



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Farmàcia  
i Ciències de l'Alimentació

Treball Final de Grau

Grau de Farmàcia

PAPER DETERMINANT DE L'ACTIVITAT LRRK2 EN LA MALALTIA DE  
PARKINSON

JOEL ESCOBEDO MARTÍN

Àmbit principal: Biologia cel·lular

Àmbits secundaris: Bioquímica i Biologia molecular, Farmacologia i Terapèutica

Biologia Cel·lular

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Universitat de Barcelona

Barcelona, juny 2024





Aquesta obra està subjecta a una llicència [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

## Resum

La malaltia de Parkinson (MP) és una malaltia neurodegenerativa que afecta a milions de persones i per la que, de moment, no existeix cap tractament que freni l'avanç. Aquesta malaltia es caracteritza per la mort de les neurones dopaminèrgiques de la *substantia nigra*, cosa que comporta l'aparició de tremolors, rigidesa i bradicinèsia, entre altres símptomes.

La cinasa LRRK2 sol ser una de les principals causes genètiques d'aquesta malaltia degut a que pot contenir certes mutacions que donen lloc a una forma de MP hereditària. Tot i així, s'ha pogut observar com en absència d'aquestes mutacions que incrementen el risc de patir MP, aquesta cinasa podria estar implicada en l'avanç i la propagació de la malaltia. Aquest descobriment obre les portes a nous tractaments de la malaltia amb LRRK2 com a diana. Tant els tractaments farmacològics proposats, com les teràpies gèniques són molt prometedors, però encara és molt aviat per assegurar que són tractaments efectius i segurs. A més, cada tipus de tractament té les seves fortaleses i els seus defectes, i ara per ara no es pot assegurar un benefici diferencial entre ells.

Finalment, cal entendre que en tractar-se d'un camp d'estudi molt innovador, la informació obtinguda que prové d'estudis *in vitro* amb cultius cel·lulars i *in vivo* en models animals, com el ratolí, s'haurà de validar en humans.

## Abstract

Parkinson's disease is a neurodegenerative illness that affects millions of people worldwide and for which, as of today, there is not a treatment that can stop its progression. This disease is characterized by the death of dopaminergic neurons from the *substantia nigra*, which leads to the appearance of tremors, stiffness, and bradykinesia, amongst other symptoms.

The LRRK2 kinase is usually one of the main genetic causes for this disease as it can contain certain mutations that lead to a hereditary form of Parkinson's disease. In the same way, it has been observed how in the absence of this high-risk mutations, the kinase could also be involved in the progression and spread of this disease. This discovery opens the door for new Parkinson's disease treatments targeting LRRK2. Both the pharmacological approach as well as the gene therapy are very promising, but it is too early to ensure that they are safe and effective treatments. In addition, both treatments have their own strengths and weaknesses, and as of now, it cannot be discerned a benefit of one over the other.

Finally, it must be understood that since this is a very innovative field, the information obtained from *in vitro* studies on cell cultures and *in vivo* studies on animals like mice must be validated in humans.

## **Integració d'àmbits**

L'àmbit principal del treball és el de la biologia cel·lular. Aquest es fa evident al llarg de tot el treball ja que es comenten molts processos cel·lulars que es donen en les cèl·lules (principalment les neurones dopaminèrgiques) i com les alteracions d'aquests porten a la patologia de la MP. Una gran part del treball comprèn aquest àmbit, fet que és lògic ja que és tracta de l'àmbit principal i ha de tenir un paper protagonista durant tot el treball.

El segon àmbit que abasta aquest treball i que és menys rellevant que l'anterior és el de la bioquímica i la biologia molecular. Aquest àmbit està present en el treball ja que es comenten diferents tractaments que comporten l'alteració de l'expressió gènica de la proteïna d'interès, referent a la biologia molecular; i per la part de la bioquímica està present perquè la proteïna d'interès és un enzim i es comenta com diverses mutacions alteren la seva activitat.

Finalment el tercer àmbit del treball és el de la farmacologia i terapèutica, present ja que es comenten teràpies i el descobriment de fàrmacs amb diana a la proteïna d'interès. Tot i que la part de les teràpies gèniques sembla que formaria part de l'àmbit de la biologia molecular, donat que és tracta també d'una teràpia, formaria part d'aquest àmbit.

## **Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS)**

De tots els objectius de desenvolupament sostenible que existeixen hi ha dos que ressalten especialment en relació amb aquest treball. El primer que estaria molt relacionat amb el treball és el número quatre, que és relaciona amb una bona salut. La seva relació és evident ja que tracta sobre el descobriment de noves teràpies per la MP que en cas de ser efectives, millorarien la qualitat de vida dels seus pacients. Aquestes teràpies obren la possibilitat d'aturar l'evolució de la malaltia permetent mantenir la malaltia en un estadi de latència permanent i evitant la neurodegeneració característica de la MP.

El segon objectiu que està relacionat amb el treball és el número nou, que parla sobre indústria, innovació i infraestructura. Aquest objectiu està relacionat amb el treball ja que les possibles teràpies que és comenten són molt noves i comporten un enfoc del tractament de la malaltia molt innovador. Això es deu al fet que ara per ara no existeix cap tractament que permeti modificar l'evolució de la malaltia o fins i tot aturar-la, de manera que si els tractaments comentats ho aconsegueixen seria un avanç molt important en el camí de curar la MP. D'aquesta manera, s'estaria assolint una innovació en el camp de la MP molt important i permetria reduir l'ús dels fàrmacs ja existents per aquesta malaltia que només serveixen per fer tractaments simptomàtics de la malaltia.

Per tant, gràcies a aquest treball és podrien assolir aquests dos objectius de desenvolupament sostenible, com a mínim en l'àmbit dels pacients amb MP.



## Índex

<b>1. Introducció</b> .....	1
<b>1.1. La malaltia de Parkinson</b> .....	1
1.1.1. Característiques clíniques .....	1
1.1.2. Tractaments disponibles .....	2
1.1.3. Fisiopatologia de la malaltia .....	3
<b>1.2. La cinasa rica en repeticions de leucina 2 (LRRK2)</b> .....	5
1.2.1. Activitat d'LRRK2 .....	6
1.2.2. Funcions cel·lulars d'LRRK2 .....	7
1.2.3. Quina relació hi ha entre LRRK2 i MP .....	8
<b>2. Objectius</b> .....	8
<b>3. Materials i mètodes</b> .....	9
<b>4. Resultats i Discussió</b> .....	10
<b>4.1. Mecanisme patològic d'LRRK2 i risc de patir MP</b> .....	10
4.1.1. Mecanismes patològics de l'alfa-sinucleïna .....	10
4.1.2. Mecanismes d'eliminació de l'alfa-sinucleïna .....	11
4.1.3. Mecanismes de la MP associats a LRRK2 .....	12
<b>4.2. Mutacions d'LRRK2 i risc de patir MP</b> .....	15
4.2.1. Mutacions al domini ROC-COR .....	16
4.2.2. Mutacions al domini cinasa .....	17
4.2.3. Mutació al domini WD40.....	17
<b>4.3. Alteracions no genètiques d'LRRK2 i l'associació amb la MP</b> .....	18
<b>4.4. Possibles nous tractaments a futur</b> .....	19
4.4.1. Inhibidors directes d'LRRK2.....	19
4.4.2. Alteracions en els nivells d'expressió d'LRRK2.....	20
<b>5. Conclusions</b> .....	22
<b>6. Bibliografia</b> .....	24

## 1. Introducció

### 1.1. La malaltia de Parkinson

Es tracta d'una malaltia neurodegenerativa i incurable que es caracteritza per un dèficit motor progressiu que provoca rigidesa, tremolors i bradicinèsia entre altres símptomes. Es tracta de la segona malaltia neurodegenerativa més prevalent, però en els últims anys està incrementant la seva prevalença i mortalitat (1). Aquesta simptomatologia característica està provocada per la destrucció de les neurones dopaminèrgiques de la *Substantia Nigra*. Aquesta pèrdua de neurones està acompanyada de l'aparició de Cossos de Lewis a les neurones restants, que són unes incusions característiques al citoplasma formades per agregats d'alfa-sinucleïna, ubiquitina, proteïna Tau, etc. Aquesta destrucció de les neurones provoca una disminució de la dopamina (DA) causa una desregulació dels circuits dels ganglis basals i porta als dèficits motors mencionats anteriorment.

Actualment el diagnòstic de la malaltia de Parkinson (MP) es fa mitjançant la detecció d'aquests símptomes motors mencionats anteriorment. Hi ha dos criteris principals que permet diferenciar MP d'altres formes de parkinsonisme, l'aparició dels símptomes de manera asimètrica i una bona resposta a Levodopa (Principal tractament de MP) (2).

Fins ara l'únic tractament disponible per la MP era el tractament simptomàtic, no hi ha cap tractament que modifiqui la malaltia. A partir dels 1990s es va veure que hi havia uns patrons hereditaris de MP i això va portar a la identificació del gen que codifica per la proteïna alfa-sinucleïna com a causant de la malaltia (3, 4). A partir d'aquí, s'han descobert 90 gens que podrien estar relacionats amb la malaltia i d'aquests només una petita part provoquen MP monogenètica (1). D'aquest grup de gens relacionats amb la malaltia, ens centrarem en aquest estudi en un en concret, el gen que codifica per la cinasa rica en repeticions de leucina 2 (LRRK2).

#### 1.1.1. Característiques clíniques

Com s'ha comentat abans, les manifestacions clíniques típiques de la malaltia consisteixen en una triada de símptomes motors, que són tremolors, rigidesa i bradicinèsia. Però també hi ha altres símptomes no motors que es poden manifestar abans que apareguin les manifestacions motores, fins i tot tan aviat com 12-14 anys abans del diagnòstic (5). Tot i que no es coneixen gaire bé els mecanismes patològics d'aquests símptomes no motors, es creu que són causats per alteracions en altres neurotransmissors i és per això que no responen bé al tractament substitutiu de dopamina (6).

Les evidències actuals apunten a que la malaltia podria iniciar-se en altres regions com el sistema nerviós autònom perifèric i el bulb olfactiu, per més tard propagar-se cap a la regió inferior del tronc encefàlic afectant a les seves estructures i finalment arribant a la *substantia nigra* (7). Aquesta teoria podria explicar aquesta simptomatologia no motora, que consisteix en restrenyiment, alteracions de la son, problemes d'equilibri, fatiga i disfunció urinària, que precedeix a les afectacions motores característiques de la MP. De fet, hi ha un estudi que demostra que gent



que patia aquesta col·lecció de símptomes era més propensa a desenvolupar MP en els 5 anys posteriors que gent sense la simptomatologia (8).

Degut a que la MP es tracta d'una malaltia molt heterogènia s'ha intentat classificar-la en diferents subclasses. Basat en la clínica trobem dos subtipus, un on el tremolor és molt dominant i un altre on no és tant present. El primer no sol patir altres tipus d'efectes motors i generalment respon correctament al tractament de substitució de dopamina, mentre que el segon pateix un síndrome de rigidesa acinètica i inestabilitat postural. L'avanç de la malaltia i la seva patogènia és diferent en els dos subtipus (9).

A mesura que la malaltia avança els símptomes empitjoren, i tot i que les afectacions motores solen ser les més característiques de la MP, les alteracions no motores tenen un impacte significatiu en la qualitat de vida dels pacients (10). A més, aquests símptomes solen ser difícils de tractar, la hipotensió ortostàtica sol causar problemes significatius als pacients i apareix demència en un 83% dels pacients 20 anys després del diagnòstic de MP (11).

Per tant, tractar la malaltia quan encara no han aparegut els símptomes motors és crucial per prevenir la degeneració motora, ja que un cop apareix, la pèrdua de les neurones dopaminèrgiques és considerable (12). En un futur els esforços haurien de ser per trobar algun tractament que modifiqui la malaltia per actuar en aquest estadi.

### **1.1.2. Tractaments disponibles**

#### **Teràpia de reemplaçament de dopamina**

És la teràpia més utilitzada actualment i consisteix en l'ús de L-Dopa, un precursor de la dopamina. En un principi és molt efectiva per alleugerar els símptomes inicials de la MP, a més, és l'únic tractament farmacològic que millora la qualitat de vida (41). Però durant un període llarg de temps s'ha observat un empitjorament del símptomes motors tot i mantenir una teràpia correcte amb L-Dopa (42), així com els efectes *on-off*, les fluctuacions al llarg del dia dels efectes del tractament. També s'ha de tenir en compte que no permet tractar els símptomes no motors ni és capaç d'aturar o retardar l'avanç de la MP ni pot revertir els efectes ja establerts.

#### **Agonistes dopaminèrgics**

Serien fàrmacs com el pramipexol, rotigotina, bromocriptina, etc. Que a diferència de l' L-Dopa poden retardar la instauració de la simptomatologia motora (43). Tot i així són menys eficaços que l'L-Dopa i més cars, però permeten reduir la dosis d'L-Dopa si es prenen com a teràpia combinada i tenen un efecte neuroprotector.

#### **Inhibidors enzimàtics**

Tenim els inhibidors de la monoamina oxidasa-B (MAO-B), un enzim encarregat de degradar la dopamina i que la seva inhibició porta a un increment d'aquest neurotransmissor al cervell. Aquests inhibidors són la selegilina, safinamida, etc., i

en combinació amb L-Dopa permeten augmentar la seva semivida fet que incrementa el seu temps d'efecte, redueix les fluctuacions *on-off* i permet reduir la seva dosi (44). Utilitzat com a monoteràpia permet retardar la necessitat d' L-Dopa durant uns mesos i disminueix els símptomes motors (45). Per contra, en formes de MP resistents a L-Dopa i pels símptomes no motors no té efecte.

