

Über einen pepsinstabilisierenden Faktor (PSF) im Magen und Magensaft bei Mensch und Tier

VON HANS HAENDLE, WILFRIED LORENZ, HERMANN STURM und EUGEN WERLE*

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Mai 1968)

Zusammenfassung: In der Magenschleimhaut und im Magensaft von Mensch und Tier wurde das Vorhandensein großer Mengen einer Substanz nachgewiesen, die Pepsin vor der sog. alkalischen Denaturierung schützt. Die als pepsinstabilisierende Faktor bezeichnete Substanz (PSF) wurde aus der Magenschleimhaut des Hundes angereichert. Ihre Schutzwirkung auf Pepsin tritt momentan ein.

Als Einheit der Schutzwirkung wird diejenige Menge des Faktors bezeichnet, die unter Standardbedingungen 1 µg Pepsin zu 50% vor alkalischer Denaturierung schützt. Bei gegebener Pepsinmenge nimmt mit steigender Menge des Faktors die Wirkung bis zu einem 80proz. Schutz linear, dann langsamer zu.

Der pepsinstabilisierende Faktor ist eine niedermolekulare, säure- und alkalistabile Substanz, wahrscheinlich ein Polypeptid mit einem Mole-

kulargewicht unter 8000. Unsere Versuche sprechen dafür, daß Pepsinogen die Muttersubstanz dieses Peptids ist, aus der es beim Übergang in aktives Pepsin freigesetzt wird.

Die Frage, ob der pepsinstabilisierende Faktor mit dem HERRIOTT'schen Pepsin-Inhibitor oder mit einem anderen freiwerdenden Peptid identisch ist, ist noch nicht entschieden. Er wird durch Pepsin zwischen pH 3 und 4 und durch Trypsin bei pH 7,8 so angegriffen, daß er seine Schutzwirkung verliert. Bei pH 1,8 und darunter ist er gegen Pepsin resistent.

Die Frage einer physiologischen Funktion des pepsinstabilisierenden Faktors wird diskutiert. Differenzierungen von proteolytischen Magenenzymen nur aufgrund ihrer unterschiedlichen Alkalistabilität sind wegen der Existenz dieses Faktors nicht möglich.

Summary: A pepsin stabilizing factor (PSF) in the stomach and gastric juice of humans and animals. A substance which protects pepsin against the so-called alkaline denaturation was found in large amounts in the gastric mucosa and gastric juice of humans and animals. This pepsin stabilizing factor was purified from the gastric mucosa of the dog. Its protective action on pepsin is instantaneous.

The unit of protective activity is the amount of the factor which, with 1 µg of pepsin, gives 50 per cent protection against alkaline denaturation. With a given amount of pepsin and an increasing amount of the factor the protective action is linear up to 80 per cent, and it then increases more slowly.

The pepsin stabilizing factor is a low molecular weight substance, stable to acid and alkali. It is

probably a polypeptide with a molecular weight less than 8,000. The present work indicates that pepsinogen is the precursor of this peptide, which is released when the pepsinogen is converted into active pepsin.

It is not yet known whether the pepsin stabilizing factor is identical with HERRIOTT's pepsin inhibitor or another released peptide. It is attacked by pepsin between pH 3 and 4 and by trypsin at pH 7.8, and thereby loses its protective activity. At pH 1.8 and lower it is resistant to pepsin.

The possible physiological function of the pepsin stabilizing factor is discussed.

Owing to the existence of this factor, it is not possible to differentiate the proteolytic gastric enzymes on the basis of their alkali stability.

* Postanschrift: Prof. Dr. Dr. E. WERLE, D-8 München 15, Nußbaumstraße 20.

Pepsin, das am meisten untersuchte Enzym des Magensaftes, nimmt unter den Enzymen des tierischen Organismus eine Sonderstellung ein: Es ist außerordentlich säurestabil, das pH-Optimum für die Spaltung seiner natürlichen Substrate liegt unter pH 2 und sein isoelektrischer Punkt unter pH 1¹. Der hohen Säurestabilität des Pepsins steht seine ungewöhnlich rasche irreversible Inaktivierung im neutralen und schwach alkalischen Bereich, beginnend bei pH 6, gegenüber, die allgemein als „alkalische Denaturierung“ bezeichnet wird. Wir haben nun in der Magenschleimhaut und im Magensaft eine Substanz festgestellt, die das Pepsin gegen diese alkalische Denaturierung weitgehend schützt und deshalb von uns pepsinstabilisierender Faktor (PSF) genannt wird.

