



Papel de la proteína LRRK2 en la enfermedad de Parkinson

Autora: Lucía Jiménez Terceño

Tutor: Antonio José Herrera Carmona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Titulación: Grado en Bioquímica

Curso académico: 2022-2023

Universidad de Sevilla

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades de la enfermedad de Parkinson.....	1
1.2. Epidemiología y etiología de la enfermedad de Parkinson	2
1.2.1. <i>Genética de la enfermedad de Parkinson</i>	2
1.3. Neuropatología de la enfermedad de Parkinson.....	3
1.3.1. <i>Alfa sinucleína: proteína clave en la enfermedad de Parkinson</i>	3
1.3.2. <i>Disfunción en los sistemas de eliminación proteicos</i>	4
1.3.3. <i>Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo</i>	4
2. OBJETIVO	6
3. METODOLOGÍA	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4.1. La proteína quinasa LRRK2.....	6
4.1.1. <i>Una proteína con dos funciones enzimáticas distintas</i>	7
4.1.1.1. La actividad quinasa de la proteína LRRK2.....	7
4.1.1.2. La actividad GTPasa de la proteína LRRK2	8
4.1.2. <i>Mecanismo de acción de la proteína LRRK2</i>	8
4.1.3. <i>Los sustratos de la proteína LRRK2</i>	9
4.2. Papel de la proteína LRRK2 en la enfermedad de Parkinson	11
4.2.1. <i>Sistema endolisosomal</i>	11
4.2.1.1. Tráfico de vesículas.....	12
4.2.1.2. Red <i>trans</i> -Golgi.....	13
4.2.1.3. Autofagia.....	14
4.2.1.4. Autofagia mediada por chaperona.....	14
4.2.1.5. Lisosomas.....	15
4.2.2. <i>Función mitocondrial</i>	16
4.2.2.1. Interacción mitocondria-retículo endoplásmico	17
4.2.2.2. Mitofagia	18
4.2.2.3. Transporte mitocondrial axonal.....	18
4.2.3. <i>Tráfico de vesículas y motilidad del citoesqueleto</i>	19
4.2.3.1. Transporte y maduración de vesículas autofágicas	19
4.2.3.2. Dinámica del citoesqueleto	20
4.2.4. <i>Apoptosis inducida por LRRK2</i>	22
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	23
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

ABSTRACT

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la aparición de alteraciones motoras debidas a la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Aunque la mayoría de los casos son de naturaleza esporádica, un pequeño porcentaje se debe a mutaciones en ciertos genes. Uno de los genes implicados en la enfermedad codifica para LRRK2, una proteína grande y compleja constituida por diversos dominios de interacción con proteínas y una región enzimática con actividad quinasa y GTPasa, que se encuentra involucrada en una gran variedad de procesos celulares. Dado el importante papel de LRRK2 en la patogenia de la enfermedad de Parkinson, se están desarrollando estrategias para controlar su función, abriéndose un nuevo campo en la investigación para el tratamiento de la EP.

KEYWORDS: Enfermedad de Parkinson, proteína quinasa rica en repeticiones de leucina 2 (LRRK2), *substantia nigra pars compacta*, actividad quinasa, actividad GTPasa, Rab GTPasas, disfunción mitocondrial, sistema endolisosomal

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo complejo caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas localizadas en una estructura mesencefálica denominada *substantia nigra*, específicamente en su *pars compacta* (SNpc) [1]. Como consecuencia de esta denervación dopaminérgica, se produce una alteración del funcionamiento fisiológico de los ganglios basales que afecta principalmente al núcleo estriado. La depleción del neurotransmisor dopamina (DA) subyace a los síntomas primarios de la enfermedad, que se caracteriza también por la presencia de cuerpos de Lewy (CLs) [2].

El rasgo más reconocible de la EP es el deterioro de la capacidad motora, que se manifiesta con la aparición de la triada motora característica de dicho trastorno: bradiquinesia y aquinesia, rigidez y temblor en reposo; además, algunos pacientes muestran inestabilidad postural a medida que la enfermedad progresa [3]. Por todo ello, la EP se ha considerado clásicamente como un trastorno motor y se ha estudiado como tal. No obstante, en las últimas décadas se ha demostrado que esta patología también presenta síntomas no motores en su fase prodrómica, entre los que destacan el deterioro cognitivo, los trastornos del sueño (incluyendo alteraciones en la fase REM), la depresión, la anosmia, el cansancio y la fatiga y la apatía, entre otros [4].

1.2. Epidemiología y etiología de la enfermedad de Parkinson

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. La prevalencia de la EP se estima en 0,3% en la población general, 1,0% en mayores de 60 años y 3,0% en personas mayores de 80 años. La incidencia estimada es de 8 a 18 casos por 100 000 habitantes/año [5].

La EP se ha considerado tradicionalmente un trastorno esporádico de causa desconocida, siendo la edad el principal factor de riesgo [5,6]. En realidad, las evidencias indican que es un trastorno multifactorial con una etiología muy compleja, en buena parte, aún desconocida. Sustancias como la 1-metil-4-fenil tetrahidropiridina (MPTP) [7,8], el 1-metil-fenilpiridinio (MPP⁺), la rotenona o el disolvente tricloroetileno causan disfunción mitocondrial y aumentan el riesgo de padecer la enfermedad [9,10]. Se está investigando el riesgo asociado a la exposición a metales pesados (hierro, cobre, aluminio, zinc y plomo), aunque aún no se ha encontrado una relación clara con la EP [11]. En cambio, hay una asociación inversa entre el riesgo de padecer la EP y el tabaquismo, o el consumo de cafeína y de antiinflamatorios no esteroideos [12,13,14]. La mayoría de los estudios sugieren que para el inicio y el desarrollo de la EP es necesaria una cierta predisposición genética además de una exposición continua a diversos agentes tóxicos. La predisposición a la EP es independiente de la raza, aunque no del sexo biológico. Diversos estudios epidemiológicos muestran que la enfermedad es 1,5 a 2 veces más frecuente en hombres que en mujeres, lo que ha sugerido una posible acción protectora de los estrógenos [15,16].

1.2.1. Genética de la enfermedad de Parkinson

Aunque la mayoría de los casos diagnosticados son idiopáticos, en torno un 5-15% son debidos a mutaciones genéticas específicas y se corresponden con una aparición temprana de la enfermedad. Esta versión de la enfermedad presenta una forma de herencia mendeliana autosómica dominante o recesiva [17]. Los genes que se han identificado como causa potencial de EP se designan como *PARK* en el orden en el que han sido identificados [3]. A día de hoy, se han identificado 23 genes *PARK* asociados a la EP. La implicación de algunos de estos genes, como *PARK5*, *PARK11*, *PARK13*, *PARK18*, *PARK21* o *PARK23*, aún no se ha confirmado con certeza. Por el contrario, los genes *PARK3*, *PARK10*, *PARK12*, *PARK16* y *PARK22* constituyen un factor de riesgo importante para la enfermedad [3]. Las mutaciones con mayor interés se localizan en los genes que codifican para las proteínas α -sinucleína, LRRK2, PINK1, DJ-1 y parkina [17].

Los genes *PARK1/4* y *PARK8* se correlacionan con versiones autosómicas dominantes de la enfermedad. El gen *SNCA* (*PARK1*) codifica para la proteína α -sinucleína, el principal componente de los cuerpos de Lewy. Las mutaciones en este gen son muy penetrantes y se relacionan con un rápido progreso de la enfermedad tanto en las versiones de aparición temprana como tardía [17]. El gen *LRRK2* (*PARK8*) codifica para la proteína multidominio LRRK2, en la que se han identificado 7 mutaciones patogénicas, siendo la variante G2019S la más común [3]. Las principales mutaciones autosómicas recesivas tienen lugar en los genes *PRKN* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*) y *DJ-1* (*PARK7*), relacionadas con la aparición temprana de la enfermedad [18]. Estos genes se han relacionado con la homeostasis mitocondrial, estando las proteínas PINK1 y parkina (codificada por el gen *PRKN/PARK2*) implicadas en la misma vía de control mitocondrial [3]. Finalmente, asociados a parkinsonismos atípicos se encuentran algunos genes autosómicos recesivos, entre los que se incluyen *ATP13A2* (*PARK9*), *PLA2G6* (*PARK14*), *FBX07* (*PARK15*) y *SYNJ1* (*PARK20*) [3].

1.3. Neuropatología de la enfermedad de Parkinson

Las características fisiopatológicas principales de la EP son la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la presencia de los cuerpos de Lewy [19]. Se ha estimado que cuando comienzan los síntomas motores se han perdido aproximadamente el 30% de estas neuronas dopaminérgicas. Tras la aparición de los síntomas motores, la pérdida neuronal puede superar el 60%. Esto conlleva a la denervación de la vía nigroestriada, lo que explica la aparición de los síntomas motores de la enfermedad [3].

1.3.1. Alfa sinucleína: proteína clave en la enfermedad de Parkinson

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos perteneciente a la familia de las sinucleínas, que incluye a las β y γ -sinucleínas. En humanos existen 3 isoformas de esta proteína generadas mediante splicing alternativo. La forma principal de la proteína presenta una longitud de 140 aminoácidos, mientras que las dos isoformas restantes tienen 126 y 112 aminoácidos, derivadas de la delección de los exones 3 y 5, respectivamente [20].

La α -sinucleína está implicada en el control de los procesos y la biogénesis de las membranas sinápticas, en el control de la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad sináptica [20,21]. La región amino terminal interacciona con las membranas lipídicas modificando la fluidez de las mismas. Asimismo, esta proteína juega un papel importante en la regulación de las funciones sinápticas al interactuar y modular la acción de diversas proteínas implicadas en los procesos de tráfico, exocitosis y liberación de las vesículas sinápticas. Otra

de las funciones de la α -sinucleína es la interacción con componentes del citoesqueleto, garantizando un correcto transporte axonal [21].

La acumulación de proteínas mal plegadas en determinadas zonas del cerebro es un rasgo característico de algunas enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer y la EP [3,22]. Al perder su conformación nativa, muchas proteínas adquieren una estructura amiloide fibrilar ordenada rica en láminas beta, que son más propensas a la agregación y generan oligómeros que finalmente acabarán formando las fibras y los agregados de mayor tamaño [3,22]. La concepción de la enfermedad de Parkinson como proteinopatía tiene como punto central la agregación de la α -sinucleína, el principal componente de los cuerpos de Lewy (CLs) [23,24]. Los CLs son pequeñas inclusiones citoplasmáticas localizadas en los cuerpos neuronales dopaminérgicos, que con frecuencia están acompañados de neuritas de Lewy [23]. Además de α -sinucleína, los CLs incluyen otras moléculas tales como ubiquitina, tau, parkina, proteínas de choque térmico, proteínas oxidadas/nitradas, elementos lisosómicos y proteasomales y proteínas del citoesqueleto, entre otros [25]. Braak et al. (2003) presentaron un modelo de progresión de la EP basándose en la distribución y localización de los CLs, proponiendo que los CLs se extienden de forma rostrocaudal a través del cerebro, lo que puede explicar la aparición de los síntomas no motores y motores característicos de la enfermedad [26].

1.3.2. Disfunción en los sistemas de eliminación proteicos

Una de las principales características de las proteinopatías es la acumulación anormal de proteínas debido a fallos en los sistemas de eliminación. Los dos elementos más destacables son el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la vía autofagia-lisosomal [3]. Mutaciones en los genes que codifican componentes esenciales de estos dos sistemas (PINK1, parkina, ATP13A2, GBA1, UCH-L1) conducen a la acumulación de proteínas y orgánulos defectuosos, causando la muerte neuronal [17].

