

## МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА АТФ-G-AКТИНА В $Mg^{2+}$ -СОДЕРЖАЩИХ РАСТВОРАХ

© 2016 г. В.Н. Умецкая

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

E-mail: valentina.umetskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.15 г.

Зарегистрированы протонные спектры ЯМР в области резонанса протонов ароматического кольца нуклеотида мономерного АТФ-G-актина, а также растворов  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина в  $D_2O$  для изучения механизма гидролиза АТФ-G-актина и его роли в образовании F-актина в растворах, содержащих  $Mg^{2+}$ . Обнаружено изменение химических сдвигов полос протонов H2 и H8 и расщепление полосы резонанса H8 аденина АТФ, связанной с G-актином, в результате взаимодействия с дикатионом магния. Наблюдаемые изменения спектров объяснены образованием АДФ-G-актина из мономерного АТФ-G-актина в результате гидролиза АТФ, что рассматривается как начальная стадия перехода G-актина в F-актин.

*Ключевые слова:* спектр ЯМР, конформация, молекулярные взаимодействия.

Известно, что АТФ-G-актин в растворе может трансформироваться в F-актин в присутствии полимеризующих солей. Этот переход наиболее эффективен при добавлении солей магния. Предположительно, АТФ-G-актин с добавлением  $Mg^{2+}$  сопровождается полимеризацией этого белка и переходит в F-актин с последующим гидролизом АТФ в F-актине с выходом свободного фосфата в раствор [1–4]. Дикатион магния, взаимодействующий с АТФ-G-актином, ускоряет его полимеризацию до F-актина. Считается [5], что освобождение фосфата вследствие гидролиза связанной АТФ происходит при присоединении мономера АТФ-G-актина к F-актину [4–6]. При этом скорость гидролиза сильно увеличивается. Природа этого явления и механизм самого гидролиза АТФ в растворе и связанного с белком до конца не ясен [7] и является предметом исследования до настоящего времени [8]. Представления о гидролизе АТФ в комплексе с G-актином в присутствии дикатионов металла связаны с изменением конформации G-актина в процессе полимеризации при трансформации G-актина в F-актин. В реакции замещения разные дикатионы, например  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , конкурируют за одно и то же место высокого сродства к дикатионам в белке [9].  $Ca^{2+}$ - и  $Mg^{2+}$ -содержащий актин имеет различные конформации и отличается скоростью образования олигомеров как начальной стадии полимеризации [10–13]. Для иона  $Mg^{2+}$ , связанного сильной связью с актином, сродство к АТФ-G-актину выше, и гидролиз АТФ происходит с большей скоро-

стью, чем для связанного  $Ca^{2+}$ . При этом оказывается, что  $Mg^{2+}$  связывается необратимо в местах высокого сродства, а  $Ca^{2+}$  легко замещается другими ионами металлов [9]. Известно также, что  $Mg^{2+}$  связывается с актином при физиологических условиях в местах высокого сродства. Считается доказанным, что дикатион магния вместе со связанным нуклеотидом является регулятором процесса полимеризации [13–15], а также образования филаментов F-актина [15]. При изучении процессов регуляции полимеризации дивалентным катионом, связанным в месте высокого сродства, высказано предположение о существовании промежуточных состояний при трансформации G-актина в F-актин, представляющих собой гомо- и гетеро-олигомеры G-актина [13,16,17]. Полимеризация сопровождается гидролизом связанной с актином АТФ, причем АДФ и металлический ион остаются специфично связанными с F-актином [9]. Большое число исследований посвящено изучению места сильного связывания металлического иона в АТФ-G-актине, особенно структурных исследований с помощью спектров протонного ЯМР [4–6,18]. Заметим, что рассматривались в основном изменения структуры белка  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина, в то время как изменения спектров самого нуклеотида при взаимодействии с ионом металла не были обнаружены [4,5]. В одном из ранних исследований [18] показана инвариантность химических сдвигов в области резонанса протонов ароматического кольца аденина АТФ при взаимодействии с G-актином. Был сделан вывод, что место

