



УДК 577.322.7:577.336

**ПРИМЕНЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ НЕОДНОРОДНОГО УШИРЕНИЯ СПЕКТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ЗОНДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ  $\text{Ca}^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ***Орлов С. Н., Бойцов В. М., Постнов Ю. В.**Центральная научно-исследовательская лаборатория  
Министерства здравоохранения СССР, Москва*

С помощью анализа параметров неоднородного уширения спектров флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната и N-фенил-1-нафтиламина в системе с белком исследовали механизм взаимодействия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с кальмодулином, тропонином С и парвальбуминами. Показано, что только в случае кальмодулина и тропонина С связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к формированию в молекуле белка гидрофобных участков, которые ответственны за его взаимодействие с ферментами-исполнителями. Оценены относительные размеры пулов зондов, сорбированных на этих участках, и полярность последних. Характеристики участков в кальмодулине, полученном из мозга крысы со спонтанной генетической гипертензией и из мозга нормальных животных, не различаются. Установлено, что механизмы ингибирующего действия трифторперазина и верапамила на кальмодулинзависимые ферменты существенно различаются. Трифторперазин приводит к уменьшению относительного размера пула сорбированного зонда и к увеличению полярности участков связывания NPN в молекуле кальмодулина, в случае же верапамила эти параметры изменяются в противоположном направлении.

В основе механизма регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими белками активности целого ряда ферментов лежат изменения конформации этих белков при взаимодействии с ионами кальция. Исследования с помощью методов флуоресценции [1–6] и ПМР-спектроскопии [7] показали, что по крайней мере в случае кальмодулина и тропонина С взаимодействие фермента с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к формированию в молекуле белка сравнительно обширных гидрофобных участков. Тем не менее ни один из указанных выше методов не давал информации о том, насколько однородны образующиеся гидрофобные участки и какова их относительная полярность.

В настоящей работе для ответа на этот вопрос мы использовали метод анализа спектров флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната (ANS) и N-фенил-1-нафтиламина (NPN) в системе с белками, сравнительно недавно разработанный в нашей лаборатории [8] и апробированный при изучении структурной организации молекулы сывороточного альбумина быка [9] и мембраны эритроцитов [10]. Этот же метод использован в данной работе для сопоставления характеристик гидрофобных областей препаратов кальмодулина, выделенных из мозга крысы со спонтанной генетической гипертензией (SHR) и из мозга контрольных животных (NKWR). Предпосылкой для этой части работы послужили данные о нарушении регуляции кальмодулином активности кальциевого насоса плазматической мембраны при спонтанной генетической гипертензии крысы [11, 12] и гипертензионной болезни человека [13]. Кроме того, на примере трифторперазина и верапамила исследованы особенности взаимодействия комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ –кальмодулин с соединениями фенотиазинового ряда и  $\text{Ca}^{2+}$ -антагонистами.

Интенсивность флуоресценции ANS и NPN в бескальциевой среде не изменяется при добавлении исследованных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков (данные не представлены). В присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с увеличением кон-

Принятые сокращения: ANS – 1-анилинонафталин-8-сульфонат, NPN – N-фенил-1-нафтиламин, SDS – додецилсульфат натрия.