In der vorliegenden Arbeit wird über Vorkommen, Isolierung und Charakterisierung dieses Faktors berichtet und die Frage seiner physiologischen Bedeutung diskutiert.

Methodik

Verwendete Substrate und Enzyme: Pepsin, 2mal kristallisiert (Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey); Pepsinogen, kristallisiert (Mann Research Laboratories, New York); Rinderhämoglobin (Serva, Heidelberg); Fibrin-blue (Calbiochem, Los Angeles); *N*-Acetyl-L-phenylalanyl-3.5-dijod-L-tyrosin (Cyclo Chemical Corp., Los Angeles).

Sonstige Substanzen: Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderlunge, Reinheitsgrad 0,18 µg/KIE* (Bayer, Leverkusen); Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne, kristallisiert (Novo, Mainz); Ocytocin (Farbwerke Hoechst, Frankfurt-Höchst); Gastrin, synthetisches Pentapeptid (Imperial Chemical Industries, Macclesfield, Großbritannien); Cholecystokinin-Pankreocymin (Karolinska Institutet, Schweden); sämtl. verwendete Aminosäuren (Serva, Heidelberg).

Bestimmung der Pepsinaktivität

Pepsin wurde nach drei verschiedenen Methoden bestimmt, deren Ergebnisse übereinstimmen:

1. Nach ANSON² et al. mit Hämoglobin als Substrat

10–40 µg Pepsin (gelöst in 0,1–0,4 ml 0,01N HCl) werden mit 5 ml Substratlösung (2 g Hämoglobin/100 ml 0,06N HCl) bei 35,5°C 10 Min. im Wasserbad inku-

* 1 KIE (= Kallikrein-Inhibitor-Einheit) = ca. 0,1 U (= Enzym-Einheiten) = ca. 0,1 µMol gespaltenes Substrat/Min.

¹ G. E. PERLMANN, *Advances Protein Chem.* **10**, 1 [1955].

² M. L. ANSON u. E. MIRSKY, *J. gen. Physiol.* **16**, 59 [1932].

biert. Endvolumen 6,0 ml, Volumenausgleich mit 0,01N HCl. Nach Reaktionsstopp mit 10 ml 5proz. Trichloressigsäure wird abfiltriert, 5 ml des Filtrates und 10 ml 0,5N NaOH unter ständigem Schütteln mit 3 ml Phenolreagenz nach FOLIN und CIOCALTEU (1:2 verdünnt mit dest. Wasser) versetzt. Nach 5–10 Min. Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird die Extinktion bei 578 nm im Photometer Eppendorf gegen dest. Wasser bestimmt. Bei Puffern, die mit Phenolreagenz reagieren, wurde die Extinktion der Filtrate direkt gegen dest. Wasser bei 280 nm im Photometer Zeiss PMQ II gemessen. Als Leerwert wurde ein Ansatz mit Trichloressigsäure-inaktiviertem Pepsin verwendet, die Eichkurve wurde wie bei den folgenden Methoden mit kristallinem Pepsin aufgestellt. 1 µg des verwendeten Pepsinpräparates entsprach 2,5 Pepsin-Einheiten nach ANSON.

2. Nach NELSON³ et al. mit Fibrin-blue als Substrat

Die mit dem Phenolreagenz erhaltenen Ergebnisse prüften wir mit der Methode nach NELSON: In graduierten Meßzylindern mit Stopfen werden 0,5 ml Pepsin (10–40 µg, pH 1,8) und 0,5 ml 0,018N HCl mit Fibrin-blue (100 mg) im Wasserbad bei 35°C für 30 Min. inkubiert. Dann wurde das Inkubat gekühlt, mit 50,0 ml 0,018N HCl aufgefüllt, 10 Sek. kräftig geschüttelt, filtriert und die Extinktion des gefärbten Filtrates bei 620 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz ohne vorhergehende Inkubation.

