

1 Einleitung

1.1 Die Domänenarchitektur von ROCO-Proteinen

ROCO-Proteine sind per Definition große Multi-Domänen-Proteine, die eine Ras-ähnliche GTPase enthalten [1]. Die Einteilung dieser Proteingruppe beruht auf bioinformatischen Analysen und wird in Zukunft eventuell auch durch Gemeinsamkeiten in der bislang noch nicht erforschten biologischen Funktion der ROCO-Proteine bestätigt. LRRK1 (*Leucine-rich repeat kinase 1*), die im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, ist eines von insgesamt vier humanen ROCO-Proteinen.

Im Gegensatz zu kleinen, monomeren GTPasen liegt in ROCO-Proteinen die so genannte Roc-Domäne (*Ras of complex proteins*) stets N-terminal zu der COR-Domäne (*C-terminal of Roc*), einer 300 - 400 Aminosäuren enthaltenden Proteindomäne mit unbekannter Funktion. Beide Domänen kommen ausschließlich in dieser Kombination vor und sind typischerweise von repetitiven Elementen, wie *leucine-rich* Repeats (LRRs) oder Ankyrin-Repeats (ANKs) und einer Kinasedomäne umgeben [1]. Die unterschiedliche Organisation der Domänen führt zu einer Einteilung der ROCO-Proteine in drei Typen, deren Bezeichnung sich aus den Namen der humanen Mitglieder ableitet. Der MASL1-Typ enthält neben Roc- und COR-Domäne N-terminal gelegene LRRs, der LRRK-Typ hat den gleichen Aufbau, enthält jedoch eine C-terminale Kinasedomäne und der DAPK1-Typ weist eine grundlegend andere Architektur auf mit einer N-terminal gelegenen Kinasedomäne und Ankyrin-Repeats (Abb. 1).

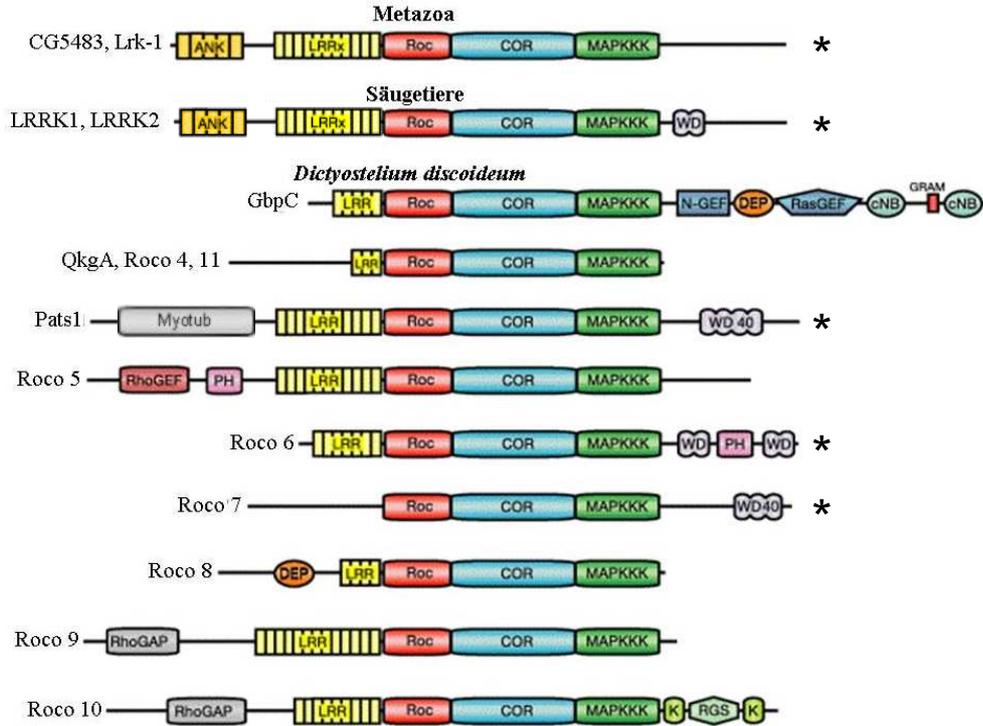
1.1.1 Die Roc-Domäne im Vergleich zu anderen GTPasen

