



УДК 577.156.41.02

МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ПЕПСИНОГЕНА

*Козлов Л. В., Грылова Ю. И., Антонов В. К.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Исследована активация пепсиногена в растворе в присутствии пепстатина и пепсиногена, иммобилизованного на аминоэтилцеллюлозе. При активации пепсиногена в присутствии пепстатина не происходит отщепления активационного пептида и пепсиноген превращается в форму, способную связывать пепстатин. При активации пепсиногена, иммобилизованного на АЕ-целлюлозе, образуется активная форма пепсиногена без отщепления активационного пептида. Активный пепсиноген связывает пепстатин только при низких значениях рН. При рН выше 5 он не связывает пепстатин и не проявляет активности в отношении свертывания молока. Активированный иммобилизованный пепсиноген способен превращаться в неактивный исходный пепсиноген при щелочных значениях рН, а затем при рН 2 вновь переходить в активную форму с той же кинетикой процесса активации, как и для исходного пепсиногена. Процесс активации, щелочного конформационного перехода в исходный пепсиноген и реактивации можно повторять многократно. Сделан вывод о том, что активация пепсиногена состоит из определяющей скорости стадии конформационного развертывания пепсиногена при кислых значениях рН с образованием активной молекулы. В дальнейшем происходит процесс межмолекулярного ферментативного отщепления активационных пептидов, придающий активации необратимый характер.

Активации пепсиногена посвящено большое число исследований, начиная с ранних работ Херриотта [1] и кончая работами последних лет [2—4]. Однако единого мнения о механизме превращения зимогена в пепсин до сих пор нет. Известно, что процесс заканчивается укорочением молекулы с N-конца на 44 аминокислотных остатка, что образующийся фермент быстро и необратимо денатурирует при нейтральных и щелочных значениях рН, когда пепсиноген устойчив, что пепсин специфически и практически необратимо ингибируется пепстатином — ингибитором из актиномицетов, но пепсиноген с пепстатином не связывается, и что пепсиноген не проявляет ферментативной активности, не будучи активированным, — так, он не свертывает молоко при рН 5—6, когда активация пепсиногена не идет. Многие авторы полагают, что процесс активации начинается с конформационного перехода молекулы зимогена в активную конформацию [3, 5—7].

Как установили Дайкс и Кей [2], пепсиноген превращается в пепсин путем последовательного расщепления молекулы зимогена: вначале отщепляется 16-членный пептид, который является ингибитором молокосвертывающей активности пепсина [8], а затем идет дальнейший протеолиз, пока на N-конце молекулы не останется изолейцин-45. Ограниченный протеолиз с отщеплением первых 16 аминокислот Дайкс и Кей осуществили, проводя активацию пепсиногена в присутствии пепстатина. Этот промежуточно образующийся фермент они назвали псевдопепсином. Образование псевдопепсина было подтверждено также Христенсеном, Педерсеном и Фолтманом [4], которые получили его при активации пепсиногена, связанного

с сефарозой. Эти авторы показали, что псевдопепсин обладает молокосвертывающей активностью при рН 5,3 и, как и пепсин, является щелочнолабильным.

Однако Марциняшин и др. [3], проводя активацию пепсиногена в присутствии пепстатина, пришли к иным выводам. Они полагают, что пепсиноген на первом этапе активации при кислых значениях рН претерпевает конформационное превращение с образованием так называемого δ -пепсиногена, который не обладает ферментативной активностью, но способен связывать пепстатин или белковый субстрат гемоглобин. В щелочной среде комплексе пепсиноген — пепстатин диссоциирует, освобождаящийся δ -пепсиноген претерпевает конформационное превращение частично в исходный пепсиноген, способный вновь активироваться при кислых рН, а частично в σ -пепсиноген, неспособный к дальнейшей активации. На втором этапе кислотной активации δ -пепсиноген превращается в θ -пепсиноген, т. е. в пепсиноген с пептидной связью 44—45, расположенной в зоне активного центра фермента. Затем происходит внутримолекулярное расщепление связи 44—45 с образованием \varnothing -пепсиногена, т. е. комплекса пепсина и активационного пептида, который диссоциирует с освобождением α -молекулы, т. е. пепсина и активационного пептида, тут же гидролизующегося до более мелких фрагментов.

