



HAL
open science

Identification de phosphatases agissant sur la régulation de la phosphorylation de la “ Leucine-Rich Repeat Kinase 2 ”, une kinase impliquée dans la maladie de Parkinson

Matthieu Drouyer

► **To cite this version:**

Matthieu Drouyer. Identification de phosphatases agissant sur la régulation de la phosphorylation de la “ Leucine-Rich Repeat Kinase 2 ”, une kinase impliquée dans la maladie de Parkinson. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS052 . tel-03095763

HAL Id: tel-03095763

<https://theses.hal.science/tel-03095763>

Submitted on 4 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Lille – Nord de France
Université de Lille

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
En Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, Spécialité Neurosciences

Présentée par :
Matthieu DROUYER

**Identification de phosphatases agissant sur la régulation de la
phosphorylation de la « Leucine-Rich Repeat Kinase 2 »,
une kinase impliquée dans la maladie de Parkinson**

Soutenue publiquement le 20 décembre 2018 devant le jury composé de :

Mr le Dr. Emmanuel Brouillet

Mme le Dr. Olga Corti

Mr le Pr Jean-Noël Octave

Mme le Dr Marie-Christine Chartier-Harlin

Mr le Pr Alain Destée

Mr le Dr. Jean-Marc Taymans

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Membre émérite

Directeur de Thèse

« La vérité est comme un puzzle, à ceci près que le nombre d'éléments qui la constituent n'est pas connu à l'avance. Or elle ne peut apparaître qu'une fois que tous les morceaux de la mosaïque ont été assemblés. »

Thérapie - **Sebastian Fitzek**

Remerciements

Je tiens en premier lieu à adresser mes sincères remerciements au Dr. **Olga Corti** et au Pr **Jean-Noël Octave** qui ont accepté de juger mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je remercie également le Dr. **Emmanuel Brouillet** d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie chaleureusement le Pr **Alain Destée**, sans qui cette thèse n'aurait pas pu commencer. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse

Je tiens également à remercier le Dr **Luc Buée**, qui dirige Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert de Lille, au sein duquel j'ai effectué ma thèse

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Dr **Marie-Christine Chartier-Harlin**, directrice de l'équipe « Stades précoces de la maladie de Parkinson » de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je la remercie pour le partage de son expérience et de ses conseils avisés.

J'adresse toute ma gratitude au Dr. **Jean-Marc Taymans**, directeur de thèse, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler sur un projet scientifique particulièrement intéressant et stimulant. Grâce à lui, j'ai eu l'occasion de réaliser des choses passionnantes et variées durant ces trois années. Ses compétences, sa rigueur scientifique et sa positivité m'ont beaucoup appris. Un grand Merci.

Je remercie sincèrement le Dr. **Malika Hamdane** et le Dr. **Robert-Alain Toillon** d'avoir suivi mon travail de thèse par le biais du Comité de Suivi de Thèse.

Je remercie aussi **Marco** et **Nathalie** pour leurs connaissances et conseils qu'ils ont su me transmettre en particulier en « culture cell » et en ICC.

Merci également à **Elodie** qui a commencé sa thèse en même temps que moi, avec qui j'ai traversé tous les moments plus ou moins difficiles d'une thèse. Sa joie et le « rose power » ont éclairé ces trois années.

Je tiens maintenant à remercier **Laurine**, **Antoine** et **William** pour ces bon moments passés ensemble dans le labo et en dehors (soirées séries, fléchettes et dégustation de rhum). I would like also to thank **Alessia** who brings some english in the lab ;-).

J'aimerais grandement remercier **Pierre** et **Thomas** pour toutes leurs connaissances et aides techniques qu'ils ont su me transmettre.

Merci à **Réginald** qui a participé à ce travail, plus particulièrement pour la partie Xénope.

Merci à toutes les autres personnes actuelles ou anciennes de l'équipe, **Coline**, **Cécile**, **Justine**, **Manelle**, **Mérodie**, ... pour toutes les conversations et pour tous les conseils prodigués.

Un grand merci à **Thomas** de la « laverie », toujours au « taquet », et sans qui la vie de laboratoire serait plus compliquée.

Je remercie bien évidemment, mes **proches**, mes **parents**, ma **sœur** et **Féline**, qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de ce long périple. Je n'ai jamais manqué de rien et ça grâce à vous. Merci à **Papy et Mamie** d'Angers, vous m'avez plus que soutenu et toujours cru en moi.

Résumé

Le gène codant la Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (*LRRK2*) compte parmi les déterminants génétiques les plus importants de la maladie de Parkinson (MP). Les mutations de *LRRK2* sont parmi les plus fréquentes de la MP. La protéine LRRK2 est une protéine hautement phosphorylée dont les sites de phosphorylation hétérologues (S910/S935/S955/S973) sont déphosphorylés dans le tissu cérébral de patients sporadiques, en présence de certains mutants pathogènes de *LRRK2* et après un traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2, une thérapie potentielle de la MP. Par ailleurs, cette déphosphorylation est accompagnée d'une augmentation de l'interaction avec la phosphatase PPP1CA et une perte de liaison avec la protéine 14-3-3. Ces observations indiquent qu'il existe un déséquilibre de la phosphorylation de LRRK2 dans la MP et que les phosphatases joueraient un rôle important dans la régulation de cette protéine. Les protéines phosphatases PP1 et PP2A sont des holoenzymes composées de sous-unités catalytiques et régulatrice et la composition précise des holoenzymes de phosphatases actives sur LRRK2 n'est pas connue. L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer la composition précise des holoenzymes phosphatases régulant la phosphorylation de LRRK2.

Ce travail s'appuie sur un criblage par génétique inverse des phosphatases effectué préalablement, qui a permis de définir un nombre de phosphatases candidates comprenant des sous-unités de PP1 et PP2A. Nous avons dans un premier temps étudié l'interaction fonctionnelle entre LRRK2 et les différentes sous-unités de phosphatases candidates par des techniques d'immunocytochimie dans les cellules HEK-293T en conditions basales et de déphosphorylation. Un travail collaboratif nous a permis de réaliser une cinétique de déphosphorylation de LRRK2 après micro-injection de la phosphatase PP2A dans des ovocytes de Xénope. Enfin, le développement et l'utilisation de la technologie CRISPR-dCas9 ont permis de moduler l'expression endogène des différentes sous-unités composant les holoenzymes dans des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y.

Les analyses de co-localisation et de Proximity Ligation Assay (PLA) ont permis de d'observer un recrutement des sous-unités de PP1 et PP2A dans le même compartiment cellulaire que LRRK2. De plus, l'interaction entre LRRK2 et les sous-unités PPP1CA, PPP2CA, PPP2R2A et PPP2R2B est augmentée en condition de déphosphorylation. Nous avons ensuite montré que les combinaisons PPP2CA:PPP2R2A et PPP2CA:PPP2R2B déphosphorylaient efficacement LRRK2 sur le site S935 par rapport à la condition contrôle et la condition PPP2CA seule et ce dès 30 minutes. Dans les cellules SH-SY5Y, la modulation de l'expression endogène des phosphatases a confirmé l'importance des sous-unités régulatrices de PP1 et PP2A, respectivement PPP1R1B et PPP2R2A dans la régulation de la phosphorylation de LRRK2.

En conclusion, ce travail de thèse a permis de confirmer l'implication de PP1 et révéler le rôle de PP2A dans la régulation de la phosphorylation de LRRK2. Nous avons démontré que l'holoenzyme PPP2CA:PPP2R2A/B est un régulateur physiologique de LRRK2. Ces informations sont donc très utiles pour mieux comprendre la cascade de signalisation de la protéine LRRK2, un déterminant génétique clef de la MP.

Abstract

Mutations in the gene encoding Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) are one of the most common genetic causes of Parkinson's disease (PD). LRRK2 is a highly phosphorylated protein and one particular phosphosite cluster (S910/S935/S955/S973) is dephosphorylated in several disease mutant forms of the protein, in sporadic PD brain tissue and upon LRRK2 inhibitor treatment, considered as a potential therapeutic approach. Interestingly, dephosphorylation of the phosphosites of the LRRK2 N-terminal region in the presence of LRRK2 PD mutations or inhibition of LRRK2 led to similar changes in LRRK2 complexes such as loss of 14-3-3 binding and increased binding of PPP1CA. This indicates that phosphatases play an important role in LRRK2 cellular regulation. PP1, like PP2A, functions solely as a multimeric enzyme (a.k.a. holoenzyme) consisting of a catalytic and a regulatory subunit, and does not function as free monomers in eukaryotic cells. Therefore, the aim of this study is to validate candidate phosphatases regulating the LRRK2 phosphorylation cycle. This work is based on a previous phosphatome-wide reverse genetics screen, revealing LRRK2 phosphorylation regulators linked to the PP1 and PP2A holoenzyme complexes. We first analyzed functional interaction of LRRK2 with candidate phosphatases by immunofluorescence microscopy in HEK-293T cells, under basal and dephosphorylation conditions. In a collaborative work, we also injected *Xenopus* oocytes with combinations of PP2A phosphatase for a kinetic analysis of LRRK2 dephosphorylation. Endogenous expression of selected candidate LRRK2 phosphatases was modulated using lentiviral vector and CRISPR-dCas9 technology in SH-SY5Y neuroblastoma cells.

A close association of LRRK2 with a subset of candidate catalytic and regulatory subunits of PP1 and PP2A was observed. Moreover, LRRK2 preferentially interacts with PPP1CA as well as PPP2CA, PPP2R2A and PPP2R2B under dephosphorylation conditions. Our kinetic analysis in a physiological system showed an increase of dephosphorylation of LRRK2 at S935 when the PP2A holoenzyme was completed with PPP2R2A or PPP2R2B regulatory subunits compared to conditions with PPP2CA injection alone or the buffer control. In SH-SY5Y cells, modulation of endogenous expression of phosphatases confirmed the importance of regulatory subunits PPP1R1B and PPP2R2A of PP1 and PP2A respectively in regulating LRRK2 phosphorylation.

In conclusion, this thesis work both confirmed a role for PP1 and revealed a role for a specific PP2A holoenzyme, denoted PPP2CA:PPP2R2A/B in LRRK2 phosphoregulation. These scientific data are therefore relevant to better understand the LRRK2 signaling cascades, a key genetic contributor in PD.

Sommaire

INDEX DES FIGURES	4
INDEX DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
INTRODUCTION.....	9
<i>Chapitre 1 : Maladie de Parkinson</i>	<i>10</i>
I - Historique et épidémiologie	10
II - Symptomatologie et diagnostique clinique	11
II.A - Symptômes moteurs	11
II.B - Symptômes non-moteurs	11
II.B.1 - Troubles cognitifs	12
II.B.2 - Troubles d'ordre psychiques.....	12
II.B.3 - Troubles sensitifs	12
II.B.4 - Troubles du sommeil	13
II.B.5 - Troubles végétatifs.....	13
II.C - Diagnostic clinique	13
III - Physiopathologie/anapathologie.....	14
III.A - Caractéristiques neuropathologiques	14
III.B - Les ganglions de la base	15
III.C - Progression des lésions	16
IV - Traitements symptomatiques	17
IV.A - Traitements médicamenteux	18
IV.B - Traitements chirurgicaux	18
V - Etiologie	18
V.A - Environnement.....	19
V.B - Génétique	20
VI - Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MP	22
VI.A - Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif	23
VI.B - Inflammation	24
VI.C - Trafic Vésiculaire et clairance protéique	24
VI.D - Accumulation et progression de type prion-like d' α -synucléine	26
VII - Stratégies thérapeutiques et traitements potentiels	29
<i>Chapitre 2 : La protéine LRRK2</i>	<i>31</i>
I - LRRK2	31
I.A - Génétique	31
II - Localisation	32
III - Structure	34
III.A - Domaine GTPase	34
III.B - Domaine Kinase	35
III.C - Domaines d'interaction protéine-protéine	38
IV - Régulation de la phosphorylation de LRRK2	39
IV.A - Sites d'autophosphorylation	39
IV.B - Sites de phosphorylation hétérologue.....	40
IV.B.1 - Les kinases	41
IV.B.2 - Les phosphatases.....	42
IV.B.3 - Les Interacteurs de LRRK2	43
IV.C - L'ubiquitination	46
IV.D - Potentiel Biomarqueurs	47
V - Fonctions et rôles de LRRK2	49
V.A - Trafic Vésiculaire	49

V.B - Autophagie.....	50
V.C - Régulation du Cytosquelette.....	51
V.D - Mitochondrie	53
V.E - Système immunitaire	55
VI - Stratégies thérapeutiques ciblant LRRK2	57
VI.A - Inhiber la fonction kinase	58
VI.B - Cibler la fonction GTPase	60
Chapitre 3 : Les Protéine Phosphatases	62
I - Généralités.....	63
II - Les protéine phosphatases de type 1	64
II.A - La sous-unité catalytique de PP1	65
II.B - Les sous-unités régulatrices de PP1	65
III - La Protéine Phosphatase de type 2A	67
III.A - Structure et composition de la PP2A	67
III.B - La sous-unité catalytique C	68
III.C - La sous-unité structurale A	68
III.D - Les sous-unités régulatrices B	69
III.E - Régulation de PP2A.....	72
III.E.1 - Composition de l'holoenzyme.....	72
III.E.2 - Les modifications post-traductionnelles.....	72
III.E.3 - Autres régulateurs.....	74
Chapitre 4 : Technologie CRISPR-Cas.....	75
I - Généralités.....	75
II - Système CRISPRi et CRISPRa	77
OBJECTIFS DE LA THESE	80
MATERIEL ET METHODES.....	83
<i>Lignée Cellulaire</i>	<i>84</i>
<i>Culture cellulaire</i>	<i>84</i>
I - Transfections	84
II - Traitements pharmacologiques	85
<i>Analyses Biochimiques</i>	<i>85</i>
I - Extraction des protéines totales.....	85
II - Dosage protéique.....	85
III - Séparation sur gel d'acrylamide monodimensionnel	86
IV - Western Blot.....	86
<i>Analyse transcriptomique</i>	<i>88</i>
I - Extraction ARN.....	88
II - Rétro-transcription	88
III - PCR quantitative	89
<i>ICC et détermination du degré de colocalisation</i>	<i>90</i>
<i>Proximity Ligation Assay (PLA).....</i>	<i>90</i>
<i>Analyse cinétique de la déphosphorylation de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope (Xenopus laevis)</i>	<i>91</i>
I - Expression et purification des protéines recombinantes	91
II - Micro-injection	92
<i>Production de vecteurs lentiviraux.....</i>	<i>93</i>
I - Etablissement des lignées cellulaires stables dCas9	93
II - Procédure de transduction	94
III - Design des séquences guides ARN	95
<i>Analyses statistiques.....</i>	<i>95</i>
RESULTATS	97

<i>Etat de phosphorylation de mutants de la protéine LRRK2</i>	98
<i>Identification et validation des phosphatases régulant LRRK2</i>	101
I - Données préalables	101
II - Analyse de la distribution subcellulaire des protéine phosphatases PP1 et PP2A	103
III - Analyse de l'effet d'une surexpression des sous-unité catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A	111
IV - Analyse cinétique de la déphosphorylation de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope (<i>Xenopus laevis</i>)	112
IV.A - Production et purification des protéines à micro-injecter	112
IV.B - Cinétique de déphosphorylation de LRRK2	114
<i>Modulation de l'expression des phosphatases par la technologie CRISPR-Cas9</i>	116
I - Design des guides ARN pour le ciblage des phosphatases	116
II - Mise en place du système CRISPR-dCas9 dans la lignée de neuroblastome humains SH-SY5Y	119
II.A - Etablissement de lignées stables dCas9	119
II.B - Expression des guides sgARN dans les cellules SH-SY5Y-dCas9	119
II.C - Validation des guides ARN pour le ciblage des phosphatases	120
II.C.1 - Phosphatase PP1	121
II.C.2 - Phosphatase PP2A	122
II.C.3 - Conclusion sur nos designs de sgARN	125
II.D - Effet de la modulation de l'expression des phosphatases sur la phosphorylation de LRRK2 en pS935	126
DISCUSSION	129
<i>La phosphorylation du site S935 de LRRK2</i>	130
<i>Rappel de l'objectif de la thèse</i>	132
<i>La validation de phosphatases par l'étude de la localisation/interaction dans le compartiment de LRRK2</i>	132
<i>Les évidences pour une déphosphorylation directe de LRRK2 par le complexe PPP2CA+PPP2R2 et l'importance de la sous-unité régulatrice</i>	134
<i>Confirmation de la validation des phosphatases de LRRK2 en condition d'expression endogène et liens avec la MP</i>	135
<i>La correspondance de la distribution tissulaire de LRRK2 avec ses phosphatases</i>	137
<i>LRRK2, ses phosphatases, son ubiquitination et sa stabilité</i>	138
<i>LRRK2, ses phosphatases et la MP</i>	139
CONCLUSION	143
PERSPECTIVES	144
BIBLIOGRAPHIE	146
ANNEXES	191
ANNEXE 1 : POSITION DES SGARN PAR RAPPORT AUX PROMOTEURS	192
ANNEXE 2 : ETUDE PILOTE SUR L'INVESTIGATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES PHOSPHATASES DANS DES CELLULES PROVENANT DE PATIENTS PARKINSONIENS	194
ANNEXE 3 : ARTICLE EN SOUMISSION	197

Index des figures

Figure 1 : Neuropathologie de la MP.....	14
Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base.....	16
Figure 3 : Évolution temporelle de l'apparition des symptômes moteurs et non moteurs de la MP selon l'hypothèse de Braak.....	17
Figure 4 : MP : une étiologie complexe.....	19
Figure 5 : Représentation schématique de l'architecture génétique de la MP.....	22
Figure 6 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans la MP.....	28
Figure 7 : Expression et localisation subcellulaire de LRRK2.....	33
Figure 8 : Structure de la protéine LRRK2 avec les positions des mutations au sein des domaines fonctionnels.....	34
Figure 9 : Impact des sites de phosphorylation N-ter sur l'activité kinase de LRRK2.....	37
Figure 10 : Structure de la protéine LRRK2 avec les positions des sites de phosphorylations.....	39
Figure 11 : Représentation schématique des partenaires impliqués dans la phosphorégulation de LRRK2.....	45
Figure 12 : Cycle déphosphorylation - ubiquitination de LRRK2.....	47
Figure 13 : Implication de LRRK2 dans une variété de processus cellulaires.....	57
Figure 14 : Stratégies thérapeutiques potentielles pour cibler la protéine LRRK2.....	61
Figure 15 : Part en pourcentage de protéines phosphorylées au niveau des résidus Ser, Thr et Tyr.....	62
Figure 16 : Classification des protéine phosphatases humaines.....	63
Figure 17 : Représentation schématique de l'holoenzyme PP1.....	64
Figure 18 : Les différents types de protéines régulatrices de PP1.....	66
Figure 19 : Structure de l'holoenzyme PP2A.....	67
Figure 20 : Régulation de PP2A.....	73
Figure 21 : Résumé des applications de la technologie CRISPR-Cas9 / dCas9.....	77
Figure 22 : Système de régulation transcriptionnelle CRISPRi et CRISPRa.....	78
Figure 23 : Représentation schématique de protéine phosphatases régulant la phosphorylation de LRRK2.....	82
Figure 24 : Représentation schématique du décours expérimental.....	92
Figure 25 : Carte des constructions plasmidiques CRISPR-dCas9 utilisées pour cette étude.....	94
Figure 26 : Etat de phosphorylation de mutants LRRK2.....	99
Figure 27 : Etat de phosphorylation de mutants LRRK2 en présence de mutations touchant la région GTPase de la protéine.....	100
Figure 28 : Identification de phosphatases régulant la phosphorylation pS935 de LRRK2 par un criblage utilisant de petits ARN interférants.....	101
Figure 29 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique HG 10-102-01 sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP1.....	105
Figure 30 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique HG 10-102-01 sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP2A.....	106
Figure 31 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique GSK2578215A sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP1 et PP2A.....	107
Figure 32 : LRRK2 interagit avec les sous-unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A.....	109

Figure 33 : Interaction entre LRRK2 et les unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A en présence de l'inhibiteur MLI-2.	110
Figure 34 : Effet de la surexpression de sous-unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A sur la phosphorylation de LRRK2.	111
Figure 35 : Représentation schématique de la procédure expérimentale.	113
Figure 36 : Vérification de la pureté des protéines pour les micro-injections dans le modèle ovocyte.	114
Figure 37 : Analyse cinétique de l'effet de phosphatases recombinantes sur la phosphorylation pS935 de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope.	115
Figure 38 : Détermination de la région du TSS du gène PPP1CA.	118
Figure 39 : Etablissement du système CRISPR-dCas9 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y.	120
Figure 40 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité catalytique PPP1CA.	121
Figure 41 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité régulatrice PPP1R1B. ...	122
Figure 42 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité catalytique PPP2CA.	123
Figure 43 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité régulatrice PPP2R2A. ...	124
Figure 44 : Effet de la modulation de l'expression endogène des phosphatases PPP1CA et PPP1R1B sur la phosphorylation de LRRK2 dans des cellules SH-SY5Y via les systèmes CRISPRa et CRISPRi.	127
Figure 45 : Effet de la modulation de l'expression endogène des phosphatases PPP2CA et PPP2R2A sur la phosphorylation de LRRK2 dans des cellules SH-SY5Y via les systèmes CRISPRa et CRISPRi.	128
Figure 46 : La déphosphorylation de LRRK2 par le recrutement des phosphatases PP1 et PP2A induit son ubiquitination.	138
Figure 47 : Phosphorégulation de LRRK2 : un complexe de taille ?.	142
Figure 48 : Expression de la protéine LRRK2 et des sous-unités PPP2CA, PPP2R2A et PPP1CA dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes immortalisées par EBV issues de patients sporadiques, G2019S et de sujets témoins.	196

Index des tableaux

Tableau 1 : Gènes et loci impliqués dans les formes autosomiques dominantes, récessives et certains facteurs de risque de la MP.....	20
Tableau 2 : Liste des immunothérapies anti-synucléine en essai clinique.....	29
Tableau 3 : Liste des stratégies thérapeutiques utilisant la thérapie génique en essai clinique. ...	30
Tableau 4 : Liste des principaux inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2.	58
Tableau 5 : Les sous-unités de PP2A : leur nomenclature, localisation et expression dans divers tissus.....	71
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pendant cette étude.	87
Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR.	89
Tableau 8 : Liste des séquences guides ARN.	95
Tableau 9 : Liste des phosphatases identifiées lors des criblages.....	102
Tableau 10 : Données démographiques et cliniques de sujets sains, de patients sporadiques et de patients porteurs de la mutation LRRK2 G2019S analysés dans la Figure 48.....	194

Liste des abréviations

AAV :	Adeno-Associated Virus
AD :	Autosomique Dominante
ARNi :	ARN interférant
ARNm :	ARN messagers
CK1 α :	Casein kinase 1 alpha
Cas9 :	CRISPR associated protein 9
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repea
DA :	Dopamine
dCas9 :	dead Cas9
Drp1 :	Dynamin related protein 1
EBV :	Epstein-Barr virus
FR :	Facteur de Risque
GWAS :	Genome Wide Association Study
HDR :	Homology Directed Repair
ICC :	Immunocytochimie
kDa :	kilo Dalton
KI :	Knock-in
KO :	Knock-out
LCR :	Liquide céphalo-rachidien
LRRK2 :	Leucine-Rich Repeat Kinase 2
Mfn :	Mitofusines
MP :	Maladie de Parkinson
N-ter :	N-terminal
NHEJ :	Non-Homologous End Joining
OPA1 :	Optic Atrophy Protein 1
PAK6 :	p21-activated kinase 6
PAM :	Protospacer Adjacent Motif
PBMC :	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCC :	Pearson Correlation Coefficient
PEI :	Polyethylenimine
PKA :	Protéine Kinase A
PLA :	Proximity Ligation Assay
PP1 :	Protéine Phosphatase 1
PP2A :	Protéine Phosphatase 2A
PSP :	Paralyse Supranucléaire Progressive
PVDF :	PolyFluorure De Vinylidène
qPCR :	quantitative Polymerase Chain Reaction
R :	Régulatrice
RE :	Réticulum Endoplasmique

RL : R1398L
RLTV : R1398L/T1343V
ROS : Reactive Oxygen Species
SCP : Stimulation Cérébrale Profonde
SEM : Standard Error of the Mean
Ser : Sérine
sgARN : single guide ARN
SN : Substance Noire
SNc : Substance Noire *pars compacta*
SNC : Système Nerveux Central
SNE : Système Nerveux Entérique
TGN : Trans Golgi Network
Thr : Thréonine
TSS : Transcription Start Site
UPS : Ubiquitin/Proteasome System
VPS35 : Vacuolar Protein Sorting 35
WB : Western blot
Wnt : Wingless signaling pathway
WT : Wild Type

Introduction

Chapitre 1 : Maladie de Parkinson

I - Historique et épidémiologie

Il y a maintenant deux siècles que la Maladie de Parkinson (MP) a été décrite par le médecin anglais James Parkinson qui décrivit pour la première fois les symptômes de la maladie dans son essai intitulé "Essay on the Shaking Palsy," en 1817 (Parkinson, 1817). Ce texte de 66 pages basé sur la description de six sujets de sexe masculin qu'il a pu observer sur plusieurs années, décrit en détail la maladie et plus précisément ses caractéristiques. Le terme de « Maladie de Parkinson » fut introduit en 1867 par le neurologue français Jean-Martin Charcot en hommage aux travaux de James Parkinson.

Au cours du XX^{ème} siècle, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) a été identifiée amenant à sa dépigmentation ainsi que la présence dans les neurones survivants d'inclusions éosinophiles intra-cytoplasmiques appelées « Corps de Lewy ». Cette dégénérescence est à l'origine de la déplétion en dopamine (DA) striatale, neurotransmetteur identifié par Arvid Carlsson (Carlsson et al. 1958). A ce jour l'étiologie de la MP est toujours aussi discutée et demeure encore inconnue. Seuls des traitements permettant d'améliorer la qualité de vie des malades sans toutefois arrêter l'évolution de la maladie existent, les dopa-thérapies qui visent à compenser le déficit en DA. Malgré les avancées techniques de ces dernières années cette maladie reste pour le moment incurable.

La MP est la deuxième affection neurodégénérative après la Maladie d'Alzheimer. Rare avant l'âge de 50 ans, son incidence et sa prévalence augmentent progressivement après l'âge de 60 ans. Dans le monde, la prévalence de la maladie s'échelonne entre 0,1% et 0,2% chez les personnes âgées de 50 à 59 ans passant à 1% chez les personnes âgées de 70 à 79 ans. Le risque de maladie est plus élevé chez les hommes avec un risque 1,5 fois supérieur (Elbaz et al. 2016). En France, 200 000 personnes sont touchées par la maladie, et on dénombre 25 000 nouveaux cas chaque année (source France Parkinson). Avec le vieillissement de la population, il est estimé que le nombre de personnes atteinte de la MP doublera d'ici 2030 (Calabrese 2007).

II - Symptomatologie et diagnostique clinique

II.A - Symptômes moteurs

La MP est une maladie dont l'évolution est lente et progressive. Les signes cliniques majeurs sont caractérisés par quatre symptômes cardinaux : le tremblement de repos, la bradykinésie (voire akinésie), la rigidité, ainsi que l'instabilité posturale (Savitt, Dawson, and Dawson 2006).

Le tremblement parkinsonien est un tremblement de repos qui peut-être facilité ou augmenté par les émotions mais disparaît quand le patient effectue des mouvements volontaires ou pendant le sommeil. Il s'agit d'un tremblement lent (4 à 6 cycles par seconde) et de faible amplitude. Unilatéral au début de la maladie, ce tremblement concerne surtout les membres supérieurs, plus particulièrement leurs extrémités distales, avec une impression de mouvement d'émiettement. Plus rarement, il peut atteindre les membres inférieurs mais aussi les lèvres ou la mâchoire.

La bradykinésie se définit comme un trouble de l'initiation motrice, caractérisée par un ralentissement des mouvements et la perte de la finesse du mouvement. Ce phénomène est mis en évidence par une diminution de l'expression gestuelle, une difficulté à la marche avec diminution du balancement des bras, une amimie avec un visage inexpressif, une réduction du clignement des paupières. D'autres signes peuvent également en être évocateurs, par exemple, une écriture plus petite, la voix plus monotone et basse, ou la difficulté à exécuter des mouvements rapides alternatifs (boutonner une chemise).

La rigidité des membres est liée à une tension excessive des muscles. Elle est appréciée lorsque l'examineur demande au patient d'étendre le bras, par une résistance aux mouvements passifs des muscles antagonistes. Cette résistance disparaît par à-coups successifs, on parle alors de phénomène de « roue dentée ».

L'instabilité posturale ou trouble de l'équilibre peut entraîner des chutes lorsque le patient se penche en avant ou en arrière pouvant générer des blessures. La personne peut aussi se vouter.

II.B - Symptômes non-moteurs

A ces signes cardinaux de la maladie s'ajoute des signes non moteurs qui apparaissent plusieurs années avant les troubles moteurs. Déjà en 1817, James Parkinson dans son essai décrivait certains symptômes non moteurs tels que des troubles du sommeil, l'humeur du patient avec un état de

tristesse et des problèmes liés à la selle (constipation). Avec les troubles moteurs, ces troubles non-moteurs participent grandement à l'altération de la qualité de vie des patients ainsi que celle de leurs proches (Martinez-Martin et al. 2011; Duncan et al. 2014; Weintraub et al. 2004).

II.B.1 - Troubles cognitifs

La démence affecte environ 40% des patients parkinsoniens, un taux six fois plus élevé que chez des personnes saines (Emre 2003; Chaudhuri et al. 2006). La démence entraîne une constellation de problèmes cognitifs incluant : perte de mémoire, ralentissement cognitif, dysfonctionnements des fonctions exécutives (planification, organisation et concentration), changements de personnalité, problèmes visuo-spatiaux et diminution de l'attention (Rana et al. 2015).

II.B.2 - Troubles d'ordre psychiques

Les troubles neuropsychiatriques où les patients souffrent de dépression, d'anxiété, d'apathie et de manque de motivation sont les symptômes non moteurs les plus courants (Rana et al. 2015; Gallagher and Schrag 2012). Les troubles de l'humeur avec des états de dépression peuvent affecter entre 10 et 45% des sujets (Burn 2002). L'anxiété peut se manifester par des crises de panique, des phobies ou bien un trouble d'anxiété généralisée et affecte jusqu'à 60% des patients (R. Henderson et al. 1992; Anthony H V Schapira, Chaudhuri, and Jenner 2017). L'apathie, définie par la perte de motivation, de désirs et d'émotions est présente chez 60% des sujets. On retrouve aussi le trouble du contrôle des pulsions (perturbation de la fonction sexuelle, l'addiction pour les jeux et l'achat compulsif) (Voon, Mehta, and Hallett 2011; Sierra et al. 2015) ainsi que des troubles psychotiques dont les symptômes les plus courants incluent les hallucinations qui sont présentes jusqu'à 40% des patients (Chaudhuri et al. 2006; Anthony H V Schapira, Chaudhuri, and Jenner 2017; Sveinbjornsdottir 2016).

II.B.3 - Troubles sensitifs

Les troubles sensoriels et la douleur sont des symptômes courants, mais ils ne sont pas toujours reconnus comme des symptômes parkinsoniens (Jankovic 2008). On retrouve des déficits olfactifs (hyposmie ou anosmie) chez plus de 90% des patients (Chaudhuri et al. 2006; Sveinbjornsdottir 2016).

II.B.4 - Troubles du sommeil

Les troubles de l'éveil et du sommeil sont des facteurs communs chez les patients parkinsoniens (Rana et al. 2015). Le sommeil se retrouve perturbé par des insomnies ou bien encore par des troubles du comportement pendant le sommeil paradoxal (sommeil REM : « Rapid Eye Movement »). Une des conséquences de ces troubles est la somnolence diurne excessive qui peut se manifester de manière brutale et irrépessible, participant à la détérioration de la qualité de vie des patients (Schrempf et al. 2014).

II.B.5 - Troubles végétatifs

Des troubles du système autonome sont fréquents et comprennent des troubles urinaires (Sakakibara et al. 2012), une dysfonction se retrouvant tout le long du système gastro-intestinal incluant l'hyper salivation, trouble de la vidange gastrique, constipation (Fasano et al. 2015; Sakakibara et al. 2011). Des problèmes d'ordre cardiovasculaires sont aussi retrouvés, tels que l'hypotension orthostatique et des troubles de la respiration (Anthony H V Schapira, Chaudhuri, and Jenner 2017).

Aujourd'hui, nous savons que la MP n'est pas limitée à des troubles moteurs mais que la présence des symptômes non moteurs, qui sont des signes apparaissant plus tôt au cours de la pathologie, ont donné naissance au concept de phase prodromale de la MP (Berg et al. 2015).

II.C - Diagnostic clinique

Actuellement, il n'existe aucun test de laboratoire ou examen issu de prélèvements biologiques (sang, urine et/ou liquide céphalo-rachidien (LCR)) permettant de diagnostiquer la MP avec certitude. Les techniques d'imagerie, de type scanner, IRM du cerveau et scintigraphie cérébrale, peuvent être pratiquées selon les cas, mais ils ne sont généralement pas nécessaires pour poser le diagnostic de la MP. En effet, son diagnostic est purement clinique et basé sur les antécédents médicaux et l'évaluation des symptômes moteurs décrits dans le paragraphe ci-dessus (Elbaz et al. 2016; Jankovic 2008). Lorsque la maladie est diagnostiquée, son évolution peut être mesurée par des échelles spécifiques dont la plus couramment utilisée dans le monde est l'échelle UPDRS (« Unified Parkinson's Disease Rating Scale ») ou échelle d'évaluation unifiée de la maladie de

Parkinson) (Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease 2003).

III - Physiopathologie/anapathologie

III.A - Caractéristiques neuropathologiques

L'observation du cerveau des patients montre une dégénérescence des neurones de la substance noire *pars compacta* (SNc) et la présence d'inclusions intra-cytoplasmique appelée corps de Lewy dans les neurones persistants (Gibb and Lees 1988; Dickson et al. 2009).

La perte progressive des neurones dopaminergiques de la SN va entraîner une dépigmentation (**Figure 1A**). Cette coloration noire est associée à la neuromélanine, un pigment cytoplasmique contenu dans les neurones dopaminergiques. Cette disparition neuronale entraîne un déficit du taux de DA dans le striatum, neurotransmetteur indispensable au contrôle des mouvements du corps. On estime que les premiers symptômes moteurs commencent à apparaître quand 50 à 60% des cellules dopaminergiques dans le système nigrostrié sont perdues (Anthony H V Schapira and Tolosa 2010).

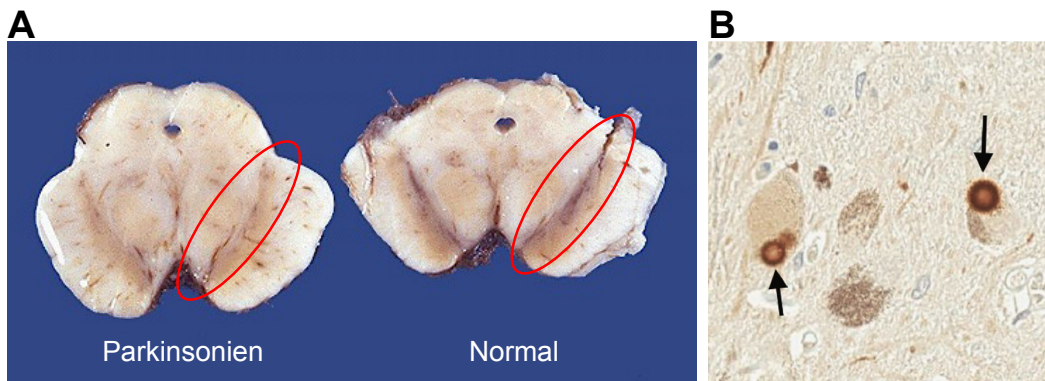


Figure 1 : Neuropathologie de la MP.

(A) L'observation d'une coupe de cerveau montre chez le parkinsonien une dépigmentation de la substance noire.

(B) Corps de Lewy (flèche noire) mis en évidence par immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée pathologique de l'alpha-synucléine (Serine 129) (McFarland 2016).

Friedrich Heinrich Lewy a décrit pour la première fois les inclusions (qui portent son nom) dans le noyau moteur dorsal du nerf vague, le noyau basal de Meynert et quelques noyaux thalamiques de patients parkinsoniens (Lewy, 1912). Les corps de Lewy se composent d'un centre dense entouré

d'un halo de fibrilles (**Figure 1B**). Ces agrégats sont composés en majeure partie d' α -synucléine (M G Spillantini, Crowther, Jakes, Hasegawa, et al. 1998; Maria Grazia Spillantini et al. 1997), mais aussi d'autres protéines, notamment l'ubiquitine (Kuzuhara et al. 1988).

III.B - Les ganglions de la base

La perte des cellules dopaminergiques chez les patients parkinsoniens a pour conséquence directe une baisse du taux en DA d'environ 80% (Kish, Shannak, and Hornykiewicz 1988). La carence en DA qui en résulte dans les ganglions de la base entraîne un trouble du mouvement caractérisé par des symptômes moteurs parkinsoniens classiques. Les ganglions de la base sont un ensemble de noyaux sous-corticaux qui comprend le striatum, le noyau sous-thalamique (NST), le globus pallidus (interne, GPi et externe, GPe) et la SN du mésencéphale (Galvan, Devergnas, and Wichmann 2015; Albin, Young, and Penney 1989). Deux voies distinctes de connexions neuronales coexistent, la voie directe qui est associée au récepteur de type D1 qui a une fonction activatrice. Et une voie indirecte polysynaptique vers le GPI/SNr via le striatum (récepteur de type D2), le GPE et le NST (**Figure 2**). Le tonus dopaminergique striatal module l'activité des GPE, GPI/SNr et NST. Physiologiquement, les afférences cortico-striatales inhibent la voie indirecte et facilitent la voie directe.

La déplétion en DA chez les patients parkinsoniens modifie l'équilibre activation/inhibition entraînant une inhibition excessive du thalamus (via le GPi qui est anormalement activé) à l'origine d'une hypoactivation du cortex moteur (DeLong and Wichmann 2007).

En plus d'un rôle dans le contrôle de la motricité, les ganglions de la base exercent un rôle dans des processus cognitifs, comme la planification, la mémoire de travail et l'attention, mais aussi dans des processus émotionnels, tels que la motivation et le comportement (Alexander, Crutcher, and DeLong 1990).

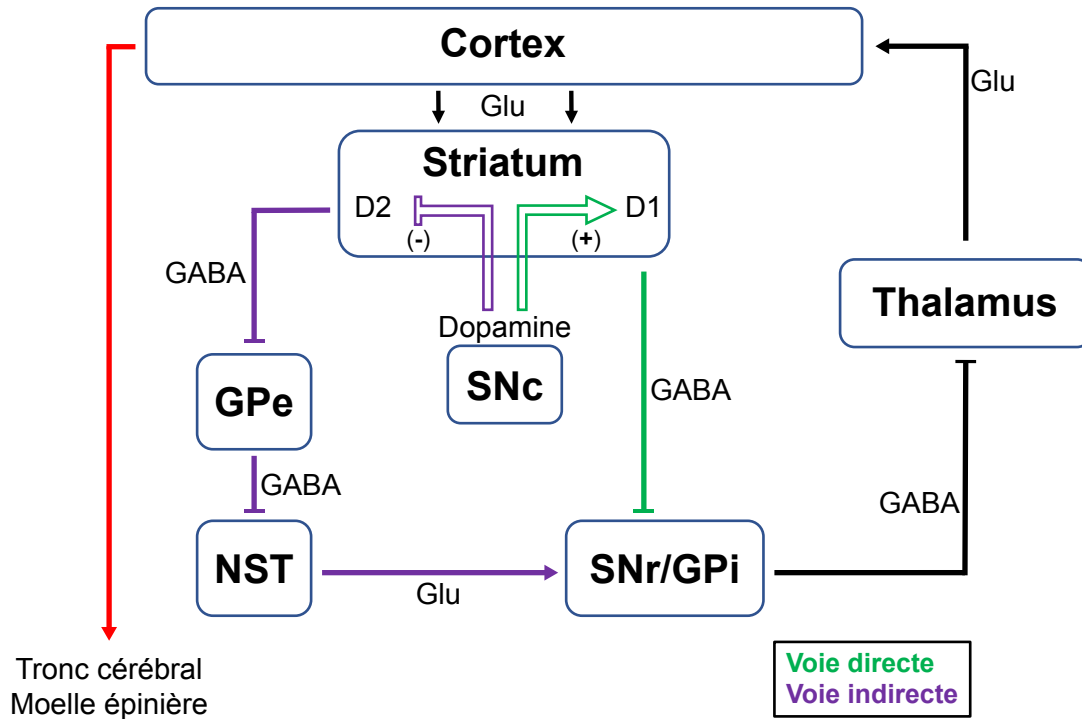


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du circuit des ganglions de la base.

La voie directe relie le striatum au segment interne du globus pallidus (GPi) et à la substance noire pars reticulata (SNr) par l'intermédiaire de projection inhibitrice. Les neurones du GPi et de la SNr envoient leur projection inhibitrice vers le thalamus et de là vers le cortex. La voie indirecte relie quant à elle, le striatum au GPi et SNr par l'intermédiaire du segment externe du globus pallidus (GPe), connecté au noyau sous-thalamique (NST) par des projections inhibitrices gabaergiques, ce qui a pour effet d'activer les neurones du GPi et ainsi d'avoir un effet inverse de la voie direct sur le thalamus. Adapté de (Stievenard et al. 2017).

III.C - Progression des lésions

Bien que la MP soit une maladie affectant le cerveau, un des points de départ proposé serait le système nerveux périphérique plus précisément au niveau du système nerveux entérique (SNE) du tube gastro-intestinal. Braak et ses collègues ont proposé 6 stades de progression de la pathologie de Lewy. Cela débiterait par l'atteinte du nerf vague et du bulbe olfactif puis les lésions s'étendraient lentement de façon rostro-caudale à l'intérieur du cerveau. Cette progression temporelle et spatiale proposée semble expliquer l'évolution clinique de la MP. En effet, les stades 1-2 correspondraient à l'apparition de symptômes pré-moteurs, aux stades 3-4 les caractéristiques motrices sont présentes en raison de la déficience en DA, enfin, lors des stades 5-6 se produiraient les symptômes non moteurs (déficits cognitifs et émotionnels), signe d'une maladie avancée (**Figure 3**).

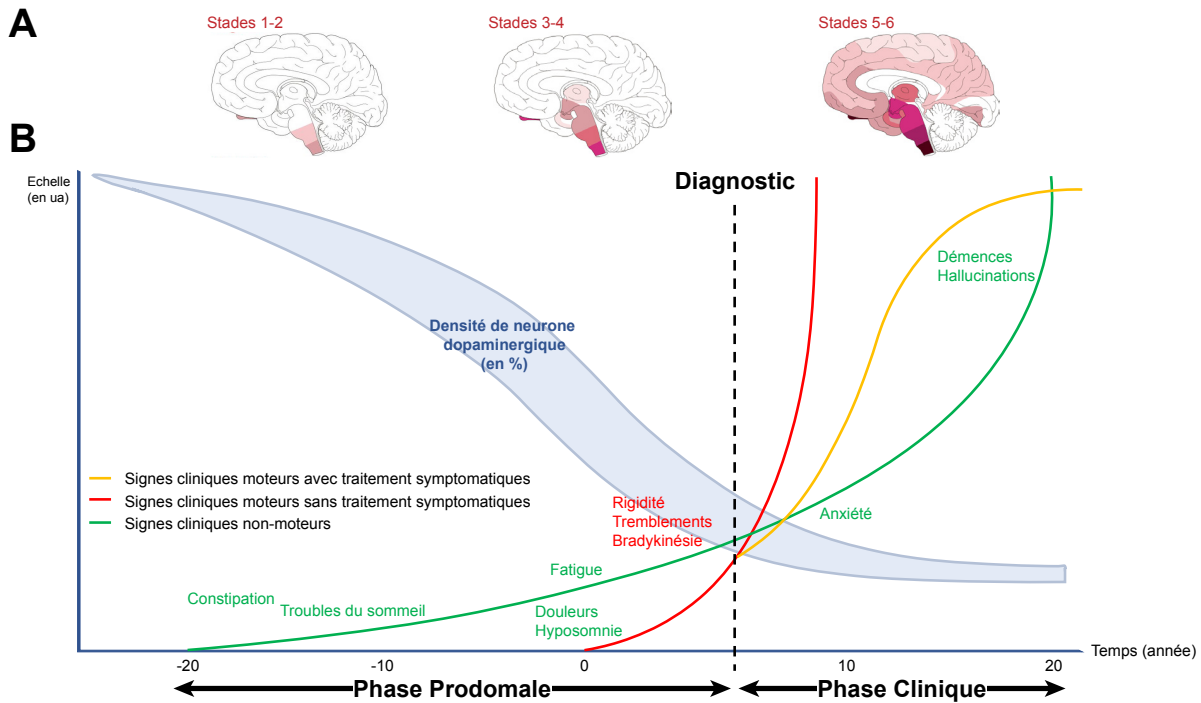


Figure 3 : Évolution temporelle de l'apparition des symptômes moteurs et non moteurs de la MP selon l'hypothèse de Braak.

(A) Progression des lésions selon l'hypothèse de Braak. Suivant cette hypothèse, les corps de Lewy prendraient leur origine au sein du système nerveux périphérique. Ils progresseraient ensuite dans le tronc cérébral ainsi que dans le bulbe olfactif (Stade 1-2). C'est au Stade 3-4 que les premiers symptômes moteurs apparaissent lorsque la SN et les autres noyaux du mésencéphale sont atteints. Au stade 5-6, les corps de Lewy sont présents dans le cortex et la structure limbique. (B) Représentation schématique de la chronologie potentielle de la manifestation des caractéristiques motrices et motrices de la MP. On estime que les caractéristiques motrices apparaissent (année 0) lorsqu'environ 50 à 60 % des neurones dopaminergiques ont été perdus. Le diagnostic de la MP survient après l'apparition de symptômes moteurs mais peut être précédé par des caractéristiques motrices émergentes subtiles qui ne sont pas remarquées par le patient, on parle de la phase prodromale. Si elle n'est pas traitée, la dysfonction motrice progresse relativement rapidement après le diagnostic. Le traitement symptomatique avec des médicaments de remplacement de la DA permet une amélioration de la fonction motrice jusqu'à un certain plafond. Les caractéristiques non motrices et motrices vont progresser lentement et contribuer à la détérioration de la qualité de vie des patients. Adapté de (Anthony H V Schapira, Chaudhuri, and Jenner 2017; Kalia and Lang 2015; Braak et al. 2003).

IV - Traitements symptomatiques

Actuellement, les traitements disponibles ne sont pas curatifs mais symptomatiques, reposant sur la correction du déficit en DA. Ils n'empêchent pas la mort neuronale ou la progression de la pathologie mais améliorent la qualité de vie des patients.

IV.A - Traitements médicamenteux

Ils visent à pallier le manque de DA soit par l'apport de la L-dopa qui sera transformée en DA, soit en mimant l'action de la DA par l'usage d'agonistes dopaminergiques (ropinirole, pramipexole, apomorphine), soit en donnant une substance qui bloque la dégradation de la DA par les inhibiteurs enzymatiques de la monoamine-oxydase B (IMAO-B) ou de la catéchol-O-méthyl-transférase (ICOMT). Ils sont donnés par voie orale dans la majorité des cas.

IV.B - Traitements chirurgicaux

Ce sont des méthodes invasives qui peuvent consister en une stimulation cérébrale profonde (SCP), ou par le maintien d'une stimulation dopaminergique striatale stable. La SCP consiste en une implantation d'électrodes dans le cerveau au sein des ganglions de la base, comme le GPi ou le NST (**Figure 2**), pour y moduler l'activité du noyau et ainsi rétablir l'équilibre dans les circuits neuronaux des ganglions de la base (Tir et al. 2007; Faggiani and Benazzouz 2017). Des données obtenues à l'hôpital de Lille chez 100 patients ayant eu recours à cette technique de stimulation du striatum ont confirmé un effet positif sur la MP avec une amélioration prolongée des performances motrices un an après la chirurgie (Tir et al. 2007). Cependant, cette intervention chirurgicale n'est pratiquée que sur 5 à 10 % des patients.

Pour la délivrance dopaminergique continue, l'apomorphine, une molécule de synthèse très proche de la dopamine, peut être administrée par la voie sous-cutanée à l'aide d'une pompe et permet de délivrer la bonne dose d'apomorphine tout au long de la journée et de rester dans la fenêtre thérapeutique optimale (Boyle and Ondo 2015). Un autre système de stimulation dopaminergique stable est le gel de Duodopa (Oertel and Schulz 2016). Cette suspension en gel de Duodopa est administrée directement dans l'intestin à l'aide d'une pompe portable qui est mise en place par endoscopie.

V - Etiologie

La MP est considérée comme une maladie multifactorielle, souvent complexe, combinant de nombreux facteurs génétiques et environnementaux (**Figure 4**), l'âge étant le facteur de risque

principal. La MP serait le plus souvent sporadique (90% des cas), les formes génétiques représentant 10% de tous les cas de MP.

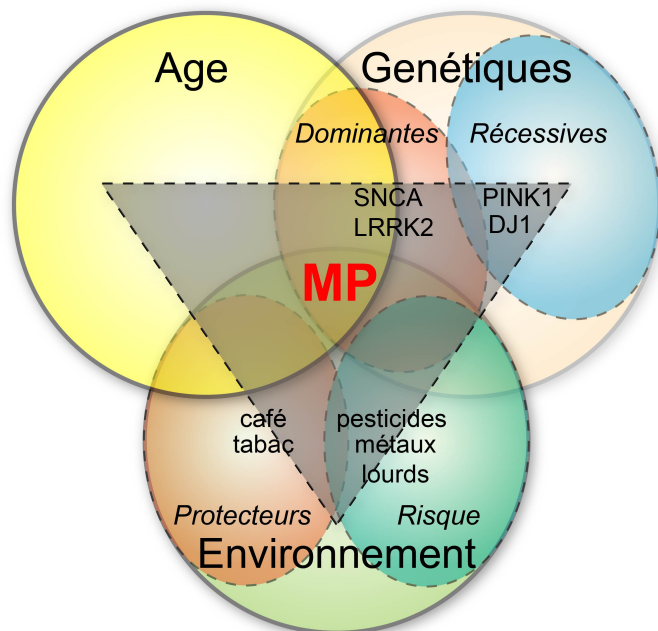


Figure 4 : MP : une étiologie complexe.

