

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Domänenarchitektur der LRRK1

LRRK1 (*leucine-rich repeat kinase 1*) zählt zu der Gruppe der ROCO-Proteine, einer Untergruppe der Ras-ähnlichen Proteine [1], die in letzter Zeit ein großes Interesse durch die Entdeckung der Parkinson-verursachenden Mutationen im LRRK1 paralogen Gen, der LRRK2, erfahren hat [66-70]. Typischerweise enthalten Proteine dieser Untergruppe neben den Roc- und COR-Domänen repetitive, strukturgebende Domänen, wie Ankyrin-, *leucine-rich* Repeats (LRRs) und WD-40-Repeats [1, 6]. Sie können weiterhin unterteilt werden in MASL1-Typ-ROCO-Proteine, die keine Kinasedomäne enthalten, LRRK-Typ-ROCO-Proteine mit einer Kinasedomäne und DAPK1-Typ-ROCO-Proteine, die ausschließlich aus DAPK1-Proteinen (*death-associated Protein Kinase 1*) unterschiedlicher Organismen bestehen und eine anders geartete Domänenstruktur aufweisen ([1] und Abb. 1).

LRRK1, vom LRRK-Typ der ROCO-Proteine, besteht aus einem Monomer von 2014 Aminosäuren (Proteingröße zirka 200 kDa; kodierender Bereich der mRNA: 6045 bp) und enthält in angegebener Reihenfolge 6 Ankyrin-Repeats, 14 LRRs, je eine Roc-, COR-, Kinasedomäne und 7 WD-40-Repeats (Abb. 5). Die Klassifizierung der Proteindomänen wurde über Sequenzhomologiesuchen mit BLAST und multiplen Sequenzalignments durchgeführt. Wegen der Varianz innerhalb der WD-40-Repeat-Sequenzen [29] wurde deren Identifikation auf insgesamt 19 ROCO-Proteine ausgeweitet und mit bekannten WD-40-Repeat-Sequenzen aus der Literatur verglichen. In allen untersuchten ROCO-Protein Sequenzen wurden genau sieben WD-40s entdeckt, in denen überwiegend  $\beta$ -Faltblätter durch die Analysesoftware PSI-PRED vorausgesagt wurden (Anhang Abb. 22). Diese Anordnung kommt ebenfalls in WD-40-Repeat-Proteinen vor, von denen bekannt ist, dass sie eine evolutionär begünstigte  $\beta$ -Propeller-Struktur ausbilden [31-33], wie z.B. den  $\beta$ -Untereinheiten der G-Proteine [121-123] oder Bubp3p und Ski8p [124, 125]. In den Primärstrukturen letzterer konnten lediglich vier bzw. fünf WD-40s detektiert werden, obwohl beide eine siebenblättrige  $\beta$ -Propeller-Struktur entfalten, wodurch der divergente Charakter und die aufwendige Identifikation der WD-40-Repeats deutlich wird.

Möglicherweise falten sich auch die C-Termini der LRRK1 und anderer ROCO-Proteine zu  $\beta$ -Propeller Strukturen, in denen jeweils 4 antiparallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter eines von sieben „Kuchenstücken“ einer zylindrischen Gesamtform darstellen. In einem solchen Modell wären auch Insertionen zwischen den einzelnen  $\beta$ -Faltblättern, wie z.B. der Serin-haltige Bereich im C-Terminus der LRRK1 (s. Abb. 20), zulässig, da es lediglich zu einer Ausstülpung auf der Oberfläche käme ohne die Grundstruktur zu beeinflussen [31].

#### **4.2 LRRK1 ist eine aktive Proteinkinase**

Die klonierte humane LRRK1-wt wurde nach transienter Überexpression in Immunkomplex-Kinase-Experimenten aufgereinigt und ihre Aktivität untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass LRRK1 eine aktive Kinase mit Autophosphorylierungsaktivität ist, wohingegen die generischen Kinasesubstrate Histon H1, Casein und MBP (*myelin basic protein*) oder  $\alpha$ -Synuklein, dessen pathogene Aggregation eine Rolle in neurodegenerativen Krankheiten spielt (s. Einleitung; [75, 77]), nicht akzeptiert werden. Wie erwartet wurde keine Aktivität der zwei LRRK1-Mutanten,  $\Delta$ Kinase- $\Delta$ WD-40 (N-terminale Hälfte ohne Kinasedomäne) und K1269W (Mutation des für die ATP-Bindung wichtigen Lysins [37]), beobachtet, die als Negativkontrollen dienten. Dieses Ergebnis stellt den ersten direkten Nachweis der Kinaseaktivität eines ROCO-Proteins des LRRK-Typs dar.