Нам казалось наиболее вероятной гипотеза, рассмотренная Кассел и Кеем [9], которая состоит в том, что зимоген претерпевает конформационное превращение, давая ферментативно активную молекулу, способную к межмолекулярному процессу активации, когда зимоген расщепляет другую молекулу зимогена. Эта гипотеза была впервые предложена Фолтманом для активации проренина (см. [9] и ссылки в этой работе), и она согласуется с механизмами активации других протеиназ, для которых эти механизмы были убедительно доказаны. Однако один из авторов статьи, Кей, в более поздней работе доказывает внутримолекулярное расщепление в пепсиногене при его активации [2]. Того же мнения придерживается теперь и сам автор гипотезы Фолтманн [4].

Если подытожить имеющиеся на сегодняшний день представления, то можно отметить два основных вопроса, по которым у авторов гипотез имеются разногласия.

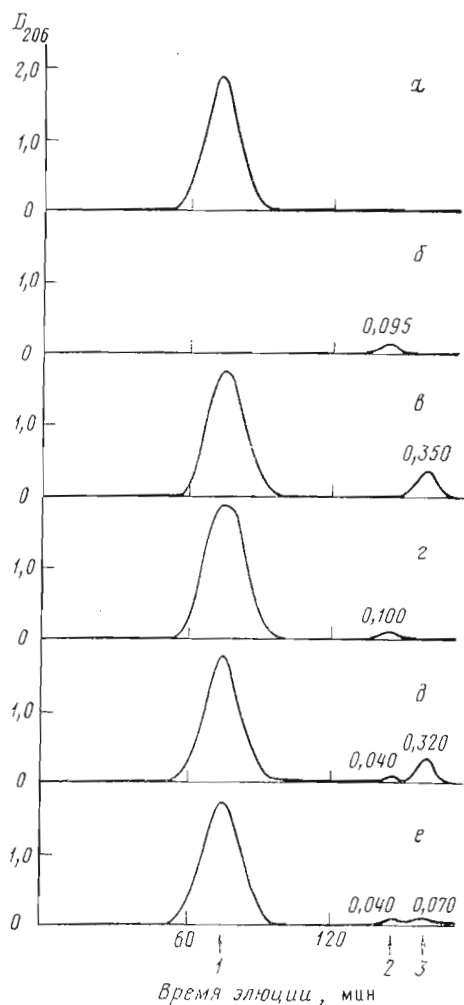
1. Обладает ли ферментативной активностью образующаяся промежуточная конформация пепсиногена (назовем ее по Тангу [3] δ -пепсиногеном)?

2. Происходит ли процесс расщепления связи в молекуле зимогена при активации внутримолекулярно или межмолекулярно? Чтобы уточнить второй вопрос, отметим, что протекание межмолекулярного процесса активации при рН выше 2 и возможность такого процесса ни у кого не вызывает сомнения. Поэтому второй вопрос можно сформулировать еще так: может ли происходить внутримолекулярный процесс расщепления зимогена? Отметим попутно, что многочисленные кинетические данные, указывающие на первый порядок процесса активации, не говорят строго о внутримолекулярном процессе расщепления связи. Действительно, если образование δ -пепсиногена определяет скорость реакции активации, то этот конформационный процесс может протекать по первому порядку и обусловить первый порядок всей реакции активации. Кроме того, если образование δ -пепсиногена достаточно для появления активности в растворе, то и в этом случае должен наблюдаться первый порядок — как кинетический, так и концентрационный.

Для выяснения этих двух вопросов мы изучили активацию пепсиногена в присутствии пепстатина и активацию иммобилизованного пепсиногена.

