sup>9</sup> angegebenen Schema geschieht, um individuelle Unterschiede der Gewebe von Tier zu Tier und innerhalb der Diaphragmen selbst auszugleichen. Hierbei ist uns bewußt, daß durch die Schnittstellen der Gewebe geringe Glucosemengen auch ohne Insulineinwirkung vom Muskel aufgenommen werden. Dieser Effekt wird durch Leerwert-Bestimmung eliminiert. Die verwendeten Ratten waren vom Stamm Sprague Dawley, sie wogen 150–170 g.

#### B. Trypsinkultivation

Zur zeitlich begrenzten Inaktivierung des Insulinrezeptors wurden Diaphragmhälften mit Trypsin vorinkubiert. Jedes Inkubationsröhrchen enthielt 1 ml Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4), 10 mg Humanalbumin, 2,5 mg Glucose, vier 1/4 Diaphragmateile sowie 2 mg Trypsin. Die Inkubations temperatur betrug 37 °C. Die Konzentration von 2 mg Trypsin pro Ansatz wurde gewählt, um einerseits eine möglichst vollständige Erholung des Insulinrezeptors, andererseits eine ausreichende inaktive Zeitspanne zu erhalten. Die Enzyminkubation wurde jeweils mit Sojabohnentrypsininhibitor unterbrochen. Die Konzentration betrug 3 mg Inhibitor pro Ansatz.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Als Kontrolle wurden Diaphragmateile zeitlich gleich vorinkubiert, der Puffer enthielt hier jedoch kein Trypsin.

Nach der Vorinkubation wurde das Medium abgesaugt, und die Diaphragmateile wurden zweimal mit Puffer gewaschen. Danach inkubierte man die Gewebeteile in dem bereits beschriebenen Inkubationspuffer mit Agmatinsulfat, L-Arginin-N,N-diäthylamid oder mit Insulin. Die Insulinkonzentration betrug  $100 \mu\text{E}/\text{ml}$  Ansatz, um so eine maximale Stimulierung zu gewährleisten. Die anderen Substanzkonzentrationen betrugen jeweils  $2 \mu\text{Mol}/\text{ml}$  Medium.

Das Ausmaß der Rezeptorregeneration wurde durch die Glucoseaufnahme der Diaphragmen aus dem Medium sowie der Glykogensynthese in den Diaphragmen bestimmt. Die Glucoseaufnahme wurde mit Hilfe der GOD-Methode (Fa. Boehringer) bestimmt, das Glykogen mit der Anthron-Methode nach Seifter *et al.*<sup>10</sup>.

### C. Kurvendarstellung

Jeder Meßpunkt einer Kurve ist der Mittelwert aus 6 Einzelbestimmungen, die maximale Streuung dieser Einzelwerte beträgt  $s = \pm 5\%$ .

## Ergebnisse

### 1. Effekte von Insulin am trypsinisierten Gewebe

Aus den Abb. 1 und 2 geht hervor, daß es möglich ist, den Rezeptor für Insulin zeitweilig zu inhibieren.

Bei einer Trypsininkubation von 5 min beträgt die Zeit, innerhalb der Insulin keinerlei Effekte zeigt – also die versuchstechnisch verwertbare Zeit –,

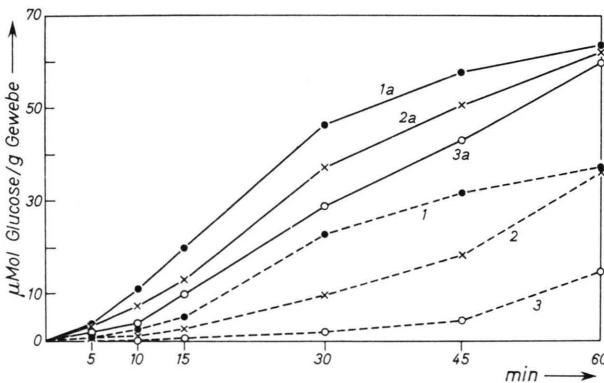


Abb. 1. Zeitwirkungskurve der Glucoseaufnahme unter Insulin am Diaphragma der Ratte. Die —— Kurven zeigen die Effekte am Trypsin-behandelten Gewebe. Kurve 1 nach 5 min Trypsininkubation, Kurve 2 nach 10 min und Kurve 3 nach 15 min. Die ——— Kurven 1 a, 2 a und 3 a zeigen die Effekte analog am unbehandelten Gewebe.

