

plus TLCK or enzyme alone were incubated for 3 h at room temperature and dialyzed against buffer to remove the free TLCK before the enzyme assay. Because of instability of TLCK at high pH, phosphate buffer pH 7.0 was used. TLCK with the concentration of  $1.71 \times 10^{-3} M$  and  $5.12 \times 10^{-3} M$  per 2.3 mg of protein caused partial or almost complete inhibition (about 90%) of fraction I esterase activity (Figure 3).

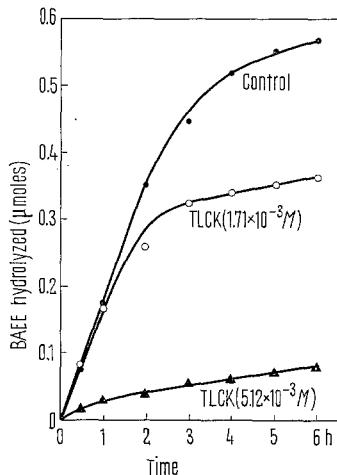


Fig. 3. Inhibitory effect of TLCK, a specific trypsin inhibitor. Fraction 1, 2.3 mg, was preincubated in 3 ml of  $1.71 \times 10^{-3} M$  (1.7 mg) or  $5.12 \times 10^{-3} M$  (5.1 mg) TLCK. Assay mixture contained 0.6 mg of protein and  $5 \times 10^{-4} M$  BAEE in 3 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0.

The hydrolysis of BAEE, one of the typical trypsin substrates<sup>15</sup>, and the inhibition of this esterase activity by SBTI, Trasylol and TLCK strongly suggest that fraction I contains trypsin or trypsin-like protease(s). The inhibitory effect of TLCK on the esterase activity of fraction I is particularly significant in support of our contention since, contrary to SBTI and Trasylol which inhibit not only trypsin but also other proteases including chymotrypsin<sup>16, 17</sup>, TLCK inhibits only trypsin (Figure 4); TLCK effectively suppressed trypsin activity, whereas even higher concentration of TLCK had no effect on  $\alpha$ -chymotrypsin. SHAW et al.<sup>18</sup> reported that TLCK specifically inactivated trypsin stoichiometrically by irreversibly binding with the histidine residue in the active site, and that it had no effect on chymotrypsin.

The intradermal injection of fraction I in guinea-pig skin results in an inflammatory reaction and a prolonged (3 h) increase in vascular permeability to plasma protein<sup>2</sup>. The mechanism for this reaction remains to be determined, but it is reasonable to assume that a release of bradykinin-kallidin-type peptides from their circulating precursors may occur due to the trypsin-like proteolytic activity of fraction 1. Since this fraction is only partially purified, it is quite possible that it contains other than

trypsin-like protease(s). Further purification and characterization of its enzymatic and vasoactive properties are in progress.<sup>19</sup>

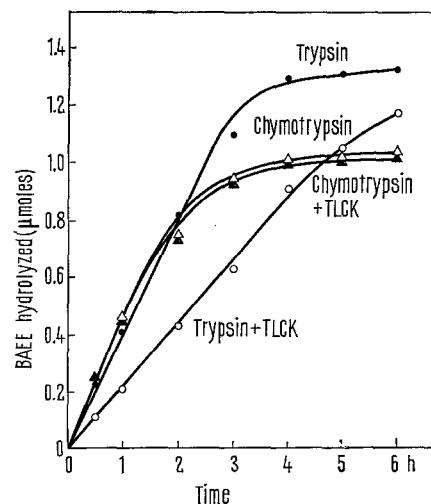


Fig. 4. Inhibitory effect of TLCK on trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. Trypsin, 35  $\mu$ g ( $2.92 \times 10^{-3} M$ ) was preincubated in 5 ml of  $6.03 \times 10^{-6} M$  TLCK and 200  $\mu$ g ( $1.74 \times 10^{-6} M$ ) of  $\alpha$ -chymotrypsin was preincubated in 5 ml of  $1.21 \times 10^{-4} M$  TLCK. Other experimental conditions were as in Figure 3 except that the aliquot of the above mixture contained 0.7  $\mu$ g of trypsin or 100  $\mu$ g of  $\alpha$ -chymotrypsin for the assay.

**Zusammenfassung.** Eine der vaso-aktiven Proteinfaktionen, aus Meerschweinchenhautextrakt gewonnen, hydrolysiert Kasein und N-( $\alpha$ )-benzoyl-L-Arginin Ethyl Ester. Substratspezifität, optimaler pH-Wert und Inaktivierung durch eine speziellen Trypsininhbitor (TLCK) beweisen, dass diese Proteinfaktion eine trypsinähnliche Protease enthält.

CH. W. SONG<sup>20</sup>, J. TABACHNICK and D. J. McCARRON JR.

