



УДК 577.122.016 : 577.25

ПОЛУЧЕНИЕ МИРИСТОИЛИРОВАННОЙ И НЕМИРИСТОИЛИРОВАННОЙ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕКОВЕРИНА В КЛЕТКАХ *E. coli* И СРАВНЕНИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 1996 г. А. А. Заргаров[#], И. И. Сенин*, А. М. Алексеев, С. В. Шульга-Морской, П. П. Филиппов*, В. М. Липкин

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино Московской обл.;

* Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Москва

Поступила в редакцию 25.12.95 г.

Сконструирована рекомбинантная плазмида для экспрессии гена рековерина быка под контролем *lac*-промотора. Осуществлена коэкспрессия генов рековерина и N-миристоилтрансферазы с целью получения рекомбинантного миристоилированного рековерина. Полученные конструкции обеспечивают высокий уровень биосинтеза рекомбинантных рековеринов в клетках *E. coli*. С использованием реконструированной системы, содержащей отмытые в мочеvine мембраны наружных сегментов палочек, очищенную родопсинкиназу и одну из форм рековерина, показано, что все три формы последнего (природная, рекомбинантная немиристоилированная и рекомбинантная миристоилированная) способны кальцийзависимым образом регулировать активность родопсинкиназы с полумаксимальным эффектом при концентрации свободного кальция 2 мкМ. Существенно, что N-концевое миристоилирование рековерина значительно увеличивает его функциональную активность.

Ключевые слова: рековерин, фоторецепция, фосфорилирование, родопсин, родопсинкиназа, кальцийсвязывающие белки, экспрессия в *E. coli*.

Ферментные системы, участвующие в передаче внутриклеточных сигналов, способны регулировать активность своих рецепторов, ответственных за восприятие внеклеточного сигнала. В большинстве случаев такого рода регуляция направлена на понижение чувствительности рецептора, т.е. приводит к его десенситизации [1]. В настоящее время регуляция чувствительности сигнальных путей наиболее изучена на примере рецепторов, сопряженных с G-белками. В первую очередь это справедливо в отношении родопсина. Поглощение кванта света фоторецепторной клеткой приводит к активации каскада родопсин – трансдукцин – сGMP-фосфодиэстераза и, в свою очередь, к закрытию сGMP-чувствительных ионных каналов с последующим понижением уровня свободного кальция в цитоплазме с 500 до 50 нМ [2, 3]. Фосфорилирование светоактивированной формы родопсина под действием родопсинкиназы, приводящее к десенситизации рецептора, является кальцийчувствительным процессом и опосреду-

ется кальцийсвязывающим белком, рековерином (P26) [4–6].

P26, или рековерин, – новый представитель большого семейства кальцийсвязывающих белков (так называемого “EF-hand”-семейства) – был впервые выделен из наружных сегментов палочек (НСП) быка [7]. Рентгеноструктурный анализ рековерина указывает на существование в его молекуле двух кальцийсвязывающих участков [8]. N-Концевой остаток глицина этого кальцийсвязывающего белка ковалентно модифицирован остатком миристиновой кислоты (C14:0). Однако присутствуют и минорные формы рековерина, которые ацилированы одним из жирнокислотных остатков, родственных миристиновой кислоте: C14:1, C14:2 или C12:0 [9]. Показано, что присутствие ковалентно связанного с P26 жирнокислотного остатка необходимо для его взаимодействия с клеточными мембранами [10, 11].

Расшифровка первичной структуры рековерина [12, 13] показала, что он имеет 59%-ную гомологию с визинином – кальцийсвязывающим белком, обнаруженным в колбочках сетчатки цыплят [14]. В настоящее время охарактеризована большая группа близкородственных рековерину кальцийсвязывающих белков, которые также

Сокращения: НСП – наружные сегменты палочки; P26 – природный рековерин; mP26 и nP26 – миристоилированный и немиристоилированный рекомбинантные рековерины; IPTG – изопропил-β-D-тиогаалактопиранозид; сGMP – гуанозин-3',5'-циклофосфат.

[#] Автор для переписки (e-mail: biochem@sovamsu.sovusa.com).