Die Autophosphorylierung findet wahrscheinlich intramolekular statt, wie Koexpressionsexperimente mit inaktiver LRRK1-K1269W-EGFP zeigen. LRRK1-wt überträgt Phosphatreste in diesen Experimenten auf sich selbst, jedoch nicht auf die inaktive LRRK1-K1269W-EGFP. Interessanterweise wurde keine Autophosphorylierung bei der Deletionsmutante  $\Delta$ WD-40, die um 5  $\frac{1}{2}$  WD-40-Repeats verkürzt ist, beobachtet – möglicherweise, weil sich die Phosphorylierungsstelle im C-Terminus befindet (s. auch Abschnitt 4.5.2).

### 4.3 Die GTP-Bindungsaktivität der LRRK1-Roc-Domäne

Die Sequenzhomologie der experimentell unbekanntes Roc-Domäne zu Ras-ähnlichen GTPasen ([1] und Abschnitt 1.1.1) führte zur Analyse der GTP-Bindungsaktivität dieses Bereichs. Es wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt, um zu testen, ob transient überexprimierte LRRK1-wt an GTP gekuppelte Sepharose binden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass LRRK1-wt in der Lage ist GTP zu binden und dass diese Interaktion kompetitiv durch einen Überschuss von GTP oder GDP, nicht aber durch ATP oder CTP unterbunden werden kann. Demzufolge handelt es sich bei LRRK1 um ein Guanosinnukleotid bindendes Protein.

Durch einen Aminosäureaustausch im *P-loop* der Roc-Domäne (K650A) konnte die GTP-Bindungsaktivität der LRRK1 analog zu Experimenten von Praefcke *et al.* mit hGBP1 (humanes Guanosinnukleotid bindendes Protein 1, [111]) eliminiert werden. Außerdem zeigten Experimente mit der transient exprimierten LRRK1-Roc-Domäne mit einer Größe von 27 kDa ein intaktes Bindungsverhalten. Somit ist gezeigt, dass die LRRK1-Roc-Domäne in der Lage ist, spezifisch Guanosinnukleotide zu binden. Dabei entfaltet die Roc-Domäne wahrscheinlich die für G-Domänen-Proteine typische Struktur der Bindungstasche.

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

Da LRRK1 eine aktive Kinase ist, die Guanosinnukleotide binden kann, wurde in der Folge untersucht, ob die Kinaseaktivität durch GTP oder GDP beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass, obwohl GTP und ebenfalls GDP gebunden werden können, nur durch Zugabe von GTP eine Stimulation der Kinaseaktivität erreicht werden konnte. Des Weiteren ist die Stimulation durch GTP dosisabhängig und blieb in Versuchen mit der K650A-Mutante, die nicht in der Lage ist GTP effektiv zu binden, aus. Folglich scheint die Roc-Domäne Teil eines Mechanismus zur Aktivierung der Kinase zu sein.

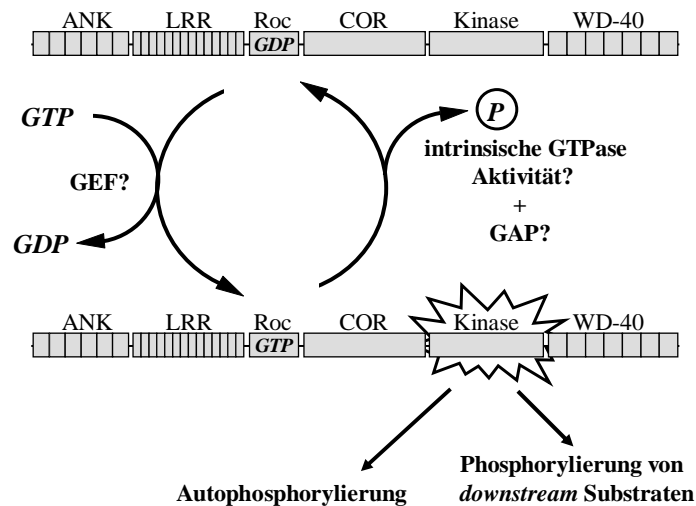
Interessanterweise ist die Gesamtaktivität der LRRK1-K650A auch ohne Zugabe von GTP stark reduziert gegenüber der LRRK1-wt, so dass sie quasi inaktiv ist. Da sich eine analoge Mutation im humanen Guanylat-bindenden Protein 1 (hGBP 1) in einer geschwächten Affinität zu GTP, aber nicht zu GDP äußert [111], ist es denkbar, dass LRRK1-K650A ausschließlich in der GDP-gebundenen Form vorkommt. Dies könnte ebenfalls die leicht abgeschwächte Aktivität der LRRK1-wt in Gegenwart von GDP erklären im Vergleich zu den Werten ohne Zugabe von GDP. Dementsprechend würde die LRRK1-Kinaseaktivität gehemmt durch die Bindung des GDPs an die Roc-Domäne.