3. Nach CHIANG⁴ et al. mit *N*-Acetyl-L-phenylalanyl-3.5-dijod-L-tyrosin als Substrat

Da auch die Bestimmung mit Fibrin-blue nicht spezifisch ist, verwendeten wir noch die Methode nach CHIANG, durch die man z. B. die Pepsin-von der Gastricsinaktivität differenzieren kann. 0,75 ml Pepsinlösung (10–40 µg, pH 1,8) werden mit 0,25 ml Substrat (= 0,002M *N*-Acetyl-L-phenylalanyl-3.5-dijod-L-tyrosin in 0,005M NaOH) bei 37°C für 1 Std. inkubiert. Die Spaltung des Substrates wird durch Zugabe von je 0,5 ml Cyanidacetat-Puffer nach ROSEN⁵ und 3proz. Ninhydrinlösung in Äthylenglykol-monomethyläther gestoppt. Zur Entwicklung des Farbstoffes wird der Ansatz 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt und im Anschluß mit 5 ml 50proz., wäßrigem Propanol-(2) kräftig geschüttelt. Die Extinktion der abgekühlten Lösung wird am Photometer (Zeiss) bei 578 nm gegen dest. Wasser abgelesen. Leerwert: Ansatz ohne Inkubation.

Bestimmung des pepsinstabilisierenden Faktors (PSF)

Prinzip: Es wird die Beständigkeit bekannter Mengen von Pepsin bei pH 7,0 in Gegenwart und in Abwesenheit des Faktors bestimmt.

³ L. W. NELSON, E. CIACCIO u. G. HESS, *Analyt. Biochem.* [New York] **2**, 39 [1961].

⁴ L. CHIANG, L. SANCHEZ-CHIANG, ST. WOLF u. J. TANG, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **122**, 700 [1966].

⁵ H. ROSEN, *Arch. Biochem. Biophysics* **67**, 10 [1957].

Meßvorgang: Ein Ansatz mit 1 ml Pepsin (100 µg gelöst in 0,01N HCl) und 0,1–1,0 ml einer den pepsinstabilisierenden Faktor enthaltenden Lösung (Magensaft, Magenschleimhautextrakt) wird mit 0,1N HCl auf pH 1,8 eingestellt und bei 37°C für 5 Min. inkubiert. Endvolumen: 2 ml, aufgefüllt mit 0,01N HCl. Dann wird der pH-Wert des Ansatzes mit 0,2N NaOH oder 0,2M DAVIES-, Triäthanolamin- und Phosphatpuffer auf 7,0 gebracht und genau 2 Min. bei 37°C weiter inkubiert. Die erforderliche Alkalimenge sollte vorher ermittelt werden, um die befristete Inkubationszeit genau einhalten zu können, in der nicht durch den pepsinstabilisierenden Faktor geschütztes Pepsin seine Aktivität vollständig verliert. Nach Rückstellung des pH-Wertes auf 1,8 mit 0,1N HCl wird die im Ansatz verbliebene Pepsinaktivität (Pepsinrestmenge) anhand einer der oben beschriebenen Methoden bestimmt, wobei nur ein Teil des Gesamtvolumens in die Tests eingesetzt und die ermittelte Pepsinaktivität auf das Gesamtvolumen berechnet wird. Der so erhaltene Wert ist ein Maß für die Menge des pepsinstabilisierenden Faktors. Letzere sollte so gewählt werden, daß sie nur bis zu 50% des vorgelegten Pepsins schützt.

Als Leerwert diente ein Ansatz, bei dem die Faktorhaltige Lösung erst nach der Rückstellung des pH-Wertes von 7,0 auf 1,8 zugesetzt wurde. Puffer, die zur Alkalisierung verwendet wurden, ergaben in den molaren Konzentrationen 0,2 und 2,0 keine unterschiedlichen Aktivitätswerte für den Faktor.

Definition der Einheit

Eine PSF-Einheit ist diejenige Menge des pepsinstabilisierenden Faktors, in deren Gegenwart 1 µg kristallisiertes Pepsin unter den angegebenen Standardbedingungen nur 50% seiner Aktivität verliert.

Aufbereitung von Magensaft und Magenschleimhaut zur Bestimmung des pepsinstabilisierenden Faktors

Für die nachstehenden Versuche wurde, wenn nicht anders vermerkt, zum Nachweis des Faktors die Methode nach ANSON verwendet.