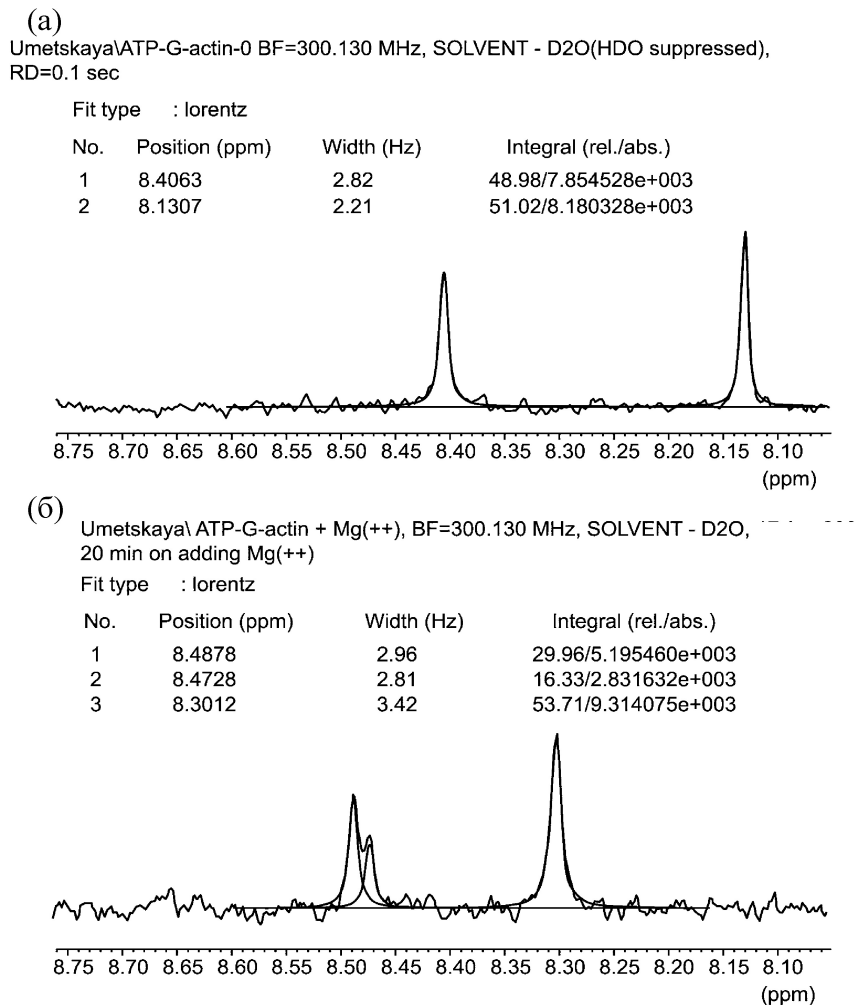
специфического связывания дикатионов, включая  $Mg^{2+}$ , находится на расстоянии более  $16 \text{ \AA}$  в стороне от ароматической части АТФ и что изменения химических сдвигов ее протонов можно игнорировать при анализе процессов, происходящих при переходе G-актина в F-актин в  $Mg^{2+}$ -содержащем растворе. Тем не менее к настоящему времени показано, что G-актин имеет место высокого сродства к дивалентному катиону, известно, что  $Mg^{2+}$  взаимодействует с АТФ-G-актином и увеличивает сродство АТФ к G-актину в  $10^3$  раза [9], а также служит фактором, контролирующим реакцию полимеризации G-актина в F-актин [15]. Для определения места связывания  $Mg^{2+}$  в АТФ-G-актине был рассмотрен Cr-АТФ – аналог  $Mg^{2+}$ -АТФ с известной кристаллической структурой с присоединенным ионом металла [9]. Cr-АТФ-G-актин полимеризуется с образованием филаментов и гидролизом Cr-АТФ-актина до Cr-АДФ· $F_i$ -G-актина, причем Cr-АДФ· $F_i$  остается специфично связанным с F-актином. Cr-АТФ ведет себя как истинный аналог  $Mg^{2+}$ -АТФ. Было доказано, что дивалентный металлический ион связан сильной связью прямо с  $\gamma$ - и  $\beta$ -фосфатами АТФ в месте специфичного связывания нуклеотида в актине. Обнаружена высокая способность G-актина к агрегации, связанная с присутствием  $Mg^{2+}$ -АТФ.