*Laboratory of Experimental Dermatology,  
Research Laboratories, Albert Einstein Medical Center,  
Philadelphia (Pennsylvania 19141, USA), 23 May 1969*

<sup>15</sup> M. DIXON and E. C. WEBB, in *Enzymes* (Longmans, Green & Co., London 1958), p. 252.

<sup>16</sup> E. G. ERDÖS, L. L. TAGUE and I. MIWA, Biochem. Pharmacol. 17, 667 (1968).

<sup>17</sup> M. CASTAÑEDA-AGULLÓ and LUZ M. DEL CASTILLO, J. gen. Physiol. 42, 49 (1958).

<sup>18</sup> E. SHAW, M. MARES-GUIA and W. COHEN, Biochemistry 4, 2219 (1965).

<sup>19</sup> Acknowledgment. This investigation was supported by U.S. Public Health Service Research Grant No. RH00218-06, National Center for Radiological Health.

<sup>20</sup> Present address: Department of Radiology, Medical College of Virginia, Richmond (Virginia 23219, USA).

## Hemmefekt von Harnstoff auf die durch Insulin stimulierte Glykogenbildung in zwei verschiedenen Muskelpräparaten in vitro<sup>1</sup>

Die stimulierende Wirkung von Insulin auf die C-1-Oxydation von Glukose-1-C<sup>14</sup> im epididymalen Fettgewebe wird durch Harnstoff kompetitiv gehemmt<sup>2</sup>. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob Harn-

stoff auf den durch Insulin stimulierten Glukosestoffwechsel des Muskelgewebes eine vergleichbare Hemmung ausübt. Als Mass der Insulinwirkung diente die Glykogenbildung. Für die Untersuchungen wurde das Diaphragma

als klassisches Modell und der M. serratus lateralis als typischer Skelettmuskel gewählt. Als Inkubationsmedium diente ein Puffer nach GEY und GEMMILL mit 300 mg/100 ml Glukose, dem verschiedene Insulinkonzentrationen zugesetzt wurden. Die beiden Hemidiaphragmen (beziehungsweise die beiden serrati) einer Ratte wurden jeweils in derselben Insulinkonzentration inkubiert, das eine mit und das andere ohne Harnstoff. Der Glykogengehalt der Gewebe wurde nach einer zweistündigen Inkubationszeit in einem mit 95%  $O_2$ -5%  $CO_2$  äquilibrierten Medium nach GOOD, KRAMER und SOMOGYI chemisch bestimmt.

Die Empfindlichkeit der beiden Muskelpräparate gegenüber Insulin war unterschiedlich (Figur 1). Beim Diaphragma wurde durch Insulinkonzentrationen von 0,125 bis 8 mE/ml der Glykogengehalt von 330 auf 570  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  Gewebe dosisabhängig erhöht, beim serratus lateralis durch Dosen von 2 bis 32 mE/ml von 260 auf 400  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  Gewebe. Die Neigungen der beiden log Dosis-Wirkungs-Kurven waren jedoch nicht verschieden. In hohen Konzentrationen zeigte Insulin eine Selbsthemmung: beim Diaphragma trat diese Selbsthemmung bei Insulinkonzentrationen über 32 mE/ml auf, beim serratus lateralis bei Konzentrationen über 128 mE/ml.

Die insulinbedingte Glykogenbildung im Diaphragma wurde durch Harnstoff gehemmt (Figur 2). Die log Dosis-Wirkungs-Kurve des Insulins wurde durch 140–280 mM/l Harnstoff konzentrationsabhängig parallel nach rechts verschoben: verglichen mit den effektiven Insulinkonzentrationen im Kontrollpuffer waren die äquieffektiven Insulinkonzentrationen nach Zugabe von 140 mM/l Harnstoff etwa 4mal, nach 280 mM/l etwa 16mal höher. Im Gegensatz zur Insulin-Harnstoff-Interaktion am Fettgewebe wird am Diaphragma der Maximaleffekt des Insulins durch Harnstoff deutlich herabgesetzt. Infolge der beobachteten Insulinselfthemmung (im Kontrollpuffer üben 128 mE/ml Insulin einen geringeren Effekt aus als 32 mE/ml:  $p < 0,05$ ) spricht diese Herabsetzung des Maximaleffekts durch Harnstoff nicht unbedingt gegen das Vorliegen eines rein kompetitiven Antagonismus<sup>3</sup>. Schwieriger ist der Hemmeffekt des Harnstoffs auf die Glykogenbildung ohne Insulinzugabe zum Inkubationsmedium zu erklären. Die Möglichkeit, dass es sich dabei um eine Hemmung des im Präparat vorhandenen