Una altra família d'inhibidors són els de la Catecol-O-metiltransferasa (COMT), un altre enzim encarregat de degradar la dopamina, per tant el mecanisme dels inhibidors és similar al grup anterior. L'únic fàrmac actualment és l'entocapona, ja que la tolcapona (el primer descobert) es va deixar d'utilitzar pels efectes hepatotòxics. Tot i així, els estudis demostren que la tolcapona té efecte sinèrgic amb l'L-Dopa fins i tot quan l'entocapona no té efecte, per això es recomana el seu ús abans d'intentar tractaments més invasius (46).

### **Fàrmacs anticolinèrgics**

Són dels medicaments més antics i econòmics utilitzats per la MP i es solen utilitzar com a adjuvants al tractament amb L-Dopa. Són útils per disminuir la simptomatologia lleu de la malaltia, però tenen molts efectes adversos com boca seca, retenció urinària, visió borrosa, etc. Els més utilitzats són la benztropina, biperidina i prociclidina; que són efectius per tractar els tremolors i el baveig, però el seu efecte és limitat en la resta de símptomes.

L'amantadina també s'utilitza molt com a anticolinèrgic, i recentment s'ha vist que pot actuar com a antagonista parcial del receptor N-metil-D-aspartat (NMDA) que podria explicar el seu efecte contra la discinèsia (47).

### **Procediments quirúrgics**

Aquesta línia de tractament està reservada com a última opció, ja que és el tractament amb majors riscos, el més car i el que requereix personal més especialitzat. L'estimulació del cervell crònica permet alleugerar els tremolors, però no redueix l'acinèsia ni alenteix l'avanç de la malaltia. S'ha considerat el transplantament de neurones dopaminèrgiques fetals i tot i que s'ha provat en animals i s'han provat tècniques similars en humans les implicacions morals així com la gran quantitat de teixit necessari per que sigui efectiu han fet que sigui un tractament complicat de desenvolupar.

Per tant, la majoria de tractaments actuals es basen en l'ús de L-Dopa sola o en combinació amb altres fàrmacs, i cap d'ells permet modificar l'avanç de la MP. D'aquesta manera, es reitera la importància de buscar nous tractaments que plantegin la possibilitat de frenar la malaltia o inclús curar-la.

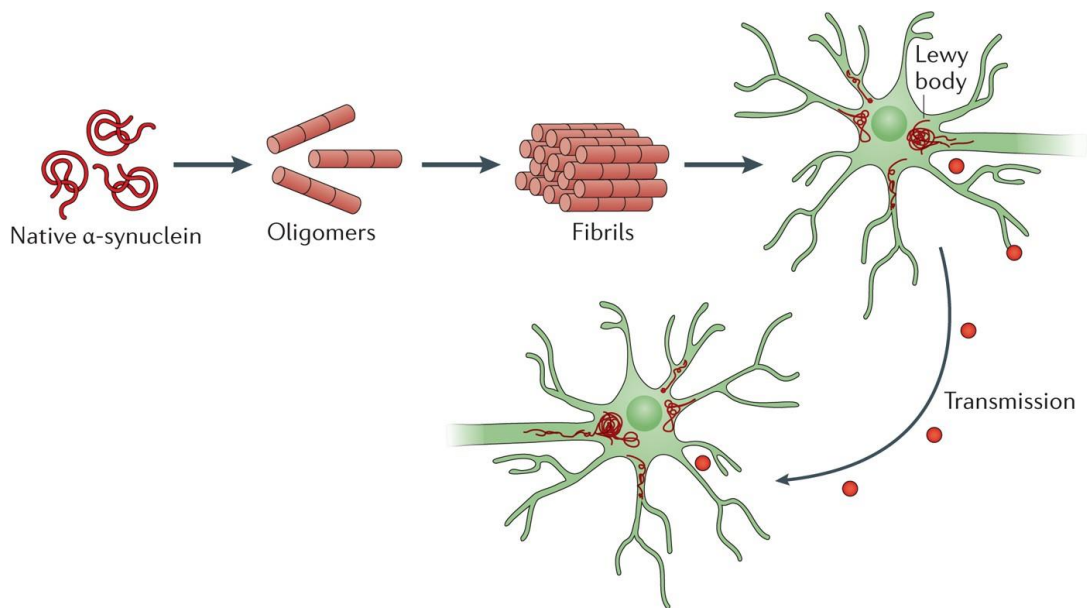
## **1.1.3. Fisiopatologia de la malaltia**

### **L'alfa-sinucleïna**

Hi ha diversos mecanismes implicats en la patogènia de la MP, però la formació d'agregats d'alfa-sinucleïna és la peça central. Aquesta proteïna es troba sense una

estructura terciària al cervell (13) i en dissolució es troba en forma de tetràmers estables que són resistents a l'agregació (14). Quan interacciona amb molècules amb càrrega negativa, com els fosfolípids de les membranes cel·lulars, adquireix una estructura d'hèlix alfa a l'extrem N-terminal (15).

En la MP, l'alfa-sinucleïna adopta una estructura rica en fulles beta que és propensa a l'agregació, i es troba en forma de filaments de 5-10 nm als Cossos de Lewis. S'han proposat diversos mecanismes per aquest canvi conformacional que porta a la seva agregació, com pot ser la fosforilació del residu de serina 129, la ubiquitinització i el truncament de l'extrem C-terminal (16, 17). Aquests mecanismes diferents explicarien les diverses formes en que es pot trobar l'alfa-sinucleïna a la MP, monòmers desplegats, oligòmers solubles i fibres insolubles d'alt pes molecular (18) (Figura 1).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 1: Procés d'agregació i transferència de l'alfa-sinucleïna.** L'alfa-sinucleïna de la cèl·lula adquireix una estructura terciària errònia que forma agregats que van creixent en mida fins a arribar a formar els Cossos de Lewis. També es poden transmetre entre cèl·lules facilitant l'agregació de l'alfa-sinucleïna de la cèl·lula receptora donant una expansió de la patologia (19).

Estudis recents en rosegadors han demostrat que la forma més neurotòxica d'alfa-sinucleïna són les formes oligomèriques i no les fibres madures insolubles (20, 21). Això és degut a que poden actuar com a "llavors" per accelerar i facilitar l'agregació d'altres alfa-sinucleïnes, fet que podria explicar la propagació de la patologia pel cervell (22).

### Disfunció mitocondrial

La disfunció mitocondrial es considera un altre factor important de patogènesi tant en la MP hereditària com en la idiopàtica (23). Estudis *post-mortem* en cervells de pacients amb MP van demostrar una deficiència en el Complex Respiratori Mitocondrial I (CRM-I), un component vital de la cadena de transport d'electrons, i

això va permetre establir una relació entre la disfunció mitocondrial i MP (24). De fet, aquesta deficiència del CRM-I també es va poder trobar en les cèl·lules del múscul esquelètic i les plaquetes (25, 26).

La substància MPTP s'utilitza en estudis amb animals per simular l'efecte de la MP en ratolins, i així poder estudiar aquesta malaltia (27). Això es deu a que un cop s'oxida, és captada per les cèl·lules dopaminèrgiques i inhibeix CRM-I. Per tant, el fet que l'inhibició de CRM-I porti a una simptomatologia similar a la MP reforça la teoria que en certa part la disfunció mitocondrial podria estar involucrada en l'avanç de la malaltia.

Finalment, l'alfa-sinucleïna té un efecte directe en el funcionament mitocondrial, això es deu a que la proteïna es pot acumular a l'interior dels mitocondris provocant la disfunció de CRM-I i incrementant l'estrès oxidatiu (28, 29). Un estudi més recent demostra que la forma oligomèrica de l'alfa-sinucleïna interaccionava amb el receptor mitocondrial TOM20 que causava una disfunció en la importació de proteïnes al mitocondri, una disminució de la respiració oxidativa i l'acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (30).

### **Sistema Ubiquitina-Proteosoma**

En estudis *post-mortem* en cervells de pacients amb MP s'han trobat una disminució dràstica de l'activitat catalítica d'aquest sistema (31). En un estudi on van injectar MPTP, que ha quedat demostrat que provoca efectes similars a MP, en titís, es va trobar una disminució de l'activitat d'aquest sistema (32). Finalment, en un altre estudi amb ratolins transgènics amb defectes en aquest sistema van trobar una degeneració de les neurones dopaminèrgiques i unes inclusions similars a Cossos de Lewis al cervell, tot i que no està clar si contenien agregats d'alfa-sinucleïna (33).

### **Sistema d'autofàgia lisosomal**

Des d'el 1997 ja es va descriure l'acumulació de vacúols d'autofàgia en anàlisis *post-mortem* del cervell de pacients amb MP (34). A més, en ratolins deficients en l'expressió d'Atg5 i Atg7 (Gens essencials per l'autofàgia) es va demostrar la ràpida neurodegeneració i inclusió de cossos al citoplasma (35, 36).

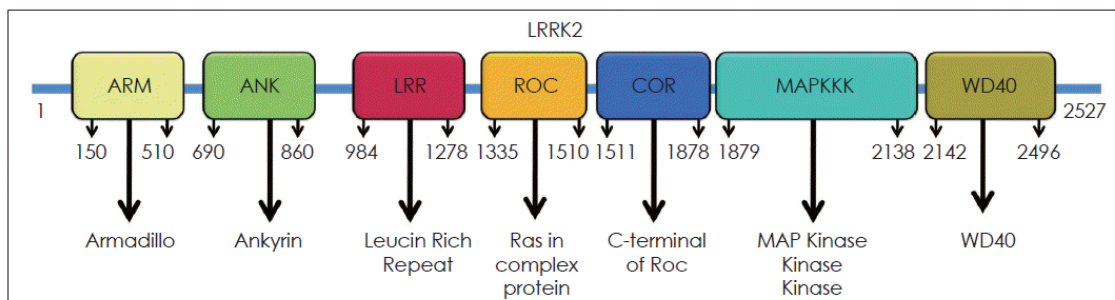
En neurones de la *substantia nigra* de pacients amb MP es van trobar incrementats els nivells d'LC3-II (marcador d'autofagosoma), fet que suggeriria l'acumulació de vacúols d'autofàgia (37, 38). Per contra, proteïnes vitals de la membrana lisosomal i diverses chaperones es van trobar disminuïts (39, 40). Per tant, això apunta a una saturació d'aquest sistema derivada de l'acumulació d'agregats d'alfa-sinucleïna, en que s'acumulen els autofagosomes per falta de lisosomes que els eliminin.

## **1.2. La cinasa rica en repeticions de leucina 2 (LRRK2)**

Tot i que és més coneguda amb les sigles LRRK2, també es coneix com a PARK8 o dardarina. El seu gen es troba a la part central del cromosoma 12 i es tracta d'una proteïna gran i complexa amb diversos dominis. Consisteix en una cadena de 2527

aminoàcids d' uns 286 kDa. El centre catalític consisteix en un domini ROC, que pertany a la família de les Ras GTPasa, seguit d'un domini COR, ja que aquests dos dominis sempre van en tàndem, i un domini cinasa (MAPKKK).

A l'extrem N-terminal tenim dos dominis que permeten interaccions de tipus proteïna-proteïna, que són l'Armadillo (ARM) i anquirina (ANK). Entre aquests dominis i el centre actiu tenim la regió amb les repeticions de leucina. Aquest domini pot tenir diverses funcions, regulació de l'expressió dels gens, adhesió cel·lular, tràfic cel·lular, desenvolupament neuronal, etc. Finalment, a l'extrem C-terminal tenim WD40 que també interacciona amb altres proteïnes (Figura 2).



**Figura 2: Estructura i dominis de la proteïna LRRK2.** Representació dels diferents dominis de la proteïna i com es troben ubicats dins d'aquesta i quina mida tenen (48).

La seva localització a l'organisme és diversa, tot i que es troba predominantment al cervell, també es pot trobar al cor, pulmons, ronyons, leucòcits, etc. Dins del cervell la podem trobar al còrtex, nucli estriat, tubercle olfatori tàlem, hipocamp, nucli septal i *substantia nigra* (Sent aquest últim d'importància per la MP) (49).

A nivell cel·lular es troba majoritàriament al citoplasma, però una part està associada a les membranes de certs orgànuls com els mitocondris, aparell de golgi, membrana plasmàtica, reticle endoplasmàtic, vesicles de transport i microtúbuls.

### 1.2.1. Activitat d'LRRK2

Els diferents dominis de la proteïna li permeten tenir activitats diferents. Per un costat tenim l'activitat cinasa del domini MAPKKK que permet fosforilar certs residus d'aminoàcids d'algunes proteïnes i d'aquesta manera regula l'activitat cel·lular. Per altra banda, tenim l'activitat GTPasa pròpia del tàndem de dominis ROC-COR, que permet regular la forma de la proteïna.

#### Activitat cinasa

Estudis *in vitro* han demostrat que certes mutacions (G2019S) que provoquen un augment de l'activitat cinasa porten a una forma autosòmica de MP (50). Altres estudis associen l'increment de l'activitat cinasa amb una desregulació del transport vesicular (51, 52) i amb alteracions del creixement neuronal (53).

