

Leucine-rich repeat kinase 1:
Charakterisierung einer intramolekular
GTP-regulierten Proteinkinase

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Daniel Korr
aus Berlin

Dezember, 2005

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Donner

2. Prof. Dr. V. Haucke

Disputation am 23. März 2006

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Betreuern für ihre Unterstützung während dieser Arbeit bedanken. Dr. Bertram Weiss, der Initiator dieser Arbeit, hat mir eine völlig neue Sichtweise aus bioinformatischer Perspektive auf die Biologie gezeigt. Er hat in unseren Diskussionen stets über die aktuelle Sachlage hinaus richtungsweisend argumentiert und war mir in dieser Hinsicht ein Vorbild. Dr. Bertolt Kreft hat den experimentellen Verlauf dieser Arbeit durch sein fundiertes biochemisches Wissen und sein innovatives Denken entscheidend beeinflusst. Ich habe sehr viel von ihm gelernt. Dr. Luisella Toschi konnte mir während der langwierigen Klonierungsarbeiten immer wieder neue Kniffs und Tricks zeigen (durch die stets offene Tür zwischen meinem Platz und ihrem Büro), die letztendlich zur erfolgreichen Synthese der langen cDNA-Sequenz führten. Alle Drei standen mir während den Hochs und Tiefs dieser Arbeit stets leidenschaftlich mit Rat und Tat zur Seite.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Hans-Dieter Pohlenz, dem Leiter der Abteilung *Genomics & Bioinformatics*, und Prof. Dr. Peter Donner, dem Leiter der Abteilung Proteinchemie und Erstgutachter der Dissertationsschrift, die diese Arbeit ermöglicht haben. Genauso gilt mein Dank Prof. Dr. Volker Haucke, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat als Zweitgutachter diese Arbeit zu bewerten.

Natürlich möchte ich mich auch bei vielen weiteren Kollegen, wie Dr. Claudia Merz, Dr. Florian Prinz und Dr. Detlef Mennerich bedanken, die mir insbesondere bei Fragestellungen in Bezug auf die Durchführung und Auswertung von RNA Interferenz Experimenten eine große Hilfe waren. Ich bin Anja Wegg und Norbert Otto sehr dankbar für ihre freundliche und kompetente Unterstützung während der Kinaseexperimenten in ihrem Labor. Bei all meinen lieben Kollegen und Kolleginnen, insbesondere Andrea, Antje und Jane, möchte ich mich für die fachliche Unterstützung in allen Fragen des Laboralltags und noch vielmehr für die schöne Zeit in dieser Arbeitsgruppe bedanken. Das gilt ebenso für meine Leidensgenossen aus der Doktorrandenrunde Horti, Alice, Kerstin, Jan & Co.

Und zuletzt gilt mein Dank all meinen guten Freunden, meiner Familie und insbesondere meiner Freundin Gerit, die zwar nichts zu dieser Arbeit beigetragen haben, aber ohne die auch nichts Vernünftiges dabei herausgekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Die Domänenarchitektur von ROCO-Proteinen	8
1.1.1	Die Roc-Domäne im Vergleich zu anderen GTPasen	8
1.1.2	Struktur und Funktion der Ankyrin, <i>leucine-rich</i> und WD-40-Repeats	12
1.1.3	Merkmale der Kinasedomänen von ROCO-Proteinen	13
1.2	Mitglieder der ROCO-Proteingruppe	13
1.2.1	MASL1 aus <i>Homo sapiens</i>	13
1.2.2	GbpC, Pats1 und QkgA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	14
1.2.3	CG5483 aus <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.2.4	Lrk-1 aus <i>Caenorabditis elegans</i>	15
1.2.5	LRRK1 und LRRK2 aus <i>Homo sapiens</i>	15
1.2.6	DAPK1 aus <i>Homo sapiens</i>	16
1.3	Neurodegenerative Erkrankungen	16
1.3.1	Parkinson-Krankheit	16
1.3.2	Alzheimer-Krankheit	17
1.4	Ziel dieser Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.2	Methoden	23
2.2.1	Bioinformatik	23
2.2.2	Zellkultur	24
2.2.3	Molekularbiologische Arbeiten	26
2.2.4	RNA-Analysen	32
2.2.5	Proteinchemische Arbeiten	34
2.2.6	RNAi <i>knock-down</i> und phänotypische Untersuchungen	37

