



УДК 577.354.2

## ТОЧЕЧНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ЗАМЕНЫ В $\text{Ca}^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРАХ РЕКОВЕРИНА. I. МЕХАНИЗМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ЗАПОЛНЕНИЯ $\text{Ca}^{2+}$ -СВЯЗЫВАЮЩИХ ЦЕНТРОВ

© 1999 г. С. Е. Пермяков, И. И. Сенин\*, В. Н. Уверский, А. М. Черская,  
С. В. Шульга-Морской\*\*, Д. В. Зинченко\*\*, А. М. Алексеев\*\*, А. А. Заргаров\*\*,  
В. М. Липкин\*\*, П. П. Филиппов\*, Е. А. Пермяков#

Институт биологического приборостроения РАН, 142292, Пуцино Московской обл.;

\* НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва;

\*\* Филиал Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142292,  
Пуцино Московской обл.

Поступила в редакцию 11.03.99 г. Принята к печати 31.05.99 г.

В молекуле фоторецепторного  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка рековерина присутствуют четыре потенциальных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра типа "EF-hand", из которых только два (2-й и 3-й) действительно способны связывать ионы кальция. Исследовано взаимодействие  $\text{Ca}^{2+}$  с рековерином и его мутантными формами, содержащими точечные аминокислотные замены в "работающих"  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центрах, путем измерения собственной флуоресценции белков. Показано, что замещение остатка Glu, хелирующего  $\text{Ca}^{2+}$ , на Gln в одном (2-м или 3-м) или одновременно в двух (2-м и 3-м)  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центрах меняет сродство белка к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  в разной степени. Замена Glu121Gln в 3-м центре, как и одновременные замены во 2-м (Glu85Gln) и 3-м (Glu121Gln) центрах, приводит к полной утрате способности рековерина прочно связывать  $\text{Ca}^{2+}$ , а замена Glu85Gln во 2-м центре лишь умеренно влияет на его сродство к катиону. Отсюда мы предположили, что связывание  $\text{Ca}^{2+}$  рековерином происходит последовательно: заполнение 2-го центра катионом делается возможным только после заполнения 3-го центра. Константы связывания для 3-го и 2-го  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров рековерина, определенные из данных спектрофлуориметрического титрования, составляют соответственно  $3.7 \times 10^6$  и  $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

*Ключевые слова:* фоторецепция; рековерин; кальцийсвязывающие белки; сайт-направленный мутагенез; флуоресценция.

### ВВЕДЕНИЕ

Фоторецепторный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий белок рековерин сетчатки глаз крупного рогатого скота [1, 2] содержит четыре потенциальных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра типа "EF-hand", из которых только 2-й и 3-й способны связывать ионы кальция, тогда как 1-й и 4-й такой способностью не обладают, поскольку они содержат замены, нарушающие их каноническую первичную структуру [2–4]. Недавно мы сообщили [5] о получении и исследовании некоторых функциональных характеристик следующих мутантных форм рековерина: 1) "–EF2" с заменой Glu85Gln во 2-м  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре; 2) "–EF3" с заменой Glu121Gln в 3-м  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре; 3) "–EF2,3" с заменами Glu85Gln и Glu121Gln соответственно во 2-м и 3-м  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центрах; 4) "+EF4" с пятью одновременными заменами Gly160Asp,

Lys161Glu, Lys162Asn, Asp165Gly и Lys166Gln в 4-м потенциальном  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре. В отличие от сетчаточного рековерина, в котором, как уже было сказано, присутствуют два "работающих"  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центра, мутанты –EF2 и –EF3 содержат лишь по одному функционирующему центру: работают в них соответственно 3-й и 2-й центры, а 2-й и 3-й нами "испорчены"; в –EF2,3 неактивны оба центра, тогда как +EF4, благодаря проведенной нами коррекции 4-го потенциального  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего фрагмента, обладает тремя активными  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающими центрами.

В представленной серии из трех работ поставлена задача изучить взаимодействие ионов кальция с перечисленными мутантными формами и рекомбинантным рековерином дикого типа методами флуоресценции и кругового дихроизма. Цель первой работы серии – изучение механизма взаимодействия рековерина дикого типа и мутан-

# Автор для переписки (тел.: (095) 924-57-49; факс: (0967) 79-05-22; e-mail: permyakov@ibp.serpukhov.su).

тов –EF2, –EF3 и –EF2,3 с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и измерение констант связывания  $\text{Ca}^{2+}$  этими белками.