## **Activitat GTPasa**

Aquesta activitat està lligada a la unió de GTP al centre actiu del domini. En condicions de repòs LRRK2 està unida a GDP i està en estat inactiu. Quan es dona el canvi per GTP la proteïna passa a l'estat actiu. Tot i que no es coneixen bé, es creu que aquests intercanvis estan mediat per l'intercanviador del nucleòtid de guanina (GEF), que elimina el GDP i permet la unió del GTP, i la proteïna activant de GTPasa (GAP) que catalitza la hidròlisi del GTP unit pel GDP lliure. Les mutacions properes a aquest domini com R1441C redueixen l'hidròlisi de GTP de manera que aquest està unit a la proteïna més temps i això porta a un augment de l'activitat cinasa (54). Això explicaria que l'unió de GTP al domini GTPasa porta a una major activitat del domini MAPKKK (55).

### **1.2.2. Funcions cel·lulars d'LRRK2**

#### **Transducció de senyals**

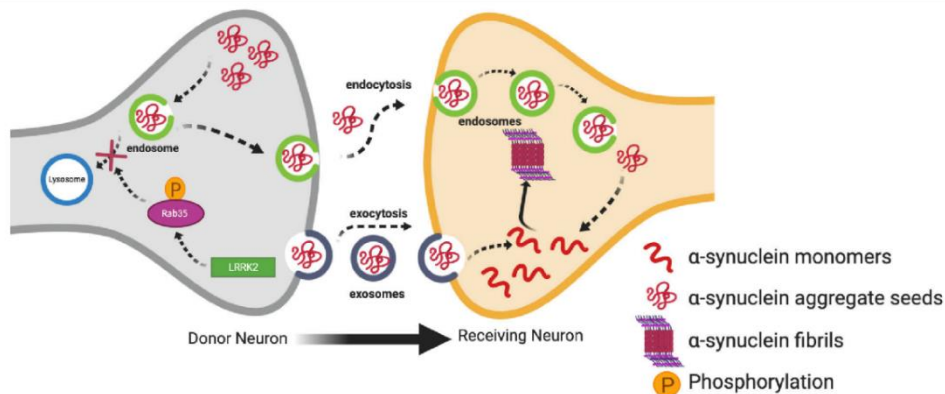
S'ha considerat que LRRK2 podria regular la via de la MAPK, que s'encarrega de regular la proliferació cel·lular, la inflamació i l'apoptosi. Quan es sobreexpressa LRRK2 es pot observar un increment de l'activitat d'ERK1/2 i ERK5 (cinases d'aquesta via) (56, 57).

Una altre via que pot estar afectada per LRRK2 és la via de senyalització WNT. Mutacions en els dominis ROC-COR alteren l'interacció amb les proteïnes DVL d'aquesta via (58). La glicogen sintasa cinasa 3 (GSK-3), un component clau d'aquesta via també interacciona amb LRRK2. La mutació G2019S, mencionada anteriorment, presenta una major afinitat amb GSK-3 que la forma *wild type* de la proteïna (59). Aquestes evidències apunten que, en les neurones, LRRK2 podria alterar aquesta via encarregada del control de la sinapsis neuronal. Això queda evident en el fet que formes mutades d'LRRK2 causen una reducció de la longitud de les neurones i de les seves ramificacions, mentre que la deficiència causa una extensió robusta de la xarxa neuronal (60).

#### **Via de l'endolisosoma i autofagosoma**

Com s'ha comentat anteriorment, LRRK2 es localitza tant al citosol de les cèl·lules com en les membranes de diferents orgànuls, però curiosament la fracció que es troba a les membranes té una major activitat cinasa que la que es troba lliure al citosol (61). També es demostra que LRRK2 es transloca als lisosomes en procés de degradació, fet que exemplifica la seva importància en l'homeòstasi d'aquest procés (62).

Diversos estudis apunten a que una de les proteïnes substrat de l'LRRK2 són les diferents proteïnes de la família RAB (63, 64). Aquestes proteïnes són les encarregades de regular el tràfic de vesícules a la cèl·lula, de manera que els efectes de LRRK2 podrien modificar el transport de vesícules bloquejant la fusió dels endosomes amb el lisosoma i afavorint l'exocitosi del seu contingut (Figura 3). Això es fa evident en el model de ratolins *knock out* pel gen d'LRRK2, que demostren un increment de marcadors lisosomals a les cèl·lules (65). A més, amb el temps, es pot observar un increment de lisosomes secundaris amb lipofuscina, un producte derivat de la peroxidació dels lípids de membrana, que demostraria que LRRK2 facilita l'eliminació als lisosomes (62).



**Figura 3: Paper d'LRRK2 en el transport vesicular d'agregats d'alfa-sinucleïna.** Mitjançant la fosforilació de Rab35 es bloqueja la fusió de l'endosoma amb el lisosoma i s'afavoreix l'excreció d'alfa-sinucleïna a les neurones veïnes promovent l'expansió de la malaltia (66).

### 1.2.3. Quina relació hi ha entre LRRK2 i MP

Com s'ha comentat anteriorment, certes mutacions en LRRK2 porten a un increment de l'activitat cinasa que desencadenaria una forma de MP hereditària. Això permetria relacionar LRRK2 amb les formes de parkinsonisme genètiques, però és possible que també pugui provocar MP esporàdica.

Una de les formes d'eliminar l'alfa-sinucleïna de les cèl·lules es mitjançant els lisosomes, per tant, si hi ha alguna alteració d'aquesta via podria portar a la seva acumulació i agregació, sent possible arribar a desenvolupar MP. Amb el coneixement que LRRK2 regula aquesta via, és possible predir que la seva activitat pot estar relacionada amb l'inici i evolució de la MP.

## 2. Objectius

Un dels objectius principals del treball és la necessitat d'establir una relació clara i inequívoca entre LRRK2 i la MP. Segons el que es pot entendre de la Introducció del treball i de la bibliografia associada sembla clara una relació possible entre els dos, però cal aprofundir més en aquesta relació.

Un altre objectiu a avaluar en aquest estudi és l'existència de certes mutacions en LRRK2 que incrementin el risc de patir MP. Pel que s'ha comentat a la Introducció sembla clara l'existència de mutacions que no només incrementen el risc de patir MP sinó que donen peu a una forma de MP hereditària. Per tant, l'objectiu serà aprofundir en aquestes mutacions, descobrir quines són i quin és el mecanisme pel que incrementen el risc de patir MP.

Un tercer objectiu parteix de la pregunta: només les mutacions en LRRK2 causen un increment de risc de MP o també hi ha altres causes? Per tant, aquest objectiu es centra en descobrir si en persones sense les mutacions que incrementen el risc de MP es pot establir una relació de causalitat entre LRRK2 i la MP, i quines causes o situacions poden provocar-ho.

Finalment, un cop s'ha avaluat i establert una relació clara entre LRRK2 i la MP es pot parlar sobre la importància d'aquesta relació. Per tant, aquest últim objectiu tracta sobre descobrir noves possibles línies de tractament amb l'esperança de poder trobar algun possible tractament prometedor que pugui modificar la malaltia o fins i tot aturar-la.

### **3. Materials i mètodes**

Degut a que es tracta d'un treball completament bibliogràfic els materials necessaris per aquest són escassos. Només caldria un ordinador per efectuar les recerques bibliogràfiques necessàries i puntualment en cas de ser necessari algun llibre en format paper. Una gran part de les fonts bibliogràfiques parteixen de la recerca a bases de dades d'estudis, però també es poden consultar revistes científiques. Aquestes poden ser de caire més general com per exemple la revista *Science*, *Nature* o *Medical Science*; o poden ser més específiques pel tema del treball. En aquest cas, com es tracta d'un treball sobre la MP, una malaltia neurològica, les revistes que seran d'utilitat són les relacionades amb la neurobiologia. Aquestes revistes seran, per exemple, *Lancet Neurology*, *Neurological Sciences*, *Neurochemical Research* o fins i tot tan específiques com per exemple *Movement Disorders*, que només publica sobre diferents trastorns del moviment, característica principal de la MP.

Els mètodes per fer el treball són molt similars independentment del tipus de font bibliogràfica consultada. Com majoritàriament seran fonts electròniques ens centrarem en aquest cas per descriure els mètodes. Per iniciar la recerca bibliogràfica cal accedir a alguna base de dades fiable. Aquesta base de dades pot ser, per exemple, PubMed, que forma part de la web de l'institut nacional de salut (NIH en anglès). Un cop s'ha accedit a la base de dades cal decidir l'idea inicial de la que es vol partir, pot ser algun tema general relacionat amb el treball, com per exemple la MP. Un cop s'ha decidit aquesta idea cal anar acotant la recerca per refinar els resultats de manera que siguin el més rellevant possibles pel treball. Un cop s'aconsegueix això es pot començar a llegir els estudis per anar obtenint la informació necessària per complimentar el treball. Aquesta recerca no només permet adquirir els coneixements necessaris per detallar els mecanismes d'interacció entre LRRK2 i la MP, sinó que qualsevol teoria que pugui formular-se durant l'elaboració



del treball pot ser que ja hagi sigut avaluada amb un estudi i es pot utilitzar per donar major fiabilitat a aquesta.

Una altre manera molt efectiva per trobar molts estudis amb gran relació amb el treball és buscar en bases de dades revisions d'estudis relacionats amb aquest. De manera que amb una única revisió es poden trobar desenes d'estudis d'alta rellevància pel treball.

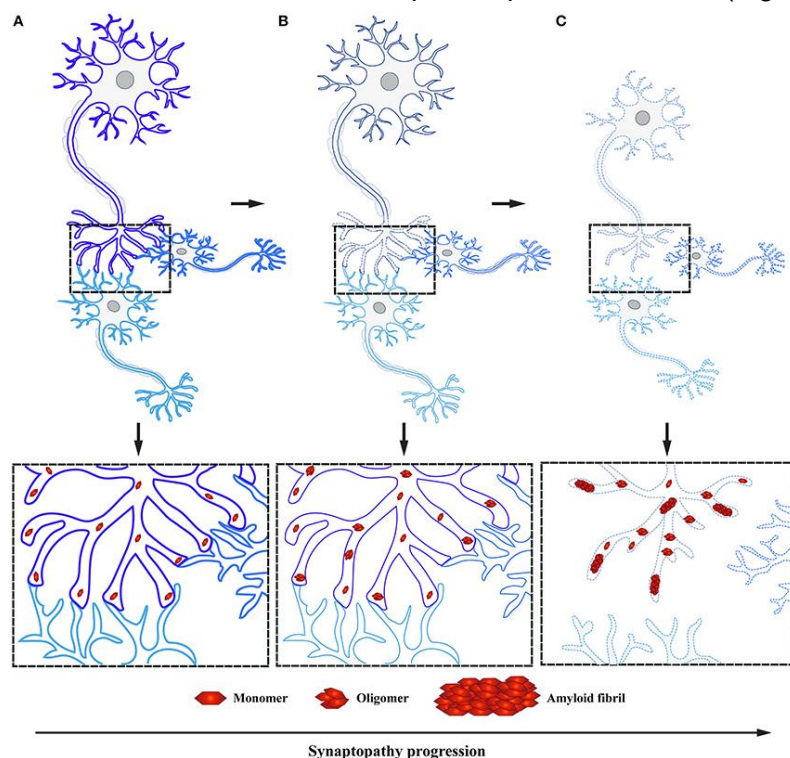
## 4. Resultats i Discussió

### 4.1. Mecanisme patològic d'LRRK2 i risc de patir MP

Tota la literatura actual apunta a l'alteració de l'alfa-sinucleïna com a causant de la MP mitjançant la formació d'agregats coneguts com a Cossos de Lewis, per tant, primer cal entendre quins mecanismes afavoreixen la malaltia, que en aquest cas seran les alteracions ens els processos relacionats amb aquesta alfa-sinucleïna patològica.

#### 4.1.1. Mecanismes patològics de l'alfa-sinucleïna

Hi ha estudis que han demostrat que l'alfa-sinucleïna s'acumula a les terminals dels axons, molt abans de que es formin els Cossos de Lewis, i aquesta acumulació està relacionada amb la pèrdua de cognició (67). A més, pacients amb estadis primerencs de la MP presenten un dany axonal extens, així com la pèrdua de la connectivitat de la via nigroestriada (68). Això podria demostrar que la patologia de l'alfa-sinucleïna podria estar relacionada amb els terminals presinàptics dels axons (Figura 4).



**Figura 4: Procés de dany axonal per acumulació d'agregats d'alfa-sinucleïna.** A mesura que es van acumulant els oligòmers d'alfa-sinucleïna es va reduint la longitud dels terminals axonals i es van perdent les connexions neuronals (69).

En condicions fisiològiques, l'alfa-sinucleïna s'encarrega de regular, juntament amb altres proteïnes, l'exocitosi de neurotransmissors a l'espai sinàptic (70). En condicions patològiques, l'acumulació d'oligòmers d'alfa-sinucleïna en l'espai presinàptic provoca una desregulació de les proteïnes encarregades d'aquest procés (69). Aquesta alteració es dona de manera progressiva i selectiva per les neurones dopaminèrgiques, com a mínim en models animals (71). Finalment, acaba portant a la mort de les neurones dopaminèrgiques.

Hi ha diverses teories sobre per què els efectes dels agregats d'alfa-sinucleïna es fan més evidents en les neurones dopaminèrgiques. Una d'aquestes teories es basa en que les neurones dopaminèrgiques tenen menys mielinització als seus axons de manera que necessiten una major energia per transmetre els potencials d'acció (72). Aquest requeriment energètic major les fa més vulnerables a qualsevol alteració en la producció d'energia com per exemple la disfunció mitocondrial, que s'ha demostrat que té un paper important en la MP (73).