Bei nichtnarkotisierten Menschen und bei mit Nembutal (0,1 g/kg) narkotisierten Hunden wurde Magensaft mit einer Duodenalsonde gewonnen, 2 Min. auf 100°C erhitzt und im Eisbad rasch wieder abgekühlt, wodurch vorhandenes Pepsin und Pepsinogen denaturiert und so als Störfaktor ausgeschaltet wurden. 0,1 bis 1,0 ml des so behandelten und eventuell mit 0,02N HCl verdünnten Magensaftes wurden für den PSF-Test eingesetzt. Schleimhaut von Menschen, Rind, Schwein und Hund wurde von der Muscularis propria abgezogen, mit dem 5fachen Volumen dest. Wasser homogenisiert und bei 1800×g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf pH 1,8 eingestellte Überstand wurde 2 Min. gekocht, rasch abgekühlt, nochmals bei 1800×g für 5 Min. zentrifugiert und zur Bestimmung des pepsinstabilisierenden Faktors verwendet. 1 PSF-Einheit entsprach 0,122 mg Biuretprotein (nach WADDELL).

Aus der Magenschleimhaut des Hundes wurde ein Präparat des pepsinstabilisierenden Faktors auf folgende Weise gewonnen: Fundus- und Corpusschleimhaut von 4 Bastardhunden wurden mit dem doppelten Volumen 1N HClO₄ im Ultraturax homogenisiert und bei 1800×g 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5N KOH neutralisiert und vom entstandenen KClO₄ dekantiert. Die klare, leicht gelbliche Lösung enthielt 158000 PSF-Einheiten, eine PSF-Einheit entsprach 0,021 mg Biuretprotein. Im Rotationsverdampfer ließ sich der Extrakt ohne Aktivitätsverlust etwa auf das 10fache konzentrieren.

Die Chromatographie an Sephadex G-25 (Säule 120×2 cm, Fließmittel 0,2M Triäthanolaminpuffer, pH 7,2) ergab 3 Hauptfraktionen, von denen die zuerst eluierte die pepsinstabilisierende Aktivität enthielt. Sie wurde lyophilisiert, in 10 ml/0,05M HCO₂H gelöst und an Sephadex G-50 (Säule 120×2 cm) rechromatographiert. Das faktorhaltige Filtrat wurde wiederum lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 37% (s. Tabelle); 1 PSF-Einheit entsprach 9,3 µg Protein. Wie erwartet, war das Produkt bei der Membranelektrophorese noch nicht einheitlich. Das praktisch salzfreie Trockenpulver wurde zur weiteren Charakterisierung des pepsinstabilisierenden Faktors verwendet.

Tabelle. Schema der Anreicherung des pepsinstabilisierenden Faktors.

Magenschleimhaut	Reinigungsgrad [µg Prot./PSF-Einheit]	Ausbeute [%]
wäßriger Extrakt	122	100
enteiweißter Extrakt	21	75
Fraktionierung an Sephadex G-25	11,7	55
Fraktionierung an Sephadex G-50	9,3	37

Ergebnisse

1. Vorkommen des pepsinstabilisierenden Faktors in der Magenschleimhaut verschiedener Säugetiere und des Menschen

Die Magenschleimhaut von Mensch, Hund, Rind und Schwein enthält den Faktor in großen Mengen. Nur wenig geringer ist der Gehalt im Magensaft von Mensch und Hund. Die pepsinstabilisierende Aktivität beträgt in allen Regionen der Magenschleimhaut und im Magensaft etwa $\frac{1}{12}$ bis $\frac{1}{5}$ der jeweils vorhandenen Pepsinaktivität (Abb. 1), Pepsin- und Faktor-Konzentration verlaufen weitgehend parallel. In der Magenmuskulatur war der Faktor nicht nachweisbar.

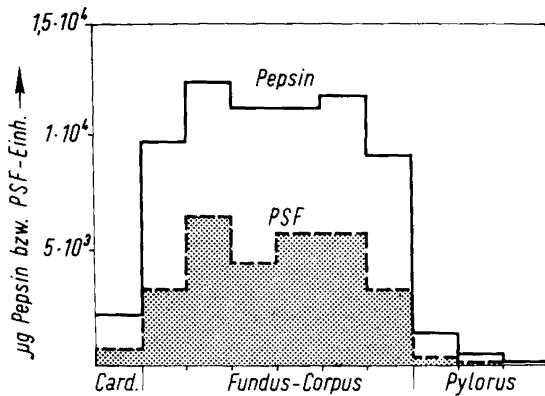


Abb. 1. Verteilung des Pepsins und des pepsinstabilisierenden Faktors im Magen des Hundes.

Abszisse: Zahl der Magenabschnitte.

Ordinate: Pepsin-Aktivität (—) und PSF-Einheiten (---).

Die Magenwand wurde entlang der zirkulären Muskelschicht in etwa 2 cm breite Streifen geschnitten und die Schleimhaut in der Submucosa von der Muscularis propria abgetrennt. Die Bestimmung des Faktors erfolgte anhand der Fibrinblue-Methode.