Alle bekannten Strukturen von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (GNBPs) bilden einen konservierten strukturellen Kern, der so genannten G-Domäne [2]. Die G-Domäne besteht aus mehreren konservierten Elementen und kann zusätzliche Insertionen enthalten, an denen sich die Subklassifizierung der GNBPs in verschiedene Untergruppen, wie z.B. der Ras-ähnlichen Proteine, α -Untereinheiten der G-Proteine oder Proteinsynthese Faktoren, orientiert [3-6]. Die Roc-Domäne der ROCO-Proteine enthält in ihrer Primärstruktur alle für die GTP-Bindung und -Hydrolyse relevanten Motive und fällt innerhalb der Subklassifizierung der GNBPs in die Gruppe der Ras-ähnlichen Proteine [1].

MASL1-Typ:



LRRK-Typ:



DAPK1-Typ:



Abb. 1: Subklassifizierung und Domänenstruktur der ROCO-Proteine (Quelle: [1]; *Zusätzlich identifizierte WD-40-Repeats werden im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben.). Gezeigt sind die drei ROCO-Protein-Untergruppen mit einigen schematisch dargestellten Proteinen, die taxonomisch unterteilt und links mit dem Namen versehen sind. ANK: Ankyrin-Repeats; cNB: zyklische Nukleotide bindende Domäne; COR: COR-Domäne; Death: cytosolische FAS/TNF Interaktionsdomäne; DEP: Domäne unbekannter Funktion, die unter anderem in Pleckstrin Proteinen vorkommt; GRAM: GRAM Domäne, die in Glykosyltransferasen, Myotubularin und membranassoziierten Proteinen vorkommt; K: Kelch Repeat; kinase: Proteinkinasedomäne; LRR: *leucine-rich* Repeat; MAPKKK: *mitogen activated protein kinase kinase kinase*; Myotub: Myotubularindomäne; N-GEF: N-terminales Motiv von RasGEF; PH: Pleckstrin homologe Domäne; RasGEF und RhoGEF: Ras- und Rho-Guaninnukleotidaustauschfaktoren; RGS: *regulator of G-Protein signalling domain*; Roc: Roc-Domäne; WD/WD40: WD-40-Repeat

Innerhalb der Ras-ähnlichen Proteine bildet die Roc-Domäne auf Grund einiger Besonderheiten eine eigenständige Untergruppe (Abb. 3). Zum einen stellt sie kein eigenständiges Molekül dar, sondern ist Teil eines Multi-Domänen-Proteins und stets mit einer C-terminal gelegenen COR-Domäne von 300 – 400 Aminosäuren mit unbekannter Funktion verbunden (Abb. 1). Des Weiteren enthält die Roc-Domäne typischerweise ein Histidin (LRRK1 H757) anstelle eines Lysins im N/TKxD-Motiv (Abb. 2) und weist keine Prenylierungsstellen auf, wie sie am C-terminalen Ende Ras-ähnlicher Proteinen vorkommen [11, 12].

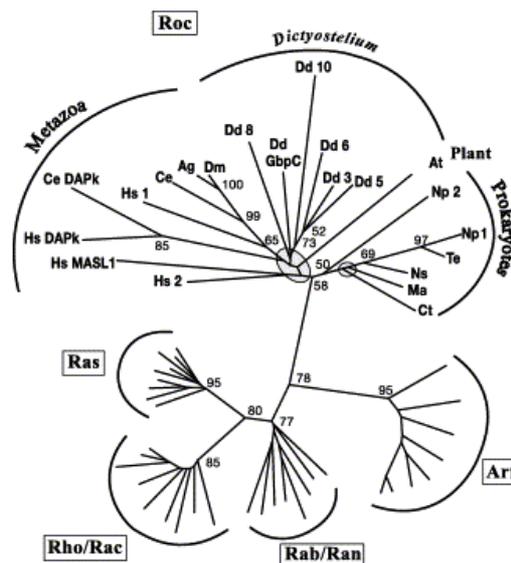


Abb. 3: Dendrogramm der GTPase Familie mit 21 Roc-Domänen und 34 anderen Ras-ähnlichen Domänen der Untergruppen Ras, Rab/Ran, Arf und Rho/Rac. (Quelle: [1]; konstruiert mit dem Fitch Programm des PHYLIP Pakets [13] aus mit ClustalW kalkulierten Sequenzalignments [14]). Hs: *H. sapiens*; Ce: *C. elegans*; Dm: *D. melanogaster*; Ag: *A. gambiae*; Dd: *D. discoideum*; At: *A. thaliana*; Np: *Nostoc punctiforme*; Ct: *Chlorobium tepidum*; Te: *Trichodesmium erythraeum*; Ns: *Nostoc sp* (PCC7120); Ma: *Methanosarcina acetovirans*