При изучении спектров протонного ЯМР растворов нуклеозидтрифосфатов dАТФ и dТТФ было показано, что их агрегация в виде стопок молекул в растворе сопровождается уменьшением химических сдвигов протонов Н2 и Н8 аденинового кольца нуклеотида АТФ в результате стэкинг-взаимодействий [19]. Дальнейшее уменьшение химических сдвигов этих протонов в растворах, содержащих  $Mg^{2+}$ , свидетельствует об усилении межмолекулярных взаимодействий агрегированных молекул нуклеозидов в растворе. Уменьшение химических сдвигов протонов аденинового кольца объяснено нейтрализацией влияния концевой фосфата на адениновое кольцо, как следствие близости  $Mg^{2+}$  концевому фосфату и адениновому кольцу [19], что возможно, если  $\gamma$ -фосфат находится вблизи аденинового кольца и оказывает деэкранирующий эффект на протон С8. Эти результаты были подтверждены при рассмотрении вопросов гидролиза АТФ, связанной в активном центре белка аденилаткиназы с помощью спектров ЯМР, и сравнения их с кристаллографическими структурами [20]. На основании полученных экспериментальных данных ЯМР и кристаллографических данных [19,20] предложена [20] модель нелинейного расположения трифосфатной цепи АТФ с соответ-

ствующей конформацией гликозидной связи. Дополнительная нейтрализация заряда происходит благодаря взаимодействию с  $Mg^{2+}$ , который хелатирует координатный комплекс, включающий  $\gamma$ -фосфат, С8 и N1 аденина. Можно считать, что совокупность этих структурных построений представляет собой модельное рассмотрение процессов, происходящих при гидролизе фосфатной связи АТФ. В свете структурных представлений [9,20] очевидно, что адениновое кольцо также может быть информативным при ЯМР-изучении гидролиза АТФ и трансформации АТФ-G-актина в F-актин с участием дикатиона магния. Учитывая эти соображения, а также наблюдаемый ранее с помощью УФ-спектров поглощения [3,21] кооперативный переход G-актина в  $Mg^{2+}$ -содержащих растворах при концентрации белка ниже критической в зависимости от времени, отнесенной нами к процессу перехода G-актина в F-актин, нами предпринято изучение протонных ЯМР-спектров поглощения в области резонансов протонов ароматического кольца АТФ растворов АТФ-G-актина, а также  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина и временной зависимости этих спектров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе был использован АТФ фирмы Boehringer Mannheim GmbH (Германия). G-актин выделяли из скелетных мышц кролика по стандартной методике [22,23]. При приготовлении образцов комплексов состава 1:1 использовали содержащий АТФ и G-актин G-буфер следующего состава: 5 мМ трис-НСl, рН 7,6, 0,2 мМ  $CaCl_2$ . Комплекс АТФ-G-актин в G-буфере, содержащем АТФ, был пропущен через анионный обменник Dowex 1 для удаления избытка АТФ. G-актин был проверен на нативность фотометрически в соответствии с процедурой, описанной ранее [24]. Для получения  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина был использован раствор ЭГТА-АТФ-G-актина в присутствии 50 мкМ  $MgCl_2$  при концентрации белка 0,05 мМ. Раствор ЭГТА-АТФ-G-актина получен инкубированием  $Ca^{2+}$ -АТФ-G-актина с 1 мМ ЭГТА в течение 24 ч [15]. Для измерения спектров ЯМР растворы комплексов АТФ-G-актина, а также  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина в G-буфере были диализованы в течение 24 ч против буфера, содержащего  $D_2O$ . Спектры протонного ЯМР растворов АТФ-G-актина в  $D_2O$ , а также растворов  $Mg^{2+}$ -АТФ-G-актина получены при частоте магнитного поля 300,13 МГц в  $D_2O$  при температуре  $24^\circ C$ . Измеряли химические сдвиги в области спектра протонов ароматического кольца АТФ, связанного с G-актином.