Активацию пепсиногена проводили при рН 2,0 при концентрации зимогена 1 мг/мл в присутствии 50 мкг/мл пепстатина и без него. Как следует из данных, приведенных на рис. 1, при активации пепсиногена в присутствии пепстатина снижается пик свободного пепстатина, а пептидные

Рис. 1. Схема разделения на сефадексе G-50 (50×1,5 см) опытных и контрольных инкубационных смесей при исследовании активации пепсиногена в растворе (рН 2, 20°, 30 мин) в присутствии пепстатина: *a* — пепсиноген без активации, *b* — пепстатин, *c* — пепсиноген после активации, *г* — пепсиноген и пепстатин без активации, *д* — пепсиноген с добавленным после активации пепстатином, *e* — активация пепсиногена в присутствии пепстатина (опыт); 1 — белок (пепсин или пепсиноген), 2 — пепстатин, 3 — активационные пептиды (числа над пиками — поглощение при 206 нм)



продукты активации обнаруживаются в значительно меньших количествах (см. величины D_{206} пиков). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что при активации пепсиноген претерпевает конформационное превращение, образуя форму, способную связывать пепстатин; при этом пепстатин препятствует расщеплению молекулы пепсиногена. Эти данные совпадают с результатами Марцинишина и др. [3], однако не согласуются с данными Дайкса и Кея [2], обнаруживших отщепление 16-членного пептида в процессе активации пепсиногена в присутствии пепстатина.

Активация пепсиногена, иммобилизованного на сефарозе, активированной бромцианом, описана в работах [4, 10]. В работе [10] показано образование в ходе активации новой N-концевой аминокислоты — изолейцина. В работе [4] это было подтверждено и, кроме того, показано, что этот остаток является изолейцином-17 молекулы пепсиногена, т. е. что при активации происходит отщепление первых 16 аминокислот. В обеих работах предполагалось, что процесс протекает внутримолекулярно. Следует, однако, отметить, что иммобилизация ферментов на активированной бромцианом сефарозе приводит к препаратам, в которых возможна десорбция фермента с носителя (см., например, [11]). Поэтому нельзя быть вполне уверенным в том, что процесс активации пепсиногена, связанного с сефарозой, сопровождающийся расщеплением пептидной связи, не происходит в результате действия фермента, находящегося в растворе, т. е. не является межмолекулярным.

Мы испробовали несколько способов и носителей для иммобилизации пепсиногена и остановились на том, который давал максимальное количество активного белка с полным отсутствием десорбции фермента в растворе в условиях активации (рН 2), о чем свидетельствовало отсутствие ферментативной активности в надосадочной жидкости после активации препарата при рН 2. Такими свойствами обладали препараты пепсиногена, иммобилизованного на АЕ-целлюлозе при помощи глутарового альдегида (АЕС-пепсиноген). Характеристика препаратов АЕС-пепсиногена и

Т а б л и ц а 1
Иммобилизация пепсиногена и пепсина на АЕС-целлюлозе
(20 ч, 4°) и характеристика препаратов

Белок	Условия иммобилизации		Характеристика препаратов	
	pH	Соотношение белок : носитель : глутаровый альдегид (вес : вес : объем)	Белок, мг/г препарата	Активность при pH 2,0, мг/г препарата
Пепсин	4,5	1 : 10 : 50	Не определяли 55	3,5 3,5-4,0
Пепсиноген	7,3	1 : 10 : 50		

АЕС-пепсина, полученного аналогичной иммобилизацией пепсина, приведены в табл. 1.

Активность препарата АЕС-пепсина и потенциальная активность АЕС-пепсиногена были одинаковыми. По данным определения элементарного азота, препарат АЕС-пепсиногена содержал 55 мг белка на 1 г. Из этого количества белок, способный активироваться при инкубации при pH 2, составлял 7%. Чтобы исключить возможность присутствия в препарате пепсиногена активного пепсина, препарат иммобилизованного пепсиногена инкубировали в течение 1 ч при pH 8,0. После этого препарат АЕС-пепсиногена при pH 2 обладал такой же активностью, что и без инкубации в щелочной среде. Инкубация АЕС-пепсина при pH 8,0 приводит к полностью неактивному препарату, не реактивирующемуся при pH 2 или каком-либо другом значении pH.

Для характеристики препарата АЕС-пепсиногена до и после активации при pH 2 были определены дансильированием N-концевые аминокислоты. В препарате иммобилизованного пепсиногена были обнаружены в качестве N-концевых: лейцин и в следовых количествах изолейцин, а в препарате после активации при pH 2: лейцин и следы аланина и фенилаланина, а изолейцин отсутствовал. Таким образом, было показано, что при активации при pH 2 иммобилизованного пепсиногена не происходит образования новых N-концевых аминокислот, т. е. можно было предположить, что активация происходит без расщепления пептидных связей.

