

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bioinformatische Analyse für die Entwicklung experimenteller Ansätze

#### 3.1.1 Aufbau des LRRK1-Gens

Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Literatur, die Informationen über die LRRK1 (*leucine-rich repeat kinase 1*) enthielt. Im Laufe der Arbeit stellten dann Manning *et al.* LRRK1 als eine der 512 humanen Proteinkinasen vor und führten die Bezeichnung LRRK1 ein [110]. Das humane LRRK1-Gen liegt auf Chromosom 15 (15q26.3) und besteht aus insgesamt 36 Exons, die sich über eine Länge von über 200 kbp erstrecken. Der kodierende Bereich der LRRK1-mRNA (GenBank DQ013130) ist 6045 bp lang und wird vermutlich gewebespezifisch in unterschiedlichen Spleißvarianten transkribiert, wie die Analyse der Sequenzhomologiesuche mit BLAST (*basic local alignment search tool*) zeigen. Die gesammelten Sequenzdaten der *expressed sequence tags* (ESTs) und der genomischen DNA sind in Tabelle 1 im Anhang zusammengefasst. Folgende Variationen der LRRK1-Sequenz wurden durch den Vergleich der EST-Daten ermittelt: Eine 71 bp Duplikation (Basen 336-407 der gezeigten LRRK1-DNA im Anhang, Abb. 20) war in der cDNA dieser Arbeit, diversen Datenbank-ESTs und der von Manning *et al.* veröffentlichten LRRK1-Sequenz vorhanden, kommt aber nicht in der aktuellen genomischen humanen DNA (NCBI build35) vor. Des Weiteren enthält die von Manning *et al.* vorausgesagte DNA-Sequenz zwei Abschnitte, die nicht in EST-Datenbanken gefunden werden konnten und nicht in den Sequenzen klonierter cDNA aus Gehirn, Lunge und Brustdrüsengewebe vorkam. Diese Abschnitte umfassen ein Exon (Exon13, 83 bp), das für einen potentiellen, zusätzlichen *leucine-rich Repeat* (LRR) des Proteins kodiert und eine Verlängerung des Exon 16 (Verlängerung um 34 bp). Letzteres ist möglicherweise ein Artefakt, das bei der Vorhersage der DNA-Sequenz und der Spleißstellen durch Manning *et al.* entstanden ist, da diese Verlängerung nicht in den Sequenzen anderer ROCO-Proteine vorkommt und eine alternative, 34 bp *upstream* gelegene Spleißstelle nicht berücksichtigt wurde. Die EST-Daten deuten außerdem auf je ein Stop-Kodon in Exon 35 und 36 hin, von denen nach Spleißen der mRNA nur noch ein Exon translatiert werden kann (Tabelle 1). Beide Exons kodieren für den letzten der im C-Terminus vorhandenen WD-40-Repeats. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz und die Mehrzahl der gefundenen ESTs enthalten Exon 36.

### 3.1.2 Analyse der Primärstruktur des LRRK1-Proteins

Die in dieser Arbeit verwendete LRRK1-cDNA kodiert für ein Protein von 2014 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 225 kDa. Das LRRK1-Protein besteht aus 6 N-terminalen Ankyrin-Repeats (ANK), 14 *leucine-rich* Repeats (LRR), jeweils einer Roc- (*Ras of complex proteins*), COR- (*C-terminal of Roc*) und Kinasedomäne, sowie 7 WD-40-Repeats im C-Terminus (Abb. 5A).

Die mehrfach vorhandenen Domänen (Protein-Repeats) wurden in Sequenzalignments dargestellt und durch Vergleich gegen Konsensussequenzen aus der Literatur klassifiziert (Abb. 5B-D). So konnten die LRRs der LRRK1, die zur Gruppe „*typical LRRs*“ gehören [27], auf Grund eines konservierten Serins (Abb. 5C) einer Untergruppe von LRR-Proteinen zugeordnet werden, deren Mitglieder mit Ras-Proteinen interagieren [28].

Für WD-40-Repeats existiert auf Grund der hohen Variabilität der Aminosäuresequenzen keine eindeutige Konsensussequenz. Generell gilt jedoch, dass die Konservierung einzelner Aminosäuren zum C-Terminus innerhalb eines Repeats hin zunimmt [30], so dass sich die von Neer *et al.* veröffentlichte Tabelle einer Konsensussequenz lediglich über die letzten drei von vier  $\beta$ -Faltblättern erstreckt (Abb. 5E, [29]). Wegen dieser Variabilität waren die mit ClustalW errechneten Sequenzalignments zum Teil nicht aussagekräftig und mussten manuell korrigiert werden. Um dabei Fehler zu minimieren, wurden zusätzliche Sequenzen verwandter Proteine mit in die Analyse einbezogen. Folglich wurden die C-Termini von insgesamt 19 ROCO-Proteinen, sowie die Aminosäuresequenzen zweier  $\beta$ -Untereinheiten von G-Proteinen, die aus WD-40-Repeats bestehen, untersucht. Das so entstandene multiple Sequenzalignment (Abb. 5D und Abb. 22 im Anhang) zeigt für jedes der Proteine genau sieben Wiederholungen von je drei hydrophoben konservierten Blöcken, die typische Merkmale der WD-40-Konsensussequenz enthalten. Eine Sekundärstrukturvorhersage (PSI-PRED; [94]) sagt für diese Bereiche vorwiegend  $\beta$ -Faltblätter voraus, wie sie üblicherweise in WD-40-Repeats vorkommen.



### 3.1.3 Verwandtschaftsgrad zwischen ROCO-Proteinen veranschaulicht mit multiplen Sequenzalignments

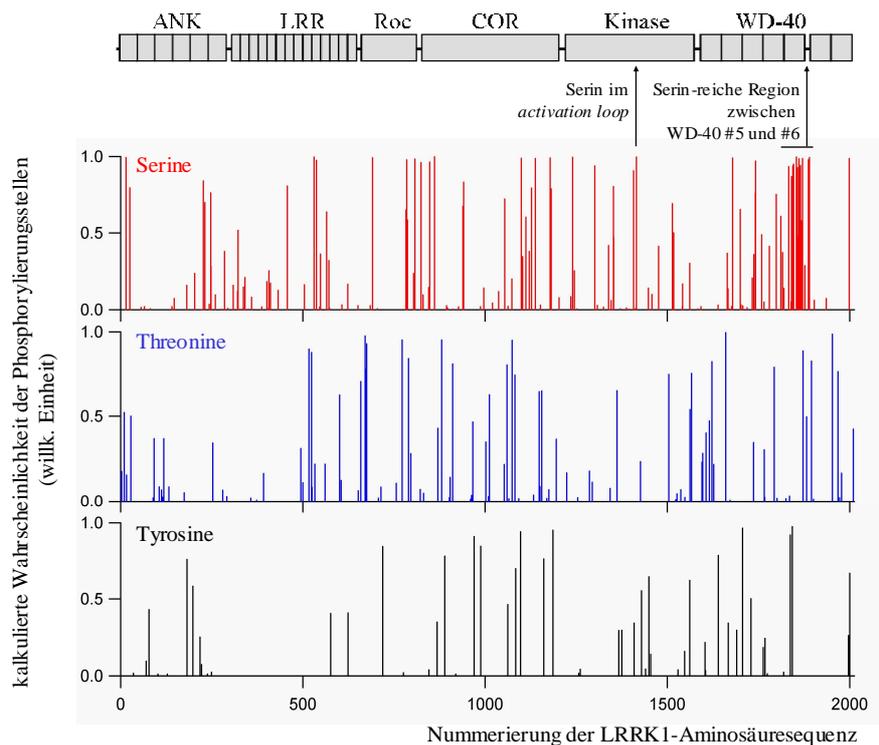
Das Fehlen jeglicher funktioneller Hinweise über LRRK1 zu Beginn dieser Arbeit warf die Frage auf, welche experimentellen Ansätze sinnvoll und effektiv zur Charakterisierung des Proteins beitragen könnten. Mittels Sequenzhomologiesuche mit BLAST und multiplen Sequenzalignments wurden folglich zunächst orthologe Proteine anderer Organismen identifiziert, die bereits in der Literatur beschrieben waren. Die auf diese Weise gesammelten Informationen stellen eine wichtige Grundlage für den experimentellen Aufbau dieser Arbeit dar, der jeweils in den betreffenden Abschnitten begründet wird.

Das multiple Sequenzalignment der orthologen Proteine ist im Anhang (Abb. 21) dargestellt und wurde im elektronischen Laborbuch der Schering AG abgespeichert (ELN, Juni 2003; Titel: *Bioinformatic investigation of the island domain and WD-40 repeats in the C-terminus*). Kurze Zeit später postulierte Bosgraaf *et al.* [1], dass die Roc-Domäne (*Ras of complex proteins*) eine Untergruppe der Ras-Proteine darstellt (s. auch Abb. 1-3 in der Einleitung). Da die multiplen Sequenzalignments von Bosgraaf *et al.* [1] mit denen in dieser Arbeit (Abb. 2 und 21) übereinstimmen, wurde die von Bosgraaf *et al.* publizierte Nomenklatur übernommen.

Die stark ausgeprägte Sequenzhomologie der ROCO-Proteine manifestiert sich in einer einheitlichen Proteindomänenarchitektur (Abb. 1), die sich über LRRs, Roc- und COR-Domäne erstreckt. Darüber hinaus enthalten LRRK-Typ-ROCO-Proteine typischerweise eine Proteinkinasedomäne und oft WD-40-Repeats. Der konservierte Bereich zwischen LRRK1 und der orthologen Proteine umfasst somit bis zu sechs unterschiedliche Proteindomänen. Besonders deutlich ist die Verwandtschaft in einigen Abschnitten der Primärstruktur zu erkennen. So kommen die in den LRRs der LRRK1 konservierten Serine (Abschnitt 3.1.2, Abb. 5C) und das in der Einleitung erwähnte Histidin (LRRK1-H757; Abschnitt 1.1.1. und Abb. 2) typischerweise in ROCO-Proteinen vor. Zudem enthalten alle bekannten ROCO-Proteinkinasen des LRRK-Typs aus mehrzelligen Organismen einen seltenen Phenylalanin-Tyrosin Austausch im *activation loop* der Kinasedomäne (DYG- anstelle eines DFG-Motifs, s. auch Abschnitt 1.1.3. und Abb. 13).