Una altra teoria apunta a que l'alfa-sinucleïna regula l'homeòstasi de la dopamina a diferents nivells. Per un costat, l'enzim limitant de la síntesi de dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH), està negativament regulat per la concentració d'alfa-sinucleïna (74). Per altre banda, els agregats d'alfa-sinucleïna redueixen el transport de dopamina a les vesícules sinàptiques per part d'VMAT2 (el transportador vesicular de monoamines 2) i la recaptació de dopamina de l'espai sinàptic al citoplasma per part del DAT (el transportador actiu de dopamina) (70).

Per tant, els efectes de l'alfa-sinucleïna es donen per la seva acumulació, fet que porta a pensar que possiblement una disminució de la seva eliminació sigui la causa de la formació dels agregats i de la patologia. Per tal d'entendre com es podria reduir la seva eliminació primer cal saber quins mecanismes segueix aquesta.

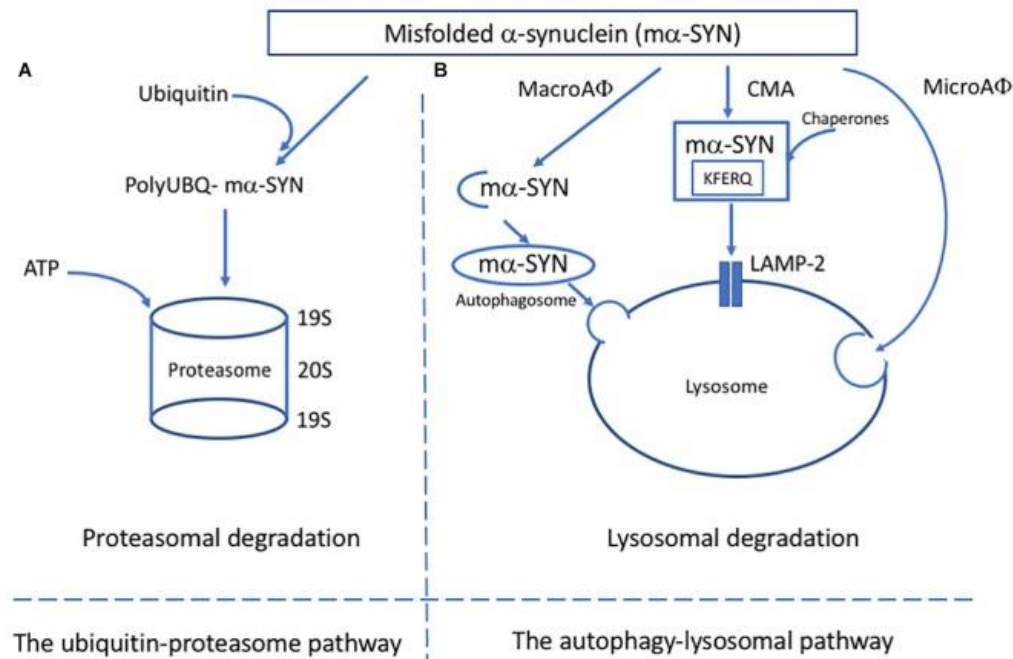
#### **4.1.2. Mecanismes d'eliminació de l'alfa-sinucleïna**

Un mecanisme per l'eliminació d'alfa-sinucleïna és mitjançant el proteosoma, ja que la inhibició d'aquest porta a una acumulació de l'alfa-sinucleïna (75). A més, s'ha vist com els nivells de les diferents subunitats del proteosoma estan reduïts en pacients amb MP (76). Aquesta via es basa en l'ubiquitinització de l'alfa-sinucleïna per tal que es pugui degradar al proteosoma amb gast d'ATP (Figura 5A). Aquesta necessitat d'ATP fa aquesta via susceptible a qualsevol alteració en l'obtenció d'aquest per part de la cèl·lula.

Un altre mecanisme seria mitjançant la via d'autofàgia lisosomal ja que l'ús d'un inhibidor lisosomal com el clorur d'amoni porta a l'acumulació d'alfa-sinucleïna (77). Aquesta via es pot dividir en 3 vies diferents que convergeixen en el lisosoma, la microautofàgia, macroautofàgia i l'autofàgia mediada per chaperones (CMA de les sigles en anglès). Tot i que encara no s'ha pogut relacionar l'eliminació d'alfa-sinucleïna mitjançant la via de microautofàgia, les altres dos si que són mecanismes coneguts de la seva eliminació. En la macroautofàgia l'alfa-sinucleïna queda envoltada per l'autofagosoma (un orgànul de doble membrana) per després fusionar-se amb el lisosoma. En la CMA l'alfa-sinucleïna s'uneix a les chaperones (hsc70 en aquest cas) ja que conté una seqüència d'aminoàcids que reconeixen (KFERQ

segons el codi d'1 lletra dels aminoàcids) i aquesta entra al lisosoma gràcies a LAMP2A, una proteïna de la membrana del lisosoma (Figura 5B).

Per tant, qualsevol alteració en algun d'aquests mecanismes directament, o algun mecanisme indirecte (com la disfunció mitocondrial que provocaria una falta d'ATP pel proteosoma) podria provocar l'acumulació d'alfa-sinucleïna i en última instància la MP.



**Figura 5: Diferents mecanismes d'eliminació de l'alfa-sinucleïna.** A l'esquerra hi ha l'eliminació per proteosoma (A) i a la dreta per la via lisosomal, a la que es pot accedir mitjançant la microautofàgia, la macroautofàgia i via CMA (B) (78).

Un cop s'han esbrinat quines vies segueix l'eliminació de l'alfa-sinucleïna cal saber quin és el paper de l'LRRK2 en aquest procés i per que és important en la MP.

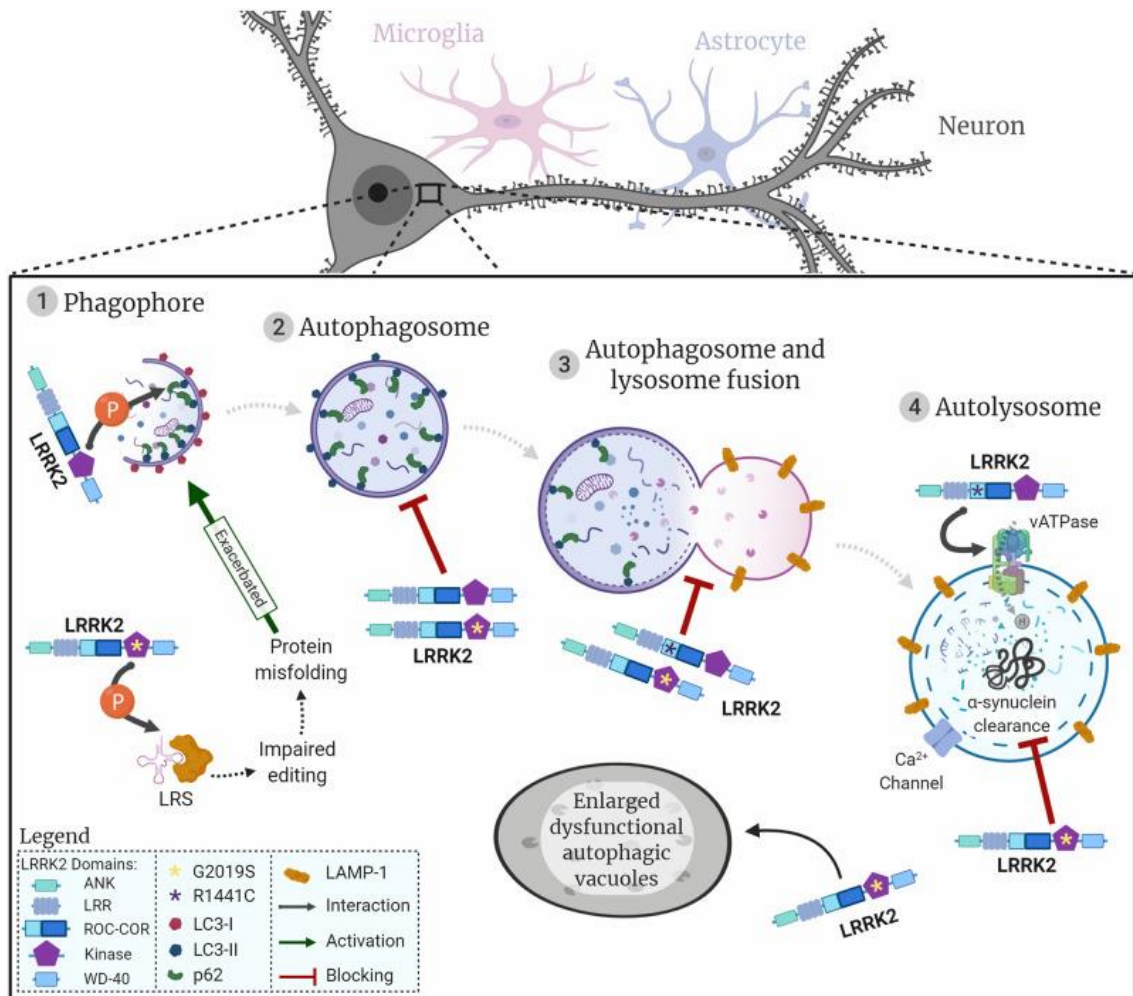
#### 4.1.3. Mecanismes de la MP associats a LRRK2

En referència al proteosoma, la sobreexpressió d'LRRK2, tant la forma *wild type* com la mutació G2019S, provoca una reducció de l'activitat del proteosoma sense alterar els nivells d'expressió de les seves subunitats (79). Tot i que no es coneix el mecanisme pel que LRRK2 inhibeix la degradació de proteïnes per part del proteosoma, aquest descobriment permetria explicar l'acumulació d'alfa-sinucleïna ubiquitinitzada. A més, per tal que hi hagi aquesta inhibició, és necessària una sobreexpressió de LRRK2, fet que apuntaria a que és necessària alguna alteració en l'homeòstasi de la proteïna per tal que es doni aquesta activitat que comporta el risc de patir MP.

Donat que l'alfa-sinucleïna es pot eliminar tant per la via del proteosoma com per la via lisosomal, és possible que l'alteració o mal funcionament d'un d'aquests sistemes pugui ser coberta per l'altre. Per tant, possiblement sigui necessària una alteració

dels dos sistemes per tal que es produeixi una acumulació d'alfa-sinucleïna que pugui causar MP.

En la via lisosomal, com s'ha comentat anteriorment, hi ha diversos mecanismes per l'eliminació de l'alfa-sinucleïna. Pel que fa a la via de la macroautofàgia, tant la forma *wild type* com la mutació G2019S d'LRRK2 inhibeixen la formació de l'autofagosoma. Les dos mutacions representades (Figura 6) inhibeixen la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma i la mutació G2019S a més, disminueix l'eliminació d'alfa-sinucleïna i promou l'aparició de grans vacúols d'autofàgia disfuncionals.



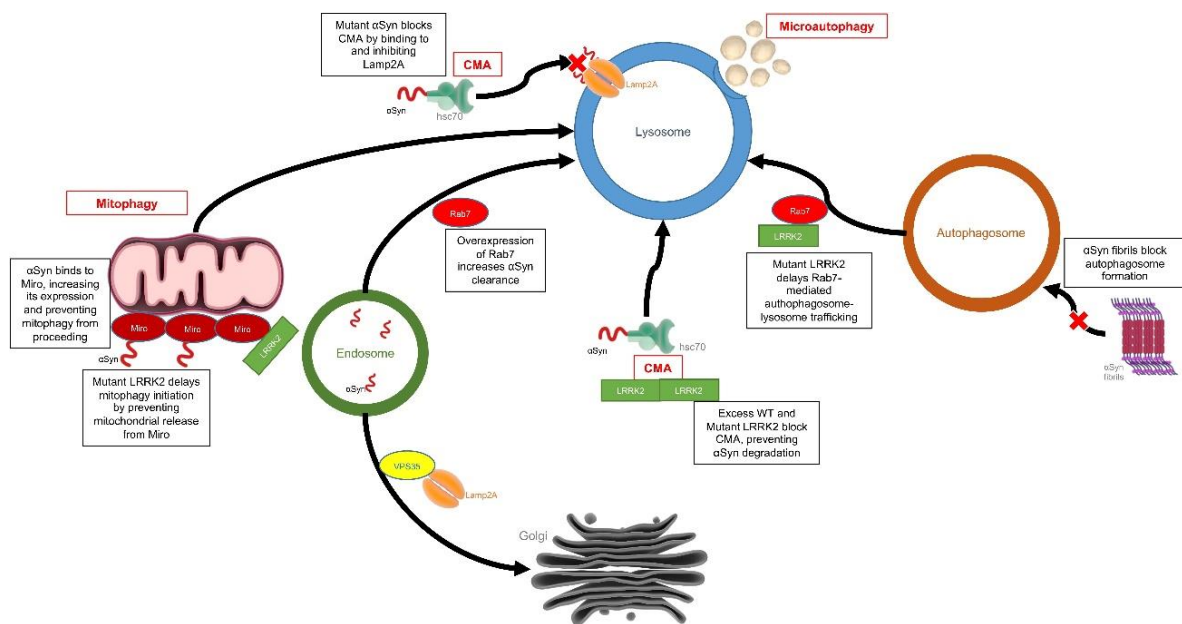
**Figura 6: Diferents punts d'acció d'LRRK2 en la via de la macroautofàgia.** L'LRRK2 inhibeix la formació de l'autofagosoma i la seva fusió amb el lisosoma. A més, les mutacions com G2019S i R1441C poden afectar a aquesta via en altres punts diferents (80).