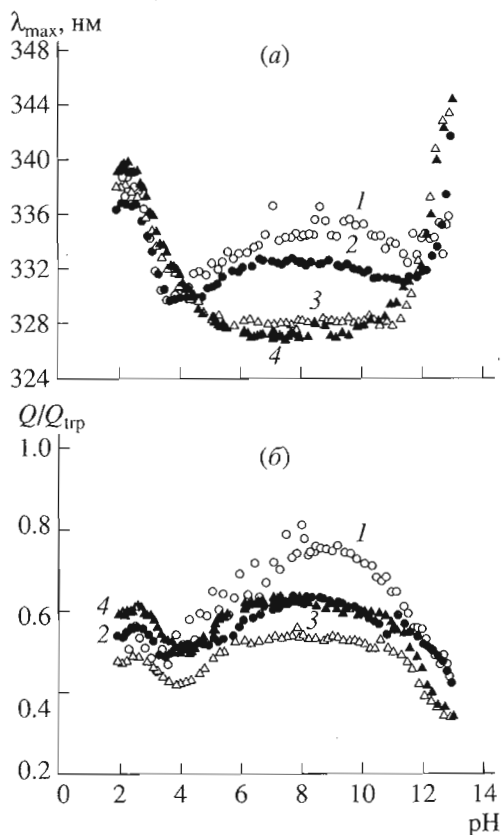
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**pH-Зависимость параметров флуоресценции остатков триптофана рековерина и его мутантных форм.** Из данных, приведенных на рис. 1, хорошо видно, что параметры флуоресценции для белка дикого типа остаются постоянными в области pH 7.5–9.0. Понижение pH от 7.5 до 3.5 вызывает сдвиг спектра флуоресценции остатков триптофана в коротковолновую сторону на 5 нм и уменьшение относительного выхода флуоресценции. Эти спектральные изменения происходят в два этапа с кажущимися  $pK$  около 6.5 и 4.5, что, по-видимому, определяется протонированием остатков His и Glu (и/или Asp), соответственно. Коротковолновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции свидетельствует обычно об уменьшении доступности некоторых остатков триптофана растворителю. Дальнейшее закисление белкового раствора от pH 3.5 до 2.0 вызывает сдвиг спектра флуоресценции на 9 нм в длинноволновую область и небольшое увеличение относительного выхода флуоресценции. Эти изменения, по-видимому, вызваны разворачиванием молекулы белка вследствие протонирования карбоксильных групп остатков Glu и Asp. Повышение pH от 9.0 до 13.0 приводит к уменьшению квантового выхода флуоресценции и небольшому коротковолновому, а затем длинноволновому сдвигу спектра флуоресценции, причем последний, по-видимому, также отражает разворачивание белка.

Мутация во 2-м  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающем центре (мутант –EF2) приводит к уменьшению амплитуды спектральных изменений, не меняя их характер, в то время как мутации в 3-м (–EF3) или во 2-м и 3-м центрах (–EF2,3) сопровождается исчезновением практически всех спектральных изменений в диапазоне pH 5.5–11.0.

Поскольку ни для одной из исследованных форм рековерина не было обнаружено каких-либо спектральных изменений в диапазоне pH 7.5–8.5, все дальнейшие измерения проводили при pH 8.0.

**Влияние ионов кальция на спектр собственной флуоресценции рековерина и его мутантов.** Как видно из результатов титрования апо-рековерина дикого типа кальцием (рис. 2), увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает длинноволновый сдвиг спектра триптофановой флуоресценции на 7 нм (этот феномен будет детально рассмотрен в следующей работе данной серии), небольшое увеличение интенсивности флуоресценции и некоторое увеличение относительного квантового выхода флуоресценции. Кривые выходят на плато при молярном отношении  $\text{Ca}^{2+}$ /белок около 2, что свидетельствует о том, что каждая молекула белка связывает по крайней мере два иона кальция. Титрование