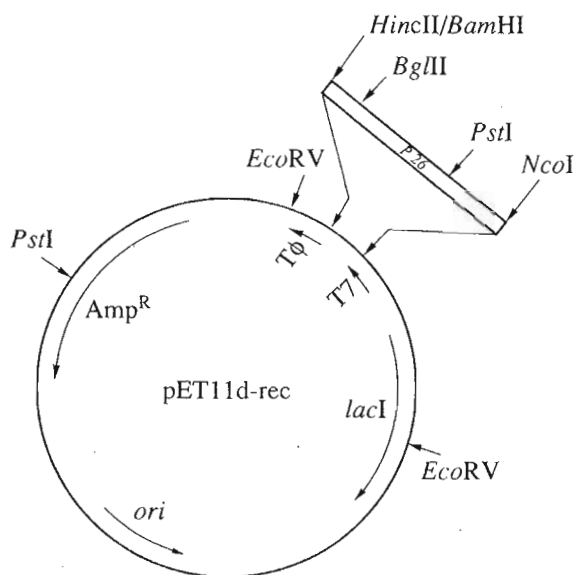


Рис. 1. Экспрессирующая плаزمида pET11d-rec, содержащая ген рековерина под контролем раннего промотора фага T7. Tφ – терминатор, lacI – репрессор лактозного оперона.

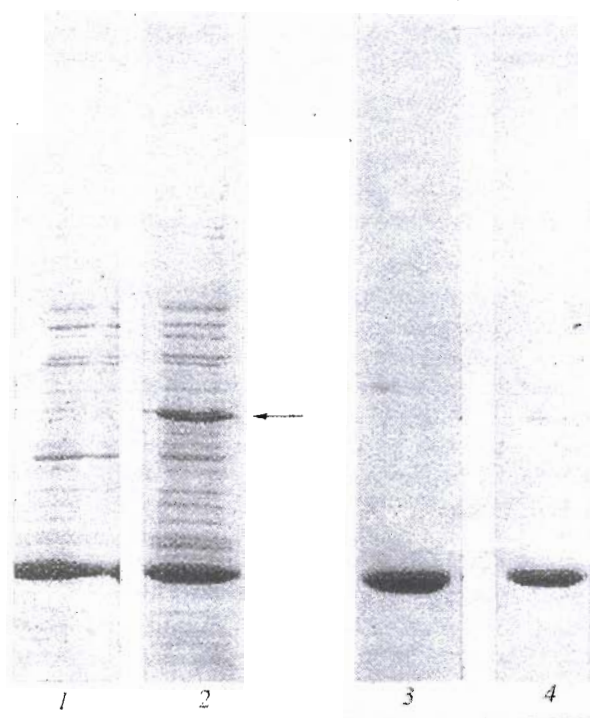


Рис. 2. Результаты электрофореза в 12.5% ПААГ с 0.1% SDS: 1 – лизат клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET11d-rec, содержащей ген рековерина; 2 – лизат клеток *E. coli* BL21(DE3), котрансформированных плазмидами pET11d-rec и pBB131, содержащей ген N-миристоилтрансферазы; 3 и 4 – препараты изолированных белков, соответственно rP26 и mP26. Стрелкой указана дополнительная белковая полоса, соответствующая N-миристоилтрансферазе.

ацилированы по N-концевому остатку глицина: S-модулин [6], активатор гуанилатциклазы-1 [15] и -2 [16] и др.

Рековерин, а также его гомолог в фоторецепторных клетках лягушки, S-модулин, выступают в роли кальцийчувствительных регуляторов активности родопсинкиназы, принимающей участие в десенситизации светоактивированного родопсина [4–6]. Из множества белков, присутствующих в фоторецепторной клетке, только родопсинкиназа взаимодействует с высокой аффинностью с рековерином в кальцийсвязанной форме [17, 18].

В настоящей работе мы разработали систему экспрессии для получения в препаративных количествах рекомбинантных миристоилированной и немиристоилированной форм рековерина и сравнили их функциональную активность в реконструированной системе, состоящей из отмывших в мочеvine мембран НСП, родопсинкиназы и одной из форм рековерина.

Получение рекомбинантных рековеринов

Экспрессию гена рековерина осуществляли в векторе pET11d (Biolabs, США) под контролем раннего промотора фага T7. NcoI, HincII-фрагмент (600 п. о.) плазмиды pL2p26 [13], содержащий полноразмерную кДНК рековерина быка, лигировали с вектором pET11d, расщепленным последовательно рестриктазами BamHI и NcoI (перед расщеплением NcoI вектор обрабатывали фрагментом Кленова для получения тупых концов). Полученная плазмида pET11d-rec (рис. 1) после трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) [19], содержащих в составе хромосомы РНК-полимеразу фага T7 под контролем lac-промотора, обеспечивает высокий уровень биосинтеза рековерина (рис. 2, 1).

