

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton (Fluka)	HEPES (Gibco BRL)
Agarose (Sigma)	Isopropanol (Merck)
Ampicillin (Sigma)	Kanamycinsulfat (Merck)
"Bovine Serum Albumine" (BSA, BioRad)	Magnesiumchlorid (Merck)
beta-Mercaptoethanol (Sigma)	Methanol (Merck)
Dapi-Reagenz (Hoechst 33342)	MES-Puffer (NuPAGE, Invitrogen)
Kalziumchlorid (Merck)	NP-40 (Calbiochem)
Chloramphenicol (Sigma)	Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma)
Complete Mini Protease Inhibitor (Roche)	Natriumchlorid (Merck)
Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad)	OPTI-MEM (Gibco BRL)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PBS (PAA Lab.)
Dithiothreitol (DTT)	Ponceau-S-Lösung (Fluka)
Salmon Testes DNA (Clontech)	Propidiumiodid (Gibco BRL)
EDTA (Merck)	RotiBlock™ (Roth GmbH)
EGTA (Merck)	TA-Puffer (NuPAGE, Invitrogen)
Ethanol (Merck)	Triton X-100 (Riedel de Haen)
Ethidiumbromid (Gibco BRL)	Trypsin (Gibco BRL)
Glycerol 87 % (v/v; Riedel de Haen)	Tween 20 (Sigma)
Glycin (Merck)	

2.1.2 Enzyme und Kits

Assay on demand for real-time PCR (Applied Biosystems)
 BCA™ Protein Assay (Pierce)
 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v1.1 (Applied Biosystems)
 BrdU-Proliferationstest (Roche)
 Cell line Nucleofector® Kit R (Amaxa)
 ECL™ Western Blot Detection (Amersham Biosciences)
 Marathon-Ready™ cDNA Amplification Kit
 PCR Purification Kit (Qiagen)
 Pfu Turbo Polymerase (Invitrogen)
 Plasmid Mini/Maxi Kit (endofree, Qiagen)
 Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene)
 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
 Quick Change® Mutagenese-Kit (Stratagene)
 Restriktionsendonukleasen inkl. Puffer (Roche oder NEBiolabs)
 Ribonuclease A (Sigma)
 RNeasy total RNA Kit (Qiagen)
 SuperScript™ First-strand-synthesis system for RT-PCR (Invitrogen)
 Taq-Polymerase (Invitrogen)
 TaqMan™ universal master mix (Applied Biosystems)
 T4-DNA-Ligase (Invitrogen)

2.1.3 Antikörper und Verdünnungen

Antikörper gegen	Western Blot	Immunpräzipitation	Immunfluoreszens
β-Aktin (Sigma, AC-74)	1:5000	-	1:5000
GFP (abcam, ab1218)	1:500	1:100	-
GST-FITC-konjugiert (abcam, ab3445)	-	-	1:1000
Maus-F(ab) ₂ -Biotin (Dianova)	-	-	1:50
Myc (Sigma, 9E10)	1:1000	1:500	1:1000
Myc-Cy3-konjugiert (Dianova)	-	-	1:50
Mono-pospho-RLC (Cell Signalling)	-	-	1:100
Di-pospho-RLC (Cell Signalling)	-	-	1:100
α-Tubulin (Sigma, DM1A)	-	-	1:2000
γ-Tubulin (Sigma, GTU-88)	-	-	1:500
Anti-Maus HRP (Amersham)	1:4000	-	-
Anti-Kaninchen HRP (Amersham)	1:4000	-	-
LRRK1 (Proteintech Group Inc)*	1:100	-	-

*Die in *E.coli* exprimierte LRRK1-Kinasedomäne wurde über einen GST-tag am Protein aufgereinigt und als Antigen zur Immunisierung in Kanninchen eingesetzt.

2.1.4 Puffer, Lösungen, Kulturmedien

Ampicillin-Stocklösung

100 mg/ml Ampicillin
in H₂O, sterilfiltriert

10x Blotpuffer:

120 mM Tris/HCl
960 mM Glycin

Coomassie-Färbelösung:

0,25 g/l Coomassie Brilliant Blue R250
10 % (v/v) Essigsäure
50 % (v/v) Ethanol in H₂O

Coomassie-Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure
50 % (v/v) Ethanol in H₂O

DMEM für HEK293FT-Zellen:

DMEM (PAA Lab., high glucose mit
Natriumpyruvat and L-Glutamin)
10 % (v/v) FCS (*fetal calf serum*, GibcoBRL)
2 mM L-Glutamin (GibcoBRL)

DNA-Größenstandard

10 % (v/v) 1kb, DNA Ladder (Roche)
10 % (v/v) 10x DNA-Probenpuffer in H₂O

DNA-Probenpuffer, 10x

20 % (w/v) Ficoll
100 mM EDTA
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol in H₂O

DTT-Lösung

500 mM Dithiothreitol in H₂O

EDTA-Lösung

200 mM EDTA in H₂O
pH 8 mit HCl einstellen

Ethanol-Lösung, 70%

70 % (v/v) Ethanol abs.
in H₂O

GTP-Bindungspuffer:

100 mM Tris/HCl, pH 7,5
50 mM KCl
1 mM EDTA
0,1 mM DTT
5 mM MgCl₂
Complete Mini Protease Inhibitor (Roche, n.
Angaben d. Herstellers)

HEPES-Puffer, 1 mM

1 mM HEPES, pH 7,4
in H₂O

Kanamycin-Stocklösung

50 mg/ml Kanamycin
in H₂O, sterilfiltriert

Kinase-Lysepuffer:

25 mM HEPES/NaOH, pH 7,3
1 % NP-40
2 mM EGTA;
2 mM EDTA
2 mM DTT
200 mM NaCl
Complete Mini Protease Inhibitor (Roche, n.
Angaben d. Herstellers)

Kinase-Reaktionspuffer:

25 mM HEPES/NaOH, pH 7,3
10 mM MgCl₂
10 mM MnCl₂
2 mM DTT
200 mM NaCl
1:100 Phosphatase Inhibitor 1 and 2 (Sigma)

Luria-Bertani (LB)-Medium

10 g/l Pepton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
auf pH 7,0 mit NaOH einstellen
in H₂O, Autoklavieren

LB-Ampicillin-Agaroseplatten

15 g/l Agar
1 l LB-Medium, autoklaviert
100 µg/ml Ampicillin
Autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium, autoklaviert
100 µg/ml Ampicillin

LB-Kanamycin-Agaroseplatten

15 g/l Agar
1 l LB-Medium, autoklaviert
25 µg/ml Kanamycin
Autoklavieren

LB-Kanamycin-Medium

LB-Medium, autoklaviert
50 µg/ml Kanamycin

MEM für HeLa-Zellen:

MEM (PAA Lab., mit Natriumkarbonat, ohne
Phenolrot und L-Glutamin)
10 % FCS (*fetal calf serum*, GibcoBRL)
2 mM L-Glutamin (GibcoBRL)

Northern Blot Waschpuffer1:

2x SSC-Puffer, 1 % SDS

Northern Blot Waschpuffer2:

0,2x SSC-Puffer, 0,5 % SDS

Propidiumiodid-Färbelösung:

82 µl PBS
3 µl Ribonuclease A (5 % Lösung in PBS; Sigma)
115 µl Propidiumiodid (100 µg/ml Lösung in PBS)

20x SSC Buffer (Standard Saline Citrate):

3 M NaCl
300 mM Na₃Citrate 2H₂O
in 1 H₂O, pH 7,0

TAE, 1x

40 mM Tris/HCl
1 mM EDTA
mit Essigsäure auf pH 8,4 einstellen

TBS-T

50 mM Tris/HCl, pH 7,4
150 mM NaCl
0.1 % (v/v) Tween 20
in H₂O

Tris-HCl

1 M Tris-HCl in H₂O
pH 7,5 mit HCl einstellen

TritonX-100-Lösung, 10%

10% (v/v) TritonX-100
in H₂O

2.1.5 cDNA-Bibliotheken und -Klone

lung, mammary gland Marathon-Ready cDNA (Clontech)
brain LRRK1 cDNA Klone B12 und H5 (ResGen)
fallopian tube cDNA Klon pINCY A3 LRRK1 (Incyte)

2.1.6 Expressionsvektoren

pCMV-2xMyc (Stratagene, enthält einen zusätzlich eingefügten Myc-tag)
pEGFP-N3 (Clontech)
pDEST27 (Invitrogen)
pcDNA3.2/V5-DEST (Invitrogen)

2.1.7 Primer

Die *Annealing*-Temperatur eines Primers wurde nach folgender Formel abgeschätzt:

$T = [4 \times n(C+G) + 2 \times n(A+T) - 5] \text{ } ^\circ\text{C}$, wobei n die Anzahl der jeweiligen Basen in der Primersequenz darstellt. In der Tabelle sind die Sequenzen aller zum kodierenden Strang komplementären Primer aufgeführt, deren Schmelztemperaturen (*annealing*-Temperatur) zwischen $50 \text{ } ^\circ\text{C}$ und $60 \text{ } ^\circ\text{C}$ liegen.

primer	Sequenz
EcoRV-#1	5´-CAGGACTTCGATATCATGGAGACGCTTAACGGTGCCGG-3´
#2	5´-CAGCGTATTTTGGACACACGGCAG-3´
#3	5´-GTTCCCTGTCATCGTGCGCTTGCCCC-3´
#4	5´-CCAGCAACAAGTTGTCCACCTCCC-3´
#5	5´-GGATCTCTCCAGAAACCAACTTGGC-3´
#6	5´-CCCTCCCCGTCTGTAAGATCTCCAGG-´
#7	5´-CGTCGGCAGCACCATCGGCTGCCAG-3´
#8	5´-CCTCTGCCCCATCTCCTTCCATC-3´
#9	5´-GAAATCAGAGGATGTGCAGTACTTC-3´
#10	5´-CACCGTGCTGTCCGAGAACGCCAG-3´
#11	5´-CCTTCATGTATGAACTGTGCTGTG-3´
#12	5´-CCATGGTTACGTCAGTCGTGTGC-3´
#13	5´-CCGACAGGTCTGAGCATGACCTG-3´
XhoI#14	5´-GCTTGCACTCGCAAGAGAAGGTAACCTCGAGAAGCTTGTGCAC-3´
K1269W	5´-GTACCAGGGCCAGCCTGTGGCCGTCTGGCGCTTCCACATCAAAAAATTC-3´
K650A	5´-CCC GCGCCAGGGCGCGTCCACCCTCCTGG-3´
K745G	5´-GGCTGCTCAACATCGAGGCCGGGGCCCCAAACGCCGTGG-3´
K745C	5´-GGCTGCTCAACATCGAGGCCCTGTGCCCAACGCCGTGG-3´
F1021C	5´CCATTTCAGAGGGTATTTAAGATGAGCTGCGTTCCCGTTGGCTTCTGG-3´
I1411T	5´GCACATCAACATCAAGCTATCTGACTACGGGACTTCGAGGCAGTCATTCCATGAGG-3´

2.1.8 Geräte

ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems)
 ABI PRISM™ 7700 (Applied Biosystems)
 Agarosegelkammern (Pharmacia Biotech)
 BioPhotometer (Eppendorf)
 Fotoentwickler Curix 60 (Agfa)
 SLab Gel Dryer (LKB)
 Hybridisierungsöfen HB-1000 (UVP)
 Lichtmikroskop Axiovert 200M (Zeiss)
 Nucleofector I (Amaxa Biosystems)
 PCR-Thermocycler (Applied Biosystems)
 Phosphoimager SI (Molecular Dynamics)

Proteingelkammer (NuPAGE, Invitrogen)
 Speed-Vac alpha RVC (Christ)
 Stereomikroskop Labovert (Leitz)
 Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman)
 HT-Imager (Molecular Devices).
 UV-Spektrometer SLT (Lab Instruments Spectra)
 Vakuumpumpe alpha 1-4 (Christ)
 Western-Blot Kammer (NuPAGE Invitrogen)
 Zentrifugen (Eppendorf)
 FACS-Gerät (FACSCalibur, Becton/Dickinson)

2.1.9 Computersoftware

AxioVision v4.3 Software
 ClustalW (EMBL-EBI, [92])
 DeCypher Tera-BLAST (TimeLogic)
 ImageMaster TotalLab v2.01 (Amers.Biosciences)
 Jalview Editor v1.7 [10]
 MetaMorph (Molecular Devices)

Molecular Dynamics Phosphoimager Softw. v5.1
 NetPhos v2.0 [93]
 Photoshop 7.0 (Adobe)
 PSI-PRED [94]
 Sequencing Analysis v3.7 (App. Biosystems)
 Vector NTI Suite v9.0 (Invitrogen)