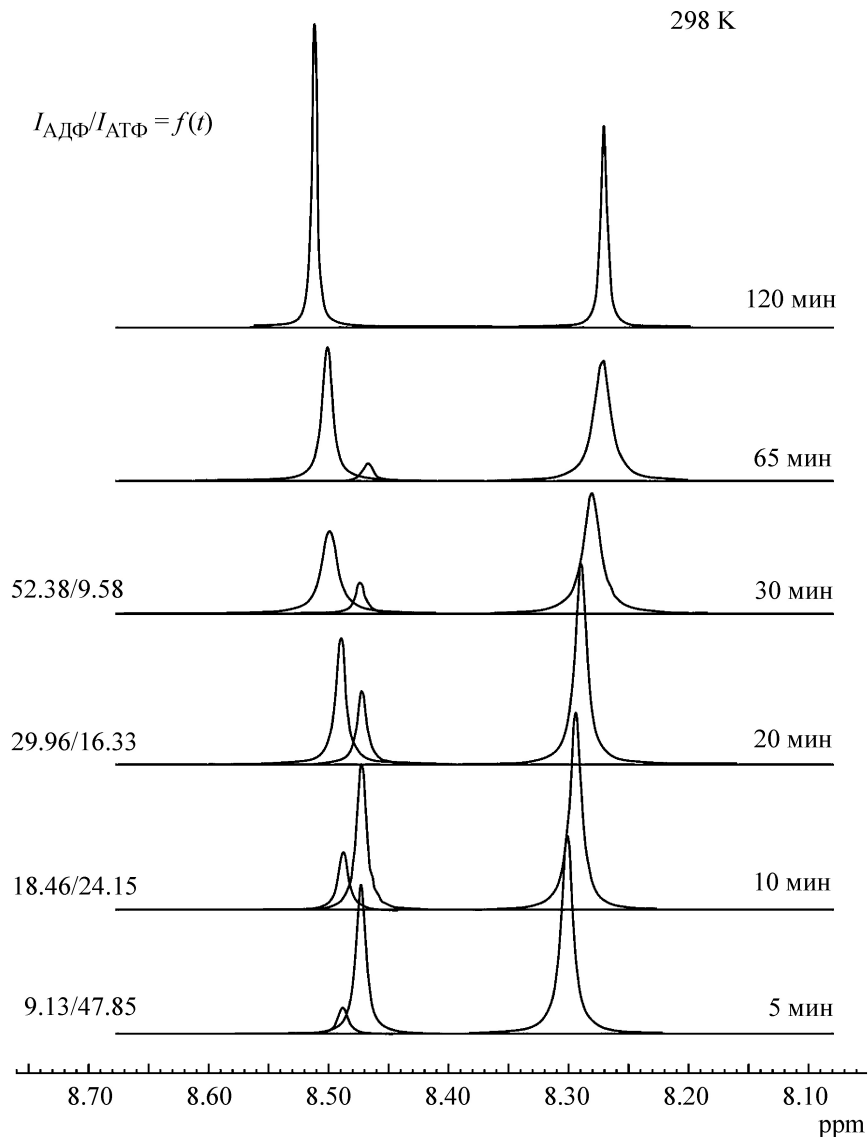


**Рис. 1.**  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры растворов АТФ-G-актина (а) и  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-G-актина (б) в  $\text{D}_2\text{O}$  в диапазоне резонанса протонов Н2 и Н8 аденинового кольца АТФ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, протонный резонанс алифатических связей наблюдается в области 1–4 м.д., в то время как протонный резонанс ароматических групп обнаруживается в области 6–9 м.д. В области резонанса протонов аденинового кольца наблюдаются сигналы для свободной АТФ: при 6,14 м.д. – Н1, при 8,26 м.д. – Н2 и при 8,54 м.д. – Н8. В спектрах, полученных в данной работе, наблюдались полосы резонанса в области поглощения протонов ароматического кольца: при 8,13 м.д., отнесенная к резонансу протона Н2, и при 8,406 м.д. – к резонансу протона Н8 и аденина АТФ, взаимодействующего с G-актином в мономерной форме. Наблюдаемые полосы резонансов эквивалентны одной молекуле АТФ на молекулу актина (рис. 1а). На рис. 1б приведен спектр того же образца в растворе, содержащем  $\text{Mg}^{2+}$ , через 20 мин после его приготовления. В спек-