Aquesta inhibició de la formació de l'autofagosoma i la seva posterior fusió amb el lisosoma es creu que pot ser degut a que LRRK2 regula la proteïna Rab7, proteïna encarregada del transport i la fusió dels autofagosomes i endosomes amb el lisosoma. L'efecte d'LRRK2 disminueix l'activitat de Rab7 tant en els models amb sobreexpressió de *wild type* LRRK2 com els models amb les formes mutades. Aquesta disminució de l'activitat de Rab7 causa una disminució del tràfic dels autofagosomes i una disminució de la fusió d'aquests amb els lisosomes mentre que

l'augment de l'activitat de Rab7 incrementa l'eliminació de l'alfa-sinucleïna (Figura 7) (81, 66). Per tant, la sobreexpressió d'LRRK2 i certes mutacions d'aquest provocarien una disminució de l'eliminació d'alfa-sinucleïna.

En la via de CMA, l'efecte d'LRRK2 és més directe. Anteriorment s'ha comentat que l'alfa-sinucleïna conté una seqüència que la chaperona hsc70 reconeix i permet la seva eliminació per aquesta via, LRRK2 també conté aquesta seqüència i en cas d'estar sobreexpressat o tenir alguna mutació, es dona una inhibició competitiva perquè tant l'alfa-sinucleïna com LRRK2 competirien per unir-se a LAMP2A. És aquesta competició la que disminuiria l'entrada de l'alfa-sinucleïna als lisosomes fent que s'acumulés a les neurones (66).

Finalment, l'eliminació de mitocondris danyats per via lisosomal també es veu afectada pels efectes d'LRRK2. En condicions normals, els mitocondris es troben units a la proteïna Miro que actua com un ancoratge als microtúbuls, quan els mitocondris van patint danys aquesta proteïna es va separant d'aquests de manera que es facilita la mitofàgia (inclusió dels mitocondris als lisosomes per la seva destrucció). En els casos que LRRK2 es troba mutada o sobreexpressada la proteïna Miro es reté enganxada als mitocondris durant més temps allargant la vida dels mitocondris danyats (82). De la mateixa manera, la disminució de l'activitat de Rab7 causada per LRRK2 també disminueix la mitofàgia.



**Figura 7: Vies d'actuació d'LRRK2 en l'eliminació de l'alfa-sinucleïna per via lisosomal.** L'LRRK2 redueix el tràfic de la via de l'autofagosoma lisosomal, disminueix l'eliminació d'alfa-sinucleïna per la via CMA i també redueix la mitofàgia (66).

Pel que es pot observar a la figura 2, LRRK2 també pot incrementar l'exocitosis d'alfa-sinucleïna a l'exterior de la cèl·lula mitjançant la inhibició del pas d'endosomes al lisosoma. Aquesta inhibició es dona a partir de la fosforilació de Rab35 que evita la fusió dels endosomes, que contenen alfa-sinucleïna a l'interior, amb els lisosomes i que a la seva vegada, facilita que aquests endosomes siguin transportats cap a la membrana cel·lular i s'alliberi l'alfa-sinucleïna a l'exterior (66). Això és de vital

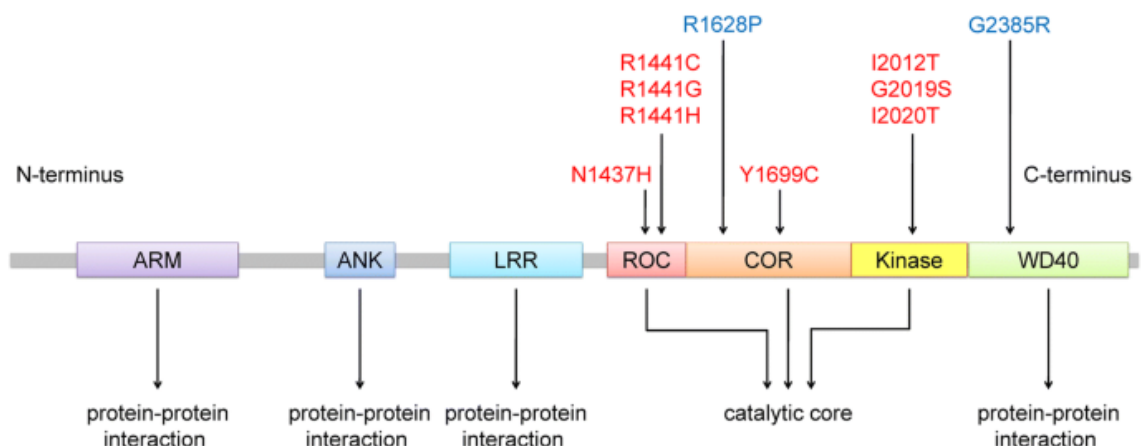
importància ja que explicaria un dels mecanismes que facilitarien el transport dels agregats cap a cèl·lules veïnes i com la malaltia es va propagant. Aquests agregats d'alfa-sinucleïna que es transfereixen entre cèl·lules faciliten l'agregació de l'alfa-sinucleïna de la cèl·lula receptora actuant com a llavors per a aquesta agregació (66).

Ara que s'ha establert una relació entre la MP i LRRK2, i es sap que la seva activitat podria contribuir a la patologia d'aquesta i es coneix l'existència de certes mutacions que incrementen el risc, cal esbrinar quines són aquestes mutacions i com afecten a l'activitat d'LRRK2 per incrementar el risc de patir MP.

#### 4.2. Mutacions d'LRRK2 i risc de patir MP

Tot i que ja s'han comentat algunes mutacions que podrien causar un increment de risc de patir MP, no són les úniques que s'han trobat. Les diferents mutacions que s'associen a la MP es basen en el tipus SNP (*Single nucleotide polymorphism*), que consisteixen en el canvi d'un aminoàcid per un altre.

LRRK2 conté molts possibles SNPs, però com es vol esbrinar les mutacions que podrien causar un major risc de patir MP ens centrarem només en les mutacions que siguin estrictament patològiques. D'aquestes en trobem deu, que es troben representades a la figura 8 (83).



**Figura 8: Localització de les diferents mutacions d'LRRK2 que causen MP.** L'esquema mostra 10 mutacions en total i la majoria d'aquestes es concentren en els tres dominis del centre catalític d'LRRK2 (83).

Pel que es pot observar a la figura 8, la majoria de mutacions es troben al centre catalític de la proteïna, sent la mutació G2385R l'única que es troba fora d'aquest. Tot i que aquesta mutació i R1628P estan representades a la figura 8, tenen un color diferent perquè només es troben en la població asiàtica (83). Això podria indicar que les diferents mutacions que provoquen un increment de risc de patir MP estan relacionades amb alteracions en el centre catalític de la proteïna i no tant amb alteracions de la interacció amb altres proteïnes. La classificació de les mutacions segons el domini on es troben seria:

-Domini tàndem ROC-COR: N1437H, R1441C/G/H i Y1699C.

-Domini cinasa: I2012T, G2019S i I2020T.

-Domini WD40: G2385R.

Segons el que s'ha establert fins ara, els efectes patològics d'LRRK2 es relacionen amb un increment de la seva activitat cinasa. Tenint en compte que el domini tàndem ROC-COR s'associa amb GTP per activar la proteïna i s'encarrega d'hidrolitzar-lo mitjançant la seva activitat GTPasa per desactivar-la, les mutacions en aquest domini haurien de provocar una disminució de l'activitat GTPasa per tal de mantenir la proteïna en estat actiu més temps. Per contra, les mutacions en el domini cinasa han de provocar un increment de la seva activitat. Finalment, s'ha trobat que la formació d'homodímers és una part important de l'activitat GTPasa (84), per tant, aquesta dimerització també podria suposar que les mutacions que alterin aquest procés podrien alterar l'activitat de la proteïna.

#### 4.2.1. Mutacions al domini ROC-COR

En aquest domini trobem agrupades sis de les mutacions amb un increment del risc de patir MP. Tres d'aquestes corresponen a mutacions en un mateix aminoàcid, fet que podria indicar que l'aminoàcid d'aquesta posició és de vital importància per l'activitat GTPasa i canvis en aquest provocarien una disminució d'aquesta funció.

Les mutacions R1441C/G/H disminueixen la velocitat d'hidròlisis del GTP de manera que això comporta que el GTP es troba associat a LRRK2 durant més temps, de manera que manté l'activitat cinasa activa durant més temps (83). A més, la mutació T1348N provoca que LRRK2 sigui deficient en unir-se a GTP i aquesta variant té una marcada reducció de l'activitat cinasa (83). Això confirma que una reducció de l'activitat GTPasa, o en general, un increment de l'afinitat per GTP comporta un increment de l'activitat cinasa i això pot generar els efectes relacionats amb la MP.

La mutació N1437H tot i trobar-se en una regió molt propera a les mutacions anteriors, té un mecanisme diferent. De fet, la seva afinitat per GTP és inferior a la de les mutacions anteriors o la forma *wild type* (85). Es considera que aquesta mutació bloqueja LRRK2 en la conformació dimèrica i disminueix l'intercanvi del GTP unit al dímer per GDP, de manera que la manté activa durant més temps tot i tenir una afinitat menor per GTP (85) i estar en forma de dímer.

La mutació Y1699C es troba en la regió COR del tàndem i el seu efecte en l'activitat d'LRRK2 és diferent a les mutacions anteriors. En aquest cas, s'ha trobat que aquesta mutació promou les interaccions intramoleculares del domini ROC-COR i disminueix les interaccions intermoleculares, de manera que es disminueix la capacitat de dimerització i per tant l'activitat GTPasa (86).

Finalment, tenim la mutació R1628P en que el seu mecanisme es diferent a totes les mutacions anteriors. Aquesta mutació és la única que no causa una alteració en l'activitat d'LRRK2, per tant el mecanisme pel que desenvolupa la toxicitat característica de la MP és indirecte (87). S'ha trobat en estudis *in vitro* que la cinasa Cdk5 podria fosforilar la serina de la posició 1627 (l'aminoàcid contigu al de la mutació) amb major facilitat que en la forma *wild type* i això incrementa l'activitat cinasa d'LRRK2 (87).

Per tant, s'ha comprovat que els mecanismes pels quals les diferents mutacions en aquest domini provoquen l'increment de risc de patir MP són molt diversos, però tots convergeixen en un augment indirecte de l'activitat cinasa.

#### 4.2.2. Mutacions al domini cinasa

Les mutacions d'aquest domini són tres i totes elles es troben en posicions molt properes, cosa que fa pensar que aquella regió és important per l'activitat cinasa de la proteïna. Com s'ha comentat anteriorment, les mutacions que incrementen el risc de patir MP són les que acaben causant un increment de l'activitat cinasa, per tant les mutacions que es troben en aquest domini probablement incrementaran directament la seva activitat.

La mutació I2012T i la seva relació amb un increment del risc de patir MP es troba en debat, ja que aquesta forma mutada d'LRRK2 té una activitat cinasa inferior a la forma *wild type* (88). A més, llevat de l'estudi inicial que la va proposar com a mutació de risc, no s'ha pogut replicar en altres estudis la seva patogenicitat en la MP (88). Tot això apunta a que aquesta mutació no hauria de formar part del grup de mutacions de risc per la MP.

La mutació G2019S és la més comentada durant el treball, això és degut a que és la mutació més comuna, representant un 1% de MP esporàdica i un 4% de MP familiar (89). Aquesta mutació presenta una activitat cinasa més elevada degut a que permet formar un enllaç de pont d'hidrogen més que la forma *wild type*, estabilitzant l'estat actiu de la cinasa (90).

Finalment, la mutació I2020T presenta un increment de l'activitat cinasa per un mecanisme diferent a l'anterior. En aquest cas, l'augment d'activitat cinasa ve donat per un major ràtio d'autofosforilació, fins a un 40% més que la forma *wild type* (91).

#### 4.2.3. Mutació al domini WD40

L'última mutació que queda és l'única que es troba fora del centre catalític, es tracta de la mutació G2385R ubicada al domini WD40 de l'extrem C-terminal i que és un domini d'associació amb proteïnes. Les evidències apunten a que aquest domini és d'importància per la dimerització d'LRRK2 ja que aquesta mutació provoca una inhibició d'aquest procés (92). Per tant, com ja s'ha comentat, una disminució de la capacitat de dimerització porta a una disminució de l'activitat GTPasa i un increment de l'activitat cinasa.

Per tant, totes aquestes mutacions porten a un increment de manera directe o indirecte de l'activitat cinasa, que és la causant de la toxicitat associada a la MP. Tot i així, cada mutació ho fa per un mecanisme diferent. Aquests mecanismes es poden resumir en incrementar l'afinitat per GTP, disminuir l'activitat GTPasa, desestabilitzar la formació del dímer, incrementar l'autofosforilació o incrementar directament l'activitat cinasa.

Ara que s'han caracteritzat les mutacions que donen un major risc de patir MP i s'ha esbrinat com funcionen, sorgeix una pregunta. Són aquestes mutacions l'única



manera de provocar un increment del risc de MP associada a LRRK2, o hi ha algun mecanisme per el que en absència d'aquestes mutacions LRRK2 pugui associar-se amb un major risc de patir MP?