В отличие от природного P26, основная доля которого в зрительной клетке миристоилирована, полученный нами рекомбинантный рековерин не подвергается посттрансляционной модификации, так как клетки *E. coli* не содержат собственной N-миристоилтрансферазы. С целью получения миристоилированного рековерина (mP26) мы осуществили коэкспрессию в *E. coli* генов рековерина и N-миристоилтрансферазы из *Saccharomyces cerevisiae* [20], ковалентно присоединяющей миристиновую кислоту с образованием амидной связи к N-концевому остатку глицина у белков с сигнальной последовательностью MGKXXS/T [21]. Коэкспрессия генов рековерина и N-миристоилтрансферазы была достигнута при совместной трансформации *E. coli* BL21(DE3) ампициллинустойчивой плазмидой pET11d-rec, содержащей ген рековерина быка, и канамицинустойчивой плазмидой pBB131, содержащей ген N-миристоилтрансферазы дрожжей, под контролем tac-промотора

[22]. Синтез рековерина и N-миристоилтрансферазы начинался одновременно, сразу после добавления IPTG в качестве индуктора (рис. 2, 2). Предполагалось, что при добавлении в культуральную среду экзогенной миристиновой кислоты в результате такой коэкспрессии будет происходить миристоилирование рековерина *in vivo*.

Выращивание культуры, разрушение клеток и выделение рекомбинантных белков проводили как указано в "Экспериментальной части". В результате удалось получить рекомбинантные немиристоилированный и предположительно миристоилированный рековерины более чем 99%-ной чистоты (рис. 2, 3 и 4). Выход обоих целевых белков составил более 5 мг/л культуральной среды.

Для доказательства идентичности рекомбинантного и природного рековеринов были применены два метода. Во-первых, методом автоматической деградации по Эдману была определена аминокислотная последовательность первых шести аминокислотных остатков нР26, которая полностью совпала с последовательностью Р26 [12, 13]. При этом N-концевым остатком зрелого белка нР26 является остаток глицина, что указывает на происходящее в процессе экспрессии отщепление метиониламинопептидазой N-концевого формилметионина, который является стартовой аминокислотой при синтезе белков в *E. coli* [21]. Во-вторых, очищенный препарат нР26 анализировали методом иммуноблоттинга с поликлональными кроличьими антителами, полученными как против Р26, так и против нР26. В качестве контроля использовали фракцию растворимых белков НСП, содержащую природный Р26. На рис. 3 видно, что полученный нами рекомбинантный нР26, так же как и природный Р26, связывается с обоими видами антител.

Для подтверждения включения миристоильного остатка в мР26 в процессе биосинтеза в культуральную среду была добавлена меченная тритием миристиновая кислота. Для контроля те же количества меченой миристиновой кислоты были добавлены и к клеткам, синтезирующим нР26. Клеточный лизат разделяли электрофорезом в ПААГ с SDS с последующей флюорографией. На рис. 4 видно, что включение меченой миристиновой кислоты *in vivo* происходит только в мР26. Это свидетельствует о том, что в случае коэкспрессии генов рековерина и N-миристоилтрансферазы действительно происходит N-концевое миристоилирование рекомбинантного рековерина *in vivo*.

Сравнение функциональной активности мР26 и нР26

Для исследования функциональной активности рековерина была использована реконструированная система, состоящая из отмытых в мочеви-