1.3.3. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

El daño mitocondrial es un elemento importante en la patogénesis de la EP. La alteración del complejo I mitocondrial debido a la exposición a tóxicos [7,8,9] produce una depleción energética en las neuronas, lo que conlleva la muerte neuronal [27]. No obstante, la deficiencia en el complejo mitocondrial I no es el único causante de la disfunción mitocondrial. Se han descrito algunos genes responsables de la versión familiar de la EP que juegan un papel crucial en la homeostasis mitocondrial [17], entre los que destacan aquellos que codifican para las

proteínas PINK1 y parkina, encargadas de la eliminación de las mitocondrias disfuncionales en un proceso conocido como mitofagia, que garantiza el correcto funcionamiento mitocondrial [27,28]. Mutaciones en parkina y PINK1 impiden la eliminación de las mitocondrias dañadas, originando versiones autosómicas recesivas de la enfermedad de Parkinson [3].

Otro elemento importante en el control del estrés oxidativo es la proteína DJ-1, que actúa como antioxidante en este tipo de condiciones. Se ha demostrado la actividad chaperona de DJ-1, que impide la agregación de α -sinucleína y la toxicidad bajo condiciones de estrés oxidativo [29]. Las mutaciones en esta proteína, que favorecen la agregación y formación de fibras de α -sinucleína, son causantes de versiones autosómicas recesivas de la enfermedad.

La disfunción mitocondrial no solo provoca una depleción energética en la célula sino la generación de estrés oxidativo. El aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a alteraciones en las mitocondrias produce daño en el ADN, peroxidación lipídica y oxidación proteica, lo que conlleva una anomalía en el funcionamiento normal de la célula y la muerte celular [17,27]. Algunos de estos mecanismos bioquímicos de neurodegeneración que tienen lugar en la EP se resumen en la Figura 1.

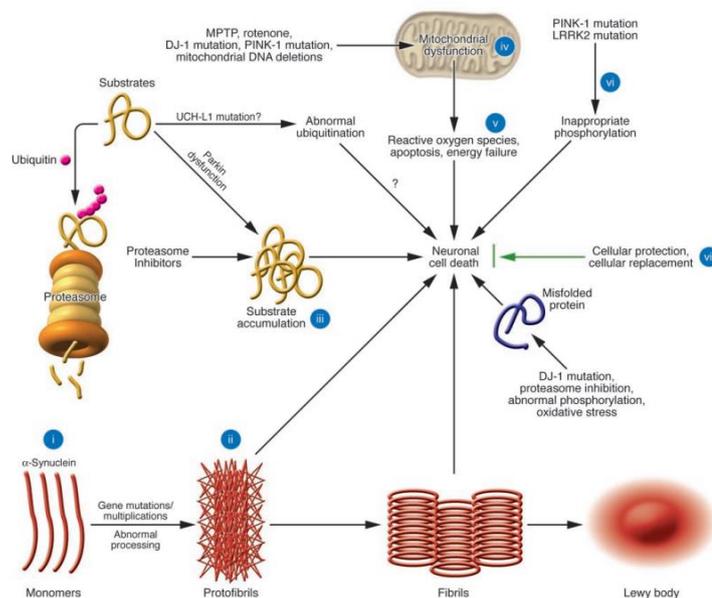


Figura 1. Mecanismos bioquímicos de la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson (imagen tomada de la referencia 29).

2. OBJETIVO

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión actualizada acerca de las implicaciones de la proteína LRRK2 en la enfermedad de Parkinson. Se revisarán los conocimientos existentes sobre las funciones de LRRK2, la forma en que estas se alteran debido a mutaciones y cómo esto constituye un factor importante en el desarrollo de esta enfermedad.

3. METODOLOGÍA

Para alcanzar el objetivo propuesto en este trabajo, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica empleando las bases de datos PubMed, Scopus, Google Scholar y Web of Science. Para la búsqueda inicial se han utilizado palabras claves generales como “Parkinson’s disease”, “ α -synuclein”, “dopaminergic cell death”, “genetics Parkinson’s disease”, “neurodegeneration”, “leucine-rich repeat kinase 2” y “LRRK2 pathogenic”; esta búsqueda se ha ido refinando con términos más específicos derivados de la información encontrada en la anterior. Se han utilizado como criterios de cribado para la selección de los artículos la fecha de publicación y el factor de impacto de la revista. Los criterios de inclusión fueron artículos científicos publicados en su gran mayoría entre 2010-2023, en inglés y accesibles mediante la Biblioteca de la Universidad de Sevilla. No obstante, algunos artículos consultados datan de fechas anteriores a 2010, que resultaron útiles para apoyar conceptos o características generales de las cuestiones que se plantean en este trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. La proteína quinasa LRRK2

La quinasa con repeticiones ricas en leucina (LRRK2) es una proteína compleja de 2527 aminoácidos que presenta un peso molecular de 268 kDa. El locus que codifica para esta proteína (*PARK8*) se localiza en el cromosoma 12p11.2-q13.1 en humanos [30].

LRRK2 es una proteína grande y multifuncional que consta de dos dominios enzimáticos: un dominio GTPasa (ROC-COR) y un dominio quinasa (KIN). El dominio GTPasa ROC-COR lleva a cabo la hidrólisis de GTP, mientras que el dominio serina/treonina quinasa está involucrado en la fosforilación de diversos sustratos (Figura 2). Este centro catalítico está flanqueado por diversos dominios conservados que están implicados en interacciones proteína-proteína, tales como un dominio armadillo (ARM), un dominio anquirina (ARK) y un dominio con repeticiones ricas en leucina (LRR) situados en la región N-terminal, y una región C-terminal con un dominio WD40 [31,32]. Además de las actividades

catalíticas ya mencionadas, LRRK2 es una proteína importante por su función de andamiaje, implicada en la formación de complejos de señalización multiproteicos [31].

Los primeros estudios de GWAS efectuados sobre la EP permitieron identificar diversas mutaciones en esta proteína, algunas de las cuales son consideradas variantes patogénicas, otras se han identificado en pacientes aislados y otras constituyen factores de riesgo para la EP [33, 34]. No obstante, mediante el refinamiento de las técnicas de análisis de variación genética, a día de hoy se han identificado 7 mutaciones patogénicas de esta proteína involucradas en la EP. Estas mutaciones dominantes patogénicas se localizan en la región central de la proteína (Figura 2), lo que demuestra la importancia de los dominios enzimáticos de la proteína LRRK2 en la EP. Todas estas mutaciones conducen a una ganancia de función de la actividad quinasa de la proteína LRRK2 [35].

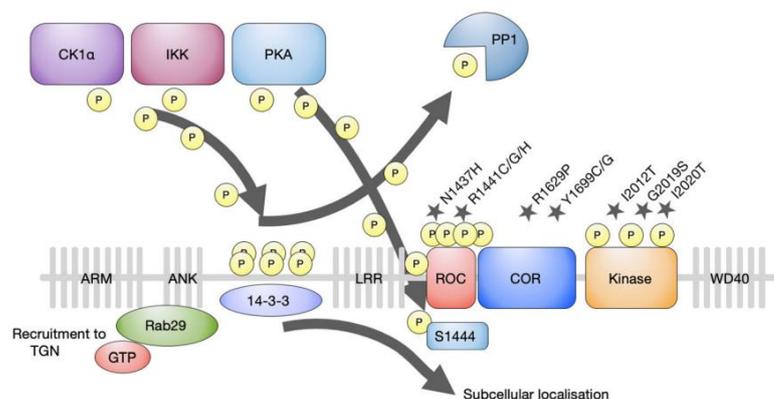


Figura 2. Estructura de la proteína humana LRRK2. Representación esquemática de la proteína LRRK2 junto con las principales mutaciones patogénicas asociadas con la EP (representadas con una estrella), los sitios de autofosforilación y residuos susceptibles a la fosforilación por diversas quinasas (CK1α, IKK, PKA) y desfosforilación (PP1). Asimismo, se muestran las regiones de interacción con las proteínas 14-3-3 y Rab29 (imagen tomada de la referencia 36).

4.1.1. Una proteína con dos funciones enzimáticas distintas

4.1.1.1. *La actividad quinasa de la proteína LRRK2*

El gran interés por el estudio del dominio quinasa de la proteína LRRK2 radica en la presencia de la mutación G2019S, la variante patogénica más frecuente en pacientes con EP. El residuo G2019 se localiza en el segmento de activación del dominio quinasa de la enzima, y la variante patogénica G2019S corresponde a un mutante de ganancia de función, al producir un aumento de la actividad quinasa de la proteína en comparación con la versión silvestre de la misma [35,37] que correlaciona con un incremento de la toxicidad neuronal *in vivo* [38]. En base a los modelos estructurales existentes de la proteína, ha surgido una hipótesis que afirma que la sustitución de glicina por serina en este residuo provoca la permanencia de la proteína LRRK2 en un estado activo persistente, que podría explicar este incremento de la actividad quinasa asociado a esta mutación. La presencia del pequeño residuo de glicina en el lazo de

activación de la región DYG facilita la flexibilidad de este lazo. La mutación de este residuo a serina bloquea esta conformación de la proteína en un estado más activo debido a la interacción de esta serina con un residuo de histidina localizado en la hélice adyacente estabilizando esta conformación activa [39].

Los residuos adyacentes al G2019 también son sensibles a las mutaciones. La tirosina de la posición 2018, localizada en este motivo DYG, es un residuo clave en la modulación de la activación del dominio quinasa de la proteína. La mutación Y2018F se correlaciona con un aumento de la actividad quinasa, al igual que sucede con la mutación G2019S [40]. Otra de las mutaciones del dominio quinasa es la variante I2020T, que también se localiza en el lazo de activación. Algunos estudios han demostrado que esta mutación tiene un menor efecto en comparación con la variante G2019S debido a que la sustitución de isoleucina por treonina no produce un cambio conformacional del sitio activo de la enzima [41].

4.1.1.2. La actividad GTPasa de la proteína LRRK2

Aunque la actividad GTPasa de la proteína LRRK2 no reciba tanto interés como el dominio quinasa, las mutaciones en los dominios ROC-COR también tienen relevancia en la patogenicidad de esta proteína en la EP. En el dominio ROC, el residuo R1441 presenta 3 mutaciones (R1441C, R1441G y R1441H). En este mismo dominio se localiza la mutación N1437H mientras que en el dominio COR se sitúa la mutación Y1699C. Estas mutaciones están implicadas en el aumento de la afinidad de la proteína por GTP, en la disminución de la hidrólisis de GTP o en ambas acciones, de forma que se potencia el estado de LRRK2 unido a GTP y, por tanto, se favorece su actividad quinasa [36]. Es interesante que algunas de estas mutaciones, tales como R1441C, R1441G y Y1699C, pueden afectar a la actividad quinasa de la enzima. Esto muestra la relación que existe entre las distintas regiones de la proteína y el dominio quinasa, lo que indica la importancia de las interacciones intramoleculares para la función quinasa de la proteína LRRK2 [42,43].

4.1.2. Mecanismo de acción de la proteína LRRK2

La presencia de ambos dominios enzimáticos en la misma cadena polipeptídica hace pensar que pueda existir un nexo entre la actividad GTPasa y la actividad quinasa en la proteína LRRK2. Diversos estudios postulan que ambos dominios interactúan entre sí, afirmando que la unión de GDP y GTP al dominio GTPasa ROC-COR influye en la conformación y actividad de LRRK2 [42]. La unión de GTP a LRRK2 estimula la actividad quinasa.