При иммобилизации молекулы пепсиногена фиксируются на носителе и пространственно разобщены, поэтому расщепление пептидных связей может протекать только внутримолекулярно. Отсутствие образования новых N-концевых аминокислот свидетельствует об отсутствии внутримолекулярного протеолиза активированной (развернутой) молекулы пепсиногена (δ -пепсиногена). Таким образом, образующийся после активации при pH 2 иммобилизованного пепсиногена препарат активного иммобилизованного фермента может быть развернутой активной формой пепсиногена (δ -пепсиногеном). Его свойства должны отличаться от свойств пепсина.

Мы исследовали отношение АЕС- δ -пепсиногена к щелочной денатурации. Как уже упоминалось выше, АЕС-пепсин необратимо теряет активность после инкубации при pH 8.

После активации АЕС-пепсиногена при pH 2 и 37° полученный активный препарат (АЕС- δ -пепсиноген) инкубировали при pH 8,0 в течение 2 ч при комнатной температуре. Повторная активация приводит к препарату с активностью, составляющей 20-30% от исходной. Следует отметить, что в работе Марцинишина и др. [3] при щелочной диссоциации комплекса δ -пепсиногена с иммобилизованным пепстатином также удавалось получить только 30% исходного пепсиногена, способного к активации при pH 2; 70% препарата превращались в неактивный σ -пепсиноген.

В нашем случае 30% активной формы АЕС- δ -пепсиногена при повторной щелочной обработке больше не теряли потенциальной активности и

Таблица 2

Ингибирование препаратов пепсина и пепсиногена пепстатином

Препарат	pH ингибирования	Активность при pH 2, % от исходной
АЕС-пепсин	2,0	0
»	5,3	0
АЕС-пепсиноген	5,3	100
»	2,0	0
АЕС-δ-пепсиноген *	5,3	29
АЕС-δ-пепсиноген, pH 8 **	5,3	26

* АЕС-пепсиноген после активации при pH 2,0.

** АЕС-пепсиноген после активации при pH 2,0 и щелочной обработки при pH 8,0.

реактивация при pH 2 снова давала 30% активной формы (т. е. 100% от предыдущего цикла активации).

Кинетика процесса возрастания активности при инкубации при pH 2 АЕС-пепсиногена и АЕС-δ-пепсиногена после щелочной обработки практически одинакова, что свидетельствует в пользу превращения АЕС-δ-пепсиногена в АЕС-пепсиноген при щелочных значениях pH (рис. 2).

Для доказательства различий в поведении АЕС-пепсина и АЕС-δ-пепсиногена было исследовано ингибирование этих препаратов пепстатином при pH 2 и 5,3 с последующей отмывкой избытка ингибитора и определением активности (или потенциальной активности) при pH 2. Результаты приведены в табл. 2. Как следует из приведенных данных, АЕС-пепсин при pH 2 и 5,3 практически необратимо связывает пепстатин; АЕС-пепсиноген при pH 5,3 пепстатин не связывает, на что указывает способность препарата при pH 2 полностью активироваться. Аналогично ведут себя 30% АЕС-пепсиногена после активации при pH 2,0, т. е. АЕС-δ-пепсиноген; при pH 5,3 эта доля пепсиногена пепстатин не связывает. В последнем случае результаты получаются одинаковые как для препарата после активации при pH 2,0, так и для препарата после pH 8,0, т. е. при pH 5,3 δ-пепсиноген способен превращаться в исходную форму неактивного предшественника (пепсиноген) на 30%, как и при щелочной инкубации.

Для проверки предположения о конформационном превращении δ-пепсиногена в исходный зимоген при повышении pH мы изучили pH-зависимость гидролиза АЕС-δ-пепсиногеном гемоглобина и способность этого препарата свертывать молоко при pH 5,3. Падение активности при повышении pH для δ-пепсиногена происходит более круто, чем для пепсина, что свидетельствует о начале свертывания молекулы δ-пепсиногена в исходный пепсиноген (рис. 3).