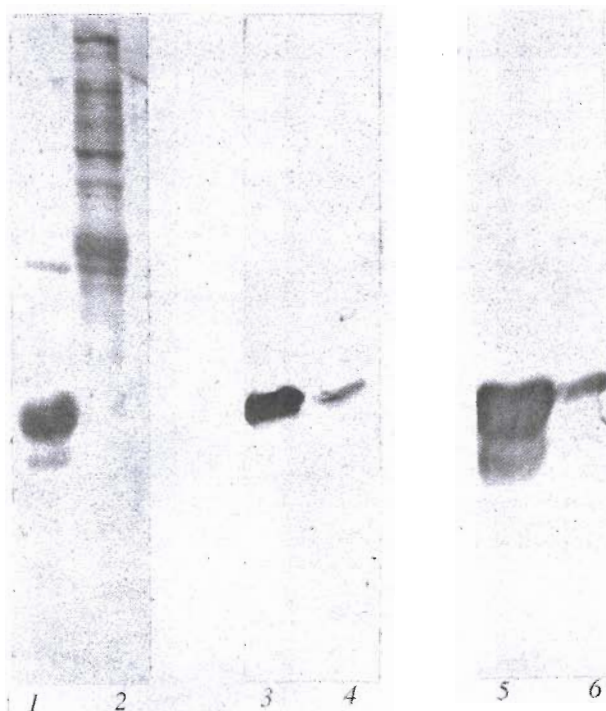


Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга рекомбинантного и природного рековеринов: 1, 3, 5 – препараты нР26; 2, 4, 6 – фракция растворимых белков НСП, содержащая Р26. 1 и 2 – окрашивание амидо-черным; 3 и 4 – иммуноспецифическое окрашивание после инкубации с поликлональными кроличьими антителами против Р26; 5 и 6 – иммуноспецифическое окрашивание после инкубации с поликлональными кроличьими антителами против нР26.

не мембран НСП, очищенной родопсинкиназы и одной из форм рековерина. В отсутствие рековерина строго светозависимое фосфорилирование родопсина родопсинкиназой было не чувствительным к изменению концентрации кальция. Как видно из рис. 5а, в присутствии рековерина фосфорилирование родопсина под действием родопсинкиназы становится кальцийчувствительным. Вне зависимости от формы рековерина (Р26, нР26 или мР26), которая использовалась в эксперименте, полумаксимальный эффект наблюдали при концентрации свободного кальция, равной 2 мкМ. Рековерин влияет на активность родопсинкиназы при концентрации свободного кальция более 1 мкМ, при этом каких-либо дополнительных белков для проявления ингибирующего действия рековерина на активность родопсинкиназы не требуется.

Ранее сообщалось, что рековерин и S-модулин регулируют активность родопсинкиназы в наномолярном диапазоне концентрации свободного кальция [4–6, 23, 24]. Причина расхождения этих данных и наших результатов может заключаться в том, что в настоящей работе концентрация свободного кальция в используемых кальциевых

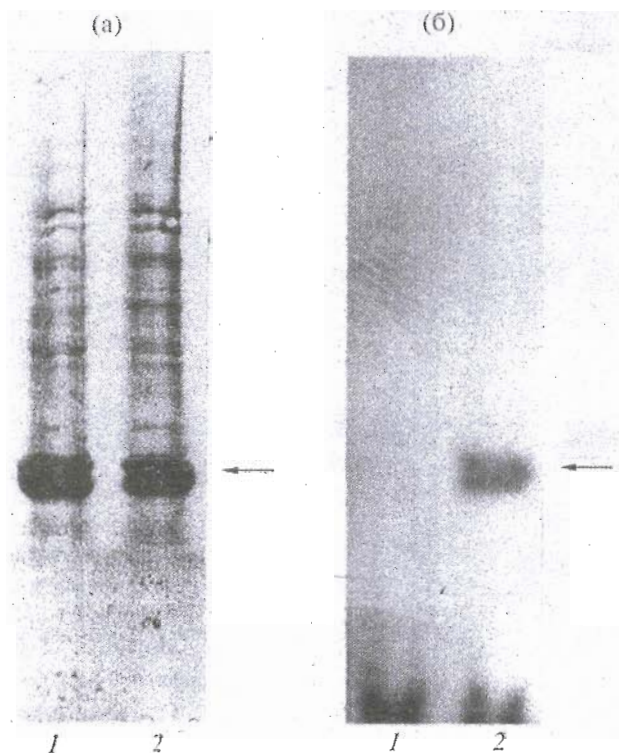
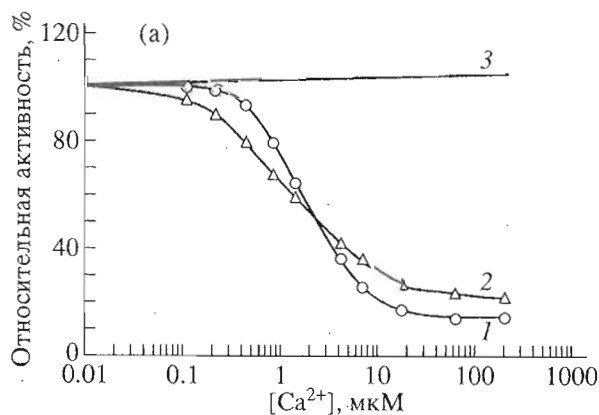