En las células, LRRK2 se puede encontrar en estado monomérico y dimérico, teniendo ambas formas de la proteína importantes funciones celulares. La forma dimérica es abundante en las membranas intracelulares y presenta una elevada actividad quinasa, mientras que el estado monomérico de la proteína es predominante en el citosol y posee una menor actividad quinasa [44]. Por tanto, la dimerización es un mecanismo regulador importante de la actividad de la proteína.

El cambio de estado monomérico/dimérico de LRRK2 está determinado por la unión GTP/GDP al dominio G de la proteína. LRRK2 se considera una GTPasa “tipo GAD”, es decir, una GTPasa activada por dimerización (GAD). En base a esta hipótesis sobre la actividad GTPasa de la proteína, Deyaert et al. (2019) propusieron un modelo de activación de LRRK2 que implica un proceso de dimerización regulado por la actividad GTPasa de la propia proteína, que promueve la acción quinasa [45]. No obstante, cabe destacar que este mecanismo de dimerización e interacción entre las actividades quinasa y GTPasa de LRRK2 es más complejo, debido a la existencia de sitios de autofosforilación en toda la estructura de la proteína (Figura 2). Aunque no hay estudios suficientes que expliquen los efectos producidos por la autofosforilación, la existencia de estos residuos muestra una relación bidireccional entre las dos actividades enzimáticas [43].

4.1.3. Los sustratos de la proteína LRRK2

Debido a la gran importancia de la actividad quinasa de LRRK2, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar los sustratos de esta proteína. En base a estudios de fosfoproteómica, genética y farmacología, Steger et al. identificaron un subconjunto de pequeñas proteínas Rab GTPasas como sustratos fisiológicos de LRRK2. La fosforilación de estos sustratos se produce en un residuo conservado del dominio interruptor II, conocido por su papel en el intercambio GDP/GTP y su interacción con proteínas reguladoras [46,47]. Este análisis mostró la fosforilación de 14 proteínas Rab (Rab3a/b/c/d, Rab5a/b/c, Rab8a/b, Rab10, Rab12, Rab29, Rab35 y Rab43) por LRRK2, siendo solo 10 de estas proteínas sustratos endógenos (Rab3a/b/c/d, Rab8a/b, Rab10, Rab12, Rab35 y Rab4) [48]. Las proteínas Rab GTPasas son reguladores esenciales del tráfico de membrana en las células eucariotas [49]. Este descubrimiento evidencia el papel de la proteína LRRK2 en la membrana y el tráfico de vesículas. Las mutaciones patogénicas en LRRK2 inducen una hiperfosforilación de Rab, favoreciendo la inclusión de Rab en las membranas y su disociación de las proteínas GIDs. De esta forma el pool de Rab en el citosol disminuye y, por consiguiente, se produce una alteración

en el tráfico intracelular debido a la acumulación de Rab inactiva en las membranas celulares [46].

Aunque las proteínas Rab GTPasas son sustratos de LRRK2, Rab29 es capaz de actuar *upstream* LRRK2. Rab29 (Rab7L1) es capaz de atraer a LRRK2 a la red *trans*-Golgi, al interactuar con su dominio anquirina. De esta forma se potencia la actividad quínasa de la proteína al autofosforilarse el residuo Ser1292 por la propia LRRK2 y al fomentar la fosforilación de sus sustratos. Esta hipótesis es conocida como la “cascada Rab29-LRRK2-Rab8/10” (Figura 3) y podría explicar las funciones fisiológicas de LRRK2. Además de la autofosforilación del residuo Ser1292, se promueve la fosforilación de un clúster de residuos susceptibles a fosforilación en LRRK2 (Ser910, Ser935, Ser955 y Ser973). Se desconoce si estos residuos susceptibles a la fosforilación son fosforilados por la propia LRRK2 o por otras quinasas *upstream* LRRK2 [50]. Asimismo, la autofosforilación en la Ser1292 está favorecida por diversas mutaciones en LRRK2 *in vivo*, entre las que se incluyen N1437H, R1441G/C, G2019S y I2020T [51]. Todo esto demuestra que Rab29 actúa como un regulador *upstream* de LRRK2, controlando su localización en el aparato de Golgi y su actividad quínasa. No obstante, también hay evidencias de la fosforilación de Rab29 por LRRK2 para regular y modular la activación de LRRK2 por Rab29, existiendo un posible lazo de retroalimentación negativa entre estos dos elementos [50].

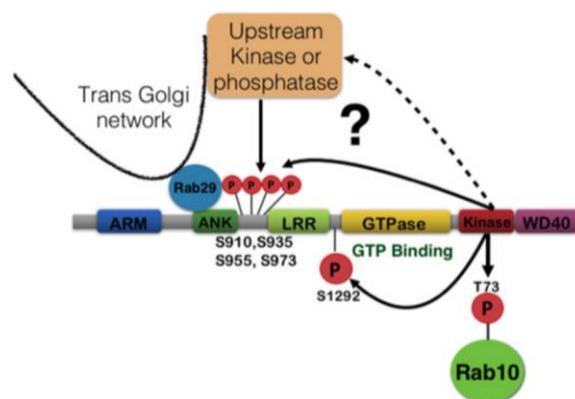


Figura 3. Modelo de activación de LRRK2 mediada por Rab29 (imagen tomada de la referencia 50).

La presencia de dominios de interacción con proteínas alrededor del núcleo enzimático de LRRK2 hace pensar que esta proteína está involucrada en la interacción con otras proteínas. Esta interacción puede influir en los estados de fosforilación de la quínasa. Una de estas proteínas con las que interactúa es la familia proteica 14-3-3, las cuales se unen a ciertos sitios susceptibles a fosforilación en LRRK2, tales como Ser860 (dominio ANK), Ser910, Ser935, Ser955, Ser973 (N-terminal), Ser1444 (dominio ROC) y Thr2524 (C-terminal). La

unión de las proteínas 14-3-3 a LRRK2 inducen su cambio conformacional a un estado inactivo de la quinasa [52]. Asimismo, las proteínas 14-3-3 regulan la localización de LRRK2 (Figura 2). La interrupción de la unión de las proteínas 14-3-3 a LRRK2 favorece la formación de un pool de LRRK2 citosólico [53].

4.2. Papel de la proteína LRRK2 en la enfermedad de Parkinson

Los procesos biológicos celulares en los que está implicada la proteína LRRK2 están muy relacionados con la arquitectura de la misma. Algunos de los mecanismos que se encuentran alterados en la EP debido a mutaciones en LRRK2 se recogen en la Figura 4. Entre estos destacan el tráfico de vesículas, la dinámica del citoesqueleto, la autofagia, la función lisosomal, la neurotransmisión y la función mitocondrial.

A lo largo de esta sección se comentarán las principales funciones patogénicas de la proteína LRRK2 implicadas en la enfermedad de Parkinson.

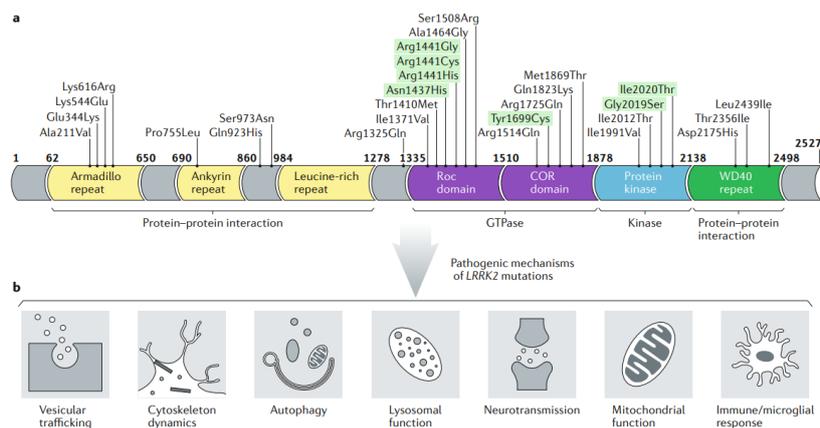


Figura 4. Representación esquemática de los procesos biológicos celulares en los que se encuentra implicada la proteína LRRK2 (imagen tomada de la referencia 54).

4.2.1. Sistema endolisosomal

El sistema endolisosomal es un conjunto de estructuras membranosas que regulan muchas de las funciones celulares, incluyendo la proteostasis, la señalización extracelular e intracelular, la homeostasis de los orgánulos y la organización y estabilidad de la membrana plasmática. La vía clásica se inicia con la endocitosis mediada por clatrina seguido de la fusión con endosomas tempranos. El endosoma temprano actúa dirigiendo a las vesículas hacia tres posibles destinos: 1) de vuelta a la superficie de la membrana, de forma directa o a través de una vía de reciclaje de endosomas, 2) degradación por el sistema ESCRT, 3) transporte retrógrado a la red *trans*-Golgi a través de vías como la del complejo del retrómero. Es interesante cómo la vía endolisosomal está conectada con las vías fagocíticas y autofágicas [55].

Las pequeñas Rab GTPasas se localizan en compartimentos intracelulares, muchos de los cuales intervienen en la vía endolisosomal. Como se comentó anteriormente, estas proteínas son los principales sustratos de la proteína quinasa LRRK2, por lo que es razonable pensar que LRRK2 esté involucrada en algunos de los procesos de la vía endolisosomal [48,49].

En este apartado se revisarán las principales funciones de LRRK2 en el sistema de endomembranas, con especial interés en el tráfico de vesículas, la red *trans*-Golgi y la interconexión de este sistema con los procesos de autofagia y fagocitosis.

4.2.1.1. Tráfico de vesículas

Las disfunciones sinápticas son uno de los primeros eventos en muchas de las enfermedades neurodegenerativas, conllevando graves disfunciones cognitivas [56]. En el caso de la EP, se han identificado varios genes que juegan un papel en la regulación de la actividad presináptica, entre los que se encuentran *SYNJ1*, *DNAJC6* y *LRRK2* [3]. La sobreexpresión de la mutación G2019S en LRRK2 produce disfunciones en el tráfico de vesículas sinápticas [57]. Se han identificado muchas proteínas importantes en el ciclo de las vesículas sinápticas que interactúan física o funcionalmente con LRRK2.

La movilización de las vesículas sinápticas está regulada por la fosforilación/desfosforilación de la sinapsina 1A, lo que controla su unión a la actina [58,59]. Se ha postulado el papel del dominio quinasa de LRRK2 como modulador de la unión sinapsina-actina, controlándose así la estabilidad de los filamentos de actina y/o la unión de las vesículas sinápticas a estos filamentos. Otro sustrato susceptible a la acción de la quinasa LRRK2 es la proteína SV2A, que puede ser fosforilada por la quinasa, lo que aumenta su unión a la sinaptotagmina, favoreciendo la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica [60]. Asimismo, LRRK2 es capaz de modular el estado de fosforilación de NSF, controlando así su interacción con α -SNAP y, por consiguiente, el desensamblaje del complejo SNARE. [61]. En los primeros pasos de la endocitosis de las vesículas intervienen las proteínas dinamina 1, clatrina y el complejo A2. La fosforilación de la dinamina 1 por LRRK2 reduce la formación de las vesículas recubiertas con clatrina. Finalmente, Rab5 es un regulador del tráfico de vesículas que interactúa con LRRK2. La fosforilación de Rab5 por LRRK2 bloquea el tráfico de vesículas en la célula [62]. Todo esto demuestra que LRRK2 interactúa con proteínas que regulan directamente el tráfico de vesículas, que se puede ver inhibido y afectado por mutaciones en LRRK2 (Figura 5).