La MP a comme origine une interaction de facteurs génétiques, environnementaux et l'âge. Chaque domaine (âge, génétiques et l'environnement) est représenté par un cercle. La résultante de l'interaction de ces domaines est le développement de la MP. Des exemples de facteurs de risques sont indiqués pour les facteurs génétiques et l'environnement. Adapté de (Lill 2016).

V.A - Environnement

L'épidémie post-encéphalitique responsable d'un syndrome parkinsonien avec déplétion dopaminergique striatale d'origine virale (Casals, Elizan, and Yahr 1998) au début du XXe siècle et les cas de toxicomanes californiens résultant d'une exposition accidentelle au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydrpyridine), alors qu'ils synthétisaient leur propre drogue (Langston et al. 1983) suggèrent que la MP pourrait être due à des facteurs environnementaux. Le MPTP une fois dans le cerveau est métabolisé en MPP+, une molécule toxique, qui est un puissant inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'exposition prolongée à des métaux lourds (mercure, plomb, manganèse) ou aux pesticides (paraquat, roténone, maneb) sont des facteurs de risques bien établis de la MP. En particulier, ces pesticides présentes une structure chimique similaire à celle du MPP+, et les études épidémiologiques au sein des populations d'agriculteurs ont montré qu'une exposition prolongée aux pesticides était corrélée avec un risque élevé de développer une MP (Baldi et al. 2003; Kab et

al. 2017; James and Hall 2015). Toutefois, il existe aussi des facteurs environnementaux qui seraient protecteurs pour la maladie, c'est le cas du tabac ou encore du café (Hernán et al. 2002).

V.B - Génétique

Pendant de nombreuses années, la MP a été considérée comme une pathologie non génétique, c'est-à-dire d'origine idiopathique. En effet, la majorité des cas sont sporadiques avec une étiologie inconnue mais ces dernières années, des mutations causales de la maladie ont été découvertes. On parle alors de formes familiales de la MP qui représente entre 10 à 15% des cas de MP (Verstraeten, Theuns, and Van Broeckhoven 2015). Les formes monogéniques sont séparées en deux catégories suivant leur transmission mendélienne (Corti, Lesage, and Brice 2011), les formes dites autosomiques dominantes et les formes dites récessives (**Tableau 1**). En plus de ces gènes, il existe d'autres locus qui confèrent un risque variable de développement de la MP. Ceux-ci ont pu être mis en évidence lors d'études pangénomiques GWAS (« Genome Wide Association Study ») qui analysent les variations génétiques chez la population étudiée (**Figure 5**).

Tableau 1 : Gènes et loci impliqués dans les formes autosomiques dominantes, récessives et certains facteurs de risque de la MP.

Locus	Gène	Chromosome	Transmission	Fonction probable	Mécanismes de toxicité/Voies possibles
PARK1/4	SNCA	4q21-q23	AD	Rôle dans compartiment présynaptique	Mitochondrie, Stress oxydatif, Dégradation des protéines, Trafic
PARK2	Parkin	6q25.2-q27	AR	Ubiquitine E3 ligase	Mitochondrie, Dégradation des protéines
PARK3	?	2p13	AD	?	?
PARK5	UCHL1	4p14	AD	Ubiquitine hydrolase	Dégradation des protéines
PARK6	PINK1	1p35-p36	AR	Protéine kinase mitochondriale	Mitochondrie, Stress oxydatif
PARK7	DJ-1	1p36.33 - p36.12	AR	Chaperonne, Antioxydatif	Mitochondrie, Stress oxydatif, Inflammation
PARK8	LRRK2	12p11.2-q13.1	AD	Protéine kinase, trafic intracellulaire	Mitochondrie, Stress oxydatif, Dégradation des protéines, Trafic vésiculaire, Inflammation
PARK9	ATP13A2	1p36	AR	ATPase lysosomale, homéostasie	Mitochondrie, Dégradation des protéines
PARK10	USP24 ?	1p32	AD ?	Protéase ?	Dégradation des protéines ?

PARK11	GIGYF2	2q36-q37	AD	IGF-1 signaling	
PARK12	?	Xq21-q25	Liée à l'X	?	?
PARK13	HTRA2/OMI	2p12	AD	Serine protéase mitochondriale	Mitochondrie
PARK14	PLA2G6	18q11	AR	Phospholipase	Mitochondrie, Dégradation des protéines
PARK15	FBXO7	22q12-q13	AR	Ubiquitine E3 ligase	Dégradation des protéines, Mitochondrie
PARK16	?	1q32	FR		
PARK17	VPS35	16q11.2	AD	Retromer component, protein transport	Dégradation des protéines, Trafic vésiculaire
PARK18	EIF4G1	3q27.1	AD	Facteur d'initiation de la traduction	Stress oxydatif
PARK19	DNAJC6	1p31.3	AR	Protéine tyrosine phosphatase	Trafic vésiculaire
ARK20	SYNJ1	21q22.11	AR	Phosphatase neuronale	Trafic vésiculaire
PARK21	DNAJC13	3q22	AD	Chaperonne	Trafic vésiculaire
PARK22	CHCHD2	7p11.2	AD	Facteur de transcription	Mitochondrie
PARK23	VPS13C	15q22.2	AR	Protéine vacuolaire	Trafic vésiculaire

Les points d'interrogation indiquent les locus qui nécessitent une validation. AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive ; FR : facteur de risque.

Parmi les gènes impliqués dans la pathogénèse, SNCA a été le premier à être associé à une forme familiale. Cinq mutations sur ce gène (dont A53T, A30P et E46K) ainsi que des duplications et triplications du locus ont été identifiées menant à des formes autosomiques dominantes (Chartier-Harlin et al. 2004; Ibáñez et al. 2004; Singleton et al. 2003).

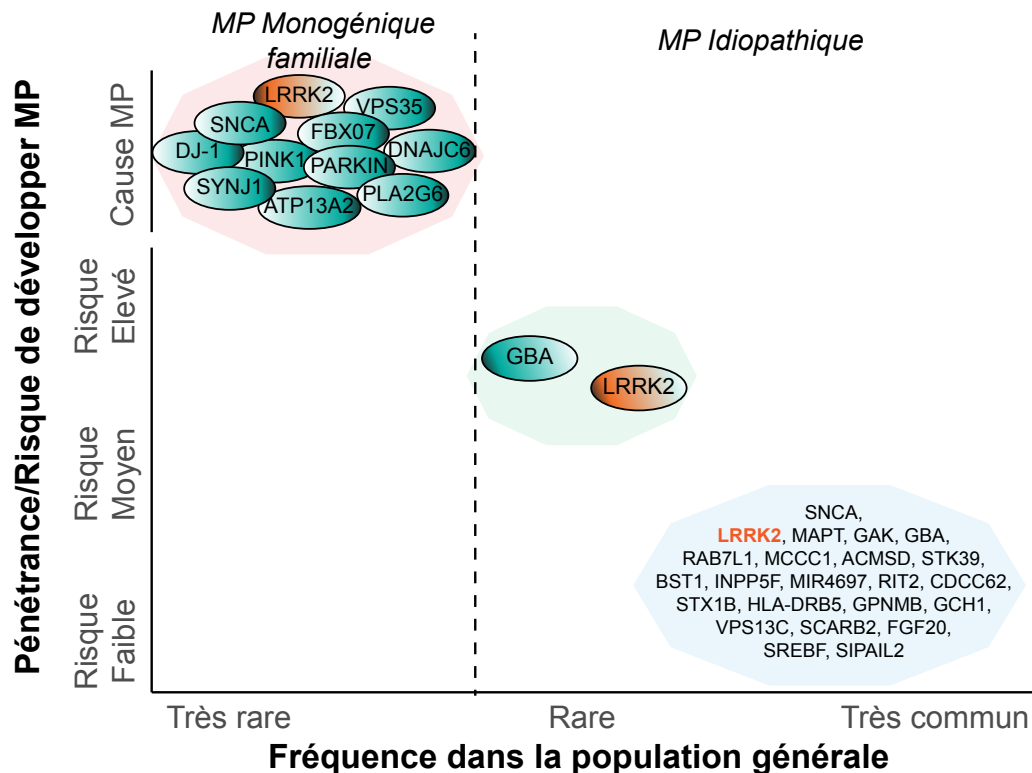


Figure 5 : Représentation schématique de l'architecture génétique de la MP.

Les gènes mendéliens énumérés dans le polygone rouge ont été identifiés par l'analyse de cas familiaux. Le polygone bleu représente les gènes dont les loci ont été sortis d'étude GWAS et désignés comme facteur de risque de la MP idiopathique. Pour finir, le polygone vert liste les variantes présentant un risque élevé de développer la MP. Adapté de (Kumaran and Cookson 2015; Brás, Guerreiro, and Hardy 2015).

L'apport de la génétique pour la MP est devenu crucial. L'existence d'une convergence des mécanismes pathobiologiques retrouvée à la fois dans des cas familiaux et sporadiques permet une meilleure compréhension de la maladie.

VI - Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MP

La détérioration des neurones dopaminergiques de la SNc proviendrait d'événements moléculaires et cellulaires. Les mécanismes de dysfonctionnement mitochondrial et du stress oxydatif, l'implication du système inflammatoire, ainsi que le trafic vésiculaire et les voies de dégradation des organites sont à l'origine de ces perturbations cellulaires. De plus, ces mécanismes peuvent agir de concert et ainsi favoriser la dégénérescence des neurones dopaminergiques (Michel, Hirsch, and Hunot 2016).

VI.A - Dysfonctionnement mitochondrial et stress oxydatif

Les mitochondries sont de petits organites intracellulaires essentiels, car elles produisent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. On parle même d'usine énergétique de la cellule. Les altérations mitochondriales sont situées au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire entraînant alors un déficit de la production d'ATP et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) toxiques pour la cellule. Un déficit de l'activité du complexe mitochondrial I a pu être observé lors d'autopsie de cerveaux des patients parkinsoniens (A H V Schapira et al. 1990; Mizuno et al. 1989). L'injection intra-veineuse de MPTP par des toxicomanes qui développèrent un syndrome parkinsonien (Langston et al., 1983) renforça l'implication potentielle des mitochondries. En effet, le MPTP inhibe de façon drastique le complexe I mitochondrial. De plus, la roténone, un pesticide impliqué dans l'étiologie de la MP, est aussi inhibiteur du complexe mitochondrial I.

Les formes génétiques de la MP ont permis l'identification des gènes codant pour les protéines PARKIN, PINK1, DJ-1 ou ATP13A2 impliquées dans les fonctions mitochondriales, renforçant ainsi l'hypothèse de l'implication de dysfonctionnements mitochondriaux dans la MP (Corti, Lesage, and Brice 2011). Parmi ces gènes, PARKIN et PINK1 participent à la régulation de la dynamique mitochondriale via leurs interactions avec Drp1 (Dynamin related protein 1) et les mitofusines (Mfn) et jouent un rôle dans l'élimination des mitochondries par le processus appelé mitophagie (Deas, Wood, and Plun-Favreau 2011; Narendra and Youle 2011; Mouton-Liger et al. 2017; Buhlman et al. 2014). De façon intéressante, LRRK2 est aussi impliqué dans des processus de dysfonctionnement mitochondrial. Des fibroblastes issus de patients porteurs de la mutation G2019S de LRRK2 présentent des perturbations mitochondriales (Mortiboys et al. 2010). De plus, il a été observé une fragmentation des mitochondries ainsi qu'une augmentation de la production de ROS dans des cellules souches pluripotentes issues de patients avec la mutation R1441C de LRRK2. Ces anomalies mitochondriales ont aussi été mises en évidence dans le striatum de souris Knock-in (KI) G2019S âgées de 15 mois, où les niveaux de protéines Drp1 ont été retrouvés réduits suggérant une altération de la fission mitochondriale (Yue et al. 2015).

Ensemble, ces données montrent l'importance des mitochondries et du stress oxydatif dans la physiopathologie de la MP (Larsen, Hanss, and Krüger 2018).

VI.B - Inflammation

La première preuve d'un rôle de la neuroinflammation dans la MP provient d'une étude menée par McGeer et ses collaborateurs. Ils ont montré une prolifération importante de microglies (macrophages) réactives et positives pour l'antigène leucocytaire humain (HLA) dans le SNc et plus particulièrement dans la zone de dégénérescence des neurones dopaminergiques des patients atteints de MP (McGeer et al. 1988). De plus, les neurones dopaminergiques de la sSNc sont entourés d'une concentration anormalement élevée de cellules microgliales par rapport à d'autres régions du cerveau chez le rat, ce qui les rend plus susceptibles aux attaques inflammatoires (W. G. Kim et al. 2000). Des études GWAS ont révélé que la variation génétique commune de plusieurs gènes présentateurs d'antigènes (spécifiquement le CMH-II exprimé par les monocytes et les microglies) conféraient une légère augmentation du risque de MP (Hamza et al. 2010). Les réponses neuroinflammatoires dans la MP comprennent l'activation phénotypique des cellules gliales et, dans une moindre mesure, une infiltration de cellules du système immunitaire périphérique, les lymphocytes T (CD8+ et CD4+) (Brochard et al. 2009). L'activation de la microglie entraîne l'augmentation de l'expression et de la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 β , le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interféron gamma (IFN- γ), de chimiokines ainsi que de deux enzymes importantes dans l'inflammation : l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX2) responsables respectivement de la production de NO et de prostaglandines E2 (PGE2) (Knott, Stern, and Wilkin 2000; Lull and Block 2010; Tansey and Goldberg 2010; Teismann et al. 2003).

La neuroinflammation est de plus en plus reconnue comme un acteur majeur de la MP. Par contre, il est encore controversé de savoir si l'inflammation est une des causes de la MP ou un effet secondaire des événements pathologiques antérieurs (Appel 2012).

VI.C - Trafic Vésiculaire et clairance protéique

Dans la MP, des processus cellulaires impliqués dans la régulation de l'homéostasie protéique sont retrouvés dérégulés. Ceux-ci comprennent des anomalies dans le trafic intracellulaire des protéines et des membranes, ainsi que dans l'élimination des protéines par le système ubiquitine-protéasome (UPS) et par la voie autophagique.

L'UPS est responsable d'une dégradation hautement sélective des protéines membranaires intracellulaires et plasmiques de courte durée de vie dans des conditions métaboliques basales, ainsi que des protéines mal repliées ou endommagées dans le cytosol, le noyau ou le réticulum endoplasmique (RE). Dans des conditions physiologiques, les protéines mal repliées sont ciblées par l'ajout d'ubiquitine, et seules les protéines ubiquitinées dépliées peuvent être incorporées dans le noyau du protéasome à travers un petit pore où elles seront dégradées. Le dysfonctionnement de l'UPS et l'accumulation résultante de protéines mal repliées ont été fortement impliqués dans la pathogenèse de la MP, une hypothèse qui est aussi soutenue par des études moléculaires des gènes responsables de la MP, tels que SNCA, PARKIN et UCHL1 (Olanow and McNaught 2006; Rubinsztein 2006). Enfin, l'évaluation post-mortem de tissu cérébral de patients sporadiques a révélé une déficience structurelle et fonctionnelle de l'UPS chez ces patients (McNaught et al. 2003). En effet, les niveaux des sous-unités alpha (mais pas des sous-unités bêta) des protéasomes 26/20S sont diminués dans les neurones dopaminergiques, concordant avec une altération de l'activité enzymatique du protéasome 20S dans la SNc (McNaught et al. 2003).

En parallèle, la voie autophagique est responsable de la dégradation des protéines à longue durée de vie, des agrégats protéiques et des organites cytoplasmiques qui ne peuvent pas être traités par le protéasome. L'autophagie peut être divisée en trois voies distinctes en fonction de la façon dont les substrats atteignent la lumière lysosomale, la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (Martinez-Vicente and Cuervo 2007). Plusieurs observations suggèrent que la fonction lysosomale, nécessaire au renouvellement des protéines et des organelles par autophagie, est affectée dans la MP. Par exemple, l'examen post-mortem des cerveaux de patients sporadiques révèle une diminution du nombre de l'expression des protéines HSC70 et LAMP-2A, protéines indispensables pour la CMA (Alvarez-Erviti et al. 2010) ou bien l'augmentation du nombre d'autophagosomes comparé à un cerveau sain (Dehay et al. 2010). De plus, des mutations génétiques dans plusieurs protéines associées à la MP, dont LRRK2, ATP13A2, GBA et SNCA (Tofaris 2012; Kumaran and Cookson 2015), perturbent la fonction lysosomale et contribuent à la formation de corps de Lewy et à une neurodégénérescence.

De nombreuses données suggèrent que l'altération de ces systèmes de dégradation pourrait contribuer à l'accumulation de l' α -synucléine. De plus, l' α -synucléine mutée se lie avec une très forte affinité à LAMP-2A, ce qui entrave leur translocation vers la lumière du lysosome et sature les LAMP-2A présentes à la membrane lysosomale. Cette saturation des LAMP-2A par l' α -

synucléine inhibe non seulement sa propre dégradation mais aussi celles de toutes les autres protéines normalement dégradées par la CMA, contribuant ainsi à l'accumulation d'agrégats protéiques caractéristiques de la maladie (Cuervo and Wong 2014). L'augmentation de l'âge, le facteur de risque majeur de la MP, est associée à une réduction des fonctions du système autophagique et de l'UPS (Kaushik and Cuervo 2015), ce qui est cohérent avec l'augmentation des taux d' α -synucléine dans les neurones dopaminergiques (Chu and Kordower 2007).

VI.D - Accumulation et progression de type prion-like d' α -synucléine

Son implication dans la MP a été d'abord identifiée du fait de l'existence de quelques cas génétiques de la maladie présentant des mutations ponctuelles ou une duplication/triplication du gène SNCA codant pour cette protéine (Polymeropoulos et al. 1997). Cette dernière est alors apparue comme un constituant majeur des lésions caractéristiques de la maladie, dans les corps neuronaux (corps de Lewy) ou dans les prolongements neuronaux (neurites de Lewy).

L' α -synucléine est une protéine abondante de 140 acides aminés, douée d'une plasticité conformationnelle. Physiologiquement, c'est une protéine intrinsèquement dépliée « natively unfolded protein » présente sous forme soluble (Auluck, Caraveo, and Lindquist 2010). Elle peut aussi, en adoptant une conformation en hélices α , interagir avec les membranes phospholipidiques (P J Kahle et al. 2000). Cette protéine possède un rôle potentiel dans la plasticité synaptique et dans le maintien du pool de vésicules synaptiques (Bendor, Logan, and Edwards 2013; Burré et al. 2013). En fonction de l'environnement physicochimique dans laquelle elle se trouve, elle peut également adopter une structure secondaire en feuillets β . Cette transconformation est l'étape préalable aux processus de dimérisation puis d'oligomérisation conduisant à la synthèse des formes pathologiques de l' α -synucléine. De façon plus générale, l'agrégation de cette protéine signe les synucléinopathies qui, outre la MP, incluent en particulier la démence à corps de Lewy ou l'atrophie multi-systématisée (M G Spillantini, Crowther, Jakes, Cairns, et al. 1998). La progression de ces maladies impliquerait une propagation de cette agrégation par un mécanisme de type « prion-like » (Olanow and Brundin 2013) telle qu'observée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, un concept partagé avec d'autres maladies neuro-dégénératives humaines, comme la maladie d'Alzheimer, ou dans une moindre mesure à ce jour la sclérose latérale amyotrophique (Prusiner 2012). Une étude approfondie de la progression des lésions neuro-anatomiques dans la MP a conduit Braak et son équipe à formuler l'hypothèse que la MP pourrait être initiée par des

agressions environnementales (agents pathogènes) dans le SNE et/ou dans le bulbe olfactif puis progresseraient jusque dans le système nerveux central (SNC) (Hawkes, Del Tredici, and Braak 2009). Au plan moléculaire, des données récentes suggèrent que la progression de ces pathologies impliquerait des mécanismes de type « prion-like », c'est-à-dire la propagation de proche en proche aux niveaux intermoléculaires et intercellulaires de l'agrégation de l' α -synucléine (Olanow and Brundin 2013). Ceci a notamment été mis en évidence par des greffes de neurones dopaminergiques mésencéphaliques embryonnaires (Björklund et al. 2003). Les autopsies des cerveaux de patients parkinsoniens plus de 10 ans après la procédure de transplantation ont révélé des corps de Lewy dans les neurones transplantés, laissant entendre qu'il s'agirait peut-être d'agrégats protéiques infectieux (J.-Y. Li et al. 2008; Kordower, Chu, Hauser, Freeman, et al. 2008; Kordower, Chu, Hauser, Olanow, et al. 2008). Pour expliquer ces observations, les chercheurs ont émis l'hypothèse d'une diffusion de la maladie de l'hôte aux cellules greffées ce qui s'apparente au processus de propagation du prion. En effet, en 2011, des chercheurs ont démontré *in vitro* que les agrégats d' α -synucléine, se propageaient effectivement de cellule en cellule à la manière d'un agent infectieux et s'amplifient en recrutant la protéine constitutive soluble (Hansen et al. 2011). Des études ultérieures ont confirmé ces résultats et montré l'implication de l'exocytose ou des exosomes pour sécréter l' α -synucléine, l'endocytose ou la transmission directe de cellule à cellule pour l'entrée de l' α -synucléine mal repliée dans les cellules voisines et pour le déclenchement de l'agrégation d' α -synucléine dans la cellule receveuse (Angot et al. 2012; Mougenot et al. 2012; Masuda-Suzukake et al. 2013; Recasens et al. 2014). Plus récemment, l'implication des nanotubes dans la transmission de cellule à cellule a été suggérée (Abounit et al. 2016).

La MP est une maladie très complexe comprenant une multitude d'évènements moléculaires à l'origine d'un dysfonctionnement des voies cellulaires essentielles à la bonne fonction des cellules. De plus, ces voies moléculaires sont perturbées aussi bien dans des cas d'origine génétiques que sporadiques laissant entendre des mécanismes communs (Figure 6). L'étude des gènes responsables des formes familiales est ainsi essentielle dans la compréhension de la MP.

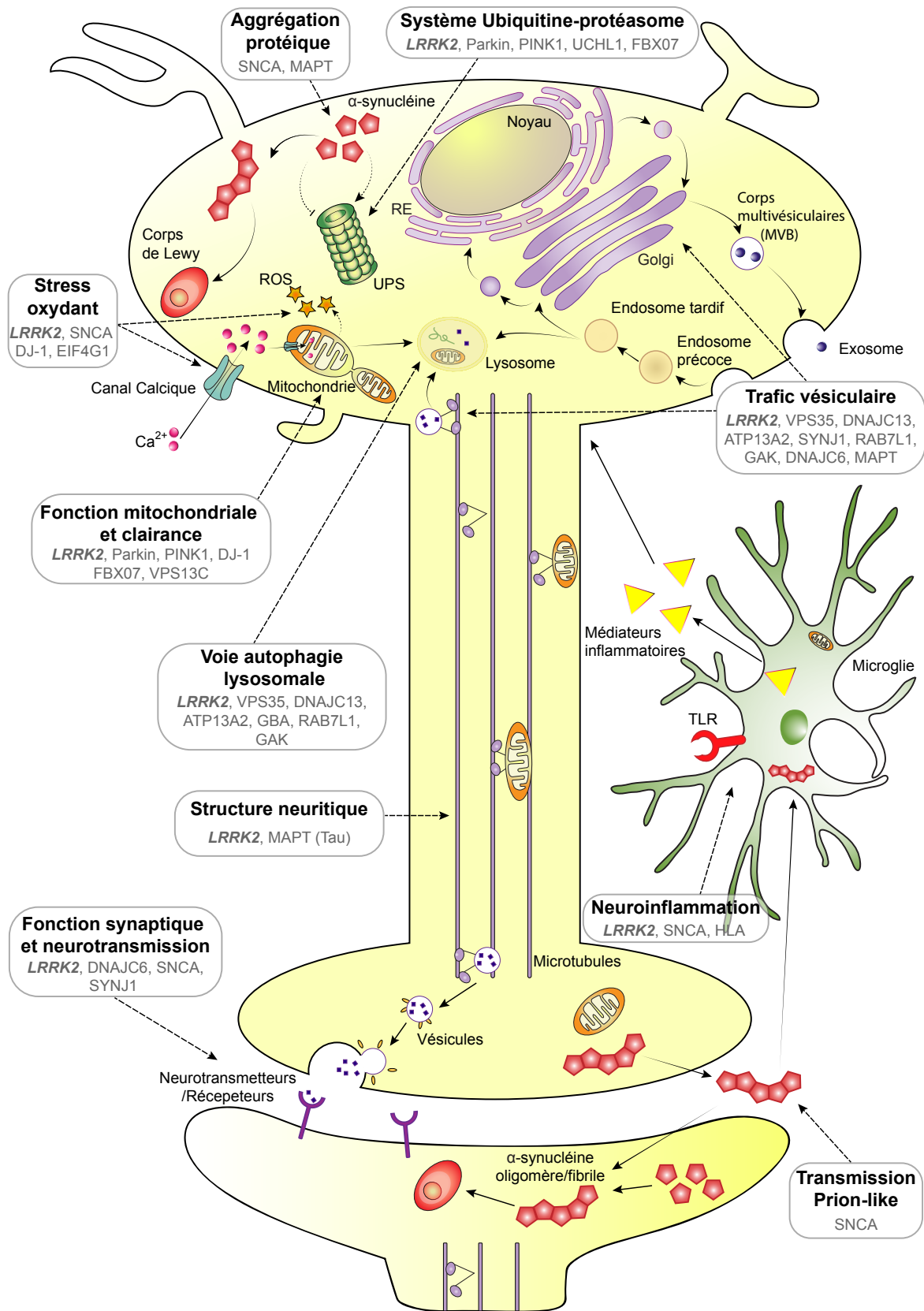


Figure 6 : Les mécanismes moléculaires impliqués dans la MP.

Représentation schématique illustrant les interactions entre les principales voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse de la MP. Chaque rectangle représente un processus biologique et détaille les gènes impliqués. Les gènes énumérés sont associés à la MP familiale et représentent aussi des facteurs de risque désignés pour la MP idiopathique, identifiés par GWAS. Le gène *LRRK2* est mise en évidence en caractère gras et est impliqué dans un grand nombre de processus. Adapté de (Kalia and Lang 2015; Kumaran and Cookson 2015; Poewe et al. 2017; Trinh and Farrer 2013).

VII - Stratégies thérapeutiques et traitements potentiels

Des efforts importants tant au point de vue financier qu’humain sont mis en place pour le développement de stratégies thérapeutiques variées.

Des thérapies anti-synucléine ont pour but de réduire le niveau d'agrégats d' α -synucléine extracellulaires toxiques et de limiter ainsi sa propagation. Il existe deux types d’immunothérapie, l’immunothérapie passive qui consiste à administrer aux patients des anticorps artificiels. Ces anticorps vont reconnaître et favoriser l’élimination de l' α -synucléine. Dans l’approche active, le système immunitaire va se mettre à produire des anticorps reconnaissant l' α -synucléine après que des peptides immunogènes mimant l' α -synucléine soient administrés par voie sous-cutanée (Oertel and Schulz 2016). Ces deux types d’immunisation sont actuellement en Phase d’essai clinique précoce (**Tableau 2**) (Lang and Espay 2018; Schenk et al. 2017).

Tableau 2 : Liste des immunothérapies anti-synucléine en essai clinique.

Compagnie	Type d’immunisation	Produit-Nom
AFFiRiS	Active	AFFITOPE® PD01A
Prothena	Passive	PRX002
Biogen	Passive	BIIB054
AC Immune	Passive	ACI-870
Proclara	Passive	NPT088
NeuroPore	Passive	NPT200-11
BioArctic Neuroscience	Passive	BAN0805

La thérapie génique avec l’utilisation de vecteurs viraux est aussi une thérapie potentielle pour la MP (Piguet, Alves, and Cartier 2017). Les vecteurs viraux principalement utilisés sont les AAVs (« Adeno-Associated Virus ») et les lentivirus. Des essais cliniques ont déjà été menés pour évaluer la sécurité et la tolérance de ces vecteurs (lentivecteur Prosavin et le vecteur AAV2-hAADC) qui ont pour but de pallier au déficit en DA par l’apport d’enzymes nécessaire à la production de DA (Palfi et al. 2014; Mittermeyer et al. 2012). D’autres approches neuroprotectrices utilisant les vecteurs viraux sont envisagées visant à délivrer des facteurs neurotrophiques pour sauver la fonction dopaminergique, pour supprimer le stress du RE ou pour améliorer les activités

lysosomales et mitochondriales (**Tableau 3**) (Valdés and Schneider 2016; Ciron et al. 2015; Rocha et al. 2015).

Tableau 3 : Liste des stratégies thérapeutiques utilisant la thérapie génique en essai clinique.

Approche stratégique	Gène	Vecteur
Augmentation de la DA	TH+AADC+GCH-1 (Prosavin)	Lentivirus (EIAV)
	AADC	AAV2
Altération de l'activité excitatoire	GAD65/67	AAV2
Facteurs neurotrophiques	GDNF	AAV2
	Neurturine	AAV2

AAV : Adeno-Associated Virus ; TH : tyrosine hydroxylase ; AADC : DOPA décarboxylase ; GCH-1 : GTP-cyclohydrolase 1 ; GAD : glutamate décarboxylase ; GDNF : Glial Derived Neurotrophic Factor.

Chapitre 2 : La protéine LRRK2

I - LRRK2

I.A - Génétique

Parmi les gènes apparentés à une forme de la MP autosomique dominante, on retrouve *LRRK2* (« Leucine-Rich Repeat Kinase 2 », PARK8). En 2002, le locus PARK8 a été initialement cartographié sur le chromosome 12q12 dans une grande famille japonaise (famille Sagamihara) présentant un parkinsonisme héréditaire dominant sur quatre générations successives (Manabu Funayama et al. 2002). Deux ans plus tard, le gène correspondant à PARK8 a été identifié, par deux groupes différents, codant pour la protéine LRRK2 ou Dardarine (terme Basque signifiant tremblement) (Zimprich et al. 2004; Paisán-Ruiz et al. 2004). A travers ces études, les premières mutations de *LRRK2* furent identifiées, R1441C et I2020T. Par la suite, en 2005, la mutation G2019S fut pour la première fois décrite, et retrouvée avec une fréquence élevée dans les populations étudiées (Kachergus et al. 2005; W. C. Nichols et al. 2005; Di Fonzo et al. 2005). A partir de là, une augmentation exponentielle des recherches sur le gène *LRRK2* a commencé et plus de 100 variantes différentes de LRRK2 ont été rapportées (Lubbe and Morris 2014; Lunati, Lesage, and Brice 2018).

Les mutations du gène *LRRK2* représentent une des causes génétiques la plus fréquente de MP à transmission autosomique dominante, affectant entre 5 et 15% des individus ayant des antécédents familiaux de la maladie, et autour de 3% des cas sporadiques caucasiens (Paisán-Ruiz et al. 2008). Une mutation, G2019S, est particulièrement fréquente, pouvant aller jusqu'à 40% selon l'origine ethnique dans les cas familiaux et dans 1% des cas sporadiques (Healy et al. 2008; Schulte and Gasser 2011). Il faut noter que la pénétrance est incomplète (Latourelle et al. 2008; Lesage and Brice 2009) suggérant l'addition d'autres facteurs génétiques ou environnementaux nécessaires au déclenchement de la pathologie.

Cependant, neuf mutations se sont clairement révélées causales de la maladie : N1437H, R1441C/G/H/S dans le domaine ROC, Y1699C dans le domaine COR ainsi que I2012T, G2019S et I2020T dans le domaine kinase (Aasly et al. 2010; Manabu Funayama et al. 2005; Healy et al. 2008; Mata et al. 2016; Nucifora et al. 2016). Fait important, toutes ces mutations sont situées au niveau de la région centrale de la protéine où se trouvent les deux domaines catalytiques (domaines

GTPase et kinase) (**Figure 8**). En outre, quatre mutations de LRRK2 ont été décrites comme facteur de risque de la MP (A419V, R1628P, M1646T et G2385R) (M Funayama et al. 2007; Ross et al. 2008; K. Li et al. 2015; Heckman et al. 2013), alors que les mutations N551K et R1398H semblent protéger contre la MP (Heckman et al. 2013; L. Chen et al. 2011) (**Figure 8**).

Fait intéressant, le phénotype clinique des patients porteurs de la mutation LRRK2 a tendance à être impossible à discerner de celui des patients présentant une forme idiopathique de la MP (Healy et al. 2008; Haugarvoll et al. 2008; Papapetropoulos et al. 2006; Marras et al. 2011; Kalia et al. 2015). Néanmoins, chez de rares patients, des caractéristiques atypiques ont été décrites avec une dopa-résistance, un dysfonctionnement autonome, une démence et elles apparaissent avec des phénotypes cliniques différents incluant un syndrome corticobasal, une paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou une démence avec tremblement (Wider, Dickson, and Wszolek 2010). Cette pathologie pléomorphe suggère que LRRK2 pourrait être au centre de différentes voies neurodégénératives.

II - Localisation

L'expression de la protéine LRRK2 se répartit assez largement dans plusieurs tissus. Il est intéressant de noter que les reins et les poumons présentent une expression de LRRK2 plus élevée que celles des tissus cérébraux (**Figure 7A**). De même, des études récentes indiquent une expression de LRRK2 dans les fluides tels que le LCR, l'urine (Fraser et al. 2013; Fraser, Moehle, et al. 2016) et le sang, y compris dans les cellules circulantes et immunitaires (lymphocytes, monocytes et neutrophiles) (Thévenet et al. 2011; N. Dzamko et al. 2013; Fan et al. 2018; Kubo et al. 2010).

Dans le SNC, LRRK2 est exprimée dans plusieurs structures cérébrales importantes pour la MP avec une plus forte expression dans les régions dopaminoceptives (Galter et al. 2006; J. Taymans, Van den Haute, and Baekelandt 2006; West et al. 2014), telles que le striatum, le cortex et l'hippocampe, et dans une moindre mesure dans la substance noire. Au niveau cellulaire, LRRK2 n'est pas uniquement présente dans des cellules neuronales, la protéine est retrouvée dans les cellules gliales et les astrocytes (Miklossy et al. 2006; N. Dzamko et al. 2017; Y. Zhao et al. 2018). A noter que l'expression augmente avec le développement puisque LRRK2 est relativement peu exprimée dans le tissu embryonnaire (Westerlund et al. 2008; Biskup et al. 2007). Ce n'est qu'à partir du 8^{ème} jour post-natal que LRRK2 est observée. Puis les niveaux d'expression de LRRK2

augmentent durant les trois semaines du développement pour ensuite rester constants durant le vieillissement. Ainsi, LRRK2 pourrait jouer un rôle durant l'organogenèse.

Au niveau subcellulaire, la protéine LRRK2 se localise principalement dans tout le cytoplasme avec une certaine affinité pour les vésicules et structures membranaires en particulier les radeaux lipidiques, les vésicules associées aux microtubules, le RE, l'appareil de Golgi. Des études immunocytochimiques et de fractionnement cellulaire ont montré un enrichissement de LRRK2 dans les fractions membranaires avec une association aux membranes de vésicules (endosome et lysosome) ainsi qu'à la membrane externe des mitochondries (**Figure 7B**) (Biskup et al. 2006; Hatano et al. 2007; West et al. 2005; Sanna et al. 2012). La distribution de LRRK2 à travers ces différentes organelles supporte un rôle de la protéine dans le trafic vésiculaire.

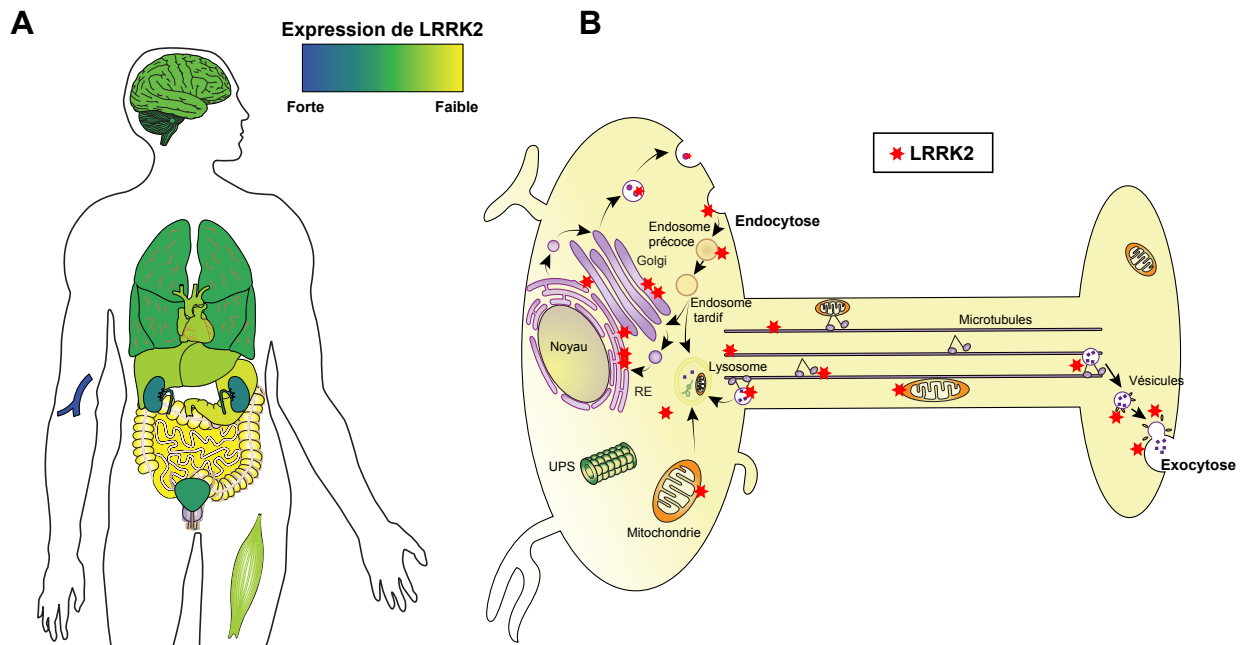


Figure 7 : Expression et localisation subcellulaire de LRRK2.

(A) Représentation de la distribution de LRRK2 dans le corps humain. L'expression de LRRK2 est indiquée par un nuancier de couleur pour les organes/tissus : biofluides, rein, poumon, cerveau, cœur, foie, muscle, estomac et intestin. (B) Représentation schématique de la localisation de LRRK2 dans différentes régions cellulaires. LRRK2 (indiqué par des étoiles rouge) co-localise en grande partie avec le RE, l'appareil de Golgi et les vésicules associées au Golgi, le cytosquelette, les vésicules synaptiques et les radeaux lipidiques. Toutes ces structures sont impliquées dans le trafic membranaire et cellulaire. Adapté de Taymans *et al*, 2017; Sanna *et al*, 2012.

III - Structure

Le gène *LRRK2* code une protéine de 2527 acides aminés avec un poids moléculaire de 286 kDa. Elle comprend plusieurs domaines d'interactions tels que les répétitions ARM (« Armadillo repeat »), ANK (« Ankyrin repeat »), LRR (« Leucine-Rich Repeat ») et un domaine WD40. De plus, la protéine contient un noyau catalytique composé d'un domaine ROC (« Ras Of Complex ») à activité GTPase, suivi du domaine C-terminal ROC (COR), cette combinaison étant caractéristique de la superfamille des protéines ROCO (Marín 2006; Bosgraaf and Van Haastert 2003), et d'un domaine kinase (KIN) (Mata et al. 2006) (**Figure 8**).

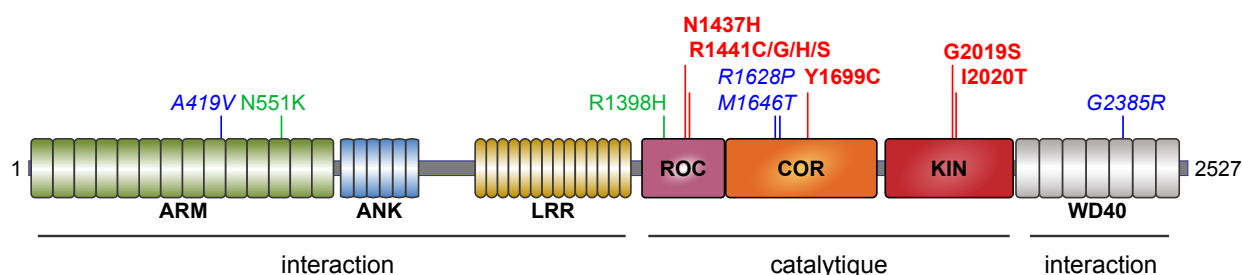


Figure 8 : Structure de la protéine LRRK2 avec les positions des mutations au sein des domaines fonctionnels. Représentation schématique de la protéine LRRK2, avec les domaines d'interactions et le cœur catalytique. ANK = Ankyrin-like repeats, LRR = leucine-rich repeats, ROC = Ras of complex proteins domaine GTPase, COR = C-terminal of ROC, KIN = Kinase et WD40. Les mutations causales de la MP sont annotées en rouge, les deux facteurs génétiques protecteurs sont indiqués en vert et les facteurs de risque sont indiqués en bleu.

III.A - Domaine GTPase

Le domaine GTPase de LRRK2 est caractérisé par un domaine ROC suivi d'un domaine COR, ce qui fait de LRRK2 un membre de la famille des protéines ROCO, dont font aussi partie son homologue LRRK1 (« Leucine-Rich Repeat Kinase 1 ») ainsi que les protéines DAPK1 (« Death Associated Protein Kinase 1 ») et MASL1 (« Malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 ») (Lewis 2009). Selon la structure type des protéines ROCO, le domaine GTPase de LRRK2 est composé de cinq régions : un domaine de liaison P-loop ou GDP/GTP, suivi par des motifs switch I et switch II qui subissent des modifications conformationnelles lors de la liaison du GTP, et des motifs G4 et G5 (Tsika and Moore 2013).

Le domaine GTPase de LRRK2 a pu être purifié en tant que monomère actif qui se lie à et hydrolyse le GTP (J. Liao et al. 2014). Cependant, il a été montré que le domaine ROC induit la dimérisation

de LRRK2 et est ainsi important pour la médiation d'une configuration dimère à l'état actif (J. Deng et al. 2008; Guaitoli et al. 2016; Tsika and Moore 2013; Greggio et al. 2008). Des données biochimiques provenant de protéines homologues suggèrent que LRRK2 appartient à un groupe de protéines G activé par dimérisation nucléotide-dépendante (GAD) (Gotthardt et al. 2008; Gasper et al. 2009). Ce modèle est en concurrence avec l'identification de protéines GAP (« GTPase activating proteins ») et GEF (« G uanine nucleotide exchange factors ») qui interagissent avec LRRK2 pour potentiellement réguler l'activité du domaine GTPase de LRRK2, à savoir les protéines ArfGAP1, RGS2 et ARHGEF7 (Stafa et al. 2012; Haebig et al. 2010; Dusonchet et al. 2014). Toutefois, il est important de noter que LRRK2 ainsi que d'autres protéines ROCO ne nécessitent pas de protéines auxiliaires pour passer d'une conformation GTP à GDP, en raison de leurs caractéristiques biochimiques uniques (Gilsbach, Eckert, and Gloeckner 2018).

Certaines études ont montré que les mutations dans le domaine GTPase et ROC modifient l'activité kinase de LRRK2. En effet, les mutations pathogènes R1441C/G et Y1699C se sont révélées présenter une liaison accrue au GTP et avec une activité GTPase diminuée (Daniëls et al. 2011; Lewis et al. 2007; West et al. 2007; J. Liao et al. 2014; Xianting Li et al. 2007), en stimulant l'autophosphorylation de LRRK2 (Guo et al. 2007; Purlyte et al. 2018). Alors que des mutations altérant la liaison du GTP, tels que K1347A et T1348N, ont été décrites comme abolissant totalement l'activité kinase de LRRK2 (Biosa et al. 2013; J. Taymans et al. 2011).

Il est tout aussi intéressant de noter qu'un polymorphisme dans le domaine ROC de LRRK2, R1398H, qui est associé à une diminution du risque de la MP (L. Chen et al. 2011), présente une diminution de la liaison du GTP et une hydrolyse accrue du GTP (Nixon-Abell et al. 2016). De même des résultats similaires ont été décrits pour la mutation artificielle R1398L (Xiong et al. 2010). Néanmoins, la saturation du domaine ROC en GTP n'active pas l'activité kinase de LRRK2 et la liaison du domaine ROC avec le GDP n'influence pas l'activité kinase de LRRK2. Tout cela suggère que l'activité kinase de LRRK2 requiert un domaine ROC GTPase actif (J. Taymans et al. 2011).

III.B - Domaine Kinase

LRRK2 appartient au groupe des sérine/thréonine (Ser/Thr) kinases (Luzón-Toro et al. 2007). Le mécanisme d'activation parmi les Ser/Thr kinases est assez conservé et implique habituellement

l'activation de l'autophosphorylation d'un ou plusieurs résidus dans la boucle d'activation, ce qui induit alors un changement conformationnel associé à la liaison de l'ATP et/ou à l'interaction du substrat.

Les premières études visant à évaluer l'activité kinase de LRRK2 étaient centrées sur sa capacité à s'autophosphoryler ou à phosphoryler des substrats génériques (peptide MBP) par des tests *in vitro* en utilisant la protéine recombinante complète. Seule la mutation G2019S est responsable d'un gain de fonction de 2 à 3 fois supérieur à celui de la protéine sauvage (WT) (Greggio and Cookson 2009; Jaleel et al. 2007; Sheng et al. 2012; West et al. 2005; R. J. Nichols et al. 2010). Alors que pour les autres mutations des résultats contradictoires ont été obtenus. Certaines études montrent une augmentation de l'activité kinase pour les mutations R1441C/G, Y1699C et I2020T (West et al. 2005; Webber et al. 2011; Gloeckner 2005; West et al. 2007), ou ne signalent aucun changement (Jaleel et al. 2007; R. J. Nichols et al. 2010; Steger et al. 2016). Ces divergences selon les études rendent difficile la compréhension des effets réels des mutations sur les fonctions physiologiques de LRRK2.

Fait intéressant, un article de Sheng et ses collègues a indiqué que l'autophosphorylation de la Ser 1292 est un indicateur direct de l'activité kinase de LRRK2 *in vivo* et que des mutations supplémentaires autres que G2019S semblent augmenter l'autophosphorylation à ce site (Sheng et al. 2012; Purlyte et al. 2018). De plus, il a été récemment montré que la protéine LRRK2 WT possédait aussi une activité kinase augmentée dans des neurones de patients parkinsoniens sporadiques comparés à des sujets sains (Di Maio et al. 2018).

Ces dernières années de nombreuses protéines ont été proposées comme substrats de LRRK2 mais ce n'est qu'en 2016, que Steger et ses collaborateurs ont montré pour la première fois que les protéines Rab GTPases, y compris Rab8, Rab10 et Rab12 sont des substrats physiologiques de LRRK2 (Steger et al. 2016). La phosphorylation des protéines Rab, induite par LRRK2, a depuis été largement rapportée par différents laboratoires à travers le monde (Jeong et al. 2018; Steger et al. 2017; Madero-Pérez, Fdez, et al. 2018; Yu et al. 2018; Thirstrup et al. 2017; Zhiyong Liu et al. 2017; Fujimoto et al. 2017)

Tous les mutants pathogènes de LRRK2 sont nettement plus actifs et phosphorylent davantage les protéines Rab que le mutant G2019S dans les cellules (*in cellulo*), même si, seul le mutant G2019S présente une activité kinase *in vitro* accrue sur les protéines Rab. Ce résultat soulève la question de l'état de phosphorylation des protéines Rab au sein de la cellule (Ito et al. 2016; Steger et al. 2016; Jeong et al. 2018). Il est donc possible que des protéines auxiliaires modulent les différences

observées entre l'activité biochimique *in vitro* de LRRK2 et l'activité de LRRK2 *in cellulo*. Les protéines Rab29 et VPS35 sont capables de moduler l'activité kinase de LRRK2 et notamment d'activer de manière accrue la phosphorylation de protéines Rab (Rab10 par exemple) (Purlyte et al. 2018; Mir et al. 2018). Plus récemment, le groupe du Dr. Nichols a proposé la protéine p62/SQSTM1 comme nouveau substrat de LRRK2 (Kalogeropoulou et al. 2018). Là encore, seul le mutant G2019S augmente la phosphorylation de p62 *in vitro*. Cela reflète un modèle similaire à celui observé pour les protéines Rab (Ito et al. 2016). De plus, l'extrémité N-terminale (N-ter) de LRRK2 serait nécessaire pour la phosphorylation optimale de p62.

Les extrémités extra-catalytiques N et C-ter de LRRK2 jouent également un rôle dans l'activité kinase et la fonction de LRRK2 en agissant comme des modulateurs. Ainsi, l'extrémité C-ter est requise pour une activité kinase optimale. En effet, il a été montré que la perte du domaine WD40 dans des formes tronquées de la protéine abolissait la fonction kinase (Jorgensen et al. 2009). De plus, le facteur de risque G2385R diminue l'activité de kinase de LRRK2 (Gloeckner 2005; Greggio et al. 2006; Jaleel et al. 2007). L'extrémité N-ter, quant à elle, est fortement phosphorylée dans les cellules et régule plusieurs aspects de la biologie de LRRK2, qui seront discutés dans les prochains paragraphes (**Figure 9**).