2.1.10 Accession numbers der Aminosäuresequenzen

Ag LRRK (EAA06914, GenBank)	Hs Rab6 (P20340, SwissProt)
Am LRRK (XP_392166; RefSeq)	Hs RhoB (CAA29968, GenBank)
Bt beta subunit (SwissProt)	Magn. sp (ZP_00044166, GenBank)
Ce LRRK (AAK73898, GenBank)	Meth. bark. (ZP_00077191, GenBank)
Chl. tep. TLS (AE012908, GenBank)	Meth. bark (ZP_00295295, GenBank)
Dd GbpC (XP_635392, RefSeq)	Meth. sarc. C2A (NP_617214, RefSeq)
Dd pats1 (AAO12857, GenBank)	Mm LRRK1 (NP_666303, RefSeq)
Dd Roco4 (AY232266, GenBank)	Mm LRRK2 (NP_080006, RefSeq)
Dd Roco6 (AY232268, GenBank)	Nos. punc (ZP_00110347, GenBank)
Dd Roco7 (AY232269, GenBank)	Nos. punc. (ZP_00110172, GenBank)
Dd QkgA (Roco2, AAO83648, GenBank)	Nos. punc. (ZP_00106558, GenBank)
Dm LRRK (CG5483, NP_650903, RefSeq)	Nos. sp. (NP_484168, RefSeq)
Gg LRRK2 (XP_415940, RefSeq)	Rn LRRK1 (XP_218760, RefSeq)
Hs Arl1 (P40616, SwissProt)	Rn LRRK2 (XP_235582, RefSeq)
Hs beta3 (NP_002066, RefSeq)	Tn LRRK1 (CAF95957, GenBank)
Hs DAPK1 (P53355, SwissProt)	Tn LRRK2 (CAG05593, GenBank)
Hs H-Ras (AAM12630, GenBank)	Tri. rey. (ZP_0007257, RefSeq)
Hs LRRK1 (DQ013130, GenBank)	Xl LRRK1 (AW637884, GenBank)
Hs LRRK2 (AAV63975, GenBank)	Xl LRRK2 (BU911845, GenBank)
Hs MASL1 (BAA74737, GenBank)	

2.1.11 Sonstiges

Deckgläschen (Roth GmbH)	NAP-5 Säulen (Amersham Biosciences)
ECL-Hyperfilm (Amersham Biosciences)	Objektträger (Roth GmbH)
Falcon Microtest™ 96-Well Assay Plate (BD)	Pipetten (Eppendorf, Rainin)
Hybridisierungsröhrchen (Schott)	Proteingele (Invitrogen)
MTN™ Blots (Clontech)	Röntgenfilme BioMax MR (Kodak)
Mikrozentrifugenfilter (Millipore)	Spritzen und Nadeln (Braun)

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatik

Sequenzhomologiesuche mit BLAST (*basic local alignment search tool*, [95]):

Die Sequenzen der LRRK1-orthologen Proteine wurden in Protein- und Gen-Datenbanken mit Hilfe der DeCypher Tera-BLAST Software (TimeLogic) identifiziert. Dabei wurden nur Einträge beachtet, die für Proteine mit LRRs, Roc- und COR-Domänen stehen. Es wurden folgende Datenbanken benutzt: Incyte: LGcompseqs, LGtemplates, foundation full-length transcripts, foundation full-length clones; NCBI: EST-human, GenEMBL, PDB, RefSeq; EBI: TrEMBL; Expacy: SWISS-PROT.

Multiple Sequenzalignments:

Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Proteine bzw. Repeats eines oder mehrerer Proteine wurden mit ClustalW (EMBL-EBI, [14]) erstellt, teils manuell berichtigt und Jalview v1.7 [10] dargestellt.

Sekundärstrukturberechnung:

Die Sekundärstruktur einzelner Aminosäuresequenzen wurde mit PSI-PRED [94] berechnet. Für die einzelnen vorausgesagten α -Helices und β -Faltblätter wurde ein kalkulierter Neigungswert (*propensity value*; Skala von 0-9) angegeben. Nur Neigungswerte größer oder gleich 5 wurden zur Analyse verwendet, wodurch die weniger wahrscheinlichen SekundärstrukturVorhersagen ausgespart wurden.

Vorhersage der Phosphorylierungsstellen:

Potentielle Phosphorylierungsstellen der kompletten LRRK1-Aminosäuresequenz wurden durch die Analysesoftware des NetPhos-Servers 2.0 berechnet [93] und graphisch in einem Diagramm dargestellt, in dem die von der Analysesoftware angegebenen Wahrscheinlichkeitswerte aufgetragen sind (Skala von 0 bis 1).

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 *E.coli*

Transformation:

Aliquots von 50 μ l kompetenten Zellen (XL1- und XL2-blue, Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und ca. 0,1 μ g Plasmid DNA hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 Min. auf Eis und anschließend für 45 Sek. bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB Medium ohne Antibiotikum wurde der Ansatz für 1 Std. bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA:

Nach der Transformation wurden Kolonien in je 2 oder 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in Flüssigkultur gebracht und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Aus der Flüssigkultur wurden Stammlösungen zur Lagerung hergestellt, indem 800 μ l der jeweiligen Kultur mit 200 μ l Glycerin gut vermischt und direkt bei -70 °C eingefroren wurden. Aus der verbleibenden Flüssigkultur wurde dann die Plasmid-DNA durch Präparation nach Angaben des Herstellers mit dem Plasmid Mini bzw. Maxi Kit (endofree, Qiagen) isoliert und in 50 μ l H₂O aufgenommen. Je zirka 200 ng Plasmid-DNA wurden zur Kontrolle mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut und in einem Agarosegel analysiert.

2.2.2.2 HEK293FT- und HeLa-Zellen

HEK293FT-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie; Invitrogen, R700-07): Die Zellen wurden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem mit 5 % CO₂ begasten Brutschrank gehalten. Als Medium diente DMEM (PAA Lab; + 10 % FCS, GibcoBRL). Die Zellen wurden bei 60 bis 80 % Konfluenz gesplittet. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und für ca. 30 Sek. lang 2 ml Trypsinlösung (GibcoBRL) auf die Zellen gegeben, welche anschließend für 5 Min. im Brutschrank inkubiert wurden. Die trypsinisierten Zellen wurden dann in frischem DMEM-Medium auf die benötigten Zellkulturschalen verteilt.

HeLa-Zellen: (humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie; ATCC, CCL-2, "Henrietta Lacks"): Diese Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, bis auf das hier verwendete MEM-Medium (PAA Lab.; + 10 % FCS, GibcoBRL)

Transfektion von HeLa- und HEK293FT-Zellen:

Die Zellen wurden entweder auf 12-mm Ø Deckgläsern in 35 mm Ø Kulturschalen für Immunfluoreszenzexperimente oder auf 100 mm Ø Kulturschalen für die Zellyse kultiviert. Bei mehr als 60 %iger Konfluenz erfolgte die Transfektion mit FuGene 6 Reagenz (Roche). Zur Pre-Komplexierung wurde die Plasmid-DNA in OPTI-MEM (GibcoBRL) verdünnt, dann mit FuGene Reagenz versetzt und für 15 Min. bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS und Zugabe von frischem serumfreien Medium, erfolgte die Transfektion durch Zugabe des DNA-FuGene-Komplexes. Die Volumina der einzelnen Komponenten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Kulturschale	Plasmid-DNA [µg]	OPTI-MEM [µl]	FuGene 6 [µl]	Gesamtvol. [µl]	Vol.: Medium [ml]
35 mm Ø	1	100	3	103	2
100 mm Ø	5,5	100	16,8	116,8	10