Еще более показательны в этом отношении результаты изучения монокосвертывающей активности препаратов АЕС-пепсина и АЕС-пепсиногена при pH 5,3. Активности препаратов АЕС-пепсина, АЕС-пепсиногена и АЕС-δ-пепсиногена равны соответственно $3 \cdot 10^{-2}$, $1 \cdot 10^{-4}$ и $3,6 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ при равной активности по гемоглобину при pH 2,0. Следует отметить, что по мере инкубации АЕС-δ-пепсиногена при pH 5,3 его монокосвертывающая активность падает (см. рис. 4), т. е. наблюдается кинетика превращения δ-пепсиногена в менее активный исходный пепсиноген.

Таким образом, N-концевой анализ, поведение при щелочной обработке, кинетика ренатурации, данные по связыванию пепстатина при pH 5,3, pH-зависимость гидролиза гемоглобина и данные по свертыванию молока при pH 5,3 показывают различие в поведении АЕС-пепсина и АЕС-пепсиногена, активированного при pH 2. Эти данные говорят в пользу того, что АЕС-пепсиноген, активированный при pH 2, представляет собой активную форму развернутой молекулы пепсиногена. Кроме того, N-концевой

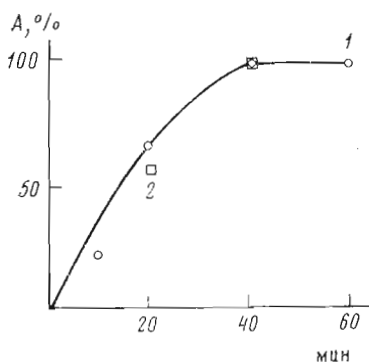


Рис. 2

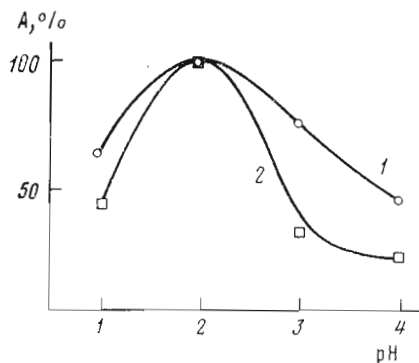


Рис. 3

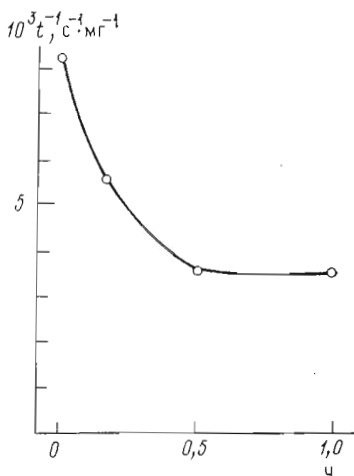


Рис. 4

Рис. 2. Кинетика активации АЕС-пепсиногена (рН 2, 37°, 30 мин) — 1 и реактивации АЕС-δ-пепсиногена после щелочной обработки (рН 8,0) — 2. (За 100% в каждом случае принимали максимальную активность)

Рис. 3. Зависимость гидролиза гемоглобина АЕС-пепсином (1) и АЕС-δ-пепсиносом (2) от величины рН

Рис. 4. Кинетика изменения молоко-свертывающей - активности АЕС-δ-пепсиногена при инкубации при рН 5,3

анализ не обнаруживает каких-либо разрывов в пептидной цепи зимогена после инкубации при рН 2. Данные по активации пепсиногена в растворе в присутствии пепстатина также свидетельствуют об образовании активной, связывающейся с пепстатином формы молекулы зимогена без разрывов пептидной цепи.

В связи с этим можно высказать мнение о том, что активация пепсиногена в растворе происходит в результате образования развернутой активной формы зимогена с последующим межмолекулярным протеолизом — отщеплением активационного N-концевого пептида (пептидов). Последующий протеолиз необходим, вероятно, для того, чтобы сделать процесс активации необратимым.

Конформационные изменения зимогена, приводящие к раскрытию активного центра протезазы, по-видимому, являются в достаточной мере общим правилом. Наиболее ярким примером этого может служить механизм активации фактора Хагемапа [12]. По-видимому, во всех случаях для закрепления этих конформационных изменений и создания необратимости процесса необходим дальнейший протеолиз.