Generell stellen GNBPs molekulare Schalter dar, die komplexe zelluläre Vorgänge mit einer einfachen biochemischen Strategie regulieren. Sie wechseln zwischen zwei Konformationen, der aktiven, GTP-gebundenen und der inaktiven, GDP-gebundenen Form. Einmal durch GTP stimuliert, binden sie an *downstream* gelegene Zielproteine, generieren so deren Aktivierung und werden erst durch Hydrolyse von GTP durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wieder deaktiviert. [2, 4]. Der Zyklus Ras-ähnlicher GTPasen wird präzise von Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) [15] und GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) reguliert, die die Austauschrate von GDP zu GTP beeinflussen [5, 16, 17]. Ebenso katalysiert ein Argininrest der GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) bei Bindung an Ras-ähnliche GTPasen die GTP-Hydrolyse-reaktion [18, 19].

1.1.2 Struktur und Funktion der Ankyrin-, *leucine-rich*- und WD-40-Repeats

Einige Proteindomänen bilden eine definierte Struktureinheit, die durch ihre typischen Wiederholungen eine übergeordnete dreidimensionale Ordnung annimmt. Die konservierten Aminosäuren dieser so genannten Protein-Repeats sind in wichtige strukturgebende Wechselwirkungen involviert, wohingegen variable Aminosäurepositionen eher auf der Oberfläche des Proteins liegen und das Bindungsverhalten mit anderen Proteinen beeinflussen [20, 21]. Diese universelle Eigenschaft und die den Repeats zugrunde liegende große evolutionäre Variabilität sind Ursache für die weite Verbreitung der Repeat-Proteine [22, 23]. Ankyrin-, *leucine-rich*- und WD-40-Repeats vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und sind in zahlreichen Zellkompartimenten zu finden. Sie können als eigenständiges Protein auftreten oder sind Teil von Proteinen, die unterschiedlichste Funktionen ausüben können.

Die 33 Aminosäuren langen Ankyrin-Repeats kommen in der Regel in vier bis sechs, aber auch mehr als 30 Wiederholungen vor und sind in Prokaryoten, Pilzen, Pflanzen und Tieren als cytosolische, Membran gebundene oder in sekretierten Proteinen zu finden [24, 25]. Die strukturelle Einheit eines Repeats aus zwei β -Faltblättern und zwei α -Helices bildet eine Schleife, deren Wiederholung zu einer übergeordneten bogenförmigen Solenoidstruktur führt [21, 26]. Es existiert bis dato keine Subgruppierung der Ankyrin-Repeats.

Leucine-rich-Repeats (LRRs) sind 20 - 29 Aminosäuren lang, kommen ebenfalls ubiquitär vor und werden den Konsensussequenzen nach in sieben Untergruppen unterteilt, die jeweils pro- oder eukaryotischen Ursprungs sind und eine bestimmte zelluläre Lokalisation aufweisen. Die LRRs der ROCO-Proteine gehören der Untergruppe der „*typical* LRRs“ an und bestehen aus je einer α -Helix und einem β -Faltblatt, deren Schleifenanordnung ebenfalls eine übergeordnete bogenförmige Solenoidstruktur ausbilden [21, 27, 28].

WD-40-Repeats sind 30 – 40 Aminosäuren lang, in viele verschiedene biologische Prozesse involviert und ausschließlich in Eukaryoten zu finden [29, 30]. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Repeats existiert keine eindeutige Konsensussequenz für WD-40-Repeats, so dass sie oft nicht direkt in der Primärstruktur erkennbar sind, jedoch später während der Strukturaufklärung eines Proteins entdeckt werden [31]. WD-40-Repeats sind aus vier β -Faltblättern aufgebaut, treten meist in sieben Wiederholungen auf und nehmen eine β -Propeller Struktur ein. Dabei bilden die letzten drei und das erste β -Faltblatt des darauf folgenden Repeats ein „Kuchenstück“ des siebenteiligen Propellers [32, 33].