Zellyse:

Es wurden je 300 µl Lysepuffer (in GTP-Bindungs- oder Kinase-Lysepuffer, inkl. Proteaseinhibitor (Roche) n. Angaben des Herstellers; s. auch 2.2.5.6-7) auf 100 mm Ø Zellkulturschalen gegeben und 10 Min. auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 Min. bei 4 °C gerüttelt. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (10 Min., 14000 rpm, 4 °C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA in wässriger Lösung wurde im BioPhotometer (Eppendorf) über die Absorption bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde der Quotient $\text{Absorption}^{260\text{nm}}/\text{Absorption}^{280\text{nm}}$ bestimmt. Dabei entspricht ein OD bei 260nm ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA-Präparationen, Restriktionsverdaus (analytisch) und zur Isolierung von DNA-Fragmenten (präparativ) wurde die DNA in Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst, wobei die Konzentration des Agarosegels von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente abhing und zwischen 0,8 und 1,5 % betrug. Als Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Min. in Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration: 1 µg/ml; GibcoBRL) gebadet und die DNA-Fragmente unter UV-Licht untersucht. Analytische Gele wurden mit der *Gel-Cam* (Polaroid) fotografiert, bei präparativen Gelen wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell auf dem UVTransilluminator (Appligene) ausgeschnitten. und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend aus dem Agarosegel gelöst. Die DNA wurde in 50 µl H₂O eluiert.

2.2.3.3 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen des Typs II schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen 4 bis 8 bp langen Erkennungsstellen und erzeugen dabei entweder überhängende, kohäsive 5'- oder 3'- Enden oder stumpfe, nicht-kohäsive Enden. Es wurden 2 Units Restriktionsenzym für 1 Schnitt pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsverdau wurden nach Angaben des Herstellers (Roche) in einem Volumen von 20 bis 30 µl angesetzt. Der Restriktionsverdau wurde unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer- und Temperaturwahl) durchgeführt. Musste ein Restriktionsverdau mit zwei Enzymen durchgeführt werden, für die kein geeigneter gemeinsamer Reaktionspuffer existierte, wurde die Plasmid DNA in zwei Arbeitsschritten verdaut. Der erste Reaktionspuffer wurde durch Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Qiagen PCR "Purification" Kit entfernt.

2.2.3.4 Ligation

50 - 200 ng Vektor DNA wurden mit der dreifachen molaren Menge *Insert*-DNA in Ligationpuffer mit 1 Unit T4-DNA-Ligase (Invitrogen) nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 µl ligiert. Sowohl Ligationen mit kohäsiven als auch mit nicht-kohäsiven Enden wurden über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend komplett für die Transformation eingesetzt um den ligierten Vektor zu vervielfältigen.

2.2.3.5 Amplifikation der cDNA-Bibliotheken

Die kommerziell erhältlichen cDNA-Bibliotheken (*lung*, *mammary gland* Marathon-Ready cDNA; Clontech), sowie cDNA Klone (*brain* cDNA B12 und H5; ResGen und *fallopian tube* cDNA pINCY-A3) wurden mit dem Marathon-ReadyTM cDNA Amplification Kit in einer PCR nach den Angabe des Herstellers vervielfältigt. Anstelle der Primer des Kits wurden LRRK1-spezifische Primer (Abschnitt 2.1.7) verwendet. Das gewünschte PCR-Produkt wurde in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt und mit der TOPO-TA-Klonierung in den pCR[®]4-TOPO kloniert.

2.2.3.6 TOPO TA-Klonierung

Der Vektor pCR[®]4-TOPO (Invitrogen) liegt linearisiert vor und besitzt einen 3'-Desoxythymidin (T)-Überhang sowie eine kovalent gebundene Topoisomerase. Da Taq-DNA-Polymerase eine Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt, generiert sie einen 3'-Desoxyadenin (A)-Überhang des PCR-Produktes und erlaubt somit die effiziente Insertion des PCR-Produktes in den Vektor [96].

Gereinigte PCR-Produkte, die mit Pfu Turbo Polymerase (Invitrogen) amplifiziert worden sind, wurden mit 1 Unit Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen) für 15 Min. bei 72°C inkubiert, um einen 3'-Desoxyadenosin (A)-Überhang zu erzeugen. Die anschließende Ligation wurde über Nacht angesetzt und ansonsten, wie die Transformation in TOP10-Zellen, nach Angaben des Herstellers durchgeführt (TOPO-TA-Cloning Kit, Invitrogen). Die korrekte Orientierung des DNA-Inserts wurde mittels restriktionsenzymatischer Spaltung nachgewiesen und durch DNA-Sequenzierung beider Stränge bestätigt.

2.2.3.7 Mutagenese

Bei der gerichteten DNA-Mutagenese werden gezielt Sequenzveränderungen in eine DNA-Sequenz eingefügt [97]. Dies geschieht durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen der einzelnen Nukleotide oder DNA-Fragmente variabler Länge durch entsprechende synthetische Oligonukleotide. Beim QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) wird Pfu Turbo-DNA-Polymerase benutzt, um das komplette doppelsträngige zirkuläre Plasmid mit zwei komplementär zum gegenüberliegenden Strang liegenden Primern zu amplifizieren, die an eine beliebige Zielsequenz binden und die gewünschte Mutation tragen. Nach der Amplifikation wird das Plasmid mit *DpnI* enzymatisch gespalten. *DpnI* ist eine Endonuklease, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und somit nur das Ausgangsplasmid spaltet. Das mutierte Plasmid wird dann in XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und Mutageneseprimer gemäß Abschnitt 3.1.7 verwendet. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung beider Stränge bestätigt.

2.2.3.8 Kolonie-PCR

Nach TOPO-TA-Klonierungen, Ligationen und Mutagenesereaktionen wurden die erhaltenen *E.coli*-Kolonien mittels PCR-Analyse einer Vorauswahl unterzogen. Als DNA-Template dient in diesem Fall eine kleine undefinierte Menge der Bakterienkolonie, die in 20 µl High Fidelity PCR Mix (PCR-Programm nach Angaben des Herstellers, Invitrogen) gegeben wurde. Um die Zellen zu zerstören und die Plasmid-DNA freizusetzen, wurde das PCR-Programm mit einer 10 minütigen Inkubation bei 95 °C begonnen. Die eingesetzten Primer waren komplementär zur Insert-DNA und lagen in einem Abstand von zirka 500 bp, so dass ein Amplifikat entsprechender Größe in der Agarosegel-Analyse detektiert werden konnte. Nur aus Kolonien, die in diesem Schnelltest positiv abgeschnitten haben, wurde die Plasmid DNA für weitere Verwendungen isoliert.