### 3.1.4 Vorhersage potentieller LRRK1-Phosphorylierungsstellen

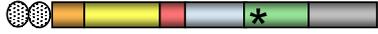
In Abschnitt 3.5 dieser Arbeit wird die Autophosphorylierungsaktivität der LRRK1 beschrieben. Da die Phosphorylierungsstelle(n) unbekannt sind, wurde eine NetPhos-Analyse (NetPhos-2.0-Server, [93]) der LRRK1-Aminosäuresequenz durchgeführt. Die NetPhos-Analyse beruht auf dem Vergleich von Aminosäuresequenzen gegen 25 Aminosäuren lange Phosphorylierungs-Konsensussequenzen jeweils spezifisch für Serine, Threonine oder Tyrosine. Die Konsensussequenzen selbst basieren auf den Aminosäuresequenzen bekannter Kinasesubstrate. Die Ergebnisse der LRRK1-NetPhos-Analyse sind in Abb. 6 in Kombination mit einer schematischen Darstellung der Proteindomänenstruktur gezeigt. Dabei entsprechen die Werte der X-Achse der Nummerierung der LRRK1-Aminosäuresequenz. Ein Serin innerhalb des *activation loops* der Kinasedomäne, sowie eine Serin-reiche Region innerhalb der WD-40-Repeats im C-Terminus (s. auch Abb. 20) sind besonders gekennzeichnet, da sie im Diskussionsteil der Arbeit erwähnt werden.



**Abb. 6:** Vorhersage potentieller LRRK1-Phosphorylierungsstellen. Die Ergebnisse der NetPhos-2.0-Analyse [93] für die LRRK1-Aminosäuresequenz sind in drei Diagrammen dargestellt (oben: Serine in rot; mitte: Threonine in blau; unten: Tyrosine in schwarz). Die Y-Achsen zeigen jeweils die kalkulierte Wahrscheinlichkeit der potentiellen Phosphorylierungsstellen auf einer Skala von 0 bis 1, wobei 1 die größte Wahrscheinlichkeit darstellt. Die Werte der X-Achse, die für alle drei Diagramme gilt, entsprechen der Nummerierung der LRRK1-Aminosäuresequenz. Ein Serin innerhalb des *activation loops* der Kinasedomäne, sowie eine Serin-reiche Region innerhalb der WD-40-Repeats im C-Terminus sind besonders mit Pfeilen gekennzeichnet, die auf deren Position in der schematisch dargestellten Proteindomänenarchitektur der LRRK1 (oben) weisen.

### 3.2 Klonierung der LRRK1-cDNA und Herstellung von Expressionskonstrukten

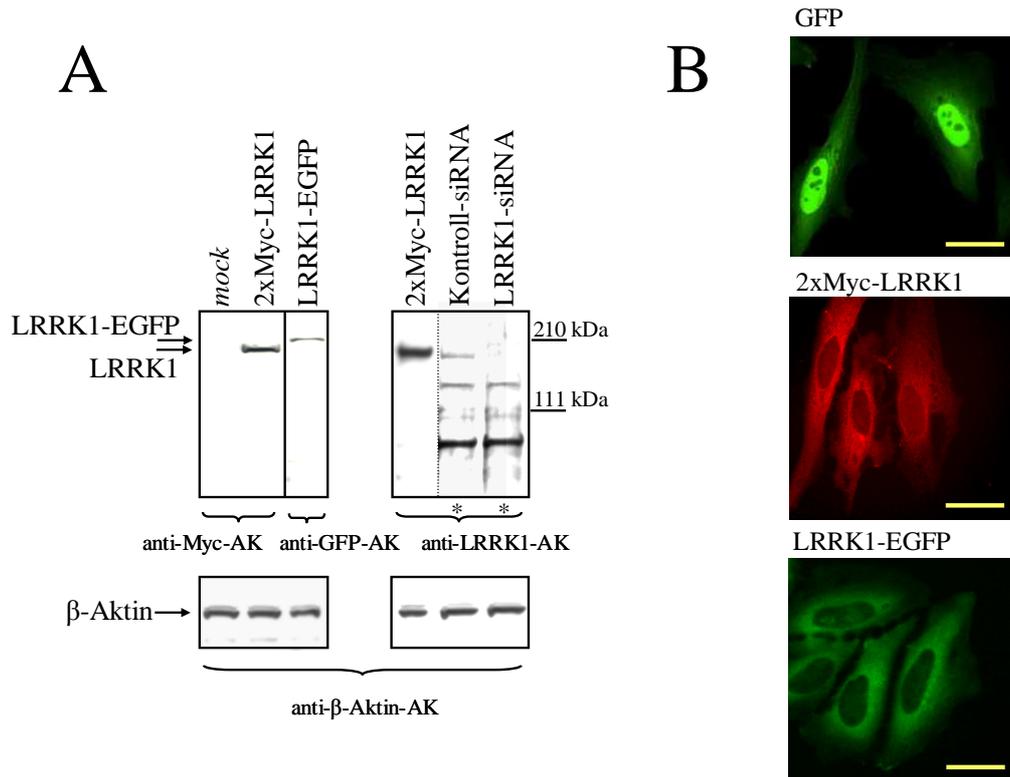
Die komplette Wildtyp-cDNA (dargestellt im Anhang Abb. 20; GenBank DQ013130) sowie einige Fragmente wurden in Expressionsvektoren kloniert. Außerdem wurden für einige Experimente gezielt Punktmutationen eingeführt. In diesem Abschnitt befindet sich eine vollständige Auflistung aller verwendeten Expressionskonstrukte, deren Zweck genauer in den zugehörigen Kapiteln erläutert wird.

Vektor	Bezeichnung des Inserts	Aufbau des Proteinprodukts
pCMV-2xmyc	LRRK1-wt	
	LRRK1-K1269W	
	LRRK1-K650A	
	LRRK1-ΔWD-40	
	LRRK1-ΔKinase-ΔWD-40	
	Roc-Domäne	
	LRRK1-K745C	
	LRRK1-K745G	
	LRRK1-F1021C	
	LRRK1-I1411T	
	pEGFP-N3 (EGFP-tag)	LRRK1-wt
LRRK1-K1269W		
pDEST27 (GST-tag)	Kinase-wt	
	Kinase-K1269W	
pcDNA3.2/V5-DEST (V5 tag)	Kinase-WD-40	

**Abb. 7:** Zusammenfassung aller verwendeten LRRK1-Expressionskonstrukte. Die Farbkodierung der Proteinprodukte entspricht der aus Abb. 5A. Protein-tags sind schwarz-weiß dargestellt: doppelter Myc-tag (gepunktet), EGFP-tag (längs gestreift), GST-tag (quer gestreift) und HA-tag (kariert). Der Ort der eingeführten Punktmutationen ist durch ein Sternsymbol gekennzeichnet.

### 3.3 Transient exprimierte LRRK1 ist im Cytosol lokalisiert

Transient und endogen exprimierte LRRK1 weisen eine Größe von zirka 200 kDa auf, wie durch Western Blot-Analyse mit Anti-Myc- und Anti-LRRK1-Antikörpern gezeigt werden konnte (Abb. 8A). Die Spezifität des aus Kaninchenserum gewonnenen Anti-LRRK1-Antikörpers, die sich gegen die Kinasedomäne richtet, konnte durch RNA-Interferenz vermittelten *knock-down* der endogenen LRRK1-Expression gezeigt werden.



**Abb. 8:** Transiente Expression der LRRK1. **A** In einer Western Blot-Analyse konnte transient exprimierte LRRK1 mit Anti-Myc- (N-terminaler 2xMyc-tag, Bahn 2 oben links) und Anti-GFP-Antikörper (C-terminaler EGFP-tag, Bahn 3 oben links) detektiert werden. Als Kontrolle wurde Cytosol nicht transfizierter Zellen eingesetzt (*mock*; Bahn 1). Der Anti-LRRK1-Antikörper erkennt sowohl transient (Bahn 1, oben rechts) als auch endogen exprimierte LRRK1 in HeLa-Zellen (Bahn 2, oben rechts; Transfektion mit Kontroll si-RNA ohne phänotypischen Effekt). RNA-Interferenz führte zu einem *knock-down* der endogenen LRRK1-Produktion (Bahn 3 oben rechts; \*: 20x längere Exposition des Films). β-Aktin dient als Ladungskontrolle der Western Blots (unten). **B** Transient exprimierte 2xMyc-LRRK1 (rot, mitte) und LRRK1-EGFP (grün, unten) sind ausschließlich im Cytosol vorhanden und die HeLa-Zellen zeigen eine normale Morphologie, wie die EGFP-Kontrolle (grün, oben) bestätigt. Gelber Balken: 10 μM; AK: Antikörper

Die unterschiedlichen *tags* hatten keinen Einfluss auf die ausschließlich cytosolische Lokalisation der transient exprimierten LRRK1 (Abb. 8B). Dies deutet darauf hin, dass durch Hinzufügen der verwendeten *tags* keine Signalpeptide in der LRRK1 Aminosäuresequenz maskiert wurden. Die verwendeten Zelllinien (HeLa und HEK293FT) zeigten bei der Expression der Wildtyp- (Abb. 8B) und mutierten LRRK1-K1269W (ohne Abbildung) eine normale Morphologie und die Transfektionsraten aller Konstrukte betragen 20-40%.

Zusammengefasst stellen HeLa- und HEK293-Zellen ideale Bedingungen zur Analyse transient exprimierter LRRK1 dar, da in beiden Zellsystemen große Mengen Protein hergestellt werden können, ohne die Vitalität der Zellen zu beeinflussen.