## 4.5 Aktivierungsmodell für LRRK1

### 4.5.1 Der aktivierte Zustand der Roc-Domäne

Die über die Roc-Domäne vermittelte Aktivierung der LRRK1 erinnert an die Regulation der Kinasen *downstream* zu den kleinen GTPasen der Rho-Familie [120, 126, 127] mit dem Unterschied, dass in LRRK1 die putative GTPase Domäne und die Kinasedomäne in einem Polypeptid vereint sind. Rho GTPasen, wie RhoA, Rac1 oder Cdc42 agieren als GTP/GDP-regulierte molekulare Schalter und sind dafür bekannt in zahlreichen Prozessen, wie der Zellzyklusregulation, transkriptionaler Regulation, Onkogenese und besonders der Regulation des Aktin-Cytoskeletts, eine Rolle zu spielen [120, 128-130]. Zusätzlich werden Rho-GTPasen durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) aktiviert, die deren aktive, GTP-gebundene Form stabilisieren [15], wohingegen GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) die Hydrolyse von gebundenem GTP katalysieren, wodurch die inaktive GDP-gebundene Form entsteht [19].

In Analogie dazu wurde ein Aktivierungsmodell (Abb. 19) für LRRK1 erstellt, in dem die Roc-Domäne die Rolle eines intrinsischen Regulators der LRRK1-Kinaseaktivität einnimmt. In der GDP-gebundenen Form ist die Kinasedomäne inaktiv und LRRK1 dephosphoryliert. Der Austausch von GDP zu GTP an der Roc-Domäne wird möglicherweise durch bislang unbekannte GEFs katalysiert und würde zu einer allosterischen Bewegung der *switch* 1- und 2-Regionen führen (s. auch Einleitung). Durch die veränderte Oberfläche würde nun eine intramolekulare Bindung der Roc-Domäne mit einem bislang nicht identifizierten Bereich der LRRK1 zur Aktivierung der Kinase führen. Diesen Bereich könnte entweder die Kinasedomäne selbst darstellen oder es handelt sich um ein zusätzliches funktionelles Modul, wie z.B. der COR-Domäne. Letzte Theorie wird vor allem durch zwei Tatsachen unterstützt. Zum einen führt eine Punktmutation (LRRK1-F1021C; s. auch Abschnitt 4.6.2 der Diskussion) in der experimentell noch völlig unbekanntem COR-Domäne trotz intakter GTP-Bindung zur kompletten Inaktivierung der Kinaseaktivität. Des Weiteren ergaben Sequenzhomologiesuchen mit BLAST (*basic local alignment search tool*), dass die COR-Domäne in allen Organismen ohne Ausnahme in Koexistenz mit einer Roc-Domäne auftritt, was die direkte funktionelle Verbindung dieser Domänen sehr wahrscheinlich macht.



**Abb. 19:** Postuliertes GTP-abhängiges Aktivierungsmodell für LRRK1. LRRK1 existiert in einem Gleichgewicht zwischen zwei Konformationszuständen. Der Austausch von GDP durch GTP wird durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) katalysiert und induziert die Aktivierung der LRRK1-Kinasedomäne. In der Folge findet eine Autophosphorylierung und die Phosphorylierung physiologischer *downstream* Substraten statt. LRRK1 kehrt durch eine potentielle intrinsische GTPase-Aktivität in den GDP-gebundenen inaktiven Zustand zurück. Dieser Vorgang wird möglicherweise durch GTPase aktivierende Proteine (GAP) stimuliert.