2.2.3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode [98]. Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden DNA-Stranges, wobei es durch den Einbau von 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphaten (ddNTP) aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese kommt. Die DNA wird so in Fragmenten verschiedener Größe amplifiziert, die durch Kapillarelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Hierbei lassen sich Fragmente, die sich nur um ein einziges Nukleotid unterscheiden, voneinander trennen. Die Detektion der einzelnen Fragmente erfolgt über die Erkennung eines an die ddNTPs gekoppelten, fluoreszierenden Moleküls mit einem Laser-Scanning System.

Alle Sequenz-PCRs wurden mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 1.1 nach Herstellerangaben durchgeführt und im ABI PRISMTM 310 mit der Sequencing Analysis Software v3.7 (alle Komponenten von Applied Biosystems) sequenziert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Vector NTI Suite v9.0 Software (contig express, Invitrogen) verarbeitet und überlappende Fragmente zusammengefügt.

2.2.3.10 SOE-PCR

Die SOE-PCR (*spliced-overlap-extension*) dient zur Fusion zweier DNA-Fragmente, die um mindestens 30 bp überlappen [99]. Normalerweise werden dabei zunächst in einer ersten PCR die zwei überlappenden Fragmente aus Vektoren amplifiziert und isoliert. In einer zweiten PCR werden die Fragmente dann fusioniert. Dabei stellt der überlappende Bereich jeweils einen Primer-ähnlichen Polymerasestartpunkt dar. Von außen zu dem überlappenden Bereich hin startet die PCR an den hinzugefügten angelagerten Primer. So entsteht ab dem zweiten PCR-Zyklus ein Fusionsprodukt, das nun durch die außen liegenden Primer amplifiziert wird.

In dieser Arbeit wurden die beiden einzelnen PCR Ansätze in einer Reaktion zusammengefasst. Dafür wurden dem Reaktionsansatz die Vektoren mit der Template-DNA, ein gering konzentriertes „inneres“ Primerpaar, das in dem überlappenden Bereich liegt und ein normal konzentriertes „äußeres“ Primerpaar zugegeben. Auf diese Weise wurden in den ersten Zyklen die beiden einzelnen Fragmente produziert. Je mehr dieser Fragmente entstand, umso weniger war vom „inneren“ Primerpaar vorhanden, so dass schließlich eher die Überlappung von 500-1000 bp der Fragmente den Polymerisationskeim für die Fusions-PCR darstellte. Das entstandene Fusionsprodukt wurde schließlich mittels der „äußeren“ Primer amplifiziert. Die Reaktion wurde mit Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) durchgeführt.

Standard-Ansatz SOE-PCR:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge/Endkonzentration</i>
Ausgangsplasmid 1	50 ng
Ausgangsplasmid 2	50 ng
10x buffer	1x
MgSO ₄ (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,3 mM
Außen-Primer 1 (10 µM)	0,2 µM
Außen-Primer 2 (10 µM)	0,2 µM
Innen-Primer 1 (10 µM)	0,04 µM
Innen-Primer 2 (10 µM)	0,04 µM
H ₂ O	ad 50 µl
Pfx-Polymerase	1 Unit

<i>Zyklen</i>	<i>Programm</i>
1	5min 94°C
23	15sec 94°C
	15sec 50°C
	1min/kbp 68°C
1	7min 68°C
1	∞ 4°C

2.2.3.11 Klonierungsstrategie

Wegen der Größe des LRRK1 Transskripts von 6045 bp war es nicht möglich in einem Schritt ein komplettes Amplifikat aus der Brustdrüsen cDNA-Bibliotheken (Abschnitt 2.1.5) herzustellen. Stattdessen wurden zunächst vier überlappende Fragmente mit einer Größe von 1500 - 2500 bp synthetisiert, die dann in weiteren Schritten mittels SOE-PCR fusioniert wurden (s. Abb. 4). Die Überlappung der einzelnen Fragmente betrug 500 bzw. 1000 bp im letzten Fusionsschritt. Für die anschließende Klonierung der Gesamt-cDNA in Expressionsvektoren wurden am 5'-Ende eine *EcoRV*- und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle über die Primersequenzen eingefügt. Von dem pCMV-2xMyc-LRRK1-wt Konstrukt ausgehend wurden alle weiteren Konstrukte hergestellt (s. auch Abb. 7). Während der Klonierung wurden ungewollt drei stille Mutationen produziert: 2484 G->C (Val), 2505 G->A (Gln), and 2820 G->A (Arg).

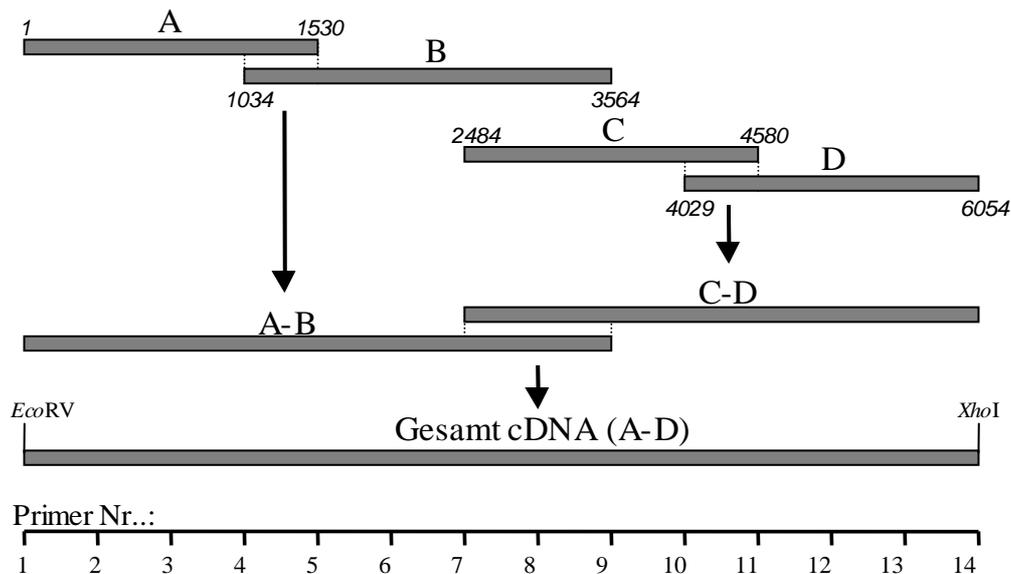


Abb. 4: Klonierungsstrategie der LRRK1-cDNA. Oben sind die primären cDNA-Amplifikate (A-D) als graue Balken dargestellt. In kursiv ist die Nummerierung der DNA-Sequenz gezeigt. Nach den ersten SOE-PCRs sind zwei Fragmente, A-B und C-D von je 3500 bp Länge, entstanden, die im letzten Fusionsschritt zur Gesamt-cDNA-Sequenz (A-D) mit den generierten Restriktionsschnittstellen, *EcoRV* und *XhoI*, führten. Unten ist die ungefähre Position der verwendeten Primer mit zirka 500 bp Abstand zueinander in Relation zur Gesamt-cDNA dargestellt.