### 3.4 GTP-Bindungsaktivität der LRRK1

#### 3.4.1 LRRK1 bindet spezifisch GTP und GDP

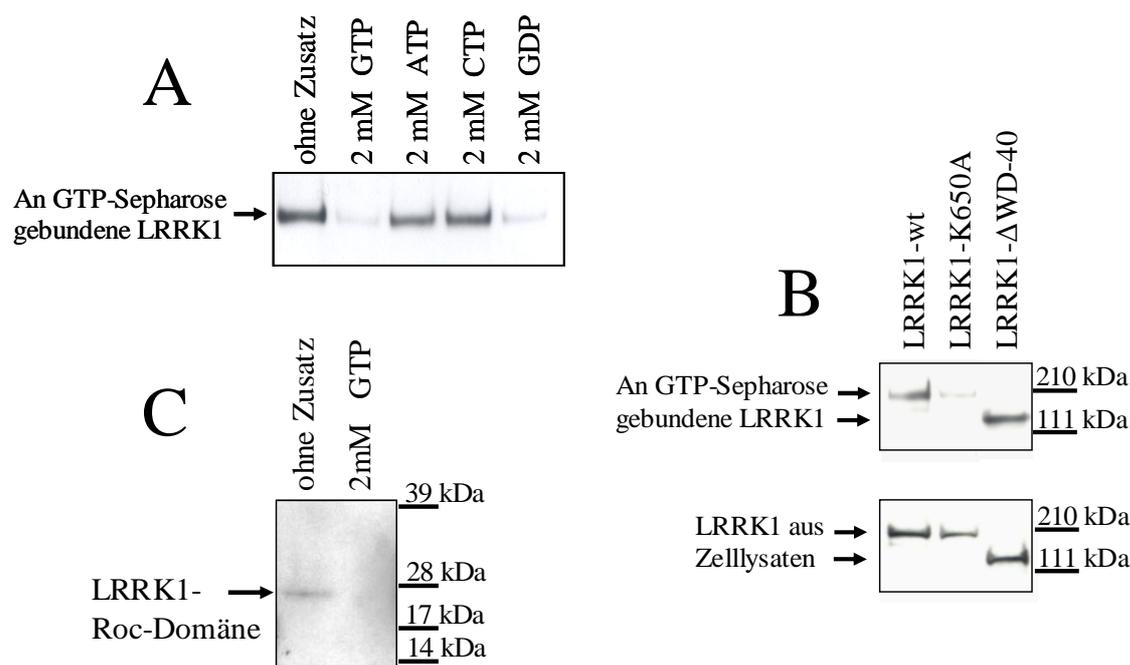
Für ROCO-Proteine wurde postuliert, dass ihre Roc-Domäne in Analogie zu kleinen GTPasen in der Lage sein könnte, Guanosinnukleotide zu binden [1]. In Proteinen der Ras-Gruppe wird jedoch ein wichtiger Beitrag der Affinität zu Nukleotiden durch das hochkonservierte NKxD-Motiv vermittelt [2, 8], das in Roc-Domänen einen Lysin-Histidin Austausch enthält (Abschnitt 1.1.1. und Abb. 2). Des Weiteren wird die Spezifität für Guanosin unter anderem durch das Alanin des SAK-Motivs vermittelt [2, 8], das in Roc-Domänen weniger deutlich konserviert ist (SCK in LRRK1; s. auch Abb. 2). Auf Grund dieser Unterschiede wurde überprüft, ob die LRRK1-Roc-Domäne spezifisch Guanosinnukleotide binden kann.

Um die Roc-Domäne der LRRK1 auf Bindungsaktivitäten zu testen, wurde Cytosol von HEK293FT-Zellen, die 2xMyc-LRRK1-wt produzieren, mit GTP-Sepharose inkubiert. LRRK1, die durch Bindung an GTP-Sepharose vom restlichen Cytosol isoliert werden konnte, wurde anschließend in einer Western Blot-Analyse mit einem Anti-Myc-Antikörper detektiert (Abb. 9A). Dass die gefundene Wechselwirkung der LRRK1 zwischen GTP und nicht der Sepharose stattfand, konnte durch Zugabe eines Überschusses an GTP während des Experiments gezeigt werden. Dabei wurde die bestehende Interaktion zwischen GTP-Sepharose und LRRK1 kompetitiv durch freies GTPs wieder aufgehoben.

Die Spezifität der Bindung wurde durch den Einsatz weiterer Nukleotide untersucht. Da GDP ebenfalls eine kompetitive Wirkung zeigt, muss LRRK1 auch GDP-Bindungsaktivität haben, die von der GTP-Bindungstasche vermittelt wird. Die Zugabe von ATP oder CTP zeigten hingegen keinen Effekt. Dadurch wurde die spezifische Affinität der LRRK1 zu den Guanosinnukleotiden GTP und GDP, wie sie auf Grund des Vergleichs zu kleinen GTPasen postuliert wurde, bestätigt.

#### 3.4.2 GTP bindet an die Roc-Domäne

In Analogie zu Proteinen der Ras-Gruppe sollte sich die GTP-Bindungstasche der ROCO-Proteine in der Roc-Domäne befinden. Demnach könnte eine Mutation in der Bindungstasche zum Verlust der GTP-Bindungsaktivität führen. Um dies zu testen, wurde ein Lysin zu Alanin Austausch (LRRK1-K650A) im *P-loop* (*phosphate-binding loop*) der putativen GTP-Bindungstasche eingeführt. Der *P-loop* kleiner GTPasen ist verantwortlich für die Komplexierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate der GTP-Moleküle [2, 8, 111].



**Abb. 9:** Die LRRK1-Roc-Domäne bindet spezifisch Guanosinnukleotide. Es wurden jeweils äquivalente Mengen des Cytosols transfizierter HEK293FT-Zellen mit GTP-Sepharose versetzt. LRRK1 bzw. Fragmente, die an die GTP-Sepharose gebunden waren, wurden mit Anti-Myc-Antikörper im Western Blot detektiert. **A** LRRK1-wt war an GTP-Sepharose gebunden (Bahn 1) und diese Bindung konnte kompetitiv durch Zugabe von 2 mM GTP oder GDP (Bahn 2 bzw. 5) unterbunden werden. 2 mM ATP oder CTP erzeugten keine kompetitive Verdrängung (Bahn 3 und 4). **B** LRRK1-K650A war nicht in der Lage GTP-Sepharose zu binden im Vergleich zu LRRK1-wt (Bahn 2 und 1, oben) oder der Deletionsmutante LRRK1-ΔWD-40 (Bahn 3, oben). Unten sind die Expressionkontrollen der Konstrukte gezeigt. **C** Die Bindung zwischen Roc-Domäne (ca. 27 kDa; Bahn 1) und GTP-Sepharose konnte kompetitiv durch 2 mM GTP (Bahn 2) unterbunden werden.

Im oben erwähnten Bindungs- und Konkurrenzexperiment konnte LRRK1-K650A nicht durch Bindung an GTP-Sepharose isoliert werden (Abb. 9B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Roc-Domäne die GTP-Bindungstasche enthält.

Eine Bestätigung dieser Annahme sollte durch Bindung der transient exprimierten, 27 kDa großen Roc-Domäne an GTP-Sepharose erreicht werden. Allerdings konnten nur geringe Mengen der Roc-Domäne produziert werden, so dass ein direkter Nachweis der Expression durch Western Blot-Analyse nicht realisierbar war. Dennoch konnte nach Anreicherung durch GTP-Sepharose eine Bande mit der theoretisch erwarteten Größe von ca. 27 kDa der Roc-Domäne detektiert werden (Abb. 9C). In diesem Versuch konnte die Interaktion ebenfalls durch Zugabe eines GTP-Überschusses kompetitiv unterbunden werden.

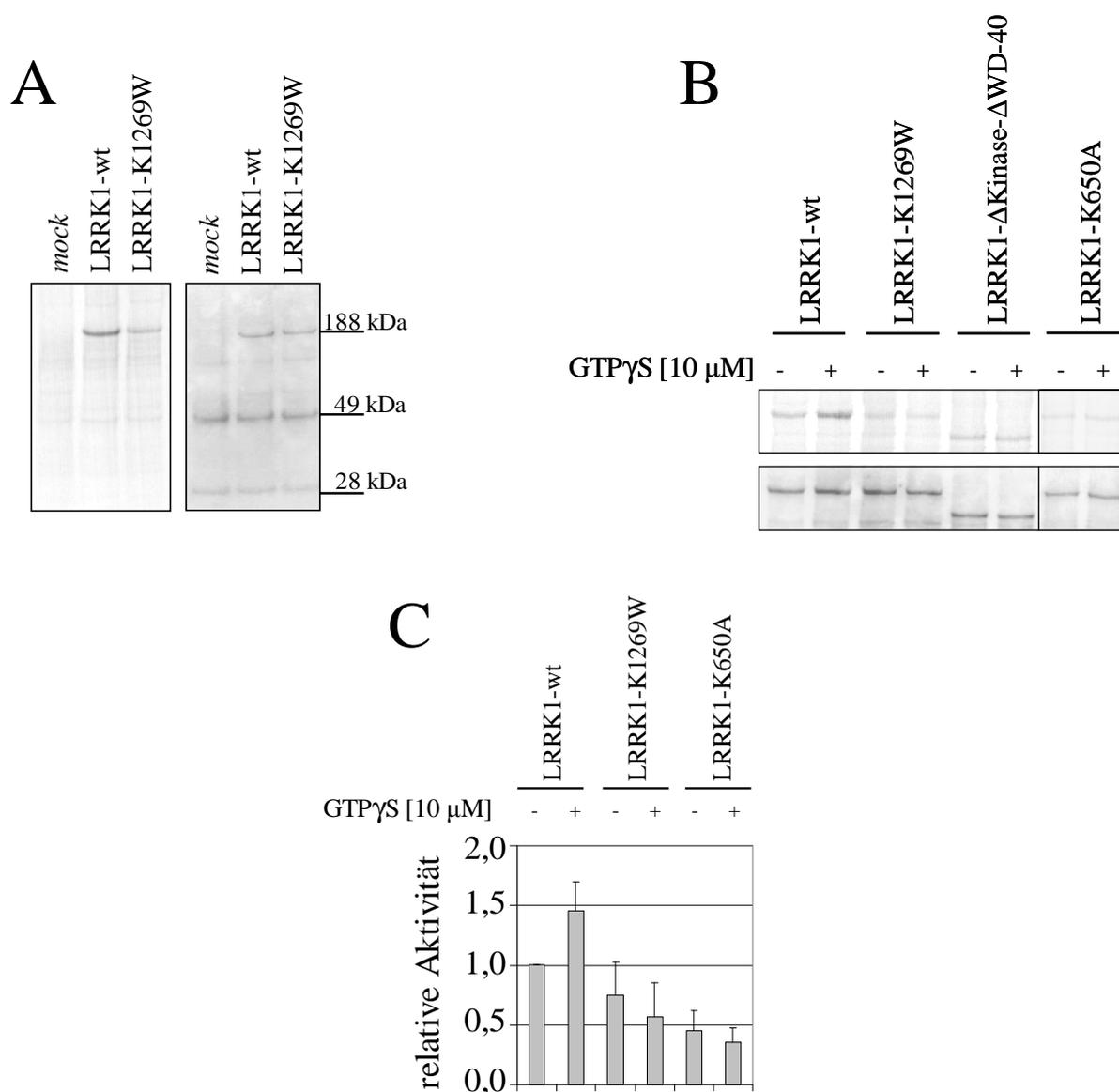
Die Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40, die in Abschnitt 3.5.6 behandelt wird, wurde ebenfalls auf ihre GTP-Bindungsaktivität geprüft. LRRK1- $\Delta$ WD-40, dem die C-terminalen 5 $\frac{1}{2}$  WD-40-Repeats fehlen, war in der Lage an GTP-Agarose zu binden, wie der Vergleich gegen die LRRK1-K650A-Negativkontrolle zeigt. (Abb. 15 B). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem GTP-Bindungsverhalten kleiner GTPasen, die ebenfalls keine zusätzlichen Faktoren für die Bindung benötigen.