#### **4.3. Alteracions no genètiques d'LRRK2 i l'associació amb la MP**

Fins ara s'ha parlat sobre els efectes d'LRRK2 en la patologia de la MP, de manera que s'ha pogut establir una relació clara entre l'increment de l'activitat cinasa produït per les diferents mutacions i la neurotoxicitat de la MP. Tot hi així, hi ha una altre opció poc comentada de moment però que podria ser de vital importància per possibles nous tractaments. En persones amb absència de mutacions que incrementin el risc de patir MP, es podria donar la mateixa toxicitat si la proteïna està sobreexpressada.

Aquesta sobreexpressió com a causant de la toxicitat en la MP és un dels mecanismes pel que es pot disminuir l'eliminació d'alfa-sinucleïna per la via CMA (66). Per tant, aquesta via d'eliminació es podria bloquejar amb la sobreexpressió d'LRRK2 i això contribuiria a la patologia de la malaltia.

En un estudi es va poder comprovar en un model animal com un augment dels nivells de l'ARNm d'LRRK2 afectava negativament a l'autofàgia (93). Això es troba en consonància amb els descobriments anteriors ja que es sap que les mutacions amb major activitat cinasa provoquen una desregulació d'aquesta via. Per tant, en el cas de l'autofàgia, la sobreexpressió d'LRRK2 tindria els mateixos efectes que les mutacions de risc per MP.

A més, s'ha comprovat mitjançant estudis *in vitro* com el micro RNA miRNA-599 pot regular el nivell d'expressió d'LRRK2. La sobreexpressió d'aquest micro RNA porta a una disminució dels nivells d'LRRK2 i per contra, mitjançant *knockdown* d'aquest micro RNA s'aconsegueix una sobreexpressió d'LRRK2 (94). Això obre les portes a una possible via de tractament mitjançant el control dels nivells d'expressió.

Per contra, hi ha altres estudis que apunten a un increment de l'activitat cinasa no associat a cap mutació de risc com al causant de la MP en les formes idiopàtiques (no associades a causes genètiques) (95). Els mecanismes per els que es dona aquest augment de l'activitat encara són desconeguts, però donat que es tracta d'una proteïna amb una regulació complexa (associació amb GTP, autofosforilació i formació de dímers), alteracions en aquests processos reguladors de l'activitat podrien ser els causants.

De fet, en un estudi es va mesurar el nivell de fosforilació d'un dels substrats (Rab10) i d'autofosforilació de pacients amb MP idiopàtica i es va trobar un increment de la fosforilació de 4 vegades més per Rab10 i 6 vegades més per l'autofosforilació respecte el control (96). Això apunta a que les causes de la MP associada a l'activitat d'LRRK2 són per un increment de l'activitat cinasa i no tant per una sobreexpressió de la proteïna. Tot i així, no s'ha de descartar aquesta possibilitat.

Per tant, amb aquestes evidències s'ha establert una relació entre LRRK2 i la MP no només amb les mutacions de risc d'LRRK2, sinó també en absència d'aquestes.

Això és de vital importància per poder plantejar possibles nous tractaments, ja que poden ser beneficiosos per una gran part dels pacients que pateixen MP i no només dels pacients amb formes de MP familiar associades al gen d'LRRK2.

#### **4.4. Possibles nous tractaments a futur**

Abans de discutir sobre quins podrien ser els tractaments a futur cal comentar certs aspectes importants. Primerament, hi ha un problema important i és que la proteïna LRRK2 s'ha descobert fa relativament poc temps i encara no s'ha caracteritzat completament la seva activitat. Fins al 2021 no es va poder obtenir un model d'alta resolució d'LRRK2 (97) i això és vital per poder esbrinar l'estructura de les possibles molècules que puguin ser susceptibles de ser tractaments efectius. Per tant, ens trobem just a l'inici del descobriment de nous possibles tractaments amb LRRK2 com a diana terapèutica.

Un segon problema és el fet que per ser una malaltia neurològica, obliga a que els tractaments desenvolupats han d'actuar al cervell i cal que travessin la barrera hematoencefàlica o que s'administrin directament al sistema nerviós central, amb els riscos que comporten.

Finalment, com es tracta d'una malaltia neurodegenerativa de molt llarga evolució, és difícil avaluar l'efectivitat de la prevenció del desenvolupament de la malaltia, així com detectar els pacients abans que es presentin els símptomes motors (moment en que la neurodegeneració ja està força avançada).

Per tant, és un gran repte el desenvolupament i avaluació d'aquests nous tractaments. Tot i així, ja s'han fet alguns assajos clínics de diferents teràpies. Aquests tractaments en desenvolupament actuals es poden classificar en dos grups: el primer que consisteix en fàrmacs que inhibeixen directament l'activitat d'LRRK2 i el segon que consisteix en teràpies de silenciament de l'expressió gènica d'LRRK2 (siRNA, oligonucleòtids antisentit, etc.). Cada tipus de teràpia té els seus beneficis, inconvenients i reptes.

##### **4.4.1. Inhibidors directes d'LRRK2**

Aquest grup es basa en el desenvolupament de diferents molècules que puguin inhibir l'activitat d'LRRK2. Dins d'aquest grup es troben dos formes d'inhibició de l'activitat, inhibint directament l'activitat del domini cinasa, o bé alterant la interacció amb GTP del domini GTPasa. Ja s'han desenvolupat diverses molècules dels dos grups, però de moment només s'estan fent assajos clínics dels inhibidors directes de l'activitat cinasa.

##### **Inhibidors de l'activitat cinasa**

Degut a que totes les alteracions d'LRRK2 que causen MP porten a un increment de l'activitat cinasa, crear compostos que l'inhibeixen és el tractament més obvi i raonable. Totes les molècules descobertes fins ara d'aquest tipus es basen en la competició amb el lloc d'unió de l'ATP (98). Aquesta inhibició de l'activitat cinasa

presenta una marcada neuroprotecció (99), fet que fa aquestes molècules un tractament molt atractiu.

Tot i així, aquestes molècules no són perfectes. Les molècules inicialment descobertes, com MLI-2, GNE-7915 o PFE-360, van demostrar certs problemes pulmonars en els estudis en animals (100). Aquests efectes es podrien explicar per el fet que la inhibició bloqueja LRRK2 en una conformació tancada i això porta a la seva acumulació als microtúbuls i bloqueja el tràfic de les vesícules (101).

Un altre dels problemes d'aquesta inhibició directa del domini cinasa és el fet que la mutació G2019S, la més comuna de totes, sol ser resistent als inhibidors dissenyats per la forma no mutada (102). Per tant, aquest fet dificulta molt el disseny de noves molècules actives ja que requereix la creació d'inhibidors selectius per aquesta mutació que potser no són tan potents per la forma no mutada. Una possible solució per aquest problema seria el disseny de molècules que inhibeixin l'activitat cinasa d'LRRK2 en algun centre al·lostèric, però per el moment no s'ha trobat cap molècula amb aquestes característiques.

### **Moduladors de l'activitat GTPasa**

Ara per ara no és el tractament millor conegut, ja que s'ha estudiat menys que l'inhibició directa del domini cinasa, però tot i així hi ha algunes molècules que s'han provat en estudis *in vivo* com per exemple FX2149. Aquest enfoc pel tractament de la MP pot no ser el més evident a simple vista però té els seus beneficis. Totes les molècules estudiades es basen en la unió competitiva en el lloc del GTP, de manera que si no s'uneix el GTP el domini cinasa no es pot activar.

Un dels problemes d'aquestes molècules estudiades és el fet que en els estudis que es va comprovar la seva unió a LRRK2 no es va estudiar la seva especificitat i és esperable certa reactivitat creuada per la similitud del lloc d'unió a GTP d'altres proteïnes (103).

Un dels punts a favor d'aquest tipus d'inhibició és el fet que en actuar en un domini diferent al domini cinasa, la mutació G2019S que és la més habitual no és resistent a aquest tractament (103). Això permetria, en teoria, tractar la MP causada per mutacions i la no causada per aquestes de la mateixa manera, unificant el tractament.

Per tant, aquest enfoc té uns punts molt positius com la possibilitat d'unificar el tractament, però cal descartar la possible reactivitat creuada per poder establir la seguretat d'aquest tipus de tractament.

#### **4.4.2. Alteracions en els nivells d'expressió d'LRRK2**

Els anteriors tractaments es basen en el "mètode clàssic" de desenvolupament de teràpies (desenvolupament de molècules actives), mentre que aquests tractaments es basen en la medicina genètica (ús de material genètic com a tractament). Des d'un punt de vista teòric són els més prometedors, ja que les possibilitats d'efectes

adversos són inferiors als anteriors. Tot i així, es tracta d'una tecnologia molt innovadora que encara no es coneix completament.

Un dels primers intents de silenciament d'LRRK2 es va fer amb shRNA (ARN en llac petit) que van ser dissenyats específicament per les mutacions R1441G i R1441C (104). Aquest tractament permetia reduir l'expressió d'LRRK2 amb aquestes mutacions selectivament, mantenint nivells normals de la forma no mutada. Això és molt útil en persones heterozigots amb la mutació en només un dels al·lells.

Una teràpia més recent i que està actualment sent provada en assajos clínics és l'ús d'oligonucleòtids antisentit. Aquest tractament permet reduir l'expressió d'LRRK2 mitjançant l'eliminació de l'mRNA abans que sigui traduït a la proteïna. Tot i que aquesta teràpia sembla ser molt efectiva, això dona pas a una pregunta, la reducció dels nivells d'expressió d'LRRK2 comporta algun efecte nociu?

Aquest efecte de la reducció dels nivells d'LRRK2 està actualment en debat. Inicialment els estudis apuntaven a que la seva reducció o eliminació no es relacionava amb cap patologia (105). Però més endavant van sortir altres estudis que relacionaven la reducció dels nivells d'LRRK2 a les cèl·lules del pulmó amb un augment de l'adenocarcinoma (106). Tot i així, es va veure que els ratolins que desenvolupaven el carcinoma eren majoritàriament els exposats a un cancerigen del tabac, fet que apunta a que la falta d'LRRK2 no és suficient per desenvolupar càncer de pulmó per si sola (106). Això demostraria certa seguretat del tractament de la MP mitjançant la reducció dels nivells d'LRRK2 en persones no fumadores.

Tornant a la tecnologia d'oligonucleòtids antisentit, s'han desenvolupat dos oligonucleòtids amb capacitat de disminuir l'expressió d'LRRK2, un d'ells és el que està actualment en assaig clínic. En l'estudi es va demostrar que només es reduïa l'expressió d'LRRK2 al cervell, però això és perquè s'utilitzava una administració mitjançant injecció intratecal i els oligonucleòtids antisentit no creuen la barrera hematoencefàlica (107). Aquest fet permetria evitar el possible risc de càncer de pulmó comentat anteriorment, però aquest tipus d'administració comporta certs riscos.

Una possible solució per aquest tipus d'administració seria l'encapsulament dels oligonucleòtids en petits cossos apoptòtics (sABs de les sigles en anglès). Aquests sABs són petites encapsulacions de restes dels continguts cel·lulars en restes de la membrana plasmàtica. Si abans de provocar l'apoptosi de la cèl·lula aquesta es transfecta amb els oligonucleòtids d'interès, aquests sABs els contindran a l'interior i es poden utilitzar per vehicular-los. Un estudi va utilitzar sABs de cèl·lules tumorals amb una alta capacitat de metastasi al cervell per incrementar el tropisme dels sABs a aquest teixit (108). Això va permetre transportar els sABs amb els oligonucleòtids antisentit a l'interior a través de la barrera hematoencefàlica mitjançant transcitosis dels sABs a través de les cèl·lules epitel·lials de la barrera hematoencefàlica (108).

L'ús dels sABs per transportar els oligonucleòtids antisentit comentats anteriorment obre la possibilitat a la seva administració via intravenosa i d'aquesta manera evitar la via intratecal, que comporta més risc i és menys còmode per els pacients. Tot i així cal estudiar amb més detall els efectes sistèmics de la reducció dels nivells

d'LRRK2 per assegurar que no hi ha risc de càncer de pulmó en persones no fumadores.

Amb tota aquesta informació, un possible pla de tractament utilitzant els oligonucleòtids antisentit podria ser l'ús de sABs via intravenosa en persones no fumadores (si es confirma l'absència de risc de càncer de pulmó i altres patologies), i l'ús de la via intratecal per administrar els oligonucleòtids antisentit en persones fumadores (ja que aquests no creuen la barrera hematoencefàlica i la reducció dels nivells d'LRRK2 quedaria restringida al cervell).

Per tant, tot i que hi ha tractaments molt prometedors, alguns dels quals ja es troben en proves en humans, encara falten molts estudis al respecte per avaluar la seva seguretat, efectivitat i eficàcia a llarg termini.

## 5. Conclusions

A l'inici del treball es van plantejar diversos objectius a assolir, però la novetat del camp d'estudi i la complexitat de la MP dificulta valorar correctament el seu assoliment.