2.2.4 RNA-Analysen

2.2.4.1 RNA-Präparation und reverse Transkription

HeLa-Zellen, die bis 60 – 80 % Konfluenz in 35 mm Ø Kulturschalen gewachsen waren, wurden mit dem RNeasy Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert und die RNA-Konzentration bestimmt.

Die reverse Transkription wurde mit der SuperScriptTM First-strand-synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. Es wurden 4 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers transkribiert und die entstandene cDNA bis zur Verwendung in der PCR bei –20 °C gelagert.

2.2.4.2 *real-time* PCR

Der LRRK1-mRNA Gehalt verschiedener Gewebe (RNA Präparationen zur Verfügung gestellt von Dr. Mennerich, Boehringer Ingelheim) oder von HeLa-Zellen (normal und nach siRNA-Behandlung) wurde mit quantitativer *real-time* PCR (TaqManTM) bestimmt [100]. Bei dieser Methode ist es möglich das Fortschreiten der PCR-Reaktion mittels einer Farbreaktion zu verfolgen. Dem Reaktionsgemisch zugesetzte Sonden bestehen aus kurzen DNA-Sequenzen, die an die Template-DNA binden und mit einem Reporterfarbstoff sowie einem Quencher-molekül versehen sind. Wird der Reporter bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, so emittiert er ein fluoreszierendes Signal, das auf Grund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt wird. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Polymerase wird die Sonde jedoch während der PCR abgebaut und das Signal des Reporterfarbstoffs freigesetzt, das nun gemessen werden kann.

Für LRRK1-spezifische Reaktionen wurde der Assay-on-demand und der TaqManTM Universal Master Mix (beides Applied Biosystems) für die PCR im ABI PRISMTM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) benutzt. Die Reaktionen wurden im DNA/RNA UV-Cleaner (UVP/T-ATR) nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Als interne Kontrolle wurde auch der mRNA-Gehalt des β -Aktins (Assay-on-demand, Applied Biosystems) bestimmt der dann zur Auswertung mit der Delta-Delta-Ct-Methode [101] herangezogen wurde. Außerdem wurde stets eine Kontrolle ohne cDNA mitgeführt, um die Reinheit der eingesetzten Reagenzien zu überprüfen.

2.2.4.3 Northern Blot

Herstellung der radioaktiven Sonde:

Zunächst wurde ein ca. 600 bp großes Fragment der LRRK1-cDNA mit den Primern 8 und 9 amplifiziert und als Template verwendet, um eine radioaktiv markierte DNA-Probe zu synthetisieren. Das PCR-Produkt wurde in einem 1.5 %igem präparativen Agarosegel isoliert und als Template-DNA in einer weiteren Polymerasereaktion eingesetzt. In dieser Reaktion wurde unter Verwendung von *random*-Primern und radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP nach den Angaben des Herstellers (Prime-It II Random Primer Labeling Kit, Stratagene) eine radioaktive Sonde generiert, die anschließend über NAP-5 Säulen (Amersham Biosciences) aufgereinigt (Entfernung des nicht eingebautem radioaktiven ATP) und mit 0,5 M NaOH für 30 Min. bei Raumtemperatur denaturiert wurde. Die spezifische Aktivität der radioaktiven Sonde wurde im Liquid Scintillation Counter 1410 (Wallac) ermittelt. Anschließend wurde die Sondenlösung mit Salmon-Testes-DNA (9,7 mg/ml; Sigma) versetzt und mit ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) verdünnt, so dass eine spezifische Aktivität von 1×10^6 cpm/ml und eine Endkonzentration 0,1 mg/ml Salmon-Testes-DNA entstand. Für die RNA-Ladungskontrolle wurde auf die gleiche Weise eine 500 bp Cyclophilin-H-spezifische Sonde generiert, die der kompletten mRNA-Sequenz entsprach. Cyclophiline sind konstitutiv exprimierte Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen, die die Faltung von Proteinen katalysieren [102].

Hybridisierung von Sonde und Blotmembran:

Die Blotmembranen (MTNTM Blots #7760-1 und #7766-1, Clontech) wurden in 10 ml der fertigen Sondenlösung in Hybridisierungsröhrchen (Schott) überführt, über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungsöfen HB-1000 (UVP) hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Blots 2x 10 Sek. bei RT und 2x für 20 Min. bei 68 °C im Wasserbad mit Waschpuffer1 und 1x mit Waschpuffer2 für 20 Min. bei 68 °C gewaschen. Anschließend wurden die Blots in Folie eingeschweißt und für 4 Tage auf einen Kodak MR X-ray Film in einer Filmkassette mit Verstärkerfolien bei -80 °C aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.2.5 Proteinchemische Arbeiten

2.2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford-Methode durchgeführt [103] bei der das Reduktionspotential von Proteinen mittels einer Farb-Redoxreaktion gemessen wird. Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe eines BSA-Standards erstellt. Dazu wurden aufsteigende BSA-Konzentrationen von 25µg/ml bis 400µg/ml in PBS aus einer 2 mg/ml-Stammlösung (Albumin Standard, Pierce) hergestellt und davon jeweils 3x 50 µl (Dreifachbestimmung) mit je 250 µl eines 1:40 Gemischs des BCATM Protein Assay Reagenz A und B (Pierce) versetzt und kurz durchmischt. Ebenso wurden je 3x 50 µl der zu analysierenden Proben behandelt. Nach ca. 30 Min. bei 37 °C wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Spektrometer (SLT Labinstruments Spectra) bestimmt und an Hand der generierten Eichgerade die Konzentration der Proteinprobe bestimmt.

2.2.5.2 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das NuPage-XCell SureLockTM Mini-Cell-System von Invitrogen benutzt. Dabei wandern denaturierte Proteine, die durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladene Partikel bilden, in einem Spannungsfeld größenabhängig durch das molekulare Netz von BisTris- bzw. TrisAcetat-Gelen (beide Invitrogen). Die Proteingemische wurden in Probenpuffer (Invitrogen) und 50 mM DTT für 10 Min. bei 65 °C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 200 V für 45 - 60 Min. in 1x MES oder TA-Puffer (beide Invitrogen).

2.2.5.3 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 (BioRad) färbt unspezifisch Proteine blau an. Gele mit Proben der Kinase-Experimente wurden ca. 30 Min. in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Das Gel wurde dann 1,5 Std. bei 80 °C unter Vakuum (Geltrockner, Hofer) getrocknet.