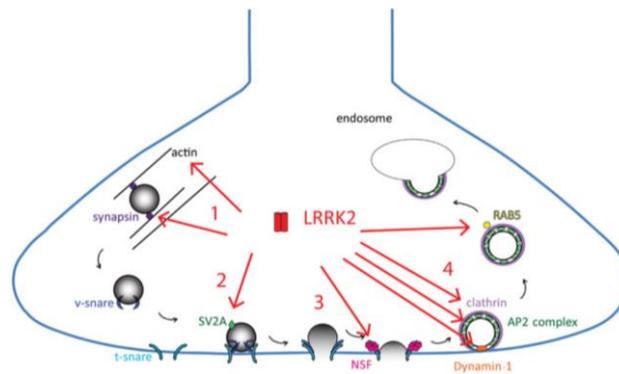


Figura 5. Papel de la proteína LRRK2 en el tráfico de vesículas (imagen tomada de la referencia 63).

4.2.1.2. Red *trans*-Golgi

Uno de los componentes de la red *trans*-Golgi (TGN) es la GTPasa Rab29. Como se comentó anteriormente, Rab29 puede actuar *upstream* de LRRK2 [50]. La sobreexpresión de Rab29 y su asociación a la membrana del aparato de Golgi [64] recluta a la proteína LRRK2 al TGN, donde se autofosforila y activa su actividad quinasa. Como resultado, LRRK2 fosforila a Rab29 y a sus sustratos Rab8a y Rab10 [65]. El complejo Rab29-LRRK2 se encarga de regular el tráfico retrógrado de las vesículas endosómicas al TGN, al interactuar físicamente con el componente VPS52 del complejo GARP, un elemento importante en el TGN [66,67]. El *knockdown* de los componentes del complejo GARP impide el reclutamiento de LRRK2 al TGN, lo que indica que son necesarios todos los componentes del complejo Rab29-LRRK2-GARP para que se produzca el reclutamiento de LRRK2 al TGN [66]. LRRK2 y el componente VPS52 forman un complejo con VAMP4 (vesícula) y STX6 (proteína del TGN), de forma que LRRK2 estabiliza la interacción de las proteínas SNARE con el complejo GARP para facilitar la fusión de las membranas del TGN y de la vesícula (Figura 6). Este efecto de LRRK2 está exagerado en la mutación R1441C. El *knockdown* de LRRK2 disminuye el tráfico retrógrado de CI-M6PR (molécula cargo del complejo GARP) al TGN, pero sorprendentemente también afecta al transporte anterógrado de las proteínas GPI del TGN a la membrana plasmática. A día de hoy no se sabe si el papel de LRRK2 en el transporte anterógrado está relacionado de forma indirecta con la modulación del tráfico retrógrado a través del complejo GARP o si puede ser debido a interacciones directas entre LRRK2 y el transporte anterógrado [55].

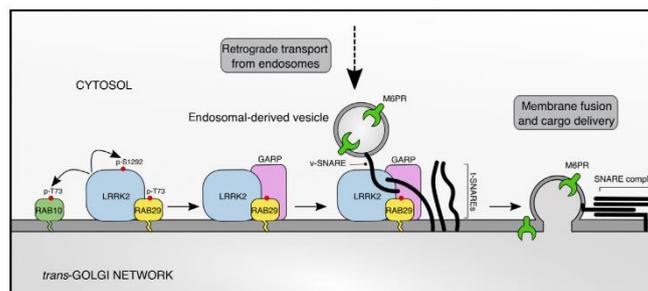


Figura 6. Papel de la proteína LRRK2 en el transporte retrógrado a la red *trans*-Golgi (imagen tomada de la referencia 68).

4.2.1.3. *Autofagia*

Los procesos de autofagia están muy relacionados con el sistema endolisosomal de la célula. En la EP se ha descrito la desregulación de los sistemas de proteostasis debido a la alteración de los sistemas ubiquitina proteasoma (UPS) y autofagia-lisosoma, lo que conlleva a la acumulación de proteínas, sustratos y orgánulos en mal estado que pueden resultar tóxicos para la célula [69]. En este trabajo se revisa el sistema autofagia-lisosoma y su subtipo más conocido, la autofagia mediada por chaperona.

La autofagia es el término referido al proceso catabólico que se encarga de eliminar los componentes citosólicos no funcionales e innecesarios de la célula para su reciclado. Existen tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperona (CMA). El orgánulo por excelencia de estos tres procesos es el lisosoma, pero a diferencia de la microautofagia y la CMA, en la macroautofagia también existe otro elemento adicional: el autofagosoma.

Las implicaciones de LRRK2 en la autofagia no están claras. Algunos estudios muestran la presencia de alteraciones en los niveles de LC3-II y p62 en ratones KO LRRK2 [70]. Ensayos *in vitro*, muestran un aumento en el número de vesículas autofágicas LC3-positivas en células SH-SY5Y con la variante G2019S [71] y aumento de la formación de autofagosomas en células HEK293 con sobreexpresión de LRRK2 [72]. Por el contrario, se ha comprobado que el *knockdown* de LRRK2 y la inhibición de la actividad quinasa estimulan la actividad autofágica [73]. Aunque es evidente el papel de LRRK2 en el proceso de autofagia, aún no se ha elucidado si LRRK2 la facilita o la suprime.

4.2.1.4. *Autofagia mediada por chaperona*

La disfunción en el sistema de autofagia mediada por chaperona (CMA) se ha descrito en la EP [74]. La CMA es un subtipo de autofagia que degrada hasta un 30% de las proteínas citosólicas. Los sustratos de esta vía presentan un motivo KFERQ [74] en su superficie que es reconocido por la chaperona citosólica hsc70, que dirige el sustrato a la membrana del lisosoma donde interacciona con LAMP-2A. Este oligomeriza y forma el complejo de translocación que permite la entrada del sustrato al interior del lisosoma para su degradación proteolítica [75]. Una vez finalizada la degradación del sustrato, se desarma el complejo de translocación y LAMP-2A se degrada para ser reciclado [74].

Dos de los sustratos de esta vía proteolítica son α -sinucleína y LRRK2. LRRK2 presenta una característica peculiar en comparación con otros sustratos de esta vía: la unión de LRRK2

a la membrana del lisosoma se ve favorecida por la presencia de otros sustratos de la vía CMA [75]. Mutaciones en LRRK2 afectan a la organización del complejo de translocación al unirse de forma aberrante a LAMP-2A impidiendo su oligomerización. La inhibición de la CMA por LRRK2 tiene consecuencias en la degradación de otros sustratos como es la α -sinucleína [74,75]. LRRK2 favorece la unión, asociación y oligomerización de α -sinucleína en la superficie lisosomal, impidiendo su translocación y la de otros sustratos al interior del lisosoma para su degradación (Figura 7) [75].

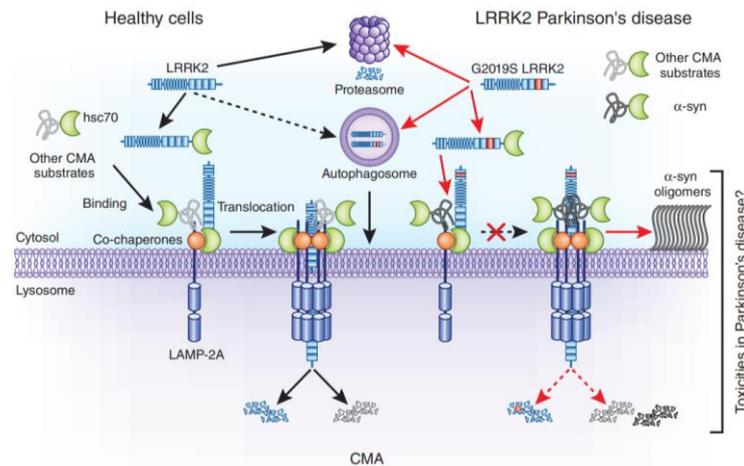


Figura 7. Papel de la proteína LRRK2 en la autofagia mediada por chaperona (CMA) (imagen tomada de la referencia 76).

4.2.1.5. Lisosomas

Aunque los lisosomas cumplen diversas funciones, estos son considerados los principales orgánulos degradativos de la célula. Los lisosomas tienen un papel importante en la EP, al existir diversas mutaciones en genes lisosomales, entre los que destacan *ATP13A* y *GBA*, que constituyen factores de riesgo para las versiones familiares y esporádicas de la enfermedad, respectivamente [77]. Debido a la composición de estos orgánulos, es crucial la existencia de mecanismos encargados de garantizar la correcta funcionalidad de los lisosomas. En este proceso de control de calidad de lisosomas interviene la proteína LRRK2. Un estímulo estresante genera un daño en la membrana lisosomal, produciendo la salida de protones y calcio al citoplasma, que favorece el reclutamiento de la proteína LRRK2 al lisosoma disfuncional. LRRK2 atrae y fosforila a Rab8a, que potencia el reclutamiento de galectina-3 (Gal3) en un proceso mediado por transferrina y su receptor TfR. Asimismo, se recluta el complejo ESCRT-III para la reparación de la membrana dañada [78,79]. No obstante, si el daño persiste se induce la activación de otra vía molecular para eliminar el orgánulo disfuncional. En estas condiciones se produce un aumento de la proteína LRRK2 mediada por Rab29. La quinasa recluta y fosforila a Rab10 y Rab35 en los residuos Thr73 y Thr72, respectivamente, permitiendo el reclutamiento de la proteína JIP4 al lisosoma. JIP4, a través de su dominio RHD2, interacciona con Rab10

fosforilada, reclutando proteínas motoras para formar estructuras tubulares en el lisosoma, que al unirse a estas estructuras se escinde en pequeñas vesículas que interactúan con otros lisosomas. Este proceso es conocido como tubulación lisosomal mediada por LRRK2 (LYTL) (Figura 8) [80].

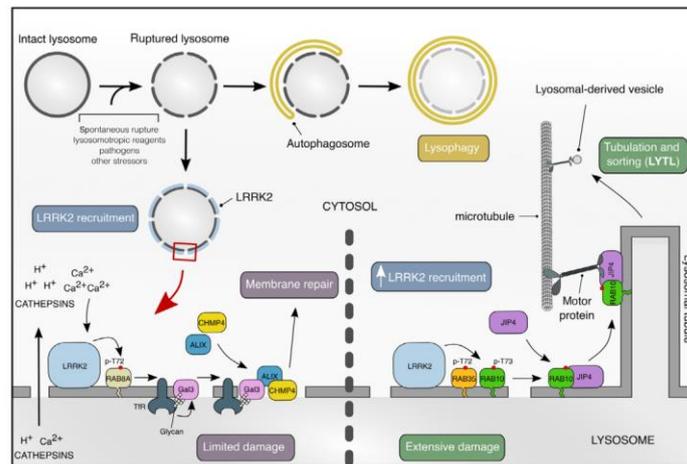


Figura 8. Papel de la proteína LRRK2 en la disfunción lisosomal (imagen tomada de la referencia 68).

Eguchi et al. (2018) propusieron una hipótesis ligeramente distinta. Según estos autores la proteína Rab GTPasa Rab29 recluta a LRRK2 al lisosoma disfuncional, donde la quinasa fosforila a Rab10 en su residuo Thr73, y recluta a Rab8a, la cual atrae a las proteínas efectoras de estas Rab: EHBP1 (efector Rab10) y EHBP1L1 (efector Rab8a). Estos efectos serían los responsables de producir la exocitosis lisosomal y la liberación del contenido no degradado al espacio extracelular, en un proceso aún desconocido (Figura 9) [81].