#### 4.5.2 Die Aktivierung der Kinasedomäne

Durch die Aktivierung der Roc-Domäne unterliegt das LRRK1-Protein möglicherweise allosterischen Veränderungen, die schließlich zur Aktivierung der Kinasedomäne und zur Autophosphorylierung führen. Die Autophosphorylierung könnte die aktive Konformation der Kinasedomäne stabilisieren und in diesem Zustand noch nicht identifizierte physiologische Substrate phosphorylieren. Die Autophosphorylierungsstelle der LRRK1 ist bislang noch nicht identifiziert, aber auch ohne diese Kenntnis können theoretisch zwei unterschiedliche Autophosphorylierungsszenarien diskutiert werden.

Zum einen werden Kinasen der RD-Gruppe im so genannten *activation loop* phosphoryliert, der dann mit einem Bereich aus vorwiegend basischen Aminosäuren, der RD-Tasche, interagiert und die Kinase auf diese Weise in eine aktive Konformation versetzt [112, 131]. Allerdings ist weder das für RD-Kinasen typische Arginin (RD) in LRRK1 vorhanden, noch ist es sterisch möglich, dass eine Kinase einen Phosphatrest intramolekular (in *cis*) auf den *activation loop* übertragen kann (persönliche Kommunikation mit Dr. Ursula Egner, Strukturbiologie, Schering AG, Berlin). Folglich findet die intramolekulare LRRK1-Autophosphorylierung eher an anderer Stelle statt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass andere Kinasen eine potentielle Phosphorylierungsstelle innerhalb des *activation loops* der LRRK1 nutzen (s. auch Abb 5).

Alternativ könnte die Autophosphorylierungsstelle außerhalb der Kinasedomäne liegen, wie im Falle der *myosin light chain kinase* (MLCK) [132] und  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin abhängiger Kinase II (CaMKII) [133, 134]. Beide Kinasen werden durch Autophosphorylierung eines inhibitorischen Segments C-terminal zur Kinasedomäne aktiviert. Da die Deletionsmutante LRRK1- $\Delta$ WD-40, die um  $5^{1/2}$  WD-40-Repeats verkürzt wurde, keine Autophosphorylierungsaktivität mehr zeigt, ist es denkbar, dass die potentielle Phosphorylierungsstelle ebenfalls im C-Terminus liegt. In diesem Zusammenhang ist es besonders erwähnenswert, dass die in Abbildung 20 (im Anhang) dargestellte Serin-reiche Region im C-Terminus der LRRK1 eine Anhäufung potentieller Phosphorylierungsstellen enthält, wie eine Analyse mit NetPhos-2.0 [93] ergab. Ob der LRRK1-C-Terminus ebenfalls eine inhibitorische Wirkung ausübt, kann jedoch nur mit geeigneten, bislang nicht identifizierten Substraten getestet werden, da die Kinaseaktivität nur so unabhängig von der Autophosphorylierung bestimmt werden kann.

Sollte der LRRK1-C-Terminus tatsächlich eine inhibitorische Wirkung entfalten, wie im Falle der MLCK oder CaMKII, könnte diese durch eine Interaktion mit der Kinasedomäne vermittelt werden. Denkbar wäre jedoch ebenfalls eine GTP/GDP abhängige Interaktion des C-Terminus mit der Roc-Domäne in Anlehnung an die Interaktion zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von G-Proteinen [4] oder zwischen Ran und RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*, [135]), bei der es jeweils zur Wechselwirkung einer GTPase-Domäne mit einem  $\beta$ -Propeller-Protein kommt. In Immunpräzipitationsexperimenten mit LRRK1-Fragmenten wurde schließlich eine Bindung zwischen transient exprimiertem N- und C-Terminus beobachtet, die allerdings unabhängig von GTP und GDP war, so dass es sich dabei möglicherweise um eine unspezifische Bindung handelt.

#### 4.5.3 Deaktivierung und Relevanz des Aktivierungsmodells

Die Rückkehr in den Grundzustand der LRRK1 könnte, wie im Aktivierungsmodell angedeutet, durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der Roc-Domäne, für die bislang keine experimentellen Daten vorliegen, eingeleitet werden. Da alle für GTPasen üblichen Motive in der Primärstruktur der Roc-Domäne konserviert sind (s. Einleitung und [1, 2, 9]), ist eine GTPase-Aktivität, die durch GAPs katalysiert werden könnte, jedoch durchaus wahrscheinlich [18, 19]. Zusätzlich wäre ein weiterer regulatorischer Schritt in Form einer Phosphataseaktivität nötig, um den dephosphorylierten inaktiven Zustand der LRRK1 wieder herzustellen.