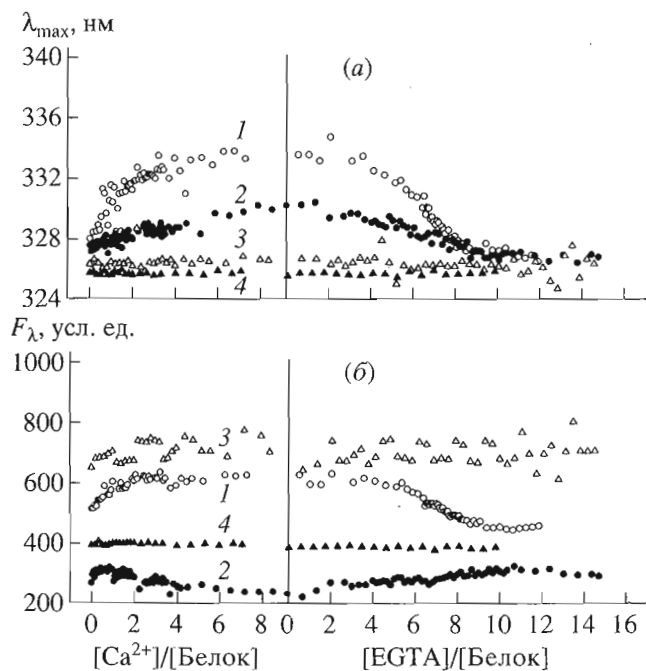


**Рис. 1.** pH-Зависимость параметров триптофановой флуоресценции для рековерина дикого типа (1) и мутантов –EF2 (2), –EF3 (3) и –EF2,3 (4). (а) – положение максимума спектра флуоресценции; (б) – относительный квантовый выход флуоресценции. Измерения проводили в 10 мМ HEPES-КОН-буфере, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , при 13°C; длина волны возбуждения 280.4 нм; концентрация белка 0.05 мг/мл.

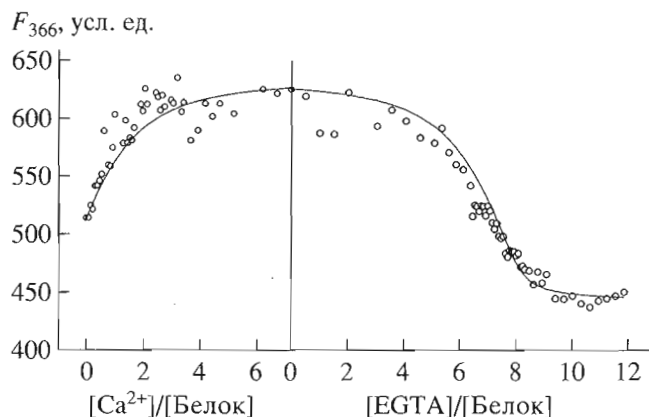
$\text{Ca}^{2+}$ -насыщенного белка хелатором ионов кальция EGTA обращает эти спектральные эффекты.

Интересно, что введение аминокислотных замен в работающие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие центры рековерина по-разному сказывается на его способности взаимодействовать с ионами металла. Из рис. 2 следует, что у мутанта –EF2 лишь несколько уменьшены амплитуды спектральных эффектов по сравнению с белком дикого типа. В этом случае  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемый сдвиг спектра собственной флуоресценции –EF2 в длинноволновую сторону составляет порядка 3.5 нм. Для мутантов же –EF3 и –EF2,3 характерно полное исчезновение  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемых спектральных эффектов (по крайней мере до соотношения концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ /белок около 8). Наиболее вероятным объяснением этого факта является отсутствие сильного связывания  $\text{Ca}^{2+}$  мутантами –EF3 и –EF2,3, характерного для рековерина дикого типа и мутанта –EF2.

**Механизм последовательного заполнения  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров рековерина.** Поскольку замена Glu85Gln во 2-м  $\text{Ca}^{2+}$ -связываю-



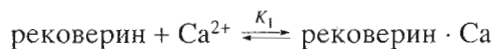
**Рис. 2.** Спектрофлуориметрическое титрование рековерина дикого типа (1) и мутантов –EF2 (2), –EF3 (3) и –EF2,3 (4) ионами кальция и EGTA: (а) – положение максимума спектра флуоресценции; (б) – интенсивность флуоресценции при 350–366 нм. Измерения проводили в 10 мМ НЕРЕС-КОН-буфере (рН 8.1) при 14°C; концентрация белка 0.05 мг/мл.



**Рис. 3.** Аппроксимация экспериментальных данных по спектрофлуориметрическому титрованию рековерина дикого типа кальцием и EGTA теоретическими кривыми, рассчитанными в соответствии с двухцентральной равновесной схемой последовательного связывания. Данные по титрованию кальцием и EGTA подгоняли одновременно; наилучшее соответствие было достигнуто при варьировании констант связывания  $K_1$  и  $K_2$ .