### **3.5 GTP-abhängige *cis*-Autophosphorylierung der LRRK1**

#### **3.5.1 Autophosphorylierungsaktivität der LRRK1**

Die Primärstruktur der LRRK1-Kinasedomäne enthält alle für die ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse notwendigen Motive [34-37]. Eine Besonderheit ist jedoch der in LRRK1 vorhandene Austausch von Phenylalanin zu Tyrosin im DFG-Motiv (DYG in LRRK1) im *activation loop* der Kinasedomäne (s. Abschnitt 1.1.3). Obwohl das Phenylalanin eine wichtige Rolle im Aufbau der ATP-Bindungstasche spielt [112], können Kinasen mit einem DYG-Motiv aktiv sein, wie im Fall der Proteinkinase-C-iota [113].

Für die Kinase-Experimente wurde transient exprimierte 2xMyc-LRRK1-wt mittels Immunpräzipitation mit Anti-Myc-Antikörper aufgereinigt und in Gegenwart von  $^{33}\text{P}$ -ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proteine des Reaktionsansatzes per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel getrocknet. Die radioaktive Bande der LRRK1-wt deutet auf eine Autophosphorylierungsaktivität hin (Abb. 10A). Durch Einführen einer Punktmutation in die ATP-Bindungstasche der LRRK1 (LRRK1-K1269W) wurde eine Mutante generiert, die nicht mehr in der Lage sein sollte ATP koordinativ zu binden [37]. Im Experiment bestätigte sich diese Annahme, da die Autophosphorylierung sichtbar verringert war. Somit war gezeigt, dass LRRK1 eine aktive Kinase ist, die sich selbst phosphoryliert. Handelsübliche Kinasesubstrate, wie MBP (*myelin basic protein*), Casein oder Histon H1 wurden in Gegenwart der LRRK1-wt nicht phosphoryliert (ohne Abbildung).



**Abb. 10:** LRRK1-Autophosphorylierung wird durch GTP stimuliert. Kinase-Experimente wurden mit transient exprimierter, immunpräzipitierter 2xMyc-LRRK1 aus HEK293FT-Zellen durchgeführt. **A** Ein Autoradiogramm (links) mit dem zugehörigen SDS-Gel (rechts) zeigt Autophosphorylierungsaktivität der LRRK1. Bahn 1: Transfektions-Negativkontrolle mit Leervektor (*mock*); Bahn 2: autophosphorylierte LRRK1-wt; Bahn 3: verminderte Autophosphorylierung der LRRK1-K1269W-Negativkontrolle. **B** Die Autophosphorylierung der 2xMyc-LRRK1-wt und -Mutanten wurde in Abwesenheit und Gegenwart von 10 μM GTPγS gemessen. Das Autoradiogramm (oben) zeigt die Aktivierung der LRRK1-wt, nicht aber von LRRK1-K1269W, LRRK1-ΔKinase-ΔWD-40 und LRRK1-K650A. Unten ist das zugehörige SDS-Gel abgebildet. **C** Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten zeigt die Aktivierbarkeit der LRRK1-wt durch GTPγS, die bei LRRK1-K1269W und LRRK1-K650A ausbleibt. Die Y-Achse zeigt die relative Aktivierung der Autophosphorylierung im Bezug auf den Wert der LRRK1-wt ohne Zusatz von GTPγS.

### 3.5.2 LRRK1-Kinaseaktivität wird durch GTP stimuliert

Kleine GTPasen werden durch GTP-Bindung aktiviert und stimulieren in dieser Form *downstream effector* Proteine. In diesem Teil der Arbeit wurde versucht eine ähnliche Beziehung zwischen der in Abschnitt 3.4 beschriebenen GTP-Bindung und der oben gezeigten Autophosphorylierung nachzuweisen. Folglich wurde die Kinaseaktivität der LRRK1-wt und -K1269W in Ab- und Anwesenheit von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S, einem nicht hydrolysierbaren Derivat des GTPs mit gleicher Wirkung, überprüft. Zusätzlich wurde die Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ Kinase- $\Delta$ WD-40, die keine Kinasedomäne enthält, benutzt um die Stärke des unspezifischen Hintergrundsignals zu bestimmen.

LRRK1-wt wies eine deutliche Steigerung der Autophosphorylierung durch GTP $\gamma$ S auf, wohingegen die Mutanten keinen Effekt zeigten (Abb. 10B-C). Dies bestätigt die Kinaseaktivität der LRRK1-wt und deutet auf eine funktionelle Verbindung zwischen Roc- und Kinasedomäne hin. Die mutierte Kinasedomäne der LRRK1-K1269W konnte nicht stimuliert werden und produzierte Signale, die mit denen der Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ Kinase- $\Delta$ WD-40 vergleichbar waren. Da diese Deletionsmutante jedoch keine Kinasedomäne enthielt, entsprach die Intensität der radioaktiven Banden der Mutanten dem Hintergrundsignal des Experiments.

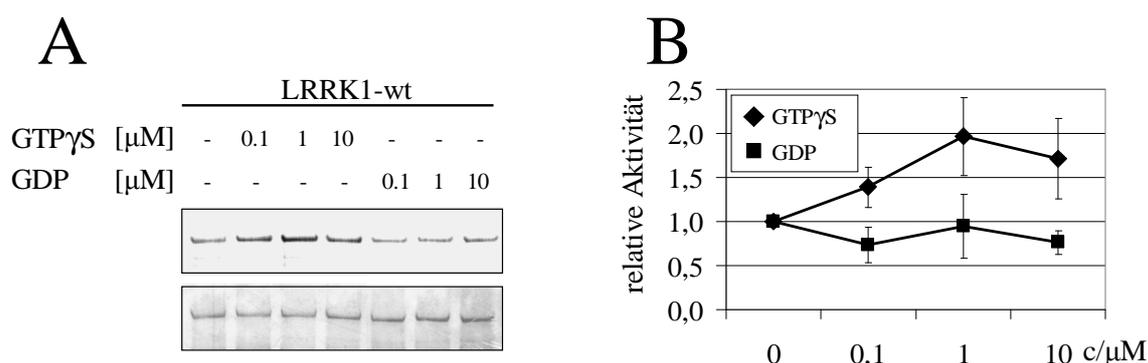
### 3.5.3 LRRK1-K650A zeigt keine Autophosphorylierungsaktivität

Sollte die GTP-Bindung tatsächlich zur Stimulierung der Kinaseaktivität führen, müsste sich die fehlende GTP-Bindungsaktivität der LRRK1-K650A in den Kinase-Experimenten widerspiegeln.

Obwohl die Kinasedomäne selbst keine Mutation enthielt, zeigte LRRK1-K650A, die kein GTP binden kann, eine deutlich reduzierte Autophosphorylierungsrate. Die Signale waren vergleichbar mit denen der Kinase-inaktiven LRRK1-K1269W (Abb. 10B-C). Außerdem erzeugte die Zugabe von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S keine Stimulation der LRRK1-K650A Kinaseaktivität. Somit konnte die funktionelle Verbindung zwischen GTP-Bindung und Kinaseaktivität durch die Experimente mit LRRK1-K650A bestätigt werden.

### 3.5.4 LRRK1-Kinaseaktivität wird selektiv durch GTP stimuliert

Analog zum Aktivierungsmechanismus kleiner GTPasen könnten GTP und GDP einen unterschiedlichen Effekt auf LRRK1 ausüben. Folglich wurden GTP $\gamma$ S und GDP in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 - 10  $\mu$ M Endkonzentration) zu den Kinase-Experimenten gegeben. GTP $\gamma$ S führte dabei zu einer dosisabhängigen Steigerung der Autophosphorylierung mit einem Sättigungspunkt im Bereich von 1  $\mu$ M (Abb. 11). GDP hingegen führten zu keiner Stimulation.



**Abb. 11:** LRRK1-Autophosphorylierung wird selektiv durch GTP stimuliert. Kinase-Experimente wurden mit transient exprimierter, immunpräzipitierter 2xMyc-LRRK1-wt aus HEK293FT-Zellen durchgeführt. **A** Die Autophosphorylierung der LRRK1-wt wurde in Gegenwart verschiedener GTP $\gamma$ S- oder GDP-Konzentrationen (0,1 - 10  $\mu$ M) gemessen. Das Autoradiogramm (oben) zeigt eine dosisabhängige Aktivierung durch GTP $\gamma$ S, die nicht durch GDP erreicht wurde. Unten ist das zugehörige SDS-Gel gezeigt. **B** Die Quantifizierung von vier unabhängigen Experimenten zeigt die GTP $\gamma$ S( $\blacklozenge$ )-Stimulation im Vergleich zu dem ausbleibenden Effekt von GDP ( $\blacksquare$ ). Die Y-Achse zeigt die relative Aktivierung der Autophosphorylierung im Bezug auf den wt-LRRK1-Wert ohne Zusatz von GTP $\gamma$ S. Die X-Achse bilden die unterschiedlichen GTP $\gamma$ S- bzw. GDP-Konzentrationen ab.

### 3.5.5 Die LRRK1-Autophosphorylierung findet intramolekular statt

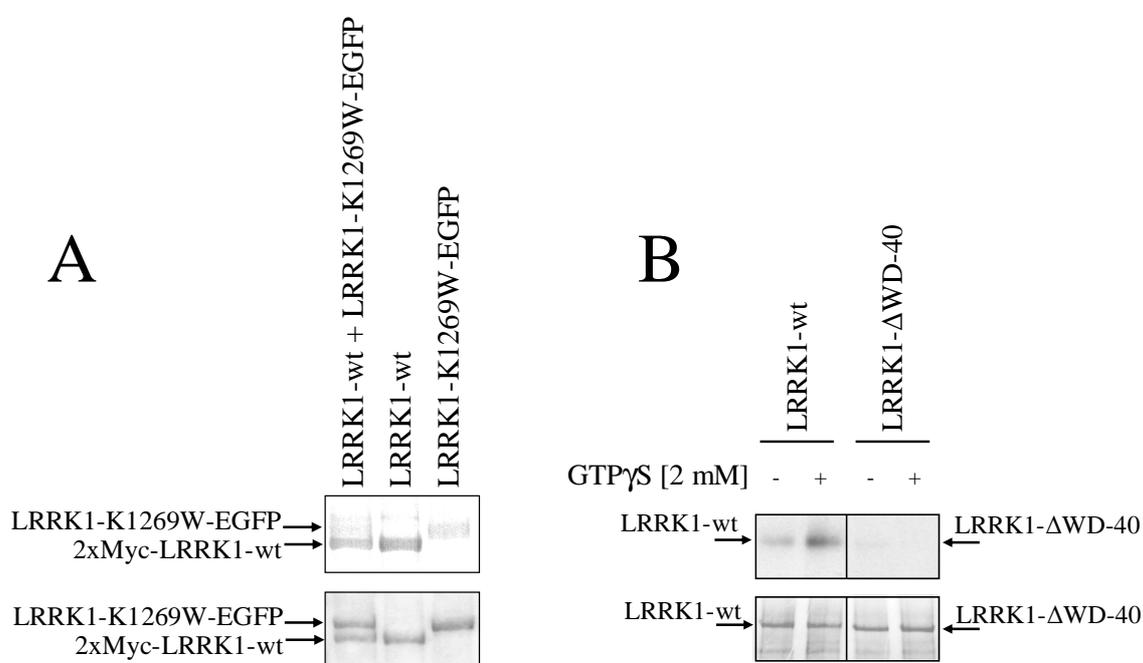
Eine Autophosphorylierung kann prinzipiell intra- oder intermolekular (in *cis* oder in *trans*) stattfinden. Um den Modus der LRRK1-Autophosphorylierung zu untersuchen wurde die Kinase-inaktive LRRK1-K1269W als Substrat für LRRK1-wt eingesetzt. Die Auftrennung beider Proteine im SDS-Gel wurde durch einen an LRRK1-K1269W angefügten EGFP-tag (zusätzliche 27 kDa) ermöglicht (Abb. 7). Nach Kotransfektion der Expressionskonstrukte wurde die Immunpräzipitation aller Ansätze simultan mit Anti-Myc- und Anti-GFP-Antikörpern durchgeführt.