LRRK1 ist somit das erste bekannte Beispiel für eine GTP-regulierte Proteinkinase, die regulatorische und enzymatische Funktionen in einem Protein vereint. Darüber hinaus erfüllt LRRK1 die Voraussetzungen für einen vielfältig regulierbaren molekularen Schalter und könnte eine wichtige Funktion innerhalb eines oder mehrerer Signaltransduktionswege darstellen. Die potentiellen Interaktionspartner der LRRK1 umfassen GEFs, GAPs, Phosphatasen, *upstream* und *downstream* gelegene Signalproteine, die jeweils einen Beitrag zur Aktivierung leisten könnten. Darüber hinaus könnte sich die Bedeutung des Aktivierungsmodells auf Grund der signifikanten Sequenzhomologie auch auf weitere Mitglieder der ROCO-Proteingruppe erstrecken. So könnte es insbesondere zur Aufklärung des Pathogenesemechanismus der LRRK2 in neurodegenerativen Krankheiten beitragen oder Hinweise über die Rolle der DAPK1 in der Apoptose erbringen.

## 4.6 Potentielle physiologische Rolle der LRRK1

### 4.6.1 Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts

Bis dato ist nur wenig bekannt über die Funktion der ROCO-Proteine. In *Dictyostelium discoideum* führt das Entfernen der Gene für GbpC, Pats1 oder QkgA zu Defekten in der Myosinphosphorylierung, Chemotaxis, Cytokinese oder Veränderungen in den Wachstumsraten ([40, 42-44]; s. auch Einleitung). Das zu LRRK1 homologe CG5483-Protein aus *Drosophila melanogaster*, scheint ebenfalls in die Zellzyklusprogression involviert zu sein [45], während die humane DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*)  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige cytoskeletale Veränderungen induzieren kann, die zur Apoptose führen [71, 72].

Um festzustellen, ob LRRK1 eine ähnliche Funktion ausübt, wurden in dieser Arbeit die Effekte von Überexpressionsstudien und siRNA-*knock-down*-Experimenten auf die Organisation des Cytoskeletts, wie die Myosinphosphorylierung, Aktin- und Mikrotubulinstrukturen, Cytokinese und Chemotaxis von HeLa-Zellen analysiert. Des Weiteren wurde die Proliferationsrate der behandelten Zellen mittels BrdU-Inkorporation und Propidiumiodid-Färbungen ermittelt. In keinem der erwähnten Experimente konnte jedoch eine Funktion der LRRK1 erkannt werden. Dieses Ergebnis könnte mehrfach gedeutet werden: Zunächst könnte nach erfolgtem *knock-down* noch ausreichend LRRK1-Restaktivität vorhanden sein, um einen phänotypischen Defekt erkennen zu lassen oder LRRK1 ist nicht in die untersuchten Prozesse involviert - zumindest in HeLa-Zellen. Da jedoch die homologen ROCO-Proteine anderer Organismen eine erkennbare Tendenz zur Organisation des

Cytoskeletts zeigen, ist es ebenso möglich, dass erst weitere experimentelle Ansätze, z.B. mit anderen Zelllinien oder die Zugabe geeigneter Stimulanzen, die Funktion der LRRK1 erkennen lassen. Außerdem könnte im humanen System, im Gegensatz zu *Drosophila melanogaster*, die nur ein LRRK-Typ-Protein exprimiert, LRRK2 redundant zu LRRK1 wirken und dessen Funktionsverlust in siRNA-*knock-down*-Experimenten maskieren.

In einer kürzlich erschienen Arbeit von Harada *et al.* wurde ebenfalls eine unveränderte Proliferationsrate von HEK293-Zellen nach LRRK1-siRNA *knock-down* beobachtet ([49]; s. auch Abschnitt 1.2.5).