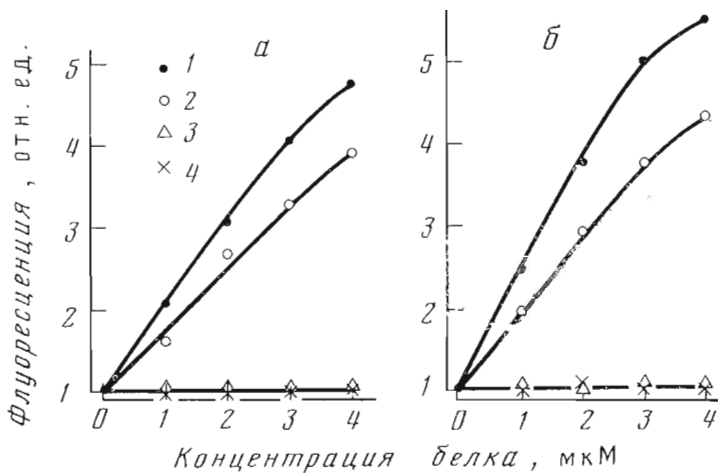


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции ANS при 470 нм (а) и NPN при 420 нм (б) от концентрации кальмодулина из мозга крупного рогатого скота (1), тропонина С (2), парвальбумина I (3) и парвальбумина II (4). Состав среды инкубации (мМ): имидазол-НСl — 40 (рН 7,4; 37° С); КСl — 100, MgCl<sub>2</sub> — 5, СаСl<sub>2</sub> — 0,1. За единицу принято значение интенсивности флуоресценции в отсутствие Са<sup>2+</sup>-связывающих белков

центрации кальмодулина возрастает интенсивность флуоресценции ANS и NPN (рис. 1). Эти данные согласуются с полученными ранее в работах [2, 3]. Аналогичный эффект наблюдался и в случае тропонина С. В случае парвальбуминов не обнаружено влияние ионов Са<sup>2+</sup> на интенсивность флуоресценции зондов.

Структуры кальмодулина и тропонина С очень близки. Оба белка ( $M \sim 17$  кДа) содержат четыре Са<sup>2+</sup>-связывающих участка [14]. Парвальбумины ( $M \sim 11-12$  кДа) содержат два Са<sup>2+</sup>-связывающих участка, причем только один из них подобен Са<sup>2+</sup>-связывающим участкам кальмодулина и тропонина С. Этот участок имеет так называемую конформацию «ЕF-руки», и ион кальция в нем координирован с пятью атомами кислорода карбоксильных групп остатков кислых аминокислот. Другой Са<sup>2+</sup>-связывающий участок парвальбуминов имеет конформацию «СD-руки», и в образовании координационных связей в нем участвуют шесть атомов кислорода [15]. Константы связывания Са<sup>2+</sup> с кальмодулином, тропонином С и парвальбуминами достаточно близки ( $K_{св} \sim 10^8-10^6$  М<sup>-1</sup>) [14, 16, 17], однако, как видно из приведенных данных, только в случае кальмодулина и тропонина С связывание ионов Са<sup>2+</sup> приводит к формированию гидрофобных участков, обнаруживаемых с помощью флуоресцентных зондов. Этот вывод согласуется с данными о том, что только для кальмодулина, тропонина С и Са<sup>2+</sup>-связывающего белка нервной ткани (белка S-100), но не для парвальбуминов характерно Са<sup>2+</sup>-индуцированное гидрофобное взаимодействие с фенотиозинами, иммобилизованными на сефарозе [18]. В отличие от кальмодулина и тропонина С до сих пор не обнаружено ферментов, активность которых модулировалась бы комплексом Са<sup>2+</sup>-парвальбумин. Исходя из приведенных данных, это можно объяснить отсутствием таких конформационных перестроек молекул парвальбуминов при взаимодействии с ионами Са<sup>2+</sup>, которые приводили бы к формированию гидрофобных участков. Учитывая очень высокое содержание этих избирательно связывающих кальций белков в клетках скелетной мускулатуры, можно предположить, что они играют роль Са<sup>2+</sup>-буфера в саркоплазме [19].

Согласно рис. 2, ионы Са<sup>2+</sup> оказывают сходное влияние на интенсивность флуоресценции NPN в присутствии кальмодулина и на активность кальмодулинзависимого компонента кальцевого насоса мембраны эритроцитов. Это свидетельствует о том, что использованные в работе флуоресцентные зонды чувствительны именно к тем конформационным перестройкам в молекуле кальмодулина, которые приводят к Са<sup>2+</sup>-зависимой активации ферментов-исполнителей.