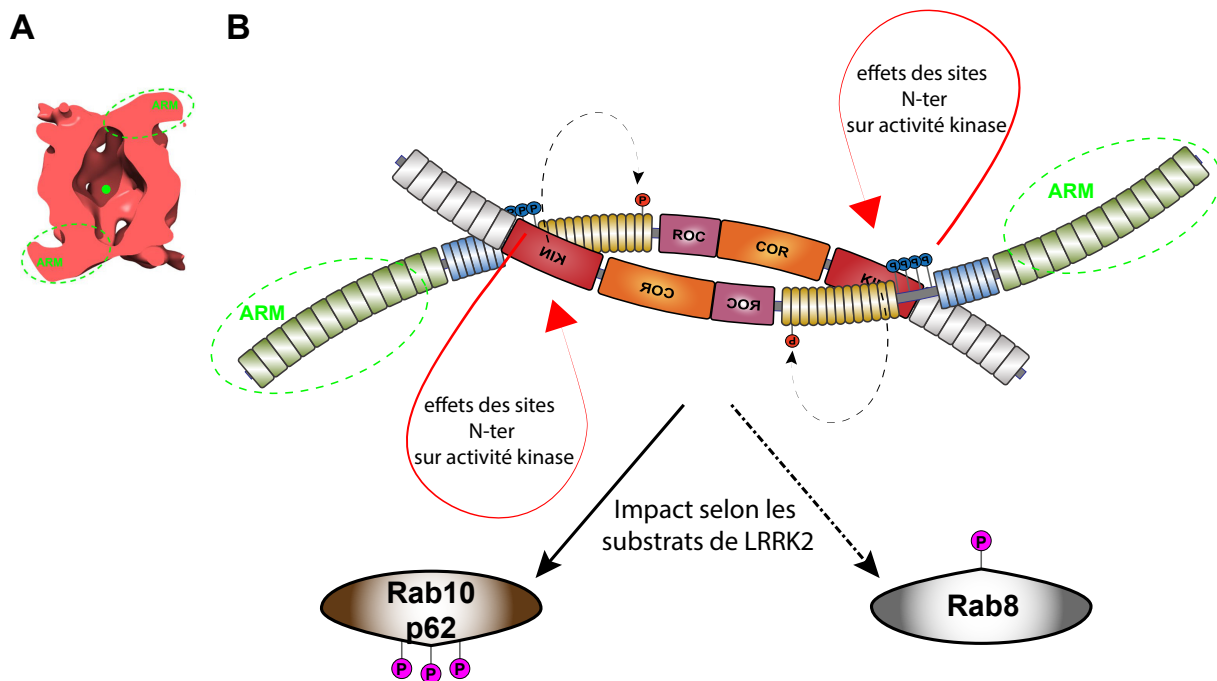


Figure 9 : Impact des sites de phosphorylation N-ter sur l'activité kinase de LRRK2.

(A) Reconstitution 3D d'un dimère de LRRK2. D'après cette représentation, les domaines Armadillo (ARM) sont projetés vers l'extérieur du dimère (cercle pointillé vert) (Sejwal *et al.*, 2017). (B) Représentation schématique d'un dimère de LRRK2. Dans ce modèle, les sites de phosphorylations N-ter interagissent avec le domaine kinase et participent ainsi à la modulation de l'activité kinase du dimère suivant les substrats de LRRK2. (Kalogeropoulou *et al.* 2018; Ito *et al.* 2016).

III.C - Domaines d'interaction protéine-protéine

Outre l'activité enzymatique de LRRK2, les interactions protéine-protéine peuvent également être pertinentes pour la fonction physiologique et pathologique de LRRK2.

La protéine LRRK2 a été décrite pour interagir avec un grand nombre de protéines suite à des criblages *in vitro* mais leur validation et leur signification biologique dans des modèles *in vivo* ne sont pas fréquemment obtenues. Une étude récente a suggéré que LRRK2 pourrait se comporter comme un "hub", avec un peu plus de 260 interacteurs identifiés à ce jour (Manzoni *et al.* 2015), parmi lesquels 25 ont été confirmés dans des conditions plus contrôlées (description par au moins deux publications et au moins deux différentes approches expérimentales employées) (Beilina *et al.* 2014; Reyniers *et al.* 2014; Dächsel *et al.* 2007). Par conséquent, LRRK2 peut être liée à de nombreuses voies et mécanismes cellulaires.

En conjonction de la localisation subcellulaire de LRRK2 avec des structures membranaires telles que les vésicules synaptiques et la présence de protéines dans les synaptosomes des neurites, un rôle de LRRK2 dans la régulation de l'endocytose synaptique par son interaction avec Rab5b a été suggéré (Shin *et al.* 2008). De plus, LRRK2 est capable de se lier aux microtubules par son interaction avec la tubuline (α et β) via son domaine ROC (Gandhi *et al.* 2008; Frank Gillardon 2009; Caesar *et al.* 2013; Blanca Ramírez *et al.* 2017). Considérant que LRRK2 colocalise avec la β -tubuline, les vésicules de transport du Golgi, les endosomes, les lysosomes et les mitochondries (Biskup *et al.* 2006) ainsi que son rôle potentiel dans l'endocytose vésiculaire, LRRK2 pourrait donc être fortement impliquée dans le transport vésiculaire et dans la modulation du cytosquelette, en particulier les processus liés aux microtubules (voir paragraphes V). Pour finir, LRRK2 interagit avec d'autres protéines également impliquées dans la MP, telles que les protéines Tau, α -synucléine, Rab29 et GAK (« Cyclin G-Associated Kinase »).

IV - Régulation de la phosphorylation de LRRK2

LRRK2 est une protéine hautement phosphorylée avec 1% de tous ses acides aminés qui sont phosphorylés (Gloeckner et al. 2010; Reyniers et al. 2014; Evy Lobbstaël, Baekelandt, and Taymans 2012). Ces sites de phosphorylation peuvent être subdivisés en deux groupes, des sites d'autophosphorylation et des sites de phosphorylation hétérologue (représentés en rouge et en bleu respectivement sur la **Figure 10**).

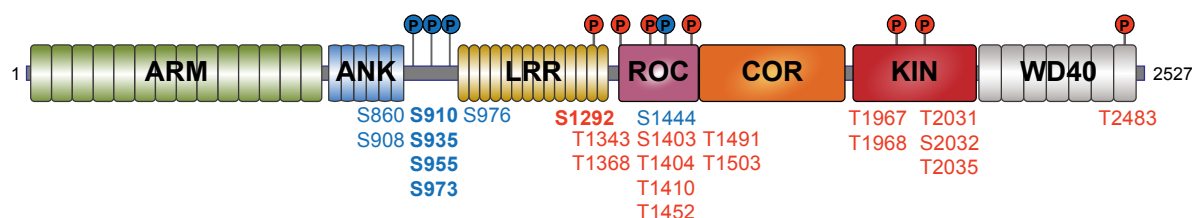


Figure 10 : Structure de la protéine LRRK2 avec les positions des sites de phosphorylations.

Les sites de phosphorylation hétérologue sont annotés en bleu et les sites d'autophosphorylation sont indiqués en rouge, et ceux le plus souvent décrits et étudiés sont indiqués en gras.

IV.A - Sites d'autophosphorylation

Comme de nombreuses kinases, LRRK2 s'autophosphoryle et ce sur plus de 20 résidus Ser et Thr *in vitro* (Kamikawaji, Ito, and Iwatsubo 2009; Gloeckner et al. 2010; Xiaojie Li et al. 2010; Pungaliya et al. 2010; Reynolds et al. 2014; Sheng et al. 2012; Greggio et al. 2009; Webber et al. 2011). La majorité des sites d'autophosphorylation résident au sein du domaine ROC et quelques-uns seulement dans le domaine kinase (**Figure 10**). La pertinence physiologique de ces sites de phosphorylation n'est toujours pas claire. En effet, certains d'entre eux n'ont pas pu être détectés *in vivo*. L'autophosphorylation sur le site S1292 a été confirmée *in vivo*, et est retrouvée augmentée en culture cellulaire pour la plupart des mutants pathogéniques de LRRK2 (N1437H, R1441C/G/H, Y1699C, G2019S et I2020T) (Reynolds et al. 2014; Steger et al. 2016), dans les lysats des cerveaux de souris transgéniques surexprimant la mutation G2019S (souris BAC transgénique) (Sheng et al. 2012) et très récemment également dans le cerveau, les reins et les poumons de souris LRRK2 Knock-in (KI) G2019S (Kluss et al. 2018). Fait intéressant, l'autophosphorylation en S1292 chez des patients parkinsoniens idiopathiques, a été rapportée augmentée dans les exosomes isolés à partir d'urine (Fraser, Rawlins, et al. 2016; Fraser, Moehle, et al. 2016) ainsi que dans les neurones

dopaminergiques (Di Maio et al. 2018). La surveillance de la phosphorylation de la Ser 1292 dans les cellules représente donc un outil important pour l'étude de l'activité kinase de LRRK2 et son effet toxique.

Le phospho-mutant S1292A réduit les effets des mutants LRRK2 sur la croissance des neurites de neurones primaires corticaux de rat, suggérant un rôle dans la neuromorphologie (Sheng et al. 2012). La phosphorylation du site S1292 s'est également avérée contribuer au rôle potentiel de LRRK2 dans la régulation de la taille et de la fonction des lysosomes dans les cellules (Henry et al. 2015). Enfin, ces deux rôles pourraient être reliés comme l'a montré l'étude menée par Plowey et collaborateurs (Plowey et al. 2008).

IV.B - Sites de phosphorylation hétérologue

Les sites de phosphorylation hétérologue sont situés majoritairement au niveau de la partie N-ter dans un cluster entre les domaines ANK et LRR (**Figure 10**). Ce cluster est composé des résidus S910, S935, S955 et S973 (Gloeckner et al. 2010; R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012; Xianting Li et al. 2011), qui sont phosphorylés de manière constitutive, cependant, ce ne sont pas des sites d'autophosphorylation.

Plusieurs éléments ont été fournis pour supporter l'idée que les résidus S910, S935, S973/S976 ne sont pas des sites d'autophosphorylation. Tout d'abord il a été montré que la protéine LRRK2 déphosphorylée n'était pas capable de rephosphoryler ces sites *in vitro* (Reynolds et al. 2014; R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012; N. Dzamko et al. 2010). De plus, la présence de résidus phosphorylés sur des mutants LRRK2 ne présentant pas d'activité kinase indique qu'il ne s'agit probablement pas de sites d'autophosphorylation (Gloeckner et al. 2010; Evy Lobbstaël et al. 2013; Ito et al. 2014). Enfin, plusieurs mutants pathogéniques (N1437H, R1441C/G/H, Y1699C et I2020T) dont la fonction kinase est hyperactivée présentent un niveau de phosphorylation réduit sur ces sites comparé au LRRK2 WT (Reynolds et al. 2014; R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012; Evy Lobbstaël et al. 2013; N. Dzamko et al. 2010).

Un autre aspect de la régulation de LRRK2 est la rapide déphosphorylation de ces sites dans les cellules et les tissus après un traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase (X. Deng et al. 2011). Étant donné la corrélation entre l'effet des inhibiteurs sur l'activité kinase de LRRK2 *in vitro* et sur les sites de phosphorylation hétérologue (Vancaenenbroeck et al. 2014), ces sites sont utilisés comme mesure indirecte de l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2. La phosphorylation

de ces résidus a également été retrouvée affectée dans les cerveaux issus de patients parkinsoniens sporadiques (N. Dzamko et al. 2017). En particulier les phosphorylations S910, S935 et S973 ont été retrouvées diminuées au sein de la SNc.

L'équilibre de la phosphorylation de LRRK2 semble être un élément participant à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, y compris sa distribution cellulaire. L'identification des régulateurs (les protéines kinases et phosphatases) de cet équilibre sera donc cruciale pour comprendre comment LRRK2 est (dé)-régulée et affecte les processus de signalisation en aval, et constitue donc une importante voie de recherche et devrait nous aider à mieux comprendre la physiopatho-biologie de LRRK2.

IV.B.1 - Les kinases

La protéine kinase A (PKA) a été proposée comme une kinase agissant sur les sites S910 et S935 (Xianting Li et al. 2011; Muda et al. 2014) ainsi que sur le site S1444 (Muda et al. 2014). Cependant dans des conditions d'activation de la PKA, la phosphorylation de LRRK2 n'a pas été confirmée (Reynolds et al. 2014). Les types cellulaires utilisés étant différents, cela peut suggérer des mécanismes de phosphorylation spécifiques à certains types cellulaires. Cette hypothèse est appuyée par les travaux du Dr. Dzamko et ses collaborateurs, qui ont montré que la famille des kinases Ikappa B (IKKs) phosphorylaient les sites S910 et S935 dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse lors de l'activation des récepteurs TLR (Toll-like receptors) (N. Dzamko et al. 2012). Enfin, la caséine kinase 1 alpha (CK1 α) a été identifiée après un criblage siARN à l'échelle du kinome dans des cellules HEK-293T (Chia et al. 2014). De plus, la répression de l'expression ou l'inhibition de CK1 α , a entraîné une diminution de la phosphorylation en S910 et S935 ainsi qu'une augmentation de l'association d'ARHGEF7 avec LRRK2, ce qui diminue la liaison du GTP à LRRK2. Le traitement avec des siARN ciblant CK1 α réduit également la fragmentation du Golgi dépendante de Rab29 causée par LRRK2, indiquant que la phosphorylation des sites hétérologues de LRRK2 module le recrutement de LRRK2 au sein du réseau trans-Golgi (TGN) (Chia et al. 2014).

IV.B.2 - Les phosphatases

Concernant les phosphatases régulant les sites de phosphorylation hétérologue, seule la sous-unité catalytique alpha de la protéine phosphatase 1 (PPP1CA) a été démontrée comme régulant la phosphorylation de LRRK2 au niveau des sites S910, S935, S955 et S973 (Evy Lobbestael et al. 2013). Cela a été montré avec l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la Protéine Phosphatase 1 (PP1), la calyculine A, qui empêchait la déphosphorylation de LRRK2 induite par un inhibiteur pharmacologique de la fonction kinase de LRRK2. Fait intéressant, les effets de PPP1CA sur la phosphorylation de LRRK2 ont pu être confirmés dans plusieurs types cellulaires (HEK-293T, SH-SY5Y, NIH 3T3, A549, U2OS et dans des neurones corticaux primaires de souris). Cela montre que PPP1CA est active en tant que phosphatase de LRRK2 indépendamment du type cellulaire testé.

Dans des conditions de déphosphorylation de LRRK2, l'association entre PPP1CA et LRRK2 est accrue. Par exemple, lors d'un traitement avec des inhibiteurs de l'activité kinase de LRRK2 ou en présence des mutants de LRRK2 présentant de faible niveau de phosphorylation (Evy Lobbestael et al. 2013). Par conséquent, le mécanisme de déphosphorylation de LRRK2 implique le recrutement de PPP1CA au sein d'un complexe comprenant LRRK2. Une autre étude sur LRRK2 et le stress oxydatif (Mamais et al. 2014) a également permis de mettre en évidence l'importance du rôle physiologique de PP1 dans la déphosphorylation de LRRK2. Le stress médié par l'arsénite entraîne une réduction de la phosphorylation de LRRK2 en S910 et S935 en culture cellulaire et cette inhibition est renversée par la calyculine A. De plus, dans cette même étude, la calyculine A empêche la déphosphorylation induite par l'arsénite et l' H_2O_2 , mais seul l'arsénite induit une association accrue de PPP1CA avec LRRK2 dans ces conditions (Mamais et al. 2014). Il serait donc intéressant d'étudier si d'autres phosphatases sont impliquées dans les événements de déphosphorylation induits par l' H_2O_2 .

La protéine phosphatase 2A (PP2A) a été identifiée comme une protéine partenaire interagissant avec LRRK2 (Athanasopoulos et al. 2016). Son implication dans la déphosphorylation des sites hétérologues n'a pas encore été démontrée. Athanasopoulos et ses collaborateurs ont observé un effet protecteur de l'activation pharmacologique de PP2A par du Sélénate de Sodium dans des cellules exprimant le mutant R1441C. De plus la réduction de l'expression de la sous-unité catalytique de PP2A par shARN, aggrave la dégénérescence cellulaire dans des cellules SH-SY5Y exprimant le mutant R1441C ainsi que dans des cultures de neurones corticaux de souris surexprimant le mutant G2019S. Enfin, les auteurs ont montré que PP2A interagit avec LRRK2

via son domaine ROC, ils ont alors proposé PP2A comme une phosphatase pouvant réguler les sites d'autophosphorylation de LRRK2 (Athanasopoulos et al. 2016; Reynolds et al. 2014).

La spécificité des cibles de PP1 et PP2A est déterminée par leur association avec leurs sous-unités régulatrices. Nous ne savons pas encore quelles sous-unités forment l'holoenzyme active qui agit sur LRRK2 (voir **Chapitre 3**). Pour bien comprendre comment la déphosphorylation de LRRK2 est régulée, il est nécessaire de savoir quelles sous-unités interviennent dans l'interaction avec LRRK2.

IV.B.3 - Les Interacteurs de LRRK2

La phosphorylation des sites S910 et S935 se sont avérées être à l'origine de l'interaction de LRRK2 avec les protéines 14-3-3 (R. J. Nichols et al. 2010; N. Dzamko et al. 2010; Xianting Li et al. 2011; Muda et al. 2014). En effet, des mutations (substitution du résidu Ser en Alanine) au niveau des sites S910 et S935, mais pas des sites S955 et S973, entraînent une forte réduction de la liaison avec 14-3-3 (Doggett et al. 2012). Si l'interaction entre LRRK2 et 14-3-3 est bloquée en utilisant le peptide difopeine, LRRK2 se retrouve déphosphorylée aux sites S910 et S935 (J. Zhao et al. 2015; Fraser et al. 2013). Par conséquent, il a été suggéré que la liaison de 14-3-3 avec LRRK2 pourrait protéger contre la déphosphorylation au niveau de ces deux sites de phosphorylation, et affecter la localisation de LRRK2 au sein de la cellule. Ainsi, LRRK2 présente une distribution majoritairement cytoplasmique lorsqu'elle est phosphorylée au niveau des sites S910 et S935 et liée à 14-3-3. Cependant, LRRK2 se relocalise et s'accumule dans des structures intracytoplasmiques appelées « skein-like » lorsque les sites S910 et S935 sont déphosphorylés et que la liaison avec 14-3-3 est altérée. De même, suite à l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 et chez les mutants pathogènes qui présentent une diminution de la phosphorylation au niveau de ces sites, LRRK2 se retrouve relocalisée dans des structures filamenteuses ou de type « skein-like » (R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012; N. Dzamko et al. 2010; X. Deng et al. 2011).

Il est intéressant de noter que les protéines 14-3-3 exercent un rôle neuroprotecteur dans la MP. Ainsi, la surexpression de 14-3-3 peut altérer l'activité kinase du mutant G2019S et empêcher un raccourcissement des neurites induit par les mutants G2019S et R1441G (Lavalley et al. 2016). Une autre étude, a par ailleurs trouvé que 14-3-3 γ était phosphorylée par la protéine PAK6 (p21-activated kinase 6), une Ser/Thr kinase (Civiero, Cogo, et al. 2017). 14-3-3 γ phosphorylée n'est plus capable de se lier au site S935 de LRRK2, provoquant ainsi sa déphosphorylation. Dans les

neurones issus de souris LRRK2 G2019S, la phosphorylation de 14-3-3 médiée par PAK6 contrebalance le raccourcissement des neurites induit par le mutant G2019S.

Plusieurs équipes ont démontré une interaction de LRRK2 avec Rab29 (D. A. MacLeod et al. 2013; Beilina et al. 2014; Zhiyong Liu et al. 2017; Purlyte et al. 2018). Cette interaction s'effectue au niveau du domaine ANK de LRRK2 et régule la phosphorylation des sites en position N-ter (Purlyte et al. 2018). En effet, Purlyte et ses collaborateurs ont découvert que tous les mutants LRRK2 du domaine ANK qui sont déficients à se lier à la protéine Rab29 sont aussi déphosphorylés sur ces sites N-ter. De plus, la perte de Rab29 endogène dans les cellules A549 réduit modérément la phosphorylation de ces sites. Cependant, ces données n'excluent pas la possibilité qu'un autre résidant du Golgi, une protéine kinase ou phosphatase, régule la phosphorylation de ces sites.

Ces résultats montrent que la phosphorégulation de la partie N-ter de LRRK2 est importante pour la pathogenèse de la MP et qu'il est donc important d'étudier plus en avant les partenaires impliqués et de caractériser les voies et signaux régulant la phosphorylation de la partie N-ter de LRRK2 (**Figure 11**).

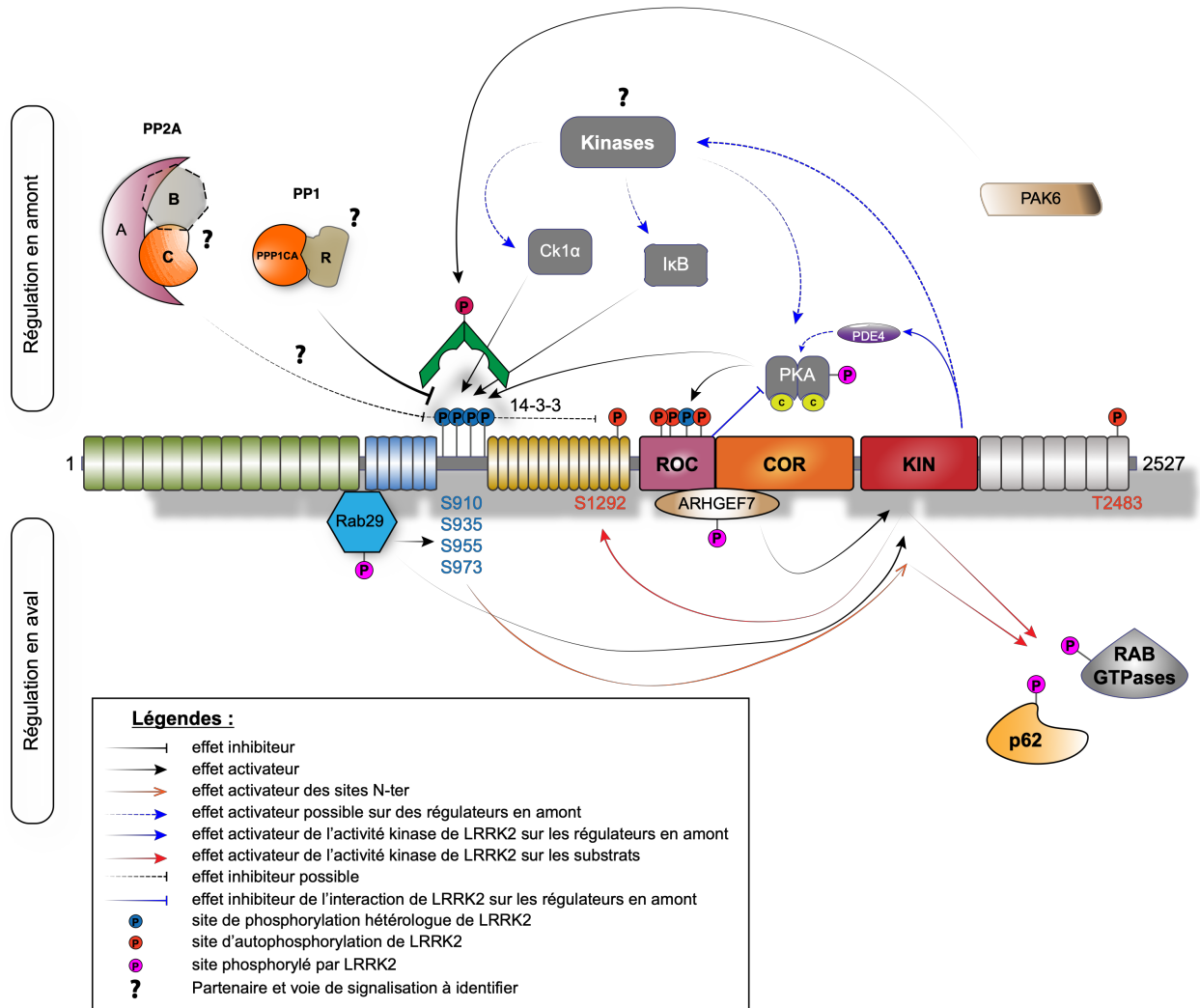


Figure 11 : Représentation schématique des partenaires impliqués dans la phosphorylation de LRRK2.

La phosphorylation de la protéine LRRK2 met en jeu un nombre important de partenaires qui peuvent eux aussi être régulés par LRRK2. Des protéines kinases et des phosphatases sont impliquées dans la régulation des sites N-ter (S910/935/955/973). PKA phosphoryle LRRK2 sur les sites N-ter et sur le site S1444, dans le même temps, LRRK2 régule l'activité de PKA soit par interaction direct via son domaine ROC, soit de manière indirecte en agissant sur la phosphodiesterase 4 (PDE4). En ce qui concerne les phosphatases, PPP1CA est confirmée mais les sous-régulatrices associées restent encore à déterminer ; l'holoenzyme PP2A interagit avec LRRK2 et peut potentiellement réguler le site d'autophosphorylation S1292. La phosphorylation des sites N-ter permet la liaison avec la protéine 14-3-3 qui peut elle-même être phosphorylée par PAK6 ce qui empêche toute liaison avec LRRK2. La régulation en aval met en jeu la phosphorylation de protéines substrats telles que les protéines Rab et p62 mais aussi LRRK2 (sites d'autophosphorylation). ARHGEF7 se lie à LRRK2 via le domaine ROC-COR, induisant une augmentation de l'activité kinase participant à la phosphorylation des substrats de LRRK2 et de ARHGEF7. Ces phosphorylations sont aussi régulées indirectement par les sites de phosphorylation N-ter. Parmi les Rab GTPases, la protéine Rab29 interagit avec LRRK2 au niveau du TGN, cette interaction augmente la phosphorylation du cluster en N-ter et aussi l'activité kinase de LRRK2. LRRK2 phosphoryle Rab29 et empêche Rab29 d'activer LRRK2 créant une boucle de rétroaction négative. (Evy Lobbstaël et al. 2013; Civiero, Cogo, et al. 2017; Purylyte et al. 2018; Kalogeropoulou et al. 2018; Steger et al. 2016; De Wit, Baekelandt, and Lobbstaël 2018; Chia et al. 2014; Xianting Li et al. 2011; N. Dzamko et al. 2012; R. J. Nichols et al. 2010; Russo et al. 2018).

IV.C - L'ubiquitination

Très peu de données existent sur d'autres modifications post-traductionnelles pour la protéine LRRK2. En effet, les efforts se sont particulièrement focalisés sur la phosphorylation. Cependant quelques études ont montré que la protéine LRRK2 pouvait être ubiquitinée (Ding and Goldberg 2009; Ko et al. 2009; J. Zhao et al. 2015; Nucifora et al. 2016). L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle complexe qui consiste en l'ajout de plusieurs résidus ubiquitines. Après ajout de ces résidus sur la protéine cible, cette dernière est prise en charge par l'UPS. L'ubiquitination de LRRK2 régule sa stabilité et sa clairance (Pajarillo et al. 2018). En effet, Zhao et collaborateurs, émettent l'hypothèse selon laquelle LRRK2 serait ubiquitinée à un niveau basal et que la déphosphorylation de LRRK2 favorise l'addition de résidus ubiquitine sur les résidus Lysine 48 et 63 de LRRK2 par l'ubiquitine E3 ligase CHIP (« carboxyl terminus of HSP70-interacting protein ») menant ainsi à la dégradation de la protéine (J. Zhao et al. 2015). En effet, dans cette étude, l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 a induit l'ubiquitination de LRRK2, qui a pu être bloquée en inhibant les phosphatases par la calyculine A, liant ainsi la déphosphorylation induite par l'inhibition de LRRK2 et l'ubiquitination de la protéine (**Figure 12**).

Il existe donc un équilibre entre la (dé)-phosphorylation et l'ubiquitination de LRRK2 important pour la régulation du niveau d'expression de la protéine et ouvre de nouvelles voies sur la biologie de LRRK2 et sur les approches thérapeutiques pour contrer les effets toxiques de la protéine (Melrose 2015).

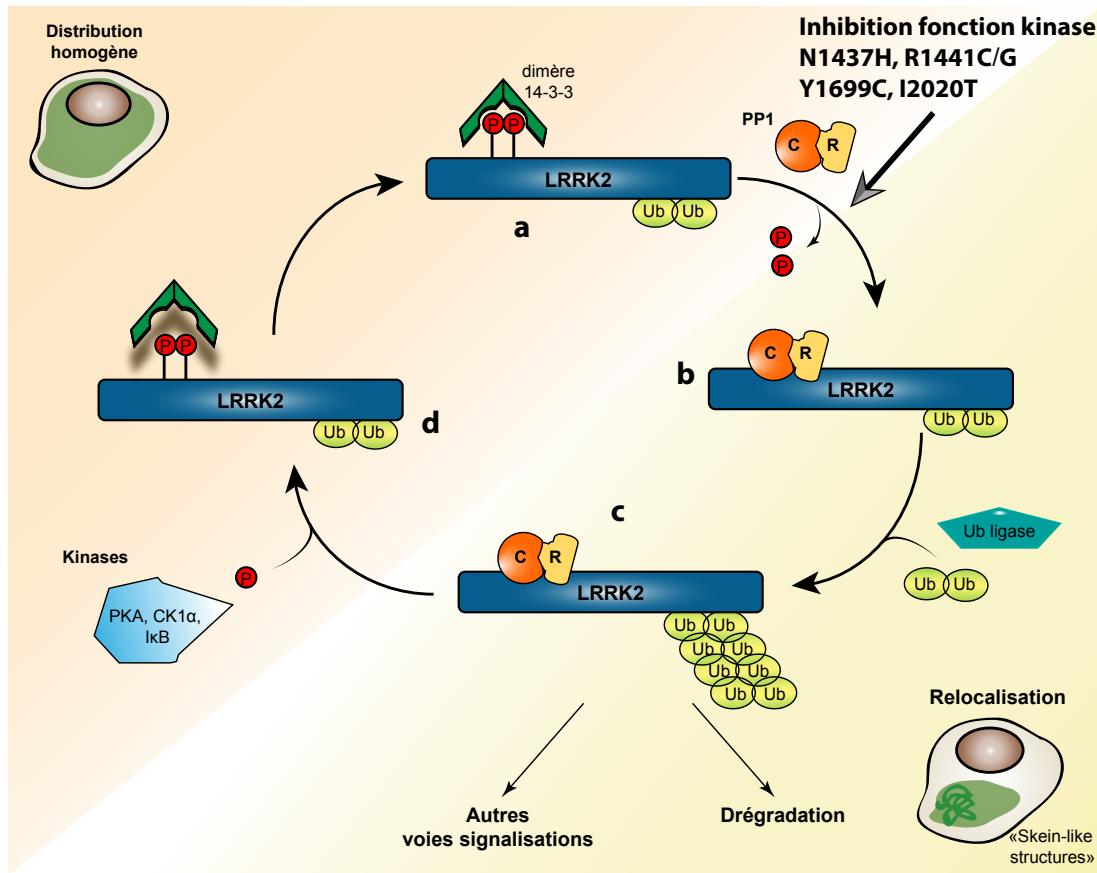


Figure 12 : Cycle déphosphorylation - ubiquitination de LRRK2.

LRRK2 existe sous forme de protéine phosphorylée avec une distribution cytoplasmique homogène dans les cellules (a). En présence de mutants pathogènes liés à la MP, N1437H, R1441C/G, Y1699C et I2020T ou lors de l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2, la phosphatase PP1 est recrutée et induit la perte de 14-3-3 (b). La déphosphorylation conduit à la re-distribution de LRRK2 entraînant une accumulation intracellulaire, souvent décrite comme étant des structures filamenteuses ou « skein-like » et/ou à l'ajout de résidus ubiquitines sur les résidus Lysine 48 et 63 de LRRK2 par l'ubiquitine E3 ligase CHIP, pouvant mener à la dégradation de LRRK2 via le protéasome ou à d'autres voies de signalisation (c). Les kinases phosphorylent LRRK2, qui revient à l'état basal. Adapté de Zhao *et al.*, 2015; Nichols, 2017.

IV.D - Potentiel Biomarqueurs

Plusieurs éléments indiquent l'intérêt de mesurer la phosphorylation de LRRK2 en tant que marqueur de la MP ou marqueur de l'efficacité des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2. LRRK2 est exprimée dans différents tissus et biofluides qui ne sont pas seulement pertinents pour la maladie, mais qui peuvent également être testés lors d'un diagnostic clinique (Civiero and Bubacco 2012).

Les niveaux de protéines LRRK2 totales (Guerreiro et al. 2013; N. Dzamko et al. 2017; H. J. Cho et al. 2013) ainsi que les niveaux de phosphorylation de plusieurs phosphosites de LRRK2 peuvent constituer des biomarqueurs prometteurs. Ceci est soutenu par les résultats démontrant que la

phosphorylation de LRRK2 est modulée dans la majorité des mutants responsables de la maladie. Pour les sites S910, S935, S955 et S973, les taux de phosphorylation sont réduits pour la plupart des mutants (R. J. Nichols et al. 2010), alors que pour le site S1292, les taux sont augmentés pour la plupart des mutants (Sheng et al. 2012).

L'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de LRRK2 est un biomarqueur de la maladie a commencé à être évaluée dans différentes études. Par exemple, la phosphorylation de LRRK2 en S910 et S935 a été testée sur des PBMC (« Peripheral Blood Mononuclear Cells ») de patients idiopathiques atteints de la MP par rapport à des témoins, mais aucun changement significatif n'a été observé (N. Dzamko et al. 2013). Dans les urines, le test des niveaux de phosphorylation du site S1292 a donné des résultats significatifs. Notamment, une phosphorylation de S1292 plus élevée est observée chez les sujets porteurs de la mutation G2019S (Fraser, Moehle, et al. 2016; S. Wang et al. 2017). Dans une autre étude, la phosphorylation de S1292 s'est avérée significativement augmentée dans les patients parkinsoniens idiopathiques par rapport aux témoins appariés (Fraser, Rawlins, et al. 2016). Fait intéressant, dans cette dernière étude, l'élévation de la phosphorylation en S1292 était corrélée avec la gravité des troubles cognitifs. Cette augmentation de phosphorylation de LRRK2 au niveau du site S1292 chez des patients atteints de MP idiopathique a également été mise en évidence dans les neurones dopaminergiques de la SN (Di Maio et al. 2018). De plus, ces cinq sites (S910, S935, S955, S973 et S1292) sont rapidement déphosphorylés en culture cellulaire, dans des modèles animaux et dans des PBMC humains sous traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2 (J.-M. Taymans 2014; Perera et al. 2016), considérés comme un traitement potentiel de la MP. Par conséquent, la mesure de la phosphorylation de LRRK2 pourrait être utilisée comme un biomarqueur pharmacodynamique pour des essais cliniques d'inhibiteurs de LRRK2 (Perera et al. 2016). Les substrats de LRRK2, tels les protéines Rab (Steger et al. 2016), sont également des biomarqueurs potentiels de l'activité kinase LRRK2. Par exemple, la phosphorylation de Rab10 est également réduite après un traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2 (Fan et al. 2018; Ito et al. 2016; Thirstrup et al. 2017; Lis et al. 2018)

La phosphorylation de LRRK2 et de ses substrats (Rab GTPase) s'avèrent donc très utile pour surveiller l'activité kinase de LRRK2, l'engagement des inhibiteurs sur LRRK2 ainsi que pour un diagnostic potentiel de la MP.

V - Fonctions et rôles de LRRK2

La protéine LRRK2, de par sa structure, la présence de deux activités enzymatiques différentes et de ses multiples domaines d'interaction protéine-protéine, est impliquée dans une grande variété de processus cellulaires, entre autres, l'immunité innée, la fonction mitochondriale, la fonction autophagie-lysosome, la voie de signalisation Wnt (« Wntless signalling pathway »), la traduction et la régulation de la DA (**Figure 13**).

V.A - Trafic Vésiculaire

Les différents modèles de souris transgéniques LRRK2 générés à ce jour ne récapitulent pas fidèlement un phénotype de la MP. Bien que certains modèles transgéniques présentent une mort des neurones dopaminergiques, la neurodégénérescence est limitée. Les souris transgéniques ne développent que des déficits moteurs légers (Rudenko et Cookson, 2010). LRRK2 se localise dans les vésicules, où elle interagit avec les protéines vésiculaires (Biskup et al. 2006; Alegre-Abarrategui et al. 2009). Dans les vésicules présynaptiques, l'extinction de la protéine LRRK2 par shRNA (« short hairpin RNA »), altère la dynamique du recyclage et augmente la cinétique des vésicules. Cela suggère que LRRK2 pourrait jouer un rôle dans le trafic de vésicules synaptiques (Piccoli et al. 2011). Il a été montré précédemment que LRRK2 interagissait avec Rab5 et Rab7, qui sont des régulateurs importants de la formation et de la maturation des endosomes. En outre, LRRK2 en association avec Rab5b, contribue à la fonction synaptique en modulant l'endocytose des vésicules synaptiques (Shin et al. 2008; Yun et al. 2015). De plus, la surexpression de LRRK2 dans les cellules neuronales primaires entrave l'endocytose des vésicules synaptiques, un phénomène qui peut être inversé avec la co-expression de Rab5b (Shin et al. 2008; Heo, Kim, and Seol 2010). L'interaction de LRRK2 avec la protéine Rab7 affecte la voie endo-lysosomale et autophagique (Gómez-Suaga et al. 2014). En effet, les mutants G2019S et R1441C diminueraient l'activité de Rab7 alors que la version WT ou sans activité kinase (« kinase-dead ») n'ont pas d'effet. Une autre interaction, décrite par différents laboratoires est celle avec la protéine Rab29 (D. A. MacLeod et al. 2013; Beilina et al. 2014), qui est génétiquement impliqué dans la MP et associé au locus PARK16. Le complexe LRRK2-Rab29 agit comme un régulateur important du TGN. En effet, le recrutement de LRRK2 par Rab29 au sein du TGN affecte la structure du TGN en induisant sa fragmentation (Zhiyong Liu et al. 2017; Fujimoto et al. 2017; Purlyte et al. 2018).

Cette modification structurale peut être améliorée par un traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2.

VPS35, un autre gène associé à la MP, participe à la voie de signalisation de LRRK2. Une étude a conclu que *VPS35* et LRRK2 pourraient fonctionner dans une voie de régulation des protéines endolysosomales et de l'appareil de Golgi (D. A. MacLeod et al. 2013). De plus, un laboratoire a montré que la surexpression de *VPS35* exacerbait les déficits locomoteurs et la réduction de la durée de vie observés chez des *Drosophiles* exprimant des mutants de LRRK2 (Linhart et al. 2014). Dernièrement, un rôle majeur de *VPS35* dans le contrôle de l'activité kinase de LRRK2 a été observé par un mécanisme encore non décrit (Mir et al. 2018). En effet, le mutant D620N de *VPS35* induit une activation de l'ordre de 5 à 6 fois de l'activité kinase de LRRK2 qui affecte la signalisation en aval de LRRK2, avec l'augmentation de la phosphorylation des protéines Rab. De plus, il a été montré que les *Drosophiles* exprimant *VPS35* et LRRK2 affectaient le même ensemble de processus de vésicules synaptiques, y compris la libération synaptique dopaminergique (Inoshita et al. 2017).

En ce qui concerne la signalisation de la DA, il a été démontré que les mutations de LRRK2 affectent la neurotransmission de la DA et la libération de catécholamines (Tong et al. 2009; H. Zhou et al. 2011; Xianting Li et al. 2010; Melrose et al. 2010; Yue et al. 2015). LRRK2 perturbe l'endocytose des vésicules synaptiques, entraînant une altération du métabolisme de la DA. L'activité kinase de LRRK2 régule l'état de phosphorylation de l'auxiline, un médiateur important des vésicules synaptiques (Nguyen and Krainc 2018). LRRK2 intervient aussi dans le trafic des récepteurs au niveau du golgi entraînant un défaut de présentation à la membrane (Beccano-Kelly, Volta, Lise, et al. 2015; Migheli et al. 2013; Rassu et al. 2017; Tozzi et al. 2018; Cinaru et al. 2014; Islam et al. 2016). Très récemment, l'équipe du Dr. Dzamko, a observé dans un modèle de souris LRRK2 KI S910A/S935A des altérations dans les protéines régulant le renouvellement de la DA, suggérant que la modulation des sites de phosphorylation des résidus S910 et S935 de LRRK2 peut avoir des implications dans ce processus (Y. Zhao et al. 2018).

V.B - Autophagie

L'absence de la protéine LRRK2 entraîne une augmentation dramatique de la mort cellulaire apoptotique, une accumulation et une agrégation des protéines SNCA et ubiquitinées, ainsi que l'accumulation de granules de lipofuscine. De plus, les taux de LC3-II et de p62, des marqueurs de

l'autophagie, sont altérés, diminués et augmentés respectivement, indiquant que la voie autophagique est défectueuse (Tong et al. 2010). Plus tard, les mêmes auteurs ont rapporté que la perte de LRRK2 chez la souris provoque des altérations biphasiques de la voie autophagique, inchangée à 1 mois, améliorée à 7 mois mais réduite à 20 mois, comme en témoignent les modifications correspondantes des taux de LC3-I/II, p62, SNCA, et de protéines lysosomales (Tong et al. 2012). Cependant, ces rapports ont été observés dans les reins de souris LRRK2 Knock-out (KO) et jusqu'à présent, aucune accumulation de structures autophagiques ou lysosomales n'a été rapportée dans le cerveau de souris âgées dépourvues de LRRK2. Néanmoins, l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 s'est avérée stimuler la macroautophagie dans trois types cellulaires différents (Manzoni et al. 2013). D'autre part, des travaux ont montré que les niveaux basales de LC3-II étaient plus élevés dans les cellules exposées à un inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2 qui, associé à un flux autophagique réduit, peut laisser supposer à un défaut de clairance (A. R. Esteves et al. 2015). En outre, le fait de réduire l'expression de LRRK2 endogène a entraîné des déficits dans l'induction de l'autophagie et de la clairance. De plus, l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 a également réduit la dégradation autophagique, suggérant l'importance de LRRK2 et de son domaine kinase dans la régulation de l'autophagie (Schapansky et al. 2014). Les résultats dans la littérature sur le rôle de LRRK2 dans l'autophagie divergent, et n'ont pas encore permis de comprendre de manière cohérente sa fonction. Les mutations pathogènes ou délétions de LRRK2 auraient à la fois pour effet d'accroître et de réduire l'autophagie en fonction de l'étude et du modèle évalués (Orenstein et al. 2013; Bravo-San Pedro et al. 2013; Alegre-Abarrategui et al. 2009; Plowey et al. 2008; Tong et al. 2012). Il reste à déterminer si LRRK2 possède un rôle positif ou négatif dans le contrôle de la macroautophagie et si le rôle de LRRK2 réside dans les étapes d'initiation ou de clairance (Wallings, Manzoni, and Bandopadhyay 2015). De plus, il a été montré que LRRK2 interagissait avec la protéine p62 (S. Park et al. 2016), et qu'elle était un nouveau substrat de LRRK2 (Kalogeropoulou et al. 2018). Cette association LRRK2-p62 conforte l'idée d'un rôle majeur de la protéine LRRK2 dans le processus autophagique menant à des effets toxiques dans les neurones.

V.C - Régulation du Cytosquelette

Les anomalies dans la croissance et la ramification des neurites figuraient parmi les premiers phénotypes cellulaires observés dans les modèles exprimant LRRK2 (D. MacLeod et al. 2006;

Tsika et al. 2014; Parisiadou et al. 2009; Dächsel et al. 2010; Ramonet et al. 2011; Schwab and Ebert 2015; Cooper et al. 2012; Sánchez-Danés et al. 2012; Reinhardt et al. 2013). Le rôle potentiel de LRRK2 dans l'architecture du cytosquelette et la dynamique du réseau des microtubules a été initialement rapporté par l'identification des protéines ezrine/radixine/moesine et de la β -tubuline en tant qu'interacteurs et substrats de LRRK2 (Jaleel et al. 2007; Frank Gillardon 2009). L'association de la protéine LRRK2 est dépendant du niveau d'acétylation de la tubuline (Law et al. 2014). En effet, Les mutants R1441C et Y1699C présentent une association accrue avec des microtubules non-acétylés menant à des altérations du transport axonal dans les neurones moteurs chez la *Drosophile* ou dans les neurones corticaux de rats transgéniques (Godena et al. 2014). LRRK2 peut également réguler la dynamique du réseau des microtubules par l'interaction avec une autre protéine associée aux microtubules, la protéine Tau (Guerreiro et al. 2016). Plusieurs études ont montré que LRRK2 était capable de phosphoryler Tau (Kawakami et al. 2012; Bailey et al. 2013; Yue et al. 2015; Schapansky et al. 2018), ce qui pourrait réguler la croissance des neurites. Le domaine ROC-COR de LRRK2 s'est avéré interagir avec PAK6. La protéine PAK6 a été impliquée dans le remodelage du cytosquelette, c'est-à-dire la formation des synapses et la croissance des neurites, et il a été suggéré que LRRK2 est le médiateur de la fonction de PAK6 (Civiero et al. 2015). En effet, la présence de LRRK2 est corrélée à l'activation de PAK6 dans les tissus cérébraux de patients parkinsoniens porteurs de la mutation G2019S ou d'origine idiopathiques, alors que des souris LRRK2 KO présentent une diminution de l'activation de PAK6. Cependant, le mécanisme reste à élucider. En effet, l'étude de Civiero et ses collaborateurs indique que la mutation G2019S de LRRK2 hyperactive PAK6 et est associée à une croissance accrue des neurites. Alors que d'autres équipes ont rapporté que la mutation G2019S induit un raccourcissement des neurites (Parisiadou et al. 2009; Winner et al. 2011; Chan et al. 2011). Les microtubules jouent un rôle essentiel dans la mobilité intra- et extracellulaire, dans la morphologie et la division cellulaire (Gardel et al. 2010; Parisiadou and Cai 2010). Des défauts au niveau du centrosome sont associés avec des déficits dans la croissance des neurites et la migration cellulaire. Il a été montré que LRRK2 phosphoryle la protéine Rab8a. Les mutants pathogènes de LRRK2 provoquent des déficits de positionnement et de cohésion du centrosome dépendant de l'activité de la kinase et de l'augmentation de la phosphorylation de Rab8a (Madero-Pérez, Fdez, et al. 2018; Madero-Pérez, Fernández, et al. 2018). De manière intéressante une autre étude a montré que l'activité kinase de LRRK2 influence la ciliogenèse. Le cil primaire est une organelle sensorielle présente à la surface de la majorité des cellules de mammifères (Malicki and Johnson

2017). Ainsi, la phosphorylation de Rab8a médiée par les mutants pathogène de LRRK2 interfère avec la formation du cil primaire (Steger et al. 2017).

Dans des cellules non neuronales, le rôle physiologique de LRRK2 sur la motilité cellulaire a pu être observé sur des fibroblastes. Caesar et ses collaborateurs ont rapporté une augmentation de la migration des fibroblastes de souris transgéniques R1441G, ainsi que pour des fibroblastes de patients humains G2019S par rapport aux témoins. De plus, cette tendance a pu être inversée par un traitement avec un inhibiteur de la fonction kinase, indiquant que LRRK2 pourrait réguler la dynamique du cytosquelette d'une manière dépendante de son activité kinase (Caesar et al. 2013). En outre, dans des cellules du système immunitaire, une autre étude a montré un chimiotactisme accru des cellules myéloïdes dérivées de souris transgéniques G2019S comparé aux témoins, ce qui correspond à une interaction améliorée et dépendante de l'activité kinase avec les protéines régulatrices de l'actine (Moehle et al. 2015). Inversement, Choi et ses collaborateurs ont trouvé que la mutation G2019S diminuait la motilité des cellules microgliales (I. Choi et al. 2015). Dernièrement, il a été montré que LRRK2 modulait la réponse phagocytaire des cellules myéloïdes en phosphorylant WAVE2, un régulateur spécifique de l'actine (K. S. Kim et al. 2018).

Toutes ces preuves témoignent d'un rôle de LRRK2 dans la régulation du cytosquelette, avec des mécanismes qui restent à déterminer et qui peuvent être spécifiques selon le type cellulaire.

V.D - Mitochondrie

Des défauts de la machinerie moléculaire qui maintiennent l'équilibre de la fusion et la dynamique de la fission dans les cellules pourraient contribuer à la pathogenèse de la MP et constitueraient un événement précoce de la dégénérescence dopaminergique (Gautier, Corti, and Brice 2014; Bose and Beal 2016; Berthet et al. 2014), il est intéressant de noter que LRRK2 affecte et régule de manière générale l'homéostasie mitochondriale. La protéine LRRK2 interagit avec les protéines Drp1, « Optic Atrophy Protein 1 » (OPA1) et Mfn, des régulateurs clés de la fission/fusion mitochondriale (X. Wang et al. 2012; Stafa et al. 2014). De plus, LRRK2 co-localise avec ces protéines dans le cytosol ou au niveau des membranes mitochondriales, indiquant qu'elle pourrait avoir de multiples rôles régulateurs (Ryan et al. 2015). Cependant, des résultats contradictoires ont été documentés selon les mutations de LRRK2 associées à la MP. Des fibroblastes dérivés de patients atteints de la MP porteur de la mutation G2019S ont présenté des mitochondries plus allongées formant un réseau interconnecté plus vaste (Mortiboys et al. 2010). Les souris LRRK2

KI G2019S présentent des modifications morphologiques progressives des mitochondries compatibles avec un défaut de fission (Yue et al. 2015). Ce défaut de fission est corrélé avec une diminution des niveaux de la protéine Drp1 et de la phosphorylation S616 de Drp1, cette modification post-traductionnelle est un marqueur de l'activité de Drp1. Inversement, d'autres études montrent que les mutants LRRK2 G2019S et R1441C provoquent une fragmentation des mitochondries (Su and Qi 2013; X. Wang et al. 2012; Niu et al. 2012). Notamment, l'expression de Drp1 est augmentée après surexpression des mutants de LRRK2 dans des neuroblastomes (cellules SH-SY5Y), dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat (X. Wang et al. 2012) et de souris (Niu et al. 2012) ainsi que dans des microglies de souris transgéniques LRRK2 G2019S (Ho et al. 2018). De leur côté, Su et Qi ont montré une fragmentation dans des fibroblastes de patients porteurs de la mutation G2019S par la phosphorylation T595 de Drp1 (Su and Qi 2013).