щем центре рековерина (мутант –EF2) сопровождается полным исчезновением высокого сродства рековерина к ионам кальция, а замена Glu121Gln в 3-м центре (мутант –EF3) не вызывает такого эффекта, разумно предположить, что связывание  $\text{Ca}^{2+}$  рековерином происходит последовательно

по схеме, согласно которой сначала заполняется 3-й и лишь затем – 2-й  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий центр:



$\text{рековерин} \cdot \text{Ca} + \text{Ca}^{2+} \xrightleftharpoons{K_2} \text{Ca} \cdot \text{рековерин} \cdot \text{Ca}$ ,  
где  $K_1$  и  $K_2$  – константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  соответственно для 3-го и 2-го центров.

На рис. 3 приведены результаты аппроксимации экспериментальных данных по титрованию белка дикого типа ионами кальция и EGTA теоретическими кривыми, рассчитанными согласно этой простейшей двухцентральной равновесной схеме связывания (нелинейный регрессионный анализ). Данные по  $\text{Ca}^{2+}$ - и EGTA-титрованию подгонялись одновременно. При титровании EGTA в модельное описание добавлялось уравнение для связывания  $\text{Ca}^{2+}$  с EGTA:



где эффективную константу связывания,  $K_{\text{EGTA}}$ , оценивали согласно работе [6].

Величины констант  $K_1$  и  $K_2$ , дающие наилучшее совпадение экспериментальных и теоретических данных, представлены в таблице.

Аналогичная процедура была использована и для мутанта –EF2, соответствующие данные для которого также приведены в таблице. Необходимо отметить, что первая константа связывания для мутанта –EF2 определялась с довольно низкой точностью в силу того, что флуоресцентный ответ, отражающий заполнение 3-го  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего центра в этом случае, очень мал.

Как уже было отмечено выше, в случае мутантов –EF3 и –EF2,3 в отличие от рековерина дикого типа и мутанта –EF2 не выявлено сильного связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , тем не менее нельзя было полностью исключить возможности того, что эти белки все же способны связывать кальций, но с существенно более низким сродством. Чтобы проверить это предположение, нами было проведено спектрофлуориметрическое титрование мутантов –EF3 и –EF2,3 ионами кальция в более широком диапазоне их концентраций. Результаты этого исследования приведены на рис. 4. Видно, что при высоких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  в спектрах собственной флуоресценции –EF3 и –EF2,3 наблюдаются изменения, говорящие об их способности связывать  $\text{Ca}^{2+}$ , хотя и с намного более низким сродством, которое приблизительно может быть охарактеризовано константой связывания порядка  $10^3 \text{ M}^{-1}$ . Здесь же укажем, что при концентрации ионов кальция, равной 2 мМ, что намного превышает его физиологический уровень, мутанты –EF3 и –EF2,3 способны ингибировать фосфорилирование родопсина, катализируемое родопсинкиназой, в той же степени, что и рековерин дикого типа (данные не представлены).

Одним из наиболее существенных результатов настоящей работы является вывод о том, что за-

полнение двух  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров рековерина ионами кальция происходит последовательно: сначала  $\text{Ca}^{2+}$  связывается 3-м центром, а затем – 2-м. Этот вывод согласуется со схемой последовательного связывания  $\text{Ca}^{2+}$  миристоилированным рековерином, предложенной ранее в работе [7], в которой принималось во внимание также и существование равновесия между конформационными состояниями R (миристоильный остаток экспонирован растворителю) и T (миристоильный остаток погружен в молекулу белка). Согласно [7], константы связывания для 3-го и 2-го центров миристоилированного рековерина в состоянии R составляют  $9.1 \times 10^6$  и  $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , что очень близко к полученным в нашей работе значениям для рекомбинантного белка дикого типа (соответственно  $3.7 \times 10^6$  и  $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Рассматриваемый механизм последовательного заполнения катионом  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих центров рековерина получил в настоящей работе прямое подтверждение благодаря использованию методов белковой инженерии, позволивших избирательно “выключать” тот или иной “EF-hand”-домен в молекуле белка.

Заметим, что аналогичная схема последовательного связывания была предложена также для парвальбумина мерланга [8], который принадлежит к тому же семейству  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков, что и рековерин, но в отличие от последнего содержит не четыре, а три потенциальных  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих домена типа “EF-hand”, из которых только два действительно способны связывать  $\text{Ca}^{2+}$ .