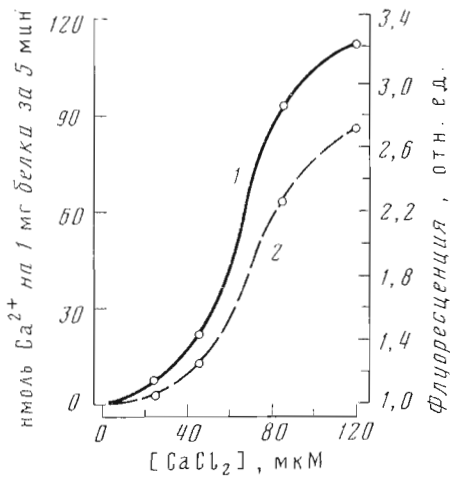


Рис. 2. Зависимость активности кальциевого насоса вывернутых везикул мембран эритроцитов (1) и интенсивности флуоресценции NPN при 420 нм (2) в присутствии кальциемодулина из мозга крупного рогатого скота от концентрации  $\text{CaCl}_2$ . Среда инкубации содержала 40 мМ имидазол- $\text{HCl}$ -буфер (рН 7,4), 100 мМ KCl, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 4 мМ  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ , 0,1 мМ EGTA, 1 мкМ кальмодулин. В случае определения активности кальциевого насоса среда инкубации содержала также 2 мкКи/мл  $^{45}\text{Ca}$  и 20 мкг/мл белка тений эритроцитов

На рис. 3 представлены спектры флуоресценции ANS и NPN, сорбированных на молекуле кальмодулина в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , а также разложение этих спектров на составляющие. Параметры неоднородного уширения представлены в табл. 1. Из приведенных данных видно, что в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ANS и NPN не взаимодействуют с белком. В обоих случаях кальмодулин не влияет ни на спектры флуоресценции зондов, ни на их параметры неоднородного уширения. Использованный в работе метод анализа спектров флуоресценции позволил выделить только один тип участков сорбции зондов, образующихся в молекуле кальмодулина при его взаимодействии с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . В случае ANS и NPN при концентрации кальмодулина соответственно 4 и 1 мкМ в этом участке располагается ~12% общего содержания зонда в системе. Именно этот пул зонда обуславливает гипохромный сдвиг максимума флуоресценции и увеличение квантового выхода флуоресценции системы, наблюдаемые при взаимодействии кальция с кальмодулином. В случае кальмодулина из мозга крупного рогатого скота ANS располагается в участке, полярность которого близка к полярности ацетона ( $\nu_c = 16\,932\text{ см}^{-1}$ ), а NPN, по-видимому, погружен в более гидрофобные зоны; полярность его окружения близка к полярности изоамилового спирта ( $\nu_c = 22\,360\text{ см}^{-1}$ ) [8].

Нам не удалось обнаружить достоверных различий в физико-химических характеристиках гидрофобных участков кальмодулинов, полученных из мозга крыс SHR и NKWR (табл. 1). Это наблюдение согласуется с данными, полученными ранее при исследовании подвижности кальмодулина, выделенного из мозга крыс SHR и NKWR, при электрофорезе в трис-глицериновом буфере, SDS-электрофорезе, спектров поглощения и собственной флуоресценции, а также взаимодействия комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин с  $\text{Ca}$ -насосом плазматических мембран, фосфодиэстеразой и тропонином I [20]. На основании этих данных можно заключить, что нарушения метаболизма кальция в клетках ряда тканей, описанных как при спонтанной гипертензии крыс, так и при гипертонической болезни человека, не связаны с изменениями универсального  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка-регулятора [21].

В настоящее время установлено, что целый ряд соединений препятствует взаимодействию комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин с ферментами-исполнителями. Среди них наиболее полно изучены нейролептики, относящиеся к производным фенотиазинового ряда (в частности, трифторперазин) [14]. Сравнительно недавно также установлено, что активность кальмодулинзависимой фосфодиэстеразы уменьшается при действии антагониста потенциалзависимых кальциевых каналов (верапамила, нимодипина, никардина) [22]. Кроме того, подобным же эффектом обладает целый ряд пептидов: адренокортикотропный гормон,  $\beta$ -эндорфин [23], глюкагон, динорфин [24], вазоактивный пептид кишечника и пептид, ингибирующий выделение гастрина [25].

Влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на положение центра распределения неоднородного уширения ( $\nu_{\text{ц}}$ ) спектров флуоресценции свободных (в скобках) и связанных с кальмодулином зондов \*

Источник кальмодулина	$\text{CaCl}_2$ , мМ	ANS		NPN	
		$N^{**}$ , %	$\nu_{\text{ц}} \cdot 10^{-3}$ , $\text{см}^{-1}$	$N^{**}$ , %	$\nu_{\text{ц}} \cdot 10^{-3}$ , $\text{см}^{-1}$
—					
(контроль)	0	0	(12,29)	0	(18,12)
Крупный рогатый скот	0	0	(12,71)	0	(18,18)
То же	1,2	12	(12,85) 17,03	13	(18,46) 22,35
Крысы SHR	1,2	4	(12,72) 17,47	14	(18,53) 22,56
» NKWR	1,2	15	(12,81) 17,50	15	(18,51) 22,55

\* Концентрации кальмодулина при использовании ANS и NPN равны соответственно 4 и 1 мкМ.

\*\*  $N$  — доля сорбированного кальмодулином зонда.

Таблица 2

Влияние трифторперазина и верапамила на положение центра распределения неоднородного уширения ( $\nu_{\text{ц}}$ ) спектров флуоресценции ANS и NPN в присутствии кальмодулина из мозга крупного рогатого скота

Добавки в среду инкубации *	ANS		NPN	
	$N^{2*}$ , %	$\nu_{\text{ц}}^{3*} \cdot 10^{-3}$ , $\text{см}^{-1}$	$N^{2*}$ , %	$\nu_{\text{ц}}^{3*} \cdot 10^{-3}$ , $\text{см}^{-1}$
—	12	(12,89) 17,03	13	(18,46) 22,35
Трифторперазин (10 мкМ)	14	(12,81) 17,60	5	(18,40) 21,53
Верапамил (75 мкМ)	4*	4*	25	(18,40) 22,50

\* Состав среды инкубации: 40 мМ имидазол-НСI-буфер (рН 7,4), 100 мМ КСI, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ EGTA, 1,2 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Концентрации кальмодулина при использовании ANS и NPN равны соответственно 4 и 1 мкМ.

2\* Доля сорбированного кальмодулином зонда.

3\* В скобках указаны значения  $\nu_{\text{ц}}$  для свободного зонда.

4\* Опыты с ANS в присутствии верапамила не проводили.

Как трифторперазин (рис. 4), так и верапамил (рис. 5) влияют на флуоресценцию зондов в присутствии кальмодулина только при добавлении в среду инкубации кальция. Из этого можно заключить, что оба соединения влияют на структуру  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированных гидрофобных участков белковой молекулы. В случае трифторперазина полумаксимальное изменение интенсивности флуоресценции зондов наблюдается при его концентрации 3–5 мкМ, что согласуется с данными, полученными при определении активности фосфодиэстеразы [26]. В случае верапамила полумаксимальный эффект наблюдается при его концентрации 20–30 мкМ, что соответствует концентрациям, применяемым для ингибирования потенциалзависимых кальциевых каналов [27]. На основании этого можно предположить, что одним из элементов структуры этих каналов являются  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, подобные кальмодулину.

Как уже отмечено выше, трифторперазин и верапамил препятствуют влиянию комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ –кальмодулин на активность фосфодиэстеразы. Однако анализ параметров неоднородного уширения спектров зондов показывает, что эти соединения оказывают различное влияние на  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемые гидрофобные участки кальмодулина (табл. 2). При действии трифторперазина наблюдается увеличение полярности гидрофобного участка и уменьшение количества сорбированного NPN. В случае же верапамила происходит некоторое уменьшение полярности этого участка и увеличение количества сорбированного зонда. Следует также отметить, что влияние трифторперазина на структуру молекулы кальмодулина имеет сложный характер. Так, полярность внутренней зоны гидрофобного участка, где сорбируется NPN, увеличивается, и количество сорбирован-