LRRK1-wt war in der Lage sich selbst, nicht aber LRRK1-K1269W-EGFP zu phosphorylieren (Abb. 12A). Dieses Ergebnis deutet auf einen intramolekularen (*cis*) Autophosphorylierungsmechanismus hin.

### 3.5.6 Deletion der WD-40-Repeats führt zum Verlust der Autophosphorylierungsaktivität

Die WD-40-Repeats in LRRK1 enthalten einen Bereich mit vielen Serinen (Aminosäuren 1839 – 1890; s. Abb. 20), der eine Autophosphorylierungsstelle beinhalten könnte (s. auch Abschnitt 3.1.4). Um erste Hinweise über die Funktion des C-Terminus zu erhalten, wurde die Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40 in Kinase-Experimenten eingesetzt.

Es stellte sich heraus, dass durch die Deletion keine Autophosphorylierung mehr möglich war (Abb. 12B). Trotz intakter GTP-Bindung (s. Abschnitt 3.4.2 und Abb. 9C) wurde darüber hinaus keine Stimulation durch Zugabe von 2 mM GTP $\gamma$ S erreicht.

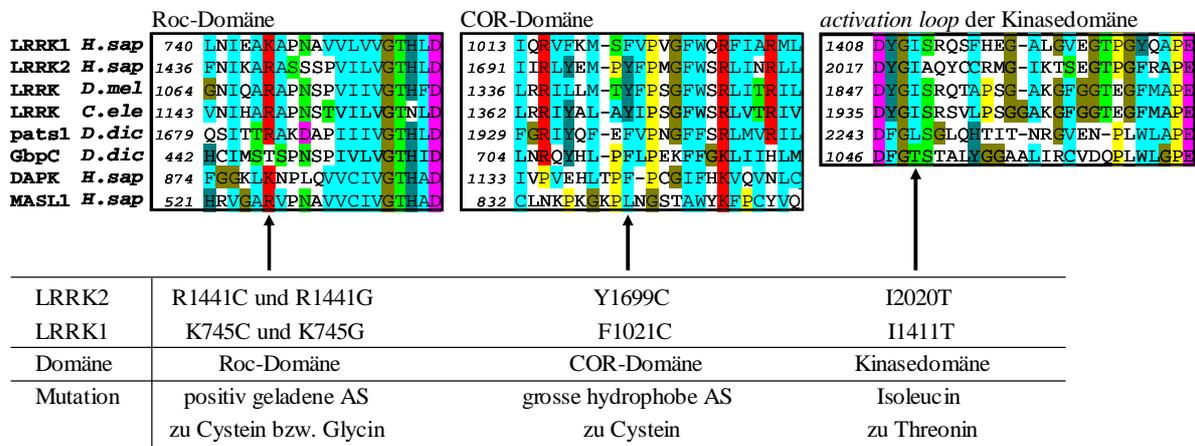


**Abb. 12:** *cis*-Autophosphorylierung und Inaktivität der Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40. Kinase-Experimente wurden mit transient exprimierter, immunopräzipitierter LRRK1 aus HEK293FT-Zellen durchgeführt. Oben sind jeweils die Autoradiogramme und unten die zugehörigen SDS-Gele dargestellt. **A** Im Tris-Acetat-Gel läuft die EGFP-getaggte LRRK1-K1269W oberhalb der 2xMyc-LRRK1-wt. 2xMyc-LRRK1-wt phosphoryliert sich selbst, aber nicht kotransfizierte Kinase-inaktive LRRK1-K1269W-EGFP (Bahn1). Bahn 2 und 3 zeigen Kontrollexperimente mit aktiver 2xMyc-LRRK1-wt und inaktiver LRRK1-K1269W-EGFP. Die Immunpräzipitationen wurden jeweils gemeinsam mit Anti-Myc- und Anti-GFP-Antikörpern durchgeführt. **B** Die Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40 wird im Gegensatz zu LRRK1-wt nicht autophosphoryliert. Trotz intakter GTP-Bindungsaktivität (s. Abschnitt 3.4.2) kann keine Stimulation durch Zugabe von 2 mM GTP $\gamma$ S erreicht werden. Im verwendeten 4-12% BisTris SDS-Gel wird der Größenunterschied zwischen LRRK1-wt und der Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40 nur geringfügig sichtbar.

### 3.6 Effekte von Parkinson-verursachenden LRRK2 Mutationen in LRRK1

#### 3.6.1 Die Bereiche der LRRK2-Mutationen sind konserviert in LRRK1

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden fünf Mutationen in dem Gen der *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2) gefunden, die mit einer autosomal vererbten Form des *late-onset* Parkinson koregrieren [50-65]. Die beschriebenen Mutationen konzentrieren sich nicht auf einen Bereich des Proteins, sondern sind verteilt über LRRs, Roc-, COR- und Kinasedomäne. Auf Grund der überaus deutlichen Sequenzhomologie zu LRRK2 stellt transient exprimierte LRRK1 ein Modellsystem dar, um mögliche Effekte der LRRK2-Mutationen zu untersuchen. Folglich wurden ausgewählte LRRK2-analoge Mutationen in LRRK1 eingeführt und experimentell auf Kinaseaktivität und GTP-Bindung untersucht. Ein Überblick der generierten LRRK1-Mutanten inklusive einer kurzen Beschreibung wird in Abbildung 13 gezeigt. Nicht untersucht wurde eine LRRK2-Mutation (I1122V, [64]), die sich innerhalb der LRRs befindet, da keine eindeutige Zuordnung in LRRK1 möglich war. Außerdem konnten weitere LRRK2-Mutationen (R1441H [114, 115] und G2019S [51, 55, 60, 67]) nicht berücksichtigt werden, da sie erst gegen Ende dieser Arbeit publiziert worden sind.



**Abb. 13:** Konservierung der Parkinson-assoziierten LRRK2-Mutationen in ROCO-Proteinen. Drei Ausschnitte eines Sequenzalignments diverser ROCO-Proteine zeigen jeweils einen Teil der Roc-, der COR- und Kinasedomäne. Im letzten Ausschnitt sind die Sequenzen der DAPK1, die im Gegensatz zu anderen ROCO-Proteinen eine N-Terminale Kinasedomäne enthält, und des MASL1-Proteins, das keine Kinasedomäne enthält, ausgelassen. Links sind Protein, Organismus und Aminosäurenummerierung angezeigt. In der unten gezeigten Tabelle sind jeweils die LRRK2-Mutationen und die analogen LRRK1-Mutationen mit einer kurzen Beschreibung der Mutation aufgeführt. Die Pfeile über den Tabelleneinträgen weisen auf den betreffenden Bereich des multiplen Sequenzalignments. AS: Aminosäure *H. sap.*: *H. sapiens*; *C. ele.*: *C. elegans*; *D. mel.*: *D. melanogaster*; *D. disc.*: *D. discoideum*; DAPK1: *death-associated protein kinase 1*; MASL1: *malignant fibrous histiocytoma-amplified sequences with leucine-rich tandem repeat 1*

### 3.6.2 LRRK2-analoge Mutationen in LRRK1 beeinflussen die GTP-Bindung nicht

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen LRRK1-Mutanten wurden auf ihre GTP-Bindungsaktivität (s. auch Abschnitt 3.4) untersucht. Keine der Mutanten wies jedoch eine veränderte Bindung an die GTP-Sepharose auf (Abb. 14A). Dies ist insbesondere erwähnenswert für LRRK1-K745C und -K745G, die jeweils eine Punktmutation in der Roc-Domäne enthalten.

Da G-Domänen-Proteine eine definierte Struktur entfalten (s. auch Abschnitt 1.1.1) und eine hohe Sequenzhomologie zwischen H-Ras und der LRRK1-Roc-Domäne besteht (66,7% Konsensuspositionen, berechnet mit AlignX/Vector-NTI), sollten die einzelnen Sequenzmotive beider Proteine eine ähnliche Position in ihrer dreidimensionalen Struktur einnehmen. Mit dieser Annahme wird erkennbar, dass die Mutationen in LRRK1-K745C/G räumlich getrennt von der GTP-Bindungstasche liegen und möglicherweise deshalb die GTP-Bindungsaktivität nicht beeinflussen (Abb. 14B).