Следует отметить также, что мутанты –EF3 и –EF2,3, не обладающие высоким сродством к кальцию, демонстрируют тем не менее низкоаффинное связывание катиона с константами порядка  $10^3 \text{ M}^{-1}$ . Дополнительное подтверждение данного наблюдения было получено при детальном исследовании структурных свойств и конформационной стабильности различных форм рековерина, что будет продемонстрировано в одной из последующих работ данной серии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали HEPES, EGTA, EDTA (Sigma, США), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция). Все растворы были приготовлены на дистиллированной деионизованной воде. Пластиковая посуда и кварцевые кюветы использованы во всех случаях, когда концентрация кальция в растворе была критична для измерений.

**Миристоилированные формы рекомбинантного рековерина дикого типа и его “EF-hand”-мутантов** получали согласно [5]. Все эксперименты проводили с миристоилированными формами белков.

**Концентрацию белка** определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения  $\epsilon_{280\text{nm}} 36400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [9]. Апо-

Константы связывания ионов  $\text{Ca}^{2+}$  рековерином дикого типа и его “EF-hand”-мутантами, оцененные путем подгонки экспериментальных данных согласно двухцентровой схеме последовательного связывания катионов с белком (см. текст). 10 mM HEPES-КОН, pH 8.1, 14°C

| Рековерин | $K_1, \text{M}^{-1}$ | $K_2, \text{M}^{-1}$ |
|-----------|----------------------|----------------------|
| Дикий тип | $3.7 \times 10^6$    | $3.1 \times 10^5$    |
| –EF2      | $2.4 \times 10^5$    | $9.9 \times 10^4$    |
| –EF3      | –                    | –                    |
| –EF2,3    | –                    | –                    |

“–” высокоаффинное связывание отсутствует.

форму рековерина и его мутантных форм готовили по методу Блюм с соавторами [10]. Содержимое остаточного кальция, измеренное спектрофлуориметрически [11], составляло менее 0.5 моль кальция на моль белка.

**Спектры поглощения** измеряли на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss, Jena) или на спектрофотометре, сконструированном и изготовленном в Институте биологического приборостроения РАН (Пущино, Россия).

**Спектры флуоресценции** измеряли на спектрофлуориметре лабораторного изготовления, основные конструкционные и рабочие характеристики которого были описаны ранее [12]. Во все спектры были введены поправки на спектральную чувствительность прибора. Все спектры подгоняли лог-нормальным распределением [13], используя нелинейный регрессионный анализ [14, 15] (нелинейное оценивание параметров теоретической модели). Положения максимумов спектров определяли из подгонок. Температуру в кювете измеряли с помощью термопары медь-константан.

**Кажущиеся константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  для рековерина и его мутантов** оценивали путем описания экспериментальных данных по спектрофлуориметрическому титрованию белков ионами кальция и EGTA теоретическими кривыми, используя нелинейный регрессионный анализ [14, 15]. Схему

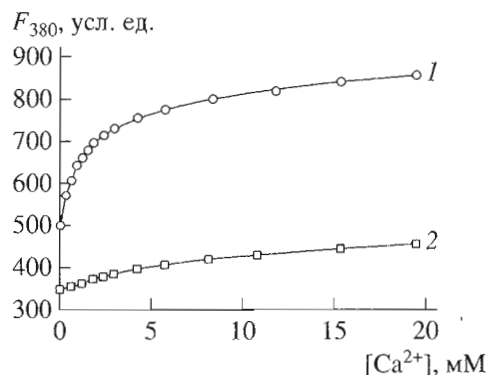


Рис. 4. Спектрофлуориметрическое титрование мутантов рековерина –EF3 (1) и –EF2,3 (2) ионами кальция в широком диапазоне концентраций  $\text{CaCl}_2$ . Измерения проводили в 10 mM HEPES-КОН-буфере (pH 8.1) при 14°C; концентрация белка 0.05 мг/мл.