тре видны изменения величин химических сдвигов. Пик резонанса протона Н2 сдвигается от 8,13 м.д. до 8,30 м.д., тогда как пик резонанса протона Н8 при 8,406 м.д. сдвигается в сторону увеличения и расщепляется на два пика резонансов при 8,473 м.д. и 8,487 м.д.. Эффект расщепления замечен уже через 5 мин после добавления  $\text{Mg}^{2+}$  к раствору АТФ-G-актина (рис. 2). Нарастание интенсивности пика резонанса при 8,487 м.д. и одновременное убывание интенсивности пика при 8,473 м.д. продолжается в течение одного часа со слабо выраженной кооперативностью из-за растянутости времени перехода (35 мин) из одного состояния АТФ в другое (рис. 2). При полном переходе пик при 8,473 м.д. протона Н8 АТФ, связанного с G-актином, исчезает, тогда как пик при 8,487 м.д. протона Н8 принимает максимальное значение интенсивности (рис. 2). Расщепление полосы резонанса протона Н8 АТФ-G-актина

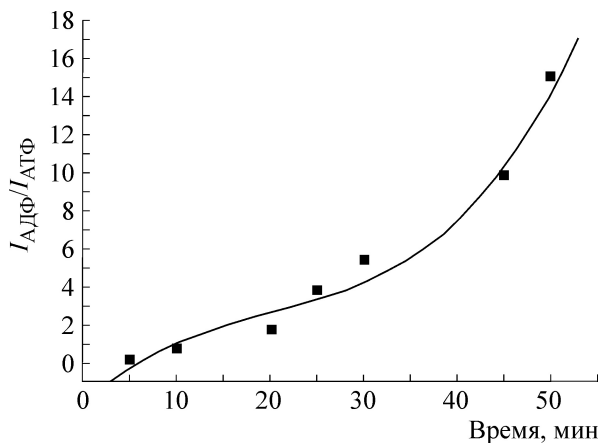


**Рис. 2.** Временная зависимость  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров раствора  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-G-актина в  $\text{D}_2\text{O}$  в области резонанса протонов Н2 и Н8 аденинового кольца АТФ.

вызвано образованием АДФ-G-актина в результате дефосфорилирования фосфатной связи  $\text{PO}_3$  аденозинтрифосфорной кислоты в составе G-актина при взаимодействии с дикатином магния. Изменение отношения интенсивностей пиков резонанса АДФ и АТФ ( $I_{\text{АДФ}}/I_{\text{АТФ}}$ ) во времени, как упоминалось, носит кооперативный характер, что видно из рис. 3. Ранее нами [21] наблюдался кооперативный переход во времени  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-G-актина в водных буферных растворах тех же самых образцов с помощью УФ-спектров поглощения, отнесенный нами к G-F-трансформации актина, о которой судили по появлению полосы поглощения при длине волны 232 нм, характерной для  $\alpha$ -спиральной укладки пептидной связи в АДФ-актине [10,14],

а также по убыванию интенсивности поглощения триптофана и увеличению интенсивности поглощения тирозина.

Представленные выше спектры ЯМР в области протонов ароматического кольца АТФ, связанной с G-актином, имеют характерные особенности, позволяющие судить как о структурных изменениях связанного нуклеотида, так и о процессе гидролиза АТФ. Во-первых, максимум полосы резонанса протона Н2 находится при 8,13 м.д., в то время как резонанс протона Н8 – при 8,406 м.д. (рис. 1а). Подобный сдвиг пика резонанса протона Н8 относительно пика протона Н2, наблюдаемый также в ЯМР-спектрах свободного dАТФ в  $\text{D}_2\text{O}$ , был объяснен дезэкранированием протонов



**Рис. 3.** Временная зависимость отношения между интенсивностями пиков резонансов протона Н8 АТФ и АДФ ( $I_{\text{АТФ}}/I_{\text{АДФ}}$ ) в комплексе с актином в  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащем растворе.