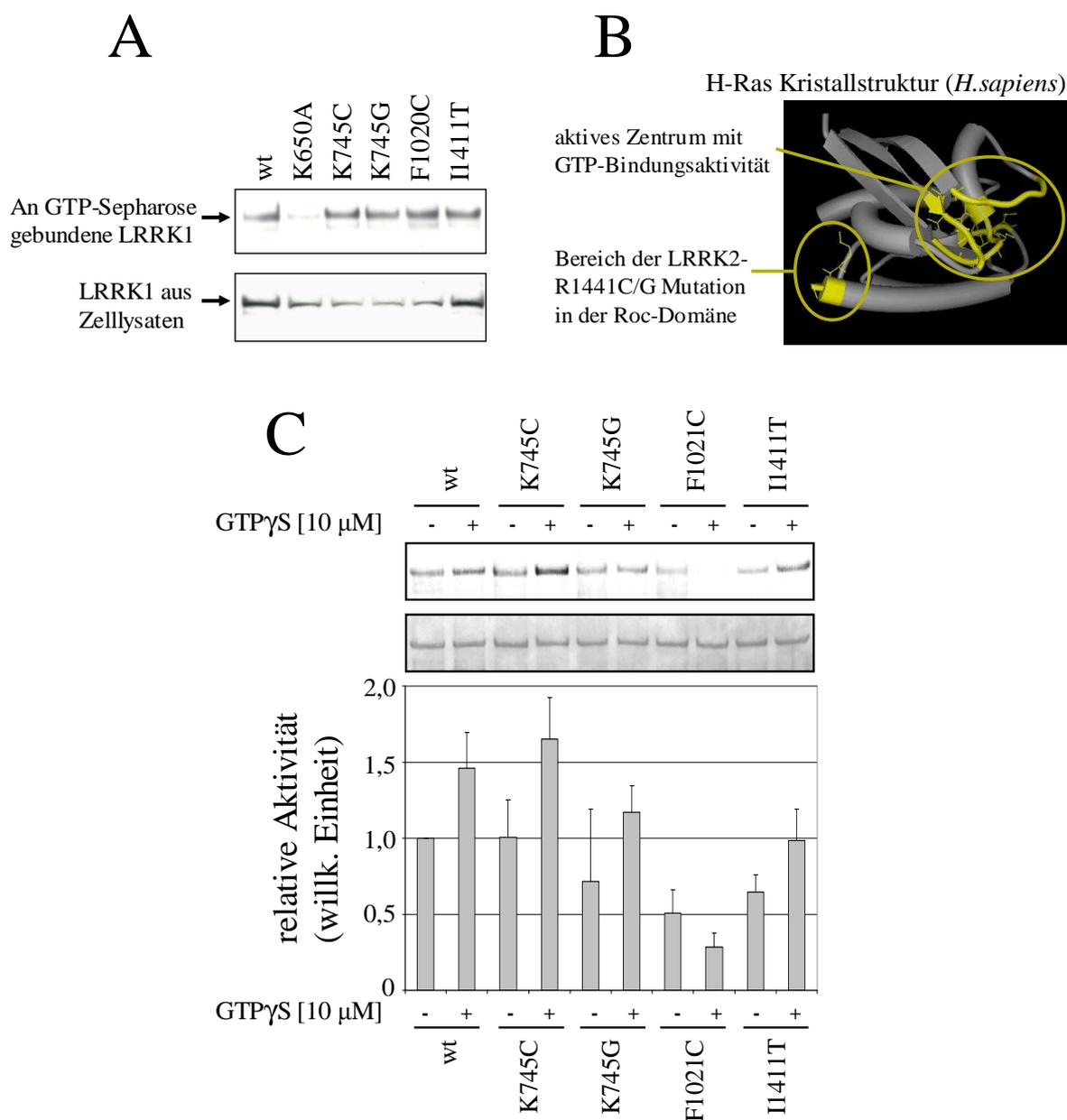
### 3.6.3 LRRK2-analoge Mutationen in LRRK1 verringern die Autophosphorylierungsrate

Die LRRK1-Mutanten wurden in Kinase-Experimenten (s. auch Abschnitt 3.5) eingesetzt und die Ergebnisse nach zwei Aspekten beurteilt. Dabei wurden zunächst der Grad der Autophosphorylierung und anschließend die Stimulierbarkeit durch Zugabe von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S untersucht.

LRRK1-K745C, die eine Punktmutation in der Roc-Domäne enthält, zeigte eine mit LRRK1-wt vergleichbare Aktivität. LRRK1-K745G hingegen, die eine andere Punktmutation an derselben Stelle enthält, wurde in geringerem Maß phosphoryliert. Die Aktivität beider Mutanten konnte durch GTP $\gamma$ S stimuliert werden (Abb. 14C).

Ein anderes Ergebnis lieferte LRRK1-F1021C, deren schwaches Autophosphorylierungssignal mit der Kinase-inaktiven LRRK1-K1269W vergleichbar war (s. auch Abb. 10B-C). Auch durch Zugabe von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S konnte keine Steigerung der Aktivität gemessen werden (Abb. 14C). Dieses Ergebnis ist insbesondere interessant, weil sich die Mutation in der COR-Domäne befindet, über die bis heute keine experimentellen Daten existieren.

LRRK1-I1411T mit einer Mutation im *activation loop* der Kinasedomäne zeigte eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich mit LRRK1-wt, die durch Zugabe von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S leicht stimuliert werden konnte (Abb. 14C).

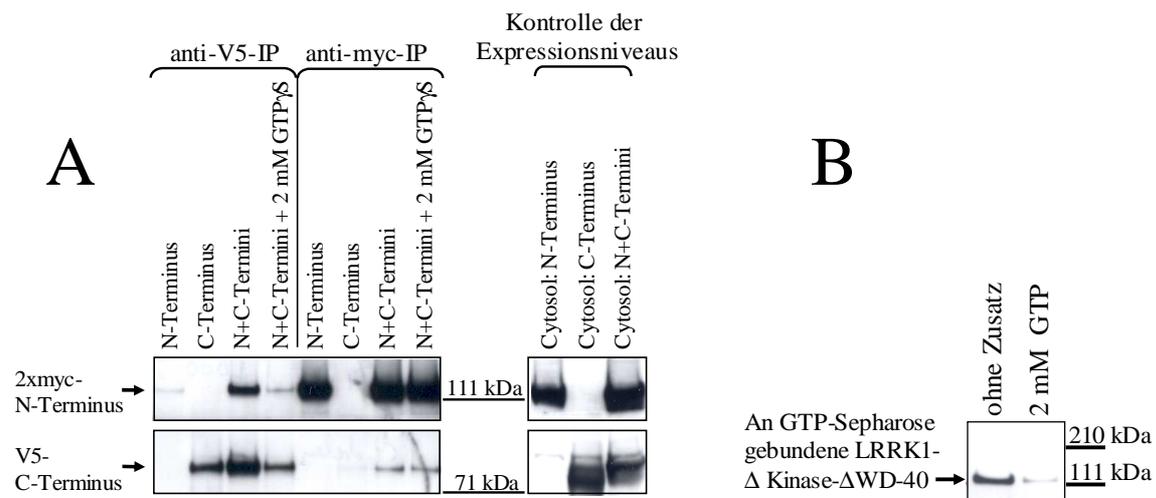


**Abb. 14:** GTP-Bindungs- und Kinaseaktivität der LRRK2-analogen LRRK1-Mutationen. **A** Alle LRRK2-analogenen Mutanten und LRRK1-wt binden GTP-Sepharose, wie der Nachweis mit Anti-Myc-Antikörper im Western Blot zeigt (Bahn 1 und 3-6, oben). LRRK1-K650A dient als Negativkontrolle (Bahn 2). Unten ist die Expressionskontrolle der verschiedenen LRRK1-Proteine gezeigt (Durchführung s. auch Experimente in Abschnitt 3.5). **B** In der Kristallstruktur des H-Ras-Proteins [116] ist die GTP-Bindungstasche, sowie der Bereich, an der LRRK2-Mutationen in der Roc-Domäne beschrieben wurden, gelb hervorgehoben. Der Sequenzvergleich von H-Ras und der LRRK2 Roc-Domäne ist in Abb. 2 dargestellt. **C** Kinase-Experimente mit den LRRK2-analogen LRRK1-Mutanten wurden in Abwesenheit und Gegenwart von 10  $\mu$ M GTP $\gamma$ S durchgeführt (s. auch Abschnitt 3.5.2). Oben ist das Autoradiogramm und in der Mitte das zugehörige Coomassie-gefärbte SDS-Gel dargestellt. In dem Diagramm ist die Quantifizierung vier unabhängiger Experimente zusammengefasst. Die Y-Achse zeigt die relative Aktivierung der LRRK1 bzw. der Mutanten in Bezug auf LRRK1-wt ohne Zusatz. Die Reihenfolge der Mutanten auf der X-Achse entspricht der im oben dargestellten Autoradiogramm.

### 3.7 Transient exprimierte LRRK1-Fragmente interagieren miteinander

Die Signaltransduktion kleiner GTPasen, die durch GTP-Bindung aktiviert wurden, wird über eine direkte Interaktion mit *downstream effector* Proteinen vermittelt [117-120]. In Analogie dazu könnte die Stimulation der LRRK1-Autophosphorylierung ebenfalls Resultat einer Interaktion der Roc-Domäne mit einem anderen Teil des LRRK1-Proteins sein.

Um eine intramolekulare Bindung zwischen einzelnen LRRK1-Domänen zu entdecken, wurden zwei Fragmente der LRRK1 auf eine eventuelle gegenseitige Wechselwirkung untersucht. Durch Koexpression der Vektoren pCMV-2xMyc-LRRK1- $\Delta$ Kinase- $\Delta$ WD-40 (Expression der N-terminalen Hälfte mit Myc-tag) und pcDNA3.2/V5-DEST-Kinase-WD-40 (Expression der C-terminalen Hälfte mit V5-tag) wurde quasi eine mittig geschnittene LRRK1 in HEK293 Zellen produziert. Die Isolierung des N-Terminus führte dabei zur Kopräzipitation des C-Terminus und umgekehrt (Abb. 15). Die detektierte Wechselwirkung war allerdings unempfindlich gegenüber GTP (und GDP; ohne Abbildung), obwohl die N-terminale Hälfte eine intakte GTP-Bindung aufweist.



**Abb. 15:** Kopräzipitation der LRRK1 N- und C-terminalen Hälfte. Die N-Terminale Hälfte entspricht den 2xMyc-LRRK1- $\Delta$ kinase- $\Delta$ WD-40 und die C-terminale Hälfte V5-Kinase-WD-40 Proteinprodukten aus Abb. 7 **A** Die transient exprimierte Fragmente wurden mit Anti-V5- (Bahn 1-4, links) oder Anti-Myc-Antikörpern (Bahn 5-8, links) immunpräzipitiert. In der anschließenden Western Blot-Analyse wurden Banden mit Anti-Myc-Antikörper (Bild oben links) und Anti-V5-Antikörper (Bild unten links) detektiert. Als Kontrolle wurden die Fragmente jeweils einzeln (Bahn 1-2 und 5-6, links) untersucht und die Präzipitation der koexprimierten Fragmente fand in Abwesenheit (Bahn 3 und 7, links), sowie Gegenwart von 2 mM GTP $\gamma$ S (Bahn 4 und 8, links) statt. Die Expressionkontrollen mit beiden Antikörpern der einzelnen und kotransfizierten Fragmente sind rechts zu sehen. **B** Die N-terminale Hälfte der LRRK1 bindet GTP. Es wurden jeweils äquivalente Mengen des Cytosols transfizierter HEK293FT-Zellen mit GTP-Sepharose versetzt. Protein, das an die GTP-Sepharose gebunden war, wurde mit Anti-Myc-Antikörper im Western Blot detektiert. Die Bindung der N-terminalen LRRK1-Hälfte (Bahn 1) konnte durch Zugabe von 2 mM GTP (Bahn 2) unterbunden werden.