1.1.3 Merkmale der Kinasedomänen von ROCO-Proteinen

Aktive Kinasen enthalten charakteristische Motive in ihrer Primärstruktur, die in die Substratbindung und Katalyse involviert sind [34-37]. Die ROCO-Proteinkinasen entsprechen dem Aufbau der Serin/Threonin Kinasen und stellen potentiell aktive Proteine dar. Bosgraaf *et al.* haben postuliert, dass es sich bei LRRK-Typ-ROCO-Proteinkinasen um MAPKKKs (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) handeln könnte [1]. Allerdings basiert diese Annahme lediglich auf Sequenzvergleichen und ist experimentell nicht bestätigt, da noch keine Aktivität der LRRK-Typ Proteinkinasen nachgewiesen wurde. Die Sequenzvergleiche verdeutlichen jedoch die Verwandtschaft der LRRK-Typ Proteinkinasen untereinander, die sich vor allem in einem seltenen Phenylalanin zu Tyrosin Austausch im konservierten DFG-Kodon eukaryotischer ROCO-Proteinkinasen manifestiert (s. auch Abb. 13).

1.2 Mitglieder der ROCO-Proteingruppe

Bislang sind mindestens 27 ROCO-Proteine aus verschiedenen Organismen in den öffentlichen Proteindatenbanken zu finden, die einen signifikanten Verwandtschaftsgrad innerhalb der einzelnen Proteindomänen aufweisen (Abb. 1). Wenige dieser Proteine wurden bereits experimentell beschrieben, wie die Zusammenfassung der Daten im Folgenden zeigt.

1.2.1 MASL1 aus *Homo sapiens*

Der MASL1-Genlocus (*malignant fibrous histiocytoma-amplified sequences with leucine-rich tandem repeat 1*, 8p23.1), dessen Produkt zum MASL1-Typ (Abb. 1) der ROCO-Proteine gehört, ist in malignen Fibrohistiozytomem vervielfältigt und unterliegt einer Translokation im NK/T-Zell Lymphom sowie im Plattenepithelkarzinom im Kopf/Halsbereich. [38, 39]. In einer onkogenen Zelllinie aus immunoblastischen B-Zell-Lymphom konnte schließlich gezeigt werden, dass nach Translokation des 8p23.1 Locus ein chimäres MASL1-Protein mit einem 19 Aminosäuren längeren C-Terminus entstand. NIH-Zellen, die MASL1 oder das chimäre Protein exprimieren, sind in Nacktmausexperimenten tumorerzeugend [38].

1.2.2 GbpC, Pats1 und QkgA aus *Dictyostelium discoideum*

In *Dictyostelium discoideum* wurden insgesamt 11 LRRK-Typ-ROCO-Proteine entdeckt, die untereinander eine große Sequenzhomologie aufweisen, in ihren äußersten N- und C-Termini jedoch unterschiedliche Proteindomänen enthalten (Abb. 1). Drei dieser Proteine wurden bislang experimentell analysiert.

GbpC (cGMP bindendes Protein C) besitzt im Vergleich zu den übrigen ROCO-Proteinen des LRRK-Typs einen andersartigen C-Terminus aus mehreren Proteindomänen: N-GEF (N-terminales Motiv von RasGEF), DEP (Domäne unbekannter Funktion, die unter anderem in Pleckstrin-Proteinen vorkommt), RasGEF (Ras-Guaninnukleotidaustauschfaktor) GRAM (GRAM Domäne, die in Glykosyltransferasen, Myotubularin und Membran-assoziierten Proteinen vorkommt) und cNB (zyklische-Nukleotide-bindende Domäne) [40]. Es ist in der Lage zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) an die cNB-Domänen zu binden und auf diese Weise die Myosin II Phosphorylierung zu regulieren. *D. discoideum* Stämme mit einem deletierten GbpC Genlokus zeigen demzufolge eine reduzierte Phosphorylierung der leichten, regulatorischen Kette des Myosin (RLC), nach Stimulation eine verminderte Anlagerung von Myosin an das Cytoskelett und einen daraus resultierenden Chemotaxisdefekt [40-42].