Рис. 4. Электрофорез в 12.5% ПААГ с 0.1% SDS лизата клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой рЕТ11d-гес, содержащей ген рековерина (1) и лизата клеток *E. coli* BL21(DE3), котрансформированных плазмидами рЕТ11d-гес и рВВ131, содержащей ген N-миристоилтрансферазы (2). [9, 10-³H]миристиновая кислота была добавлена в обоих случаях в культуральную среду. (а) – окрашивание кумасси G-250, (б) – автофлюорограмма. Стрелкой указано положение, соответствующее рековерину.

буферах измерялась непосредственно с помощью либо кальцийчувствительного электрода, либо флуоресцентного красителя Fura-2. В указанных



же работах концентрация свободного кальция рассчитывалась без прямого измерения.

В зависимости от концентрации кальция N-концевое ацилирование оказывает влияние на кооперативность эффекта по отношению к родопсинкиназе. Действительно, в случае Р26 и мР26 коэффициент Хилла в наших экспериментах составил 1.7, в случае же нР26 – 0.9. Эти результаты согласуются с данными, указывающими на влияние N-концевого ацилирования на кооперативность связывания ионов кальция рековерином [18].

При насыщающих концентрациях свободного кальция мР26 является более сильным ингибитором активности родопсинкиназы, чем нР26: $IC_{50} = 0.9$ мкМ в случае мР26 и 6.5 в случае нР26 (рис. 5б). В то же время мР26 ведет себя почти так же, как природный рековерин. Таким образом, минорное ацилирование (С14:1; С14:2; С12:0-ацилирование) Р26 не оказывает существенного влияния на его функциональную активность.

Таким образом, разработанная система экспрессии позволила получить рекомбинантные миристоилированный и немиристоилированный рековерины в *E. coli* и установить, что N-концевое ацилирование существенно усиливает ингибирующую активность рековерина в отношении родопсинкиназы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: акриламид, трис, аденозинтрифосфат, бисакриламид (Merck, Германия); EGTA, IPTG (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); SDS (Serva, Германия); эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Nco*I, *Hind*III, ДНК-лигазу фага Т4, полинуклеотидкиназу фага Т4, щелочную фосфатазу *E. coli* (Boehringer-Mannheim,

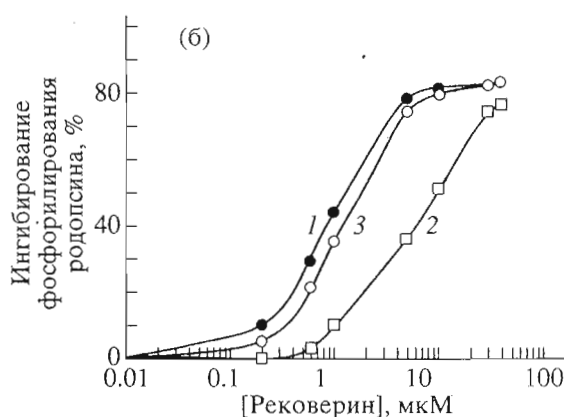


Рис. 5. Зависимость активности родопсинкиназы в реконструированной системе: (а) – от концентрации свободного кальция при насыщающей концентрации рековеринов мР26 (1), нР26 (2) и в их отсутствие (3); (б) – от концентрации рековеринов мР26 (1), нР26 (2) и Р26 (3) при насыщающей концентрации свободного кальция $[Ca^{2+}]$ 200 мкМ.

Германия), остальные реактивы (соли, кислоты и щелочи) – отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а.