Н8 анионами фосфатных групп dATФ из-за предполагаемой близости конечного  $\gamma$ -фосфата адениновому кольцу нуклеотида. Это объяснение было применено не только для свободных dATФ в растворе [19], но и для АТФ, связанной в активном центре белка аденилаткиназы [20]. Таким образом, наблюдаемые нами различия химических сдвигов протонов Н2 и Н8 также подтверждают представление о близости расположения к адениновому кольцу конечного фосфата трифосфатной цепи АТФ в растворе, именно к протону Н8. Во-вторых, из спектров (рис. 1б) следует, что пики резонансов протонов АТФ-G-актина в растворе, содержащем  $\text{Mg}^{2+}$ , сдвигаются в область слабых полей, в отличие от сдвигов пиков резонансов тех же протонов свободной dATФ в  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащем растворе. Как показано ранее [19], пик резонанса протона Н8 аденинового кольца свободной dATФ в растворе сдвигается в область сильного поля от 9,92 м.д. до 8,86 м.д. при увеличении относительной концентрации  $\text{Mg}^{2+}$ . Этот результат был объяснен как уменьшением влияния  $\text{PO}_3$ -группы на адениновое кольцо из-за нейтрализации ее молекулами дикатиона магния, так и увеличением стабилизации агрегатов молекул АТФ в стопках в результате усиления поляризационных  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг-взаимодействий этих молекул. В растворах АТФ-G-актина (рис. 1а и 1б) изменение концентрации соли  $\text{MgCl}_2$  от 0 до 0,05 мМ сопровождается сдвигом пиков резонансов протонов Н2 и Н8 в область слабого поля. Наблюдаемое увеличение химических сдвигов протонов аденинового кольца АТФ в этом случае доказывает, что местом сильного связывания дикатиона магния в АТФ-G-актине является именно нуклеотид АТФ. Предполагается

только [9,19,20], дикатион магния образует координатный комплекс, включающий  $\gamma$ - и  $\beta$ - $\text{PO}_3$ -группы трифосфатной связи, атомы аденинового кольца и близлежащие молекулы аминокислот [9]. При комплексообразовании с  $\text{Mg}^{2+}$  происходит увеличение электроотрицательности  $\gamma$ -фосфата и увеличение кислотности оставшейся ароматической группы АТФ [19], что может лежать в основе гидролиза АТФ и увеличении химического сдвига протонов ароматического кольца АТФ в составе белка. Деэкранирующее действие на протон Н8 в АДФ, связанной с актином, может оказывать отрицательный заряд  $\beta$ - и  $\alpha$ - $\text{PO}_3$ -групп, что приводит к смещению резонанса протона Н8 в область слабого поля, т.е. к увеличению химического сдвига. В растворах dATФ, а также в  $\text{Mg}^{2+}$ -содержащих растворах dATФ происходит агрегация молекул АТФ, причем межмолекулярные взаимодействия при агрегации определяются поляризуемостью соседних молекул и окружающей среды, тогда как при взаимодействиях, происходящих в белке и в связанном с ним нуклеотиде, более существенны парные ионные взаимодействия и общее закисление среды. Дальнейшее увеличение химического сдвига протона Н8 наблюдается при отщеплении  $\gamma$ - $\text{PO}_3$ -группы и образовании АДФ-G-актина. Как следует из спектра на рис. 2б, пик резонансов протонов АТФ-G-актина при взаимодействии с  $\text{Mg}^{2+}$  смещается в область слабого поля и пик резонанса протона Н8 в АТФ-G-актине расщепляется на два пика при 8,473 м.д. и 8,488 м.д., что связано с образованием АДФ в результате гидролиза АТФ, как упоминалось выше.

Наблюдаемые два пика разной интенсивности в области резонанса протона Н8 являются результатом одновременного существования двух форм актина, отличающихся состоянием связанного нуклеотида: АТФ или АДФ. На рис. 3 видно развитие процесса во времени. Убывание интенсивности пика резонанса протона Н8 АТФ при 4,473 м.д. сопровождается возрастанием интенсивности пика резонанса протона Н8 АДФ при 8,488 м.д. Относительное изменение интенсивностей носит кооперативный характер со временем перехода 30–35 мин (рис. 3). В течение часа пик при 4,733 м.д. полностью исчезает, и в спектре обнаруживается только один пик при 8,488 м.д., принадлежащий протону Н8 АДФ, связанной с актином.