Die höchste Konzentration findet sich dabei im Fundus- und Corpusbereich; in der Cardia- und Pylorusregion ist sie sehr niedrig.

2. Eigenschaften des pepsinstabilisierenden Faktors

a) Säure- und Alkalistabilität, Dialysierbarkeit

Schon bei der Isolierung aus der Magenschleimhaut des Hundes erwies sich der pepsinstabilisierende Faktor als besonders säurebeständig; selbst in 3N Perchlorsäure tritt über einen längeren Zeitraum kein Aktivitätsverlust auf. In 1N HClO₄ ist der Faktor für mindestens 10 Min. kochbeständig. Auch in 1N NaOH (5 Min. bei 25°C) behält er seine pepsinstabilisierende Wirkung, bei der Dialyse gegen dest. Wasser durchdringt er rasch und ohne Verlust an Wirkung die Cellophanmembran.

b) Inaktivierung durch proteolytische Enzyme

Unter der Annahme, daß es sich bei diesem Faktor um ein Polypeptid handelt, prüften wir seine Aktivität nach Einwirkung von Trypsin und Pepsin. Durch 2 mg Trypsin wurden bei dem für die Trypsinaktivität (in 0,2M Triäthanolaminpuffer) optima-

len pH-Wert von 7,8 450 PSF-Einheiten mit einer Halbwertszeit von mehr als einer halben Stunde zerstört.

Durch 2 mg Pepsin wurden 670 PSF-Einheiten bei dem für die natürlichen Substrate des Pepsins optimalen pH-Wert von 1,8 auch während 2stdg. Inkubation nicht angegriffen (s. auch Abb. 4). Da aber beim Pepsin das pH-Optimum weitgehend vom Substrat abhängt, untersuchten wir die Frage der Inaktivierung des Faktors durch Pepsin auch bei höheren pH-Werten. Dabei ergab sich, daß er von Pepsin im Bereich von pH 3–4 mit einer Halbwertszeit von etwas weniger als einer Stunde abgebaut wird (Abb. 2).

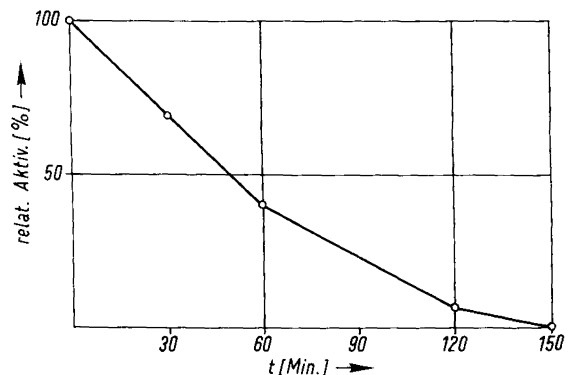


Abb. 2. Abbau des pepsinstabilisierenden Faktors durch Pepsin bei pH 3,5.

670 PSF-Einheiten wurden mit 2 mg Pepsin in 6 ml 0,2M DAVIES-Puffer bei 37°C inkubiert.

Abszisse: Inkubationszeit (Min.).

Ordinate: Relative Aktivität des pepsinstabilisierenden Faktors.

Die Aktivität zum Zeitpunkt 0 der Inkubation wurde gleich 100% gesetzt. Die Aktivitätsbestimmung von Pepsin erfolgte mit Hämoglobin.

c) Konzentrations-Wirkungsbeziehung des pepsinstabilisierenden Faktors

Setzt man den Faktor vor der „Alkalisierung“ des Pepsins dem Ansatz zu, so nimmt die Schutzwirkung gegenüber Pepsin mit steigender Konzentration des Faktors zu (Abb. 3). Mit 80 PSF-Einheiten behalten 30 µg Pepsin unter den in der Legende zu Abb. 3 angegebenen Bedingungen praktisch ihre volle Aktivität. Alle drei beschriebenen Pepsinbestimmungsmethoden (s. Methodik) führten dabei zu übereinstimmenden Ergebnissen.

