

Berichte aus der Biologie

**Birgit Grafelmann**

**Frequenin-Untersuchungen zur Funktion  
eines neuronalen Calcium-bindenden Proteins  
in *Saccharomyces cerevisiae* und  
murinen Fibroblastenzellen**

Shaker Verlag  
Aachen 2005

**Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Hamburg, Univ., Diss., 2004

Copyright Shaker Verlag 2005

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4540-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen  
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9  
Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems ein definierter Abschnitt im N-Terminus der Phosphatidylinositol-4-OH-Kinase Pik1 aus *Saccharomyces cerevisiae* als NCS-bindende Domäne definiert werden. Die Interaktion war im Zwei-Hybrid-System spezifisch für NCS-1 innerhalb der NCS-Familie. Durch biochemische Versuche konnte die Wechselwirkung, die sich als Calcium-unabhängig erwies, unter *in vitro*-Bedingungen bestätigt werden. Dabei war die Bindung sowohl von unmyristoyliertem als auch myristoyliertem NCS-1 mit Pik1 vergleichbar. Die für die Bindung von NCS-1 relevanten Aminosäuren innerhalb des N-Terminus von Pik1 wurden mit Hilfe eines Alanin- und Lysin-Scan in der entsprechenden Region detaillierter untersucht. Dabei konnte für die an der Bindung beteiligten Aminosäuren in der bindende Region von Pik1 die Struktur einer alpha-Helix angenommen werden. Die Charakterisierung der Interaktion der Bindungspartner erfolgte mittels Fluoreszenz-Spektroskopie und zeigte einen Bindungskomplex von NCS-1 und Pik1 von 1:1. Die Bindung der beiden Interaktionspartner erwies sich als hoch affin und zeigte keine Kooperativität. Weiterhin wurde die Bindung von NCS-1 mit einem N-terminalen Fragment des spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv4.2 mit Hilfe eines Lysin-Scan unter *in vitro*-Bedingungen untersucht. Dabei zeigten einigen Mutanten unter Calcium-haltigen und Calcium-freien Bedingungen ein abweichendes Bindungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Unter Calcium-freien Bedingungen konnte zudem ein Einfluß von Zink auf die Bindung von NCS-1 und dem N-Terminus von Kv4.2 beobachtet werden. Die Lokalisation von NCS-1 wurde durch immunzytochemische Analyse von stabil transfizierten Fibroblastenzellen untersucht. NCS-1 lag neben einer geringen Expression im TGN im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen hauptsächlich in der Membran vor. Die nicht-myristoylierbare Mutante NCS-1(G2A) konnte dagegen vorwiegend im Zytosol der Zellen nachgewiesen werden. Eine Kolo-kalisation von NCS-1 mit filamentösem Aktin konnte unter den gewählten Bedingungen nicht gezeigt werden. Die zytochemische Untersuchung von PI4Kbeta, dem putativen humanen Pik1-Homolog, ergab eine perinukleäre Lokalisation im Bereich des TGN. Somit konnte bei einem Vergleich der stabil transfizierten Fibroblastenzellen keine Kolo-kalisation von NCS-1 und PI4Kbeta nachgewiesen werden. Mit Hilfe von biochemischen Versuchen ließ sich unter den gewählten Versuchsbedingungen ebenfalls keine Interaktion dieser Proteine detektieren.