Выращивание штаммов-продуцентов и выделение рекомбинантных рековеринов. Штаммы-продуценты нР26 и мР26 выращивали в сходных, описанных ниже условиях. Культуральная среда LB содержала ампициллин (100 мг/л), а также дополнительно в случае мР26 – канамицин (10 мг/л). В случае мР26 сразу после добавления IPTG в культуральную среду также добавляли миристиновую кислоту до конечной концентрации 5 мкг/мл. Отобранную отдельную колонию выращивали в течение ночи при 37°C, ночную культуру разводили в соотношении 1 : 100 в культуральной среде LB и выращивали при 37°C до поглощения $A_{600} = 0.6$ ОЕ, после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Через 3 ч клетки собирали центрифугированием и лизировали ультразвуком в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 100 мМ NaCl и 1 мМ EDTA, при 4°C в присутствии лизоцима (10 мкг/мл) для разрушения клеточных стенок. Клеточный дебрис отделяли от растворимых белков центрифугированием при 10000 *g*. Фракцию растворимых белков подвергали дробному высаливанию сульфатом аммония. Высаливание как мР26, так и нР26 наблюдалось в диапазоне 70–90%-ного насыщения сульфатом аммония. Осадок белка растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 100 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, и наносили на колонку с фенил-сефарозой (Pharmacia, Швеция). Элюцию рековеринов осуществляли буфером, содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 100 мМ NaCl, 5 мМ EGTA. В некоторых случаях для дополнительной очистки и концентрирования препаратов рековерина применяли анионообменную хроматографию на колонке MonoQ HR5/5 (Pharmacia, Швеция) в 10 мМ трис-НСl (рН 8.0) в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 300 мМ.

Получение НСП и выделение зрительных белков. Препараты НСП готовили из замороженных сетчаток быка при слабом красном освещении по методике, описанной в работе [25], замораживали в жидком азоте и хранили при –70°C. Мембраны НСП многократно промывали в растворе 6 М мочевины центрифугированием при 40000 *g* до полного исчезновения эндогенной родопсинкиназной активности. Концентрацию родопсина определяли по разнице оптического поглощения образцов при 500 нм до и после освещения в присутствии 1% Triton X-100 [26]. Родопсинкиназу выделяли как описано в работе [27]. Природный рековерин выделяли из фракции растворимых белков НСП по описанной выше процедуре выделения рекомбинантных рековеринов.

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [28] в 12.5% ПААГ с 0.1% SDS.

Определение концентрации свободного кальция в буферных системах проводили с использованием флюоресцентного индикатора Fura-2 и кальцийчувствительного электрода [29]; Ca²⁺/EGTA-буферы были приготовлены как описано в работе [30].

Активность родопсинкиназы определяли в реакционной смеси общим объемом 100 мкл, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 0.5 мкг фермента, отмытые в мочевины мембраны НСП (80 мкг родопсина); концентрации рековерина и свободного кальция варьировали в зависимости от эксперимента (указаны в подписях к рис. 5а, б). Меченый АТФ (400 мкмоль [γ -³²P]АТФ, 0.3 мКи/нмоль) добавляли к реакционной смеси через 30 с после освещения (0.6% засвеченного родопсина). Реакцию останавливали через 30 мин добавлением 20 мкл инкубационного буфера для электрофореза по Лэммли: 0.3 М трис-НСl (рН 6.8), 10% SDS, 15% β -меркаптоэтанол, 50% глицерин. После электрофореза в ПААГ зону, соответствующую родопсину, вырезали. Включение радиоактивного фосфора в родопсин определяли по Черенкову с помощью счетчика LS 5801 (Beckman Inst., США).

Авторы признательны Б.Е. Шмуклеру, осуществившему выделение полноразмерного гена рековерина; С.А. Зозуле за любезное предоставление плазмиды рВВ131; В.П. Зинченко за помощь в определении концентраций свободного кальция. Результаты, изложенные в данной статье, получены в рамках исследований по проектам, поддержанным Международным научным фондом (гранты MU-5300 и MJ-9300), Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 94-04-11673 и 93-04-7310), ГНТП “Инженерная энзимология” Министерства науки Российской Федерации (грант 1-535/о).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stryer L. // Annu. Rev. Neurosci. 1986. V. 28. P. 87–119.
2. Herley J.B. // Curr. Opin. Neurobiol. 1994. V. 4. P. 481–487.
3. Gray-Keller M.P., Detwiler P.W. // Neuron. 1994. V. 13. P. 849–861.
4. Kawamura S. // Nature. 1993. V. 362. P. 855–857.
5. Gorodovikova E.N., Gimelbrant A.A., Senin I.I., Philipov P.P. // FEBS Lett. 1994. V. 349. P. 187–190.
6. Kawamura S., Hisatomi O., Kayada S., Tokunaga F., Kuo C.-H. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 14579–14582.
7. Дижур А.М., Некрасов Е.Р., Филиппов П.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 225–228.
8. Flaherty K.M., Zozulya S., Stryer L., McKay D.B. // Cell. 1993. V. 75. P. 709–716.