Таким образом, полученные результаты показывают, что при взаимодействии дикатиона магния в активном центре белка вблизи АТФ осуществляются условия для гидролиза АТФ в

результате образования координатного комплекса  $Mg^{2+}$ , включающего фосфаты и атомы аденинового кольца. Увеличение химического сдвига протона Н8 аденина АДФ-G-актина по сравнению с химическим сдвигом протона Н8 АТФ в G-актине связано, по-видимому, с деэкранирующим действием оставшихся  $\beta$ - и  $\alpha$ - $PO_3$ -групп при условии их близости к адениновому кольцу. На основании полученных результатов можно считать, что одновременное взаимодействие  $Mg^{2+}$  с  $\gamma$ -фосфатной группой и кольцом аденина осуществляется также в активном центре G-актина, что подтверждает предполагаемую ранее пространственную структуру комплекса  $Mg^{2+}$ -dАТФ в растворе [19] и в связанном с белком аденилаткиназы состоянии [20]. Можно считать, что одновременное взаимодействие  $Mg^{2+}$  с  $\gamma$ -фосфатной группой и кольцом аденина осуществляется в активном центре G-актина. Предполагаемые взаимодействия дикатиона магния с АТФ возможны, если трифосфатная цепь направлена под соответствующим углом по отношению к аденину, что определяется конформацией рибозного кольца. При этом, как следует из анализа кристаллографических данных [20], комплекс  $Mg^{2+}$  с АТФ-G-актином находится в гидрофобном кармане из аминокислот и является основным реактивным центром, определяющим гидролиз АТФ. Полученные в данной работе протонные спектры ЯМР подтверждают гидролиз АТФ и показывают кооперативный характер этого процесса. Из характера представленных зависимостей (рис. 2 и 3) можно думать, что наблюдаемая кооперативность процесса связана с переходом АТФ-G-актина в АДФ-F-актин. Нарастание интенсивности полосы АДФ-G-актина во времени доказывает, что наблюдаемая кооперативность связана с полным переходом G-актина из смеси двух мономерных состояний АТФ- и АДФ-актина, а также, возможно, частично агрегированных состояний [3,13] в состояние актина, содержащего только  $Mg^{2+}$ -АДФ-актин. Известно, что при полимеризации G-актина нуклеотид АДФ и связанный с ним дикатион магния  $Mg^{2+}$  остаются специфично связанными в F-актине [9]. Поэтому наблюдаемые нами пики резонанса протона Н8 АДФ (рис. 2) могут принадлежать образовавшемуся  $Mg^{2+}$ -АДФ-F-актину. Из рис. 2 следует, что происходит накопление АДФ-G-актина или олигомеров актина до критической величины, после которой происходит переход в новое состояние. Однако при рассмотрении  $Mg$ -содержащих растворов АТФ-G-актина остается невыясненным наблюдаемое ускорение гидролиза АТФ, связанной в активном центре G-актина,

с течением времени (рис. 3). В работах [3,4] подчеркивалось воздействие  $Mg^{2+}$  на АТФ-G-актин и замечено, что его эффект подобен полимеризации. Отмечено также, что  $Mg^{2+}$  образует координатный комплекс не только с аминокислотными остатками, но также с  $\gamma$ - и  $\beta$ -фосфатами [9] трифосфатной связи нуклеотида. В образовавшемся АДФ-G-актине, в соответствии с данными расчета с помощью всеатомной молекулярной динамики [28], показано, что нуклеотидсвязывающая щель предпочитает закрытую конформацию для связанного нуклеотида в АТФ- и АДФ- $\Phi_1$ -состояниях, тогда как АДФ-состояние предпочитает открытую конформацию как для мономера, так и для тримера, что может обеспечить выход диссоциированного фосфата в раствор.

Полученные результаты (рис. 2 и 3) подтверждают заключения работ [2,3,16], что первым шагом процессов гидролиз-полимеризация в  $Mg^{2+}$ -содержащем растворе АТФ-G-актина является гидролиз АТФ до АДФ, ускоренный взаимодействием с  $Mg^{2+}$ . В соответствии с ранее проведенными исследованиями [15], на основании полученных результатов (рис. 2,3) подтвержден вывод о том, что активный центр G-актина, содержащий  $Mg^{2+}$ -АТФ, ответственен за гидролиз G-актина.