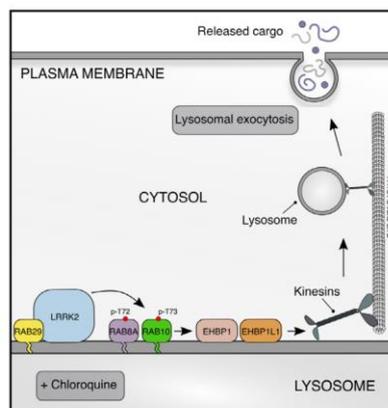


Figura 9. Papel de la proteína LRRK2 en la disfunción lisosomal (imagen tomada de la referencia 68).

4.2.2. Función mitocondrial

La mitocondria es un elemento fundamental en las neuronas dopaminérgicas, por lo que su correcto funcionamiento es esencial para mantener la funcionalidad de estas. LRRK2 interviene en ciertos procesos en los que la mitocondria se encuentra involucrada.

4.2.2.1. *Interacción mitocondria-retículo endoplásmico*

La disfunción mitocondrial es un rasgo de las enfermedades neurodegenerativas, pero la alteración de este orgánulo es de vital importancia en la EP [27]. En torno a un 5-20% de las superficies de la mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) se encuentran asociadas a través de unas regiones denominadas membranas mitocondriales asociadas al retículo endoplásmico (MAMs). Este contacto es importante para mantener la bioenergética de la mitocondria [82] y preservar una variedad de procesos de señalización entre ambos elementos, entre los que se incluyen el intercambio de calcio y fosfolípidos [83,84], la producción de ATP, la autofagia, el correcto plegamiento proteico y la apoptosis, entre otros [84,85].

Sobre la membrana mitocondrial externa se localizan una serie de proteínas E3 ubiquitina ligasas (MARCH5, MULAN y parkina) que se encargan del control de la calidad de las proteínas mitocondriales, además de regular la formación de MAMs y la morfología mitocondrial [86]. Otro aspecto importante a tener en cuenta es el aumento de estrés del RE en pacientes con EP. El estado de estrés en el RE inducidos por diversos estímulos es percibido por la quinasa PERK [87], que activa una vía de señalización mediada por el complejo UPR, que intenta restaurar la homeostasis del RE. Si este sistema falla, se activará el proceso de apoptosis, con el objetivo de eliminar la célula “estresada”.

Hay evidencias que muestran el papel de la proteína LRRK2 en la interacción mitocondria-RE. LRRK2 se une a través de su región N-terminal al dominio RING de las E3 ubiquitinas ligasas, favoreciendo la interacción de proteínas localizadas en las membranas de ambos orgánulos, entre ellas la mitofusina 2, generándose las zonas MAMs. El acercamiento entre ambos orgánulos también permite la interacción entre IP3R y VDAC1 y, por consiguiente, se establece un flujo de calcio entre ambos elementos. La hiperactividad quinasa de LRRK2 promueve la autofosforilación de su residuo Ser1292, lo que conlleva a su disociación de las ubiquitina ligasas y a la fosforilación y activación de las ubiquitinas ligasas en un proceso mediado por PERK. Como resultado se aumenta la degradación de los componentes MAMs y disminuye la interacción mitocondria-RE (Figura 10), produciendo una alteración de la transferencia de calcio entre estos dos elementos y una disminución de la producción de ATP por la mitocondria [88].

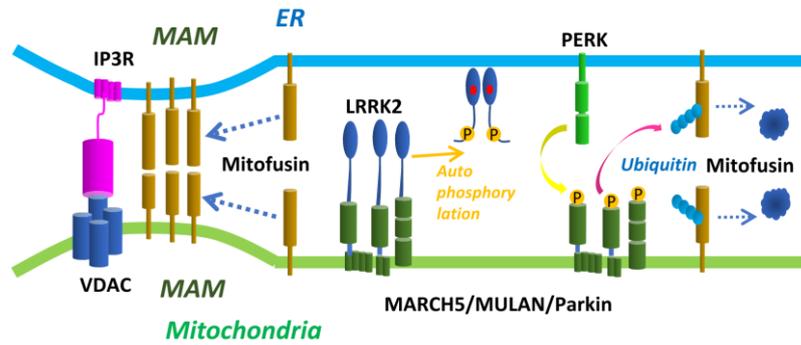


Figura 10. Papel de la proteína LRRK2 en la interacción mitocondria-retículo endoplásmico (RE) (imagen tomada de la referencia 88).

4.2.2.2. Mitofagia

El control de calidad mitocondrial es fundamental para asegurar el correcto funcionamiento del orgánulo, garantizando la producción de energía y evitando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [27]. Durante el proceso de mitofagia, la presencia de PINK1/parkina en la mitocondria despolarizada favorece el reclutamiento de Rab10 a la membrana mitocondrial externa, donde se une al receptor de autofagia optineurina (OPTN), produciendo su acumulación en la mitocondria y, por consiguiente, la formación de un autofagosoma alrededor de la mitocondria disfuncional para su eliminación. La existencia de ciertas formas mutada de LRRK2 (G2019S y R1441C) produce un aumento de la fosforilación de Rab10 en su residuo Thr73, impidiendo su reclutamiento a la mitocondria y deteniéndose la mitofagia (Figura 11) [89].

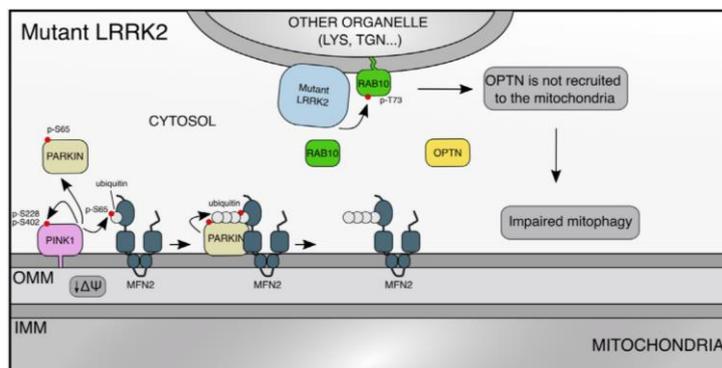


Figura 11. Papel de la proteína LRRK2 en la mitofagia (imagen tomada de la referencia 68).

4.2.2.3. Transporte mitocondrial axonal

Las mitocondrias son orgánulos móviles pero sus movimientos han de estar muy controlados para mantener la homeostasis mitocondrial y evitar el estrés oxidativo. Miro es una proteína localizada en la membrana mitocondrial externa [90] que une a las proteínas motoras dineína y quinesina a la mitocondria para favorecer su movimiento por la célula [91]. Es importante que las mitocondrias dañadas frenen su motilidad para que pueda iniciarse la

mitofagia, proceso que comienza con la eliminación de Miro de la superficie mitocondrial disfuncional [92]. En condiciones fisiológicas, la despolarización de la mitocondria activa la vía PINK1/parkina que ubiquitina a Miro, la cual se une y forma un complejo con LRRK2 en un proceso independiente de la actividad quinasa de LRRK2, desprendiéndose esta de la membrana mitocondrial para que pueda iniciarse el proceso de mitofagia. Bajo condiciones patológicas, LRRK2 no interacciona con Miro, de forma que esta permanece más tiempo unida a la mitocondria, ralentizándose el proceso de mitofagia (Figura 12). Las mitocondrias disfuncionales producen y acumulan ROS, que provocarán la muerte de las neuronas dopaminérgicas [93].

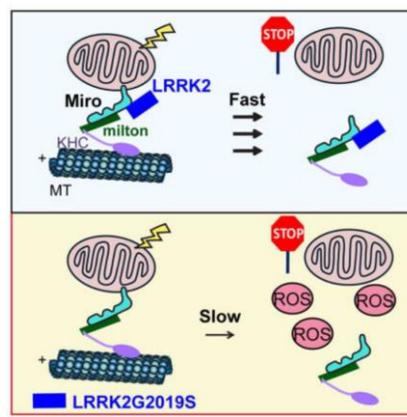


Figura 12. Papel de la proteína LRRK2 en el transporte mitocondrial por el axón (imagen tomada de la referencia 93).

4.2.3. Tráfico de vesículas y motilidad del citoesqueleto

4.2.3.1. *Transporte y maduración de vesículas autofágicas*

El transporte de vesículas autofágicas es primordial para mantener una homeostasis axonal. Estas vesículas autofágicas se generan en los terminales axónicos de las neuronas y deben llegar al soma neuronal [94] mediante un transporte retrógrado mediado por la acción de las proteínas motoras dineínas [95]. A medida que se produce este transporte retrógrado, los autolisosomas van madurando y se van fusionando a lisosomas, disminuye su pH, se activan las enzimas hidrolíticas y se degradan las moléculas cargo de su interior [94].

Hay evidencias que demuestran que la hiperactividad quinasa de LRRK2 afecta el transporte axonal de las vesículas autofágicas. Bajo condiciones fisiológicas, ARF6 favorece la interacción del complejo dineína/dinactina con las proteínas motoras adaptadoras JIP3/4, permitiendo el transporte retrógrado de las vesículas autofágicas [96]. En condiciones patológicas, LRRK2 hiperfosforila a las proteínas Rab GTPasas localizadas en la membrana del autofagosoma, favoreciendo el reclutamiento de JIP3/4 y resultando en una activación anormal de la quinesina. La presencia de ambas proteínas motoras en la membrana del mismo

orgánulo provoca una situación de “tira y afloja” entre los transportes anterógrado y retrógrado, deteniéndose el transporte axonal (Figura 13) [97].

Como consecuencia de la parada del transporte axonal, las vesículas autofágicas no terminan su proceso de maduración, de forma que los sustratos que contienen en su interior no se degradan. Una de las moléculas que se transporta por este sistema de eliminación es la α -sinucleína. Debido a fallos en los sistemas de proteostasis, la excesiva presencia de α -sinucleína mutada o modificada en la neurona puede provocar su agregación (formación de los CLs) en la neurona, o pueden actuar como semillas de agregación y transmitirse a otras neuronas, propagándose la patología de Lewy [98,99].

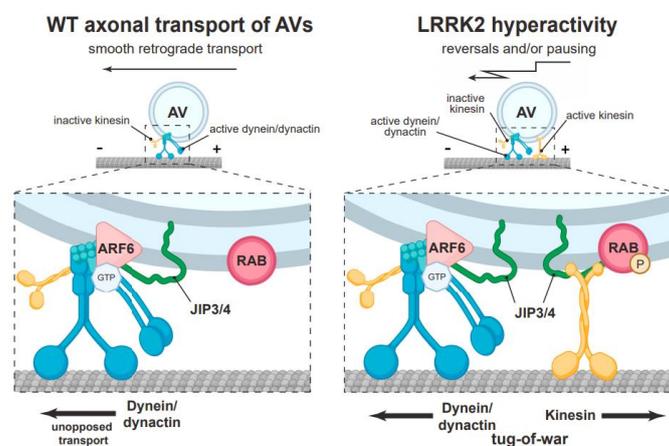


Figura 13. Papel de la proteína LRRK2 en el transporte por el axón y maduración de vesículas autofágicas (imagen tomada de la referencia 97).

4.2.3.2. Dinámica del citoesqueleto

Estudios recientes indican que LRRK2 modula las funciones del citoesqueleto al regular la dinámica de la actina y la tubulina al unirse a los microtúbulos a través de su dominio ROC/GTPasa. Esta interacción requiere de la actividad quinasas de LRRK2, ya que es necesaria la autofosforilación de ciertos residuos. Asimismo, los microtúbulos actúan como un andamio para la organización estructural de LRRK2 y promueven su actividad enzimática [100].