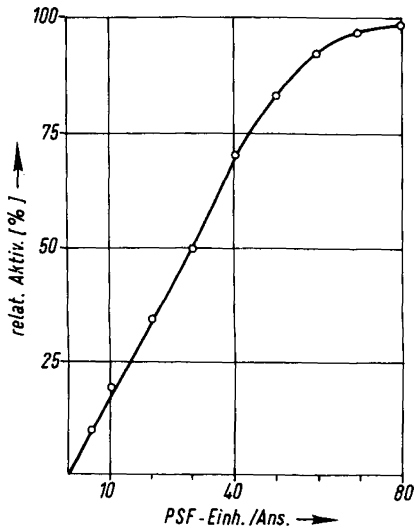


Abb. 3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Schutzwirkung des pepsinstabilisierenden Faktors gegenüber Pepsin.

Inkubationsdauer: 2 Min. bei pH 7,2 und 37°C. In den Kontrollansätzen ohne den Faktor war zu keinem Zeitpunkt nach Alkalisierung eine Pepsinaktivität nachweisbar.

Ordinate: Relative Restaktivität von 30 µg Pepsin nach alkalischer Denaturierung.

Abzisse: Konzentration des Faktors (Einh./Ansatz).

d) Nachweis der Bildung eines Komplexes zwischen pepsinstabilisierendem Faktor und Pepsin

5 mg kristallisiertes Pepsin wurden mit 1500 PSF-Einheiten in 10 ml 0,02M Triäthanolaminpuffer, pH 6,9, gelöst und gegen 10 l des gleichen Puffers dialysiert. Nach der gleichen Zeit, nach der in einem Parallelansatz ohne Pepsin der Faktor im Innendialysat nicht mehr nachweisbar war, wurden im Innendialysat der Mischung mit Pepsin nach dem Kochen etwa 80–85% des Faktors wiedergefunden.

e) Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes zwischen pepsinstabilisierendem Faktor und Pepsin

Unter den Bedingungen einer 50proz. Schutzwirkung des Faktors gegenüber Pepsin (s. Abb. 3) wurde die Dauer der Vorinkubation bestimmt, nach der maximale Schutzwirkung auftrat. Sie war bereits nach 1 Min. Vorinkubation optimal (Abb. 4). Die Schutzwirkung nahm auch bei 2stdg. Inkubation bei pH 1,8 nicht ab.

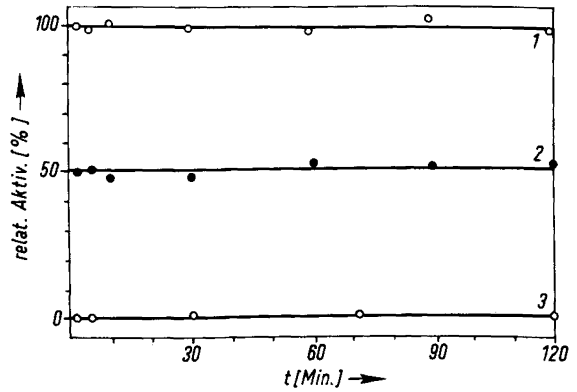


Abb. 4. Bildungsgeschwindigkeit des Komplexes zwischen pepsinstabilisierendem Faktor und Pepsin und Stabilität des Faktors bei pH 1,8 in Gegenwart von Pepsin.

30 µg Pepsin wurden mit und ohne den Faktor bei pH 1,8 vorinkubiert, danach alkalisiert und 2 Min. lang bei pH 7,2 und 37°C inkubiert. Kurve (1): ohne Alkalisierung; Kurve (2): alkalisierte Ansätze mit stabilisierendem Faktor; Kurve (3): alkalisierte Ansätze ohne stabilisierenden Faktor.

Ordinate: Relative Pepsinaktivität [%]; der 100%-Wert entspricht der Aktivität ohne alkalische Denaturierung; Abzisse: Vorinkubationsdauer [Min.].

f) Dauer des Schutzes für Pepsin durch den stabilisierenden Faktor im alkalischen Milieu

Wurden Ansätze mit einem konstanten Gemisch aus Pepsin und pepsinstabilisierendem Faktor nach 5 Min. Vorinkubation bei pH 1,8 verschieden lange dem pH-Wert 7,2 ausgesetzt, so nahm mit steigender Inkubationsdauer die pepsinstabilisierende Wirkung ab. Innerhalb von etwa 30 Min. fiel die Pepsinaktivität und damit die Schutzwirkung auf ungefähr die Hälfte ab und verminderte sich danach nurmehr geringfügig (Abb. 5).

g) Pepsinstabilisierung durch den pepsinstabilisierenden Faktor in Abhängigkeit vom pH-Wert

Während Pepsin in Abwesenheit des Faktors seine Aktivität ab pH 6 langsam und ab pH 6,5 rasch und vollkommen verliert, bleibt sie in dessen Gegenwart im Bereich von pH 6,0–7,6 weitgehend erhalten (Abb. 6). Durch größere Mengen des Faktors, als sie in Abb. 6 gewählt wurden, läßt sich eine 100proz. Stabilisierung des Pepsins auch über den Neutralpunkt hinaus erzielen (Beispiel, s. Abb. 3).