#### **4.6.2 Funktionelle Gemeinsamkeiten von LRRK1 und LRRK2**

Bei Analysen einer chromosomalen Region (PARK8, 12q11.2-q13.2), die in Verbindung zu autosomal dominant vererbten Parkinson steht, wurden insgesamt sieben unterschiedliche Mutationen in LRRK2, dem paralogen Gen der LRRK1, entdeckt [50-57, 59, 60, 62-65, 114, 115]. Im Zuge dessen entstand auch die LRRK2-Bezeichnung „Dardarin“, abgeleitet von dem baskischen Wort *dardara*, das Tremor bedeutet [65]. Die LRRK2-Mutationen kosegregieren mit der Krankheit in betroffenen Familien und stellen nach aktuellem Wissen die Hauptursache für die vererbliche Form des Parkinsons dar. Eine gängige Hypothese besagt, dass die mutierte LRRK2 das Phosphorylierungsmuster von bislang nicht identifizierten Proteinen verändert und in der Folge neuronale Zellen für die pathogene Entwicklung von Parkinson anfällig macht [66-70]. Die einzelnen LRRK2-Mutationen sind in verschiedenen Regionen des Proteins, wie den LRRs (LRRK2-I1122V), der Roc-(LRRK2-R1441C/G/H), COR-(LRRK2-Y1699C) und Kinasedomäne (LRRK2-G2019S und -I2020T) lokalisiert.

Auf Grund der großen Sequenzhomologie zwischen LRRK1 und LRRK2 könnten die für LRRK2 beschriebenen Mutationen in LRRK1 einen messbaren Effekt auf die Kinaseaktivität oder deren Regulation haben. Folglich wurden vier neue LRRK1-Mutanten, analog zu den LRRK2-Mutationen generiert und experimentell analysiert (Weitere LRRK2-Mutationen wurden nicht berücksichtigt, da diese erst kürzlich veröffentlicht worden sind [56, 57, 114, 115].) Keine der LRRK1-Mutanten zeigte einen messbaren Verlust der GTP-Bindung, obwohl zwei der Mutationen innerhalb der GTP-bindenden Roc-Domäne liegen. Mit Hilfe der Kristallstruktur des H-Ras-Proteins konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Mutationen außerhalb der theoretisch erwarteten GTP-Bindungstasche liegen sollten und möglicherweise deshalb deren Bindungsaktivität nicht beeinflussen.



Die Autophosphorylierungsaktivität der LRRK2-analogen Mutanten war hingegen in drei von vier Fällen deutlich reduziert. Im Einzelnen führten Mutationen sowohl in der Roc-Domäne (LRRK1-K745G analog zu LRRK2-R1441G [64]) als auch in der Kinasedomäne (LRRK1-I1411T analog zu LRRK2-I2020T [64]) zu einer generellen Reduktion der Kinaseaktivität, wobei die GTP-induzierte Aktivierbarkeit erhalten blieb. Der Effekt der LRRK1-I1411T kann durch die Tatsache erklärt werden, dass sich die Mutation im *activation loop* der Kinasedomäne befindet, einer Region, die bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Aktivität von Kinasen hat [34, 35]. Die erst kürzlich veröffentlichte LRRK2-Mutation G2019S [51, 55, 60], die ebenfalls in Verbindung zu Parkinson steht, liegt in direkter Nachbarschaft zu LRRK2-I2020T und könnte zu einer vergleichbaren Reduktion der Kinaseaktivität führen. Bemerkenswerterweise führt die Mutation der COR-Domäne (LRRK1-F1021C analog zu LRRK2-Y1699C [64]) zu einem kompletten Verlust der Kinaseaktivität und deren Aktivierbarkeit, so dass die LRRK1 COR-Domäne ein signaltransduzierendes Modul zwischen Roc- und Kinasedomäne darstellen könnte (Abschnitt 4.5.1).