L'action de LRRK2 sur Drp1 est dépendante de son activité kinase comme le démontre l'emploi de mutant LRRK2 KD qui inhibe l'interaction avec Drp1 et le recrutement à la membrane de la mitochondrie (X. Wang et al. 2012; Su and Qi 2013). De plus il a été montré que le traitement avec l'inhibiteur LRRK2-IN1 restaure partiellement le réseau mitochondrial fragmenté dans des fibroblastes issus de patients sporadiques ainsi que de patients porteurs des mutations LRRK2 G2019S et R1441C (Smith et al. 2016). Enfin, le variant E193K de LRRK2, une mutation identifiée chez une famille italienne, altère la liaison avec la protéine Drp1, affectant la fission mitochondriale lors de la réponse à un traitement au MPP+ (Perez Carrion et al. 2018).

Dans leur étude, Wang et ses collaborateurs, avaient montré une diminution des événements de fusion après surexpression de LRRK2 dans des neuroblastomes humains (X. Wang et al. 2012). Des études récentes ont montré une diminution de l'expression de l'isoforme courte de Opa1 alors que l'isoforme longue n'est pas altérée, chez les patients atteints de la MP et porteur de la mutation G2019S (Stafa et al. 2014). Cette même observation a été rapportée chez des souris LRRK2 KI G2019S (Yue et al. 2015).

Collectivement, ces données corroborent l'hypothèse selon laquelle l'activation constitutive de LRRK2 perturbe l'homéostasie mitochondriale par un déséquilibre de la balance fusion/fission associé avec des altérations de la production de ROS et de l'autophagie.

V.E - Système immunitaire

L'inflammation est un mécanisme qui est associé avec la MP et pourrait être un élément déclencheur de la perte neuronale chez les parkinsoniens porteurs de mutation sur le gène *LRRK2* (J.-W. Lee and Cannon 2015). De nombreuses preuves soutiennent l'idée que *LRRK2* peut avoir une fonction importante dans le système immunitaire (Russo, Bubacco, and Greggio 2014; N. L. Dzamko 2017). Tout d'abord, *LRRK2* a été identifiée par des études GWAS comme l'un des gènes de susceptibilité à la lèpre et à la maladie inflammatoire de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) (Franke et al. 2010; F.-R. Zhang et al. 2009; Barrett et al. 2008; Hui et al. 2018; Z. Wang et al. 2018). De plus, *LRRK2* est abondamment exprimée dans les cellules immunitaires, incluant les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (Gardet et al. 2010; Fan et al. 2018; Thévenet et al. 2011; Kubo et al. 2010; Hakimi et al. 2011) ainsi que dans la microglie et les astrocytes (Miklossy et al. 2006; F. Gillardon, Schmid, and Draheim 2012; Moehle et al. 2012; Ho et al. 2018; Y. Zhao et al. 2018). Aussi, il a été constaté que l'expression et la phosphorylation de la protéine *LRRK2* augmentaient après l'exposition de ces cellules à des produits microbiens et à d'autres stimuli pathogènes (Hakimi et al. 2011; Gardet et al. 2010; Kuss, Adamopoulou, and Kahle 2014; Hongge et al. 2015; N. Dzamko et al. 2012; Schapansky et al. 2014). De manière intéressante, chez les patients sporadiques et chez des patients porteurs de la mutation G2019S les voies et processus d'inflammation sont retrouvés dérégulés (Mutez et al. 2014). Aussi l'expression de *LRRK2* est augmentée dans les monocytes des patients atteints de la MP (Bliederhaeuser et al. 2016; Cook et al. 2017), provoquant un dérèglement des fonctions et une activation des cellules du système immunitaire inné et adaptatif (Bliederhaeuser et al. 2016; Cook et al. 2017; Kozina et al. 2018). De plus, il a été suggéré que la protéine *LRRK2* active la voie de signalisation NF- κ B dans les cellules HEK-293T (Gardet et al., 2010) et la libération de cytokines pro-inflammatoires (F. Gillardon, Schmid, and Draheim 2012; N. Dzamko, Rowe, and Halliday 2016). Dernièrement, dans la microglie, l'équipe de Greggio a montré que la mutation pathologique G2019S diminue l'activité de PKA, ce qui entraîne une réduction de la signalisation inhibitrice de NF- κ B induite par PKA, entraînant alors une augmentation de l'inflammation dans des cultures primaires de cellules microgliales issues de souris *LRRK2* KI G2019S suite à un traitement avec des fibrilles d' α -synucléine pré-formées (Russo et al. 2018). En outre, les rats *LRRK2* KO sont partiellement protégés contre la neurodégénérescence induite par une surexpression d' α -synucléine ou après une injection de lipopolysaccharides (LPS), ce qui

suggère que l'inhibition de LRRK2 peut avoir un effet neuroprotecteur (Daher et al. 2014; Daher et al. 2015).

Toutefois, la réactivité immunitaire peut protéger contre des agents pathogènes. Il a été démontré que des souris LRRK2 KO sont plus susceptibles à des infections causées par les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* (W. Liu et al. 2017; Q. Zhang et al. 2015). De même l'inhibition pharmacologique de l'activité kinase de LRRK2 empêche de combattre l'infection par *S. typhimurium* de façon optimale. Alors que l'augmentation de l'activité kinase de LRRK2 par la ré-expression du mutant G2019S a un effet protecteur par phosphorylation de la protéine NLRC4 (« NLR family Card domain-containing protein 4 ») de l'inflammasome. Ce complexe favorise la production des cytokines inflammatoires interleukine-1 β . De même, les cellules microgliales issues de souris LRRK2 KI G2019S montrent une augmentation d'interleukine-1 β (Russo et al. 2018). De façon intéressante, cette cytokine est retrouvée augmentée dans le sérum de sujets asymptomatiques porteurs de la mutation G2019S (N. Dzamko, Rowe, and Halliday 2016). Cela suggère qu'une augmentation de l'inflammation peut mener à une neurodégénérescence comme dans le modèle de rats LRRK2 G2019S qui présentent des cellules microgliales réactives ainsi qu'une neurodégénérescence dopaminergique après une injection intracrânienne d'AAV exprimant l' α -synucléine dans la SN (Daher et al. 2015). Enfin, dans le cerveau de patients idiopathiques, les cellules microgliales présentent une augmentation de deux fois de l'activité de LRRK2, par mesure de la phosphorylation S1292, comparé à des sujets contrôles (Di Maio et al. 2018). De même, chez des rats traités avec de la roténone, les auteurs ont aussi observé une augmentation de l'activité de LRRK2 dans les cellules microgliales (Di Maio et al. 2018).

En conclusion, l'augmentation de l'activité kinase de LRRK2 peut être protectrice contre les infections de pathogènes opportunistes mais augmente le risque de développer une MP dans le temps, on parle de pléiotropie antagoniste (Alessi and Sammler 2018).

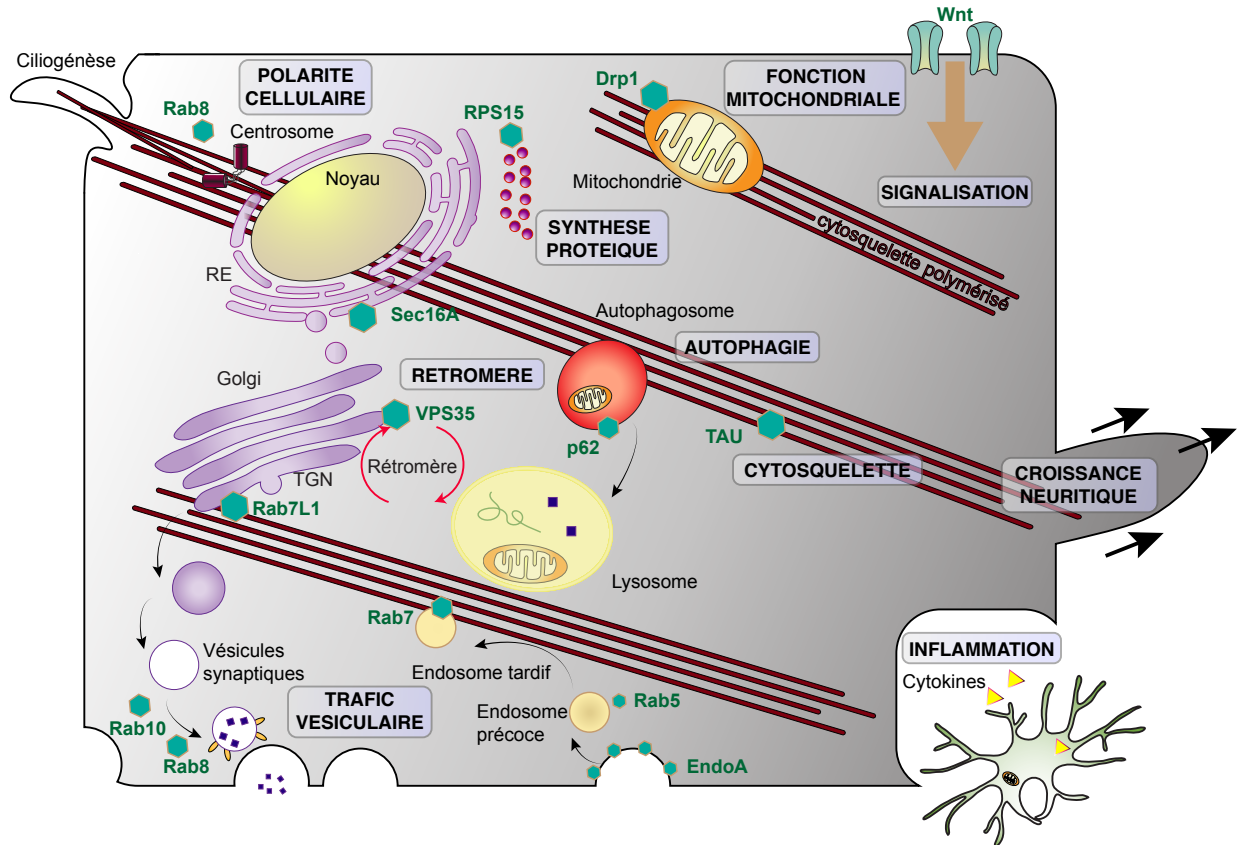


Figure 13 : Implication de LRRK2 dans une variété de processus cellulaires.

La protéine LRRK2 peut interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans une variété de fonctions cellulaires, reliant ainsi LRRK2 à plusieurs fonctions cellulaires clés : la fonction mitochondriale, la traduction, le trafic endomembranaire à des étapes distinctes (autophagie, endocytose, trafic via le rétromère et la sécrétion de vésicules), cascades de signalisation telles que la signalisation Wnt, les processus liés au cytosquelette (croissance neuritique ainsi que la polarité de la cellule) et dans la neuroinflammation. Adapté de Wallings *et al*, 2015; Cookson, 2016; Berwick & Harvey, 2013.

VI - Stratégies thérapeutiques ciblant LRRK2

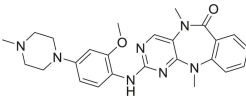
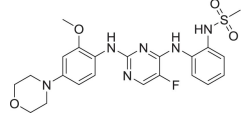
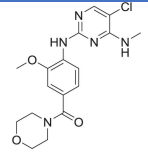
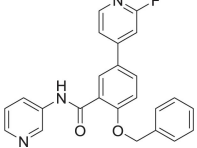
La présence de mécanismes pathologiques (trouble de la mitochondrie, trouble lysosomal, inflammation...) retrouvée à la fois chez les patients sporadiques et chez les patients porteurs de mutations dans le gène *LRRK2* on fait de la protéine LRRK2 une cible privilégiée de la MP. La modulation de l'activité enzymatique de LRRK2 (activités GTPase et kinase) est une approche prometteuse pour une intervention thérapeutique, visant à prévenir la toxicité neuronale et la progression de la maladie dépendante de LRRK2.

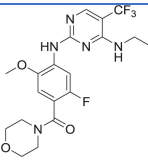
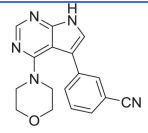
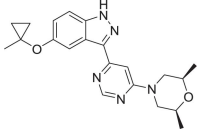
VI.A - Inhiber la fonction kinase

Le lien potentiel entre l'activité kinase de LRRK2 et les fonctions cellulaires (Greggio et al. 2006), associées au dysfonctionnement de LRRK2 dans la MP, en particulier l'observation d'une activité kinase accrue par certaines mutations, a incité le développement d'inhibiteurs ciblant cette activité enzymatique (Atashrazm and Dzamko 2016; Christensen, Smith, and Williamson 2017; West 2017). De plus, il a été récemment montré une augmentation de l'activité kinase de LRRK2 chez des patients parkinsoniens sporadiques (Di Maio et al. 2018). Enfin, l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 c'est avérée bénéfique dans plusieurs modèles cellulaires et *in vivo* (Cooper et al. 2012; Daher et al. 2015; Yao et al. 2013; B. D. Lee et al. 2010; Volpicelli-Daley et al. 2016; Zhihua Liu et al. 2011; Mendivil-Perez, Velez-Pardo, and Jimenez-Del-Rio 2016)

Depuis le premier inhibiteur LRKK2-IN1 (X. Deng et al. 2011), pas moins d'une centaine d'inhibiteurs ont été développés (J. Taymans and Greggio 2016). Ces inhibiteurs sont de plus en plus puissants, de plus en plus sélectifs (avec une IC₅₀ de l'ordre du nM) et ont la capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Liste des principaux inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2.

Composé	Structure	Activité <i>in vitro</i> LRRK2 IC ₅₀ (nM)		Activité <i>in cellulo</i> (S935 ou S1292) LRRK2 IC ₅₀ (nM)	Passage de la BHE	Off- target	Références
		WT	G2019S				
LRRK2-IN1		13	6	280	Non	12/442	(X. Deng et al. 2011)
CZC-25146		5	7	44	Faible	5/185	(Ramsden et al. 2011)
HG-10-102-01		20	3	650	Oui	2/451	(H. G. Choi et al. 2012)
GSK2578215A		11	9	992	Faible	2/451	(Reith et al. 2012)

GNE-7915		9	1	9*	Oui	2/451	(Estrada et al. 2012)
PF-06447475		3	11	25	Oui	3/349	(J. L. Henderson et al. 2015)
Mli-2		0,8	0,76	1,4	Oui	1/144	(Fell et al. 2015)

* : donnée obtenue sur le résidu S1292 du triple mutant (G2019S/R1441G/Y1699C) ; nM : nanomolaire ; BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Plusieurs rapports ont démontré des anomalies au niveau pulmonaire, rénale et hépatique chez des rats LRRK2 KO par rapport aux rats exprimant des niveaux physiologiques de LRRK2 (Baptista et al. 2013; Tong et al. 2012; Tong et al. 2010).

Fait intéressant, une première étude préclinique menée sur les effets de l'administration d'inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2 à des rongeurs (traitement de 5 jours) a montré que ceux-ci réduisaient globalement les taux de protéine LRRK2 (Herzig et al. 2011), suggérant que l'inhibition de la fonction kinase pouvait entraîner la perte de protéines LRRK2. Plus récemment, des études menées chez des rongeurs (Fell *et al*, 2015) et des primates non humains (Fuji *et al*, 2015), en administrant quotidiennement deux composés sélectifs, respectivement Mli-2 et GNE7915, ont confirmé la présence de corps lamellaires dans les cellules pulmonaires de type II, suggérant que les anomalies observées chez les animaux LRRK2 KO sont induites par une perte de la fonction kinase de LRRK2 (Baptista et al. 2013).

Il existe une corrélation entre l'inhibition de la fonction kinase et la diminution du taux de protéine LRRK2 même si cela n'a pas été rapporté dans toutes les études (Fuji et al. 2015; Daher et al. 2015; E. Lobbestael et al. 2016).

Cependant, une étude menée par le Dr. Marco Baptista en collaboration avec des compagnies pharmaceutiques a montré que tous les composés testés à des doses plus élevées induisaient la pathologie pulmonaire alors que les faibles doses étaient sans effet indésirable, confirmant que les effets sur les poumons étaient provoqués par l'inhibition de la fonction kinase de LRRK2. Fait important, les composés à faibles doses ont inhibé l'activité kinase de LRRK2 de plus de 80% dans le cerveau et les tissus périphériques (Baptista *et al*, 2015). De plus, une autre équipe a pu montrer

que le phénotype rénal observé après l'inhibition de LRRK2 était réversible 30 jours suivant la fin du traitement (Andersen et al. 2018).

Enfin, l'entreprise biopharmaceutique Denali a lancé les premiers essais cliniques avec le composé DNL201 (Clinicaltrials.gov, réf NCT03710707, <http://investors.denalitherapeutics.com/news-releases/news-release-details/denali-therapeutics-announces-positive-clinical-results-lrrk2#ir-pages>), un inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2. Ce composé a été testé chez des personnes volontaires et a démontré une déphosphorylation de plus de 50%. De plus, le composé a pu être mesuré dans le LCR indiquant son passage de la barrière hémato-encéphalique et par conséquent de son habilité à cibler le cerveau.

Comme mentionné dans le paragraphe ci-dessus, l'un des problèmes d'innocuité est le développement d'une pathologie pulmonaire chez les souris et les primates non humains, ce qui est très probablement lié aux niveaux fortement réduits de la protéine LRRK2 après l'inhibition de la fonction kinase. Il se peut alors que modifier le niveau de protéine totale de LRRK2 soit une thérapie appropriée pour la MP comme le suggère l'étude de Zhao et ses collaborateurs (J. Zhao et al. 2015).

VI.B - Cibler la fonction GTPase

L'inhibition de la liaison au GTP a été proposée comme une approche thérapeutique qui pourrait inverser les effets induits par les mutations situées au niveau des domaines ROC-COR. Une étude récente a mis au point les deux premiers inhibiteurs altérant la liaison du GTP à la protéine LRRK2 (composés 68 et 70) (T. Li et al. 2014). Ces deux composés diminuent la liaison du GTP avec la protéine LRRK2 WT ainsi que sur des mutants pathogéniques, avec une réduction concomitante de l'activité kinase *in vitro*. De plus, ces composés ont atténué la dégénérescence neuronale dans les cellules SH-SY5Y et les neurones primaires de souris, et le composé 68, qui a été testé *in vivo*, a permis de réduire à la fois la liaison du GTP et l'activité kinase de LRRK2 (T. Li et al. 2014). La même équipe, a développé un nouveau composé, FX2149 (T. Li et al. 2015) qui, comme le composé 68, inhibe la liaison du GTP et atténue les altérations du transport mitochondrial et lysosomal induites par le mutant R1441C dans les neurites des cellules SH-SY5Y (Thomas et al. 2016).

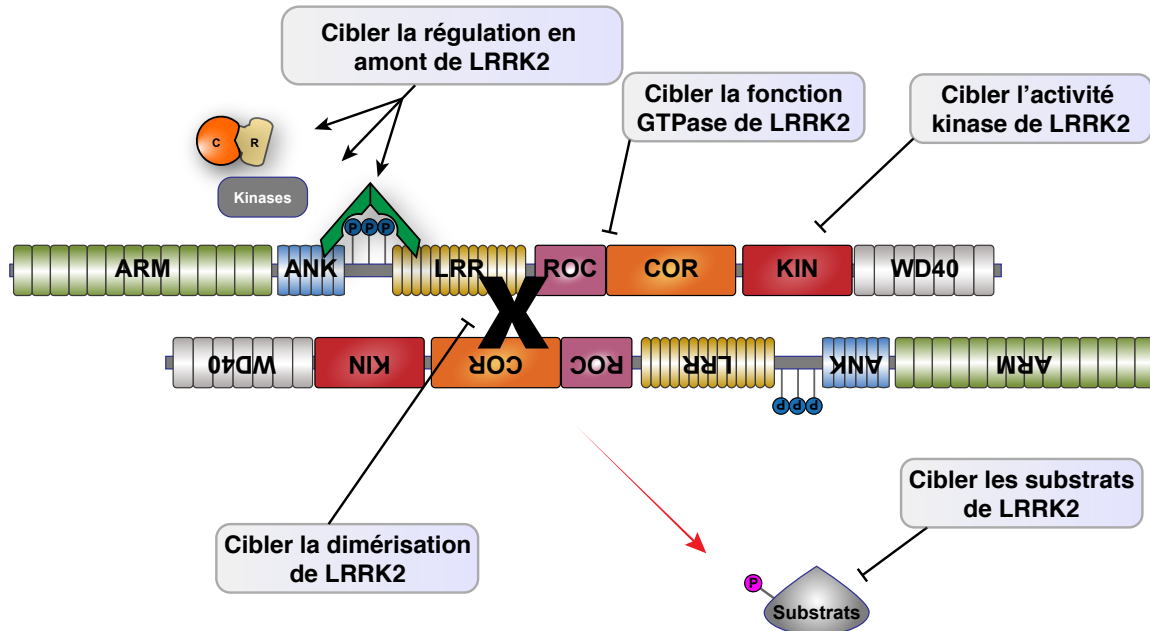


Figure 14 : Stratégies thérapeutiques potentielles pour cibler la protéine LRRK2.

L'inhibition de la fonction kinase est la stratégie la plus développée pour le moment. Par ailleurs, le développement de composé inhibant la liaison du GTP est de plus en plus étudié. D'autres stratégies peuvent être envisagées comme le ciblage de certaines voies de signalisation en aval de LRRK2, pour cela cibler directement les substrats de LRRK2 devient une approche intéressante. L'augmentation de l'activité kinase est corrélée avec la capacité de dimérisation de LRRK2, le développement de peptide inhibant cette dimérisation est une approche concevable. Finalement, le ciblage de la régulation en amont de LRRK2 est possible, par exemple en ciblant les interactions tels qu'avec la protéine 14-3-3, mais aussi de pouvoir cibler les protéines régulatrices telles que les kinases ou bien encore les phosphatases. Adapté de (Rudenko, Chia, and Cookson 2012; B. D. Lee, Dawson, and Dawson 2012; J. Taymans and Greggio 2016).

Des stratégies thérapeutiques alternatives au ciblage des fonctions kinase et GTPase ont été rapportées comme, bloquer ou interférer la dimérisation de LRRK2 (Civiero, Russo, et al. 2017), ou bien encore de cibler les substrats de LRRK2, les protéines Rab par exemple, en aval de LRRK2 afin de cibler de manière plus spécifiques les cascades de transduction du signal de LRRK2 (Rudenko, Chia, and Cookson 2012; J. Taymans and Greggio 2016) (**Figure 14**). Il est aussi envisageable de cibler les protéines liées à la régulation en amont de LRRK2 telles que les protéines 14-3-3 ou bien encore les protéines kinases et phosphatases régulant les sites de phosphorylation S910/S935/S955/S973 (Purlyte et al. 2018; Mir et al. 2018; Lavalley et al. 2016; Evy Lobbestael et al. 2013; Athanasopoulos et al. 2016; Civiero, Cogo, et al. 2017).

Chapitre 3 : Les Protéine Phosphatases

Des études phosphoprotéomiques ont suggéré que plus de 70% de toutes les protéines cellulaires eucaryotes sont régulées par la phosphorylation (Olsen et al. 2010). L'état de phosphorylation lui-même, est méticuleusement contrôlé par l'action des kinases et des phosphatases sur les résidus Ser/Thr ou tyrosine (Tyr). La phosphorylation constitue la base des réseaux de signalisation cellulaire (Hunter 2000; Hunter 1995). Par conséquent, l'état de phosphorylation de nombreuses protéines contrôle leur devenir moléculaire et une phosphorylation protéique anormale peut contribuer à de nombreuses conditions pathologiques (Arribas et al. 2018; M. Zhang et al. 2013). Le génome humain comprend environ 518 protéines kinases classées comme des Tyr kinases ou des Ser/Thr kinases (Manning et al. 2002; Johnson and Hunter 2005). Alors que le nombre de Tyr phosphatases est approximativement le même que celui des Tyr kinases, le nombre de Ser/Thr phosphatases (PSP) est beaucoup plus faible que le nombre de Ser/Thr kinases (**Figure 15**). Cependant, le faible nombre de phosphatases est contrebalancé par le grand nombre de régulateurs responsables notamment de la spécificité du substrat, de la localisation subcellulaire et/ou de l'activité de la sous-unité catalytique (P. T. Cohen 1997; Honkanen and Golden 2002; Mathieu Bollen et al. 2010).

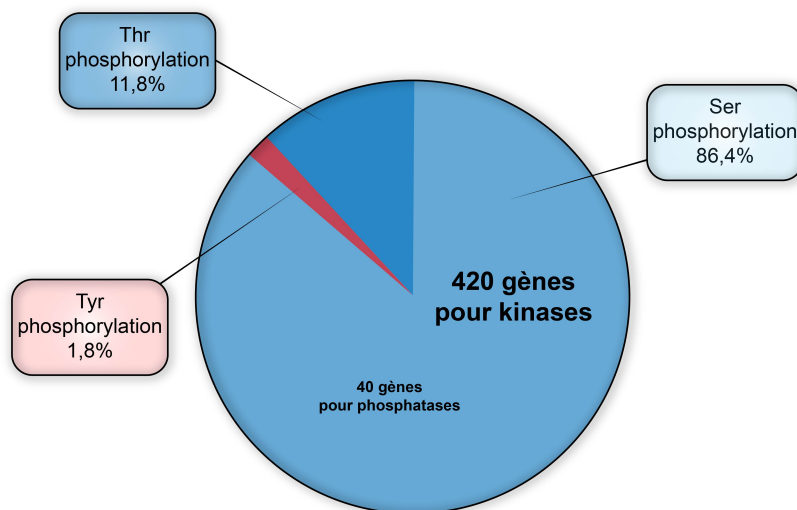


Figure 15 : Part en pourcentage de protéines phosphorylées au niveau des résidus Ser, Thr et Tyr.

Les phosphorylations sur les résidus Ser et Thr représentent 98% de tous les événements de phosphorylation (Olsen et al. 2006). Plus de 420 gènes codant pour des Ser/Thr kinases sont nécessaires pour réaliser ces réactions alors que pour les Ser/Thr phosphatases (PSP) seulement 40 gènes sont requis pour ce même pourcentage de réactions (Peti, Nairn, and Page 2013).

I - Généralités

Les phosphatases sont classées en 3 groupes selon leurs caractéristiques biochimiques. Ainsi, on distingue, les protéine Ser/Thr phosphatases (PSPs) et les protéine Tyr phosphatases (PTPs) qui constituent les deux plus grands groupes (**Figure 16**). A noter que dans le groupe des PTPs, il existe des phosphatases à double spécificité (DSP) pouvant déphosphoryler les résidus Ser et Thr ainsi que Tyr (Patterson et al. 2009).

Les PSPs sont un groupe très diversifié et sont en outre classées en trois familles selon leur exigence pour les métaux, leur spécificité de substrat et leur sensibilité aux inhibiteurs : les phosphoprotéine phosphatases (PPP), les protéine phosphatases dépendante d'un métal (PPM) et les phosphatases à base d'aspartate (**Figure 16**).

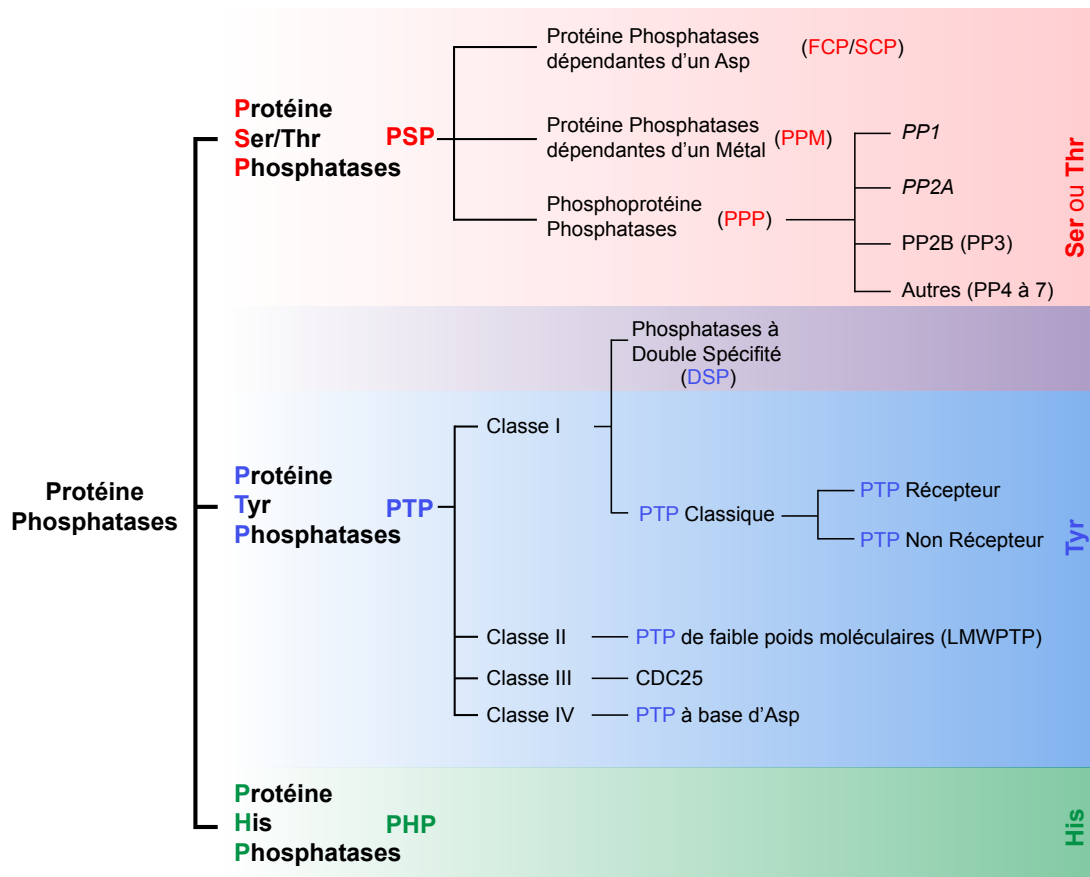


Figure 16 : Classification des protéine phosphatases humaines.

Les phosphatases sont classées dans trois grands groupes eux-mêmes subdivisés en sous-groupes selon des critères biochimiques.

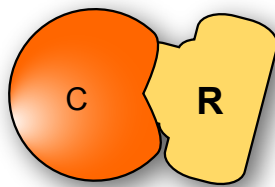
Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux phosphatases présentes dans la famille des PSPs à savoir les protéine phosphatases PP1 et PP2A. PP1 et PP2A correspondent à des holoenzymes qui sont deux des enzymes les plus abondantes dans de nombreux types cellulaires et ensemble, elles sont responsables de plus de 90% de l'activité des protéine phosphatases dans les cellules eucaryotes (Moorhead, Trinkle-Mulcahy, and Ulke-Lemée 2007; Virshup and Shenolikar 2009).

II - Les protéine phosphatases de type 1

Les protéines PP1 sont exprimées de manière ubiquitaires dans les cellules eucaryotes et catalysent une fraction importante des réactions de déphosphorylation de la phosphosérine/thréonine (Ceulemans and Bollen 2004). On estime qu'environ un tiers de toutes les protéines eucaryotes sont déphosphorylées par PP1 (Heroes et al. 2013; Mathieu Bollen et al. 2010). Chaque enzyme PP1 fonctionnelle existe sous la forme d'une holoenzyme composée d'une sous-unité catalytique (PPP1C) et d'une sous-unité régulatrice (généralement appelée protéine d'interaction PPP1R ou PIP pour « PP1 binding proteins ») (**Figure 17**). En rapport avec ses innombrables fonctions, les nombreuses formes de PP1 possèdent collectivement un large spectre de substrats. Cependant chaque holoenzyme PP1 formée présente des spécificités de substrat, des localisations subcellulaires et des activités catalytiques distinctes suscitant des réponses biologiques spécifiques (Terrak et al. 2004).

C : Sous-unité Catalytique

PPP1CA
PPP1CB
PPP1CC



Sous-unité Régulatrice

> 200 différentes

Figure 17 : Représentation schématique de l'holoenzyme PP1.

PP1 est composée d'une sous-unité catalytique très conservée qui est associée à des sous-unités régulatrices qui déterminent l'activité. A ce jour plus de 200 protéines régulatrices existeraient.

II.A - La sous-unité catalytique de PP1

La sous-unité catalytique de PP1 est hautement conservée parmi tous les eucaryotes, avec une identité de séquence protéique d'environ 70% ou plus (Gibbons et al. 2007). Chez les mammifères, la sous-unité catalytique PPP1C est codée par trois gènes distincts (PPP1CA, PPP1CB et PPP1CC) qui possèdent des fonctions subcellulaires distinctes. Une diversification supplémentaire des isoformes de PP1 est obtenue par un épissage alternatif de PPP1CA (PP1 α 1-3) et de PPP1CC (PP1 γ 1/2). PPP1CC2 est la seule PP1 à posséder une expression tissu-spécifique (cerveau et testicule), alors que toutes les autres isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire (Korrodi-Gregório, Esteves, and Fardilha 2014; Ceulemans and Bollen 2004; S. Strack et al. 1999). De plus, ces isoformes présentent une très forte homologie de séquence, démontrant une identité supérieure à 90%, les principales différences étant présentes aux extrémités N- et C-ter (Ceulemans and Bollen 2004).

II.B - Les sous-unités régulatrices de PP1

La spécificité du substrat et le ciblage subcellulaire de la sous-unité PPP1C sont dictés par son association avec plus de 200 protéines régulatrices (R) (Mathieu Bollen et al. 2010; Fardilha et al. 2010; Heroes et al. 2013). Certaines sont exprimées de manière ubiquitaires (inhibiteur-2), d'autres présentent une expression plus restreinte (la spinophiline dans les neurones) ou sont exprimées dans certaines conditions (Ki67 dans les cellules en prolifération). Ces sous-unités présentent très peu d'homologie les unes avec les autres, mais la plupart possèdent un motif de liaison commun à PPP1C. En effet, PPP1C interagit avec ses sous-unités R via un motif consensus RVxF (où x est un résidu quelconque), qui interagit à distance du site catalytique (Egloff et al. 1997). Ce motif est partagé par 70% de tous les sous-unités R connues (Verbinnen, Ferreira, and Bollen 2017). La liaison de ce motif n'entraîne pas d'effets majeurs sur la conformation de PP1 (Peti, Nairn, and Page 2013; Egloff et al. 1997; Mathieu Bollen et al. 2010). Cependant, cet événement de liaison est essentiel car il rapproche PP1 de ses sous-unités R et favorise les interactions secondaires contribuant à la sélection des isoformes PP1 et détermine l'activité et la spécificité de l'holoenzyme (M Bollen 2001; Mathieu Bollen et al. 2010). D'autres motifs sont plus restreints, tels que le motif KiR-SLiM récemment découvert. Il ne se trouve que dans les protéines nucléaires RepoMan et Ki67 (Heroes et al. 2013; Kumar et al. 2016).

L'interaction de la sous-unité catalytique de PP1 avec sa sous-unité R déterminent la localisation subcellulaire et la spécificité du substrat de l'holoenzyme. Ainsi, les interactions entre la sous-unité catalytique et les sous-unités R spécifiques sont essentielles aux fonctions de PP1 (**Figure 18**). Les protéines de liaison de PP1 (PIP) ou sous-unités R, peuvent être regroupées en trois catégories fonctionnelles : (i) les sous-unités dirigeant l'holoenzyme vers son substrat, (ii) les sous-unités qui sont des substrats et (iii) les sous-unités qui vont inhiber l'activité catalytique (inhibiteurs) (Mathieu Bollen et al. 2010; Rebelo et al. 2015; Fardilha et al. 2010). Ces dernières incluent l'inhibiteur-1 (I-1) et son homologue DARPP-32 (« Dopamine and cAMP-Regulated PhosphoProtein of 32 kDa ») (H. C. Hemmings, Nairn, et al. 1984; Walaas and Greengard 1984; H. C. Hemmings, Greengard, et al. 1984).

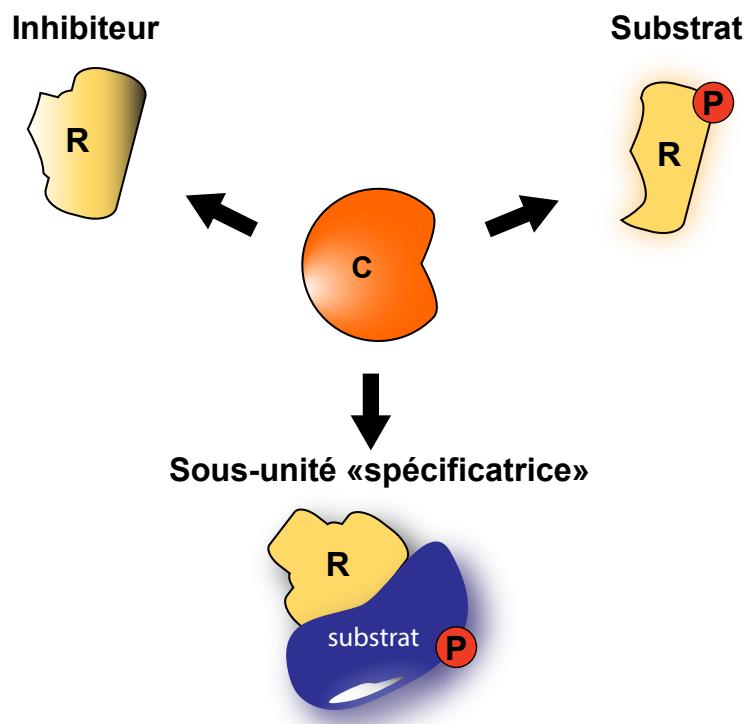


Figure 18 : Les différents types de protéines régulatrices de PP1.

Les sous-unités régulatrices, peuvent être soit un substrat, un inhibiteur de l'activité catalytique ou une sous-unité qui va diriger la sous-unité catalytique à son substrat, on parle alors de sous-unité dite « spécifique ».

Compte tenu du nombre de protéines phosphatases et de substrats phosphoprotéiques codés dans le génome humain, un grand nombre de protéines R de PP1 restent à découvrir.

III - La Protéine Phosphatase de type 2A

PP2A est une des enzymes les plus abondantes, elle représente jusqu'à 1% des protéines cellulaires totales dans certains tissus et organes, elle est notamment fortement exprimée dans le cerveau (Shi 2009; P. T. Cohen 1997; Ruediger et al. 1991; Y. Xu et al. 2008). De plus, PP2A joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires importantes telles que la croissance neuronale, la mobilité cellulaire, la dynamique du cytosquelette, le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de nombreuses voies de signalisation (V Janssens and Goris 2001).

III.A - Structure et composition de la PP2A

PP2A est un complexe qui peut exister sous deux formes différentes à savoir la forme hétérodimérique, dans un tiers des cas (Kremmer et al. 1997; Goldberg 1999) et la forme hétérotrimérique qui est majoritaire dans la cellule. La forme hétérodimérique, aussi appelée l'enzyme « core » se compose d'une sous-unité catalytique (sous-unité C) complexée à une sous-unité structurale (sous-unité A), qui permet la bonne conformation de l'enzyme. La forme hétérotrimérique ou holoenzyme, est constituée du « core » et d'une sous-unité régulatrice (sous-unité B) (Mayer-Jaekel and Hemmings 1994; Zolnierowicz 2000) (**Figure 19**).

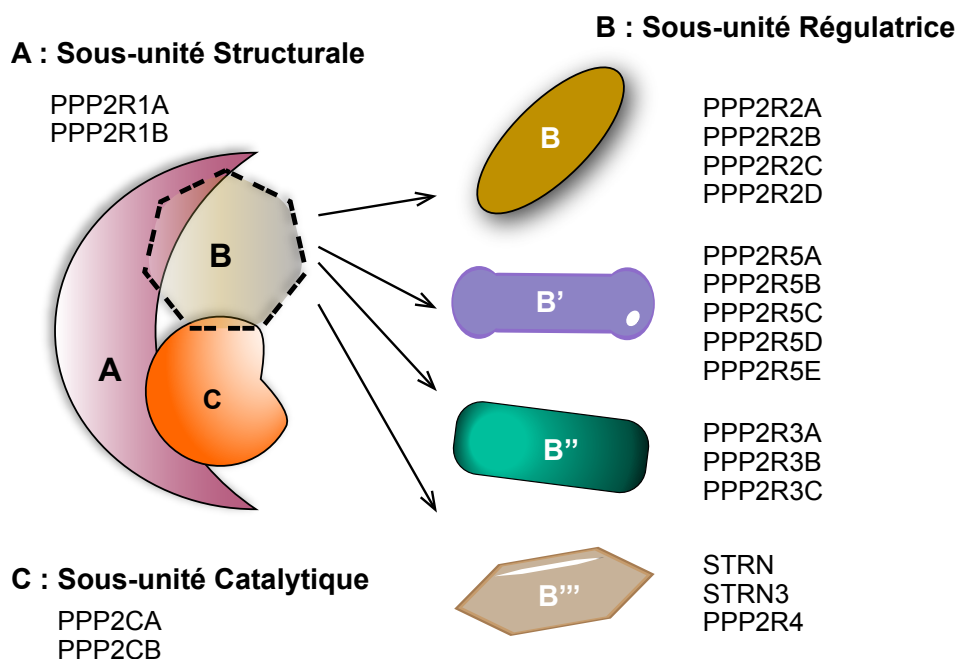


Figure 19 : Structure de l'holoenzyme PP2A.

La majorité des holoenzymes PP2A ont une structure hétérotrimérique et se composent d'une sous-unité catalytique C, d'une sous-unité structurale A formant l'enzyme « core » qui s'associe avec une sous-unité régulatrice B. Les sous-unités A et C sont codés chacun par 2 gènes distincts. La sous-unité B est répartie en 4 familles non apparentées (B, B', B'' et B''') et elle est responsable de la spécificité du substrat et/ou de la localisation subcellulaire.

III.B - La sous-unité catalytique C

La sous-unité catalytique possède deux isoformes, PPP2CA et PPP2CB (respectivement α et β) qui possèdent une homologie de séquence de 97% (Stone, Hofsteenge, and Hemmings 1987). Elles sont présentes de façon ubiquitaires avec une expression plus forte dans le cœur et le cerveau (**Tableau 5**). Cependant, PPP2CA est environ 10 fois plus abondante que PPP2CB y compris dans le cerveau en raison d'un promoteur plus fort et d'un taux de renouvellement de son ARNm plus élevé (Khew-Goodall et al. 1991). Il a été rapporté que PPP2CA est nécessaire pour le développement embryonnaire. En effet, les souris KO PPP2CA ne sont pas viables et meurent dans les premiers jours du développement embryonnaire (entre 5 et 6 jours de développement) (Götz et al. 1998), indiquant que PPP2CB ne peut pas compenser l'absence de PPP2CA. De plus, le niveau d'expression de la protéine PPP2CA est régulé de manière précise au niveau traductionnel pour maintenir un taux constant de la protéine dans les cellules (Baharians and Schonthal 1998).

III.C - La sous-unité structurale A

Comme pour la sous-unité catalytique, la sous-unité structurale A (PR65) existe sous deux isoformes, nommées PPP2R1A et PPP2R1B qui partagent une homologie de séquence de 87%. De plus, les deux isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire (**Tableau 5**) (B. A. Hemmings et al. 1990). Malgré leur similitude, environ 90% des holoenzymes PP2A contiennent l'isoforme PPP2R1A, les holoenzymes contenant l'isoforme PPP2R1B ne représentant que 10% (Hendrix et al. 1993). Ceci suggère qu'il existe des fonctions ou propriétés biochimiques différentes et ceci est illustré par le fait que PPP2R1B est incapable de remplacer la perte de PPP2R1A chez la souris. De plus, PPP2R1B est exprimé à des niveaux beaucoup plus faibles que PPP2R1A dans les tissus adultes. Cependant, dans les ovocytes de Xénope, et au début du développement des vertébrés, l'ARNm de PPP2R1B est plus abondant que l'ARNm de PPP2R1A (Bosch et al. 1995; Hendrix et al. 1993). PPP2R1A et PPP2R1B sont détectées principalement dans le cytoplasme mais différent par leur capacité à se lier aux sous-unités régulatrices B (J. Zhou et al. 2003).

La sous-unité A agit différemment selon qu'elle est liée seulement à la sous-unité C (enzyme « core ») ou si elle est liée aussi à la sous-unité B, formant alors l'holoenzyme. Sous forme d'holoenzyme, elle fournit une base structurelle flexible pour la liaison d'autres composants de l'holoenzyme PP2A et guide la sous-unité C pour interagir avec différentes sous-unités B tandis que sous forme d'enzyme « core », elle agit comme régulateur catalytique de la sous-unité C (U. S. Cho and Xu 2007). Cette diversité est facilitée par les changements de conformation induits dans la sous-unité A lors de la liaison d'une sous-unité C et d'une sous-unité B aux séquences HEAT (« Huntingtin, Elongation factor 3 (EF3), PR65/A, and TOR1 ») (B. A. Hemmings et al. 1990). Enfin, la sous-unité A, ayant une conformation souple, subit une flexion comme un fer à cheval pour recruter la sous-unité régulatrice B et les substrats de PP2A (U. S. Cho and Xu 2007; Y. Xu et al. 2006). Fondamentalement, la sous-unité A fournit une base structurelle où les sous-unités catalytiques et régulatrices interagissent les unes avec les autres et catalysent les réactions enzymatiques.

III.D - Les sous-unités régulatrices B

Deux caractéristiques frappantes des sous-unités B sont leur diversité, découlant de l'existence de quatre familles distinctes (**Tableau 5**) et de l'absence totale de similitude de séquence entre ces familles de gènes (Eichhorn, Creighton, and Bernards 2009; Sents et al. 2013), même si elles reconnaissent des segments similaires de la sous-unité A (Xinghai Li and Virshup 2002). La sous-unité B ayant plusieurs sous-types et isoformes est considérée comme la sous-unité la plus diversifiée et le régulateur principal de PP2A. En effet, lorsque le « core » dimère de l'enzyme interagit avec la sous-unité régulatrice B, cette-dernière donne une spécificité de localisation subcellulaire et de substrat à l'holoenzyme hétérotrimérique alors formée (**Figure 19**) (Y. Xu et al. 2006; V Janssens and Goris 2001; Virshup and Shenolikar 2009).

Il existe quatre classes différentes de sous-unités : (i) B (B55/PPP2R2), (ii) B' (B56/PPP2R5), (iii) B'' (PPP2R3) et (iv) B''' (STRIATINS/PPP2R4), et chaque famille a diverses isoformes (Veerle Janssens, Longin, and Goris 2008; Mayer-Jaekel and Hemmings 1994; V Janssens and Goris 2001). Tous les sous-types et leurs isoformes sont exprimés et localisés différemment en fonction du tissu et du type cellulaire (**Tableau 5**). Ensemble, la grande diversité de la composition des holoenzymes PP2A, plus d'une centaine de combinaisons (Veerle Janssens, Longin, and Goris 2008), crée donc

une spécificité et constitue la base des multiples fonctions physiologiques de PP2A (Nematullah, Hoda, and Khan 2018; Kiely and Kiely 2015; Baskaran and Velmurugan 2018).

Tableau 5 : Les sous-unités de PP2A : leur nomenclature, localisation et expression dans divers tissus.

Sous-unité	Isoforme	Gène	Autre Nom	Distribution tissulaire	Localisation subcellulaire
Structurale A	α	PPP2R1A	PR65 α , PP2A- α	Ubiquitaire	Cytosol
	β	PPP2R1B	PR65 β , PP2A- β	Ubiquitaire, ovaire (F)	Cytosol
Catalytique C	α	PPP2CA	PP2AC α	Ubiquitaire ; Cœur et cerveau (F)	Cytoplasme et noyau
	β	PPP2CB	PP2A β	Ubiquitaire ; Cœur et cerveau (F)	Cytoplasme et noyau
Regulatrice B (PPP2R2/B55)	α	PPP2R2A	PR55 α , PP2AB α	Ubiquitaire	Cytoplasme, RE, membranes, Golgi, microtubules, neurofilaments
	β	PPP2R2B	PR55 β , PP2AB β	Cerveau, testicule (F)	Cytosol
	γ	PPP2R2C	PR55 γ , PP2AB γ	Cerveau (S)	Cytosquelette
	δ	PPP2R2D	PR55 δ , PP2AB δ	Ubiquitaire, testicule (F)	Cytosol
Regulatrice B' (PPP2R5/B56)	α	PPP2R5A	PR56/61 α	Tissus cardiaque et muscles squelettiques (F)	Cytoplasme
	β	PPP2R5B	PR56/61 β	Cerveau (F)	Cytoplasme
	γ	PPP2R5C	PR56/61 γ	Tissus cardiaque et muscles squelettiques (F)	Cytoplasme et noyau
	δ	PPP2R5D	PR56/61 δ	Principalement dans le cerveau	Cytoplasme, mitochondrie, microsomes et noyau
	ϵ	PPP2R5E	PR56/61 ϵ	Principalement dans le cerveau	Cytoplasme
Regulatrice B'' (PPP2R3)	α	PPP2R3A	PR130	Cerveau (F), Cœur, poumon, rein et muscle	Centrosome et Golgi
	α	PPP2R3A	PR72	Cœur (F) et muscle squelettique	Cytosol et noyau
	β	PPP2R3B	PR70, PR48	Placenta	Noyau
	γ	PPP2R3C	G5PR	Cerveau fœtus (durant le développement)	Noyau
	δ	PPP2R3D	PR59	Tissus cardiaques, rein et poumon	Noyau
Regulatrice B'''		STRN	Striatin, PR110	Cerveau	Cytoplasme et membrane
		STRN3	SG2NA	Neurones	Noyau
		PPP2R4	PTPA, PR53	Ubiquitaire	Cytosol et noyau

Note : F : Forte expression ; S : Spécifique (Seshacharyulu et al. 2013; Nematullah, Hoda, and Khan 2018)

III.E - Régulation de PP2A

Comme décrit précédemment, PP2A est une holoenzyme composée de trois sous-unités différentes, mise à part la diversité des sous-unités B, elle est spécifiquement régulée par des modifications post-traductionnelle et par l'action de petits inhibiteurs endogènes.