### 3.8 Das Expressionsprofil der LRRK1 zeigt eine ubiquitäre Gewebeverteilung

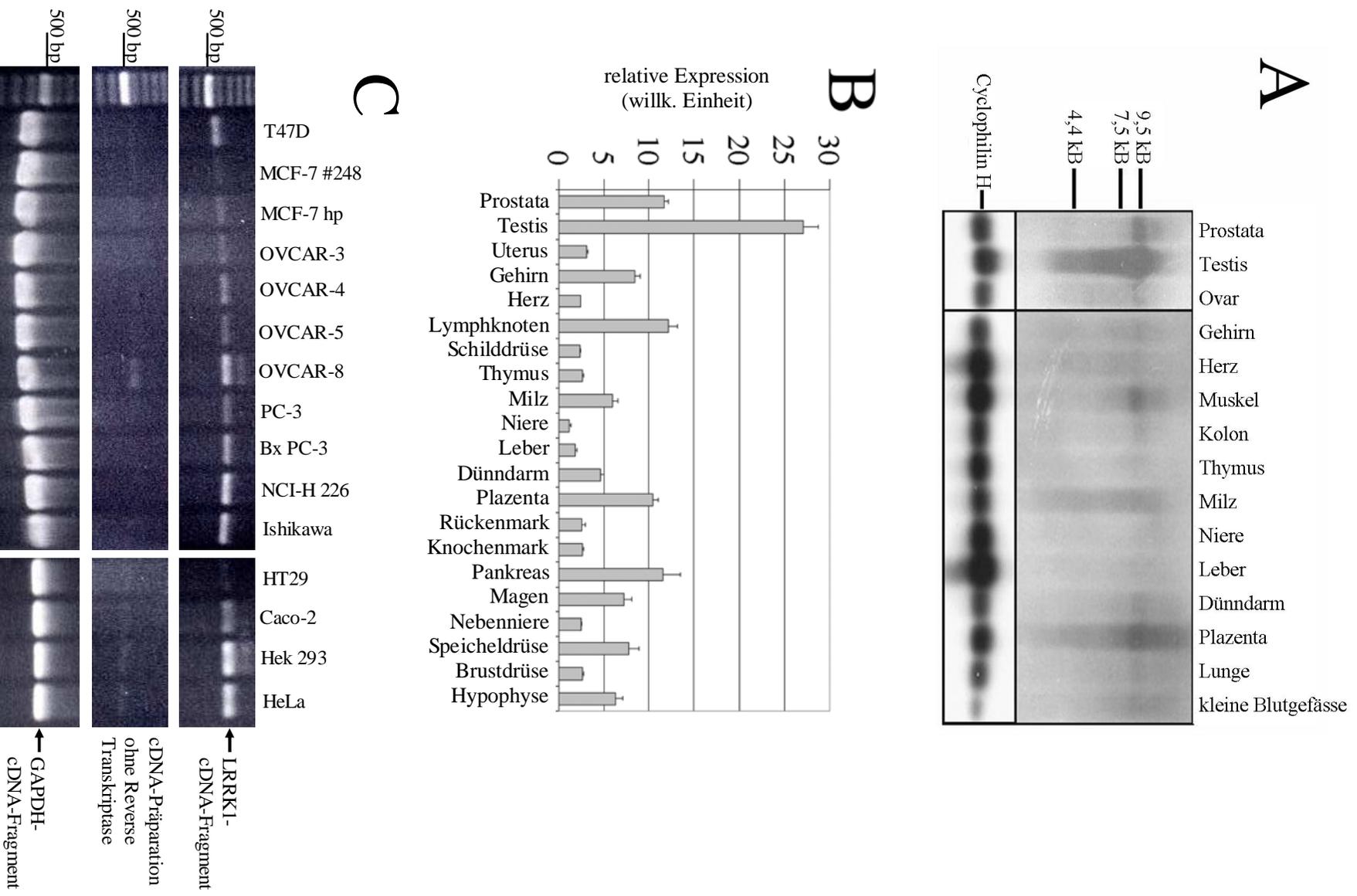
Die gewebespezifische Expression humaner LRRK1 wurde mittels Northern Blot-Analyse untersucht, in denen ein 599 bp Fragment der LRRK1-DNA-Sequenz als Sonde benutzt wurde, um die cirka 9 kb große mRNA zu detektieren. In den meisten der untersuchten Gewebe wurde eine LRRK1-Expression mit besonders hohem Level in Testis, Plazenta, Prostata, Muskelgewebe und Milz detektiert (Abb. 16A).

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse konnten in einer *real-time* PCR-Analyse bestätigt werden. RNA-Präparationen aus verschiedenen Geweben und Zelllinien wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die enthaltene LRRK1-mRNA mit *real-time* PCR quantifiziert. Übereinstimmung zu den Ergebnissen der Northern Blots ergibt sich vor allem bei der besonders deutlichen Expression in Testis, Plazenta, Prostata und Milz, sowie der geringeren in Gehirn und Pankreas (Abb. 16B). Eine ebenfalls hohe Expression wurde in Magen, Lymphknoten, Speicheldrüse und Hypophyse gemessen, die mittels Northern Blot-Analyse nicht untersucht wurden.

Die semi-quantitative Analyse einiger Zelllinien ergab, das LRRK1 unter anderem in HeLa- und HEK293FT-Zellen exprimiert wird. Die LRRK1-Expression in HeLa-Zellen war eine gute Voraussetzung für RNA-Interferenz vermittelte *knock-down*-Experimente, wie sie im nächsten Abschnitt beschrieben werden (Abb. 16C).

**Abb. 16 (s. nächste Seite):** LRRK1-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien. **A** Die LRRK1-Gewebeverteilung wurde mittels Northern Blot-Analyse ermittelt. Eine Sonde (Basen 2966-3564 der LRRK1-cDNA-Sequenz im Anhang) wurde zur Detektion des ca. 9 großen kb LRRK1-Transkripts benutzt (oben). Die Detektion der Cyclophilin H-mRNA dient als Kontrolle der RNA-Menge (unten). **B** Die relative LRRK1-Expressionstärke verschiedener Gewebe wurde mit quantitativer *real-time* PCR gemessen und in Bezug auf den Wert aus Niere dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. **C** Aus der mRNA diverser Zelllinien wurde mit Reverser Transkriptase cDNA hergestellt, die als Template-DNA für eine PCR benutzt wurde. Exprimiert eine Zelllinie LRRK1, ergaben LRRK1-spezifische *primer* ein 520 bp großes Fragment im Gegensatz zur Negativkontrolle, in der keine Reverse Transkriptase benutzt wurde. Als cDNA-Positivkontrolle wurden GAPDH-spezifische (Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase) *primer* eingesetzt, die zu einem 420 bp PCR-Produkt führten.

Abb. 16: LRRK1-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien (Abbildungstext: s. vorherige Seite)

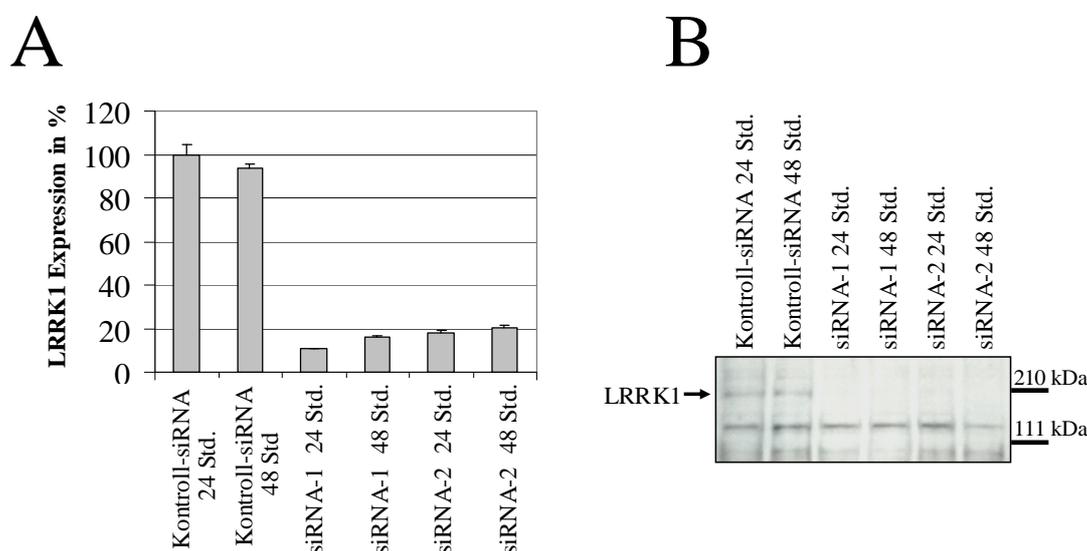


### 3.9 Experimente zur Aufklärung der LRRK1-Funktion

#### 3.9.1 LRRK1-*knock-down* durch RNA-Interferenz

RNA-Interferenz stellt eine wirksame Methode zur Analyse der Funktion unbekannter Proteine dar [105-107]. Zum Beispiel können phänotypische Untersuchungen an Zelllinien, in denen ein siRNA vermittelter *knock-down* durchgeführt wurde, Hinweise auf die Funktion eines Proteins ergeben. Grundvoraussetzung für derartige Analysen ist ein effizienter *knock-down* der Expression des betreffenden Proteins.

Für den *knock-down* der LRRK1 wurden zwei unterschiedliche siRNA Sequenzen mit vergleichbarer Effizienz benutzt. Der LRRK1-mRNA-Gehalt von HeLa-Zellen verringerte sich schon 24 Std. nach Nukleofektion dieser siRNAs von 100% auf 15-20% (Abb. 17A). Auch 72 Std. nach erfolgtem *knock-down*, konnte keine Expression der LRRK1 nachgewiesen werden (ohne Abbildung). LRRK1-Protein konnte in den behandelten Zellen mittels Western Blot-Analyse mit Anti-LRRK1-Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 17B). Zum Vergleich wurden Transfektionen mit Kontroll-siRNA, die keinen phänotypischen Effekt in den Zellen auslöst, durchgeführt. Der erfolgreiche *knock-down* der LRRK1 war Grundlage für die im nächsten Abschnitt beschriebenen Versuche.