Die LRRK2-I1122V-Mutation liegt innerhalb der LRRs [64] und kann wegen deren repetitiven Charakters nicht eindeutig auf die LRRK1-Sequenz bezogen werden. Somit kann über die Rolle der LRRs in dem vorgestellten Aktivierungsmodell nur spekuliert werden. Möglicherweise üben die LRRs einen stabilisierenden Effekt auf den GTP-induzierten Zustand aus, wie er z.B. auch für die Ras-Raf-Interaktion durch das LRR-Protein Sur-8 beschrieben worden ist [136]. Diese These wird unterstützt durch die Klassifizierung der LRRs der LRRK1 zur Gruppe der Ras-bindenden LRRs (Abschnitt 3.1.2).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LRRK2, wie LRRK1, eine GTP-regulierte Kinase ist und dass die entdeckten LRRK2 Mutationen zu einer abgeschwächten Kinaseaktivität führen, die letztendlich Auslöser für die Entwicklung der Parkinson-Krankheit sein könnte. Darüber hinaus wurde vor kurzem die cytosolische Lokalisation transient exprimierter LRRK2 veröffentlicht [137]. Dieser erste *in-vitro*-Befund stellt gleichzeitig die erste experimentelle Übereinstimmung zwischen LRRK1 und LRRK2 dar, wie die Ergebnisse des Abschnitts 3.3 zeigen.

#### **4.6.3 LRRK1 als möglicher Pathogenesefaktor für neurodegenerative Erkrankungen**

Der *knock-down* des Lrk-1-Proteins, dem zu LRRK1 orthologen Protein aus *C. elegans*, resultiert in einer Mislokalisierung des SNB1-Proteins in neuronalen Zellen [47]. Das zu SNB1 homologe Protein aus *H. sapiens*, Synaptobrevin/VAMP2, wiederum ist in die Fusion

exzitatorischer Vesikel mit der Plasmamembran von Neuronen involviert [48]. Demzufolge könnte das LRRK-Typ-ROCO-Protein Lrk-1 direkt oder indirekt in den Ablauf synaptischer Prozesse involviert sein. Darüber hinaus kann wegen des ausgeprägten Verwandtschaftsgrades der ROCO-Proteine untereinander, der insbesondere zwischen LRRK1 und LRRK2 hoch ist, über eine Rolle der LRRK1 in neuronalen Prozessen, bzw. neurodegenerativen Krankheiten spekuliert werden. In dieser Hinsicht ist es bemerkenswert, dass das LRRK1-Gen in einer Region liegt (15q26.3), die bereits zuvor in einer hochauflösenden genetischen Assoziationsstudie mit der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht wurde [138].

Alzheimer und Parkinson sind beides neurodegenerative Krankheiten, deren klinisches Erscheinungsbild unter anderem durch cytoplasmatische Einschlüsse von  $\alpha$ -Synuklein (Lewy-Körperchen in Parkinson) bzw. von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Alzheimer) oder durch extrazelluläre Agglomeration von  $\beta$ -Amyloid-Protein (Alzheimer) geprägt ist [77, 78].

Die Unterscheidung zwischen so genannten Tauopathien und  $\alpha$ -Synukleinopathien ist jedoch nicht vollkommen strikt auf Grund der teilweise überlappenden Symptome. So entwickeln Alzheimer-Patienten neben  $\beta$ -Amyloid- und Tau- auch  $\alpha$ -Synuklein-Plaques [86] und es wurde in kürzlich erschienenen Arbeiten über Tau-Protein-Ablagerungen im Zusammenhang mit Parkinson berichtet [139, 140]. Darüber hinaus wird zunehmend über die Koexistenz von  $\alpha$ -Synuklein und Tau-Protein in cytoplasmatischen Ablagerungen von Patienten mit neurodegenerativen Krankheiten berichtet [79, 141, 142]. Dies ist in Einklang mit *in-vivo*-Experimenten, in denen gezeigt wurde, dass  $\alpha$ -Synuklein und Tau-Protein synergistisch und gegenseitig ihre Fibrillisierung fördern [143]. Die hier angedeutete Verbindung zwischen neurodegenerativen Erkrankungen könnte somit die Folge eines krankheitsauslösenden Ereignisses sein, wie z.B. Mutationen im LRRK2-Gen [70] – und möglicherweise auch im LRRK1-Gen. Die unterschiedliche Ausprägung der Krankheit ist darüber hinaus abhängig von weiteren genetischen und umweltbedingten Faktoren.

Eine anschließende These zur Funktion der LRRK1 ergibt sich aus den hier dargestellten Fakten in Kombination mit den in Abschnitt 4.6.1 diskutierten Spekulationen über die zelluläre Funktion der ROCO-Proteine. Danach ist es zur Zeit am wahrscheinlichsten, dass Mutationen in LRRK2, und möglicherweise auch LRRK1, Neuronen anfällig gegenüber pathogenen Faktoren für neurodegenerative Krankheiten macht, indem sie die Organisation des Cytoskeletts verändern.