Primerament s'havia d'establir una relació clara entre LRRK2 i la MP, fet que sembla molt probable. Tot i que la malaltia es basa en la disfunció de l'alfa-sinucleïna i per tant, és aquesta proteïna la causa directa de la malaltia, LRRK2 contribueix a aquesta patologia. De manera que si bé, no es tracta d'una causa directa de la malaltia, podria considerar-se un important factor de risc per la seva progressió. **Les causes per les quals l'LRRK2 pot afavorir l'aparició de la MP compren principalment la disfunció del transport vesicular, inhibició directa de la destrucció de l'alfa-sinucleïna i alteració de l'homeòstasi dels mitocondris.**

El segon objectiu d'aquest treball es tractava de descobrir quines mutacions de risc existeixen per LRRK2 que poden propiciar l'aparició de la MP. Al treball s'han comentat deu mutacions, tot i que finalment sembla que per el moment són nou les que incrementen el risc de patir MP (la mutació I2012T encara està en debat la seva associació amb la MP). Si bé **totes les mutacions d'LRRK2 comentades acaben provocant un augment de l'activitat cinasa**, cada mutació ho fa per un mecanisme diferent i únic. Un problema a tenir en compte és el fet que la proteïna s'ha caracteritzat fa poc i encara avui no és coneix ben bé la seva activitat i molts mecanismes associats a aquesta. Per tant, això obre la possibilitat a l'existència de més mutacions encara no conegudes que provoquin un increment del risc de patir MP.

El tercer objectiu es basa en l'associació de LRRK2 amb la MP en absència de les mutacions de risc. Això és de vital importància per la viabilitat dels possibles tractaments de la MP amb LRRK2 com a diana ja que si en absència d'aquestes mutacions no hi ha una relació clara, la gran majoria dels pacients amb MP no es podrien beneficiar d'aquests tractaments. Tot i que inicialment es va plantejar una sobreexpressió d'LRRK2 com a possible causant de la MP, finalment tot apunta a que es tractaria per un increment de l'activitat cinasa espontani, encara que aquesta sobreexpressió podria contribuir igualment a la patologia. Però el més important és

el fet que **s'ha pogut establir una relació entre l'activitat d'LRRK2 i la MP**. Per tant, com a mínim amb els estudis preliminars existents ja s'ha pogut comprovar que **l'LRRK2 com a diana terapèutica per tractar, o prevenir, la MP és una opció viable**.

Finalment l'últim objectiu aprofita tota la informació obtinguda durant el treball per valorar possibles **nous tractaments a futur de la MP amb LRRK2 com a diana**. S'han trobat dos enfocos diferents pel descobriment de tractaments, un primer basat en el disseny de molècules amb activitat per inhibir el domini cinasa (ja sigui per unió amb aquest o al domini GTPasa), i un segon basat en la teràpia gènica.

Pel que fa a la inhibició de l'activitat cinasa, és possiblement l'enfoc més intuïtiu i fàcil. Moltes de les molècules que ja s'han descobert tenen una bona potència i són actives per via oral, fet que facilita molt l'administració del fàrmac. Però per contra, hi ha certes mutacions com la G2019S que són resistents a aquest tipus de tractament. Un altre problema d'aquest enfoc és el fet de la possible reactivitat creuada per la gran similitud de les altres proteïnes amb llocs d'unió per ATP i GTP (ja que els fàrmacs actuen competint per aquest espai amb les molècules endògenes). Per tant, és una via d'investigació molt prometedora però cal fer moltes proves en humans per caracteritzar el perfil de seguretat i efectivitat.

En el cas de la teràpia gènica, hi ha dos possibles línies de tractament. Per un costat, en pacients heterozigots en que un dels al·lells contingui una de les mutacions de risc, es podrien utilitzar shRNA, miRNA o qualsevol altre tecnologia de silenciament genètic per tal d'evitar l'expressió de l'al·lel mutat i deixar només l'expressió de l'al·lel *wild type*. Per altra banda, en pacients sense cap mutació de risc però que presentin símptomes compatibles amb MP es podria utilitzar oligonucleòtids antisentit com s'ha comentat en l'apartat corresponent. Un dels problemes principals és el fet de l'administració directa al sistema nerviós central, fet que es podria solucionar amb l'ús dels sABs comentats ja que facilitaria una administració amb menors riscos. Tot i així, la controvèrsia dels efectes sistèmics per disminució de l'expressió d'LRRK2 fan que una administració directa al sistema nerviós central pugui ser la solució per evitar aquests efectes adversos.

Finalment, cal adreçar diverses limitacions en aquest treball. Primerament, el fet que aquest sigui un camp molt innovador fa que molta informació obtinguda sigui susceptible a canviar a mesura que es va descobrint més d'aquest camp, i el fet que sigui un tema molt complex no ajuda a aquest fet. Una altre limitació a comentar és el fet que ara per ara, **cal esperar a l'aparició dels símptomes motors per diagnosticar la MP, i com bé s'ha comentat a la introducció, un cop s'arriba a aquest estadi la degeneració de les neurones dopaminèrgiques ja és molt extensa**.

Per tant, tot i que aquests possibles tractaments podrien frenar l'avanç de la malaltia, els esforços a futur haurien de ser enfocats a trobar mètodes de diagnòstic de la malaltia abans de l'aparició d'aquests símptomes motors. D'aquesta manera es podria evitar fins i tot l'aparició de la malaltia.

## 6. Bibliografia

1. Bandres-Ciga, S., M. Diez-Fairen, J.J. Kim, and A.B. Singleton. 2020. Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiol. Dis.* 137:104782. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104782>
2. Williams-Gray CH, Worth PF. Parkinson's disease. *Medicine.* 2016 Sep 1;44(9):542–6. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.06.001>
3. Polymeropoulos, M.H., J.J. Higgins, L.I. Golbe, W.G. Johnson, S.E. Ide, G. DiIorio, G. Sanges, E.S. Stenroos, L.T. Pho, A.A. Schaffer, et al. 1996. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 274:1197–1199. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1197>
4. Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276:2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
5. Postuma RB, Aarsland D, Barone P, Burn DJ, Hawkes CH, Oertel W, et al. Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012 Apr 15;27(5):617–26. <https://doi.org/10.1002/mds.24996>
6. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2006 Mar;5(3):235–45. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)
7. Katzenschlager R, Head J, Schrag A, Ben-Shlomo Y, Evans A, Lees AJ, et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology.* 2008 Aug 12;71(7):474–80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310812.43352.66>
8. Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: A case-control study. *Lancet Neurol.* 2015 Jan;14(1):57–64. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70287-X)
9. Marras C, Lang A. Parkinson's disease subtypes: Lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2013;84(4):409–415. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-303455>
10. Martinez-Martin P, Rodriguez-Blazquez C, Kurtis MM, Chaudhuri KR. NMSS Validation Group. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011 Feb 15;26(3):399–406. <https://doi.org/10.1002/mds.23462>
11. Ranzo A, Tolosa E, Gelpi E, Molinuevo JL, Valldeoriola F, Serradell M, et al. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: An observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2013 May;12(5):443–53. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70056-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70056-5)
12. Ma SY, Røyttä M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci.* 1997 Oct 3;151(1):83–7. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00100-7)
13. Burré J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Südhof TC. Properties of native brain  $\alpha$ -synuclein. *Nature.* 2013 Jun;498(7453):E4–6. <https://doi.org/10.1038/nature12125>

14. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ.  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011 Sep;477(7362):107–10. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
15. G; EDER. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 20 Mar 2024]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11286556/>
16. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, et al. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*. 2002 Feb;4(2):160–4. <https://doi.org/10.1038/ncb748>
17. Barrett PJ, Timothy Greenamyre J. Post-translational modification of  $\alpha$ -synuclein in parkinson's disease. *Brain Research*. 2015 Dec;1628:247–53. doi:10.1016/j.brainres.2015.06.002
18. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by  $\alpha$ -synuclein oligomers provides evidence for spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology. *J Neurochem*. 2009 Oct 1;111(1):192–203. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06324.x>
19. Kingwell K. Zeroing in on neurodegenerative  $\alpha$ -synuclein. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017 May 31;16(6):371–3. doi:10.1038/nrd.2017.95
20. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Mar 8;108(10):4194–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100976108>
21. Karpinar DP, Balija MBG, Kügler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, et al. Pre-fibrillar  $\alpha$ -synuclein variants with impaired  $\beta$ -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *EMBO J*. 2009 Oct 21;28(20):3256–68. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.257>
22. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by  $\alpha$ -synuclein oligomers provides evidence for spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology. *J Neurochem*. 2009 Oct 1;111(1):192–203. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06324.x>
23. Moon HE, Paek SH. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2015 Jun;24(2):103–16. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.2.103>
24. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990 Mar;54(3):823–7. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>
25. Bindoff LA, Birch-Machin MA, Cartlidge NEF, Parker WD, Turnbull DM. Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 1991 Aug 1;104(2):203–8. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(91\)90311-T](https://doi.org/10.1016/0022-510X(91)90311-T)
26. Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH. Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann Neurol*. 1992 Dec;32(6):782–8. <https://doi.org/10.1002/ana.410320612>
27. Mat Taib CN, Mustapha M. MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction of therapeutic strategies. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 2020 [citat el 21 Mar 2024]. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2020.5181>



28. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -Synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem*. 2008 Apr 4;283(14):9089–100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
29. Luth ES, Stavrovskaya IG, Bartels T, Kristal BS, Selkoe DJ. Soluble, prefibrillar  $\alpha$ -Synuclein oligomers promote complex I-dependent,  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*. 2014 Aug 1;289(31):21490–507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545749>
30. Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, et al.  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in parkinson's disease. *Science Translational Medicine*. 2016 Jun 8;8(342). doi:10.1126/scitranslmed.aaf3634
31. McNaught KStP, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2001 Jan;297(3):191–4. doi:10.1016/s0304-3940(00)01701-8
32. Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, Caballero C, Ferrer I, Obeso JA, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in parkinson disease brains. *Archives of Neurology*. 2010 Dec 1;67(12). doi:10.1001/archneurol.2010.198
33. Odin P, Wolters E, Antonini A. Continuous dopaminergic stimulation achieved by duodenal levodopa infusion. *Neurological Sciences*. 2008 Dec;29(S5):387–8. doi:10.1007/s10072-008-1054-7
34. Zeng B, Iravani MM, Lin S, Irifune M, Kuoppamäki M, Al-Barghouthy G, et al. MPTP treatment of common marmosets impairs proteasomal enzyme activity and decreases expression of structural and regulatory elements of the 26S proteasome. *European Journal of Neuroscience*. 2006 Apr;23(7):1766–74. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04718.x
35. Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R, et al. Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *The Journal of Neuroscience*. 2008 Aug 13;28(33):8189–98. doi:10.1523/jneurosci.2218-08.2008
36. Anglade P;Vyas S;Javoy-Agid F;Herrero MT;Michel PP;Marquez J;Mouatt-Prigent A;Ruberg M;Hirsch EC;Agid Y; Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with parkinson's disease [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 22 Mar 2024]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9046040/>
37. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006 Apr 19;441(7095):885–9. doi:10.1038/nature04724
38. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006 Apr 19;441(7095):880–4. doi:10.1038/nature04723
39. Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of autophagosomal proteins (LC3, Gabarap and gate-16) in Lewy Body disease. *Neurobiology of Disease*. 2011 Sept;43(3):690–7. doi:10.1016/j.nbd.2011.05.022
40. Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, et al. Pathogenic lysosomal depletion in parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*. 2010 Sept 15;30(37):12535–44. doi:10.1523/jneurosci.1920-10.2010

41. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*. 2009 Sept;35(3):385–98. doi:10.1016/j.nbd.2009.05.023
42. Cao, X. B., Guan, Q., Xu, Y., Wang, L., & Sun, S. G. (2006). Mechanism of over-activation in direct pathway mediated by dopamine D<sub>1</sub> receptor in rats with levodopa-induced dyskinesia. *Neuroscience bulletin*, 22(3), 159–164.
43. Antonini A, Barone P. Dopamine agonist-based strategies in the treatment of parkinson's disease. *Neurological Sciences*. 2008 Dec;29(S5):371–4. doi:10.1007/s10072-008-1049-4
44. Lew MF, Pahwa R, Leehey M, Bertoni J, Kricorian G. Safety and efficacy of newly formulated selegiline orally disintegrating tablets as an adjunct to levodopa in the management of 'off' episodes in patients with parkinson's disease. *Current Medical Research and Opinion*. 2007 Mar 1;23(4):741–50. doi:10.1185/030079906x167697
45. Uzun M, Alp R, Uzlu E, Alp SI, Çitil M, Topçu B, et al. P141 the investigation of Selegiline and rasagiline administration on QT interval in Conscious Rabbits. *Clinical Neurophysiology*. 2008 May;119. doi:10.1016/s1388-2457(08)60412-5
46. Canesi M, Zecchinelli AL, Pezzoli G, Antonini A. Clinical experience of tolcapone in advanced parkinson's disease. *Neurological Sciences*. 2008 Dec;29(S5):380–2. doi:10.1007/s10072-008-1052-9
47. Wolf E;Seppi K;Katzenschlager R;Hochschorner G;Ransmayr G;Schwingenschuh P;Ott E;Kloiber I;Haubenberger D;Auff E;Poewe W; Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in parkinson's disease [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 25 Mar 2024]. Disponibile a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20198649/>
48. Kumari U, Tan E-K. Leucine-rich repeat kinase 2-linked parkinson's disease: Clinical and molecular findings [Internet]. The Korean Movement Disorder Society; 2010 [citat el 26 Mar 2024]. Disponibile a: <https://www.e-jmd.org/journal/view.php?doi=10.14802%2Fjmd.10008>
49. Higashi S, Biskup S, West AB, Trinkaus D, Dawson VL, Faull RLM, et al. Localization of parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Research*. 2007 Jun;1155:208–19. doi:10.1016/j.brainres.2007.04.034
50. MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K, Abeliovich A. The familial parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*. 2006 Nov;52(4):587–93. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.008
51. Biskup S;Moore DJ;Celsi F;Higashi S;West AB;Andrabi SA;Kurkinen K;Yu SW;Savitt JM;Waldvogel HJ;Faull RLM;Emson PC;Torp R;Ottersen OP;Dawson TM;Dawson VL; Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 26 Mar 2024]. Disponibile a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17120249/>
52. Shin N, Jeong H, Kwon J, Heo HY, Kwon JJ, Yun HJ, et al. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2008 [citat el 27 Mar 2024]. Disponibile a: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445495>
53. Parisiadou L, Xie C, Cho HJ, Lin X, Gu X-L, Long C-X, et al. Phosphorylation of ezrin/radixin/moesin proteins by LRRK2 promotes the rearrangement of actin