Экспериментальная часть

Получение пепсиногена [1, 13]. Слизистую желудка свиный (2 кг), очищенную от жира и слизи, промывали, измельчали и экстрагировали 4 объемами раствора 0,1 M NaHCO₃, рН 8,0, содержащего (NH₄)₂SO₄ (на-

сыщение 0,2), с перемешиванием в течение 18 ч. Фильтрат доводили $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,7. Осадок белка отделяли центрифугированием в течение 1 ч при 10 000 об/мин и диализовали 18 ч против 0,1 М фосфатного буфера, pH 8,0. К диализату добавляли равный объем свежеприготовленной гидроокиси меди и оставляли стоять 18 ч, затем центрифугировали 1,5 ч при 10 000 об/мин, осадок отбрасывали. К раствору добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения 0,8, осадок после центрифугирования растворяли в 200 мл 0,02 М фосфатного буфера, pH 6,8, и диализовали против 10 л этого же буфера в течение 18 ч. К диализату добавляли буфер до 2 л, после фильтрования наносили на промытую тем же буфером колонку с DEAE-целлюлозой DE-32 Whatman (Англия) (20×4 см) и хроматографировали в линейном градиенте концентраций NaCl (0—0,5 М) в том же буфере (общий объем 2 л). Фракцию белка, выходящую при концентрации NaCl 0,3 М, диализовали против 0,02 М фосфатного буфера, pH 6,8, и лиофильно высушивали. Выход пепсиногена-сырца 8,38 г.

Для получения высокоочищенного пепсиногена 2 г белка растворяли в 50 мл дистиллированной воды, наносили на промытую 0,02 М фосфатным буфером, pH 7,3, колонку с DEAE-целлюлозой DE-52 (15×3 см) и элюировали 1,5 л буфера с линейным градиентом NaCl (0,2—0,6 М). Белковую фракцию, выходящую при концентрации NaCl 0,27 М, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 (мелкий) и лиофильно высушивали. Выход 0,34 г. Потенциальная протеолитическая активность по гемоглобину [14] от 3000 до 6000 ед/мг.

Пепстатин был любезно предоставлен проф. Х. Умезавой (Япония).

Активация пепсиногена в присутствии пепстатина. Пепсиноген (1 мг) растворяли в 1 мл воды, добавляли 50 мкг пепстатина в 50 мкл метилового спирта и 0,1 мл 0,1 М HCl (до pH 2,0). Через 30 мин инкубации при 20° смесь наносили на колонку с сефадексом G-50 (50×1,5 см) и элюировали водой, регистрируя светопоглощение в элюате при 206 нм. Контрольные опыты содержали: а) пепсиноген без активации, б) пепстатин, в) пепсиноген с активацией, г) пепсиноген и пепстатин без активации, д) пепсиноген с активацией и последующим добавлением пепстатина.

Пепсин — препарат Олайнского завода химреактивов, активность 3000 ед/г.

Иммобилизация пепсина и пепсиногена [15]. К 100 мг АЕ-целлюлозы (Serva, ФРГ), предварительно подготовленной обработками 0,5 М HCl и 0,5 М NaOH, добавляли раствор 10 мг пепсина или пепсиногена в 1 мл 0,01 М ацетатного буфера, pH 4,5 (для пепсина), или 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,3 (для пепсиногена), и 0,2 мл глутарового альдегида (Merck, ФРГ). Смесь перемешивали 30 мин на магнитной мешалке при 20° и 18 ч при 4°. Препараты отмывали буфером, в котором иммобилизовали, 1 М NaCl в буфере до отсутствия белка в промывном растворе, буфером от NaCl, 2 М мочевиной в буфере и снова буфером.

Щелочную обработку препаратов АЕС-пепсина и АЕС-пепсиногена проводили в 0,01 М фосфатном буфере, pH 8,0, в течение 1—2 ч при перемешивании с последующей отмывкой 0,01 М ацетатным буфером, pH 4,5, и определением активности по гемоглобину при pH 2.

Активация и реактивация АЕС-пепсиногена. АЕС-пепсиноген инкубировали 30 мин при pH 2 и 37°. После щелочной обработки препаратов при pH 8,0 проводили повторную реактивацию в тех же условиях.