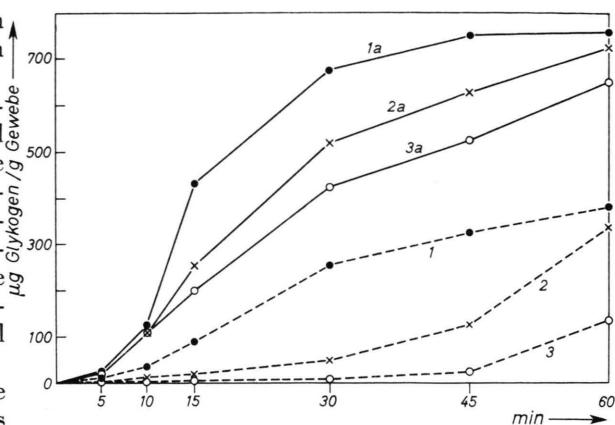


Abb. 2. Zeitwirkungskurve der Glykogensynthese unter Insulin am Diaphragma der Ratte. Die —— Kurven zeigen die Effekte am Trypsin-behandelten Gewebe. Kurve 1 nach 5 min, Kurve 2 nach 10 min und Kurve 3 nach 15 min Trypsininkubation, Die ——— Kurven 1 a, 2 a und 3 a zeigen die Effekte analog am unbehandelten Gewebe.

etwa 20 min (Kurve 1, Kurve 1 a gibt die Glucoseaufnahme des unbehandelten Gewebes wieder). Bei einer Verlängerung der Trypsininkubation auf 10 min beträgt diese Zeitspanne etwa 30 min (Kurven 2 und 2 a). Hierbei wird der Rezeptor durch das Trypsin noch nicht wesentlich zerstört, denn 60 min nach Beendigung der Trypsineinwirkung beträgt der Prozentsatz der Erholung etwa 60% des

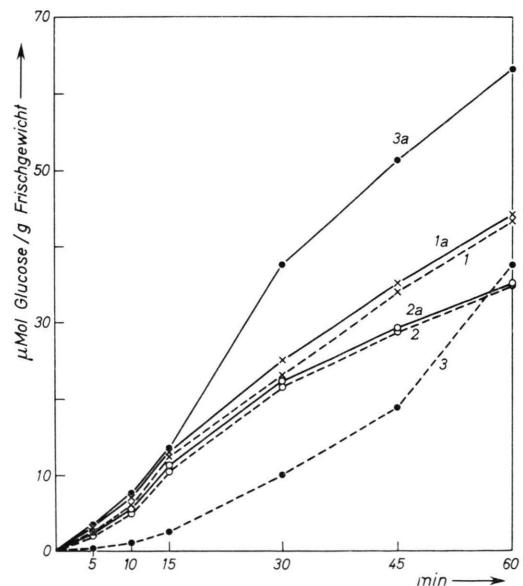


Abb. 3. Zeitwirkungskurven der Glucoseaufnahme am trypsinisierten und nicht trypsinisierten Rattendiaphragma. Die Vorinkubation mit und ohne Trypsin betrug 10 min. Das Kurvenpaar 1, 1 a zeigt das Verhalten von L-Arginin-N,N-diäthylamid, 2, 2 a von Agmatinsulfat und 3, 3 a von Insulin.

Glucosewertes und 50% des Glykogenwertes. Andererseits ist aber diese Zeit von 30 min für eine Inkubation mit den in Frage kommenden Substanzen ausreichend lang. Dies gilt sowohl für den Effekt des Glucoseeinstromes als auch für die Glykogensynthese. Das Kurvenpaar 3, 3 a zeigt dagegen eine bereits weitgehende irreversible Schädigung des Rezeptors.