- cytoskeleton in neuronal morphogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 2009 Nov 4;29(44):13971–80. doi:10.1523/jneurosci.3799-09.2009
54. Lewis PA, Greggio E, Beilina A, Jain S, Baker A, Cookson MR. The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007 Jun;357(3):668–71. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.006
  55. Greggio E, Cookson MR. Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and parkinson's disease: Three questions [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2009 [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695577/>
  56. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, et al. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity [Internet]. Oxford University Press; 2007 [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://academic.oup.com/hmg/article/16/2/223/2356167>
  57. Carballo-Carbajal I, Weber-Endress S, Rovelli G, Chan D, Wolozin B, Klein CL, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2010 [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163153/>
  58. Sancho RM, Law BMH, Harvey K. Mutations in the LRRK2 ROC-Cor Tandem Domain Link Parkinson's disease to Wnt signalling pathways [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2009 [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748899/>
  59. Lin C-H, Tsai P-I, Wu R-M, Chien C-T. Irrk2 g2019s mutation induces dendrite degeneration through mislocalization and phosphorylation of tau by recruiting autoactivated gsk3 $\beta$ . *The Journal of Neuroscience*. 2010 Sept 29;30(39):13138–49. doi:10.1523/jneurosci.1737-10.2010
  60. MacLeod D;Dowman J;Hammond R;Leete T;Inoue K;Abeliovich A; The familial parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17114044/>
  61. 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 [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2010 [citat el 28 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2987719/>
  62. 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 [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 29 Mar 2024]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30209220/>
  63. Steger M, Tonelli F, Ito G, Davies P, Trost M, Vetter M, et al. Phosphoproteomics reveals that parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases [Internet]. U.S. National Library of Medicine; 2016 [citat el 29 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4769169/>
  64. Liu Z, Bryant N, Kumaran R, Beilina A, Abeliovich A, Cookson MR, et al. LRRK2 phosphorylates membrane-bound rabs and is activated by GTP-bound RAB7L1 to promote recruitment to the Trans-Golgi Network [Internet]. U.S. National Library

- of Medicine; 2018 [citat el 29 Mar 2024]. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5886198/>
65. Tong Y; Giaime E; Yamaguchi H; Ichimura T; Liu Y; Si H; Cai H; Bonventre JV; Shen J; Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes age-dependent bi-phasic alterations of the autophagy pathway [Internet]. U.S. National Library of Medicine; [citat el 29 Mar 2024]. Disponible a: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22230652/>
  66. O'Hara, D.M. *et al.* (2020) 'LRRK2 and  $\alpha$ -synuclein: Distinct or synergistic players in parkinson's disease?', *Frontiers in Neuroscience*, 14. doi:10.3389/fnins.2020.00577.
  67. Marui W, Iseki E, Nakai T, Miura S, Kato M, Uéda K, et al. Progression and staging of Lewy pathology in brains from patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of the Neurological Sciences*. 2002 Mar;195(2):153–9. doi:10.1016/s0022-510x(02)00006-0
  68. Caminiti SP, Presotto L, Baroncini D, Garibotto V, Moresco RM, Gianolli L, et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical*. 2017;14:734–40. doi:10.1016/j.nicl.2017.03.011
  69. Bridi JC, Hirth F. Mechanisms of  $\alpha$ -synuclein induced synaptopathy in parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2018 Feb 19;12. doi:10.3389/fnins.2018.00080
  70. Burré J. The synaptic function of  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Parkinson's Disease*. 2015 Oct 8;5(4):699–713. doi:10.3233/jpd-150642
  71. Janezic S, Threlfell S, Dodson PD, Dowie MJ, Taylor TN, Potgieter D, et al. Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new parkinson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Sept 30;110(42). doi:10.1073/pnas.1309143110
  72. Pissadaki EK, Bolam JP. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: Clues to susceptibility in parkinson's disease. *Frontiers in Computational Neuroscience*. 2013;7. doi:10.3389/fncom.2013.00013
  73. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Neurodegenerative Diseases. *Nature*. 2006 Oct;443(7113):787–95. doi:10.1038/nature05292
  74. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A role for  $\alpha$ -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *The Journal of Neuroscience*. 2002 Apr 15;22(8):3090–9. doi:10.1523/jneurosci.22-08-03090.2002
  75. Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced  $\alpha$ -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of Aging*. 2010 Jun;31(6):953–68. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008
  76. Grünblatt E, Mandel S, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Amarglio N, Rechavi G, et al. Gene expression profiling of Parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *Journal of Neural Transmission*. 2004 Sept 30;111(12):1543–73. doi:10.1007/s00702-004-0212-1
  77. Paxinou E, Chen Q, Weisse M, Giasson BI, Norris EH, Rueter SM, et al. Induction of  $\alpha$ -synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *The Journal of Neuroscience*. 2001 Oct 15;21(20):8053–61. doi:10.1523/jneurosci.21-20-08053.2001

78. Lehtonen Š, Sonninen T-M, Wojciechowski S, Goldsteins G, Koistinaho J. Dysfunction of cellular proteostasis in parkinson's disease [Internet]. *Frontiers*; 2019 [citat el 28 Abr 2024]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00457/full>
79. Lichtenberg M, Mansilla A, Zecchini VR, Fleming A, Rubinsztein DC. The parkinson's disease protein LRRK2 impairs proteasome substrate clearance without affecting proteasome catalytic activity. *Cell Death & Disease*. 2011 Aug 25;2(8). doi:10.1038/cddis.2011.81
80. Madureira M, Connor-Robson N, Wade-Martins R. "LRRK2: Autophagy and lysosomal activity." *Frontiers in Neuroscience*. 2020 May 25;14. doi:10.3389/fnins.2020.00498
81. Gómez-Suaga P, Rivero-Ríos P, Fdez E, Blanca Ramírez M, Ferrer I, Aiastrui A, et al. LRRK2 delays degradative receptor trafficking by impeding late endosomal budding through decreasing RAB7 activity. *Human Molecular Genetics*. 2014 Jul 30;23(25):6779–96. doi:10.1093/hmg/ddu395
82. Hsieh C-H, Shaltouki A, Gonzalez AE, Bettencourt da Cruz A, Burbulla LF, St. Lawrence E, et al. 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):709–24. doi:10.1016/j.stem.2016.08.002
83. Chen M-L, Wu R-M. LRRK 2 gene mutations in the pathophysiology of the roco domain and therapeutic targets for parkinson's disease: A Review. *Journal of Biomedical Science*. 2018 Jun 14;25(1). doi:10.1186/s12929-018-0454-0
84. Civiero L, Russo I, Bubacco L, Greggio E. Molecular insights and functional implication of LRRK2 dimerization. *Advances in Neurobiology*. 2017;107–21. doi:10.1007/978-3-319-49969-7\_6
85. Huang X, Wu C, Park Y, Long X, Hoang QQ, Liao J. The parkinson's disease–associated mutation N1437H impairs conformational dynamics in the G domain of LRRK2. *The FASEB Journal*. 2018 Dec 28;33(4):4814–23. doi:10.1096/fj.201802031r
86. Daniëls V, Vancraenenbroeck R, Law BM, Greggio E, Lobbestael E, Gao F, et al. Insight into the mode of action of the LRRK2 Y1699C pathogenic mutant. *Journal of Neurochemistry*. 2010 Dec 16;116(2):304–15. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07105.x
87. Shu Y, Ming J, Zhang P, Wang Q, Jiao F, Tian B. Parkinson-related LRRK2 mutation R1628P enables cdk5 phosphorylation of LRRK2 and upregulates its kinase activity. *PLOS ONE*. 2016 Mar 1;11(3). doi:10.1371/journal.pone.0149739
88. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, et al. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Human Molecular Genetics*. 2007 Jan 2;16(2):223–32. doi:10.1093/hmg/ddl471
89. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated parkinson's disease: A case-control study. *The Lancet Neurology*. 2008 Jul;7(7):583–90. doi:10.1016/s1474-4422(08)70117-0
90. Naskar A, Bhanja KK, Roy RK, Patra N. Role of the residue Q1919 in increasing kinase activity of g2019s LRRK2 kinase: A computational study. *ChemPhysChem*. 2023 Aug 31;24(21). doi:10.1002/cphc.202300306

91. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, et al. The parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Human Molecular Genetics*. 2005 Dec 1;15(2):223–32. doi:10.1093/hmg/ddi439
92. Tezuka T, Taniguchi D, Sano M, Shimada T, Oji Y, Tsunemi T, et al. Pathophysiological evaluation of the LRRK2 G2385R risk variant for parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*. 2022 Aug 5;8(1). doi:10.1038/s41531-022-00367-y
93. Takagawa T, Kitani A, Fuss I, Levine B, Brant SR, Peter I, et al. An increase in LRRK2 suppresses autophagy and enhances dectin-1–induced immunity in a mouse model of colitis. *Science Translational Medicine*. 2018 Jun 6;10(444). doi:10.1126/scitranslmed.aan8162
94. Wu, Q., Xi, D. Z., & Wang, Y. H. (2019). MicroRNA-599 regulates the development of Parkinson's disease through mediating LRRK2 expression. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(2), 724–731. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201901\\_16886](https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16886)
95. Rocha EM, Keeney MT, Di Maio R, De Miranda BR, Greenamyre JT. LRRK2 and idiopathic parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*. 2022 Mar;45(3):224–36. doi:10.1016/j.tins.2021.12.002
96. Di Maio R, Hoffman EK, Rocha EM, Keeney MT, Sanders LH, De Miranda BR, et al. LRRK2 activation in idiopathic parkinson's disease. *Science Translational Medicine*. 2018 Jul 25;10(451). doi:10.1126/scitranslmed.aar5429
97. Myasnikov A, Zhu H, Hixson P, Xie B, Yu K, Pitre A, et al. Structural analysis of the full-length human LRRK2. *Cell*. 2021 Jun;184(13). doi:10.1016/j.cell.2021.05.004
98. Zhu H, Hixson P, Ma W, Sun J. Pharmacology of LRRK2 with type I and II kinase inhibitors revealed by Cryo-EM. *Cell Discovery*. 2024 Jan 23;10(1). doi:10.1038/s41421-023-00639-8
99. West AB. Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in parkinson disease. *Experimental Neurology*. 2017 Dec;298:236–45. doi:10.1016/j.expneurol.2017.07.019
100. Baptista MA, Merchant K, Barrett T, Bhargava S, Bryce DK, Ellis JM, et al. LRRK2 inhibitors induce reversible changes in nonhuman primate lungs without measurable pulmonary deficits. *Science Translational Medicine*. 2020 Apr 22;12(540). doi:10.1126/scitranslmed.aav0820
101. Deniston CK, Salogiannis J, Mathea S, Snead DM, Lahiri I, Matyszewski M, et al. Structure of LRRK2 in parkinson's disease and model for microtubule interaction. *Nature*. 2020 Aug 19;588(7837):344–9. doi:10.1038/s41586-020-2673-2
102. Kelly K, Wang S, Boddu R, Liu Z, Moukha-Chafiq O, Augelli-Szafran C, et al. The g2019s mutation in LRRK2 imparts resiliency to kinase inhibition. *Experimental Neurology*. 2018 Nov;309:1–13. doi:10.1016/j.expneurol.2018.07.012
103. Wojewska DN, Kortholt A. LRRK2 targeting strategies as potential treatment of parkinson's disease. *Biomolecules*. 2021 Jul 26;11(8):1101. doi:10.3390/biom11081101

104. de Yñigo-Mojado L, Martín-Ruíz I, Sutherland JD. Efficient allele-specific targeting of LRRK2 R1441 mutations mediated by RNAi. *PLoS ONE*. 2011 Jun 21;6(6). doi:10.1371/journal.pone.0021352
105. Whiffin N, Armean IM, Kleinman A, Marshall JL, Minikel EV, Goodrich JK, et al. The effect of LRRK2 loss-of-function variants in humans. *Nature Medicine*. 2020 May 27;26(6):869–77. doi:10.1038/s41591-020-0893-5
106. Lebovitz C, Wretham N, Osooly M, Milne K, Dash T, Thornton S, et al. Loss of parkinson's susceptibility gene LRRK2 promotes carcinogen-induced lung tumorigenesis. *Scientific Reports*. 2021 Jan 22;11(1). doi:10.1038/s41598-021-81639-0
107. Zhao HT, John N, Delic V, Ikeda-Lee K, Kim A, Weihofen A, et al. LRRK2 antisense oligonucleotides ameliorate  $\alpha$ -synuclein inclusion formation in a parkinson's disease mouse model. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2017 Sept;8:508–19. doi:10.1016/j.omtn.2017.08.002
108. Wang Y, Pang J, Wang Q, Yan L, Wang L, Xing Z, et al. Delivering antisense oligonucleotides across the blood-brain barrier by tumor cell-derived small apoptotic bodies. *Advanced Science*. 2021 May 4;8(13). doi:10.1002/advs.202004929