**Abb. 17:** LRRK1-siRNA-*knock-down* in HeLa-Zellen. **A** Der LRRK1-mRNA-Gehalt der HeLa-Zellen wurde 24 und 48 Stunden nach *knock-down* durch zwei unterschiedliche siRNA-Sequenzen mittels *real-time* PCR bestimmt. Das Diagramm zeigt die prozentuale LRRK1-Expression in Bezug auf den Wert der Kontroll-siRNA nach 24 h, der 100 % entspricht. An der X-Achse sind die benutzten siRNAs und die Dauer der Expressionsphase angegeben. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Dreifachbestimmung an. **B** In einer Western Blot-Analyse konnte die LRRK1-spezifische Bande (Bahn 1 und 2) bei ca. 200 kDa nach dem siRNA *knock-down* mit Anti-LRRK1-Antikörper nicht mehr detektiert werden (Bahn 3-6).

### 3.9.2 Analyse von siRNA-behandelten HeLa-Zellen

Das Entfernen bzw. Zerstören der LRRK1-orthologen Gene für GbpC, pats1 und QkgA in *D. discoideum* führt zu einem Cytokinesedefekt, der in großen multinukleären Zellen und veränderten Proliferationsraten resultiert [40, 43, 44]. Zudem weisen GbpC-*knock-out*-Zellen einen Chemotaxisdefekt auf [42]. Der *knock-down* des *D. melanogaster* LRRK1-Orthologen, CG5483, führt zu einem geringfügig vermehrten Auftreten abnormaler Zentrosomen in der Mitose und einem leicht reduzierten Verhältnis sich teilender Zellen zur Gesamtzellzahl (*P/M ratio*) [45]. Insgesamt deuten die verfügbaren Daten auf eine Funktion der jeweiligen Proteine in der Regulation der Cytokinese und der Chemotaxis hin. Demzufolge wurden ähnliche Experimente zur Analyse des LRRK1-*knock-down* durchgeführt.

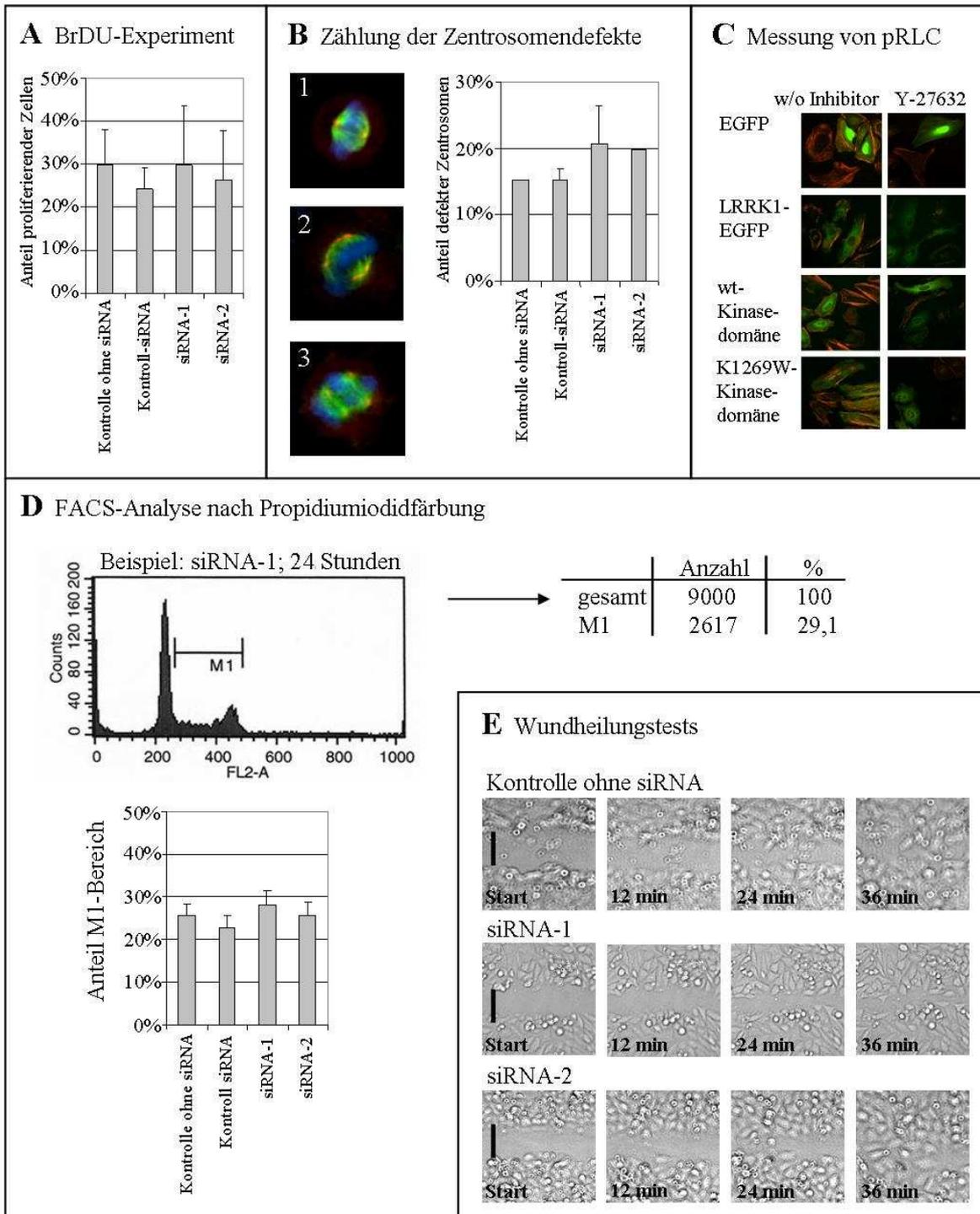
HeLa-Zellen, deren LRRK1-Expression temporär durch RNA-Interferenz gehemmt wurde, zeigten unter dem Mikroskop eine unveränderte Wildtyp-Zellmorphologie (ohne Abbildung). Weder die Proliferation der Zellen war verändert, wie BrdU- und Propidiumiodid-Färbungen gezeigt haben, noch äußerte sich ein Cytokinesedefekt im Aufbau der Zentrosomen oder des Spindelapparates, wie  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin-Färbungen in Immunfluoreszenz-Färbungen gezeigt haben. Wundheilungstests führten zu keiner messbaren Veränderung in der Wandergeschwindigkeit siRNA-behandelter HeLa-Zellen. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

### 3.9.3 Analyse des Phosphorylierungsgrades des RLC in transfizierten HeLa-Zellen

Der Einfluss des GbpC-Proteins auf die Chemotaxis der *D. discoideum*-Zellen wird wahrscheinlich über den Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (RLC) vermittelt [40].

Die transiente Expression der LRRK1-wt bzw. deren Kinasedomäne (wt und inaktive K1269W Mutation) führte zu keiner Veränderung des RLC-Phosphorylierungsgrades, wie der Nachweis mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen RLC zeigte (Abb. 18C). Die Analyse des RLC-Phosphorylierungsgrades nach siRNA-Behandlung wiesen ebenfalls keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp auf (ohne Abbildung)

**Abb. 18:** Phänotypische Untersuchungen an siRNA-behandelten bzw. transfizierten HeLa-Zellen (Abbildungstext: s. nächste Seite)



**Abb. 18 (vorherige Seite):** Phänotypische Untersuchungen an siRNA-behandelten bzw. transfizierten HeLa-Zellen. In den Experimenten wurden jeweils Ansätze mit zwei unterschiedlichen LRRK1-spezifischen siRNAs, ohne siRNA und mit Kontroll-siRNA durchgeführt. Da keine zeitabhängigen Effekte beobachtet werden konnten, wurden die verschiedenen Zeitpunkte von 24, 48 und 72 Std. nach siRNA Nukleofektion gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

**A** In drei unabhängigen siRNA-Experimenten wurden BrdU- und Hoechst-Färbungen jeweils 24 und 48 Stunden nach siRNA-Nukleofektion durchgeführt und die Zellen automatisiert am UIC Imager gezählt. Die Daten aller Experimente wurden in einem Diagramm zusammengefasst, das den Anteil proliferierender Zellen zur Gesamtzellzahl in Prozent zeigt.

**B** In vier unabhängigen siRNA-Experimenten wurden DNA, Spindelapparat und Zentrosomen mitotischer Zellen gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Pro Versuch und Ansatz wurden in Blindproben mindestens 150 mitotische Zellen gezählt und in „normal“ und „defekt“ eingeteilt (Beispiele links: Bild 1: normale mitotische Zelle; Bild 2: abnormale Zentrosomen; Bild 3: Zentrosomenduplikation). Die Daten aller Experimente wurden in einem Diagramm zusammengefasst, das den Anteil defekter mitotischer zu normalen mitotischen Zellen in Prozent zeigt.

**C** Der Phosphorylierungsgrad der regulatorischen leichten Kette des Myosins (RLC) in HeLa-Zellen, die transient EGFP, LRRK1-EGFP oder die GST-LRRK1-Kinasedomäne (Wildtyp und inaktive K1269W Mutation) exprimieren, wurde in Immunfluoreszenzexperimenten untersucht. Die Signale phospho-spezifischer Antikörper gegen Mono-Phospho-RLC und Di-Phospho-RLC (ohne Abbildung) sind rot und das transient exprimierte Protein grün dargestellt. Vorherige Inkubation der Zellen mit ROCK-Kinase-Inhibitor Y-27632 führte zu einer Verminderung des phospho-RLC-Signals, wodurch die Spezifität der Antikörper gezeigt werden konnte.

**D** In drei unabhängigen siRNA-Experimenten wurden Propidiumiodid-Färbungen durchgeführt um den Anteil sich teilender Zellen mittels FACS-Analyse zu bestimmen. Beispielhaft ist ein Diagramm einer Messung (oben) abgebildet, in dem der Signalbereich der G2/M- und S-Phase markiert ist (M1). Die aus dem Diagramm extrahierten Daten (Gesamtzellzahl und Anzahl der Zellen vom M1-Bereich) sind rechts dargestellt. Unten sind die Daten aller Experimente in einem Diagramm zusammengefasst, das den Anteil der Zellanzahl aus dem M1-Bereich zur Gesamtzellzahl in Prozent zeigt.

**E** In Wundheilungsexperimenten mit siRNA-*knock-down* wurde jeweils ein zirka 100 µm (schwarzer Balken) breiter Kanal in einen Zellrasen gekratzt (Startzeitpunkt t entspricht 0 Min.) und die Chemotaxis der Zellen beim Bewandern des Kanals mittels *live-cell-imaging* beobachtet. In der oberen Reihe ist eine siRNA-Kontrolle, die zu keinem *knock-down* führt, gezeigt. Reihe 2 und 3 zeigen Zellen mit einem LRRK1-spezifischen *knock-down*. Unten rechts ist jeweils der Zeitpunkt der Aufnahme in Minuten angegeben. Wegen der Bewegung des Mikroskoptischs zwischen den einzelnen Aufnahmen kam es zu Verschiebungen in der Z-Achse, wodurch die Unschärfe der Bilder in Reihe 1 und 3 zu erklären sind.