Además de la interacción con los microtúbulos, LRRK2 es capaz de fosforilar a la β -tubulina en el residuo Thr107 de la hélice H3' en presencia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Se postula que la fosforilación de este residuo favorece las interacciones electrostáticas entre β -tubulina y las proteínas MAPs, aumentando la estabilidad del citoesqueleto axonal de microtúbulos y, por consiguiente, restringiendo la dinámica de los mismos [101]. Una desregulación de esta dinámica interfiere en el crecimiento de las neuritas, el transporte axonal, el movimiento de la célula y la formación de sinapsis, lo que puede

conllevar daños y disfunciones consistentes con la patología de tau observados en algunas muestras post-mortem de pacientes con mutaciones en LRRK2 [100,101].

LRRK2 también influye de forma indirecta en la fosforilación de la proteína tau a través de las quinasas Ste20 y PKC Zeta. Mutaciones en LRRK2 afectan a estos procesos celulares, produciendo disfunción sináptica y fragmentación de las neuritas. Cuatro miembros de la familia quinasa Ste20 serina/treonina (TAOK3, STK3, STK24 y STK25) son sustratos de LRRK2, siendo STK24 y STK25 quinasas que interaccionan físicamente con LRRK2 [102]. La quinasa TAOK tiene gran homología de secuencia con la familia de quinasas MARKK [103], las cuales participan en una vía de señalización encargada de la fosforilación de la proteína tau [104]. Debido al aumento de fosforilación de tau en mutantes de sobreexpresión de LRRK2 en modelos de ratones, se postuló que LRRK2 era un elemento de la cascada de señalización TAOK/MARKK→MARK→tau. Esta hipótesis podría explicar la hiperfosforilación de tau en modelos animales de sobreexpresión de LRRK2 y en muestras de pacientes que portan la mutación G2019S [102]. Asimismo, LRRK2 es sustrato de la quinasa PKC Zeta *in vitro*. Ambas quinasas, PKC Zeta y LRRK2, fosforilan a la proteína moesina en su residuo Thr558, lo que sugiere que moesina actúa como un regulador de la elongación de las neuritas [102].

Hay evidencias que indican que la mutación G2019S induce la degeneración de las dendritas provocada por una hiperfosforilación de tau mediada por la quinasa GSK3 β . Esta variante patogénica de LRRK2 se asocia a los microtúbulos a través de su dominio ROC y recluta a GSK3 β a la proximidad del microtúbulo donde fosforila a tau en su residuo Thr212/Ser214 [105]. Esto favorece la desunión de tau del microtúbulo y, por consiguiente, se produce su desensamblaje y fragmentación del mismo, de forma que se ve afectado el transporte axonal. La acumulación de tau en las dendritas produce la degeneración de estas, lo que es un rasgo común en las versiones de la enfermedad de Parkinson en las que LRRK2 se encuentra mutada. Todos estos procesos están recogidos en la Figura 14.

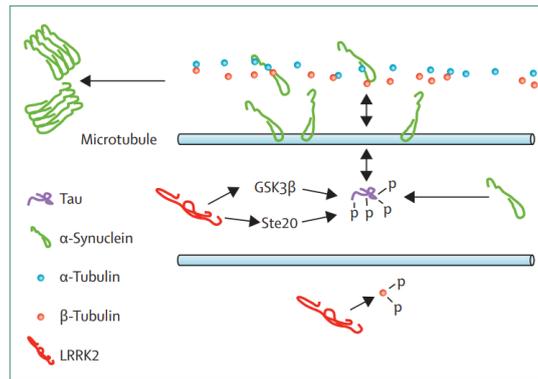


Figura 14. Papel de la proteína LRRK2 en la dinámica del citoesqueleto (imagen tomada de la referencia 106).

4.2.4. Apoptosis inducida por LRRK2

Diversos estudios *in vitro* muestran la participación de la proteína LRRK2 en la activación de la caspasa 8, en un proceso mediado por la interacción de LRRK2 con la proteína adaptadora FADD [107]. Ante determinadas señales, FADD se asocia al receptor Fas a través de su dominio DD (death domain), formando un complejo que recluta y activa a la caspasa 8, que resulta en la muerte de la célula por apoptosis [108]. Los estudios indican el papel de LRRK2 como una proteína andamiaje que potencia el reclutamiento de FADD al complejo II, formado por FADD, TRADD, RIP1, Traff2 [107]. Esta interacción se establece entre el dominio N-terminal armadillo de LRRK2, más concretamente la región comprendida entre los residuos Met532-Lys547, y el dominio DD de la proteína adaptadora FADD [109]. En algunas células, la activación de la caspasa 3 por la caspasa 8 es suficiente para iniciar su muerte [110]. No obstante, en ciertas células es necesario una amplificación de la señal mediada por la escisión y activación de Bid por la caspasa 8. El fragmento tBid se transloca a la mitocondria y favorece la formación del poro BAX-BAK, que permite la salida de ciertos factores como el citocromo c que, junto con la caspasa 9 y Apaf1, activan la formación del apoptosoma (Figura 15) [108].

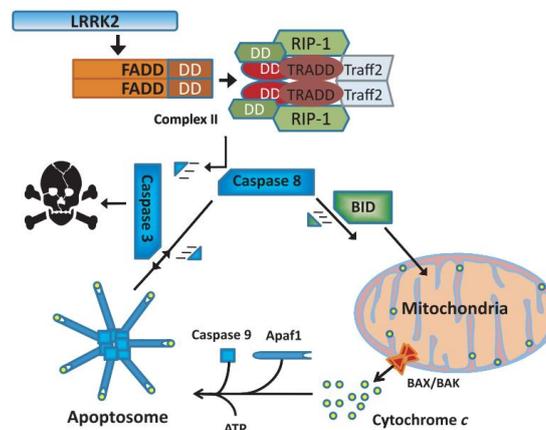


Figura 15. Papel de la proteína LRRK2 en la activación de la muerte celular programada mediada por caspasas (imagen tomada de la referencia 111).

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La EP es una enfermedad muy compleja con una etiología aún desconocida. La edad constituye un factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad en las versiones de naturaleza idiopática [5,6]. No obstante, existe un pequeño porcentaje de casos de EP que son debido a mutaciones en ciertos genes, denominados *PARK* [17]. Uno de estos es el gen *PARK8*, que codifica para la proteína LRRK2 [31], una proteína multidominio de gran tamaño formada por una serie de dominios de interacción proteína-proteína que flanquean una región catalítica con actividades quinasa y GTPasa [32]. La diversidad de dominios presentes en LRRK2 hacen que esté involucrada en una gran variedad de procesos celulares, que se ven alterados por las versiones mutadas de la proteína, lo que resulta en daños celulares y muerte celular [55-111].

Actualmente, la administración de L-DOPA es el eje central del tratamiento de la EP. Aunque tiene una serie de efectos secundarios entre los que destacan las disquinesias inducidas por L-DOPA [112], sigue siendo el tratamiento por excelencia para la EP. Sin embargo, debido a la importancia creciente que se le reconoce a LRRK2 en la enfermedad, esta proteína se está convirtiendo en una diana terapéutica de interés para el tratamiento de la EP.

La actividad quinasa de LRRK2 está regulada al alza en la mayoría de las mutaciones de la proteína causantes de la EP [36]. Por tanto, la opción más directa sería controlar la esta actividad quinasa. A pesar del desarrollo de numerosos inhibidores de la actividad quinasa y de su éxito *in vitro*, la gran mayoría de ellos fallaron en los ensayos en los modelos con roedores porque causan cambios morfológicos en los pulmones [113,114], de forma que sus ensayos se frenaron. Actualmente, muchos de ellos son utilizados en investigación para estudiar la biología de LRRK2, como por ejemplo el inhibidor MLi-2.

Debido a la complejidad de los efectos de la actividad quinasa, otras líneas de investigación se han centrado en modular otros elementos que también influyen en la actividad enzimática de LRRK2, entre los que se incluyen la inhibición de la actividad GTPasa y el control de los dominios de interacción de LRRK2 con otras proteínas, el bloqueo de la dimerización de LRRK2 y el bloqueo de la interacción de LRRK2 con sus elementos *upstream* (Rab29, complejo retrómero) y *downstream* (Rab GTPasas) [115].

Con el progreso de la medicina y la terapia génica, se ha abierto una nueva línea de tratamiento de LRRK2 focalizada en la reducción de los niveles de la proteína. Esto se puede conseguir modificando su expresión génica o degradando la proteína ya producida. En 2011, Yñigo-Mojado et al. identificaron dos shRNAs específicos para las mutaciones R1441G y

R1441C que produjeron un 80% de eficiencia en el silenciamiento, además de discriminar entre mRNA WT y mutante de LRRK2. Esto demuestra que la forma mutante de LRRK2 puede ser silenciada de forma selectiva [116]. Los oligonucleótidos antisentido (ASOs) también se han probado con la proteína LRRK2. Zhao et al. han desarrollado dos ASOs que actualmente se encuentran en fase 1 de ensayo clínico (BIIB094), capaces de reducir los niveles de LRRK2 en el cerebro, sin alterar los niveles de LRRK2 en otros órganos periféricos. Asimismo, se reduce la formación de agregados de α -sinucleína y la muerte de neuronas dopaminérgicas y, por consiguiente, se mejoran los efectos motores de la enfermedad. El tratamiento a largo plazo es tolerado por los ratones y no presenta efectos secundarios [117]. El principal problema de este tratamiento es la vía de administración ya que al no poder atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), los ASOs deben ser administrados a través de una inyección intracerebroventricular. Otra estrategia para disminuir los niveles proteicos de LRRK2 es el uso de PROTACs (Proteolysis-Targeting Chimeras). Esta técnica se fundamenta en el uso de la maquinaria de degradación de la propia célula para degradar la proteína diana [118], como pueden ser agregados proteicos ya formados y otras dianas que no pueden ser tratadas con herramientas convencionales. El uso de PROTACs para la proteína LRRK2 en células embrionarias fibroblásticas disminuyó los niveles de LRRK2 y la fosforilación del residuo Ser935, mostrando la efectividad de esta técnica [119].

Otro foco en la intervención farmacológica de LRRK2 es la actuación sobre sus sustratos. Bernsden et al. proponen estimular la desfosforilación de los principales sustratos de LRRK2, las proteínas Rab GTPasas. La sobreexpresión de la fosfatasa PPM1H suprime la fosforilación mediada por LRRK2 de las proteínas Rab8a, Rab8b, Rab10 y Rab35 (Figura 17) [120]. Esto demuestra que PPM1H es un modulador de la señalización de LRRK2 al controlar la desfosforilación de las proteínas Rab GTPasas.