III.E.1 - Composition de l'holoenzyme

L'holoenzyme PP2A est un complexe composé de trois sous-unités différentes A, C et B générant potentiellement un très grand nombre de combinaisons différentes (**Figure 19**). La composition des holoenzymes, et plus particulièrement les sous-unités B, est un moyen de réguler l'activité de l'holoenzyme de façon spatio-temporelle. En effet, de par leur propre localisation, elles vont adresser l'holoenzyme dans des compartiments cellulaires, des tissus et des types cellulaires différents et à des stades différents (Stefan Strack et al. 1998; V Janssens and Goris 2001). Aussi, elles vont permettre une spécificité de substrat via une bonne adaptation structurelle du complexe sur le substrat.

III.E.2 - Les modifications post-traductionnelles

PP2A peut subir deux types de modifications post-traductionnelles. La sous-unité C peut-être phosphorylée ou méthylée, régulant directement son activité mais également la composition de l'holoenzyme (**Figure 20**). La phosphorylation de la sous-unité C sur le résidu Y307 (J. Chen, Martin, and Brautigan 1992) inhibe l'interaction avec la sous-unité B55 (PPP2R2.), ce qui entraîne une inactivation de l'activité de l'holoenzyme PP2A (Longin et al. 2007; Ogris, Gibson, and Pallas 1997). Tout comme la phosphorylation en Y307, une phosphorylation sur le résidu T304 peut également intervenir dans l'inhibition du recrutement de sous-unité B55 (Veerle Janssens, Longin, and Goris 2008). De plus, les sous-unités B peuvent aussi être phosphorylées, par exemple, PPP2R3D est phosphorylée par la PKA modifiant la spécificité du substrat de l'holoenzyme (Usui et al. 1998). De même la phosphorylation de la sous-unité B peut entraîner une augmentation de l'activité de l'holoenzyme (Z. Xu and Williams 2000).

D'autre part, la méthylation participe à la régulation de la composition de l'holoenzyme (Bryant, Westphal, and Wadzinski 1999; Tolstykh et al. 2000; Wu et al. 2000). Le résidu L309 de la sous-unité C, peut-être méthylé de façon réversible. Ainsi, la méthylation de PP2A est critique pour son

activité sélective envers différents substrats. Le statut de méthylation de PP2A est régi par les activités opposées de deux enzymes, la Leucine Carboxyl Méthyltransférase 1 (LCMT-1) et la Phosphatase MethylEsterase 1 (PME-1) (Leulliot et al. 2004; Longin et al. 2007). Dans les maladie neurodégénératives, la dérégulation de la méthylation serait à l'origine d'une hyperphosphorylation des protéines Tau (Sontag et al. 2004) et α -synucléine (H.-J. Park et al. 2016).

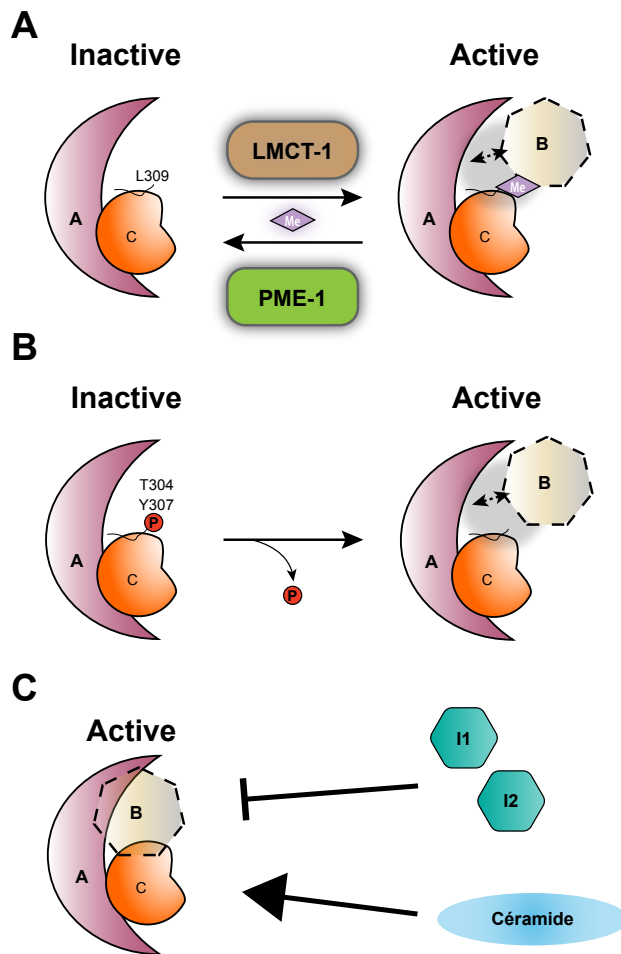


Figure 20 : Régulation de PP2A.

(A) La sous-unité C peut être méthylée sur le résidu L309. Cette méthylation est réversible et opérée par deux enzymes distinctes, LCMT-1 et PME-1. Une fois méthylée, une sous-unité B peut venir s'associer à l'enzyme « core » (sous-unités A+C). (B) La sous-unité C peut également être phosphorylée sur deux résidus, T304 et Y307, ces phosphorylations empêchent toute association avec une sous-unité B. (C) Dans sa forme active, l'holoenzyme peut être inhibée par deux protéines différentes nommées I1^{PP2A} et I2^{PP2A} alors qu'elle peut être activée par des céramides.

III.E.3 - Autres régulateurs

Enfin mis à part les sous-unités régulatrices de type B, un certain nombre de protéines peuvent réguler l'activité de PP2A (**Figure 20C**). Il existe deux peptides endogènes inhibant PP2A, I1^{PP2A} et I2^{PP2A} qui se fixent directement sur l'extrémité N-ter de la sous-unité C (M. Li and Damuni 1998). Au contraire, les céramides sont des activateurs de PP2A (Dobrowsky et al. 1993; Chalfant et al. 1999; Oaks and Ogretmen 2014).

L'émergence croissante des connaissances sur les phosphatases et particulièrement sur la formation d'holoenzyme ciblant spécifiquement un substrat ouvrent la possibilité de cibler sélectivement ces complexes (McConnell and Wadzinski 2009). Des études plus approfondies sur la régulation et la fonction des complexes macromoléculaires de phosphatase jetteront les bases pour le développement de molécules spécifiques de ces complexes, qui pourraient s'avérer être des agents thérapeutiques.

Chapitre 4 : Technologie CRISPR-Cas

L'expression génique est un processus en plusieurs étapes qui implique un contrôle coordonné de la transcription, de la traduction et du renouvellement des ARN messagers (ARNm) et des protéines (Crick 1970). La régulation précise du processus par lequel l'ADN devient ARN au niveau transcriptionnel ou épigénétique est la première étape pour contrôler complètement ce processus sophistiqué. Le développement de méthodes permettant de contrôler avec précision l'expression des gènes contribue à notre compréhension de la physiologie cellulaire, essentielle à la fois pour la recherche biologique fondamentale et pour l'avancement dans le domaine médical (Charpentier 2015). Une façon d'explorer la fonction des gènes est de perturber leur fonctionnement. Pour cela, une stratégie consiste à utiliser des méthodes d'ingénierie du génome qui suppriment ou modifient de manière permanente l'ADN en utilisant des endonucléases qui coupent à un certain endroit choisi, telles que des nucléases à doigts de Zinc (ZFNs), TALENs (« Transcription Activator-Like Effector Nucleases ») ou CRISPR-Cas9 (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated genes ») (Gaj, Gersbach, and Barbas 2013; Sander and Joung 2014). C'est avec cette dernière que nous avons décidé de travailler afin de moduler l'expression de protéines cibles (Du and Qi 2016a).

I - Généralités

Le système CRISPR-Cas9 est à l'origine un mécanisme de défense bactérien contre l'infection des phages et le transfert de plasmides dans la nature (Barrangou et al. 2007). Plusieurs types de systèmes CRISPR existent, dont le système nucléase CRISPR-Cas 9 de type II est le plus simple (Makarova et al. 2015). En effet, bien que certains systèmes CRISPR-Cas nécessitent de multiples protéines pour fonctionner (Brouns et al. 2008), les systèmes de type II présents dans de nombreuses bactéries (Barrangou et al. 2007; Deltcheva et al. 2011; Garneau et al. 2010) utilisent une seule endonucléase, la protéine Cas9. Cette enzyme agit conjointement avec l'ARN guide (sgARN : « single guide ARN ») pour localiser et cliver l'ADN sur des sites délimités par des séquences conservées appelées motifs adjacents proto-espaces (PAM) (Jinek et al. 2012; Sapranaukas et al. 2011). Pour former un complexe fonctionnel de ciblage de l'ADN, la Cas9 nécessite deux transcrits d'ARN distincts, un ARN CRISPR (crARN) qui va reconnaître de manière spécifique une séquence de 20 pb complémentaire du génome, et un « trans activating crRNA »

(tracrARN). Cependant, en 2012, pour simplifier cet ARN double, celui-ci a été reconfiguré en un seul ARN guide à partir de la fusion du tracrARN et du crARN (Jinek et al. 2012). Cette séquence comprenant 20 nucléotides complémentaires à la séquence cible est suffisante pour diriger la protéine Cas9. La Cas9 clive en double-brin l'ADN cible grâce aux domaines nucléases HNH et RuvC (H. Chen, Choi, and Bailey 2014) (**Figure 21**), en aval de la séquence PAM (5'-NGG) (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013). Un des avantages majeurs du sgARN est sa synthèse car une seule séquence est plus simple à produire et à utiliser en laboratoire. De plus, son efficacité est souvent très bonne, même si certains mésappariements sont tolérés dans la reconnaissance de la séquence cible, ce qui augmenteraient les effets « off-target » et donc diminueraient la spécificité du système (Fu et al. 2013).

Comme le montrent de nombreuses publications, le système Cas9 guidé par un sgARN peut fonctionner dans une variété de cellules et d'organismes pour cliver des génomes intacts sur des sites spécifiques (Cong et al. 2013; Y. Chen et al. 2015; Mali, Yang, et al. 2013; Hwang et al. 2013). La coupure double brin est réparée par recombinaison non homologue (NHEJ) et conduit ainsi à l'insertion ou à la délétion de nucléotides. Cependant, en présence d'une séquence ADN donneuse, la coupure est réparée de manière contrôlée par recombinaison homologue (HDR). Le but de cette intervention est soit d'inactiver la fonction du gène, soit de la restaurer, soit de la modifier (**Figure 21**). Dans le domaine de la thérapie par exemple, il s'agit d'inactiver un gène délétère ou de réparer un gène déficient (LaFontaine, Fathe, and Smyth 2015; Xiao-Jie et al. 2015; Doudna and Charpentier 2014). En effet, ce système a été utilisé et adapté pour permettre l'édition du génome (**Figure 21A**).

Depuis sa découverte, le système CRISPR-Cas9 n'a cessé d'évoluer, des chercheurs ont modifié la protéine Cas9 en introduisant des mutations dans un ou les deux domaines nucléases HNH et RuvC, on parle respectivement de Cas9 nickase (Mali, Aach, et al. 2013) et dCas9 (« dead Cas9 ») (Qi et al. 2013). Cette approche d'ingénierie de la Cas9 offre des possibilités passionnantes et des nouvelles fonctions (H. Wang, La Russa, and Qi 2016; Hsu, Lander, and Zhang 2014; Dominguez, Lim, and Qi 2016) telles que la perturbation transcriptionnelle (Gilbert et al. 2013), la modulation épigénétique (Kearns et al. 2015) et l'imagerie génomique (B. Chen et al. 2013) (**Figure 21B**).

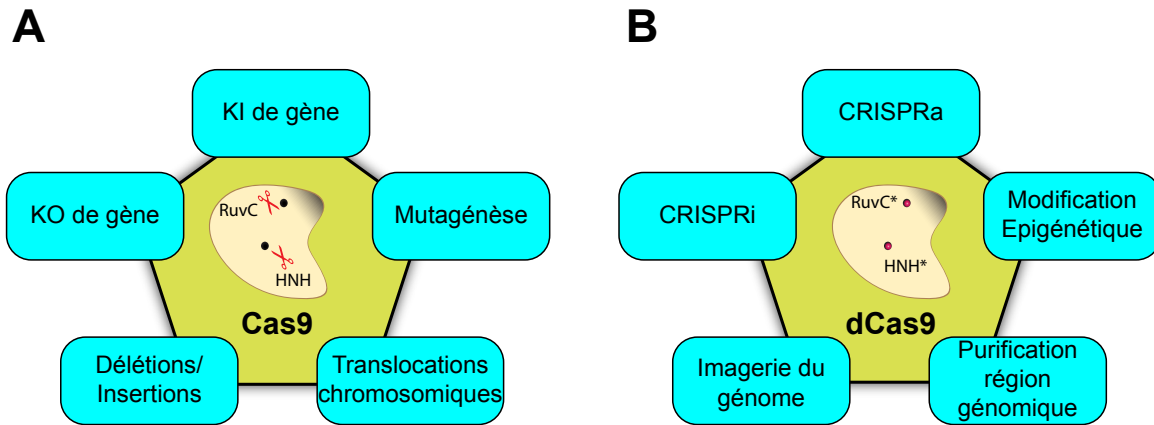


Figure 21 : Résumé des applications de la technologie CRISPR-Cas9 / dCas9.

(A) La Cas9 est utilisée dans des applications d'ingénierie ciblées du génome par clivage de l'ADN en double brin. Le clivage de l'ADN est assuré par les deux domaines nucléases, HNH et RuvC qui sont indiqués par des ronds noirs. (B) Alors que la dCas9 (« dead Cas9 »), rendue inactive par l'introduction de deux mutations dans les deux domaines nucléases représentées par des ronds rouges, permet par exemple de réguler l'expression de gènes ou de marquer des locus chromosomiques spécifiques dans des cellules ou des organismes vivants. Adapté de Lo & Qi, 2017.

II - Système CRISPRi et CRISPRa

Outre l'utilisation de la nucléase Cas9 pour l'édition du génome, le système CRISPR-Cas9 peut être utilisé comme outil de modulation transcriptionnelle par l'activation ou la répression de la transcription de gènes (Heckl and Charpentier 2015). La protéine dCas9 dépourvue de son activité nucléase par l'insertion de mutations est incapable de cliver l'ADN mais conserve tout de même la capacité d'être recrutée spécifiquement à l'ADN lorsqu'elle est guidée par un sgARN adjacent à un motif PAM. Ce processus est nommé CRISPRi pour CRISPR interférence ou CRISPRa pour CRISPR activation (Du and Qi 2016a) (**Figure 22**).

La protéine dCas9 seule peut réduire efficacement l'expression de gènes chez les bactéries, une répression allant jusqu'à 99,9% a été obtenue (Qi et al. 2013). Cependant, la répression dans les cellules eucaryotes reste modeste. En effet, lors du ciblage de gènes endogènes tels que le récepteur de transferrine CD71, le récepteur de chimiokine C-X-C de type 4 (CXCR4) et la protéine tumorale 53 (TP53), une répression allant de 60 à 80% a été observée (Gilbert et al. 2013; Lawhorn, Ferreira, and Wang 2014). Afin d'obtenir une répression accrue, la protéine dCas9 est couplée à un effecteur répresseur tel que le domaine KRAB (« Krüppel associated box ») (Gilbert et al. 2013; Gilbert et al. 2014; Zheng et al. 2018) (**Figure 22A**). Dans le cas de l'activation génique par CRISPR, CRISPRa, la protéine dCas9 est couplée à des activateurs transcriptionnels tels que VP64 (quatre copies du domaine VP16 du virus Herpes simplex) ou p65AD (**Figure 22B**) (Gilbert et al. 2013;

Maeder et al. 2013; Perez-Pinera et al. 2013; Zalatan et al. 2015; Tanenbaum et al. 2014). Une fois la protéine dCas9 recrutée dans une zone proche du promoteur du gène cible, les effecteurs couplés à celle-ci vont recruter des protéines qui vont ainsi moduler l'expression de ce gène. La fenêtre de ciblage recommandée est de -50 à +300 pb par rapport au site d'initiation de la transcription (TSS) pour CRISPRi (Gilbert et al. 2014), ou -400 à -50 pb CRISPRa (Konermann et al. 2015). Généralement, il est recommandé de tester de multiples séquences sgARN dans la fenêtre cible du gène pour définir la séquence de ciblage la plus efficace pour la répression ou l'activation du gène.

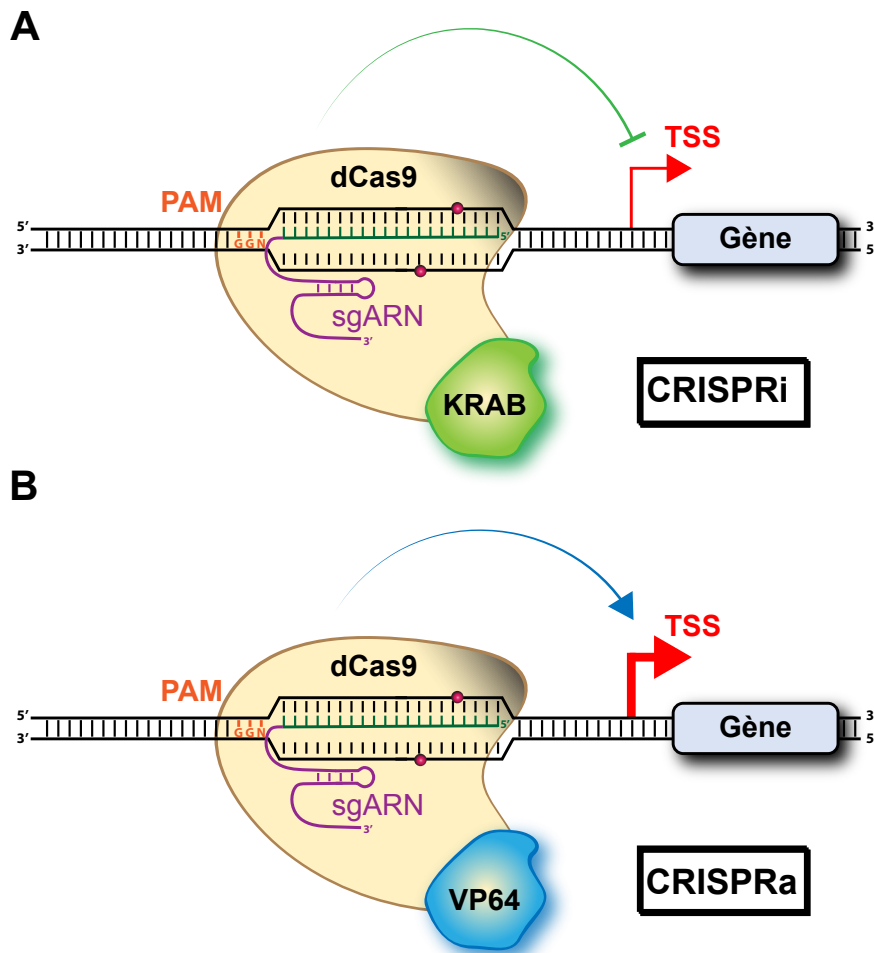


Figure 22 : Système de régulation transcriptionnelle CRISPRi et CRISPRa

Le guide ARN composé d'une séquence de 20pb se fixe par liaison Watson-Crick sur la région ciblée et située à proximité du TSS (site d'initiation de la transcription). Il recrute la protéine dCas9 qui est fusionnée avec un effecteur, le facteur de répression KRAB (A) ou le facteur VP64 activant la transcription (B).

En résumé, CRISPRi et CRISPRa offrent des approches puissantes pour la répression et l'activation de gènes endogènes, utiles pour étudier les fonctions des gènes et la reprogrammation cellulaire

notamment. De plus, cette technique offre une alternative intéressante au système d'ARN interférence (ARNi), notamment par l'absence de système CRISPR chez les eucaryotes, une faible toxicité et des effets « off target » moins importants (D. Kim and Rossi 2008).

La découverte du système CRISPR-Cas9 a apporté des changements révolutionnaires dans la recherche génomique, comprenant des outils d'édition, de régulation et d'imagerie du génome (**Figure 21**). La simplicité et flexibilité des systèmes CRISPR-Cas9 permettront aux chercheurs de développer des outils d'ingénierie génomique plus avancés pour un large éventail d'applications en recherche fondamentale et en médecine translationnelle. Cela va notamment aider à démêler des processus biologiques complexes et à identifier les principaux acteurs génétiques des maladies. En clinique, nous pouvons nous attendre à de nouvelles thérapies pour les maladies génétiques (en utilisant l'édition du génome ou les systèmes CRISPRi/a) et de nouvelles techniques de diagnostic (en utilisant l'imagerie basée sur la manipulation de la protéine dCas9) (H. Wang, La Russa, and Qi 2016; Heckl and Charpentier 2015). Dans notre étude, nous avons travaillé avec les systèmes CRISPRi/a afin de moduler l'expression de protéine phosphatases en vue de leur validation comme cible agissant sur la phosphorylation de LRRK2.

Objectifs de la thèse

Les preuves que LRRK2 est un acteur majeur de la pathogénèse de la MP s'accumulent depuis 15 ans. Les mutations du gène *LRRK2* sont les plus fréquentes parmi des formes génétiques de la maladie et les patients parkinsoniens portant les mutations *LRRK2* montrent un profil clinique et neuropathologique quasiment identique à des cas sporadiques de la MP.

La protéine parkinsonienne LRRK2 est phosphorylée à de nombreux sites avec deux classes notables de sites de phosphorylation, des sites d'autophosphorylation présents dans ou près du domaine de ROC et des sites de phosphorylation hétérologue principalement trouvés entre les domaines ANK et LRR à l'extrémité N-ter (Gloeckner et al. 2010). Cette dernière région de phosphorylation comprend entre autres les sites S910, S935, S955 et S973, la phosphorylation S935 étant celle qui est la plus étudiée.

Les preuves que la phosphorylation de LRRK2 joue un rôle physiologique s'accumulent ces dernières années. La déphosphorylation des phosphosites de la région N-ter de LRRK2 en présence de mutations de LRRK2 (N1437H, R1441C/G, Y1699C et I2020T) ou l'inhibition de l'activité kinase de LRRK2, considérée comme une approche thérapeutique potentielle, ont conduit en culture cellulaire ou dans des modèles animaux à des phénotypes cellulaires similaires, avec la perte de la liaison avec la protéine 14-3-3 entraînant une relocalisation de la protéine au niveau d'accumulations cytoplasmiques filamenteuses, ainsi qu'une augmentation de la liaison avec la protéine phosphatase PP1 (R. J. Nichols et al. 2010; N. Dzamko et al. 2010; Xianting Li et al. 2011; Doggett et al. 2012; Evy Lobbstaël et al. 2013). De manière intéressante, la phosphorylation de ces sites est réduite dans les cerveaux de parkinsoniens sporadiques (N. Dzamko et al. 2017), suggérant que la déphosphorylation de LRRK2 est liée à la pathogénèse de la MP. De plus, des études ont montré l'implication de manière indirecte de ces sites de phosphorylation dans la phosphorylation des substrats de LRRK2, les protéines Rab et p62 (Ito et al. 2016; Kalogeropoulou et al. 2018). La régulation de la phosphorylation est ainsi essentielle pour les rôles physiologiques de LRRK2.

La phosphorylation est un mécanisme qui permet de réguler de manière fine les voies métaboliques dans la cellule. Et la dérégulation de la phosphorylation est responsable de nombreuses pathologies humaines. Le niveau de phosphorylation de protéines est régulé par diverses protéines kinases et phosphatases. Les études citées ci-dessus rapportent plusieurs conditions dans lesquelles la réduction de la phosphorylation de LRRK2 est observée, indiquant un rôle particulièrement crucial de phosphatases dans les fonctions physiologiques et pathologiques de LRRK2. Des données préliminaires du laboratoire ont permis d'identifier plusieurs phosphatases candidates pouvant

réguler la phosphorylation de LRRK2, dont des protéines constitutives de complexes de phosphatases des familles de phosphatases PP1 et PP2A. Les phosphatases PP1 et PP2A agissent en tant que complexe (ou holoenzyme) regroupant une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice, qui confère la spécificité du substrat

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'identifier de manière précise la composition des holoenzymes phosphatases candidates agissant sur la phosphorylation de LRRK2 au niveau des sites de phosphorylation hétérologue, dont le site représentatif est S935. (**Figure 23**). Pour cela, des expérimentations *in cellulo* ont été effectuées pour évaluer le recrutement et l'association des phosphatases avec la protéine LRRK2. Nous avons aussi collaboré avec l'équipe du Professeur Jean-François Bodart pour utiliser un système physiologique moins courant, des ovocytes de Xénope. Un second aspect de ce travail a été la volonté de confirmer la déphosphorylation de LRRK2 par ses phosphatases dans des conditions d'expression endogène de ces protéines. Pour cela la technologie CRISPR-dCas9 (Gilbert et al. 2013) a été mise au point afin de moduler l'expression endogène des sous-unités constitutives des holoenzymes PP1 et PP2A.

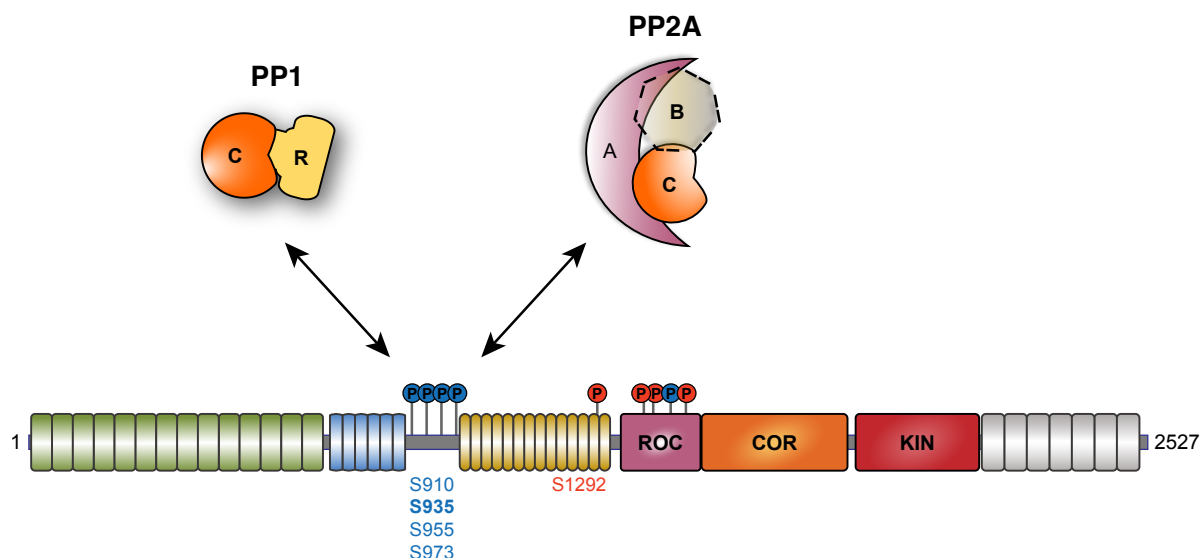


Figure 23 : Représentation schématique de protéine phosphatases régulant la phosphorylation de LRRK2. Sur cette représentation, deux complexes de protéine phosphatases sont indiquées, la protéine phosphatase 1 (composée d'une sous-unité catalytique C et d'une sous-unité régulatrice R) et la protéine phosphatase 2A (composée d'une sous-unité catalytique C, d'une sous-unité régulatrice B et d'une sous-unité structurale A).

Matériel et Méthodes

Lignée Cellulaire

Durant ce travail de thèse, deux lignées cellulaires différentes ont été utilisées, la lignée de cellules rénales embryonnaires humaines HEK-293T et la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y : lignée proche des cellules neuronales humaines qui sont également utilisées pour étudier les maladies neurodégénératives.

Culture cellulaire

Les deux lignées sont cultivées dans une étuve humidifiée à 37°C et à 5% de CO₂. Les cellules HEK-293T sont cultivées dans du DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium », Invitrogen) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 25 mM de HEPES et 50U/ml de pénicilline/streptomycine. L'entretien et le maintien des cellules se font par aspiration du milieu, rinçage au PBS et incubation 5 minutes avec 1 mL d'une solution de trypsine/EDTA (0,025% de trypsine et 0,01% d'EDTA) dans l'étuve à 37°C pour détacher les cellules du support de culture. L'action de la trypsine est bloquée par ajout de milieu de culture complet ; après dissociation, une numération sur lame de Kova (Greiner Bio-one) est réalisée dans le but d'ensemencer les cellules dans les conditions expérimentales appropriées, en fonction du protocole expérimental.

Le protocole appliqué pour les cellules SH-SY5Y est identique à celui utilisé pour la lignée HEK-293T à l'exception de la composition du milieu ; DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), en acides aminés non essentiels (Invitrogen) et 50U/ml de pénicilline/streptomycine.

I - Transfections

Les cellules HEK-293T en culture, à 70-80% de confluence, sont transfectées en utilisant les agents de transfection suivant : le polyéthylèneimine (PEI) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) ou le FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega Corporation, Madison, USA). Afin d'étudier les niveaux de phosphorylation des mutants de LRRK2, Des plaques de 24 puits sont ensemencées avec 100 000 cellules. Un mélange ADN/PEI (1:2) dans 50 µL de DMEM est réalisé à raison de 1 µg d'ADN pour 2 µL de PEI (1 µg/µL). Ce mélange est incubé durant 15 minutes à température

ambiante puis ajouté sur les cellules contenant 1mL de milieu de culture complet. Le milieu de culture est renouvelé après 24 heures.

Le FuGENE® 6 est utilisé pour la transfection des cellules analysées par immunocytochimie (ICC) à raison d'un ratio agent de transfection : ADN de 3:1.

II - Traitements pharmacologiques

Les cellules HEK-293T sont traitées durant 1 heure avec les composés HG 10-102-01 (H. G. Choi et al. 2012), GSK2578215A (Reith et al. 2012) ou MLI-2 (Scott et al. 2017; Fell et al. 2015) ciblant l'activité kinase de la protéine LRRK2. Les inhibiteurs sont dissous dans du DMSO et utilisés à une concentration finale de 1 μ M pour les composés HG 10-102-01 et GSK2578215A et de 10 nM pour MLI-2. La condition contrôle est effectuée par traitement des cellules avec le DMSO à volume équivalent à celui des inhibiteurs (0,1% du volume final).

Analyses Biochimiques

I - Extraction des protéines totales

Les cellules en culture dans des plaques 24 puits sont rincées avec du PBS froid et lysées directement sur glace, par ajout de 100 μ L de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 10% glycérol) supplémenté avec un cocktail en inhibiteurs de protéases et phosphatases (Roche). Puis les lysats sont homogénéisés pendant 30 minutes à 4°C afin de solubiliser les protéines et centrifugés pendant 15 minutes à 15 000g et à 4°C. Un dosage protéique est réalisé sur les lysats cellulaires obtenus (cfr infra) pour être ensuite analysés en Western Blot (WB).

II - Dosage protéique

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du Kit BCA protein assay (Thermo Scientific). Ce kit permet le dosage colorimétrique de protéines en plaques 96 puits. Les échantillons sont dilués au 1/10ème. Une gamme étalon d'albumine bovine est réalisée en parallèle, comprenant 9 points de

concentration croissante de 0 à 2 mg/mL. Chaque point est doublé, la concentration finale retenue étant la moyenne des deux mesures. La plaque est incubée à 37°C pendant 30 minutes et à l'abri de la lumière. L'absorbance des échantillons est mesurée sur un lecteur de microplaque à 570 nm ; les valeurs obtenues sont comparées à la gamme étalon et la concentration protéique est calculée.

III - Séparation sur gel d'acrylamide monodimensionnel

Les protéines contenues dans chaque extrait sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante. Les échantillons à analyser sont dilués et repris dans un tampon de dépôt (NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (ThermoFisher) et agent réducteur DTT 10X (Dithiothreitol, Invitrogen)) de manière à pouvoir effectuer un dépôt de 10 µg de protéines dans chaque puits. Les protéines sont dénaturées pendant 10 minutes à 95°C avant dépôt sur les gels d'acrylamide. La migration est réalisée sous une tension constante sur des gels NuPAGE Tris-Glycine 4-12% (Life Technologies) pendant 35 minutes à 220V ou Tris-Acétate 3-8% pendant 55 minutes à 150V.

IV - Western Blot

Les protéines séparées contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,45µm (Amersham) sous une tension de 100V pendant 90 minutes (système Bio-Rad). Le système est immergé dans de la glace afin de refroidir et ainsi éviter la surchauffe du gel et de la membrane. Après un lavage au TNT (100 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20), les sites de fixation non spécifiques sont saturés par incubation dans une solution contenant du TNT 1X supplémentée de lait ou de BSA (« Bovin Serum Albumin ») à 5% pendant 1 heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires d'intérêt (**Tableau 6**) sur la nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite rincées trois fois pendant 10 minutes dans du TNT 1X. L'incubation dans les anticorps secondaires se fait température ambiante pendant 1h30. Trois autres lavages de 10 minutes sont effectués dans le TNT 1X puis les membranes sont incubées 5 minutes dans de l'ECL Prime (Amersham). L'ECL contient du luminol qui réagit avec une peroxydase couplée aux anticorps secondaires, l'HRP (Horse Radish Peroxidase). Le signal de chimioluminescence est détecté par acquisition à l'imager 600 (GE

Healthcare Bio-Sciences), permettant ainsi la révélation des zones immunoréactives des membranes.

Pour les WB où la détection des protéines se fait par immunofluorescence. Le transfert est réalisé sur une membrane en polyvinylidène difluorure d'une porosité de 0,45µm (Immun-Blot® Low Fluorescence PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, United States). C'est une membrane à faible autofluorescence qui est activée en la plongeant préalablement dans du méthanol, induisant ainsi le passage de la membrane d'un état hydrophobe à un état hydrophile. Les membranes sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à une molécule fluorescente Alexa fluor 488 et 555 pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. La révélation du signal fluorescent sur les membranes se fait directement après rinçage avec la solution de TNT 1X par acquisition sur l'appareil Typhoon FLA9500 (GE Healthcare) en utilisant les lasers Cy2 (excitation 473nm) et Cy3 (excitation 532nm). Le niveau d'intensité des bandes immunoréactives est quantifié par mesure de la densitométrie via le logiciel ImageJ (Scion Image, USA).

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés pendant cette étude.

Anticorps	Espèce	Dilution	Application	Fournisseur	Référence
Anti-LRRK2 N241A/34	Souris	1/1000	WB	UC Davis/NIH Neuromab Facility	75-253
Anti-LRRK2 UDD2 10(12) pS935	Lapin	1/1000	WB	Abcam	ab133518
Anti-β-Actine	Souris	1/1000 et 1/100000	WB	Sigma-Aldrich	A5441
Anti-PPP1CA (E-9)	Souris	1/1000	WB	Santa Cruz	sc-7482
Anti-DARPP-32 (EP720Y)	Lapin	1/500	WB	Abcam	ab40801
Anti-PPP2CA	Lapin		WB	Abcam	Ab137825
Anti-PPP2R2A (2G9)	Souris	1/500	WB	Thermo Fisher Scientific	MA5-18064
Anti-souris	Cheval	1/10000	WB	Cell Signaling	7074S
Anti-lapin	Chèvre	1/5000	WB	Cell Signaling	7076S
Anti-GFP	Lapin	1/1000	ICC	Life Technologies	A11122
Anti-Flag M2	Souris	1/1000	WB et ICC	Sigma Aldrich	F1804
Anti-souris Alexa Fluor488	Chèvre	1/1000	WB	Thermo Fisher Scientific	A-11001
Anti-lapin Alexa Fluor555	Chèvre	1/1000	WB	Thermo Fisher Scientific	A-21428
Anti-lapin Alexa Fluor488	Chèvre	1/500	ICC	Thermo Fisher Scientific	A-11034

Anti-souris Alexa Fluor568	Chèvre	1/500	ICC	Thermo Fisher Scientific	A-11001
-----------------------------------	--------	-------	-----	--------------------------	---------

WB : Western blot ; ICC : immunocytochimie.

Analyse transcriptomique

I - Extraction ARN

L'ARN total a été extrait de cellules SH-SY5Y à l'aide du kit « NucleoSpin[®]RNA XS » (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les cellules sont lysées et un volume d'éthanol 70% est incorporé à chaque échantillon. Le mélange ainsi obtenu est déposé sur une colonne contenant une membrane en silice qui va retenir les acides nucléiques. Après un premier lavage, un traitement à la DNase est appliqué pour éliminer toute trace d'ADN résiduel. Trois autres lavages permettent d'éliminer la DNase, l'ADN et les traces d'éthanol. L'ARN est récupéré dans un volume de 50 µL d'eau RNase-free par une centrifugation d'une minute à 11 000g. A la suite de cette procédure, une étape de purification-amplification est réalisée en utilisant le kit « NucleoSpin[®]RNA Clean-up XS » (Macherey-Nagel). Les échantillons d'ARN totaux sont conservés à -80°C.

La détermination de la concentration des différents ARNs extraits a été réalisée par mesure de l'absorbance à 260 nm, au spectrophotomètre Nanodrop[™] ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Des mesures d'absorbance à 230 nm et 280 nm sont également effectuées afin d'évaluer la pureté des échantillons d'ARNs. Le ratio A260nm/A280nm évalue la contamination protéique et doit être proche de 2 pour que les ARNs soient considérés comme purs. Le ratio A260nm/A230nm est un indice de la présence de sucres et doit être compris entre 1,8 et 2.

II - Rétro-transcription

La rétro-transcription (RT) a été effectuée sur l'ARN extrait en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies). Pour chaque échantillon, 250 ng d'ARN dilué dans 10 µL d'eau sans nucléase ont été ajoutés à 10 µL de mélange RT contenant des désoxynucléotides, du tampon RT, des amorces aléatoires et la transcriptase inverse MultiScribe. La réaction de RT a

été effectuée sur le thermocycleur (Mastercycler Pro, Eppendorf) selon les étapes suivantes : 10 minutes à 25°C ; 120 minutes à 37°C ; 5 minutes à 85°C.

III - PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été réalisée en utilisant 1µL d'ADNc dilué au 1/10, 5µL de SYBR Green Master Mix (Life Technologies), de 3,4µL d'H₂O et 0,3µL de chacune des amorces spécifiques pour chaque gène à amplifier (pour une concentration finale de 300nM). Les qPCR ont été effectuées dans un appareil StepOne plus real-time PCR system (Applied Biosystems) en suivant les températures d'amplifications optimales déterminées précédemment pour chaque ensemble d'amorces. Le programme qPCR est composé d'une pré-dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivies de 40 cycles se composant d'une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et d'une étape d'hybridation et d'élongation à la température optimale spécifique aux couples d'amorces (**Tableau 7**). Tous les échantillons, y compris les contrôles négatifs dans lesquels aucun ADN n'a été inclus, ont été analysés en triplicat, et la β-Actine a été utilisée comme gène de référence. L'expression quantitative des gènes a été exprimée en tant que Ct. Pour chaque échantillon, cette valeur a été normalisée à l'expression du gène de référence comme delta Ct représenté par 2-Δ (ΔCt) prenant en compte la différence de l'efficacité des PCR (Livak and Schmittgen 2001). L'expression normalisée est donc le rapport : (1/Ct du gène cible) / (1/Ct du gène référent). Toutes les amorces utilisées sont représentées dans le **Tableau 7** et ont été conçues par le logiciel Oligo Primer Analysis 7.0 (Molecular Biology Insights, USA).

Tableau 7 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR.

Gène		Séquence (5'-3')	T _m (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
β-Actine	S	CACGGCATCGTCACCAACT	52,1	75
	A	AGCCACACGCAGCTCATTG		
PPP1CA	S	CCCTCAAGATCTGCGGTGACA	64,1	104
	A	GTCCCCCAGAAAGAGGTAGTTG		
PPP2CA	S	TCTGAGACATTTAATCATGCCA	60,2	142
	A	CCAGTTATATCCCTCCATCACT		
PPP2R2A	S	GCAACAGGAGATAAAGGTGGTA	56,8	117
	A	TGGTTCATGGCTCTGGAAGGTG		

S : amorce sens ; A : amorce anti-sens ; T_m : Température d'hybridation ; pb : paire de base

ICC et détermination du degré de colocalisation

Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec les constructions plasmidiques codant la protéine LRRK2 (pCHMWS-GFP-LRRK2) et les différentes phosphatases (pEXPR-Flag-phosphatase). 24 heures après transfection, les cellules sont splittées (ratio ¼) pour être mises en culture en plaque 24 puits contenant des coverslips (diamètre 12mm) préalablement « coatés » à la poly-D-Lysine (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany). 24 heures plus tard, les cellules sont traitées 1 heure avec l'inhibiteur pharmacologique puis les cellules sont fixées 15 minutes à température ambiante avec de la paraformaldéhyde (PAF) 4% suivie de deux lavages au PBS. Après les avoir perméabilisées 5 minutes avec du PBS+0,1% Triton, une étape de 30 minutes de blocage dans du PBS+1% BSA est réalisée. Les cellules sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-Flag M2 et anti-GFP dilués au 1/1000 dans du PBS. Les cellules sont lavées et incubées avec les deux anticorps secondaires fluorescents (anti-rabbit Alexa488 et anti-mouse Alexa568, Invitrogen) dilués au 1/1000 (**Tableau 6**) dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les coverslips sont montées sur des lames SuperFrost en utilisant le milieu de montage UltraCruz Hard-Set Mounting Medium (Santa Cruz Biotechnology). La visualisation des lames est réalisée avec un microscope Zeiss AxioImager Z1 (Zeiss, Jena, Allemagne) puis les images sont analysées et traitées en utilisant le logiciel Image J. La détermination du degré de colocalisation a été évaluée par le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) pour chaque cellule à l'aide du « plugin » JACoP.

Les images d'illustration ont été obtenues par observation à un grossissement x63 avec un microscope confocal (Zeiss LSM710) (Plate-forme BICeL, Lille).

Proximity Ligation Assay (PLA)

Pour la technique de « Proximity Ligation Assay » (PLA), les cellules ont été fixées et perméabilisées comme dans les expériences d'ICC, puis bloquées avec la solution Duolink Blocking pendant 30 minutes à 37°C. Immédiatement après le blocage, les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires anti-Flag M2 et anti-GFP (**Tableau 6**) dans la solution Duolink Antibody Diluent pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été lavées deux fois avec du tampon de lavage Duolink Wash Buffer A pendant 5 minutes avant l'incubation des sondes

PLUS et MINUS. Les cellules ont été incubées avec les sondes PLA pendant 1 heure à 37°C, suivies de deux lavages de 5 minutes avec le tampon Wash Buffer A. Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution de Ligation-Ligase prémélangée à 37°C pendant 30 minutes. Après deux lavages de 2 minutes avec le Wash Buffer A, les cellules ont été incubées avec la solution Amplification-polymérase prémélangée pendant 90 minutes à 37°C. Enfin, les cellules ont été lavées deux fois avec le tampon de lavage Duolink Wash Buffer B durant 10 minutes, suivies d'un lavage pendant 1 minute avec la solution Wash Buffer B 0,01X. Les coverslips ont été séchées à l'obscurité et montées sur lame en utilisant le milieu de montage UltraCruz Hard-Set Mounting Medium.

Les lames sont visualisées par imagerie avec un microscope Zeiss AxioImager Z1 et correspondent à un ensemble de couches espacées de 1 µm, dans l'axe z, rassemblées par MIP (Maximum Intensity Projection). La quantification des points rouges a été réalisée avec le logiciel Image J à l'aide du module de comptage Cell Counter et calculée sur un minimum de 30 cellules.

Les images présentées ont été obtenues par observation à un grossissement x63 avec un microscope confocal LSM 710 (Carl Zeiss).

Analyse cinétique de la déphosphorylation de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*)

I - Expression et purification des protéines recombinantes

Les protéines LRRK2 ainsi que les différentes phosphatases (sous-unités catalytiques et régulatrices) marquées avec FLAG ont été purifiées essentiellement comme décrit précédemment (Civiero et al. 2012). Des cellules HEK-293T ont été cultivées dans des boîtes de 15 cm et transfectées à une confluence de 70-80% avec 30 µg des constructions marquées FLAG en utilisant le PEI linéaire (Polysciences). 48 heures après transfection, les cellules sont lysées dans 500 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton 1%, glycérol 10% et supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases) pendant 30 minutes à 4°C et en rotation. Le lysat est clarifié par centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes et à 4°C. Le surnageant est ensuite incubé sur la nuit à 4°C avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-Flag qui ont été préalablement rincées. Le lendemain, les billes sont rincées 4 fois dans du

tampon de lavage (Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 400 mM, Triton 1%) puis elles sont rincées deux fois dans le tampon d'élution. Enfin les protéines sont éluées par ajout de 100 µg/ml peptide 3xFLAG pendant 15 minutes à 4°C avec une rotation constante

Les protéines ainsi purifiées sont ensuite déposées sur gel et une coloration à l'argent est réalisée pour vérifier leur présence d'une part ainsi que leur pureté.

II - Micro-injection

Cette expérimentation est faite en collaboration avec le Dr. Katia Cailliau-Maggio et le Dr. Alain Martoriati, travaillant au sein du Laboratoire UMR8576-CNRS dans l'équipe « Régulation des signaux de division » qui est sous la direction du Prof. Jean-François Bodart.

La micromanipulation des ovocytes et la microinjection des protéines purifiées (concentration 5 µg/ml) ont été réalisées comme décrit précédemment (de Broucker et al. 2015). Cinquante nanolitres de protéine 3xFLAG-LRRK2 purifiée ont d'abord été injectés puis, après 30 minutes, 50 nanolitres de protéines phosphatases (soit sous-unité catalytique seule ou avec la sous-unité régulatrice) ont été injectés, correspondant au temps 0 de l'expérience. Les ovocytes ont été recueillis à 30 minutes, 1, 2 et 4 heures après l'injection des protéines phosphatases (**Figure 24**). Dix ovocytes ont été collectés et dosés par réplicats expérimentaux. Les ovocytes ont été homogénéisés dans du tampon de lyse (100 µl/10 ovocytes) (MOPS 25 mM pH 7,2, β-glycérophosphate 60 mM, phosphate de paranitrophényle 15 mM, EDTA 15 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 2 mM, vanadate orthosodique 1 mM, 1 mM NaF, phénylphosphate 1 mM, 10 µg/ml de leupeptine, 10 µg/ml d'aprotinine, 10 µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, 10 µM de benzamidine) et ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes et à 4 ° C. Le lysat de dix ovocytes a été analysé par WB. La protéine recombinante LRRK2 (Life Technologies) a été utilisée comme contrôle interne.

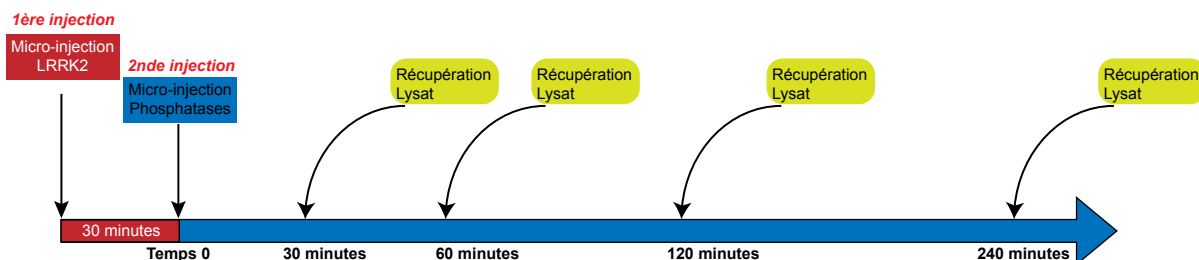


Figure 24 : Représentation schématique du déroulement expérimental.

La protéine LRRK2 purifiée est d'abord micro-injectée dans les ovocytes puis 30 minutes plus tard une seconde injection est faite avec le Tampon élution (condition contrôle) ou PPP2CA seule ou bien les combinaison PPP2CA + PPP2R2A ou PPP2R2B. Des lysats protéiques sont récupérées 30 minutes, 1 heures, 2 heures et 4 heures après la seconde injection.

Production de vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux codant pour les constructions CRISPR-dCas9 ont été produits essentiellement comme précédemment décrit (Vancraenenbroeck et al. 2014; Reyniers et al. 2014; Civiero et al. 2012; Evy Lobbestael et al. 2010; J.-M. Taymans, Gao, and Baekelandt 2013). Brièvement, après l'ensemencement des cellules HEK-293T dans deux boîtes de Pétri 10 cm (J0), une tri-transfection transitoire est effectuée avec les plasmides de transfert contenant le transgène, un plasmide d'encapsulation (psPAX2) et un plasmide codant la protéine d'enveloppe VSV-G (pMD2.G) (les plasmides sont disponibles via Addgene) (J1). Le milieu est remplacé après 24 heures (J2). Le surnageant contenant les vecteurs lentiviraux est récolté le jour 4, filtré avec un filtre X50 Millipore de taille 0,45 μm (Fisher) et concentré en utilisant une colonne de concentration Amicon Ultra-15 (Merck-Millipore) jusqu'à 1mL.

I - Etablissement des lignées cellulaires stables dCas9

50 000 cellules SH-SY5Y ont été ensemencées dans des plaques 24 puits. Le jour suivant, les cellules en culture sont transduites avec les LVs pHAGE-EF1 α dCas9-KRAB (Addgene #50919) et pHAGE-EF1 α dCas9-VP64 (Addgene #50918) (

Figure 25). Après 24 heures, du milieu complet DMEM est ajouté. Les cellules sont sélectionnées par maintien dans du milieu de sélection (puromycine 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EvoPure Toku-E) pendant plusieurs semaines, en le renouvelant deux fois par semaine puis les cellules résistantes sont alors amplifiées.