Pats1 besitzt als einziges ROCO-Protein eine N-terminale Myotubularindomäne, die zur Familie der Tyrosinphosphatasen gehört, aber experimentell bislang nicht untersucht wurde. Die Pats1-Kinasedomäne, sowie der C-Terminus erzeugten in Überexpressionstudien große multinukleäre Zellen. Dieser Cytokinesedefekt wurde ebenfalls beobachtet in *D. discoideum* Zellen, die einen deletierten Pats1-Lokus enthielten [43].

In einer ähnlichen Studie wurde der QkgA-Genlokus deletiert und ein Defekt in der Cytokinese der Zellen beobachtet, der sich in einer gesteigerten Wachstumsrate und abnormal großen Zellen resultierte [44].

1.2.3 CG5483 aus *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* wurde das komplette Genom analysiert, um Kinasen, die in die Regulation der Zellteilung involviert sind, zu identifizieren. Es wurde festgestellt, dass der *knock-down* von CG5483, einem LRRK-Typ-ROCO-Protein, zu Defekten im Zentrosomenaufbau und zu einem leicht reduzierten Verhältnis sich teilender Zellen zur Gesamtzellzahl resultiert [45].

1.2.4 Lrk-1 aus *Caenorabditis elegans*

In einer *C. elegans knock-down*-Studie wurden Gene identifiziert, die die ersten beiden embryonalen Zellteilungen negativ beeinflussen. Es wurde kein Effekt des LRRK-Typ-ROCO-Proteins Lrk-1 beobachtet [46]. In einer anderen *knock-down*-Studie mit adulten *C. elegans* manifestierte sich ebenfalls kein Cytokinesedefekt, aber es wurde eine Mislokalisierung des SNB1-Proteins in Neuronen entdeckt [47]. SNB1 ist homolog zu humanem Synaptobrevin, einem Vesikel-assoziierten Protein, das eine Rolle bei der Fusion exzitatorischer Vesikel mit der Plasmamembran spielt [48].

1.2.5 LRRK1 und LRRK2 aus *Homo sapiens*

LRRK1, das Gegenstand dieser Arbeit ist, und LRRK2 sind die einzigen humanen LRRK-Typ-ROCO-Proteine und sie vereint eine überaus deutliche Sequenzhomologie, die sich über 2000 Aminosäuren und alle Proteindomänen streckt. Sie enthalten Ankyrin-, *leucine-rich*-Repeats, Roc-, COR- und Kinasedomäne, sowie sieben WD-40-Repeats, wie im Ergebnisteil der Arbeit gezeigt wird.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten keine experimentellen Daten zu LRRK1. Erst kürzlich wurde von Harada et al [49] berichtet, dass die LRRK1-Überexpression in HEK293 Zellen zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt. Obwohl dieses Ergebnis gut in den Kontext anderer ROCO-Proteine passt, sind die präsentierten Daten schwierig zu interpretieren, da die Experimente lediglich mit einem Fragment der LRRK1 durchgeführt wurden. Das Fragment wird in der Arbeit als komplette LRRK1 deklariert, besteht jedoch nur aus der C-terminalen Hälfte der Kinasedomäne und den WD-40-Repeats, wie die Überprüfung des zu Grunde liegenden cDNA-Klons ergab. Der LRRK1-*knock-down* durch RNA-Interferenz-Experimente hingegen führte zu keinem messbaren Effekt in der Proliferationsrate [49].

Seit kurzem erscheinen regelmäßig neue Publikationen zu LRRK2, das auch Dardarin genannt wird (Das baskische Wort *dardara* bedeutet Tremor). Mutationen im LRRK2-Gen, das im PARK8 Locus bei 12q11.2-q13.1 liegt, kosegregieren mit einer autosomal-dominanten Form der Parkinson-Krankheit [50-65]. Bemerkenswert ist, dass Betroffene mit LRRK2-Mutationen alle klinischen Symptome der Parkinson-Krankheit aufweisen (s. auch Abschnitt 1.3), aber im Gehirn der Mutationsträger auch Veränderungen gefunden wurden, die bislang verschiedenen Unterformen des Parkinson-Syndroms zugeordnet waren. Das bedeutet, dass die Mutation dieses Gens offenbar verschiedene neurodegenerative Prozesse auslösen kann. Es wird spekuliert, dass die entdeckten Mutationen einen Effekt auf die Kinaseaktivität der LRRK2 haben und auf diese Weise Neuronen anfällig für pathogene Faktoren machen [66-