9. Dizhoor A.M., Ericsson L.H., Johnson R.S., Kumar S., Olshevskaya E.V., Zozulya S., Neubert T.A., Stryer L., Hurley J.B., Walsh K.A. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 267. P. 16033–16036.
10. Zozulya S., Stryer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 11569–11573.
11. Dizhoor A.M., Chen C.-K., Olshevskaya E.V., Sinelnikova V.V., Philippov P.P., Hurley J.B. // *Science.* 1993. V. 259. P. 829–832.
12. Dizhoor A.M., Ray S., Kumar S., Niemi G., Spencer M., Brolley D., Walsh K.A., Philippov P.P., Hurley J.B., Stryer L. // *Science.* 1991. V. 251. P. 915–918.
13. Kutuzov M.A., Shmukler B.E., Suslov O.N., Dergachev A.E., Zargarov A.A., Abdulaev N.G. // *FEBS Lett.* 1991. V. 293. P. 21–24.
14. Yamagata K., Goto K., Kuo C.H., Kondo H., Miki N. // *Neuron.* 1990. V. 4. P. 469–476.
15. Gorczyła W.A., Gray-Keller M.P., Detwiler P.W., Palczewski K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 4014–4018.
16. Dizhoor A.M., Lowe D.G., Olshevskaya E.V., Laura R.P., Hurley J.B. // *Neuron.* 1994. V. 12. P. 1345–1352.
17. Gorodovikova E.N., Philippov P.P. // *FEBS Lett.* 1993. V. 335. P. 277–279.
18. Chen C.-K., Inglese J., Lefkowitz R.J., Hurley J.B. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 18060–18066.
19. Dubendorff J.W., Studier F.W. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 219. P. 45–59.
20. Gordon J.I., Duronio R.J., Rudnick D.A., Adams S.P., Goker G.W. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8647–8650.
21. Hirel P.H., Schmitter M.J., Dessen P., Fayat G., Blanquet S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 8247–8251.
22. Towler D.A., Gordon J.I., Adams S.P., Glaser L. // *Annu. Rev. Biochem.* 1988. V. 7. P. 69–99.
23. Gorodovikova E.N., Senin I.I., Philippov P.P. // *FEBS Lett.* 1994. V. 353. P. 171–172.
24. Kawamura S., Cox J., Nef P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 121–127.
25. Schnetkamp P.P.M., Klompmaker A.A., Daemen F.J.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. V. 552. P. 379–389.
26. Aton B.R., Litman B.J., Jackson M.L. // *Biochemistry.* 1984. V. 23. P. 1737–1741.
27. Palczewski K., McDowell J., Hargrave P.A. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 14067–14073.
28. Laemli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
29. Tsien R., Pozzan T. // *Methods Enzymol.* 1989. V. 12. P. 230–262.
30. Sitaramayya A., Margulis A. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 10652–10656.

Preparation of Myristoylated and Nonmyristoylated Recombinant Recoverins in *E. coli* and Comparison of Their Functional Activities

A. A. Zargarov*, I. I. Senin**, A. M. Alekseev*, S. V. Shul'ga-Morskoi*,
P. P. Philippov**, and V. M. Lipkin*

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

** *Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

Abstract—A recombinant plasmid was constructed for expressing a gene for bovine recoverin under the control of the *lac* promoter. Coexpression of the recoverin and *N*-myristoyl transferase genes was performed to prepare recombinant myristoylated recoverin. The obtained systems provide high levels of biosynthesis of the recombinant recoverins in the *E. coli* cells. Using a reconstructed system, containing urea-washed rod outer segment membranes, purified rhodopsin kinase (RK), and a recoverin, it was shown that the three recoverin forms (natural, recombinant nonmyristoylated, and recombinant myristoylated ones) perform the calcium-dependent regulation of the activity of RK with half a maximum effect at a free calcium concentration of 2 μ M. Interestingly, the *N*-terminal myristoylation of recoverin increased substantially its functional activity.

Key words: recoverin, photoreception, phosphorylation, rhodopsin, rhodopsin kinase, calcium-binding proteins, expression in *E. coli*.