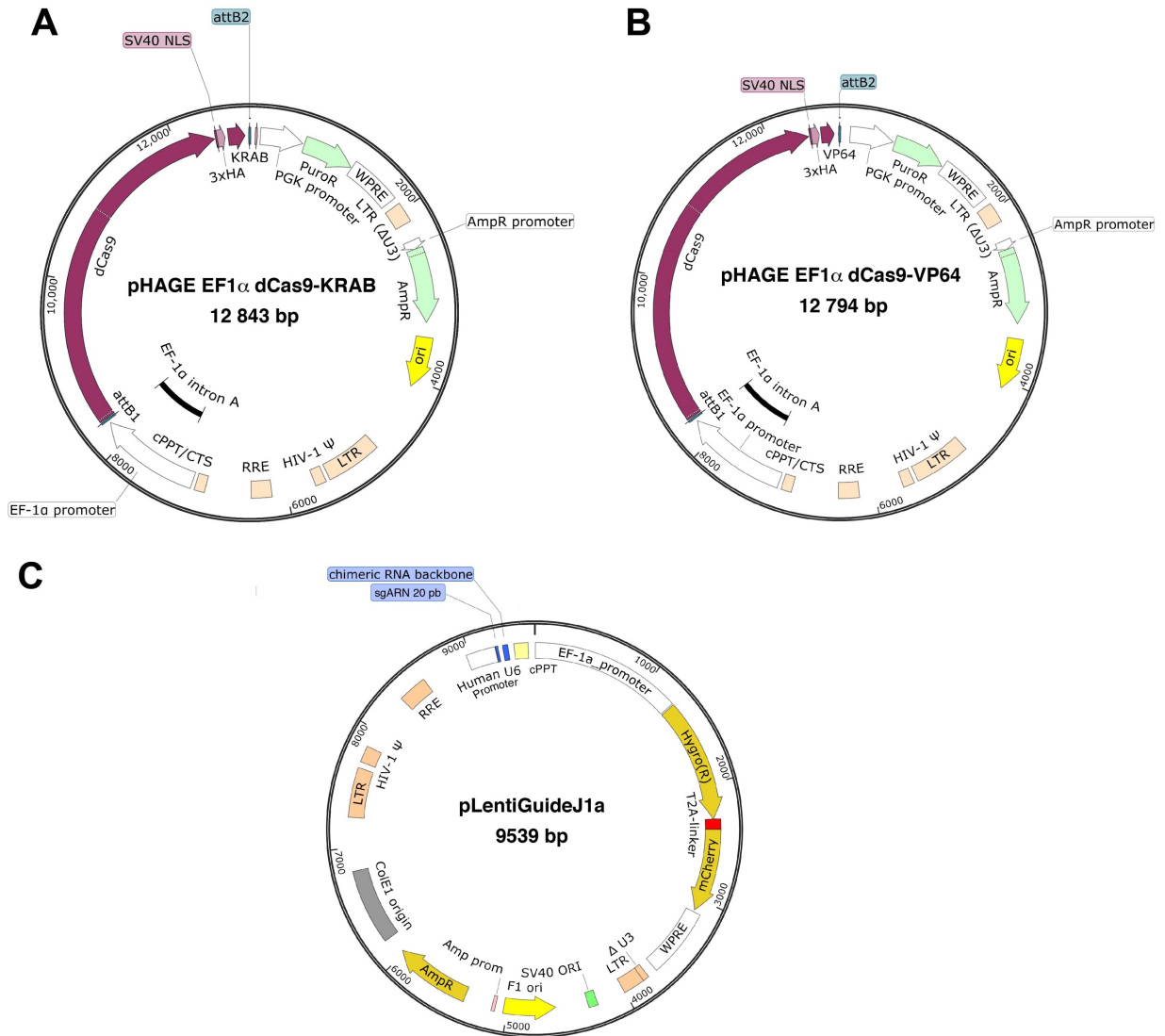


Figure 25 : Carte des constructions plasmidiques CRISPR-dCas9 utilisées pour cette étude.

(A) Plasmide pHAGE-EF1 α dCas9-KRAB. (B) Plasmide pHAGE-EF1 α dCas9-VP64. (C) Plasmide pLentiGuideJ1a, les séquences des guides ARN (en bleu) testés pendant l'étude ont été clonées dans ce plasmide.

II - Procédure de transduction

Les cellules ensemencées en plaque 24 puits sont transduites avec 100 μ L de LV. Après 24 heures, du milieu complet DMEM est ajouté. Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à l'utilisation pour analyse. Quand cela est possible, les cellules sont sélectionnées avec du milieu contenant 200 μ g/ml d'hygromycine B (InvivoGen).

III - Design des séquences guides ARN

La recherche de séquences guide ARN au niveau du TSS pour chacun des gènes cibles a été réalisée en partant de la séquence RefSeq de NCBI. Une zone allant de -500 à +300 autour du TSS est identifiée. Cette séquence est entrée dans le site web <http://crispr.mit.edu/> et permet de déterminer des séquences de 20 nucléotides contenant une séquence PAM (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Liste des séquences guides ARN.

Gène cible	Nom	Séquence (5'-3')
PPP1CA	CR-PPP1CA-1	CGTCCAGCGGGGGCGCTAGAGGG
	CR-PPP1CA-2	CCGCGCCTCACGTCCAGCGGGGG
	CR-PPP1CA-4	CATGTTAATAACCGGCTGCTAGG
	CR-PPP1CA-5	CCCAAGGACCAAAGTGCGCTGGG
PPP1R1B	CR-PPP1R1B-1	TCAAGTTCTGGGGAGACCGCAGG
	CR-PPP1R1B-2	TCAAGTTCTGGGGAGACCGCAGG
PPP2CA	CR-PPP2CA-4	AAGCGCAGGCGCGACGTAGCCGG
	CR-PPP2CA-5	CTGCGGCTCTGTAATCGTGTGGG
	CR-PPP2CA-7	CGGCCGCACGACCGGAGTTGGGG
PPP2R2A	CR-PPP2R2A-3	ACTTTCAAAATGGCGCCGGCTGG
	CR-PPP2R2A-4	GCGACTACGACAGCGACGGCGG
	CR-PPP2R2A-5	GTAGTCGCCGCCGCGCTGCCGG
	CR-PPP2R2A-6	CGCCCCCTAGGTGACGTCACTGG
	CR-PPP2R2A-7	GACTACGACAGCGACGGCGGCGG
N/A	sgARN neg	GGAGACGAAGCTTAAACGTCTCT

La séquence PAM est indiquée en souligné. N/A : non applicable

Analyses statistiques

Toutes les données présentées sont exprimées en moyenne \pm SEM (erreur-type de la moyenne) représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Le nombre répliquet et la taille des échantillons sont indiqués dans les légendes des figures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Le niveau de significativité est placé à $p < 0.05$ et analysé avec un test Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn pour une

comparaison de plus de deux groupes ou par une analyse Mann-Whitney pour une comparaison de seulement deux groupes. Les expériences d'ICC et de PLA ont été analysées avec le test de comparaison multiple t-test suivi d'un test post-hoc de Holm-Sidak. Dans l'expérience de cinétique (Xénope), les variations de la phosphorylation de LRRK2 dans les différents groupes ont été testées par un test ANOVA à 2 voies avec le temps et les combinaisons injectées comme paramètres suivi d'un test post-hoc de Bonferroni pour chacun des temps analysés.

Résultats

Etat de phosphorylation de mutants de la protéine LRRK2

Les sites de phosphorylation hétérologue présents entre les domaines ANK et LRR sont constitutivement phosphorylés dans les cellules. Le site S935, représentatif de ce cluster, est connu pour être important pour la localisation au sein de la cellule de la protéine LRRK2. D'autre part, il a été montré pour certains mutants pathogènes de LRRK2, l'existence de variations au niveau de ce site de phosphorylation. En effet, à l'exception du mutant G2019S dont la phosphorylation est comparable à la version WT, les mutants N1347H, R1441C/G, Y1699C et I2020T présentent une diminution de la phosphorylation sur le site S935 comparé au WT (R. J. Nichols et al. 2010; N. Dzamko et al. 2010).

Nous avons dans un premier temps évalué les niveaux de phosphorylation de mutants de LRRK2 dans des cellules HEK-293T. Comme nous pouvons l'observer sur la **Figure 26** ci-dessous, les mutants pathogènes N1347H et I2020T sont déphosphorylés au niveau du phosphosite S935 (**Figure 26**), ce qui est en accord avec la littérature (Ho et al. 2016; R. J. Nichols et al. 2010). En revanche, le mutant R1441C qui est retrouvé déphosphorylé dans la littérature, n'est pas diminué de manière significative dans notre expérimentation. On peut également noter une tendance à une augmentation de la phosphorylation pour le mutant R1398H, variant de LRRK2 avec un effet protecteur dans la MP (Nixon-Abell et al. 2016; Ross et al. 2011), mais qui n'est certes pas significative. Par ailleurs, nous n'observons aucune différence entre les facteurs de risque S1647T et R1628P, les mutations somatiques I1294V, G2019D et L2500F comparé au WT. Pour ces dernières mutations, il s'agit de données novatrices.

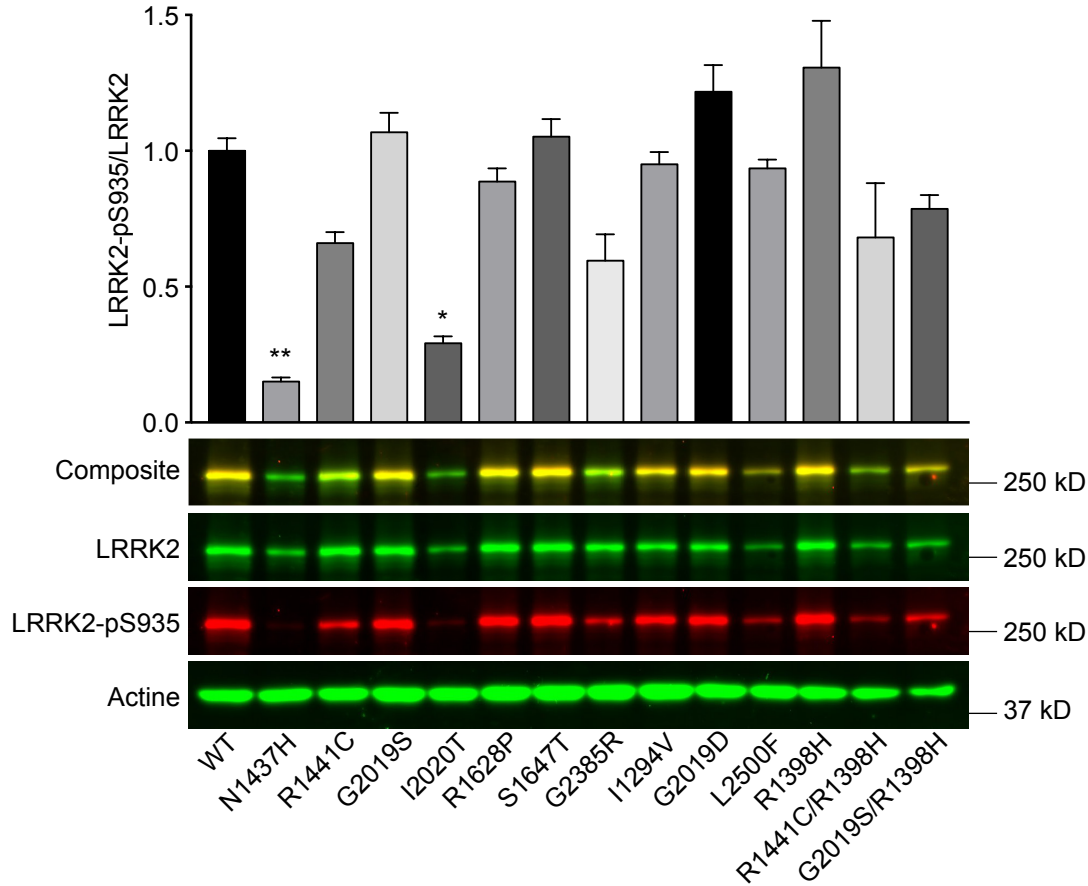


Figure 26 : Etat de phosphorylation de mutants LRRK2.

Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec la version WT et une série de mutants de la protéine LRRK2. La phosphorylation en S935 a été analysée par WB. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge. Les barres d'erreur indiquent l'erreur-type de la moyenne (SEM). L'expérimentation a été répétée 4 fois (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ont été déterminées par une analyse Mann-Whitney.

Un second travail collaboratif avec le laboratoire du Dr. Sabine Hilfiker, CSIC Grenade en Espagne, a été publié dans le papier de Marian Blanca en 2017 (Blanca Ramírez et al. 2017).

Nous avons de nouveau analysé la phosphorylation en pS935 dans la version WT de LRRK2 ainsi que dans des mutants pathogéniques en absence ou en présence de mutations touchant la région GTPase de la protéine. La mutation R1398L (RL) a été décrite comme diminuant la capacité de LRRK2 à lier le GTP, cette diminution est accentuée avec l'addition de la mutation T1343V (Xiong et al. 2010).

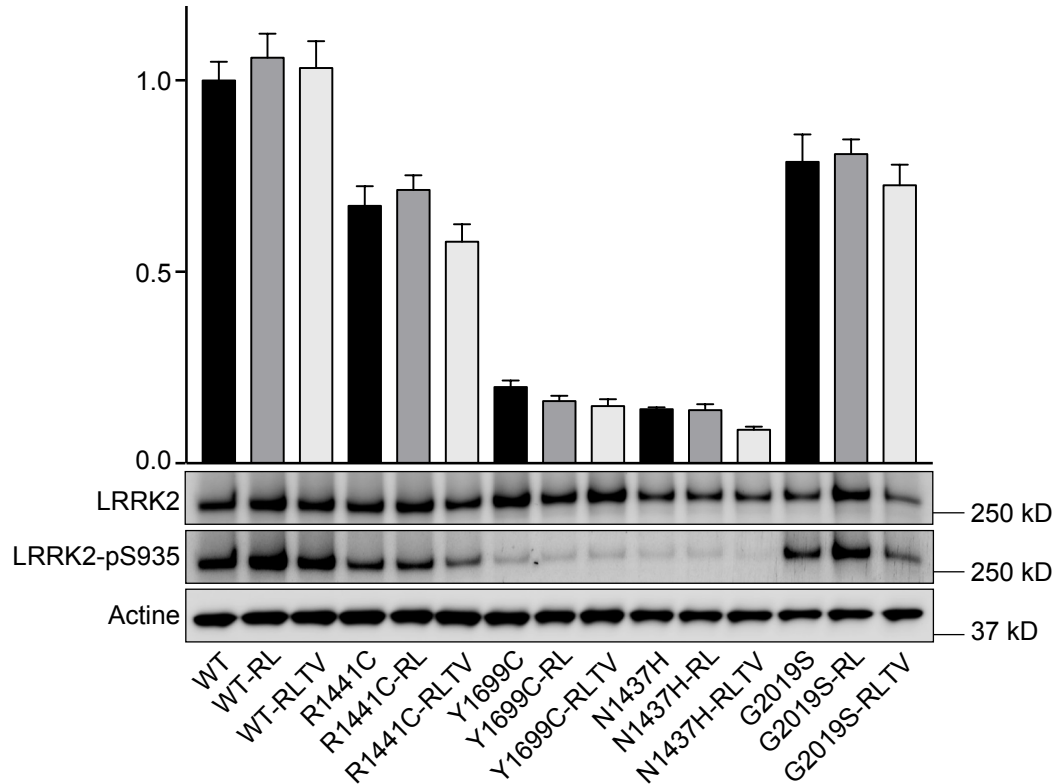


Figure 27 : Etat de phosphorylation de mutants LRRK2 en présence de mutations touchant la région GTPase de la protéine.

Les cellules HEK-293T ont été transfectées avec les constructions indiquées. La phosphorylation S935 a été analysée par WB. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge. L'histogramme indique les moyennes \pm SEM. du rapport pS935/LRRK2 total pour chaque construction. L'expérimentation a été répétée 4 fois (n=4).

La présence des mutations entraînant une diminution de la liaison du GTP ainsi que la formation de filaments (Biosa et al. 2013), n'altère pas la phosphorylation en pS935 comparé à leur construction version sauvage, WT et mutant R1441C, N1437H, Y1699C et G2019S respectivement (**Figure 27**).

Cette partie montre l'intérêt de l'étude du site de phosphorylation pS935 de LRRK2. En effet, il existe une grande variation de l'état de phosphorylation selon les mutants étudiés. De façon intéressante des différences de phosphorylation sont observées par rapport à la version WT de LRRK2.

Identification et validation des phosphatases régulant LRRK2

I - Données préalables

Dans le but d'identifier des phosphatases régulant la protéine LRRK2 nous nous sommes appuyé sur des données préalables issues de précédents criblages effectués par le Dr. Taymans et ses collaborateurs (données qui seront publiées ensemble avec les résultats de ce doctorat, **Annexe 3**). Pour identifier de nouvelles phosphatases et de régulateurs de la phosphorylation de LRRK2, un criblage utilisant la technologie de petits ARN interférents (siARN) a été réalisé. Une librairie siARN ciblant l'intégralité des phosphatases humaines (894 siARNs uniques pour 298 cibles) a été utilisée dans des cellules U2OS (lignée établie à partir d'un ostéosarcome humain) exprimant la protéine LRRK2 taguée GFP. Trois siARN ont été testés pour chacune des 298 phosphatases et l'effet de chaque siARN sur le niveau de la phosphorylation de LRRK2 au résidu S935 a été mesuré (**Figure 28**). La moyenne des trois valeurs du taux de phosphorylation pS935 est prise en compte et comparée par rapport au contrôle sans knockdown. Ce criblage a permis de sélectionner 39 phosphatases candidates, basé en premier lieu sur l'amplitude du changement de la phosphorylation pS935 de LRRK2 effectuée par l'extinction de l'expression des phosphatases.

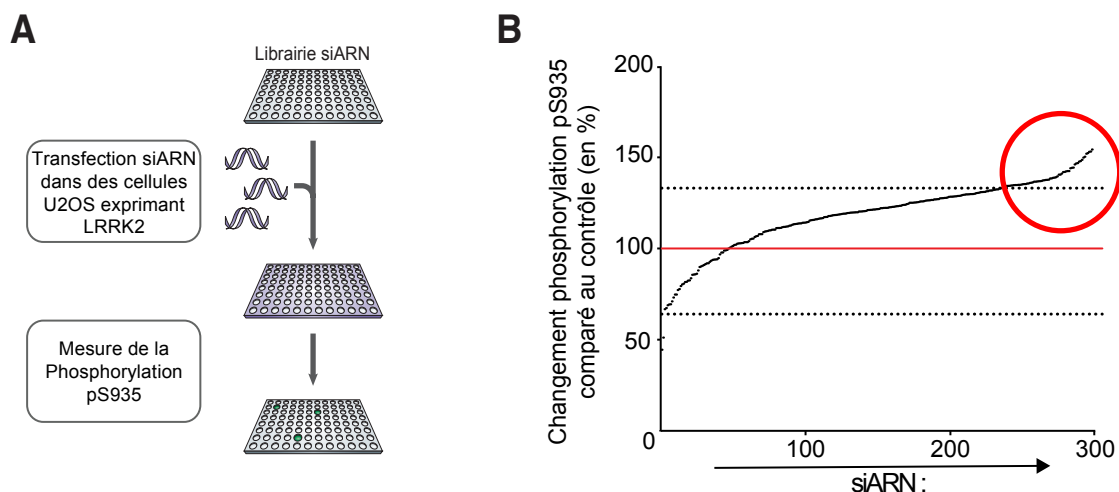


Figure 28 : Identification de phosphatases régulant la phosphorylation pS935 de LRRK2 par un criblage utilisant de petits ARN interférents.

(A) Représentation schématique de l'approche du criblage par siARN. Les siARN ciblant les 298 protéines constitutives de complexe de phosphatases (sous-unités catalytiques et régulatrices) ont été transfectés dans des cellules U2OS exprimant la protéine LRRK2-GFP. Le niveau de phosphorylation pS935 est mesuré par transfert d'énergie

entre les molécules fluorescentes GFP et l'anticorps anti-pS935 marqué au Terbium (technologie FRET). (B) Graphique représentant le changement du niveau de phosphorylation pS935 pour chacune des 298 phosphatases testées. Les valeurs exprimées en pourcentage comparées au contrôle sont ordonnées de la plus faible à la plus haute. Les valeurs pour lesquelles le changement de la phosphorylation pS935 est la plus grande sont encadrées en rouge sur le graphique

Un second criblage a été effectué à partir des 39 phosphatases sélectionnées du premier criblage. Brièvement, deux constructions microARN (miRNA) ont été produites pour chacune des 39 phosphatases sélectionnées. Des cellules SH-SY5Y exprimant 3xFLAG-LRRK2 ont été transduites avec les deux constructions en présence ou non de l'inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2, LRRK2-IN1 (X. Deng et al. 2011) . Le changement de la phosphorylation pS935 a été mesuré par la méthode du Dot-blot.

Cela a permis d'identifier 17 phosphatases candidates pouvant réguler la phosphorylation de LRRK2, dont des protéines constituantes de complexes de phosphatases des familles de phosphatases PP1 et PP2A (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Liste des phosphatases identifiées lors des criblages.

#	Gène	Nom	Type de sous unité
1	PPP1CA	Protéine phosphatase 1, sous unité catalytique alpha	Catalytique
2	PPP1CB	Protéine phosphatase 1, sous unité catalytique beta	Catalytique
3	PPP1CC	Protéine phosphatase 1, sous unité catalytique gamma	Catalytique
4	PPP1R1A	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 1A	Régulatrice
5	PPP1R1B	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 1B	Régulatrice
6	PPP1R3B	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 3B	Régulatrice
7	PPP1R3D	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 3D	Régulatrice
8	PPP1R3F	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 3F	Régulatrice
9	PPP1R8	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 8	Régulatrice
10	PPP1R16B	Protéine phosphatase 1, sous unité régulatrice 16B	Régulatrice
11	PPP2CA	Protéine phosphatase 2, sous unité catalytique alpha	Catalytique
12	PPP2CB	Protéine phosphatase 2, sous unité catalytique beta	Catalytique
13	PPP2R2A	Protéine phosphatase 2, sous unité régulatrice B alpha	Régulatrice
14	PPP2R2B	Protéine phosphatase 2, sous unité régulatrice B beta	Régulatrice
15	PPP2R2C	Protéine phosphatase 2, sous unité régulatrice B gamma	Régulatrice
16	PPP2R3C	Protéine phosphatase 2, sous unité régulatrice B'' gamma	Régulatrice
17	PPP2R5C	Protéine phosphatase 2, sous unité régulatrice B' gamma	Régulatrice

II - Analyse de la distribution subcellulaire des protéine phosphatases PP1 et PP2A

Suite aux résultats obtenus avec les criblages et afin de confirmer l'implication des 17 phosphatases dans la régulation de la phosphorylation de LRRK2, nous avons examiné leur degré de colocalisation avec LRRK2 dans des cellules HEK-293T.

LRRK2 est localisée majoritairement de façon diffuse dans le cytoplasme. En revanche, après l'induction de la déphosphorylation de LRRK2 par un traitement avec un inhibiteur de la fonction kinase ou en présence de certains mutants cliniques de LRRK2, la protéine LRRK2 s'accumule sous forme de filaments ou accumulations punctiformes (R. J. Nichols et al. 2010; N. Dzamko et al. 2010).

Nous avons évalué par immunofluorescence la colocalisation entre les phosphatases candidates et LRRK2 en condition basale et dans des conditions de déphosphorylation de LRRK2. Cette technique a été réalisée sur des cellules HEK-293T co-transfectées avec la construction GFP-LRRK2 et les 17 différentes phosphatases taguées FLAG. Les cellules ont ensuite été traitées une heure avec l'inhibiteur HG-10-102-01 (1 μ M) (H. G. Choi et al. 2012) ou traitées avec du DMSO (0,1% en concentration finale) (condition contrôle).

Comme décrit précédemment, nous observons une localisation cytoplasmique de LRRK2 (**Figure 29 et Figure 30**) dans la majorité des cellules transfectées. A l'état basal, la majorité des sous-unités PP1 se situe dans le cytoplasme de la cellule à l'exception des sous-unités PPP1CC et PPP1R8 qui sont localisées dans le noyau. Par l'ajout du composé HG 10-102-01, un inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2, on induit une déphosphorylation permettant d'étudier le rôle des phosphatases. Après une inhibition d'une heure, on observe une augmentation significative ($p < 0.05$) de la colocalisation des phosphatases PPP1CC, PPP1R1B et PPP1R3B avec LRRK2 dans le cytoplasme (**Figure 29B, C**). En revanche, pour la sous-unité régulatrice PPP1R3D, on observe l'effet inverse avec une diminution significative ($p < 0.05$) de la colocalisation. Alors que pour les sous-unités catalytiques PPP1CA et PPP1CB aucun changement n'est observé. En effet, ces deux sous-unités catalytiques sont déjà présentes dans le même compartiment cellulaire que LRRK2 au niveau basal.

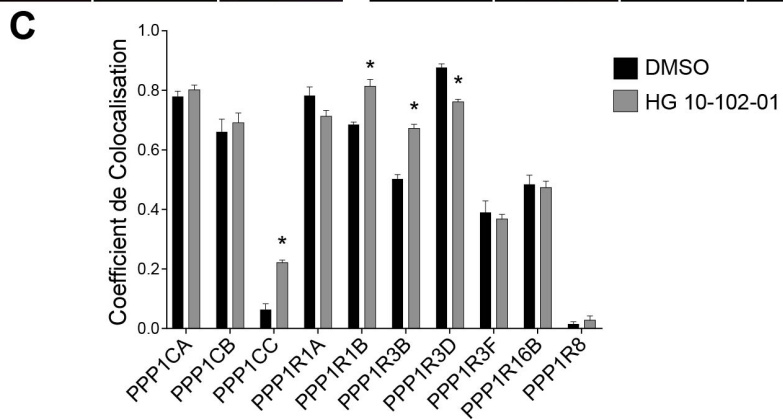
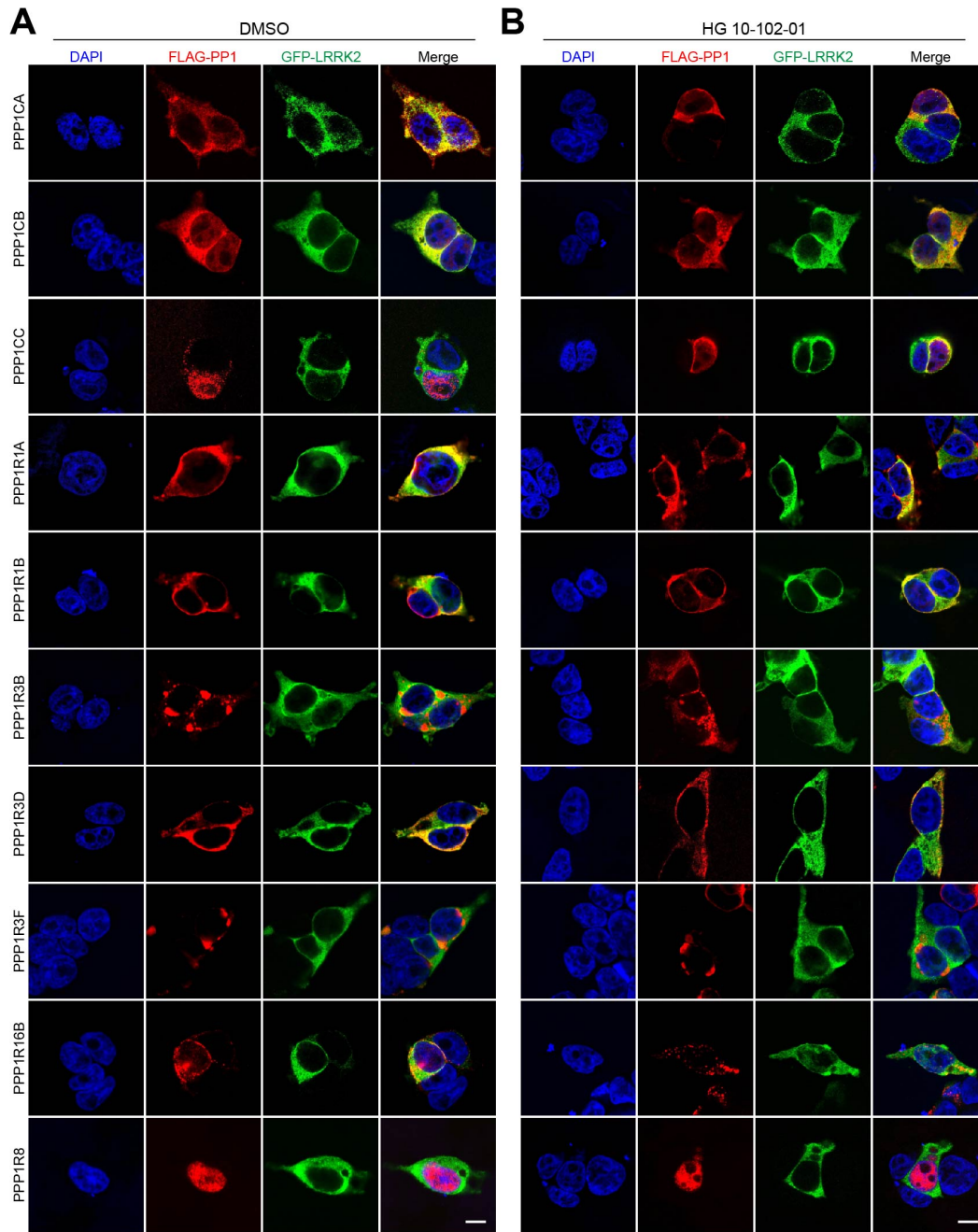


Figure 29 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique HG 10-102-01 sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP1.

Les cellules HEK-293T sont co-transfectées avec les plasmides pCHMWS-GFP-LRRK2 et pEXPR-FLAG-phosphatases. Le noyau des cellules est marqué en bleu (marquage DAPI), les protéines sont détectées en utilisant un anticorps anti-FLAG pour les phosphatases (rouge, second panel) et anti-GFP pour LRRK2 (vert, troisième panel). L'image reconstituée est montrée sur le dernier panel à droite. (A) Cellules traitées avec le DMSO (contrôle), (B) ou avec l'inhibiteur HG 10-102-01 (1 μ M) durant 1 heure. Scale bar, 10 μ m. (C) Coefficient de corrélation (Rcoloc) LRRK2/Phosphatase pour les conditions DMSO et HG. Sur le graphique, les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et sont analysées avec de multiples t-test, *p<0.05. Les résultats de l'expérimentation sont issus de 3 co-transfections différentes (n=3), et une image représentative est montrée pour chaque groupe.

L'effet de l'inhibiteur sur la localisation des sous-unités PP2A est plus important que celui observé avec les sous-unités PP1. En effet, alors qu'en condition basale les sous-unités catalytiques PPP2CA et PPP2CB sont majoritairement localisées dans le noyau tout comme la sous-unité régulatrice PPP2R2A (**Figure 30A**), une augmentation significative de la colocalisation des phosphatases PPP2CA, PPP2CB, PPP2R2A et PPP2R3C avec LRRK2 est observée après une heure de traitement avec l'inhibiteur HG 10-102-01 (**Figure 30B, C**).

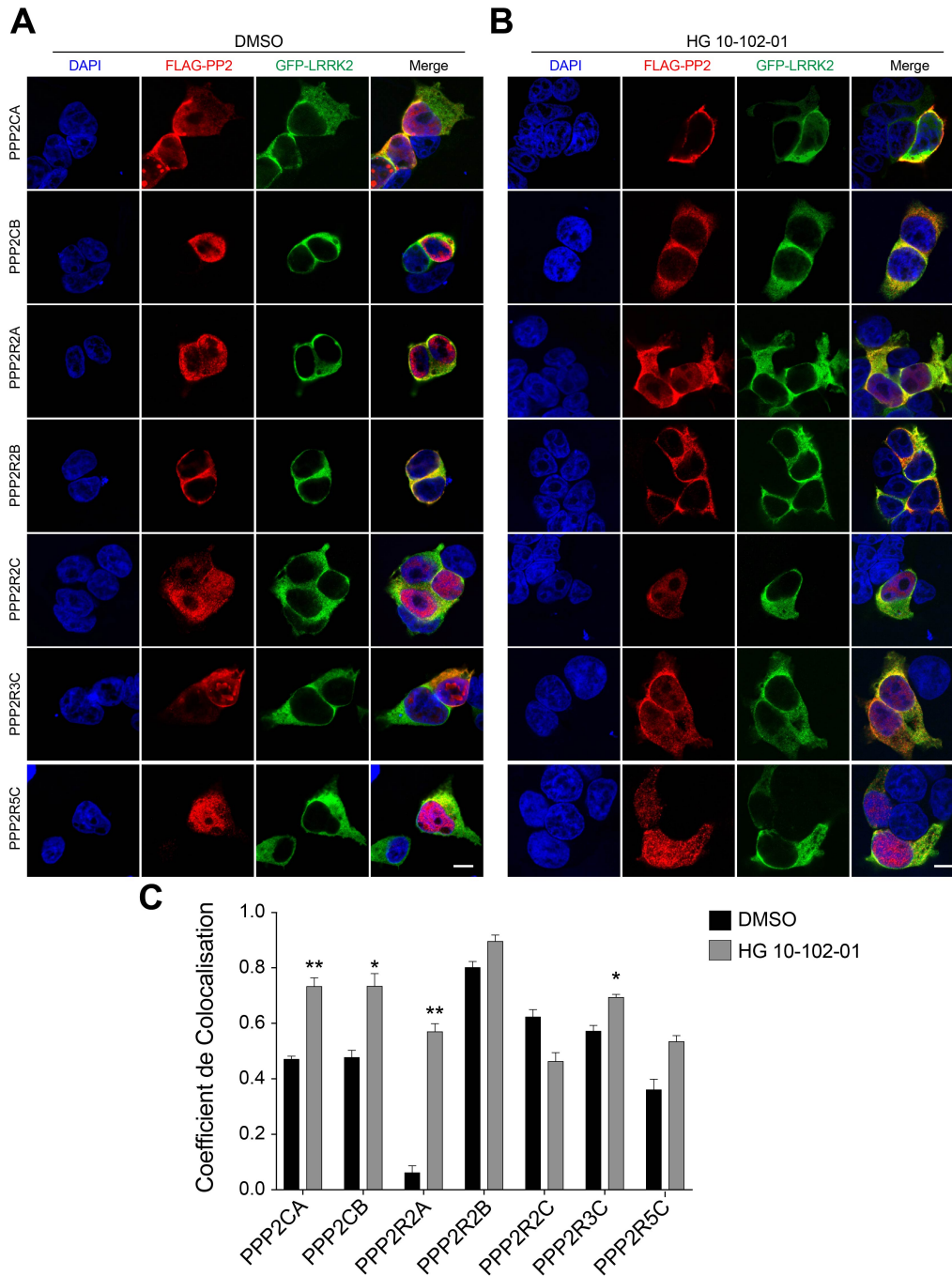


Figure 30 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique HG 10-102-01 sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP2A.

Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec les plasmides pCHMWS-GFP-LRRK2 et pEXPR-FLAG-phosphatases. Le noyau des cellules est marqué en bleu (marquage DAPI), les protéines sont détectées en utilisant un anticorps anti-Flag pour les phosphatases (rouge, second panel) et anti-GFP pour LRRK2 (vert, troisième panel). L'image reconstituée est montrée sur le dernier panel à droite. (A) Cellules traitées avec le DMSO (contrôle), (B) ou avec l'inhibiteur HG 10-102-01 (1 μ M) durant 1 h. Scale bar, 10 μ m. (C) Coefficient de corrélation (Rcoloc) LRRK2/Phosphatase pour les conditions DMSO et HG. Sur le graphique, les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et sont analysées avec de multiples t-test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Les résultats de l'expérimentation sont issus de 3 co-transfections différentes (n=3), et une image représentative est montrée pour chaque groupe.

L'expérimentation a été répétée avec un autre inhibiteur, structurellement différent, le composé GSK2578215A (Reith et al. 2012) (**Figure 31**).

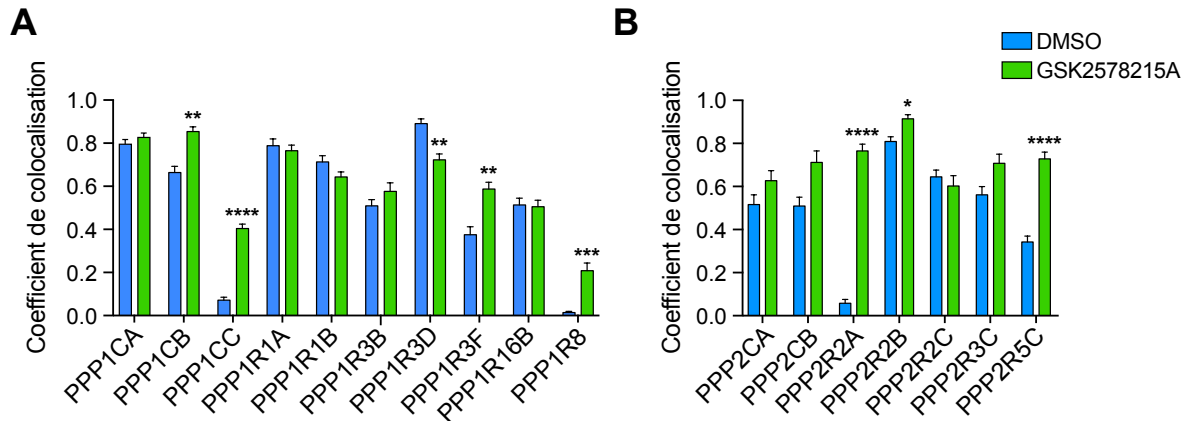


Figure 31 : Effet de l'inhibiteur pharmacologique GSK2578215A sur la colocalisation de LRRK2 avec les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP1 et PP2A.

Représentation graphique du niveau de colocalisation entre la protéine LRRK2 et les sous-unités PP1 (A), et les sous-unités PP2A (B) après un traitement d'une heure avec le DMSO (0,1% concentration finale) ou l'inhibiteur GSK2578215A (1 μ M). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM et sont analysées avec de multiples t-test, * p <0.05 ; ** p <0.01 ; *** p <0.001 ; **** p <0.0001. Les résultats sont issus d'une seule co-transfection (n=1), entre 4 et 10 cellules ont été analysées par groupe.

On observe une augmentation significative de la colocalisation pour les sous-unités catalytiques PPP1CB et PPP1CC (** p <0.01 et *** p <0.0001 respectivement) (**Figure 31A**). En ce qui concerne les sous-unités régulatrices de PP1, une diminution de la colocalisation est observée pour PPP1R3D comme précédemment observé avec l'inhibiteur HG 10-102-01. Enfin, la colocalisation est augmentée significativement pour les sous-unités PPP1R3F et PPP1R8 alors qu'aucun effet n'a été visible avec le composé HG 10-102-01.

Pour les phosphatases PP2A, il existe des similarités dans les résultats, avec des augmentations de colocalisation pour les sous-unités PPP2R2A, PPP2R2B et PPP2R5C. On note toutefois que par rapport au composé HG 10-102-01 qui entraînait une augmentation significative de la colocalisation des sous-unités catalytiques PPP2CA et PPP2CB, les colocalisations en présence de l'inhibiteur GSK2578215A sont plus élevées sans pour autant démontrer une différence significative (**Figure 31B**).

Par ICC, on a pu observer que LRRK2 co-localise au sein de la cellule avec les différentes phosphatases et que le degré de colocalisation de certaines phosphatases est augmenté après le traitement avec deux inhibiteurs différents, HG-10-102-01 et GSK2568215A.

Afin d'étudier l'interaction entre LRRK2 et les différentes sous-unités PP1 et PP2A nous avons utilisé la technique PLA (Proximity Ligation Assay), qui mesure *in situ* la proximité entre deux protéines permettant la détection des complexes dans la cellule.

La PLA est réalisée sur des cellules HEK-293T co-exprimant GFP-LRRK2 et des phosphatases taguées FLAG. Un signal n'est généré que lorsque les deux protéines sont à proximité l'une de l'autre (distance inférieure à 40nm), permettant ainsi la ligation et l'amplification à partir des oligonucléotides fixés aux anticorps secondaires. Le signal obtenu est un point de fluorescence rouge dans notre expérimentation, indicatif d'une grande proximité et donc d'une interaction entre les deux protéines. Le nombre de points rouges peut alors être visualisé et quantifié au microscope (**Figure 32**).

La spécificité du signal PLA est testée par la condition contrôle, où le plasmide codant le GFP-LRRK2 est exprimé seule dans la cellule. Cette condition ne présente pas de signal PLA (**Figure 32A**).

La quantification des points PLA montre une augmentation significative de l'interaction entre LRRK2 et les sous-unités PPP1CA, PPP1CB, PPP1CC, PPP2CA, PPP2R2A et PPP2R2B après un traitement d'une heure avec l'inhibiteur HG 10-102-01 à une concentration de 1 μ M (**Figure 32B et C**). Cette augmentation d'interaction est doublée pour la sous-unité catalytique PPP1CA, confirmant les précédentes données publiées par Lobbestael et al. qui en utilisant la technique de co-immunoprécipitation avait démontré que la déphosphorylation de LRRK2 était accompagnée d'un recrutement de PP1 (Evy Lobbestael et al. 2013). Cette augmentation est même triplée pour la sous-unité régulatrice PPP2R2B (**Figure 32C**).

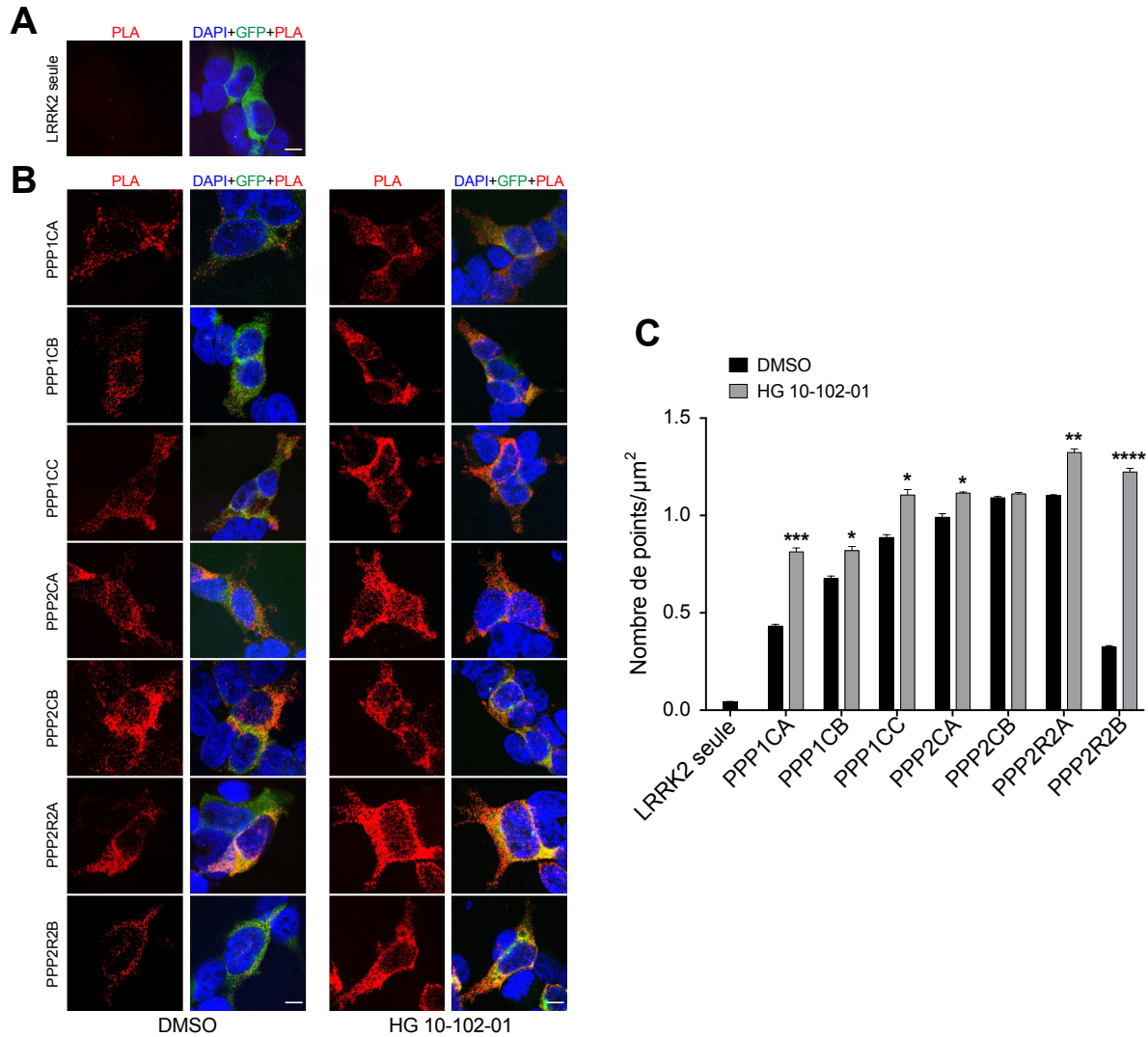


Figure 32 : LRRK2 interagit avec les sous-unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A.

Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec pCHMWS-GFP-LRRK2 et pEXPR-FLAG-phosphatases. 48 heures post-transfection, les cellules sont soumises à la PLA suivant le protocole du fournisseur. (A) La condition témoin négatif est le plasmide pCHMWS-GFP-LRRK2 transfecté seul. Pour chaque panel, une image du signal d'amplification en rouge est montrée et une seconde image montre l'image fusionnée avec le noyau en bleu (marquage DAPI), le LRRK2-GFP en vert et le signal d'amplification en rouge. (B) Le panel de gauche montre les cellules traitées DMSO (contrôle) et le panel de droite montre les cellules traitées avec l'inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2, HG 10-102-01 (1 μM) durant 1 heure. Scale bar, 10 μm . (C) Quantification du nombre de points par μm^2 de (A) et (B), 30-40 cellules ont été dénombrées pour chaque groupes. Les données sur le graphique sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$. Valeurs de p sont issues de multiples t-test. Les résultats de l'expérimentation sont issus de 3 co-transfections différentes ($n=3$), et une image représentative est montrée pour chaque groupe.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec l'inhibiteur HG 10-102-01, l'expérimentation a été répétée en présence d'un autre inhibiteur de LRRK2, le composé MLi-2 (Fell et al. 2015). Cet inhibiteur est considéré à l'heure actuelle comme un des plus performants, il possède une grande

efficacité d'inhibition avec très peu d'effet sur d'autres kinases (effets « off-target ») à la concentration utilisée (Fell et al. 2015; Scott et al. 2017). Après une heure de traitement avec l'inhibiteur MLI-2, on observe une augmentation significative de l'interaction entre LRRK2 et les phosphatases PPP1CA, PPP2CA, PPP2R2A et PPP2R2B (**Figure 33**).

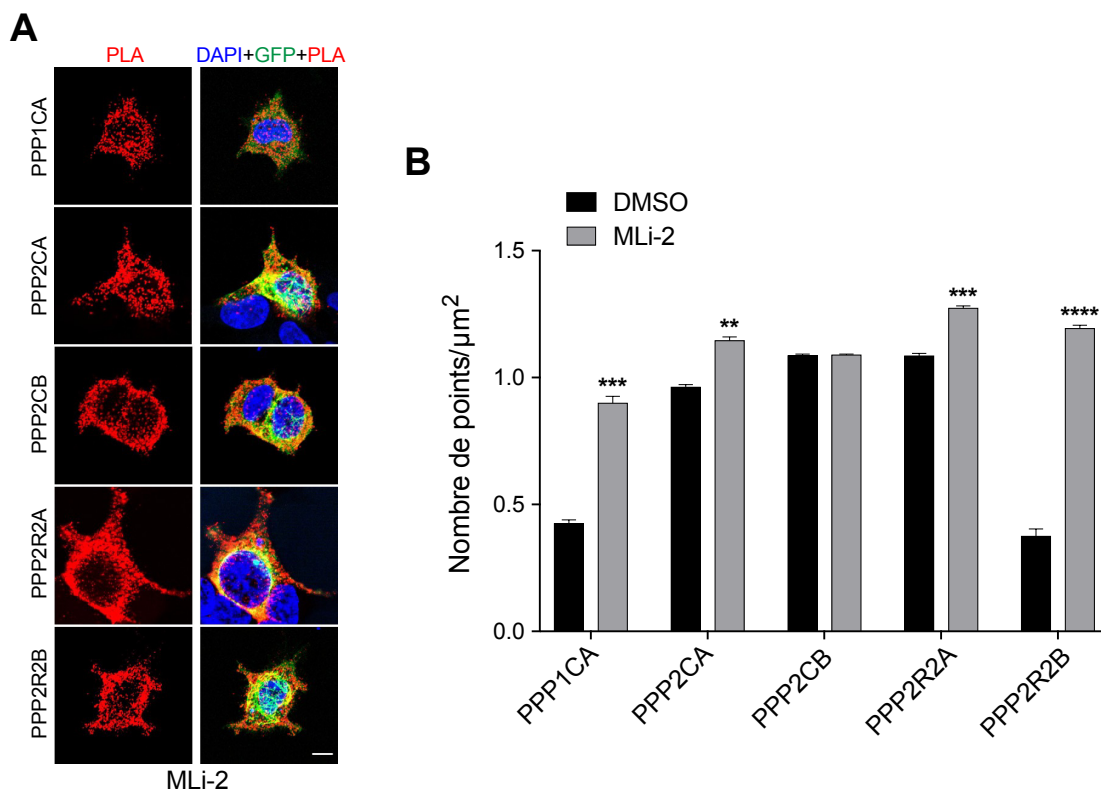


Figure 33 : Interaction entre LRRK2 et les unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A en présence de l'inhibiteur MLI-2.

Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec pCHMWS-GFP-LRRK2 et pEXPR-Flag-phosphatases. 48 heures post-transfection, les cellules sont soumises à la PLA suivant le protocole du fournisseur. Les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2, MLI-2 (10nM) durant 1 heure. (A) Le panel de gauche montre une image du signal d'amplification en rouge et le panel de droite montre l'image reconstituée avec le noyau en bleu (marquage DAPI), le LRRK2-GFP en vert et le signal d'amplification en rouge. Scale bar, 10µm. (B) Quantification du nombre de points par µm², 30-40 cellules ont été dénombrées pour chaque groupe. Les données sur le graphique sont représentées en moyenne ± SEM. **p<0.01, ***p<0.001 et ****p<0.0001. Valeurs de p sont issues de multiples t-test. Les résultats de l'expérimentation sont issus de 3 co-transfections différentes (n=3), et une image représentative est montrée pour chaque groupe.

A travers l'utilisation de deux inhibiteurs différents, nous obtenons des résultats similaires, c'est-à-dire que la déphosphorylation de LRRK2 induite par un inhibiteur pharmacologique de LRRK2, permet un recrutement des phosphatases au sein du complexe LRRK2 dans le cytoplasme de la cellule.

III - Analyse de l'effet d'une surexpression des sous-unité catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A

En parallèle des analyses de localisation subcellulaire, nous avons aussi décidé de tester l'effet de la surexpression des sous-unités catalytiques et régulatrices des phosphatases sur la phosphorylation de LRRK2 (**Figure 34**).

Le traitement avec l'inhibiteur MLI-2 est utilisé ici comme contrôle et conduit à une diminution significative de la phosphorylation en S935 (**Figure 34A, B**).

La surexpression des sous-unités catalytiques seules, PPP1CA ou PPP2CA n'induit pas de déphosphorylation de LRRK2 (**Figure 34A, B**). En revanche, la surexpression des sous-unités régulatrices PPP2R2B ou PPP1R3F seules induit une déphosphorylation significative de LRRK2 en S935.

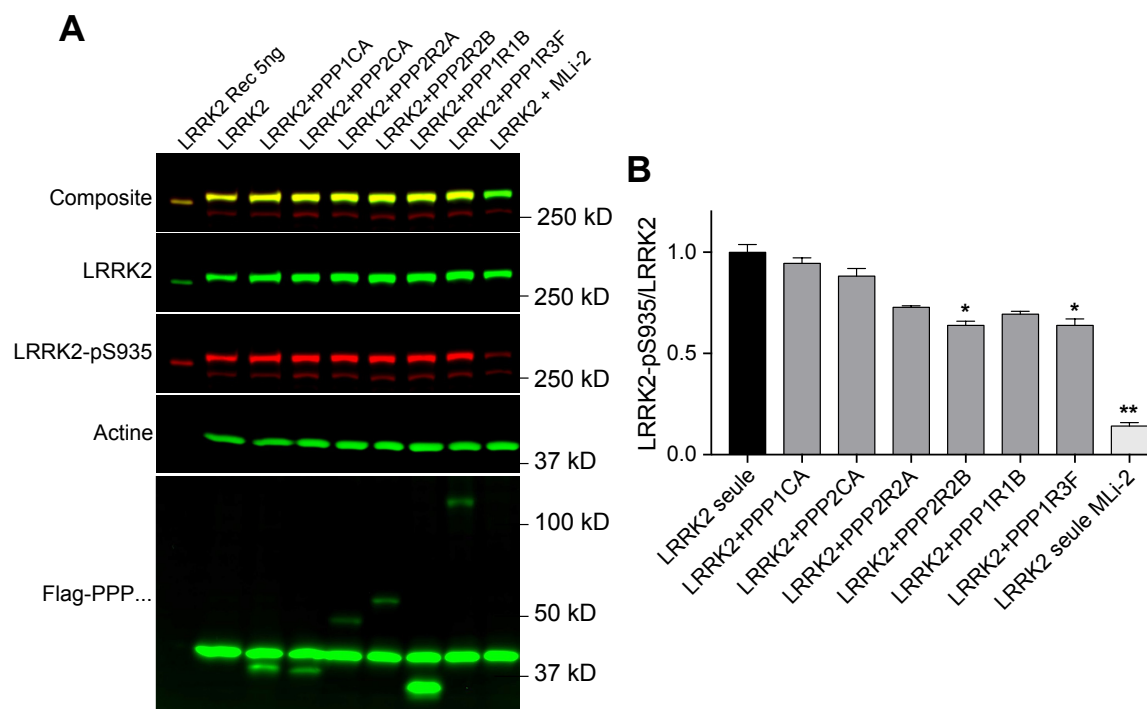


Figure 34 : Effet de la surexpression de sous-unités catalytiques et régulatrices des phosphatases PP1 et PP2A sur la phosphorylation de LRRK2.

Des cellules HEK-293T sont co-transfectées avec les plasmides pCHMWS-GFP-LRRK2 et pEXPR-FLAG-phosphatases comme indiqué. 48 heures post-transfections, les cellules sont traitées une heure avec du DMSO (0,1%) ou avec l'inhibiteur MLI-2 (10nM) puis lysées. Les changements de phosphorylation de LRRK2 en Sérine 935 sont mesurées par WB (A). 10 microgrammes de protéines extraites sont déposés et la β -actine est utilisée comme contrôle de charge. Les histogrammes indiquent les moyennes \pm SEM du rapport pS935/LRRK2 total (B). L'expérimentation a été répétée 3 fois (n=3). * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$. Les valeurs de p sont déterminées par two-tailed t-test.

La surexpression des sous-unités seules ne déphosphoryle pas LRRK2 comme le traitement avec l'inhibiteur Mli-2. Alors que les données de nos collaborateurs (données qui seront publiées ensemble avec les résultats de ce doctorat), montrent une déphosphorylation équivalente à celle de l'inhibiteur pour la surexpression des combinaisons PPP2CA+PPP2R2A,B,C,D ainsi que PPP1CA+PPP1R3F (Annexe 3). Pour une déphosphorylation optimale, il faut la présence de l'holoenzyme complète (sous-unités catalytique et régulatrice).

IV - Analyse cinétique de la déphosphorylation de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*)

Les données obtenues par les études d'association subcellulaire ainsi que les résultats *in vitro* et obtenus par nos collaborateurs au Parkinson Institute (**Annexe 3**), nous ont permis de sélectionner l'holoenzyme PP2A comme candidat à la déphosphorylation de LRRK2. Pour aller plus loin par rapport aux effets des phosphatases sur le taux de déphosphorylation de LRRK2 dans le contexte cellulaire, nous avons testé l'effet des holoenzymes PPP2CA-PPP2R2A/B sur la phosphorylation de LRRK2 en micro-injectant les protéines recombinantes dans le modèle d'ovocytes de Xénope. La cinétique de la déphosphorylation de LRRK2 en culture cellulaire suite à un traitement avec des inhibiteurs est rapide et est d'environ 80% de déphosphorylation en moins de 30 minutes (X. Deng et al. 2011; Doggett et al. 2012; N. Dzamko et al. 2010). C'est pour cela que le modèle physiologique Xénope est très intéressant car il permet l'injection de protéines recombinantes dans des ovocytes, ces protéines sont ainsi directement disponibles au sein de la cellule.

IV.A - Production et purification des protéines à micro-injecter

La première étape a consisté à produire les protéines recombinantes en vue de leur injection dans des ovocytes (**Figure 35**). Brièvement, les protéines à purifier sont exprimées dans des cellules HEK-293T qui sont transfectées avec les plasmides contenant 3xFLAG-LRRK2 ou FLAG-phosphatases. 48 heures post-transfections, les cellules sont lysées et nos protéines d'intérêt possédant le tag FLAG sont capturées par immunoaffinité à l'aide de billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-FLAG. Après des étapes de lavage, les protéines sont éluées par ajout de peptide 3xFLAG. Enfin les billes sont incubées avec du tampon de dénaturation et analysées par une

coloration au nitrate d'argent et également par WB en utilisant l'anticorps anti-FLAG M2 (**Figure 36**).

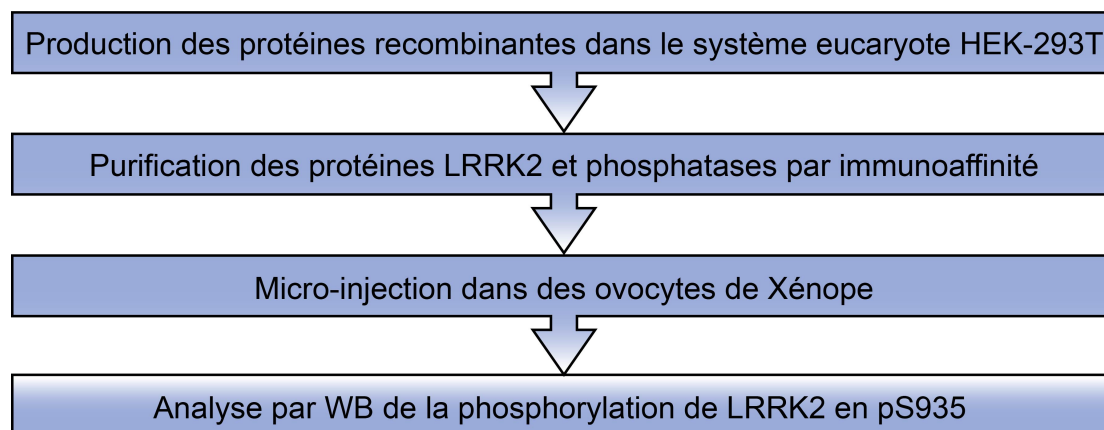


Figure 35 : Représentation schématique de la procédure expérimentale.

Les plasmides p3xFLAG-CMV10-LRRK2 et pEXPR-FLAG-phosphatases codant respectivement la protéine LRRK2 et les protéines phosphatases sont transfectées dans des cellules HEK-293T. 48 heures post-transfection, les cellules sont lysées et les protéines sont purifiées par affinité avec des billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-FLAG. Après micro-injection des protéines dans des ovocytes, des lysats protéiques sont récupérés à des temps précis pour être analysés par WB.

La pureté et l'intégrité des phosphatases sont vérifiées par visualisation des protéines sur gel SDS-PAGE 4-12% (**Figure 36A, B**). La visualisation des protéines par coloration à l'argent et par WB a permis de mettre en évidence la présence des différentes sous-unités, catalytiques ou régulatrices purifiées. De même, la coloration à l'argent montre une purification des sous-unités catalytique et régulatrice (**Figure 36B**).

Afin de vérifier leur pureté, il faut comparer la masse moléculaire obtenue pour chacune avec leur masse moléculaire attendue. En ce qui concerne PPP2R2B, la masse moléculaire observée est plus grande que celle attendue. Après une vérification par spectrométrie de masse, nous avons pu confirmer qu'il s'agissait bien de la protéine PPP2R2B (données non montrées).

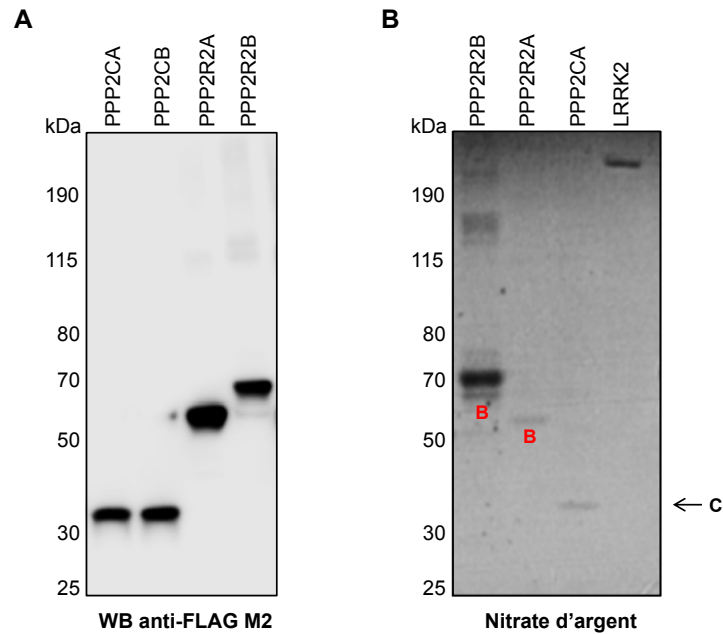


Figure 36 : Vérification de la pureté des protéines pour les micro-injections dans le modèle ovocyte.

Les protéines sont déposées et séparées sur un gel 4-12% Bis-Tris pour une détection par WB en utilisant l'anticorps anti-FLAG M2 (A) et une révélation au nitrate d'argent (B). Les protéines présentes sur ces gels sont la protéine LRRK2 (B), des sous-unités catalytiques ou régulatrices de PP2A (A et B). Sur le gel coloré au nitrate d'argent, B correspond à la sous-unité régulatrice de 55kDa pour PPP2R2A et 60kDa pour PPP2R2B ; C correspond à la sous-unité catalytique de 36kDa.

IV.B - Cinétique de déphosphorylation de LRRK2

Cette expérimentation est faite en collaboration avec Dr. Katia Cailliau-Maggio et Dr. Alain Martoriati, travaillant au sein du Laboratoire UMR8576-CNRS dans l'équipe « Régulation des signaux de division » qui est sous la direction du Prof. Jean-François Bodart.

Après micro-injection de la protéine LRRK2 (1^{ère} injection), les combinaisons suivantes ont été utilisées lors de la seconde injection :

- Tampon élution
- PPP2CA
- PPP2CA+PPP2R2A
- PPP2CA+PPP2R2B

Suite à la seconde injection, des lysats sont récupérés au bout de 30 minutes, 1, 2 et 4 heures (**Figure 37**). L'analyse WB de la cinétique de déphosphorylation de LRRK2 par les combinaisons de la seconde injection est donnée en **Figure 37A**.

Dans notre expérimentation, le niveau basal de la phosphorylation en pS935 de LRRK2 correspond à l'injection du Tampon d'éluion, le rapport LRRK2-pS935/LRRK2 reste stable au cours du temps (**Figure 37B**). On observe un rapport LRRK2-pS935/LRRK2 plus élevé pour la sous-unité PPP2CA seule comparé aux combinaisons sous-unités catalytiques et régulatrices injectées ensembles sur toute la durée de l'expérimentation. L'injection des holoenzymes (sous-unité catalytique et régulatrice), combinaisons PPP2CA+PPP2R2A et PPP2CA+PPP2R2B, entraîne une déphosphorylation rapide dès 30 minutes avec une différence significative pour la combinaison PPP2CA+PPP2R2B comparée à la condition Tampon d'éluion (**Figure 37B**). Aux temps une heure, deux heures et quatre heures, les combinaisons PPP2CA+PPP2R2A et PPP2CA+PPP2R2B entraîne une diminution du rapport LRRK2-pS935/LRRK2 qui est significative (**Figure 37B**).

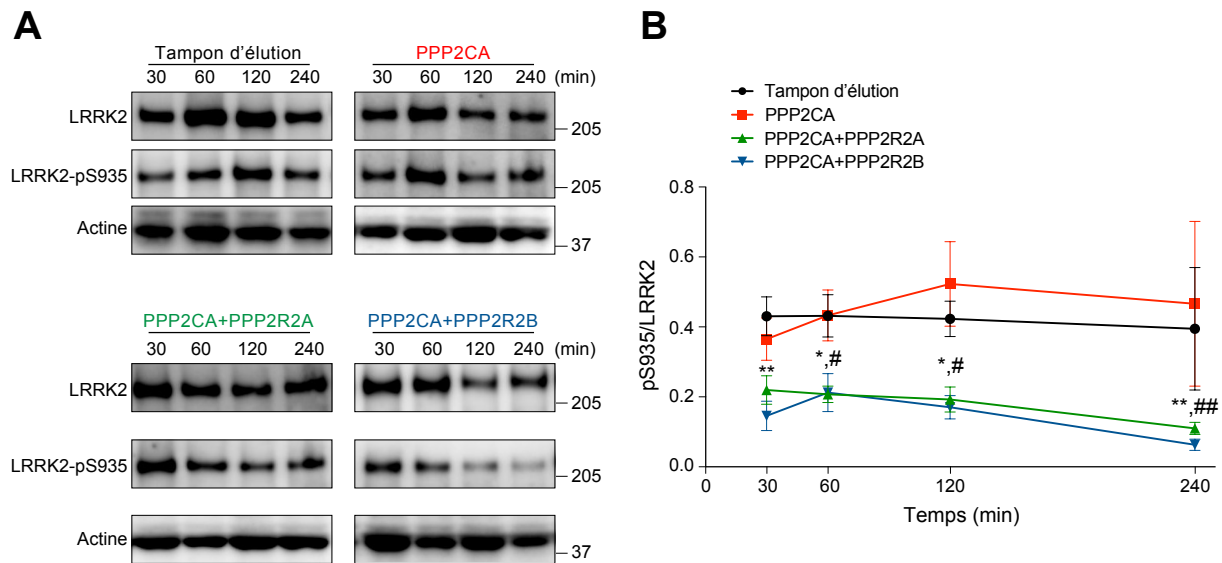


Figure 37 : Analyse cinétique de l'effet de phosphatases recombinantes sur la phosphorylation pS935 de LRRK2 dans des ovocytes de Xénope.

Des ovocytes de Xénope ont été micro-injectés avec des phosphatases recombinantes selon différentes combinaisons (voir ci-dessus). (A) WB représentatif de l'expérimentation, les échantillons sont détectés avec les anticorps LRRK2 total, LRRK2 phosphorylé en S935 et actine. (B) Le graphique représente l'évolution au cours du temps du rapport LRRK2-pS935 sur LRRK2 totale. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM. Les différences statistiques ont été testées par ANOVA à 2 voies avec le temps et les combinaisons injectées comme facteurs, suivie par le test post-hoc de Bonferroni visant à comparer les effets des combinaisons injectées par rapport à la condition du groupe contrôle (LRRK2 +tampon d'éluion) pour chaque point temporel. *, # P < 0,05 ; **, ### P < 0.01; ns = non significatif ; les symboles * et # désignent des différences significatives pour les groupes PPP2CA+PPP2R2B et PPP2CA+PPP2R2A respectivement, par rapport au groupe contrôle, Tampon d'éluion. L'expérience a été réalisée à trois reprises (n=3) à partir de deux micro-injections indépendantes.

Ce modèle nous a permis d'appréhender la cinétique de déphosphorylation de LRRK2 par différentes combinaisons de l'holoenzymes PP2A. Tout d'abord, nous avons pu démontrer que

LRRK2 est un substrat de PP2A. En effet PP2A est capable de déphosphoryler LRRK2 en pS935. De plus, la déphosphorylation est plus importante lorsque l'holoenzyme PP2A est « complète » c'est-à-dire la sous-unité catalytique est associée à sa sous-unité régulatrice.

Modulation de l'expression des phosphatases par la technologie CRISPR-Cas9

Dans les précédentes parties des résultats, nous avons mis en évidence plusieurs phosphatases (sous-unités catalytiques et régulatrices) de PP1 et PP2A comme potentiel candidat régulateur de la phosphorylation de LRRK2.

Afin de confirmer les phosphatases agissant sur la régulation de la phosphorylation de LRRK2 sur le LRRK2 endogène, nous avons choisi d'utiliser la technologie CRISPR/dCas9. Cette approche a pour principal avantage de nous permettre de moduler l'expression endogène des phosphatases candidates.

Cette méthode de manipulation génétique repose sur l'utilisation d'une protéine Cas9 bactérienne qui est recrutée à une région spécifique de l'ADN génomique à l'aide d'un ARN guide (sgARN) complémentaire de l'ADN ciblée. Nous avons utilisé une protéine Cas9 modifiée, appelée dCas9, dont les domaines nucléases sont désactivés. Cette protéine modifiée dCas9 est alors utilisée pour modifier la régulation de l'expression de gènes. La protéine dCas9 peut être d'une part couplée à un répresseur, le domaine KRAB par exemple, l'accès de l'ARN polymérase à l'ADN est alors bloqué, ce qui entraîne une répression de la transcription. Ce processus est connu sous le nom de CRISPRi. D'autre part, la protéine dCas9 peut être couplée à un activateur transcriptionnel, le domaine VP64 par exemple, l'expression génique peut alors être efficacement activée. Ce processus est aussi connu sous le nom de CRISPRa (Gilbert et al. 2013; J.-J. Park et al. 2017; Du and Qi 2016b).

I - Design des guides ARN pour le ciblage des phosphatases

Un obstacle dans l'application CRISPR-Cas9 est la bonne détermination des séquences sgARN apparentées à un gène donné afin que le système soit efficace dans la régulation de l'expression des

protéines cibles. Même de petits changements de position le long de la séquence génomique cible sont suffisants pour altérer la fonction et l'efficacité du système CRISPR-Cas9.

La séquence sgARN doit être déterminée au niveau de la région du TSS, plus particulièrement en ciblant une zone allant de -500 à +300 autour du TSS (Gilbert et al. 2014; Konermann et al. 2015). Pour déterminer la zone du TSS de chacune des phosphatases cibles, nous nous sommes servis de deux bases de données différentes, « RefSeq genes » et « EDP The Eukaryotic Promoter Database » (**Figure 38**).

En comparant la position les deux bases de données on peut noter des différences dans la position du TSS. Si on prend l'exemple du gène PPP1CA (**Figure 38**), on observe une différence de 50 bases entre le début du TSS donné par RefSeq (**Figure 38A**) et le début du promoteur (=TSS) donné par EDP (**Figure 38B**). En comparant ces annotations de TSS à une autre base de données, la base FANTOM5/CAGE (FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) et al. 2014) on note aussi une différence de quelques dizaines de bases (**Figure 38C**).

Des données de la littérature suggèrent que l'utilisation des annotations TSS de la base de données FANTOM5/CAGE constitue la référence la plus fiable pour concevoir des sgARN de CRISPRi efficaces (Radzisheuskaya et al. 2016; Zheng et al. 2018).

Une fois la région identifiée, celle-ci est rentrée dans le logiciel « Optimized CRISPR Design – MIT » (<http://crispr.mit.edu>). A partir de la séquence rentrée, le logiciel va déterminer des séquences uniques sgARN, que l'on a testées par la suite.

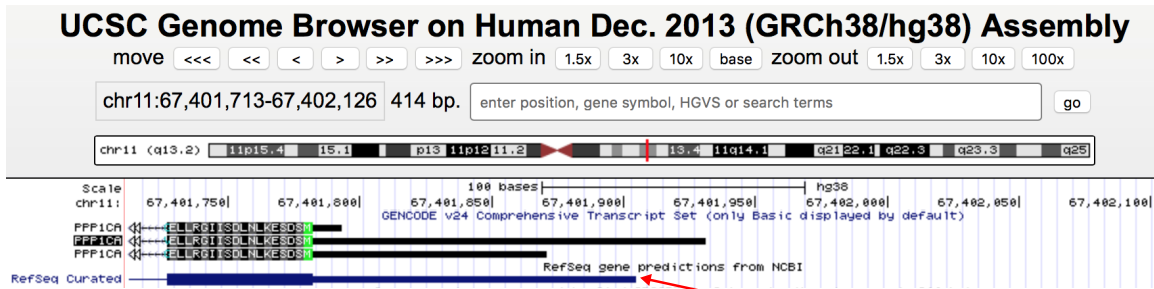
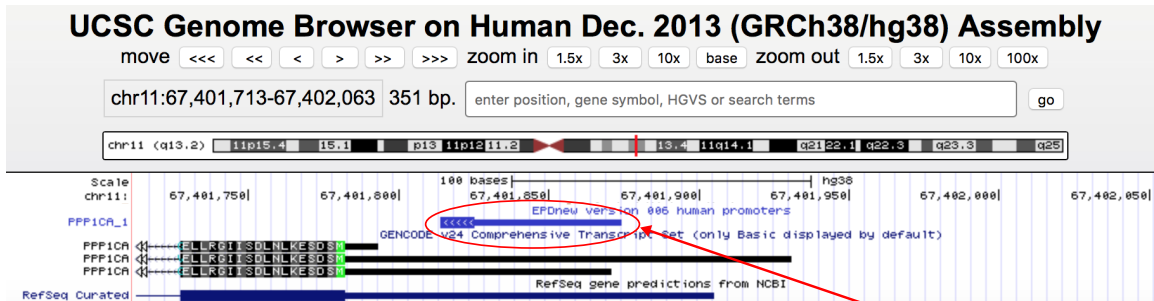
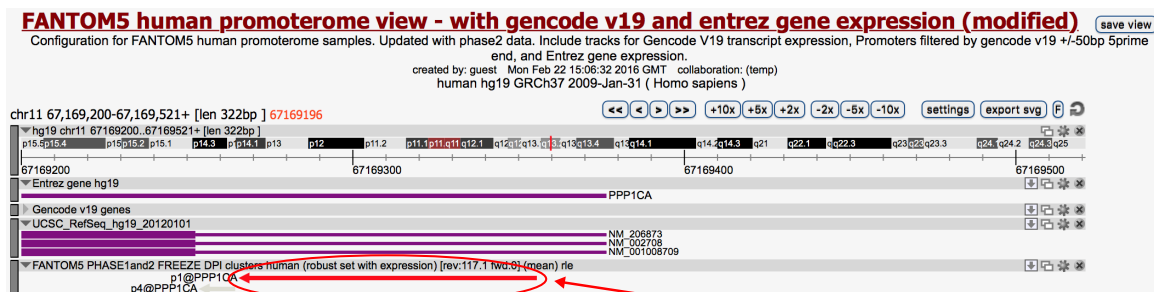
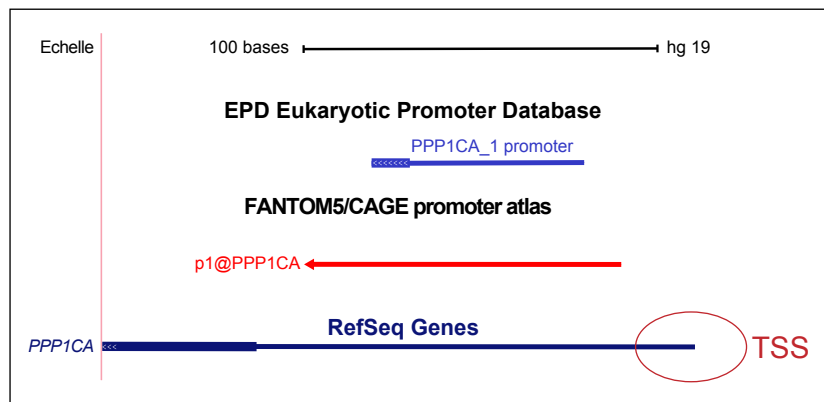
A**B****C****D**

Figure 38 : Détermination de la région du TSS du gène PPP1CA.

La région du TSS a été déterminée en utilisant les annotations issues de RefSeq (A) ou bien de EDP The Eukaryotic Promoter Database (B). L'annotation par la base de données FANTOM5/CAGE est montrée en (C). Le panneau du bas est une représentation d'un alignement de la disposition des promoteurs selon les trois bases de données, la zone du TSS est indiquée par un trait bleu (terme PPP1CA_1 promoter) pour la base de données EPD, par la flèche rouge

pour la base de données FANTOM5 et par le cercle rouge pour la base de données RefSeq Genes (D). Cet alignement met en évidence des différences de localisation du TSS selon les bases de données.

II - Mise en place du système CRISPR-dCas9 dans la lignée de neuroblastome humains SH-SY5Y

II.A - Etablissement de lignées stables dCas9

Dans un premier temps, des lignées cellulaires stables de SH-SY5Y exprimant les protéines dCas9-KRAB ou dCas9-VP64 ont été générées. (**Figure 39**). Pour établir ce système, des cellules SH-SY5Y ont été infectées de manière aiguë avec des vecteurs lentiviraux permettant l'expression des protéines dCas9-KRAB ou dCas9-VP64. Ces cellules ont ensuite été mises en sélection en présence de puromycine. L'expression des protéines Cas9 a été vérifiée et confirmée par WB en utilisant l'anticorps anti-Cas9 (**Figure 39B**).

II.B - Expression des guides sgARN dans les cellules SH-SY5Y-dCas9

L'obtention d'une bonne efficacité du système CRISPR-dCas9 repose en grande partie sur une efficacité de transfection élevée du sgARN ainsi que son import dans le noyau, où est localisée la séquence génomique cible à modifier. Notre choix s'est naturellement orienté vers l'utilisation de vecteur lentiviraux qui permettent d'infecter un très grand nombre de cellules comparé à une transfection simple. Aussi, l'intégration de la cassette d'expression dans le génome permet le maintien de l'expression suite à la division cellulaire.

Pour tester l'effet du système CRISPR-dCas9, nous avons conçu un protocole d'évaluation de la fonctionnalité des sgARN individuels dans la répression ou l'augmentation de l'expression de leur gène cible respectif (**Figure 39A**).

Les cellules SH-SY5Y exprimant les protéines dCas9-KRAB ou dCas9-VP64 sont transduites avec les constructions sgARN ciblant les différentes phosphatases sélectionnées ainsi qu'un sgARN contrôle. Le sgARN contrôle est une séquence de 20pb qui ne cible aucune région du génome.

Les cellules ont été sélectionnées en présence d'hygromycine à partir du 2^{ème} ou 3^{ème} jour puis les cellules ont été collectées pour l'analyse de l'expression des phosphatases cibles. Les niveaux de transduction sont contrôlés avec l'expression de la protéine mCherry pendant l'étape de sélection (**Figure 39C**).

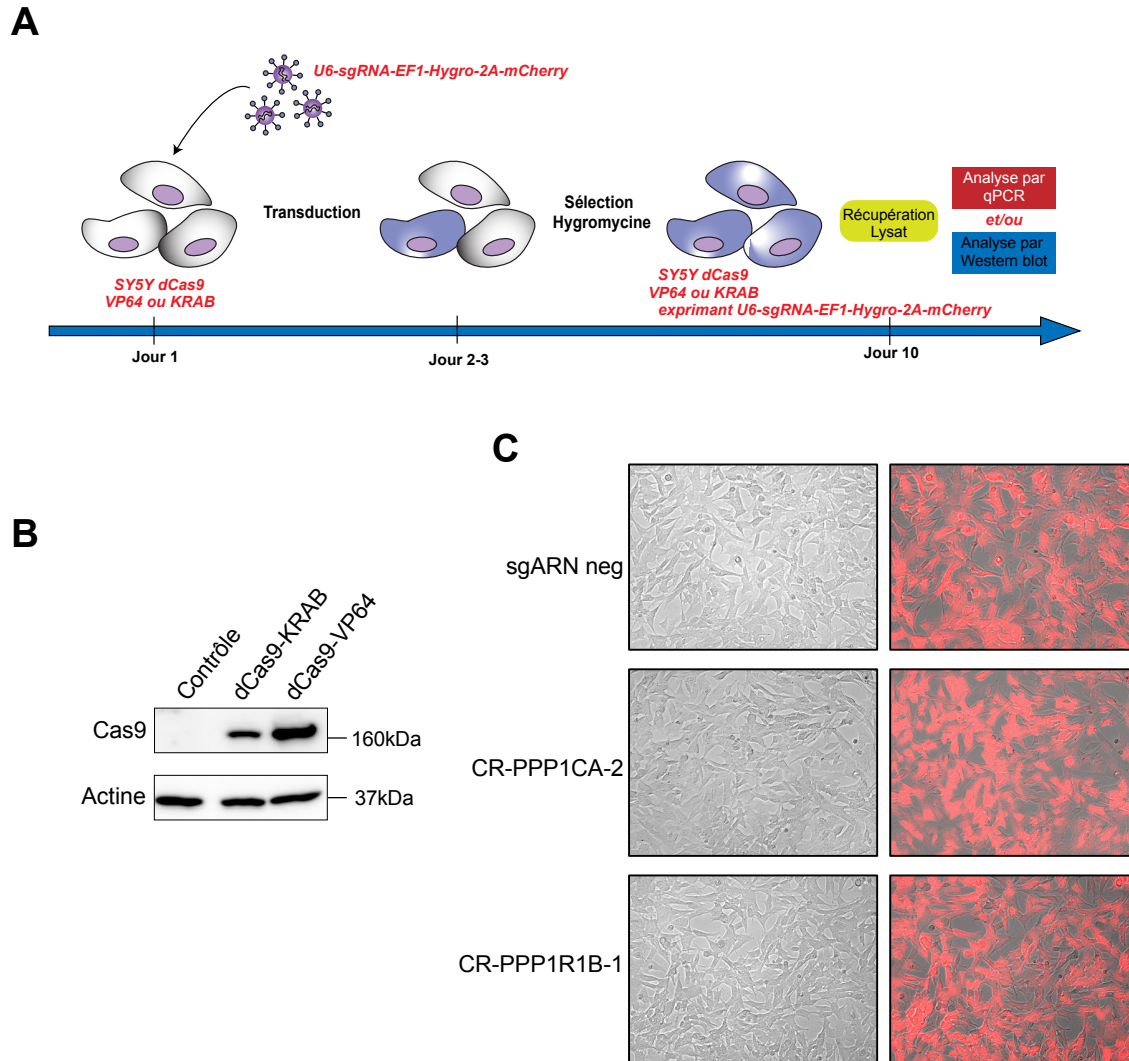


Figure 39 : Etablissement du système CRISPR-dCas9 dans la lignée cellulaire SH-SY5Y.

(A) Conception expérimentale utilisée pour évaluer l'efficacité des sgARN sur la régulation de l'expression du gène cible. (B) Des Cellules SH-SY5Y ont été transduites avec les vecteurs pHAGE-EF1 α -KRAB ou pHAGE-EF1 α -VP64. Après sélection avec de la puromycine à 1 μ g/mL, les cellules sont lysées et analysées par immunoblot avec l'anticorps anti-Cas9. Le puit contrôle correspond à des cellules non transduites et non sélectionnées. (C) Les Cellules SH-SY5Y-dCas9 ont été transduites avec les lentivecteurs exprimant les sgARN ciblant PPP1CA, PPP1R1B et le sgARN contrôle puis sélectionnées avec l'hygromycine (200 μ g/ml). Par l'intermédiaire de la protéine mCherry nous pouvons contrôler l'efficacité de la procédure de transduction et de sélection.

II.C - Validation des guides ARN pour le ciblage des phosphatases

L'efficacité des sgARN a été évaluée de la manière suivante : nous avons d'abord mesuré les niveaux d'expression des protéine phosphatases par WB. Lorsque le résultat du WB n'était pas convaincant, nous avons vérifié par RT-qPCR les niveaux d'expression de l'ARNm des

phosphatases cibles. En effet, pour certaines cibles le signal donné en WB était faible ou bien les anticorps n'étaient pas spécifiques de notre cible, ainsi plusieurs bandes pouvaient être visibles.

II.C.1 - Phosphatase PP1

Afin d'identifier les sgARN les plus efficaces dans la régulation de l'expression de la sous-unité catalytique PPP1CA, des cellules SH-SY5Y exprimant la protéine dCas9-VP64 ont été transduites avec des sgARN différents. Tous les résultats obtenus ne sont pas présentés mais voici quelques exemples de sgARN testés. L'analyse par RT-qPCR de l'effet de ces sgARN sur les niveaux de transcrits de PPP1CA montrent que le sgARN PPP1CA-2 est celui qui conduit à une augmentation la plus forte (**Figure 40A**). Ce résultat a été confirmé par WB (**Figure 40B**). En parallèle, nous avons testé ce sgARN dans le système CRISPRi. Nous pouvons observer que le sgARN PPP1CA-2 est efficace à réprimer les niveaux de transcrits de PPP1CA comme le montre les résultats de RT-qPCR (**Figure 40C**) et de WB où une diminution de l'expression est visible comparé au sgARN négatif (**Figure 40D**).

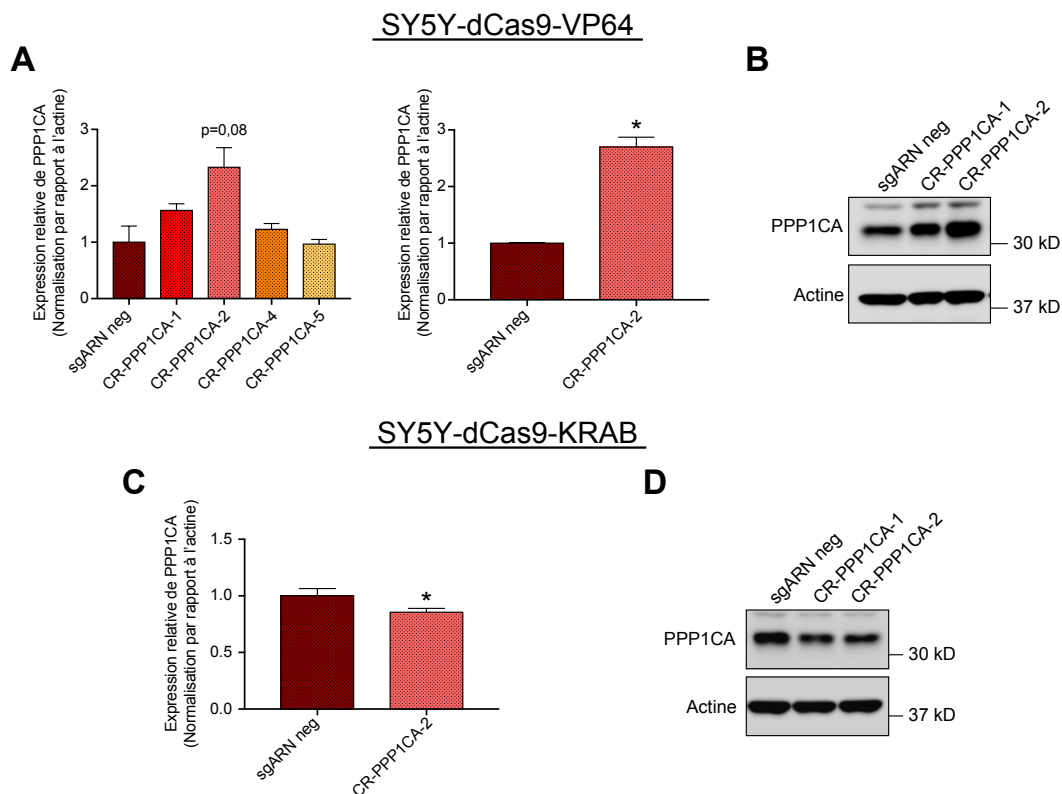


Figure 40 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité catalytique PPP1CA.

Des cellules SH-SY5Y-dCas9-VP64 (A, B) et KRAB (C, D) ont été transduites avec différents sgARN ciblant la région promotrice du gène PPP1CA. En parallèle un contrôle sgARN négatif a été inclus. 10 jours après sélection et expansion de la culture, les cellules ont été collectées, une moitié a été utilisée pour mesurer l'expression d'ARNm par RT-qPCR, tandis que la seconde moitié a été appliquée à l'analyse des niveaux d'expression de la protéine PPP1CA par WB. L'analyse par RT-qPCR (A, C) et par WB (B, D) de l'expression de l'ARNm et de la protéine PPP1CA respectivement suggère que le sgARN PPP1CA-2 est le plus efficace en CRISPRa (A, B) et en CRISPRi (C, D). Les données sur les graphiques sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$. Les différences entre les valeurs moyennes des groupes ont été déterminées par une analyse Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn pour une comparaison de plus de deux groupes ou par une analyse Mann-Whitney pour une comparaison de seulement deux groupes.

Des sgARN ciblant la sous-unité régulatrice PPP1R1B ont été testés par WB. Comme on peut l'observer le sgARN PPP1R1B-1 conduit à une très forte augmentation de PPP1R1B (**Figure 41A**) avec le système CRISPRa. De plus, le sgARN PPP1R1B-1 est efficace dans le système CRISPRi comme le montre l'absence de détection d'une bande sur le WB (**Figure 41B**).

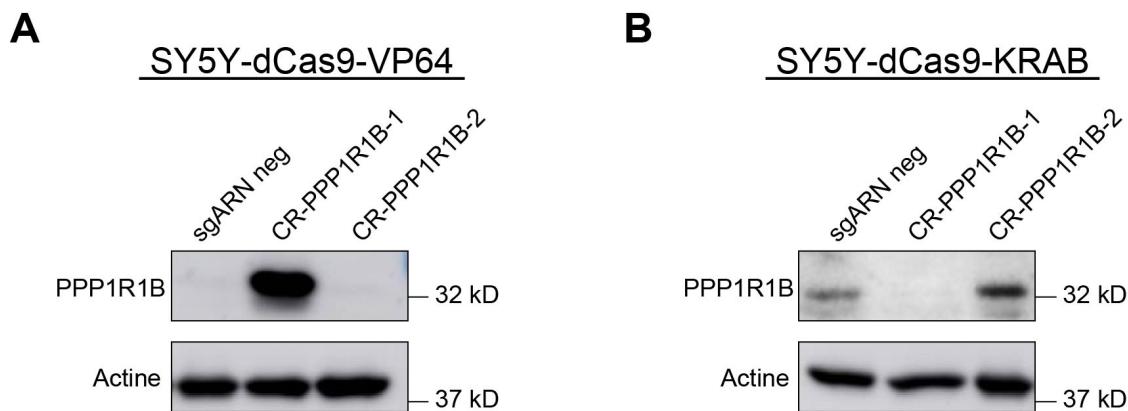


Figure 41 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité régulatrice PPP1R1B.

Des cellules SH-SY5Y-dCas9-VP64 (A) et KRAB (B) ont été transduites avec différents sgARN ciblant la région promotrice du gène PPP1R1B. En parallèle un contrôle sgARN négatif a été inclus. 10 jours après sélection et expansion de la culture, les cellules ont été collectées et analysées par WB avec l'anticorps anti-DARPP32, les temps d'exposition sur la figure sont différents, quelques secondes pour l'image A, alors que le temps d'exposition de l'image B correspond à une dizaine de minutes. La β -actine est utilisée comme contrôle de charge.

II.C.2 - Phosphatase PP2A

Au vu des résultats précédents, la sous-unité catalytique PPP2CA est une phosphatase importante pour LRRK2. Nous avons donc testé plusieurs sgARN ciblant PPP2CA. Le sgARN PPP2CA-7 semble être le plus efficace pour augmenter l'expression de la protéine PPP2CA dans le système CRISPRa (**Figure 42B**). Afin de confirmer cette observation, nous avons également analysé par RT-qPCR l'expression de l'ARNm de PPP2CA. Cette expression est augmentée le plus fortement avec le sgARN PPP2CA-7 (**Figure 42A**)

Malheureusement au cours de cette thèse nous n'avons pas pu valider de sgARN ciblant PPP2CA pour le système CRISPRi.

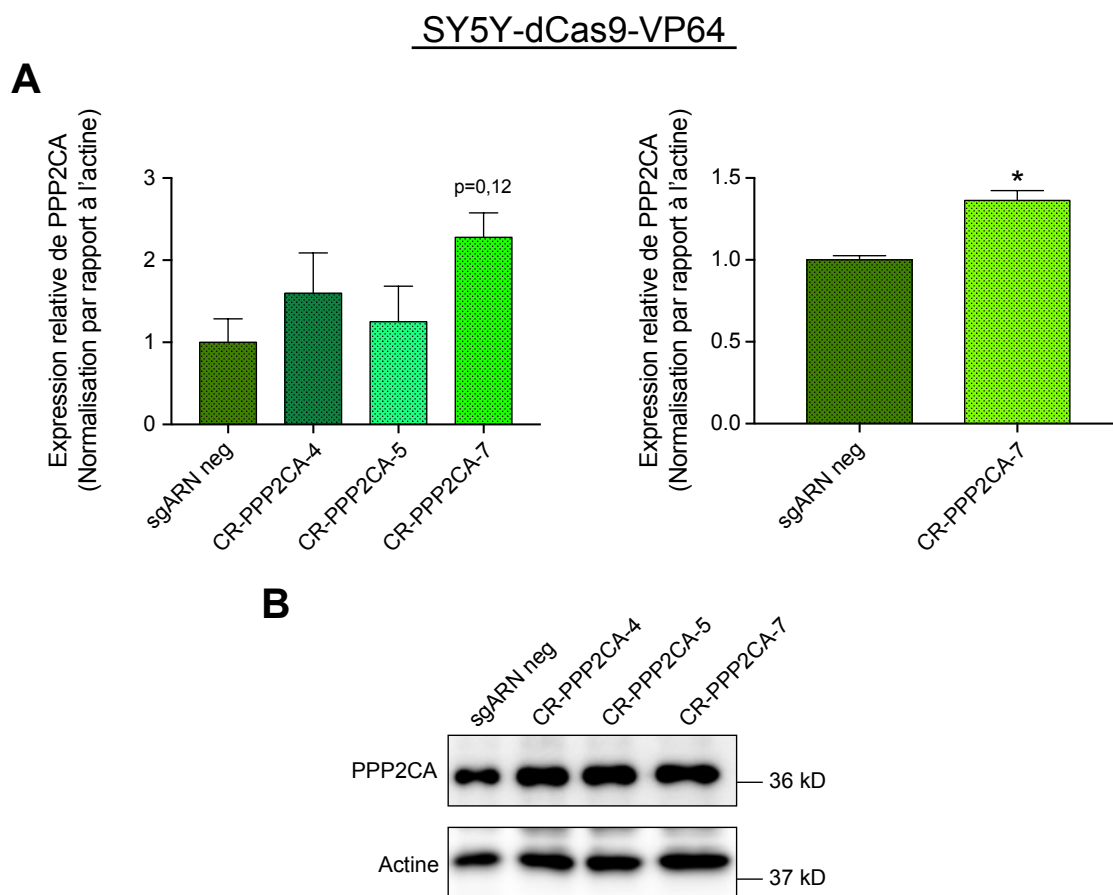


Figure 42 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité catalytique PPP2CA.

Des cellules SY5Y-dCas9-VP64 ont été transduites avec différents sgARN ciblant la région promotrice du gène PPP2CA. En parallèle un contrôle sgARN négatif a été inclus. 10 jours après sélection et expansion de la culture, les cellules ont été collectées, une moitié a été utilisée pour mesurer l'expression d'ARNm par RT-qPCR, tandis que la seconde moitié a été appliquée à l'analyse des niveaux d'expression de la protéine PPP2CA par WB. L'analyse par RT-qPCR (A) et par WB (B) de l'expression de l'ARNm et de la protéine PPP2CA respectivement suggère que le sgARN PPP2CA-7 est le plus efficace en CRISPRa (A, B). Les données sur les graphiques sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$. Les différences entre les valeurs moyennes des groupes ont été déterminées par une analyse Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn pour une comparaison de plus de deux groupes ou par une analyse Mann-Whitney pour une comparaison de seulement deux groupes.

La sous-unité régulatrice PPP2R2A a aussi émergé comme un candidat très important pour l'étude de la phosphorégulation de LRRK2. Nous avons designé plusieurs sgARN ciblant PPP2R2A. L'analyse par WB de quatre sgARN a montré que tous étaient fonctionnels dans le système CRISPRa avec une augmentation de l'expression de la protéine PPP2R2A comparé au sgARN négatif (Figure 43B). La mesure de l'expression de l'ARNm a confirmé ce résultat (Figure 43A).

Etant donné que le sgARN PPP2R2A-7 est le plus efficace dans le système CRISPRa (**Figure 43A et B**), nous l'avons testé aussi dans le système CRISPRi (**Figure 43B et C**). Les résultats de RT-qPCR et de WB confirme l'efficacité du sgARN PPP2R2A-7 avec le système CRISPRi où une diminution de l'expression de PPP2R2A est observable.

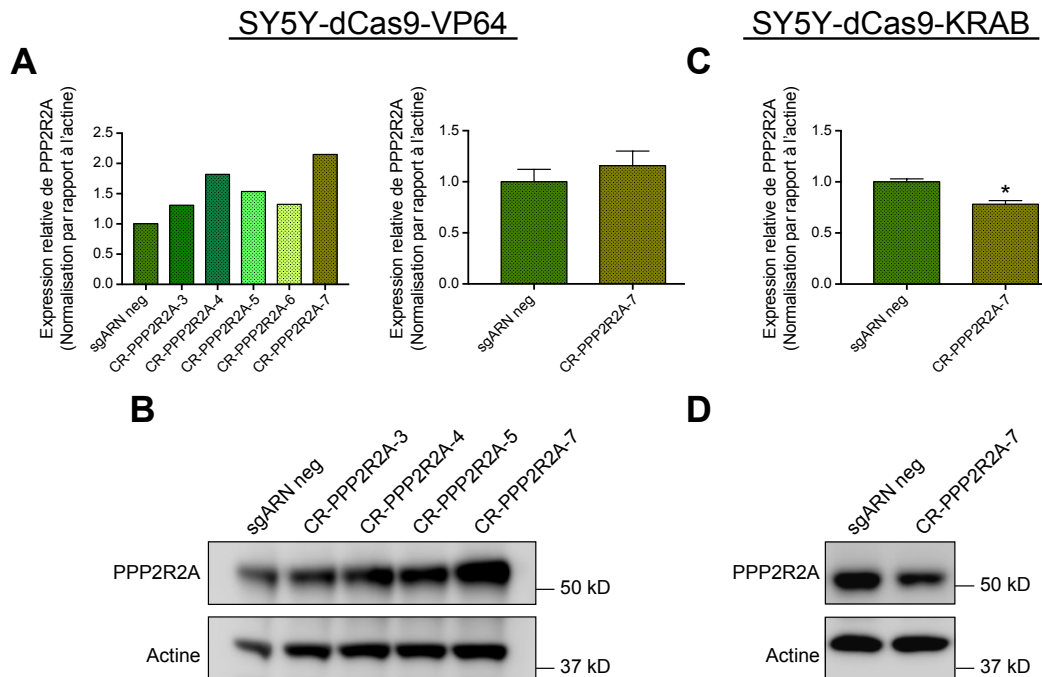


Figure 43 : Identification de sgARN fonctionnel ciblant la sous-unité régulatrice PPP2R2A.