Исследования, описанные в данной работе, выполнены в рамках ранее развиваемых представлений [9,15,17,20]. Полученные результаты свидетельствуют о гидролизе АТФ в составе G-актина и о кооперативности процесса гидролиза, подобно процессу полимеризации АТФ-G-актина до F-актина, наблюдаемому ранее с использованием УФ-спектроскопии [3,10,21].

Автор благодарит д.б.н. С.Ю. Хайтлину за интерес к работе и полезное обсуждение рукописи, а также А.П. Солонитцину за техническую помощь при подготовке рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Fuer, S. Molnar, E. Pettko, and F. B. Straub, *Acta Physiol. Hung.* **1**, 150 (1948).
2. L. A. Selden., L. C Gershman, and J. E. Esters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 478 (1983).
3. M. Kasai, Sh. Asakura, and F. Oosawa, *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 13 (1962).
4. H. Strezelewska-Golashevska, in *Divalent Cations, Nucleotides and Proteins*, Ed. by C. G. Dos Remedios (Springer-Verlag, Berlin, 2001), pp. 132-159.
5. J. A. Barden, Ch.-Sh. Wu, and C. G. Dos Remedios, *Biochim. Biophys. Acta* **748**, 230 (1987).
6. J. A. Barden and C. G. Dos Remedios, *Eur. J. Biochem.* **146**, 5 (1985).

7. Sh. C. L. Kamerlin and A. Narshel, *J. Phys. Chem.* **113**, 15692 (2009).
8. E. H. Reister and E. H. Egelman, *J. Biol. Chem.* **282**, 6133 (2007).
9. C. Valentin-Rank and M. F. Carlier, *J. Biol. Chem.* **264**, 20871 (1989).
10. M. Kasai and F. Oosawa, *Biochim. Biophys. Acta* **57**, 22 (1962).
11. M.-F. Carlier, D. Pantaloni, and E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **261**, 10778 (1986).
12. M.-F. Carlier, D. Pantalony, and E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **261**, 10785 (1986).
13. M.-F. Carlier, *J. Biol. Chem.* **266**, 1 (1991).
14. S. Higashi, and F. Oosawa, *J. Mol. Biol.* **12**, 843 (1965).
15. M. O. Steinmetz, A. Hoenger, A. Bremer, and U. Aebi, *J. Struct. Biol.* **119**, 295 (1997).
16. C. Freiden and K. Patane, *Biochemistry*, **38**, 12885 (1999).
17. F. Oosawa, in *Muscle and Nonmuscle Motility*, Ed. by Stracher (Acad. Press, NY, 1983), pp. 151–261.
18. J. A. Barden, R. Cooke, P. E. Wright, and C. Dos Remedios, *Biochemistry* **19**, 5912 (1980).
19. C.-G. Jang and P. Bartl, *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 335 (1972).
20. D. C. Fry, A. Kuby, and A. S. Mildvan, *Biochemistry* **24**, 4680 (1985).
21. В. Н. Умецкая и Г. П. Пинаев, *Биофизика* **46**, 197 (2001).
22. M. E. Carsten and W. F. K. M. Mommaerts, *Biochemistry* **2**, 28 (1963).
23. J. A. Spudich and S. Watt, *J. Biol. Chem.* **246**, 4866 (1971).
24. B. Nagy, *Anal. Biochem.* **47**, 371 (1972).
25. J. Pfaendtner, D. Braunduardib, M. Parriello, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 12723 (2009).

## The Mechanism of ATP-G-Actin Hydrolysis in Mg<sup>2+</sup>-Containing Solutions

V.N. Umetskaya

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

NMR proton spectra were measured in the range of resonance of protons of monomeric ATP-G-actin nucleotide aromatic ring and also of Mg<sup>2+</sup>-ATP-G-actin solutions in D<sub>2</sub>O for studying the mechanism of ATP-G-actin hydrolysis and its role in F-actin formation in the Mg<sup>2+</sup>-containing solutions. Experimental data revealed variations in proton chemical shifts of the H2 and H8 peaks and splitting of the H8 resonance peak of G-actin-bound ATP adenine which are caused by interaction with magnesium dication. The observed spectra variations have been explained by hydrolysis of monomeric ATP-G-actin to ADP-G-actin that is regarded as the initial stage of the G-actin to F-actin transformation.

*Key words: NMR spectra, conformation, molecular interactions*