3	Ergebnisse	40
3.1	Bioinformatische Analyse für die Entwicklung experimenteller Ansätze	40
3.1.1	Aufbau des LRRK1-Gens	40
3.1.2	Analyse der Primärstruktur des LRRK1-Proteins	41
3.1.3	Verwandtschaftsgrad zwischen ROCO-Proteinen veranschaulicht mit multiplen Sequenzalignments	43
3.1.4	Vorhersage potentieller LRRK1-Phosphorylierungsstellen	44
3.2	Klonierung der LRRK1-cDNA und Herstellung von Expressionskonstrukten	45
3.3	Transient exprimierte LRRK1 ist im Cytosol lokalisiert	45
3.4	GTP-Bindungsaktivität der LRRK1	47
3.4.1	LRRK1 bindet spezifisch GTP und GDP	47
3.4.2	GTP bindet an die Roc-Domäne	47
3.5	GTP-abhängige <i>cis</i> -Autophosphorylierung der LRRK1	49
3.5.1	Autophosphorylierungsaktivität der LRRK1	49
3.5.2	LRRK1-Kinaseaktivität wird durch GTP stimuliert	51
3.5.3	LRRK1-K650A zeigt keine Autophosphorylierungsaktivität	51
3.5.4	LRRK1-Kinaseaktivität wird selektiv durch GTP stimuliert	52
3.5.5	Die LRRK1-Autophosphorylierung findet intramolekular statt	52
3.5.6	Deletion der WD-40-Repeats führt zum Verlust der Autophosphorylierungsaktivität	53
3.6	Effekte von Parkinson-verursachenden LRRK2 Mutationen in LRRK1	54
3.6.1	Die Bereiche der LRRK2-Mutationen sind konserviert in LRRK1	54
3.6.2	LRRK2-analoge Mutationen in LRRK1 beeinflussen die GTP-Bindung nicht	55
3.6.3	LRRK2-analoge Mutationen in LRRK1 verringern die Autophosphorylierungsrate	55
3.7	Transient exprimierte LRRK1-Fragmente interagieren miteinander	57
3.8	Das Expressionsprofil der LRRK1 zeigt eine ubiquitäre Gewebeverteilung	58
3.9	Experimente zur Aufklärung der LRRK1-Funktion	60
3.9.1	LRRK1- <i>knock-down</i> durch RNA-Interferenz	60
3.9.2	Analyse von siRNA-behandelten HeLa-Zellen	61
3.9.3	Analyse des Phosphorylierungsgrades des RLC in transfizierten HeLa-Zellen	61

4	Diskussion	64
4.1	Die Domänenarchitektur der LRRK1	64
4.2	LRRK1 ist eine aktive Proteinkinase	65
4.3	Die GTP-Bindungsaktivität der LRRK1-Roc-Domäne	66
4.4	LRRK1-Kinaseaktivität wird selektiv durch GTP stimuliert	66
4.5	Aktivierungsmodell für LRRK1	67
4.5.1	Der aktivierte Zustand der Roc-Domäne	67
4.5.2	Die Aktivierung der Kinasedomäne	68
4.5.3	Deaktivierung und Relevanz des Aktivierungsmodells	69
4.6	Potentielle physiologische Rolle der LRRK1	70
4.6.1	Einfluss auf die Organisation des Cytoskeletts	70
4.6.2	Funktionelle Gemeinsamkeiten von LRRK1 und LRRK2	71
4.6.3	LRRK1 als möglicher Pathogenesefaktor für neurodegenerative Erkrankungen	72
5	Zusammenfassung	74
6	Summary	75
7	Literaturverzeichnis	76
8	Anhang	83
9	Abkürzungen	94
10	Publikation	95

Abbildungsverzeichnis

1.	Subklassifizierung und Domänenstruktur der ROCO-Proteine	9
2.	Sequenzvergleich der Roc-Domäne mit Ras-ähnlichen GTPasen	10
3.	Dendrogramm der GTPase Familie mit 21 Roc-Domänen und 34 anderen Ras-ähnlichen Domänen	11
4.	Klonierungsstrategie der LRRK1-cDNA	31
5.	Proteindomänen und Sequenzalignment der LRRK1-Protein-Repeats	42
6.	Vorhersage potentieller LRRK1-Phosphorylierungsstellen	44
7.	Zusammenfassung aller verwendeten LRRK1-Expressionskonstrukte	45
8.	Transiente Expression der LRRK1	46
9.	Die LRRK1-Roc-Domäne bindet spezifisch Guanosinnukleotide	48
10.	LRRK1-Autophosphorylierung wird durch GTP stimuliert	50
11.	LRRK1-Autophosphorylierung wird selektiv durch GTP stimuliert	52
12.	<i>cis</i> -Autophosphorylierung und Inaktivität der Deletionsmutante LRRK1- Δ WD-40	53
13.	Konservierung der Parkinson-assoziierten LRRK2-Mutationen in ROCO-Proteinen	54
14.	GTP-Bindungs- und Kinaseaktivität der LRRK2-analogen LRRK1-Mutationen	56
15.	Kopräzipitation der LRRK1 N- und C-terminalen Hälfte	57
16.	LRRK1-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien	59
17.	LRRK1 siRNA <i>knock-down</i> in HeLa-Zellen	60
18.	Phänotypische Untersuchungen an siRNA-behandelten bzw. transfizierten HeLa-Zellen	62
19.	Postuliertes GTP-abhängiges Aktivierungsmodell für LRRK1	68
20.	DNA- und Aminosäuresequenz der humanen LRRK1	83
21.	Multiplere Sequenzalignment der Roc- und COR-Domänen von ROCO-Proteinen verschiedener Organismen	87
22.	Sequenzalignment der einzelnen WD-40-Repeats in den C-Termini von ROCO-Proteinen	89
Tabelle 1: Auflistung der unterschiedlichen LRRK1-EST-Datenbankeinträge		93