связывания выбирали на основе наилучшего описания экспериментальных данных простейшей теоретической схемой с учетом флуоресцентных фазовых графиков [16]. Качество описания оценивали по разности между экспериментальными и теоретическими величинами.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Э.А. Бурштейну за предоставленную возможность проведения измерений на спектрофлуориметре и Д.Б. Вепринцеву за компьютеризацию использованного в работе спектрофлуориметра.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 98-04-49211, № 97-04-49145, № 94-04-1167, № 98-04-49293) и фондом Wellcome Trust (ИИС и ППФ).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дижур А.М., Некрасова Э.Р., Филиппов П.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 225–229.
2. Dizhoor A.M., Ray S., Kumar S., Niemi G., Spenser M., Brolley D., Walsh K.A., Philippov P.P., Hurley J.B., Stryer L. // Science. 1991. V. 251. P. 915–918.
3. Flaherty K.M., Zozulya S., Stryer L., McKay D.B. // Cell. 1993. V. 75. P. 709–716.
4. Ames J.B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J.I., Stryer L., Ikura T. // Nature (London). 1997. V. 389. P. 198–202.
5. Alekseev A.M., Shulga-Morskoy S.V., Zinchenko D.V., Shulga-Morskaya S.A., Suchkov D.V., Vaganova S.A., Senin I.I., Zargarov A.A., Lipkin V.M., Akhtar M., Philippov P.P. // FEBS Lett. 1998. V. 440. P. 116–118.
6. Schwarzenbach G., Flaschka H. Die Komplextometrische Titration. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1965.
7. Ames J.B., Porumb T., Tanaka T., Ikura M., Stryer L. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 4526–4533.
8. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Emelyanenko V.I., Burstein E.A., Gerday C., Closset J. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 109. P. 307–315.
9. Klenchin V.A., Calvert P.D., Bownds M.D. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 16147–16152.
10. Blum H.E., Lehky P., Kohler L., Stein E.A., Fisher E.H. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 2834–2838.
11. Permyakov E.A., Yarmolenko V.V., Kalinichenko L.P., Morozova L.A., Burstein E.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 100. P. 191–197.
12. Permyakov E.A., Burstein E.A., Sawada Y., Yamazaki I. // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 491. P. 149–154.
13. Burstein E.A., Emelyanenko V.I. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. P. 316–320.
14. Marquardt D.W. // J. Soc. Indust. Appl. Math. 1963. V. 11. P. 431–441.
15. Ball W.E. // Ind. Eng. Chem. Fundamentals. 1967. V. 6. P. 475.
16. Бурштейн Э.А. // Итоги науки и техники. Серия биофизика. М.: ВИНТИ, 1977. Т. 7.

## Point Amino Acid Substitutions at Ca<sup>2+</sup>-Binding Sites of Recoverin. I. The Mechanism of Successive Filling of the Ca<sup>2+</sup>-Binding Sites

S. E. Permyakov\*, I. I. Senin\*\*, V. N. Uverskii\*, A. M. Cherskaya\*,  
S. V. Shulga-Morskoy\*\*\*, D. V. Zinchenko\*\*\*, A. M. Alekseev\*\*\*, A. A. Zargarov\*\*\*,  
V. M. Lipkin\*\*\*, P. P. Philippov\*\*, and E. A. Permyakov\*\*

\*Institute of Biological Instrument Making, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

\*\*Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

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

The molecule of photoreceptor Ca<sup>2+</sup>-binding protein recoverin contains four potential Ca<sup>2+</sup>-binding sites of the EF-hand type, but only two of them (the second and the third) can actually bind calcium ions. We studied the interaction of Ca<sup>2+</sup> with recoverin and its mutant forms containing point amino acid substitutions at the working Ca<sup>2+</sup>-binding sites by measuring the intrinsic protein fluorescence and found that the substitution of Gln for Glu residues chelating Ca<sup>2+</sup> in one (the second or the third) or simultaneously in both (the second and the third) Ca<sup>2+</sup>-binding sites changes the affinity of the protein to Ca<sup>2+</sup> ions in different ways. The Gln for Glu121 substitution in the third site and the simultaneous Gln substitutions in the second (for Glu85) and in the third (for Glu121) sites result in the complete loss of the capability of recoverin for a strong binding of Ca<sup>2+</sup>-ions. On the other hand, the Gln for Glu85 substitution only in the second site moderately affects its affinity to the cation. Hence, we assumed that recoverin successively binds Ca<sup>2+</sup>-ions: the second site is filled with the cation only after the third site has been filled. The binding constants for the third and the second Ca<sup>2+</sup>-binding sites of recoverin determined by spectrofluorimetric titration are  $3.7 \times 10^6$  and  $3.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** photoreception, recoverin, Ca<sup>2+</sup>-binding proteins, site-directed mutagenesis, fluorescence

# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 924-5749; fax: +7 (0967) 79-0522; e-mail: permyakov@ibp.serpukhov.su.