70]. Die krankheitserregenden Mutationen liegen in den LRRs, der Roc-, COR- und der Kinasedomäne des LRRK2-Proteins, von dem bislang noch nicht bekannt ist, ob es ein aktives Enzym ist und wie es reguliert wird [64, 65, 68].

1.2.6 DAPK1 aus *Homo sapiens*

Zelltod-assoziierte Proteinkinase 1 (*Death-associated protein kinase 1*; DAPK1) und ihre Orthologen, stellen die isolierte ROCO-Subfamilie des DAPK1-Typs dar (Abb. 1). Sie bestehen aus einer N-terminalen Proteinkinasedomäne, die nicht mit denen des LRRK-Typs verwandt ist, aus Ankyrin-Repeats, der Roc- und COR-Domäne sowie einer C-terminalen *death*-Domäne. Die humane DAPK1 ist eine Ca^{2+} /Calmodulin regulierte Serin/Threonin Proteinkinase, die durch verschiedene „*death*“-Signale induziert werden kann und so den programmierten Zelltod einleitet [71, 72]. Diese proapoptotische Funktion der DAPK1 ist von ihrer Kinaseaktivität abhängig und wirkt über die Myosin II Phosphorylierung, die schließlich zu Zelltod-assoziierten morphologischen Veränderungen, wie Membranausstülpungen und Aufrunden der Zellen führen [72, 73]. Bislang ist noch unbekannt, ob die Roc- und COR-Domänen eine Rolle in der Funktion der DAPK1 spielen.

1.3 Neurodegenerative Erkrankungen

Die in der Diskussion dieser Arbeit erwähnten neurodegenerativen Krankheiten werden im Folgenden kurz beschrieben.

1.3.1 Parkinson-Krankheit

Parkinson ist mit 0,5-1% Betroffenen bei den 65-69 Jährigen und 1-3% bei den über 69 Jährigen die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit [74, 75]. Die Krankheit ist nach ihrem Entdecker James Parkinson benannt und 1815 erstmals beschrieben worden [76]. Die Betroffenen erkranken meist in fortgeschrittenem Alter, leiden unter zunehmender Störung der Motorik und werden häufig zu Pflegefällen. Direkte Ursache der Symptome ist ein Mangel an Dopamin im Gehirn, der durch Medikamente eine Zeit lang ausgeglichen werden kann. Der Dopaminmangel in Parkinson wird durch selektive und progressive Degenerierung von Dopamin erzeugenden Neuronen in der *Pars compacta* der *Substantia nigra* verursacht, die cytoplasmatische Einschlüsse fibrillärer, fehlgefalteter Proteine, den Lewy-Körperchen, entwickeln [76-78]. Die exakte Zusammensetzung dieser Ablagerungen ist nicht bekannt, obwohl sie ubiquitiniertes α -Synuklein (α -Synukleinopathie), Parkin, Synphilin,

Neurofilamente und synaptische Vesikel-Proteine enthalten [77, 79]. Obwohl nach aktuellem Stand mehr als 90 % der Erkrankungen sporadischer Natur sind, gibt es auch erbliche Formen, in denen mindestens 11 Genloki (PARK-Genloki) eine Rolle spielen [80]. Bekannt sind Mutationen in α -Synuklein (PARK1), Parkin (PARK2), UCHL-1 (PARK5), PINK1 (PARK6), DJ-1 (PARK7) und LRRK2 (PARK8), das mit 5 % den größten Anteil des vererblichen Parkinson ausmacht [75, 81]. Eine Therapie gegen das Fortschreiten der Erkrankung und der damit einhergehenden Behinderung ist bis jetzt jedoch nicht möglich, da die zugrunde liegenden biochemischen Vorgänge weitgehend unbekannt sind [76]. Darüber hinaus existieren diverse Unterformen der Parkinson-Krankheit die weitere α -Synukleinopathien als auch Tauopathien (s. nächster Abschnitt) umfassen.