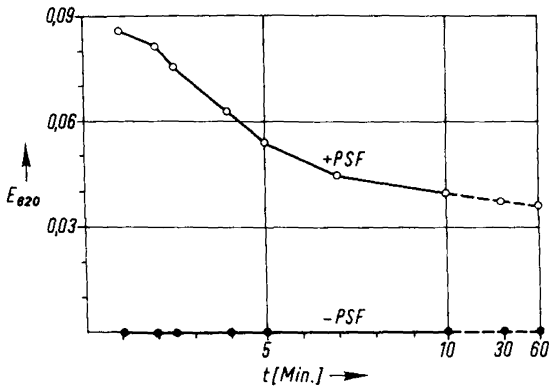


Abb. 5. Dauer der Schutzwirkung des pepsinstabilisierenden Faktors gegenüber Pepsin im alkalischen Bereich. Es wurde eine 50proz. Schutzwirkung als Ausgangsbasis gewählt.

Ordinate: Pepsinrestaktivität in Extinktionen bei 620 m μ .

Abszisse: Inkubationszeit bei pH 7,2 [Min.].

○—○—○—○: Ansätze mit Faktor; ●—●—●—●: Ansätze ohne Faktor.

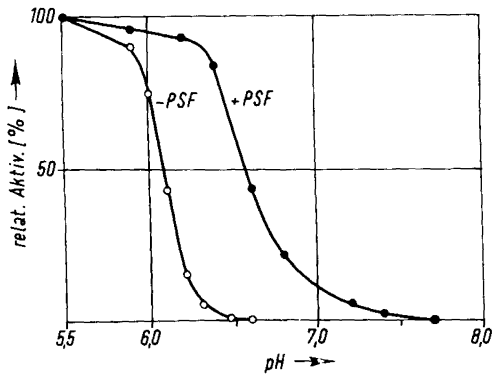


Abb. 6. Pepsinaktivität nach vorheriger Inkubation des Pepsins mit und ohne pepsinstabilisierenden Faktor bei verschiedenen pH-Werten.

30 μ g Pepsin wurden mit 8 PSF-Einheiten bei 37°C für 2 Min. mit jeweils 0,2M DAVIES-Puffer inkubiert.

○—○—○—○: Ansätze ohne Faktor; ●—●—●—●: Ansätze mit Faktor.

h) Zur Frage der Spezifität des pepsinstabilisierenden Faktors

Um zu entscheiden, ob auch andere Oligopeptide, Polypeptide oder Aminosäuren Pepsin vor der alkalischen Denaturierung schützen können, wurden der polyvalente Kallikrein-Trypsin-Inhibitor,

Cholecystokinin, Pankreocym, Ocytocin, kristallisierter Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, synthetisches Gastrin, ferner die Aminosäuren Alanin, Prolin, Valin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin und Histidin als Modellsubstanzen verwendet. Sie waren alle ohne Einfluß auf die alkalische Pepsindenaturierung.

3. Herkunft des pepsinstabilisierenden Faktors

Die Spaltbarkeit des Faktors durch proteolytische Enzyme, also seine vermutliche Polypeptidnatur, die gleiche regionale Verteilung wie Pepsin in der Magenschleimhaut und die weitgehend parallelen mengenmäßigen Anteile beider Substanzen in Magensaft und -Schleimhaut ließen vermuten, daß dieser Faktor ein bei der Pepsinogenaktivierung freiwerdendes Bruchstück des Pepsinogens darstellen könnte. Wir untersuchten dies mit reinem Pepsinogen.

Die Lösung von 5 mg eines Pepsinogenpräparates in 0,06N HCl wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Lösung (I) wurde gekocht und anschließend auf pepsinstabilisierende Aktivität untersucht, der andere (II) für die Pepsinbestimmung verwendet. Das Verhältnis von in (I) gebildetem Pepsin zu aus (II) erhaltenen pepsinstabilisierenden Faktor betrug 1:9, berechnet aus der Aktivität beider Substanzen.