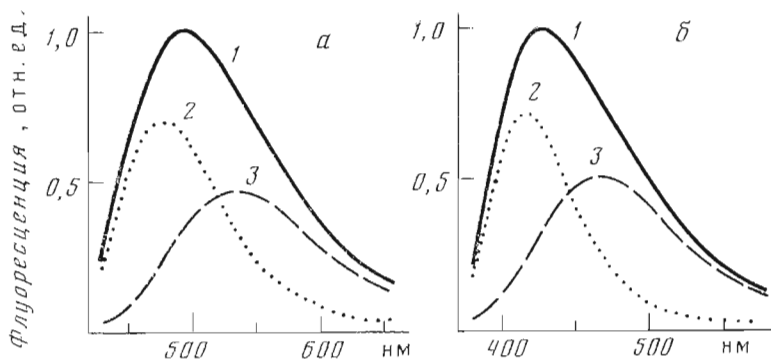


Рис. 3. Нормированные спектры флуоресценции ANS (а) и NPN (б) в присутствии кальмодулина из мозга крупного рогатого скота (1) и их составляющие (2, 3). Состав среды инкубации: 40 мМ имидазол-НСI (рН 7,4), 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EGTA, 1,2 мМ CaCl<sub>2</sub>

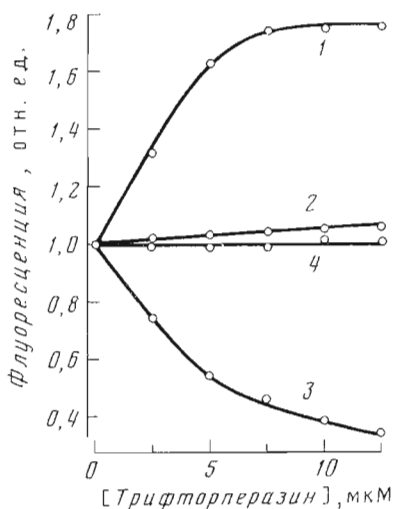


Рис. 4

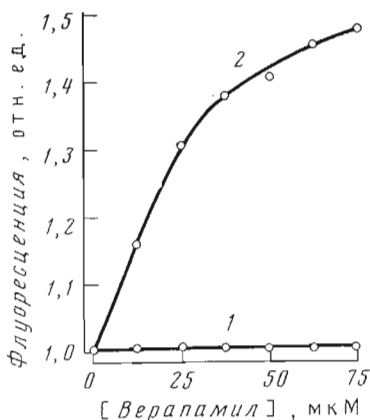


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции ANS при 470 нм (1, 2) и NPN при 420 нм (3, 4) от концентрации трифторперазина в присутствии кальмодулина из мозга крупного рогатого скота. Состав среды инкубации: 40 мМ имидазол-НСI-буфер (рН 7,4), 100 мМ КСI, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ EGTA; в случае 1 и 3 среда инкубации содержала также 1,2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Концентрация кальмодулина 4 мкМ (1, 2) или 1 мкМ (3, 4). За единицу принято значение интенсивности флуоресценции зондов в отсутствие трифторперазина

Рис. 5. Зависимость интенсивности флуоресценции NPN при 420 нм в присутствии кальмодулина из мозга крупного рогатого скота от концентрации верапамила. Состав среды инкубации (мМ): 1 — имидазол-НСI — 40 (рН 7,4), КСI — 100, MgCl<sub>2</sub> — 5, EGTA — 1; 2 — в среду добавлен 1,2 мМ CaCl<sub>2</sub>

ного в ней зонда уменьшается по мере роста концентрации трифторперазина. Напротив, поверхностная часть зоны, где сорбируются отрицательно заряженные молекулы ANS, становится менее полярной.

В последнее время было установлено, что кальмодулинзависимые ферменты клетки (кальциевый насос плазматических мембран, фосфодиэстераза, киназа легких цепей миозина) могут быть активированы целым рядом амфипатических соединений (кислыми фосфолипидами, лизофосфолипидами, жирными кислотами) [2, 28]. На основании этих данных высказано предположение, что активация этих ферментов комплексом Ca<sup>2+</sup>—кальмодулин обусловлена неспецифическими гидрофобными взаимодействиями [2]. В настоящей работе показано, что взаимодействие каль-

модулина с ферментами-исполнителями может быть ингибировано такими соединениями, которые влияют на полярность гидрофобных участков, образующихся в молекуле кальмодулина при его взаимодействии с ионами кальция. Отсюда можно сделать вывод, что для эффективного взаимодействия комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ —кальмодулин с ферментом-исполнителем полярность его гидрофобных зон должна поддерживаться на строго определенном уровне.