Aunque muchos de estos tratamientos han fracasado, otros han mostrado grandes avances en el desarrollo de una terapia efectiva contra las versiones mutadas de LRRK2. No obstante, aún queda mucho por hacer hasta poder establecer un tratamiento eficaz para la EP cuya diana sea LRRK2. El próximo reto es identificar biomarcadores fiables para la detección de versiones anormales de LRRK2 que permitan actuar en los primeros estadios de la enfermedad. Actualmente, se están desarrollando métodos que permitan detectar la fosforilación de Rab10 [121] en muestras de pacientes mediante análisis no invasivos [122], como indicador de la actividad de LRRK2 alterada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 1998 Oct 339(15):1044-53. **Pequeña revisión sobre la neuropatología de la enfermedad de Parkinson.**
2. Panicker N, Ge P, Dawson VL, Dawson TM. The cell biology of Parkinson's disease. *J Cell Biol*. 2021 Apr 220(4):1-31.
3. Kouli A, Torsney KM, Wei-Li K. Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In: *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Stoker TB, Greenland JC (Editors). Brisbane, Australia: Codon Publications; 2018 Dec: 3-26.
4. Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, Ziemssen T. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012 Apr 27(5):617-626.
5. Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin*. 2016 Nov 34(4):955-965.
6. Lin MK, Farrer MJ. Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med*. 2014 Jun 6(48):1-16.
7. Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, Saitoh T. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett*. 1988 Sep 91(3):349-353.
8. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 1983 Feb 219(4587):979-980.
9. Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct 318(1):225-241.
10. Gash DM, Rutland K, Hudson NL, Sullivan PG, Bing G, Cass WA, Pandya JD, Liu M, Choi DY, Hunter RL, Gerhardt GA, Smith CD, Slevin JT, Prince TS. Trichloroethylene: Parkinsonism and complex I mitochondrial neurotoxicity. *Ann Neurol*. 2008 Feb 63(2):184-192.
11. Björklund G, Hofer T, Nurchi VM, Aaseth J. Iron and other metals in the pathogenesis of Parkinson's disease: Toxic effects and possible detoxification. *J Inorg Biochem*. 2019 Oct 199(110717):1-6.
12. Breckenridge CB, Berry C, Chang ET, Sielken RL Jr, Mandel JS. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Apr 11(4):1-42.
13. Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, Ascherio A. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord*. 2012 Sep 27(10):1276-1282.
14. Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: a meta-analysis. *Neurology*. 2010 Mar 74(12):995-1002.
15. Cerri S, Mus L, Blandini F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*. 2019 Jul 9(3):501-515.
16. Jurado-Coronel JC, Cabezas R, Ávila Rodríguez MF, Echeverría V, García-Segura LM, Barreto GE. Sex differences in Parkinson's disease: Features on clinical symptoms, treatment outcome, sexual hormones and genetics. *Front Neuroendocrinol*. 2018 Jul 50:18-30.
17. Antony PM, Diederich NJ, Krüger R, Balling R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J*. 2013 Dec 280(23):5981-5993.
18. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet*. 2021 Jun 12;397(10291):2284-2303.
19. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol*. 2020 Jan 27(1):27-42.
20. Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C, Spano P. From α -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2012 Oct 2(1476):183-202.
21. Bellucci A, Navarria L, Zaltieri M, Missale C, Spano P. α -Synuclein synaptic pathology and its implications in the development of novel therapeutic approaches to cure Parkinson's disease. *Brain Res*. 2012 Jan 13(1432):95-113.
22. Choi ML, Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J*. 2018 Oct 285(19):3631-3644.
23. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 95(11):6469-6473.
24. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997 Aug 388(6645):839-840. **Artículo que identifica a la proteína α -sinucleína como principal componente de los cuerpos de Lewy.**
25. Xia Q, Liao L, Cheng D, Duong DM, Gearing M, Lah JJ, Levey AI, Peng J. Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies. *Front Biosci*. 2008 May 1(13):3850-3856.

26. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Apr 24(2):197-211. **Sistema de estadiaje propuesto por Braak et al. que intenta explicar la progresión de la EP en base a la distribución de los cuerpos de Lewy.**
27. Moon HE, Paek SH. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol*. 2015 Jun 24(2):103-116.
28. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*. 2015 Jan 21;85(2):257-273.
29. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest*. 2006 Jul 116(7):1744-1754.
30. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol*. 2002 Mar 51(3):296-301. **Artículo de la identificación del locus *PARK8* (*LRRK2*) implicado en la enfermedad de Parkinson.**
31. Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci*. 2006 May 29(5):286-293.
32. Cookson MR. LRRK2 Pathways Leading to Neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jul 15(7):1-17.
33. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2008 Jul 7(7):583-590.
34. Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E, Volkmann J, Pramstaller PP, Kostic V, Vieregge P, Klein C. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006 Sep 21(9):1506-1510.
35. West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 102(46):16842-16847.
36. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Mol Neurodegener*. 2019 Dec 14(1):49.
37. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, Biskup S, Zhang Z, Lim KL, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet*. 2007 Jan 16(2):223-232.
38. Rivero-Ríos P, Romo-Lozano M, Madero-Pérez J, Thomas AP, Bioso A, Greggio E, Hilfiker S. The G2019S variant of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) alters endolysosomal trafficking by impairing the function of the GTPase RAB8A. *J Biol Chem*. 2019 Mar 294(13):4738-4758.
39. Mata IF, Kachergus JM, Ross OA, Farrer MJ. LRRK2 mutations and Parkinsonism. *Lancet*. 2005 Apr 365(9466):1229-1230.
40. Schmidt SH, Knappe MJ, Boassa D, Mumdey N, Kornev AP, Ellisman MH, Taylor SS, Herberg FW. The dynamic switch mechanism that leads to activation of LRRK2 is embedded in the DFG ψ motif in the kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Jul 116(30):14979-14988.
41. Gloeckner CJ, Schumacher A, Boldt K, Ueffing M. The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro. *J Neurochem*. 2009 May 109(4):959-968.
42. Deng J, Lewis PA, Greggio E, Sluch E, Beilina A, Cookson MR. Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 105(5):1499-1504.
43. Greggio E, Zambrano I, Kaganovich A, Beilina A, Taymans JM, Daniëls V, Lewis P, Jain S, Ding J, Syed A, Thomas KJ, Baekelandt V, Cookson MR. The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation. *J Biol Chem*. 2008 Jun 283(24):16906-16914.
44. Berger Z, Smith KA, Lavoie MJ. Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. *Biochemistry*. 2010 Jul 49(26):5511-5523.
45. Deyaert E, Wauters L, Guaitoli G, Konijnenberg A, Leemans M, Terheyden S, Petrovic A, Gallardo R, Nederveen-Schippers LM, Athanopoulos PS, Pots H, Van Haastert PJM, Sobott F, Gloeckner CJ,

- Efremov R, Kortholt A, Versées W. A homologue of the Parkinson's disease-associated protein LRRK2 undergoes a monomer-dimer transition during GTP turnover. *Nat Commun.* 2019 Oct 8(1008):1-12.
- Artículo que propone la dimerización de LRRK2 como modelo para su activación.**
46. Steger M, Tonelli F, Ito G, Davies P, Trost M, Vetter M, Wachter S, Lorentzen E, Duddy G, Wilson S, Baptista MA, Fiske BK, Fell MJ, Morrow JA, Reith AD, Alessi DR, Mann M. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife.* 2016 Jan 29(5):1-28.
- Artículo de la identificación de Rab GTPasas como sustratos de la proteína LRRK2.**
47. Jeong GR, Jang EH, Bae JR, Jun S, Kang HC, Park CH, Shin JH, Yamamoto Y, Tanaka-Yamamoto K, Dawson VL, Dawson TM, Hur EM, Lee BD. Dysregulated phosphorylation of Rab GTPases by LRRK2 induces neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2018 Feb 13(8):1-17.
48. Steger M, Diez F, Dhekne HS, Lis P, Nirujogi RS, Karayel O, Tonelli F, Martinez TN, Lorentzen E, Pfeffer SR, Alessi DR, Mann M. Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *Elife.* 2017 Nov 10(6):1-22.
49. Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Oct 6(11):1-25.
50. Purlyte E, Dhekne HS, Sarhan AR, Gomez R, Lis P, Wightman M, Martinez TN, Tonelli F, Pfeffer SR, Alessi DR. Rab29 activation of the Parkinson's disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J.* 2018 Jan 37(1):1-18. **Artículo que demuestra que Rab29 regula la activación de la proteína LRRK2.**
51. Sheng Z, Zhang S, Bustos D, Kleinheinz T, Le Pichon CE, Dominguez SL, Solanoy HO, Drummond J, Zhang X, Ding X, Cai F, Song Q, Li X, Yue Z, van der Brug MP, Burdick DJ, Gunzner-Toste J, Chen H, Liu X, Estrada AA, Sweeney ZK, Scarce-Levie K, Moffat JG, Kirkpatrick DS, Zhu H. Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations. *Sci Transl Med.* 2012 Dec 4(164):1-12. **Artículo que indica la importancia de la autofosforilación del residuo Ser1292 de LRRK2 para potenciar su actividad quinasa.**
52. Manschwetus JT, Wallbott M, Fachinger A, Obergruber C, Pautz S, Bertinetti D, Schmidt SH, Herberg FW. Binding of the Human 14-3-3 Isoforms to Distinct Sites in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2. *Front Neurosci.* 2020 Apr 14(302):1-11.
53. Nichols RJ, Dzamko N, Morrice NA, Campbell DG, Deak M, Ordureau A, Macartney T, Tong Y, Shen J, Prescott AR, Alessi DR. 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochem J.* 2010 Sep 430(3):393-404.
54. Tolosa E, Vila M, Klein C, Rascol O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol.* 2020 Feb 16(2):97-107.
55. Erb ML, Moore DJ. LRRK2 and the Endolysosomal System in Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2020 10(4):1271-1291.
56. Wishart TM, Parson SH, Gillingwater TH. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006 Aug 65(8):733-739.
57. Pan PY, Li X, Wang J, Powell J, Wang Q, Zhang Y, Chen Z, Wicinski B, Hof P, Ryan TA, Yue Z. Parkinson's Disease-Associated LRRK2 Hyperactive Kinase Mutant Disrupts Synaptic Vesicle Trafficking in Ventral Midbrain Neurons. *J Neurosci.* 2017 Nov 37(47):11366-11376.
58. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol.* 2010 Aug 91(4):313-348.
59. Liu X, Shu S, Hong MS, Levine RL, Korn ED. Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 103(37):13694-13699.
60. Pyle RA, Schivell AE, Hidaka H, Bajjalieh SM. Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J Biol Chem.* 2000 Jun 275(22):17195-17200.
61. Pyle RA, Schivell AE, Hidaka H, Bajjalieh SM. Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J Biol Chem.* 2000 Jun 275(22):17195-17200.
62. Shin N, Jeong H, Kwon J, Heo HY, Kwon JJ, Yun HJ, Kim CH, Han BS, Tong Y, Shen J, Hatano T, Hattori N, Kim KS, Chang S, Seol W. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp Cell Res.* 2008 Jun 314(10):2055-2065.
63. Belluzzi E, Greggio E, Piccoli G. Presynaptic dysfunction in Parkinson's disease: a focus on LRRK2. *Biochem Soc Trans.* 2012 Oct 40(5):1111-1116.
64. Gomez RC, Wawro P, Lis P, Alessi DR, Pfeffer SR. Membrane association but not identity is required for LRRK2 activation and phosphorylation of Rab GTPases. *J Cell Biol.* 2019 Dec 218(12):4157-4170.