Diskussion

In der Literatur wurde bisher lediglich das Vorhandensein eines Inhibitors für Pepsin beschrieben, eines Faktors, der beim Übergang von Pepsinogen in Pepsin frei wird und der z. B. die milchgerinnende Wirkung des Pepsins hemmt⁶.

Es konnte nun die Existenz eines Pepsin-Schutzfaktors (PSF) mit Hilfe von 3 verschiedenen Methoden, darunter der für Pepsin relativ spezifischen Spaltung des N-Acetyl-L-phenylalanyl-3,5-dijod-L-tyrosins, das zum Beispiel von Gastricrin nicht angegriffen wird⁴, nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein Polypeptid, das nur in der Magenschleimhaut und im Magensaft, nicht aber in der Magenmuskulatur vorkommt. Andere von uns untersuchte Polypeptide und Aminosäuren vermögen Pepsin nicht zu stabilisieren.

⁶ R. M. HERRIOTT, J. gen. Physiol. 24, 325 [1941].

Das Molekulargewicht des pepsinstabilisierenden Faktors war zunächst zwischen 1000 und 10000 anzunehmen, wofür das Verhalten bei der Chromatographie an Sephadex, ferner die Säurestabilität und der rasche Durchtritt durch die Cellophanmembran sprachen. Für die Polypeptidnatur des Faktors sind mehrere Gründe anzuführen, in erster Linie seine Angreifbarkeit durch Trypsin und Pepsin. Das Hauptargument aber liefert der Befund, daß Pepsinogen mit größter Wahrscheinlichkeit als die Muttersubstanz des Faktors anzusehen ist. Darauf deutet einmal die auffallende lokale und mengenmäßige Vergesellschaftung mit Pepsin in der Magenschleimhaut und im Magensaft, zum anderen die Tatsache, daß bei der Ansäuerung einer Pepsinogenlösung sich unter den freiwerdenden Polypeptiden pepsinstabilisierende Aktivität findet. Pepsinogen hat ein Molekulargewicht von 42900. Das größte Bruchstück, das bei der Säureeinwirkung neben Pepsin (Molekulargewicht 35300) abgespalten wird, ist das von HERRIOTT⁷ als Pepsin-Inhibitor bezeichnete Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 3200.

Subtrahiert man die Summe der Molekulargewichte von Pepsin und Inhibitor, nämlich 38500, von dem Molekulargewicht des Pepsinogens, so verbleibt ein Rest von der Größenordnung 4400, der bei der Umwandlung von Pepsinogen zu Pepsin in kleineren Bruchstücken frei wird.

⁷ H. VAN VUNAKIS u. R. M. HERRIOTT, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **23**, 600 [1957].

Es ist möglich, daß der pepsinstabilisierende Faktor mit dem HERRIOTTschen Pepsin-Inhibitor identisch ist. Dieser Inhibitor hemmt, wie erwähnt, die milchgerinnende Wirkung des Pepsins zwischen pH 5—6, hat aber keinen Einfluß auf die eigentliche enzymatische Spaltung von Substraten des Pepsins im Bereich von pH 1,6—4,0. Auch eine Identität des Faktors mit einem der übrigen bei der Pepsinaktivierung freiwerdenden Polypeptide ist zunächst nicht auszuschließen.

Es erhebt sich die Frage, ob dem pepsinstabilisierenden Faktor eine physiologische Bedeutung zukommt. Man darf annehmen, daß sich im Inhalt des Magens pH-Werte, besonders zu Beginn der Nahrungsaufnahme, einstellen, bei denen die Stabilität des Pepsins nicht gewährleistet ist. Hier könnte die Schutzfunktion des Faktors von Bedeutung sein.

Seine Existenz in der Magenschleimhaut und im Magensaft könnte bei quantitativen Bestimmungen der proteolytischen Magenenzyme zu Fehlschlüssen führen, weil Methoden, z. B. zur Differenzierung von Pepsin und Gastricsin, verwendet werden, bei denen die unterschiedliche Alkalistabilität der Enzyme zur gegenseitigen Abgrenzung herangezogen wird^{8,9}.

⁸ M. D. TURNER, J. L. TUXILL, L. L. MILLER u. H. L. SEGAL, *Gastroenterology* **53**, 905 [1967].

⁹ M. D. TURNER, L. L. MILLER u. H. L. SEGAL, *Gastroenterology* **53**, 967 [1967].