## 2. Effekte von L-Arginin-N,N-diäthylamid bzw. Agmatinsulfat an trypsinisierten Zellen

Die beiden genannten Substanzen wurden als Modellsubstanzen verwandt, da ihre insulinähnlichen Wirkungen schon im *in vitro*-Versuch untersucht wurden<sup>8, 9</sup>. Aus den Abb. 3 und 4 geht hervor, daß

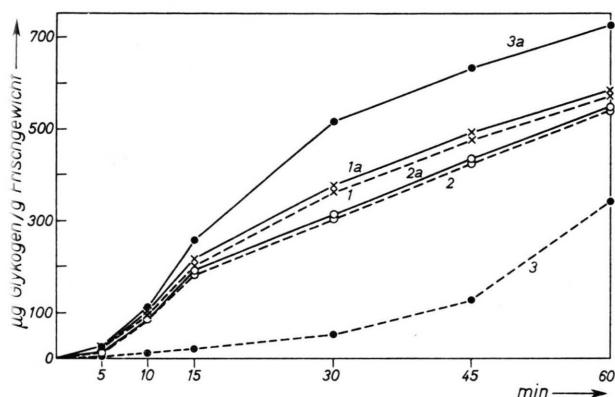


Abb. 4. Zeitwirkungskurve der Glykogensynthese am trypsinisierten und nicht trypsinisierten Rattendiaphragma. Die Vorkinkubation mit und ohne Trypsin betrug 10 min. Das Kurvenpaar 1, 1 a zeigt das Verhalten von L-Arginin-N,N-diäthylamid, 2, 2 a von Agmatinsulfat und 3, 3 a von Insulin.

die Inhibition des Insulinrezeptors durch die vorangegangene Trypsininkubation die Wirkung der beiden eingesetzten Guanidinverbindungen nicht beeinflußt.

- <sup>1</sup> P. Rieser u. C. H. Rieser, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **116**, 669 [1964].
- <sup>2</sup> J. K. Kuo, C. E. Holmlund u. I. K. Dill, Life Sci. **5**, 2257 [1966].
- <sup>3</sup> T. Kono, J. biol. Chemistry **244**, 1772 [1969].
- <sup>4</sup> T. Kono, J. biol. Chemistry **244**, 5777 [1969].
- <sup>5</sup> P. Cuatrecasas, J. biol. Chemistry **246**, 6522 [1971].
- <sup>6</sup> L. S. Weis u. H. T. Narahara, J. biol. Chemistry **244**, 3084 [1969].

## Diskussion

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen läßt sich folgern, daß in Analogie zur Fettzellmembran<sup>7</sup> auch in der Muskelmembran ein für Insulin spezifischer Rezeptor vorhanden ist. Dieser läßt sich durch Trypsin in der angegebenen Weise temporär ausschalten.

Die Parameter Glucoseaufnahme und Glykogenbildung, die im Muskelgewebe Meßgrößen für Insulin oder insulinähnliche Effekte darstellen, können somit von eventuell im Gewebe vorhandenen endokrinem Insulin nicht beeinflußt werden. Die gesteigerte Glucoseaufnahme bzw. Glykogenbildung muß daher eine Folge der eingesetzten Stoffe Agmatin und L-Arginin-N,N-diäthylamid sein.

Obwohl nicht genau bekannt ist, wie die Wirkung von Insulin an der Membran zustande kommt, läßt sich aus der Hemmung des insulin-spezifischen Mechanismus ableiten, daß die Zunahme von Glucoseaufnahme und Glykogengehalt unter dem Einfluß von Agmatin bzw. L-Arginin-N,N-diäthylamid kein unspezifischer Diffusionseffekt ist. Die relativ schnelle und gute Erholung des Gewebes nach der Trypsinbehandlung unter den oben genannten Bedingungen spricht gegen eine Membranschädigung, die zu einer reinen Diffusion führen könnte. Zudem dürfte bei einer reinen Diffusion eine zusätzliche Glucoseaufnahme bzw. Glykogenbildung über den Leerwert hinaus nicht zu finden sein. Aus den Abb. 1 – 4 geht aber das Gegenteil hervor. Denn die Kurven zeigen die Differenzwerte zwischen Meß- und Leerwert. Die Frage, ob die eingesetzten Substanzen ihre Wirkung an der Membran oder im Zellinneren entfalten, kann bis jetzt noch nicht beantwortet werden, steht aber zur Untersuchung an.

Frau U. Häffelin danke ich für wertvolle Mitarbeit.

- <sup>7</sup> T. Kono, Adipose tissue, Suppl. 2, p. 108, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970.
- <sup>8</sup> G. Weitzel, W. Stock u. H. Guglielmi, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **353**, 1661 [1972].
- <sup>9</sup> G. Weitzel, R. Renner u. H. Guglielmi, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **352**, 1617 [1971].
- <sup>10</sup> S. Seifter, S. Dayton, B. Novic u. E. Muntywyler, Arch. Biochemistry **25**, 191 [1950].