Insulins handelt, bleibt zu untersuchen. Die Beobachtungen am serratus lateralis waren mit den am Diaphragma erhobenen Befunden vergleichbar. Der Insulineffekt wurde am serratus lateralis schon mit der kleinsten verwendeten Harnstoffkonzentration (70 mM/l) deutlich gehemmt: verglichen mit den effektiven Insulinkonzentrationen im Kontrollpuffer waren die äquieffektiven Insulinkonzentrationen unter dieser Bedingung etwa 2mal höher. Am Fettgewebe findet sich eine deutliche Hemmung bereits bei 50 mM/l (300 mg/100 ml) Harnstoff<sup>4</sup>. Die trotz hoher Insulinämie erniedrigte Glukose-

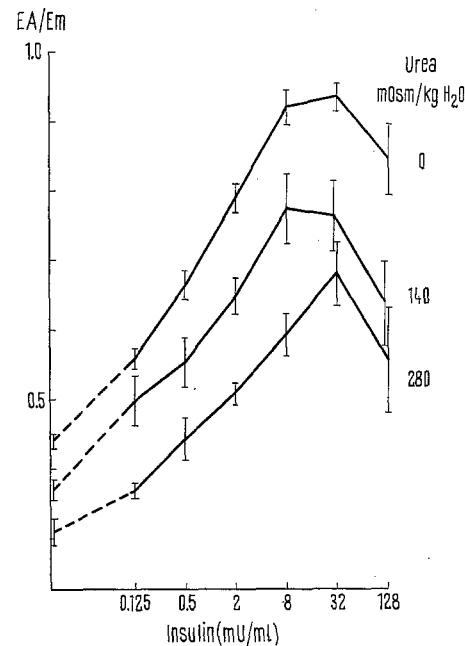


Fig. 2. Log Dosis-Wirkungs-Kurven für die Zunahme der Glykogenkonzentration im Diaphragma und die Einwirkung von Insulin ohne und mit Harnstoff im Inkubationsmedium. Vertikale Linien: Standardabweichungen der Mittelwerte. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 12 Bestimmungen ohne Harnstoff, aus 6 Bestimmungen mit Harnstoff. Die Wirkungen wurden für jeden einzelnen Versuch als Fraktion des Maximaleffekts ausgedrückt.

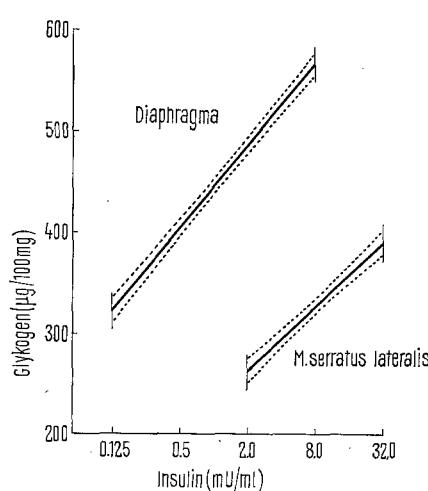


Fig. 1. Glykogengehalt des Diaphragmas und des M. serratus lateralis ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  Frischgewebe) nach Inkubation in insulinhaltigen Lösungen, ausgedrückt als Regressionsgerade (mit ihren Standardabweichungen). In Betracht gezogen werden nur Werte im Bereich derjenigen Insulindosen, die eine dosisabhängige Steigerung des Glykogengehalts verursachen (für das Diaphragma 0,125–8,0 mE/ml; für den M. serratus lateralis 2,0–32,0 mE/ml).

toleranz hochurämischer Patienten kann die Folge einer durch Harnstoff herabgesetzten Insulinempfindlichkeit der peripheren Gewebe sein.

**Résumé.** L'effet activateur de l'insuline, *in vitro*, sur la formation de glycogène musculaire, était inhibé par la présence d'urée dans le milieu d'incubation. Ce phénomène a été observé sur deux modèles expérimentaux: le diaphragme et le muscle grand dentelé du rat. Le mode par lequel l'urée s'oppose à l'action de l'insuline est discuté.

H. OBENAUS und R. GUIDOUX

*Institut de Pharmacologie de l'Université,  
CH-1005 Lausanne (Schweiz),  
und Sandoz-Forschungs-Institut,  
Wien (Österreich), 29. Mai 1969*

<sup>1</sup> Ce travail bénéficie du soutien financier du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (Crédit no 5316).

<sup>2</sup> R. GUIDOUX, Helv. physiol. Acta 26, 219 (1968).

<sup>3</sup> E. U. ARIENS, A. M. SIMONIS und J. M. VAN ROSSUM, *Molecular Pharmacology* (Academic Press, New York/London 1964), vol. 1, p. 297.

<sup>4</sup> R. GUIDOUX und G. PETERS, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 260, 126 (1968).