65. Liu Z, Bryant N, Kumaran R, Beilina A, Abeliovich A, Cookson MR, West AB. LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet.* 2018 Jan 27(2):385-395.
66. Beilina A, Bonet-Ponce L, Kumaran R, Kordich JJ, Ishida M, Mamais A, Kaganovich A, Saez-Atienzar S, Gershlick DC, Roosen DA, Pellegrini L, Malkov V, Fell MJ, Harvey K, Bonifacino JS, Moore DJ, Cookson MR. The Parkinson's Disease Protein LRRK2 Interacts with the GARP Complex to Promote Retrograde Transport to the trans-Golgi Network. *Cell Rep.* 2020 May 31(5):1-36.
67. Bonifacino JS, Hierro A. Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 2011 Mar 21(3):159-167.
68. Bonet-Ponce L, Cookson MR. LRRK2 recruitment, activity, and function in organelles. *FEBS J.* 2022 Nov 289(22):6871-6890.
69. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 2008 Feb 319(5865):916-919.
70. Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ 3rd, Shen J. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 107(21):9879-9884.
71. Plowey ED, Cherra SJ 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 2008 May 105(3):1048-1056.
72. Gómez-Suaga P, Luzón-Toro B, Churamani D, Zhang L, Bloor-Young D, Patel S, Woodman PG, Churchill GC, Hilfiker S. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Hum Mol Genet.* 2012 Feb 21(3):511-525.
73. Alegre-Abarrategui J, Christian H, Lufino MM, Mutihac R, Venda LL, Ansoorge O, Wade-Martins R. LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Hum Mol Genet.* 2009 Nov 18(21):4022-4034.
74. Ho PW, Leung CT, Liu H, Pang SY, Lam CS, Xian J, Li L, Kung MH, Ramsden DB, Ho SL. Age-dependent accumulation of oligomeric SNCA/ α -synuclein from impaired degradation in mutant LRRK2 knockin mouse model of Parkinson disease: role for therapeutic activation of chaperone-mediated autophagy (CMA). *Autophagy.* 2020 Feb 16(2):347-370.
75. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, Cortes E, Honig LS, Dauer W, Consiglio A, Raya A, Sulzer D, Cuervo AM. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.* 2013 Apr 16(4):394-406.
76. Yue Z, Yang XW. Dangerous duet: LRRK2 and α -synuclein jam at CMA. *Nat Neurosci.* 2013 Apr 16(4):375-377.
77. Klein AD, Mazzulli JR. Is Parkinson's disease a lysosomal disorder? *Brain.* 2018 Aug 141(8):2255-2262.
78. Herbst S, Campbell P, Harvey J, Bernard EM, Papayannopoulos V, Wood NW, Morris HR, Gutierrez MG. LRRK2 activation controls the repair of damaged endomembranes in macrophages. *EMBO J.* 2020 Sep 39(18):1-14.
79. Radulovic M, Schink KO, Wenzel EM, Nähse V, Bongiovanni A, Lafont F, Stenmark H. ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *EMBO J.* 2018 Nov 37(21):1-15.
80. Bonet-Ponce L, Beilina A, Williamson CD, Lindberg E, Kluss JH, Saez-Atienzar S, Landeck N, Kumaran R, Mamais A, Bleck CKE, Li Y, Cookson MR. LRRK2 mediates tubulation and vesicle sorting from lysosomes. *Sci Adv.* 2020 Nov 6(46):1-15.
81. Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M, Komori T, Fujimoto T, Ito G, Yoshimura SI, Harada A, Fukuda M, Koike M, Iwatsubo T. LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Sep 115(39):9115-9124.
82. Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnóczky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 2006 Sep 174(7):915-921.
83. Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J.* 2001 Aug 15(358):147-155.
84. Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Oct 13(10):607-625.

85. Simmen T, Lynes EM, Gesson K, Thomas G. Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug 1798(8):1465-1473.
86. Nagashima S, Tokuyama T, Yonashiro R, Inatome R, Yanagi S. Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J Biochem*. 2014 May 155(5):273-279.
87. Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ, Samali A. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med*. 2011 Oct 15(10):2025-2039.
88. Toyofuku T, Okamoto Y, Ishikawa T, Sasawatari S, Kumanogoh A. LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway. *EMBO J*. 2020 Jan 39(2):1-19.
89. Wauters F, Cornelissen T, Imberechts D, Martin S, Koentjoro B, Sue C, Vangheluwe P, Vandenberghe W. *LRRK2* mutations impair depolarization-induced mitophagy through inhibition of mitochondrial accumulation of RAB10. *Autophagy*. 2020 Feb 16(2):203-222.
90. Fransson A, Ruusala A, Aspenström P. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*. 2003 Feb 278(8):6495-6502.
91. Cai Q, Sheng ZH. Moving or stopping mitochondria: Miro as a traffic cop by sensing calcium. *Neuron*. 2009 Feb 61(4):493-496.
92. Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, Selkoe D, Rice S, Steen J, LaVoie MJ, Schwarz TL. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*. 2011 Nov 147(4):893-906.
93. Hsieh CH, Shaltouki A, Gonzalez AE, Bettencourt da Cruz A, Burbulla LF, St Lawrence E, Schüle B, Krainc D, Palmer TD, Wang X. Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*. 2016 Dec 19(6):709-724.
94. Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol*. 2012 Feb 196(4):407-417.
95. Cheng XT, Zhou B, Lin MY, Cai Q, Sheng ZH. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol*. 2015 May 209(3):377-386.
96. Montagnac G, Sibarita JB, Loubéry S, Daviet L, Romao M, Raposo G, Chavrier P. ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Curr Biol*. 2009 Feb 19(3):184-195.
97. Dou D, Smith EM, Evans CS, Boecker CA, Holzbaur ELF. Regulatory imbalance between LRRK2 kinase, PPM1H phosphatase, and ARF6 GTPase disrupts the axonal transport of autophagosomes. *Cell Rep*. 2023 May 42(5):1-20.
98. Lee HJ, Bae EJ, Lee SJ. Extracellular α -synuclein—a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nat Rev Neurol*. 2014 Feb 10(2):92-98.
99. Fares MB, Jagannath S, Lashuel HA. Reverse engineering Lewy bodies: how far have we come and how far can we go? *Nat Rev Neurosci*. 2021 Feb 22(2):111-131.
100. Caesar M, Zach S, Carlson CB, Brockmann K, Gasser T, Gillardon F. Leucine-rich repeat kinase 2 functionally interacts with microtubules and kinase-dependently modulates cell migration. *Neurobiol Dis*. 2013 Jun 54:280-288.
101. Gillardon F. Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability—a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration? *J Neurochem*. 2009 Sep 110(5):1514-1522.
102. Zach S, Felk S, Gillardon F. Signal transduction protein array analysis links LRRK2 to Ste20 kinases and PKC zeta that modulate neuronal plasticity. *PLoS One*. 2010 Oct 5(10):1-7.
103. Timm T, Li XY, Biernat J, Jiao J, Mandelkow E, Vandekerckhove J, Mandelkow EM. MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *EMBO J*. 2003 Oct 22(19):5090-5101.
104. Johne C, Matenia D, Li XY, Timm T, Balusamy K, Mandelkow EM. Spred1 and TESK1—two new interaction partners of the kinase MARKK/TAO1 that link the microtubule and actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*. 2008 Apr 19(4):1391-1403.
105. Lin CH, Tsai PI, Wu RM, Chien CT. LRRK2 G2019S mutation induces dendrite degeneration through mislocalization and phosphorylation of tau by recruiting autoactivated GSK3 β . *J Neurosci*. 2010 Sep 30(39):13138-13149.
106. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. 2011 Nov 10(11):1015-1025.
107. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008 Oct 27(48):6194-6206.

108. Ho CC, Rideout HJ, Ribe E, Troy CM, Dauer WT. The Parkinson disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J Neurosci*. 2009 Jan 29(4):1011-1016.
109. Antoniou N, Vlachakis D, Memou A, Leandrou E, Valkimadi PE, Melachroinou K, Re DB, Przedborski S, Dauer WT, Stefanis L, Rideout HJ. A motif within the armadillo repeat of Parkinson's-linked LRRK2 interacts with FADD to hijack the extrinsic death pathway. *Sci Rep*. 2018 Feb 8(1):1-17.
110. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*. 1998 Mar 17(6):1675-1687.
111. Webber PJ, West AB. LRRK2 in Parkinson's disease: function in cells and neurodegeneration. *FEBS J*. 2009 Nov 276(22):6436-6444.
112. Espay AJ, Morgante F, Merola A, Fasano A, Marsili L, Fox SH, Bezard E, Picconi B, Calabresi P, Lang AE. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Ann Neurol*. 2018 Dec 84(6):797-811.
113. Scott JD, DeMong DE, Greshock TJ, Basu K, Dai X, Harris J, Hruza A, Li SW, Lin SI, Liu H, Macala MK, Hu Z, Mei H, Zhang H, Walsh P, Poirier M, Shi ZC, Xiao L, Agnihotri G, Baptista MA, Columbus J, Fell MJ, Hyde LA, Kuvelkar R, Lin Y, Mirescu C, Morrow JA, Yin Z, Zhang X, Zhou X, Chang RK, Embrey MW, Sanders JM, Tiscia HE, Drolet RE, Kern JT, Sur SM, Renger JJ, Bilodeau MT, Kennedy ME, Parker EM, Stamford AW, Nargund R, McCauley JA, Miller MW. Discovery of a 3-(4-Pyrimidinyl) Indazole (MLi-2), an Orally Available and Selective Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Inhibitor that Reduces Brain Kinase Activity. *J Med Chem*. 2017 Apr 60(7):2983-2992.
114. Fuji RN, Flagella M, Baca M, Baptista MA, Brodbeck J, Chan BK, Fiske BK, Honigberg L, Jubb AM, Katavolos P, Lee DW, Lewin-Koh SC, Lin T, Liu X, Liu S, Lyssikatos JP, O'Mahony J, Reichelt M, Roose-Girma M, Sheng Z, Sherer T, Smith A, Solon M, Sweeney ZK, Tarrant J, Urkowitz A, Warming S, Yaylaoglu M, Zhang S, Zhu H, Estrada AA, Watts RJ. Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 7(273):1-12.
115. Li T, Yang D, Zhong S, Thomas JM, Xue F, Liu J, Kong L, Voulalas P, Hassan HE, Park JS, MacKerell AD Jr, Smith WW. Novel LRRK2 GTP-binding inhibitors reduced degeneration in Parkinson's disease cell and mouse models. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 23(23):6212-6222.
116. De Yñigo-Mojado L, Martín-Ruiz I, Sutherland JD. Efficient allele-specific targeting of LRRK2 R1441 mutations mediated by RNAi. *PLoS One*. 2011 Jun 6(6):1-10.
117. Zhao HT, John N, Delic V, Ikeda-Lee K, Kim A, Weihofen A, Swayze EE, Kordasiewicz HB, West AB, Volpicelli-Daley LA. LRRK2 Antisense Oligonucleotides Ameliorate α -Synuclein Inclusion Formation in a Parkinson's Disease Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Sep 15(8):508-519.
118. Tomoshige S, Ishikawa M. PROTACs and Other Chemical Protein Degradation Technologies for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2021 Feb 60(7):3346-3354.
119. Kargbo RB. Degradation of LRRK2 in the Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Med Chem Lett*. 2020 Sep 11(11):2070-2071.
120. Berndsen K, Lis P, Yeshaw WM, Wawro PS, Nirujogi RS, Wightman M, Macartney T, Dorward M, Knebel A, Tonelli F, Pfeffer SR, Alessi DR. PPM1H phosphatase counteracts LRRK2 signaling by selectively dephosphorylating Rab proteins. *Elife*. 2019 Oct 30(8):1-37.
121. Fan Y, Tonelli F, Padmanabhan S, Baptista MAS, Riley L, Smith D, Marras C, Howden A, Alessi DR, Sammler E. Human Peripheral Blood Neutrophil Isolation for Interrogating the Parkinson's Associated LRRK2 Kinase Pathway by Assessing Rab10 Phosphorylation. *J Vis Exp*. 2020 Mar 21(157):1-7.
122. Nirujogi RS, Tonelli F, Taylor M, Lis P, Zimprich A, Sammler E, Alessi DR. Development of a multiplexed targeted mass spectrometry assay for LRRK2-phosphorylated Rabs and Ser910/Ser935 biomarker sites. *Biochem J*. 2021 Jan 478(2):299-326.