Кинетику активации и реактивации АЕС-пепсиногена исследовали, инкубируя препараты при pH 2,0 и добавляя к пробам раствор гемоглобина при pH 2,0 для определения активности. За время активации принимали время инкубации при pH 2 вместе со временем инкубации с гемоглобином (10 мин).

Ингибирование АЕС-пепсина и АЕС-пепсиногена пепстатином. Специально подготовленные препараты АЕС-пепсиногена (неактивированный, активированный при pH 2, активированный с последующей щелоч-

пой обработкой), а также АЕС-пепсин инкубировали при рН 5,3 или 2,0 с пепстатином (10 мкл 0,1% раствора пепстатина в метиловом спирте на 20 мг препарата в 0,5 мл соответствующего буфера).

Зависимость от рН гидролиза гемоглобина. Гемоглобин растворяли (20 мг/мл) в воде и раствор доводили до требуемого рН при помощи НСl. Навески АЕС-пепсиногена или АЕС-пепсина инкубировали 10 мин при 37° в растворах с теми же значениями рН, затем добавляли раствор гемоглобина и определяли активность по Ансону [14].

Свертывание молока при рН 5,3. Липофилизованное обезжиренное молоко (1 г) растворяли в 200 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,3, добавляли CaCl₂ до концентрации 0,03 М. К навеске (~1 мг) АЕС-пепсиногена (или АЕС-пепсина), суспендированной в 1 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,3, добавляли 5 мл раствора молока при 37° и определяли время образования сгустка.

Авторы благодарят Л. М. Гиподмана за полезные советы и рекомендации по получению препарата пепсиногена и Л. Л. Завада за участие в проведении экспериментов по активированию пепсиногена в присутствии пепстатина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Herriott R. M. (1938) *J. Gen. Physiol.*, **22**, 65-78.
2. Dykes C. W., Kay J. (1976) *Biochem. J.*, **153**, 141-144.
3. Marciniyszyn J., Jr., Huang J. S., Hartsuck J. B., Tang J. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7095-7102.
4. Christensen K. A., Pedersen V. B., Foltmann B. (1977) *FEBS Lett.*, **76**, 214-218.
5. Foltmann B. (1966) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, **35**, 143-231.
6. Funatsu M., Harada Y., Hayashi K., Jirgensons B. (1971) *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 566-572.
7. McPhie P. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4277-4281.
8. Anderson W., Harthill J. E. (1973) *Nature*, **243**, 417-419.
9. Kassell B., Kay J. (1973) *Science*, **180**, 1022-1027.
10. Bustin M., Conway-Jacobs A. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 615-620.
11. Lasch J., Koelsch R. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **82**, 181-186.
12. Cochrane C. G., Revak S. D., Wuepper K. D. (1973) *J. Exptl. Med.*, **138**, 1564-1583.
13. Lincz J. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **37**, 522-524.
14. *Worthington enzyme manual* (1972) pp. 122-123, Worthington Biochemical Corporation, Frechold.
15. Ryle A. P. (1972) *Int. J. Peptide and Protein Res.*, **4**, 123-125.

Поступила в редакцию
27.II.1978

MECHANISM OF PEPSINOGEN ACTIVATION

KOZLOV L. V., KRYLOVA YU. I., ANTONOV V. K.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The activation of pepsinogen in solution in the presence of pepstatin, as well as the activation of pepsinogen immobilized on aminoethylcellulose were studied. In the first case the process is not accompanied by splitting off of an activation peptide and pepsinogen transforms into the species which can complex pepstatin. The activation of immobilized pepsinogen produces the active form of zymogen without releasing the activation peptide. Active pepsinogen binds pepstatin only at low pH values, showing neither binding, nor milk clotting activity at pH above 5. Activated immobilized pepsinogen can be transformed into original zymogen at alkaline pH, whereas at pH 2 it can be reactivated with the same kinetics of the activation process as original pepsinogen. The activation process, the alkaline conformational transition and the reactivation can be repeated many times. It is inferred that the pepsinogen activation consists of the rate limiting step of the pepsinogen unfolding at acidic pH accompanied by the formation of the active molecule and followed by intermolecular enzymic splitting off of the activation peptides, the latter giving irreversible character to the activation process.