2.2.5.4 Western Blot

Die Western Blot Methode dient dem Transfer der in SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Invitrogen), um die Proteine anschließend mit Antikörpern zu detektieren. Hier wurde das NuPage XCell II™ Blot Modul (Invitrogen) verwendet, in dem das Gel in einer mit Blot-Puffer gefüllten Kammer auf die PVDF-Membran (Invitrogen) gedrückt wird. Nach 1 Std. bei 30 V Spannung bei 4 °C, wurde die PVDF Membran für 5 Min. mit Ponceau-S-Lösung (Fluka) gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung mit H₂O-bidest. abgespült und die Proteine erschienen als rötlich gefärbte Banden.

2.2.5.5 Antikörper-Inkubation und -Detektion

Die Blotmembran wurde nach dem Transfer der Proteine für 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4° C in 1x RotiBlock™ (Roth) geblockt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in 1x RotiBlock verdünnt (Abschnitt 2.1.3) für 1 Std. bei RT auf die Membran gegeben. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Min. mit TBS-T gewaschen und für 1 Std. bei RT mit dem sekundären, an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper (HRP, Amersham Biosciences, 1:4000 Verdünnung) in 1x RotiBlock inkubiert. Durch die Kopplung des sekundären Antikörpers an Meerrettichperoxidase konnte mit ECL-Reagenz (Amersham Biosciences) eine Chemolumineszenz hervorgerufen werden, die eine Schwärzung auf lichtempfindlichem Film während der Exposition in einer Autoradiographiekassette hervorrief. Dafür wurde die gewaschene Blotmembran für 1 Min. in 5 ml einer 1:20 Mischung der ECL™ Western Blot Detektion (Amersham Biosciences) inkubiert und die Blotmembran sofort nach dem Abtropfen einem ECL-Hyperfilm (Amersham Biosciences) exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem Curix 60 Filmentwickler (Agfa).

2.2.5.6 GTP-Bindungsexperimente

Die GTP-Bindungsexperimente wurden von Pirovani *et al.* [104] übernommen und leicht abgeändert. Die Lysate (in GTP-Bindungspuffer) transfizierter HEK293FT-Zellen wurden bei 15000 g für 10 Min. zentrifugiert und aliquotiert, so dass jeder Ansatz 100 µg-Protein enthielt. Zu jedem Ansatz wurde 30 µl GTP-Sepharose (Volumen der Sepharose, Sigma) gegeben, die zuvor in mit 100 µg/ml BSA (Perbio Science) in 1x RotiBlock (Roth) geblockt und anschließend in GTP-Bindungspuffer gewaschen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std. bei 4 °C wurde optional für eine weitere Stunde 2 mM GTP, GDP, ATP oder CTP zur kompetitiven Hemmung der Bindung an die GTP-Sepharose hinzugegeben. Dann wurden die Reaktionsansätze auf 0,65 µm Mikrozentrifugenfiltern (Millipore) geladen, 2x mit je 500 µl

GTP-Bindungspuffer gewaschen und jeweils kurz bei 0,8 g abzentrifugiert. Nach Zugabe von 25 µl eines 6:3:1 Gemischs von H₂O, SDS-Probenpuffer (NuPage, Invitrogen) und 500 mM DTT-Lösung auf die Säulen, wurde für 10 Min. bei 72 °C inkubiert, abzentrifugiert und die Proben in einer Western Blot-Analyse untersucht.

2.2.5.7 Kinase-Experimente

Die Lysate (in Kinase-Lysepuffer) transfizierter HEK293FT-Zellen wurden bei 100.000 g für 30 Min. zentrifugiert und derart aliquotiert, dass jeder Ansatz 2 mg Protein enthielt. Anschließend wurde die transient exprimierte LRRK1 durch Immunpräzipitation pelletiert. Dafür wurde Anti-Myc- (1:500, 9E10, Sigma) allein oder zusammen mit Anti-GFP-Antikörper(1:100, abcam) hinzugegeben und für 1 Std. bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl mit Kinase-Lysepuffer gewaschener Protein-G-Sepharose (Volumen der Sepharose, Sigma) und erneuter Inkubation für 1 Std. bei 4 °C, wurden die Reaktionsansätze auf 0,65 µm Mikrozentrifugenfilter (Millipore) geladen. Zunächst wurden diese 2x mit eiskaltem Kinase-Lysepuffer und 2x mit eiskaltem Kinase-Reaktionspuffer gewaschen und jeweils kurz bei 0,8 g abzentrifugiert. Beim dritten Waschschrift wurde dem Kinase-Reaktionspuffer GTP γ S oder GDP in der angegebenen Konzentration hinzugefügt, für 15 Min. inkubiert und kurz abzentrifugiert. Für die Kinasereaktion wurden je 30 µl Kinase-Reaktionspuffer (inkl. GTP γ S oder GDP) mit 3 µM ATP (Sigma) und 5µCi γ -³³P-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) versetzt und auf die Säulen gegeben. Nach einer Inkubation von 1,5 Std. bei 30 °C wurden 10 µl eines 4:1 Gemischs aus SDS-Probenpuffer (NuPage, Invitrogen) und 500 mM DTT-Lösung auf die Säulen gegeben, für 10 Min. bei 72 °C inkubiert und abzentrifugiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Die Intensität der Coomassie-Banden wurde mit ImageMaster TotalLab v2.01 (Amersham Biosciences) und die Intensität der radioaktiven Signale in mit einem PhosphorImager SI (Molecular Dynamics) bestimmt. Das radioaktive Hintergrundsignal des Gels wurde durch Messung eines Bereichs ohne radioaktive Bande ermittelt und von den Werten für die Banden subtrahiert. Der Quotient aus Hintergrundbereinigtem, radioaktivem Signal zu Bandenstärke ergab das spezifische radioaktive Signal der entsprechenden Bande.

2.2.6 RNAi *knock-down* und phänotypische Untersuchungen

2.2.6.1 RNAi *knock-down*

Die RNA-Interferenz oder kurz RNAi ist ein zelleigener Mechanismus, der Zellen gegen virale Infektionen schützt und die Expression von Genen beeinflussen kann. Dabei wird virale, in die Zelle eingeführte dsRNA oder zelleigene mRNA nach Anlagerung an 21-23 bp langen, komplementäre RNA-Molekülen (*micro-RNAs*) von einem zelleigenen Proteinkomplex abgebaut, wodurch schließlich die Proteinexpression gezielt gehemmt wird [105-107]. Man kann die Wirkung der zelleigenen miRNA auch durch synthetische, 21-23 bp langen siRNAs (*short interfering RNA*) erzielen, in dem man die Zellen mit diesen transfiziert. Auf diese Weise wird ein gezielt die Translation der mRNA eines Zielgens gehemmt und es können phänotypische Untersuchungen durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Funktion des betroffenen Gens führen.