### Экспериментальная часть

В работе использовали кальмодулин из мозга крупного рогатого скота (Calbiochem, США). Кальмодулин из мозга крыс со спонтанной генетической гипертензией (spontaneously hypertensive Kioto-Wistar rats — SHR), которые считаются наиболее адекватной моделью при изучении гипертензивной болезни человека или первичной (эссенциальной) гипертензии, и из мозга контрольных животных (normotensive Kioto-Wistar rats — NKWR) выделяли на колонке с фенолсефарозой по методу, предложенному в работе [29] и модифицированному в соответствии с работой [4]. Согласно данным электрофореза в отсутствие и в присутствии додецилсульфата натрия, все три образца белка имеют одинаковую молекулярную массу и не различаются по величине заряда. Тропонин С из скелетной мышцы кролика получен от Н. Б. Гусева (биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова). Парвальбумины I и II из скелетной мышцы щуки *Esox lucius* любезно предоставлены Е. А. Пермяковым (Институт биофизики АН СССР). 1-Анилинафталин-8-сульфонат (Serva, ФРГ) и N-фенил-1-нафтиламин (Koch Light, Англия) использовали в концентрации  $10^{-5}$  М. Длина волны возбуждающего света для NPN и ANS составляла соответственно 331 и 380 нм. Измерения проводили при  $37^\circ\text{C}$  на спектрофлуориметре MRF-4 (Hitachi, Япония) при следующей спектральной линии щелей монохроматоров возбуждения и испускания флуоресценции: NPN — 3 и 5 нм, ANS — 10 и 5 нм. Состав среды инкубации указан в подписях к рисункам. Метод расчета неоднородного уширения спектров флуоресценции изложен в работах [8, 9]. Метод определения активности кальциевого насоса вывернутых везикул мембран эритроцитов описан в работах [30, 31].

Авторы благодарны М. Ю. Меньшикову (ВКНЦ АМН СССР) за помощь при выделении кальмодулина.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Drabikowski W., Kuznicki J., Orabarck Z. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 485, № 1, p. 124—133.
2. Tanaka T., Hidaka H. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 23, p. 11078—11080.
3. La Porte D. C., Wierman B. M., Storm D. R. Biochemistry, 1980, v. 19, № 10, p. 3814—3819.
4. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязский Г. Г., Кравцов Г. М. Биохимия, 1984, т. 49, № 1, с. 51—59.
5. Ткачук В. А., Меньшиков М. Ю., Северин С. Е. Докл. АН СССР, 1979, т. 246, № 1, с. 240—244.
6. Kincaid R. L., Vaughan M., Osborne J. C., Jr., Tkachuk V. A. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 18, p. 10638—10643.
7. Ikura M., Hiraoaki T., Hikichi K., Mikuni T., Yazawa M., Yagi K. Biochemistry, 1983, v. 22, № 8, p. 2573—2579.
8. Бойцов В. М. Биофизика, 1982, т. 27, № 5, с. 786—790.
9. Бойцов В. М., Орлов С. Н. Биофизика, 1982, т. 27, № 6, с. 1049—1052.
10. Орлов С. Н., Карагодина З. В., Бойцов В. М. Биол. мембраны, 1984, т. 1, с. 268—272.
11. Orlov S. N., Pokudin N. I., Postnov Yu. V. Pflügers Archiv, 1983, B. 397, № 1, S. 54—56.
12. Kravtsov G. M., Orlov S. N., Pokudin N. I., Postnov Yu. V. Clin. Sci., 1983, v. 65, № 1, p. 127—135.
13. Postnov Yu. V., Orlov S. N., Reznikova M. B., Riazhsy G. G., Pokyudin N. I. Clin. Sci., 1984, v. 66, № 2, p. 459—463.
14. Klee C. B., Vanaman T. C. Adv. Protein Chem., 1982, v. 35, p. 213—321.
15. Coffee C. J., Bradshaw R. A., Ksetsinger R. H. Adv. Exp. Med. and Biol., 1974, v. 48, № 1, p. 211—233.
16. Permyakov E. A., Yarmolenko V. V., Emelyanenko V. I., Burstein E. A., Closset J., Gerdoy C. Eur. J. Biochem., 1980, v. 109, № 2, p. 307—315.