1.3.2 Alzheimer-Krankheit

Alzheimer ist mit ca. 1 % Betroffenen bei den 65-69 Jährigen und bis zu 30 % bei den über 90 Jährigen die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit [75, 82]. Die Krankheit ist nach ihrem Entdecker Alois Alzheimer benannt und 1907 erstmals beschrieben worden [78]. Die Betroffenen erkranken meist in fortgeschrittenem Alter und leiden unter abnehmenden geistigen Funktionen des Gedächtnisses, der Sprache und der räumlichen Orientierung. Die Ursache für die Symptome ist der fortschreitende Verlust von Neuronen des Hippokampus und des cerebralen Kortex [83]. Im Gehirn Betroffener manifestieren sich charakteristische Läsionen: extrazelluläre Amyloid-Plaques [84] und intrazelluläre neurofibrilläre Ablagerungen aus hyperphosphoryliertem Tau Protein (Tauopathie) [85] oder α -Synuklein (α -Synukleinopathie) [77, 78, 86]. Amyloid-Plaques enthalten kleine, toxische Spaltprodukte ($A\beta$ 40 und $A\beta$ 42) des Amyloidvorläuferproteins (APP), Proteoglykane, ApoE4 (Apolipoprotein E4) und Antichymotrypsin. ApoE4 kann möglicherweise die pathogenen Ablagerungen beeinflussen und ist somit selbst ein Risikofaktor [77, 78, 87]. Obwohl der Grossteil der Erkrankungen sporadischer Natur ist, gibt es auch eine autosomal-dominant vererbte Form der Alzheimer-Krankheit, die bereits zwischen dem 30. und 50. Lebensalter auftritt. Mutationen in APP, Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) stehen in Verbindung mit dieser Form [75]. Preseniline sind membranständige Aspartylproteasen, die zur Spaltung des APP in die toxischen Amyloide beiträgt [77, 78]. Bislang existiert keine Therapie, um das Fortschreiten von Alzheimer aufzuhalten [88]. Es gibt viele Varianten der Alzheimer-Krankheit, wie z.B. frontotemporale Demenz, Demenz vom Lewy-Körperchen-Typ und progressive supranukleäre Blickparese [89].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die Entschlüsselung des Genoms ist zentrale Voraussetzung für ein systemweites, funktionelles Verständnis der Vorgänge innerhalb der Zelle [90, 91]. Funktionsträger in einem Organismus sind jedoch nicht die Gene, sondern die Gesamtheit der tatsächlich produzierten Proteine, das „Proteom“. Die Entschlüsselung des Proteoms ist im Gegensatz zum Genom mit weitaus größerem Aufwand verbunden, da jedes Protein einzeln mit diversen, spezifischen Experimenten analysiert werden muss. Außerdem können viele Proteine ihre Funktion erst im Verbund mit anderen Proteinen entfalten, wodurch die Analyse meist erschwert wird. Aus pharmakologischer Sicht ist vor allem die Charakterisierung signaltransduzierender Proteine im Mittelpunkt des Interesses, da über deren Regulation oft wichtige zelluläre Prozesse gesteuert werden.

In dieser Arbeit soll eine Vertreterin der ROCO-Proteingruppe, die humane LRRK1 (*leucine-rich repeat kinase 1*), biochemisch charakterisiert werden. LRRK1 ist von besonderem Interesse, da sie neben einer Kinasedomäne auch eine GTPase-ähnliche Domäne enthält - zwei Domänen, die meist essentielle Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden darstellen.

Da zu Beginn dieser Arbeit keine funktionellen Daten über LRRK1 verfügbar waren, sollte zunächst die cDNA humaner LRRK1 kloniert und exprimiert werden, um anschließend die verschiedenen Domänen funktionell zu charakterisieren. Hierbei sollten die potentielle GTP-Bindung und ihre Auswirkung auf die Kinaseaktivität im Vordergrund stehen. Zur Vervollständigung der Charakterisierung sollten *in-vivo*-Überexpressionsstudien und RNA-Interferenz-Experimente durchgeführt werden. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Funktion und Regulation der LRRK1 als Mitglied der ROCO-Proteingruppe diskutiert werden.