Die siRNA-Nukleofektion der HeLa-Zellen wurde mit 0,6 - 1,8 μM LRRK1-spezifischer siRNA pro Ansatz mit dem Cell line Nucleofector[®] Kit R (Amaya, Programm B-28) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 24, 48 und 72 Std. wurde der mRNA- (*real-time* PCR, Abschnitt 2.2.4.2), sowie der Proteingehalt (Western Blot mit Anti-LRRK1-Antikörper) der LRRK1 überprüft.

siRNA#1 sense: 5'-GAAUCACUCACUGACUACtt-3'
antisense: 5'-GUAGUCAGUGAGUGAUUCCtg-3' (Ambion, Cat# 16704)

siRNA#2 sense: 5'-CAGAGAUUCUCCUUUAUAAUU-3'
antisense: 5'-PUAUAAAGGAAGAAUCUCUGUU-3' (Dharmacon, Cat# D005320-05, LRRK1).

siRNA-Negativkontrolle: Ambion (#1630).

2.2.6.2 Chemotaxismessung durch Wundheilungstests

Wundheilungstests wurden nach der von Nobes *et al.* [108] beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden siRNA-behandelte HeLa-Zellen auf Falcon Microtest[™] 96-Well Assay Plates (Black/Clear Bottom, TC Surface, Fisher Life Science) kultiviert und zu einem dichten Zellrasen wachsen gelassen. Anschließend wurde mit einer kleinen Pipettenspitze ein zirka 100 μm breiter Kanal in den Zellrasen gekratzt und die Zellkulturplatte auf den Mikroskopisch gestellt, der von einem Inkubator (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) umgeben war. Zur Analyse wurden Bereiche des verwundeten Zellrasens mit dem Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M, AxioVision Software v4.3) fokussiert und über ein Zeitspanne von 1 Std. alle 2 Min. eine Kontrastphasenaufnahme gemacht.

2.2.6.3 BrdU-Proliferationstest

Bei 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) handelt es sich um modifiziertes Uridin, das während der DNA-Synthese inkorporiert wird und anschließend durch Immunfluoreszenz mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden kann [109]. Auf diese Weise kann der Anteil sich teilender Zellen einer Kultur ermittelt werden.

HeLa-Zellen wurden auf Falcon Microtest™ 96-Well Assay Plate (Black/Clear Bottom, TC Surface, Fisher Life Science) kultiviert, bis eine Zellkonfluenz von 50 % ohne größere Zellagglomerationen erreicht ist. Anschließend wurde die Färbung der Zellen mit dem BrdU Labeling and Detection Kit I (Roche) und die Zellkern-Färbung mit 10 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit einem 10x Objektiv wurden 9 Ausschnitte (mit je 500 – 1000 Zellen) pro Well der Mikrotiterplatte mit dem HT-Imager (Molecular Devices) aufgenommen. Mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware MetaMorph (Molecular Devices) wird die Gesamtzellzahl (so genannte Hoechst-Färbung) und die Zahl der sich teilenden Zellen (BrdU-Färbung) pro Ausschnitt eines Wells ermittelt. Der gemittelte Quotient der BrdU- zur Hoechst-Färbung ergibt die Teilungsrate.

2.2.6.4 Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse

Zur Analyse des Zellzyklus einer Zelllinie misst den DNA Gehalt der Zellen. In der G1-Phase beträgt der DNA Gehalt 1N, in der G2/M Phase 2N, in der S-Phase liegt der Gehalt der DNA dazwischen. Der DNA-Gehalt wird über die Interkalation von Propidiumiodid in die DNA und die daraus resultierende Fluoreszenzstärke im FACS-Gerät bestimmt. Zur Zellzyklusmessung wurden 1×10^6 Zellen bei 1500 rpm abzentrifugiert und einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem (-20 °C) 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton resuspendiert und zum Fixieren über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Danach wurden die Zellen bei 1500 rpm abzentrifugiert, zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen, abdekantiert und in 5 ml PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Propidiumiodid-Färbelösung wurden die Proben mindestens 30 Min. 4 °C aufbewahrt. Die Messung der Propidiumiodid-Fluoreszenz erfolgte per FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*; FACSCalibur, Becton/Dickinson). Es wurden jeweils 9000 Ereignisse pro Ansatz gemessen und die Anzahl der erfassten Zellen gegen die Intensität der Färbung in einem Diagramm aufgetragen, so dass Peaks für Zellen mit 1 N und 2 N DNA entstanden. Der Bereich der Zellen in G2/M- und S-Phase wurde im Diagramm markiert und die zugehörige Zellzahl bestimmt. Der Quotient aus G2/M- und S-Phase-Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt den Anteil proliferierender Zellen.

2.2.6.5 Immunfluoreszenz-Färbung transfizierter Zellen

HeLa- oder HEK293FT-Zellen wurden auf 12 mm Deckgläschen (Roth) in 35 mm Ø Kulturplatten ausgesät und je nach Versuch mit Plasmid-DNA transfiziert oder mit siRNA behandelt. Nach 24 –72 Std. wurden die Deckgläschen entnommen und die Zellen wie folgt bei RT fixiert und gefärbt: kurz waschen in PBS; 15 Min. 3,7 % Formaldehyd in PBS zur Fixierung; 4 Min. in 0,5 % TX-100 in PBS zur Permeabilisierung (alternativ für γ -Tubulin-Färbungen: 6 Min. in vorgekühlten Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$); 10 Min. Waschen in PBS; 30 Min. Blockpuffer; 1 Std. primärer Antikörper in 1x RotiBlockTM; 10 Min. Waschen in PBS; 1 Std. sekundärer Antikörper in 1x RotiBlockTM inklusive Zellkern-Färbung (Hoechst-Färbung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst Reagenz); 10 Min. Waschen in PBS; 5 Min. Waschen in H₂O und Fixieren der Deckgläschen mit 3 μl MOWIOL 4-88-Lösung (Calbiochem) auf Objektträger. Wenn Antikörper gegen α - und γ -Tubulin (beides Maus-Antikörper) in einem Experiment verwendet wurden, dann wurde zunächst die erfolgte γ -Tubulin-Färbung mit einem Überschuss Biotin-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper-Fragment (Dianova) geblockt. Erst im nächsten Schritt wurden die Zellen mit α -Tubulin-Antikörper und in Gegenwart von Cy3-Streptavidin (Dianova; 1:50 Verdünnung), das an Biotin bindet, inkubiert. Der letzte Schritt entsprach wieder der oben beschriebenen Inkubation des sekundären Antikörpers mit Cy2-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop analysiert und fotografiert (Zeiss AxioVert 200M Fluoreszenz Mikroskop; AxioVision v4.3 Software).