17. Пермяков Е. А., Ярмоленко В. В., Клиниченко П. П., Буриштейн Е. А. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 1, с. 1660–1668.
18. Marshak D. R., Watterson D. M., Van Eldik L. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., 1981, v. 78, № 11, p. 6793–6797.
19. Haiech J., Derancourt J., Pechere J. F., Demaille J. C. Biochemistry, 1979, v. 18, № 8, p. 2752–2758.
20. Покудин Н. И., Орлов С. Н., Рязжский Г. Г., Меньшиков М. Ю., Ткачук В. А., Постнов Ю. В. Кардиология, 1983, т. 25, № 11, с. 65–71.
21. Postnov Yu. V., Orlov S. N. In: Hypertension. Physiopathology and treatment / Eds Genest J. et al. N. Y.: McGraw Book Comp., 1983, p. 95–108.
22. Epstein P. M., Fiss K., Hachisu R., Andrenyak D. N. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 105, № 3, p. 1142–1149.
23. Weiss B., Prozialeck W., Cimino M., Barnette M. S., Wallace T. L. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1980, v. 356, p. 319–328.
24. Maleneik D. A., Anderson S. R. Biochemistry, 1982, v. 21, № 14, p. 3480–3486.
25. Maleneik D. A., Anderson S. R. Biochemistry, 1983, v. 22, № 8, p. 1995–2001.
26. Neiss B., Levin R. M. Adv. Cyclic Nucl. Res., 1978, v. 9, № 2, p. 283–304.
27. Fleckenstein A. Circulat. Res., 1983, v. 52, suppl. 1, p. 3–16.
28. Al-Lobre A., Minocherhomjee A. M., Villalobo A., Roufogalis B. D. In: Erythrocyte membranes. Vol. 3. N. Y.: Alan R. Liss. Inc., 1984, p. 243–292.
29. Gopolakrishna R., Anderson W. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 104, № 2, p. 830–836.
30. Орлов С. Н., Покудин Н. И., Рязжский Г. Г. Биохимия, 1983, т. 48, № 4, с. 664–672.
31. Orlov S. N., Pokudin N. I., Reznikova M. B., Rjazhsky G. G., Postnov Yu. V. Eur. J. Biochem., 1983, v. 132, № 2, p. 315–319.

Поступила в редакцию  
6.VII.1984  
После доработки  
20.VIII.1984

## USE OF THE PARAMETERS OF INHOMOGENEOUS BROADENING OF FLUORESCENCE SPECTRA OF PROBES FOR STUDYING THE CONFORMATIONAL CHANGES IN Ca<sup>2+</sup>-BINDING PROTEINS

ORLOV S. N., BOITSOV V. M., POSTNOV YU. V.

*Central Research Laboratory, Ministry of Public Health  
of the USSR, Moscow*

The parameters of inhomogeneous broadening in the fluorescence spectra of 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate and N-phenyl-1-naphthylamine, recorded in the systems with respective proteins, have been analyzed in order to shed light on the mechanism of interaction between Ca<sup>2+</sup> ions and calmodulin, troponin C and parvalbumin. It was shown that only calmodulin and troponin C but not parvalbumin bind calcium ions with concomitant formation of hydrophobic sites that are responsible for interaction with the «executor enzymes». The relative pools of the probes adsorbed in the hydrophobic sites and polarity of the latter were assessed. These parameters in calmodulin obtained from the brain of spontaneously hypertensive rats or normotensive rats do not differ. It was established that trifluoroperazine and verapamil inhibit the calmodulin-dependent enzymes by essentially different mechanisms. Trifluoroperazine diminishes the relative pool of the adsorbed probe and enhances the polarity of the calmodulin binding sites, whereas verapamil affects these parameters in the opposite direction.