Des cellules SH-SY5Y-dCas9-VP64 (A, B) et KRAB (C, D) ont été transduites avec différents sgARN ciblant la région promotrice du gène PPP2R2A. En parallèle un contrôle sgARN négatif a été inclus. 10 jours après sélection et expansion de la culture, les cellules ont été collectées, une moitié a été utilisée pour mesurer l'expression d'ARNm par RT-qPCR, tandis que la seconde moitié a été appliquée à l'analyse des niveaux d'expression de la protéine PPP1CA par WB. L'analyse par RT-qPCR (A, C) et par WB (B, D) de l'expression de l'ARNm et de la protéine PPP2R2A respectivement suggère que le sgARN PPP2R2A-7 est le plus efficace en CRISPRa (A, B) et en CRISPRi (C, D). Les données sur les graphiques sont représentées en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$. Les différences entre les valeurs moyennes des groupes ont été déterminées par une analyse Mann-Whitney pour une comparaison de seulement deux groupes.

L'étape de validation des sgARN ciblant les protéines phosphatases nous a permis de sélectionner les sgARN PPP1CA-2, PPP1R1B-1, PPP2CA-7 et PPP2R2A-7, ciblant les phosphatases PPP1CA, PPP1R1B, PPP2CA et PPP2R2A respectivement. Ces sgARN vont pouvoir être utilisés pour étudier la phosphorylation de LRRK2 en manipulant l'expression endogène de ces phosphatases.

II.C.3 - Conclusion sur nos designs de sgARN

Plusieurs facteurs sont essentiels pour un fonctionnement et un résultat optimal de la technique CRISPR-Cas9. Le facteur le plus important est l'identification du TSS qui est primordiale dans le cas du CRISPRi et CRISPRa. En générale, la fenêtre recommandée autour du TSS est de -50 à +300 pb pour CRISPRi (Gilbert et al. 2014), ou -400 à -50 pb CRISPRa (Konermann et al. 2015). Nous avons utilisé les bases de données RefSeq genes (2016-03-04) et EPD (Eucaryotic Promoter Database) pour déterminer les séquences proches du TSS pour nos gènes d'intérêt. Dans nos expériences, nous avons pu montrer que la technique fonctionnait, avec des résultats positifs pour différentes sous-unités, PPP1CA, PPP1R1B, PPP2CA et PPP2R2A. Pour les gènes dont les résultats ont été présentés au cours de cette thèse, la séquence sgARN ciblait une zone entre -100 et +1 autour du TSS. La séquence sgARN pour PPP1R1B, qui démontre la plus forte activation, se trouve à -65 du TSS (**Annexe 2**). Ceci est en accord avec la zone à cibler par le CRISPRa (Du and Qi 2016b; Du and Qi 2016a). Ces résultats prouvent donc que l'identification de la séquence proche du TSS était correct. Cependant, il existe à ce jour de multiple base de données. Dans notre discussion, nous parlerons seulement de la base de données FANTOM/CAGE5 (FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT) et al. 2014). Nous avons effectué un travail a posteriori pour identifier des moyens nous permettant d'améliorer l'efficacité de la méthode. En effet, le taux de réussite, qui correspond ici au nombre de sgARN fonctionnant sur le nombre testé au départ n'est pas très élevé, environ 10%. Comme mentionné auparavant, l'identification du TSS est primordiale, nous avons donc fait un alignement des TSS données par les trois bases de données que nous venons de mentionner pour chacun des gènes testés (Voir **Annexe 2**). On peut observer un positionnement différent du TSS pour certains gènes testés selon les trois bases de données. Si l'on prend l'exemple de PPP2CA, on observe une différence d'environ 200pb entre le début du TSS donné par la RefSeq et celle qui est donné par les bases de données FANTOM ou EPD (**Annexe 2**). Cette différence est importante si on prend en considération la fenêtre de 300 à 500pb autour du TSS qui est généralement recommandée. Une étude a démontré que les séquences sgARN les plus efficaces l'ont été en utilisant la zone du TSS prédite par la base FANTOM5/CAGE (Radzishenskaya et al. 2016). Aujourd'hui il existe des logiciels, par exemple CRISPR-ERA qui permettent l'obtention d'une séquence sgARN sans avoir préalablement donné une séquence autour du TSS (H. Liu et al. 2015). En effet, pour ce type de logiciel, il suffit de donner le nom du gène que l'on souhaite cibler et l'application avec laquelle on souhaite le cibler (CRISPRi ou

CRISPRa). Le logiciel propose ensuite des séquences sgARN autour du TSS en utilisant leur propre base de données.

Nos résultats montrent que cette technologie est fiable et efficace avec soit une augmentation ou une diminution significative de l'expression des quelques phosphatases testées.

II.D - Effet de la modulation de l'expression des phosphatases sur la phosphorylation de LRRK2 en pS935

Le système CRISPR-Cas9 validé, nous avons analysé l'effet de la modulation endogène des protéines phosphatases sur la phosphorylation de LRRK2 en pS935.

Des cellules SH-SY5Y exprimant le système CRISPRa ou CRISPRi sont transduites avec les sgARN validés (cfr. supra) et la phosphorylation de LRRK2 en pS935 est analysée par WB. Pour cette analyse, nous n'avons pris en considération que les WB où l'effet de la modulation de la phosphatase était significativement différent du sgARN négatif. Un LRRK2 recombinant (LifeTechnologies) est déposé comme contrôle pour déterminer quelle bande correspond à LRRK2, ceci est notamment vrai pour LRRK2-pS935 qui donne plusieurs bandes non-spécifiques.

La modulation de l'expression de PPP1CA n'affecte pas la phosphorylation de LRRK2 (**Figure 44A**). Par contre on observe une augmentation ($p=0.09$) de la protéine LRRK2 quand l'expression de PPP1CA est augmentée.

De manière intéressante, la modulation de l'expression de PPP1R1B affecte la phosphorylation de LRRK2. En effet, quand la sous-unité régulatrice inhibitrice PPP1R1B est augmentée, on observe une augmentation significative ($p<0.05$) de la phosphorylation de LRRK2 ainsi qu'une diminution de la protéine LRRK2 totale ($p=0.06$) (**Figure 44B**). Inversement, la diminution de PPP1R1B n'affecte pas la phosphorylation de LRRK2 ni le niveau de protéine LRRK2 totale.

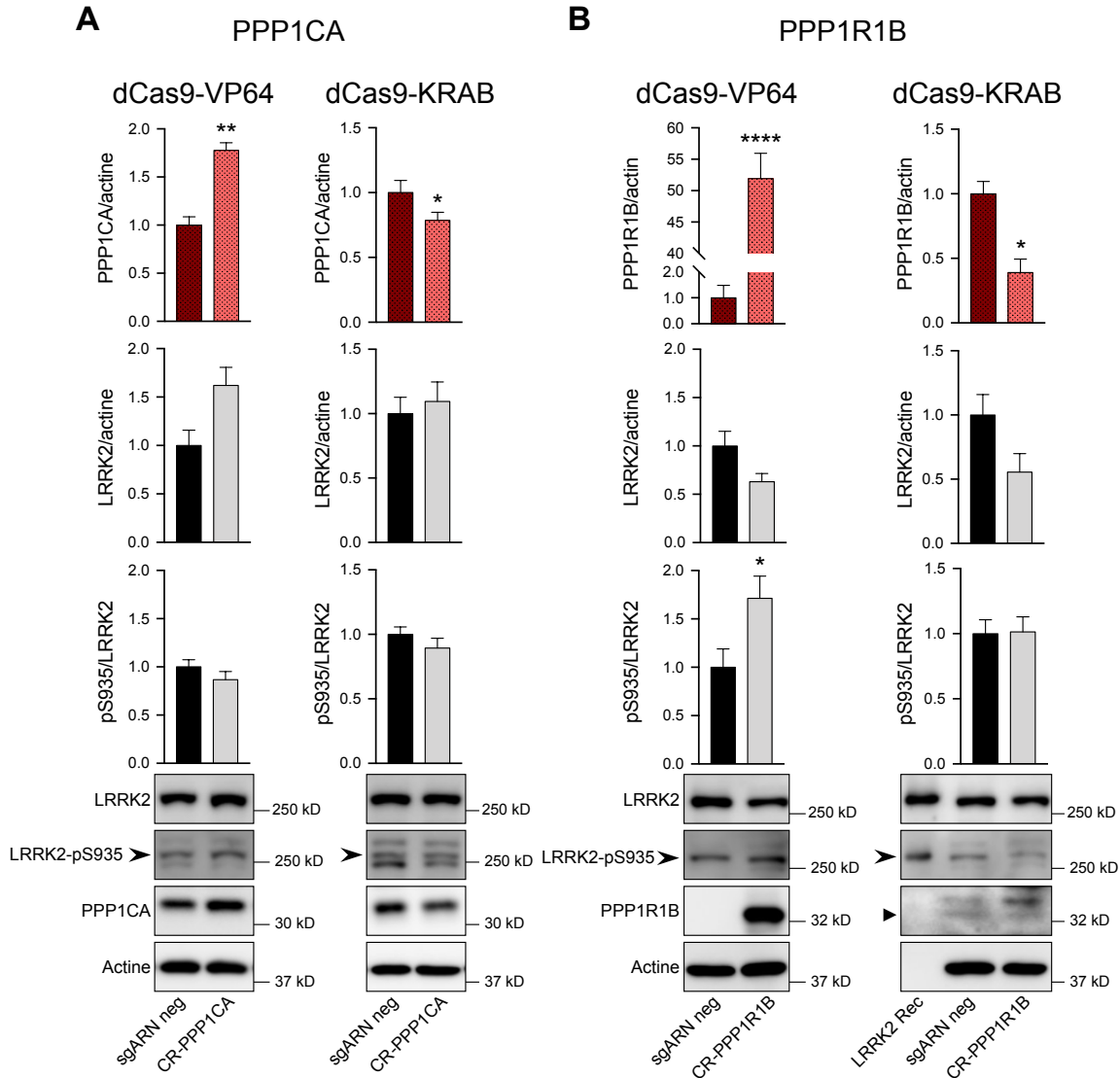


Figure 44 : Effet de la modulation de l'expression endogène des phosphatases PPP1CA et PPP1R1B sur la phosphorylation de LRRK2 dans des cellules SH-SY5Y via les systèmes CRISPRa et CRISPRi.

Des cellules SH-SY5Y exprimant de manière stable dCas9-VP64 ou dCas9-KRAB ont été transduites avec des constructions de lentivirus exprimant un sgARN négatif ou un sgARN ciblant les phosphatases PPP1CA (A) ou PPP1R1B (B). Pour PPP1R1B, l'image du blot de gauche correspond à une exposition de quelques secondes alors que le blot de droite, l'image correspond à une exposition de plusieurs dizaines de minutes. Les cellules ont été cultivées pendant au moins 10 jours, des lysats de protéines ont été collectés et analysés pour la protéine LRRK2, LRRK2 phosphorylée en sérine 935, les protéines PPP1CA et PPP1R1B. La bactine a été utilisée comme contrôle interne de charge. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et issues d'au moins trois répliques biologiques. Les différences statistiques ont été évaluées par le test Mann-Whitney, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; (>) indique la phosphorylation pS935 endogène et (▶) indique la protéine PPP1R1B endogène.

L'augmentation de l'expression de PPP2CA n'affecte pas la phosphorylation de LRRK2 (Figure 45A). Alors que pour la sous-unité PPP2R2A, à la fois la réduction et l'augmentation de l'expression endogène de PP2R2A conduisent à une augmentation de la phosphorylation de

LRRK2. L'augmentation de l'expression de PPP2R2A conduit à une plus forte augmentation de la phosphorylation pS935 de LRRK2 ($p < 0,01$) (**Figure 45B**). Par contre, aucun changement au niveau de l'expression de la protéine LRRK2 n'est observé lors de la modulation de l'expression de ces deux sous-unités (**Figure 45**).

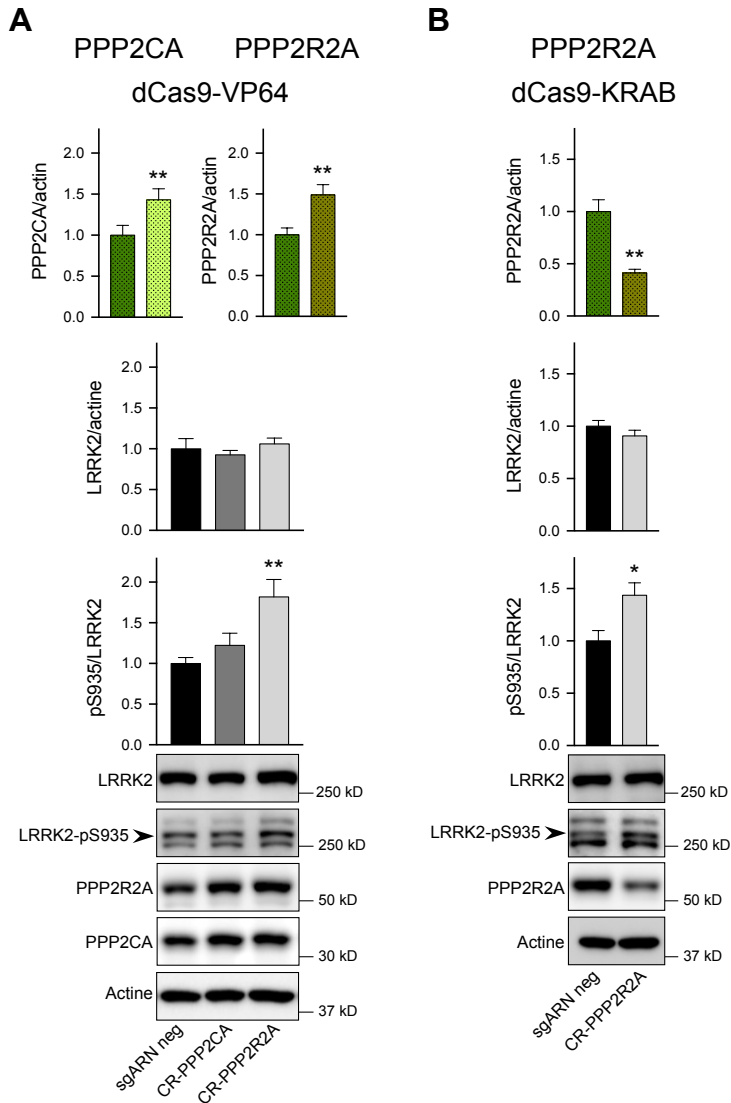


Figure 45 : Effet de la modulation de l'expression endogène des phosphatases PPP2CA et PPP2R2A sur la phosphorylation de LRRK2 dans des cellules SH-SY5Y via les systèmes CRISPRa et CRISPRi.

Des cellules SH-SY5Y exprimant de manière stable des cellules dCas9-VP64 ou dCas9-KRAB ont été infectées avec des constructions de lentivirus exprimant un sgARN négatif ou un sgARN ciblant les phosphatases PPP2CA (A) ou PPP2R2A (A, B). Les cellules ont été cultivées pendant au moins 10 jours, des lysats de protéines ont été collectés et analysés pour la protéine LRRK2, LRRK2 phosphorylée en sérine 935, les protéines PPP2CA et PPP2R2A. La β actine a été utilisée comme contrôle interne de charge. Les données sont représentées en moyenne \pm SEM et issues d'au moins trois répliques biologiques. Les différences statistiques ont été évaluée par le test Mann-Whitney, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (\blacktriangleright) indique la phosphorylation pS935 endogène.

Discussion

Le gène *Leucine-Rich Repeat Kinase 2* (*LRRK2*, PARK8) a émergé comme l'un des acteurs clés de la pathogenèse de la MP : 1) les mutations dans *LRRK2* sont parmi les causes les plus répandues de formes monogéniques de la MP ; 2) les mutations de *LRRK2* sont présentes non seulement pour les cas de MP familiales, mais aussi pour des cas sporadiques (prévalence de 2% à près de 40% dans certains groupes de population) ; 3) des variations génomiques au locus *LRRK2* ont d'autre part été récemment associées à la MP dans plusieurs études d'association pangénomiques (études GWAS) (Nalls et al. 2014) ; 4) les patients parkinsoniens portant les mutations de *LRRK2* montrent un profil clinique et neuropathologie quasiment identique à des cas sporadiques de MP (Healy et al. 2008). Aussi, la protéine LRRK2 est considérée comme une cible thérapeutique prometteuse dans la MP (B. D. Lee, Dawson, and Dawson 2012; J. Taymans and Greggio 2016; J.-M. Taymans 2014). De gros investissements tant du côté de la recherche publique que de la part de compagnies privées ont été faits pour comprendre comment la protéine LRRK2 contribue à l'apparition de la maladie.

La phosphorylation du site S935 de LRRK2

LRRK2 est une protéine complexe hautement phosphorylée, qui présente deux types distincts de phosphorylation. Des sites d'autophosphorylation sont présents majoritairement dans et proche du domaine ROC tandis que des sites de phosphorylation hétérologue sont retrouvés entre les domaines ANK et LRR, partie N-ter de la protéine. Ces sites de phosphorylation sont importants dans la maladie mais leur régulation et implication précise dans la maladie et en fonction des mutants associés au risque de MP étudiés restent encore à éclaircir.

Nos premiers résultats (**Figure 26** et **Figure 27**) ainsi que ceux présents dans la littérature montrent que pour le site S935, le site représentatif du cluster de phosphorylation hétérologue, le niveau de phosphorylation est retrouvé variable selon les mutants étudiés comparés à la protéine WT. Cette variation de la phosphorylation entre les différents mutants pose de nombreuses questions : i) quelle est la fonction de cette phosphorylation ? ; ii) pourquoi existe-il une aussi grande variation d'une forme mutante de LRRK2 à une autre ? En effet, si l'on regarde plus attentivement, on obtient des résultats déjà observés auparavant pour les mutants pathogènes N1347H, R1441C et I2020T par exemple, qui sont déphosphorylés comparé au WT, ce qui est en accord avec la littérature (R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012). De manière intéressante, les facteurs de risque (Rudenko et al. 2012; Bardien et al. 2011; Tan et al. 2010) ne présentent pas le même profil de

phosphorylation, le facteur de risque G2385R est déphosphorylé alors que R1628P et S1647T ne le sont pas.

Les sites de phosphorylation de S910/S935/S955/S973 jouent un rôle central dans la localisation subcellulaire de LRRK2. En effet, toutes les protéines LRRK2 ayant une forme mutée pathogène, à l'exception du mutant G2019S, se relocalisent dans des accumulations cytoplasmiques de forme filamenteuse, présentent une diminution de la phosphorylation en S935 ainsi qu'une diminution de la liaison de LRRK2 à la protéine 14-3-3 (R. J. Nichols et al. 2010; Doggett et al. 2012; Evy Lobbestael et al. 2013; Xianting Li et al. 2011; Alegre-Abarrategui et al. 2009; Kett et al. 2012). Le même phénomène de déphosphorylation de LRRK2 en S935, diminution de la liaison LRRK2:14-3-3 et accumulation filamenteuse de LRRK2 dans le cytoplasme est observé suite à l'inhibition pharmacologique de LRRK2. De plus, la surexpression de 14-3-3 permet d'inverser le phénotype filamenteux induit par les mutants pathogènes LRRK2 et après inhibition de la fonction kinase de LRRK2 (Blanca Ramírez et al. 2017), ce qui est corrélé avec une augmentation de la phosphorylation en S935 et une diminution de la liaison au GTP. Par rapport à la fonction GTPase de LRRK2, les mutations de ces acides aminés, R1398 et T1343, ont une importance fonctionnelle pour la protéine LRRK2 (Biosa et al. 2013) car la présence de ces mutations abolit la liaison du GTP à la protéine LRRK2 et prévient la formation d'accumulations filamenteuses de LRRK2. Cependant ces mutants n'entraînent pas de modification de la phosphorylation S935 par rapport à leurs homologues non mutés respectifs. Ces données suggèrent que la déphosphorylation des sites de phosphorylation hétérologue observée chez les mutants pathogènes et lors de l'inhibition pharmacologique de LRRK2 n'est pas suffisante pour provoquer la relocalisation de la protéine sous d'accumulations filamenteuses cytoplasmiques (Blanca Ramírez et al. 2017).

De même, une question persiste quant à savoir si la déphosphorylation de LRRK2 est toxique pour la cellule ou pas. En effet, une déphosphorylation rapide de LRRK2 en S935 est retrouvée après un traitement avec des inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2 (N. Dzamko et al. 2010; X. Deng et al. 2011). Ces traitements sont considérés comme des thérapies potentielles pour la MP. De façon intéressante, la déphosphorylation induite par les inhibiteurs de LRRK2 entraîne aussi une perte de la liaison avec la protéine 14-3-3 ainsi qu'une relocalisation de la protéine dans des structures filamenteuses (N. Dzamko et al. 2010). De plus, cette déphosphorylation est accompagnée d'un recrutement de la phosphatase PPP1CA (Evy Lobbestael et al. 2013). Enfin, chez les patients parkinsoniens d'origines idiopathiques, la déphosphorylation de ces sites

hétérologues a été retrouvée dans différentes régions du cerveau, y compris la SNc (N. Dzamko et al. 2017).

La phosphorylation cellulaire de LRRK2 est régulée en amont par plusieurs types de protéines régulatrices sous la forme de cascades de signalisation, comprenant des kinases et des phosphatases (N. Dzamko et al. 2012; Xianting Li et al. 2011; Chia et al. 2014; Evy Lobbestael et al. 2013; Athanasopoulos et al. 2016). Le rôle des phosphorylations de LRRK2 et de leur régulation dans le fonctionnement physiologique et pathologique de LRRK2 n'est pas encore défini de manière claire. Cependant, les observations dans des conditions physiologiques et pathologiques de déplacement de l'équilibre de la phosphorylation vers la déphosphorylation de LRRK2 indiquent que les phosphatases jouent un rôle important dans la régulation cellulaire de LRRK2.

Rappel de l'objectif de la thèse

Dans des travaux préalables à cette thèse, des phosphatases candidates agissant sur la phosphorylation de LRRK2 ont été identifiées par un criblage de génétique inverse. Les protéines phosphatases sont des holoenzymes regroupant des sous-unités catalytiques et régulatrices (Virshup and Shenolikar 2009). Par conséquent, identifier les éléments constitutifs du complexe est essentiel.

La validation de phosphatases par l'étude de la localisation/interaction dans le compartiment de LRRK2

Nous avons dans un premier temps analysé la localisation de ces phosphatases par rapport à LRRK2 dans la cellule par immunofluorescence. Comme il est décrit dans la littérature, LRRK2 est distribuée de façon diffuse dans le cytoplasme des cellules (West et al. 2005; Biskup et al. 2006; Alegre-Abarategui et al. 2009; R. J. Nichols et al. 2010). Le traitement avec les inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2, HG-10-102-01 et GSK2578215A (H. G. Choi et al. 2012; Reith et al. 2012) permet d'induire la déphosphorylation de LRRK2 et ainsi d'étudier le rôle des phosphatases en condition de déphosphorylation. Nous avons observé un changement de la localisation de certaines phosphatases après une heure de traitement avec les inhibiteurs. Cette relocalisation des phosphatases dans le même compartiment cellulaire que LRRK2 concorde avec les nombreuses études de la littérature. En effet, la localisation des phosphatases à proximité de leurs substrats apparaît comme un facteur essentiel pour assurer l'activité de déphosphorylation. Cependant, pour la phosphatase PPP1CA par exemple, l'augmentation de cette colocalisation n'est pas significative

pour l'analyse par immunofluorescence de type statique. Dans notre étude, des expériences de localisation dynamique ont également été réalisées par le Dr Marco Emanuele (chercheur post-doctorant dans notre laboratoire) (**Annexe 3**). Ces expérimentations ont montré un recrutement dans le temps différent selon les phosphatases, avec une relocalisation immédiate pour la sous-unité PPP1CA alors qu'elle n'est visible qu'après 30 minutes pour les sous-unités catalytiques PPP2CA et PPP2CB. La localisation préférentielle serait assurée par une interaction entre l'holoenzyme et le substrat lui-même, ou entre l'holoenzyme et un composant cellulaire associé au substrat. Cela suppose donc une association directe entre une partie de l'holoenzyme, ou l'une des sous-unités du complexe avec les substrats. Dans la première étude identifiant une phosphatase de LRRK2 de Lobbestael *et al.*, la déphosphorylation était accompagnée d'un recrutement de PPP1CA au sein du complexe LRRK2 (Evy Lobbestael et al. 2013). Par la technique PLA, nous avons pu confirmer une augmentation de l'interaction de PPP1CA avec la protéine LRRK2 après le traitement avec deux inhibiteurs différents. De la même manière, nous avons révélé une interaction avec les sous-unités de PP2A, PPP2R2A et PPP2R2B. Des études antérieures ont montré que la protéine DAPK (« Death-Associated Protein kinase ») appartenant à la famille des protéines ROCO interagissait avec la sous-unité régulatrice B' de PP2A, en utilisant le domaine ROC comme site principal d'interaction (Carlessi et al. 2011). De plus, Athanasopoulos *et al.*, ont aussi observé une interaction de l'holoenzyme PP2A avec LRRK2 par l'intermédiaire du domaine ROC (Athanasopoulos et al. 2016). Cependant, ils n'ont pas identifié quelles sous-unités régulatrices interagissaient avec LRRK2. Une caractéristique structurelle des sous-unités B de PP2A est la présence de cinq répétitions WD-40 dégénérées (Neer et al. 1994). Les répétitions WD-40 sont des séquences de 40 acides aminés peu conservées qui se terminent généralement par le tryptophane-aspartate (WD) et dont on pense qu'elles interviennent dans les interactions protéine-protéine. À cet égard, les résultats obtenus avec l'expérience PLA montrant une augmentation de l'interaction entre PPP2R2A et PPP2R2B avec la protéine LRRK2 qui comprend elle aussi un domaine répété WD40 (Mata et al. 2006), suggère que la liaison des deux sous-unités B à LRRK2 pourrait être médiée par leur répétition WD-40. Il serait intéressant de faire les mêmes expérimentations avec des formes tronquées de la protéine LRRK2 pour confirmer cette hypothèse. A travers ces résultats, notre travail confirme ce qui a été observé précédemment, c'est-à-dire que la déphosphorylation de LRRK2 induite par un inhibiteur pharmacologique de LRRK2, permet un recrutement des phosphatases au sein du complexe LRRK2 dans le cytoplasme de la cellule. Une autre étude a aussi rapporté cette augmentation de la liaison de la phosphatase PP1 avec LRRK2 dans des conditions

de stress cellulaire (Mamais et al. 2014).

Les évidences pour une déphosphorylation directe de LRRK2 par le complexe PPP2CA+PPP2R2 et l'importance de la sous-unité régulatrice

La déphosphorylation de LRRK2 par les phosphatases est-elle directe ? Nos collaborateurs ont montré que PP2A (PPP2CA+PPP2R2D) déphosphorylait de manière directe LRRK2 *in vitro* (**Annexe 3**). Afin de valider les holoenzymes qui agissent sur la déphosphorylation de LRRK2, nous avons ensuite testé des combinaisons de sous-unités catalytiques et régulatrices de la phosphatase PP2A dans des ovocytes de Xénope. Dans ce système, on peut injecter directement la protéine souhaitée, permettant ainsi une action immédiate de celle-ci. La déphosphorylation de LRRK2 par des inhibiteurs est un processus rapide dans les cellules, de l'ordre de 30 à 90 minutes (N. Dzamko et al. 2010; X. Deng et al. 2011; Doggett et al. 2012). De plus, nos études de microscopie dynamique ont montré une relocalisation rapide dans la cellule. Cette expérimentation a démontré un résultat qui confirme l'implication de la protéine phosphatase PP2A sur la régulation de la phosphorylation de LRRK2 et confirme l'holoenzyme de façon précise. Nous avons pu observer une déphosphorylation dès 30 minutes pour la combinaison PPP2CA+PPP2R2B et pour la combinaison PPP2CA+PPP2R2A par rapport à la condition témoin. La condition PPP2CA seule ne modifie pas la phosphorylation de LRRK2, ce qui signifie que la sous-unité régulatrice B (PPP2R2.) confère une activité complète lorsqu'elle interagit avec la sous-unité catalytique C (Y. Xu et al. 2006). Ces observations concordent avec des études antérieures qui ont démontré que l'holoenzyme est plus efficace pour déphosphoryler des protéines cibles spécifiques (par exemple la protéine Tau) que le « core » dimère et encore plus que PPP2CA seule (Ferrigno, Langan, and Cohen 1993; Goedert et al. 1992).

Afin de confirmer ces résultats ainsi que ceux de nos collaborateurs sur l'activité catalytique de l'holoenzyme quand celle-ci est complète (**Annexe 3**), nous avons surexprimé les sous-unités catalytiques et régulatrices seules dans les cellules HEK-293T (**Figure 34**). Les sous-unités catalytiques seules sont insuffisantes pour obtenir une déphosphorylation de LRRK2 alors que la surexpression des sous-unités régulatrices permet d'obtenir une déphosphorylation significative de LRRK2, notamment pour PPP1R3F et PPP2R2B. Au travers de ces expérimentations, nous avons

démontré que la sous-unité catalytique sans la présence de sa bonne sous-unité régulatrice ne présente aucun effet sur la déphosphorylation de LRRK2.

Confirmation de la validation des phosphatases de LRRK2 en condition d'expression endogène et liens avec la MP

Afin de valider les phosphatases agissant sur la phosphorylation de LRRK2 dans un système d'expression endogène, nous avons choisi d'utiliser la technologie CRISPR-dCas9 pour moduler de façon précise l'expression des différentes sous-unités constituant les holoenzymes PP1 et PP2A. Ce système CRISPR-dCas9 est un outil très puissant pour décortiquer la fonction des gènes. En effet, la modulation de l'expression des gènes au niveau de loci endogènes (Qi et al. 2013; Perez-Pinera et al. 2013; Gilbert et al. 2013; Maeder et al. 2013) permet d'établir des observations dans des conditions physiologiques pertinentes et d'obtenir ainsi une meilleure compréhension des voies de signalisation. Dans nos expériences, nous avons pu montrer que la technique fonctionnait, avec des résultats positifs pour différentes sous-unités, PPP1CA, PPP1R1B, PPP2CA et PPP2R2A. Pour les gènes dont les résultats ont été présentés au cours de cette thèse, la séquence sgARN ciblait une zone entre -100 et +1 autour du TSS. La séquence sgARN pour PPP1R1B, qui démontre la plus forte activation, se trouve à -65 du TSS. Ceci est en accord avec la zone à cibler par le CRISPRa (Du and Qi 2016b; Du and Qi 2016a). Ces résultats prouvent donc que l'identification de la séquence proche du TSS était correcte. Dans les expérimentations avec le système CRISPR-dCas9, nous n'avons pas observé de changement de la phosphorylation de LRRK2 quand l'expression des sous-unités catalytiques PPP1CA ou PPP2CA était modulée. Ce résultat est en adéquation avec notre précédente conclusion sur l'inefficacité de la sous-unité catalytique à agir seule sur son substrat. Dans le même temps on peut aussi penser que l'effet de nos CRISPR n'est pas assez efficace pour observer une variation de la phosphorylation de LRRK2. En revanche, la variation des niveaux endogènes des sous-unités régulatrices PPP1R1B et PPP2R2A a un effet sur la phosphorylation de LRRK2. Cette expérimentation confirme donc que les sous-unités régulatrices sont essentielles pour l'activité catalytique des holoenzymes phosphatase sur LRRK2.

De manière intéressante, l'augmentation de l'expression endogène de la sous-unité régulatrice PPP1R1B augmente significativement la phosphorylation de LRRK2. PPP1R1B, aussi appelée DARPP-32, est une sous-unité inhibitrice de PPP1CA (H. C. Hemmings, Greengard, et al. 1984; P. Cohen 2002) qui est régulée dans le cerveau, plus spécifiquement dans le striatum par la voie de

signalisation de nombreux neurotransmetteurs incluant la DA et la sérotonine (Greengard, Allen, and Nairn 1999). Ces travaux ont notamment été récompensés du Prix Nobel en 2000. La DA active le récepteur D1, ce qui entraîne une augmentation du niveau d'AMPC menant à une augmentation de l'activité de la protéine kinase PKA. PPP1R1B est phosphorylée sur le résidu Thr34 par la PKA (H. C. Hemmings, Greengard, et al. 1984). La sous-unité PPP1R1B phosphorylée inhibe l'activité de PPP1CA. Une équipe a montré que LRRK2 était déphosphorylée dans les cerveaux de patients parkinsoniens (N. Dzamko et al. 2017). Or, la diminution du taux de DA observée chez les patients parkinsoniens peut induire une diminution de l'activité de PKA et induire de manière indirecte l'activation de PPP1CA qui peut ainsi déphosphoryler LRRK2. De plus, Dzamko et al., ont démontré que les niveaux de protéines totaux de LRRK2 étaient augmentés dans des stades précoces de la maladie chez l'homme. Une autre étude chez la souris, a démontré que la surexpression de LRRK2 altérait les niveaux de DA et augmentait le taux de protéine totale de PPP1R1B mais le taux de phosphorylation de PPP1R1B en T34 n'était pas modifié (Beccano-Kelly, Volta, Munsie, et al. 2015). Il reste à étudier si la régulation de l'activité de PP1 par la DA pourrait moduler la phosphorylation de LRRK2. Il serait alors intéressant de mesurer la phosphorylation de LRRK2 en S935 dans ces échantillons de souris surexprimant LRRK2.

La modulation des niveaux de PPP2R2A entraîne une variation de la phosphorylation en S935. Ce résultat démontre que cette sous-unité est un régulateur majeur dans la phosphorégulation de LRRK2. La diminution de l'expression de PPP2R2A entraîne une augmentation de la phosphorylation de LRRK2, cela démontre que LRRK2 est un substrat de l'holoenzyme composé de PPP2R2A. D'un autre côté, l'augmentation de son expression augmente aussi la phosphorylation en S935 de LRRK2. Une hypothèse envisageable pour expliquer ces observations contradictoires est que l'holoenzyme ne serait pas active, la sous-unité catalytique serait méthylée empêchant le recrutement de PPP2R2A.

Au regard des résultats obtenus avec le système CRISPR-dCas9, il reste certains points à éclaircir. En effet, un système d'expression endogène est plus représentatif que des systèmes de surexpression de protéines exogènes qui vont participer à « forcer le système » de la cellule. Néanmoins c'est un point de départ qui permet de « déblayer le terrain ». Travailler sur des systèmes endogènes est la façon d'obtenir les résultats les plus représentatifs de la physiologie naturelle d'un système biologique.

La correspondance de la distribution tissulaire de LRRK2 avec ses phosphatases

Avec la sous-unité régulatrice comme élément variable, un large répertoire d'holoenzymes fonctionnelles peut être engendré. Ce serait cette sous-unité régulatrice qui permettrait également la localisation spécifique de la partie catalytique (P. T. Cohen 1997; Honkanen and Golden 2002; Mathieu Bollen et al. 2010; Shi 2009). Les sous-unités catalytiques de PP1 et PP2A sont exprimées de manière ubiquitaire alors que les sous-unités régulatrices sont localisées de manière plus spécifique. Alors que les sous-unités de la famille B de PP2A qui comprennent quatre membres (PPP2R2A, PPP2R2B, PPP2R2C, PPP2R2D) n'ont pas la même distribution tissulaire. PPP2R2A et PPP2R2D ont une distribution tissulaire ubiquitaire, alors que PPP2R2B et PPP2R2C sont spécifiques au cerveau (V Janssens and Goris 2001). D'autre part, les niveaux de PPP2R2A et PPP2R2D sont très faibles dans les reins et le foie, et les plus élevés dans le cerveau (Schmidt et al. 2002; Stefan Strack et al. 1999). Dans le même temps, LRRK2 est exprimée aussi de manière différente selon les organes avec une expression modérée dans le cerveau et un fort taux dans les reins (Galter et al. 2006; J. Taymans, Van den Haute, and Baekelandt 2006; West et al. 2014). On peut donc penser que différentes compositions en holoenzymes régulées par les sous-unités régulatrices vont moduler la phosphorylation de LRRK2 selon les tissus étudiés. De plus, dans un même tissu, les sous-unités régulatrices ont des localisations subcellulaires distinctes. En effet, PPP2R2A est principalement cytosolique/nucléaire. Dans notre étude, nous le retrouvons principalement dans le noyau. PPP2R2B et PPP2R2D sont retrouvées de manière diffuse dans le cytosol mais sont exclues du noyau. Tandis que PPP2R2C est fortement enrichie dans la fraction du cytosquelette. La protéine LRRK2 est retrouvée associée avec le centrosome et les microtubules (Mamais et al. 2014; Kett et al. 2012; Alegre-Abarrategui et al. 2009) conférant un rôle important à LRRK2 dans la régulation de nombreux processus cellulaires clés incluant le trafic vésiculaire, la croissance neuritique ainsi que dans la polarité et la migration de la cellule (D. MacLeod et al. 2006; D. A. MacLeod et al. 2013; Madero-Pérez, Fdez, et al. 2018; Beilina et al. 2014; Parisiadou et al. 2009; Caesar et al. 2013; I. Choi et al. 2015; Moehle et al. 2015; Steger et al. 2017; Winner et al. 2011; Blanca Ramírez et al. 2017; A. Raquel Esteves and Cardoso 2017). D'un autre côté, le centrosome est une cible privilégiée de certaines phosphatases (Ou and Rattner 2004). De plus, PP1 et PP2A agissent sur la protéine Tau (H. Liao et al. 1998; Sontag et al. 1995). Il est possible que la relocalisation s'opère au niveau de ces éléments dans la cellule et que les protéines LRRK2

mutées qui possèdent une augmentation de leur localisation au niveau des microtubules (Blanca Ramírez et al. 2017) soient plus sensibles à la régulation des phosphatases et donc sont retrouvées plus fortement déphosphorylées.

LRRK2, ses phosphatases, son ubiquitination et sa stabilité

Des rapports récents ont suggéré que l'ubiquitination de LRRK2 est liée à la déphosphorylation de LRRK2 (J. Zhao et al. 2015) et que l'inhibition de la fonction kinase de LRRK2 modifie les niveaux d'expression de LRRK2 (Herzig et al. 2011; Fell et al. 2015; Fuji et al. 2015; J. Zhao et al. 2015; E. Lobbstaël et al. 2016).

Les résultats présentés dans notre papier montrent donc une interaction entre la phosphorylation LRRK2 et l'ubiquitination et/ou stabilité de LRRK2 (**Annexe 3**), suggérant que LRRK2 peut être placée dans la classe de molécules et de voies régulées par l'interaction de la phosphorylation et de l'ubiquitination (Hunter 2007) dans laquelle les phosphatases PP1 et PP2A régulent les niveaux d'expression de LRRK2 (**Figure 46**).

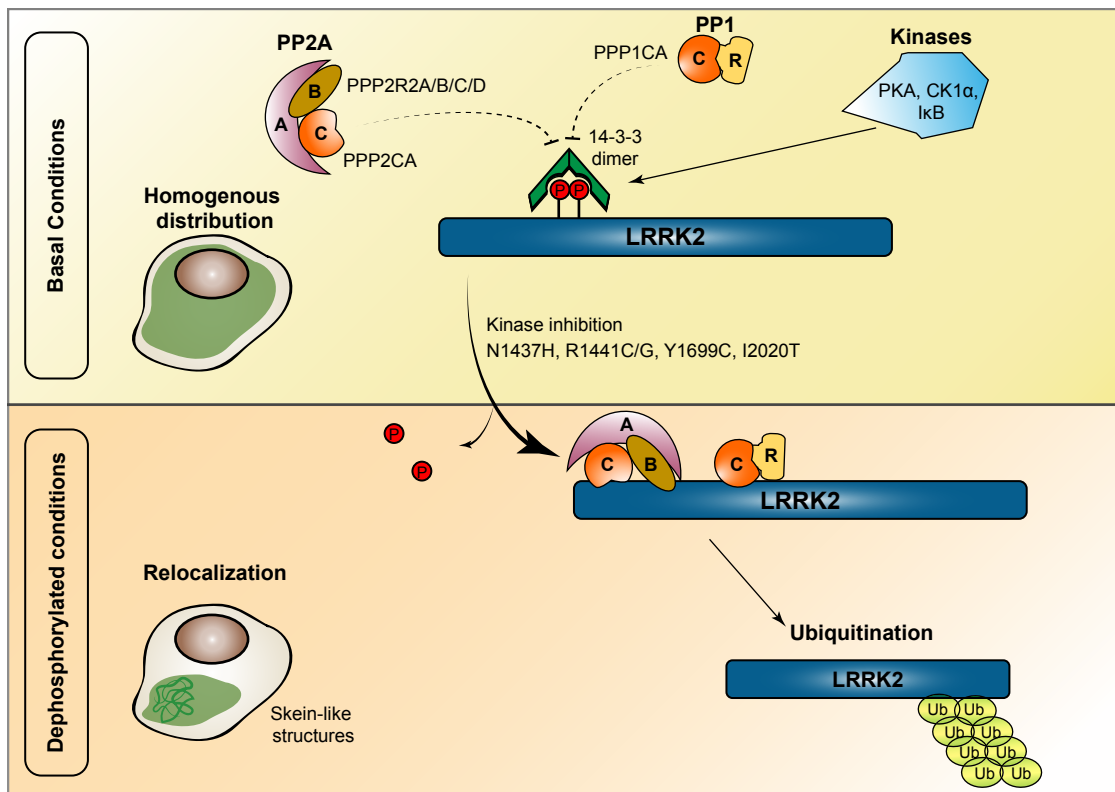


Figure 46 : La déphosphorylation de LRRK2 par le recrutement des phosphatases PP1 et PP2A induit son ubiquitination.

LRRK2 existe sous forme de protéine phosphorylée avec une distribution cytoplasmique homogène dans les cellules. En cas d'inhibition de l'activité kinase de LRRK2 ou en présence de mutants pathogènes liés à la MP, N1437H, R1441C/G, Y1699C et I2020T, il existe un recrutement physique des phosphatases avec LRRK2. La composition des

holoenzymes proposée est : PPP2CA+PPP2R2A/B/C et D, PPP1CA+sous-unité R (qui reste à définir). La déphosphorylation conduit à la re-distribution de LRRK2 entraînant une accumulation intracellulaire, souvent décrite comme étant des structures filamenteuses ou « skein-like structure » et/ou à l'ajout de résidus ubiquitines sur LRRK2 par une ubiquitine ligase, pouvant mener à la dégradation de LRRK2 (D'après M.F. Bolliger, M. Drouyer, E. Lobbstaël et al, en soumission).

L'observation que LRRK2 est dégradée après l'inhibition de sa fonction kinase a des implications importantes pour le développement d'inhibiteurs de LRRK2 en tant que stratégie thérapeutique de la MP. En effet, des études précliniques d'inhibiteur de la fonction kinase de LRRK2 ont révélé des changements morphologiques dans les pneumocytes de type II de poumon, chez les rongeurs (Fell et al. 2015) et chez les primates non humains (Fuji et al., 2015). Ces observations rappellent les changements observés dans le poumon des souris KO LRRK2 (Baptista et autres 2013). Cela suggère une corrélation directe entre la diminution des taux de protéine LRRK2 et l'inhibition de la LRRK2 kinase. De plus, dans des souris KI LRRK2 S910A/S935A mimant la déphosphorylation (S>A) de ces résidus, des diminutions du taux de protéine LRRK2 ont été observées seulement dans les reins mais pas dans le cerveau (Y. Zhao et al. 2018). En revanche, cette réduction n'était pas accompagnée du phénotype morphologique observé précédemment chez des souris KO présentant une perte totale de LRRK2 (Tong et al. 2010; Tong et al. 2012). Au regard de ces observations, il apparaît clairement une relation entre les niveaux d'expression de la protéine et les effets des phosphorylations sur les sites hétérologues. Des études futures seront nécessaires pour élucider pleinement cette relation.

LRRK2, ses phosphatases et la MP

Chez les patients parkinsoniens sporadiques, une diminution de la phosphorylation de LRRK2 a été observée dans la SNc (N. Dzamko et al. 2017). Par conséquent, une hypothèse est que cela pourrait être dû à une altération de l'expression des phosphatases. Les niveaux d'expression de PP2A ont été testés dans les échantillons cérébraux post-mortem de patients (collaboration avec Dr. RJ Nichols, The Parkinson Institute et Stanford University) et nous n'avons trouvé aucun changement dans les niveaux de protéines PPP2CA/B et PPP2R2A/B/C/D dans le cerveau à l'exception de la SNc où une légère diminution des sous-unités régulatrices a été observée par rapport aux témoins (**Annexe 3**). Une étude précédente de Park et ses collègues n'avait également observé aucun changement dans les sous-unités catalytiques et régulatrices de PP2A dans les cerveaux de patients parkinsoniens (H.-J. Park et al. 2016). En plus du cerveau, la protéine LRRK2 est hautement exprimée dans d'autres tissus, tels que les cellules du sang périphérique. Dans une étude pilote (**Annexe 2**), nous avons testé les niveaux d'expression des phosphatases dans des

lignées lymphoblastoïdes provenant de ces sujets sains, sporadiques et porteurs de la mutation G2019S. Nous avons trouvé que la diminution de la phosphorylation en S935 chez les patients sporadiques était corrélée avec une augmentation de l'expression de la sous-unité catalytique de PP2A. En revanche aucun changement n'a été observé pour la sous-unité régulatrice PPP2R2A, excepté pour les patients porteurs de la mutation G2019S où une augmentation est détectée. Cette étude pilote montre la faisabilité de tester les niveaux d'expression des phosphatases dans des tissus où LRRK2 est exprimée. Cependant, à la vue du nombre d'échantillons testés, nous ne pouvons pas faire de conclusion définitive. Dans les prochaines études, les effectifs de patients à analyser devront être significativement relevés. De plus, il serait intéressant d'inclure des patients porteurs d'autres mutations pathogènes de LRRK2, notamment celles qui présentent une déphosphorylation en S935.

Très récemment, une équipe a mis en évidence par la technique de PLA une perte de la liaison de la protéine 14-3-3 avec LRRK2 dans la SNc de patients idiopathiques (Di Maio et al. 2018). Nous avons de notre côté dans ces travaux de thèse observé une interaction par PLA entre LRRK2 et les phosphatases et cette interaction était augmentée en condition de déphosphorylation. Il serait donc intéressant de procéder à cette technique de PLA dans la SNc de patients idiopathiques pour visualiser l'interaction de LRRK2 avec ses phosphatases.

Dans leur étude, Park et ses collègues ont démontré une expression nettement diminuée de la forme PP2A méthylé dans la SN et le cortex frontal de patients parkinsoniens (H.-J. Park et al. 2016) conduisant à une réduction de l'activité de l'holoenzyme (Bryant, Westphal, and Wadzinski 1999; Tolstykh et al. 2000). L'activité des phosphatases peut aussi être régulée par les céramides (Dobrowsky et al. 1993; Chalfant et al. 1999; Oaks and Ogretmen 2014). Une étude a montré que chez des souris KO LRRK2, les niveaux de céramides étaient augmentés dans le cerveau total (Ferrazza et al. 2016). De manière intéressante, l'activité de la glucocérébrosidase, une enzyme qui hydrolyse les glucosylcéramides (GlcCer) en glucose et céramide, est retrouvée augmentée chez des patients G2019S (Alcalay et al. 2015). Il serait donc utile de vérifier si ces autres mécanismes de régulation de phosphatases sont à l'œuvre, par exemple en mesurant l'activité des phosphatases dans les tissus où LRRK2 est exprimée mais aussi en mesurant les céramides, un métabolite connu pour augmenter l'activité des phosphatases.

D'autres mécanismes de régulation des phosphatases de LRRK2 pourraient passer par les protéines Rab. L'équipe de Cesareni a montré que les protéines Rab8 et Rab9 inhibent l'activité de PP2A en

altérant la liaison de la sous-unité catalytique PPP2CA avec la sous-unité structurale PPP2R1A (Sacco et al. 2016). Ceci est d'autant plus pertinent pour LRRK2 que plusieurs protéines Rab ont récemment été validées comme de véritables substrats de LRRK2 (Steger et al. 2016; Ito et al. 2016; Zhiyong Liu et al. 2017). Cela ouvre la possibilité d'un mécanisme potentiel de régulation mutuelle par lequel LRRK2 pourrait réguler son propre niveau de phosphorylation via la régulation de PP2A grâce à la phosphorylation de ses substrats Rab.

D'autre part, la structure de la protéine LRRK2 n'est pas encore définie même si un modèle moléculaire, dérivé d'études cryo-EM, fournit des indications utiles sur l'organisation générale du dimère (Guaitoli et al. 2016; Sejwal et al. 2017). Dans ce modèle, l'extrémité N-ter semble être en contact avec le domaine ROC-COR et pourrait réguler l'activité de la protéine. À l'appui de cette hypothèse, Ito et ses collaborateurs, ont déterminé que la phosphorylation de LRRK2 en S910 et S935 est nécessaire pour la phosphorylation de Rab 10 mais pas de celle de Rab8 (Ito et al. 2016). De même, le groupe du Dr. Nichols a constaté que la phosphorylation sur ces résidus était également nécessaire pour la phosphorylation de p62 (Kalogeropoulou et al. 2018). Il est donc probable que la phosphorégulation de sites hétérologues de LRRK2 régule indirectement la phosphorylation des substrats de LRRK2. Plusieurs questions se posent à la vue de ces données. Les mutants pathogéniques de LRRK2 possèdent-ils des structures différentes ? Plus particulièrement entre les mutants possédant une déphosphorylation des sites hétérologues et le mutant G2019S. La structure de la protéine LRRK2 gouverne-t-elle le recrutement des phosphatases que l'on a identifiées dans nos travaux ? On peut penser que les sites de phosphorylation sont accessibles plus facilement pour les phosphatases dans les mutants présentant une déphosphorylation accrue de ces sites. La structure de LRRK2 est un aspect important dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la protéine mais aussi pour le développement de nouveaux inhibiteurs ou drogues ciblant LRRK2. Dans le but d'établir une structure 3D haute-résolution de LRRK2, une étude a essayé d'améliorer la cristallisation de LRRK2 à bord de la station spatiale internationale (ISS) pour profiter des conditions de microgravité (Mattea et al. 2018). Malheureusement, les conditions de microgravité n'ont pas pu améliorer la qualité de diffraction des cristaux.

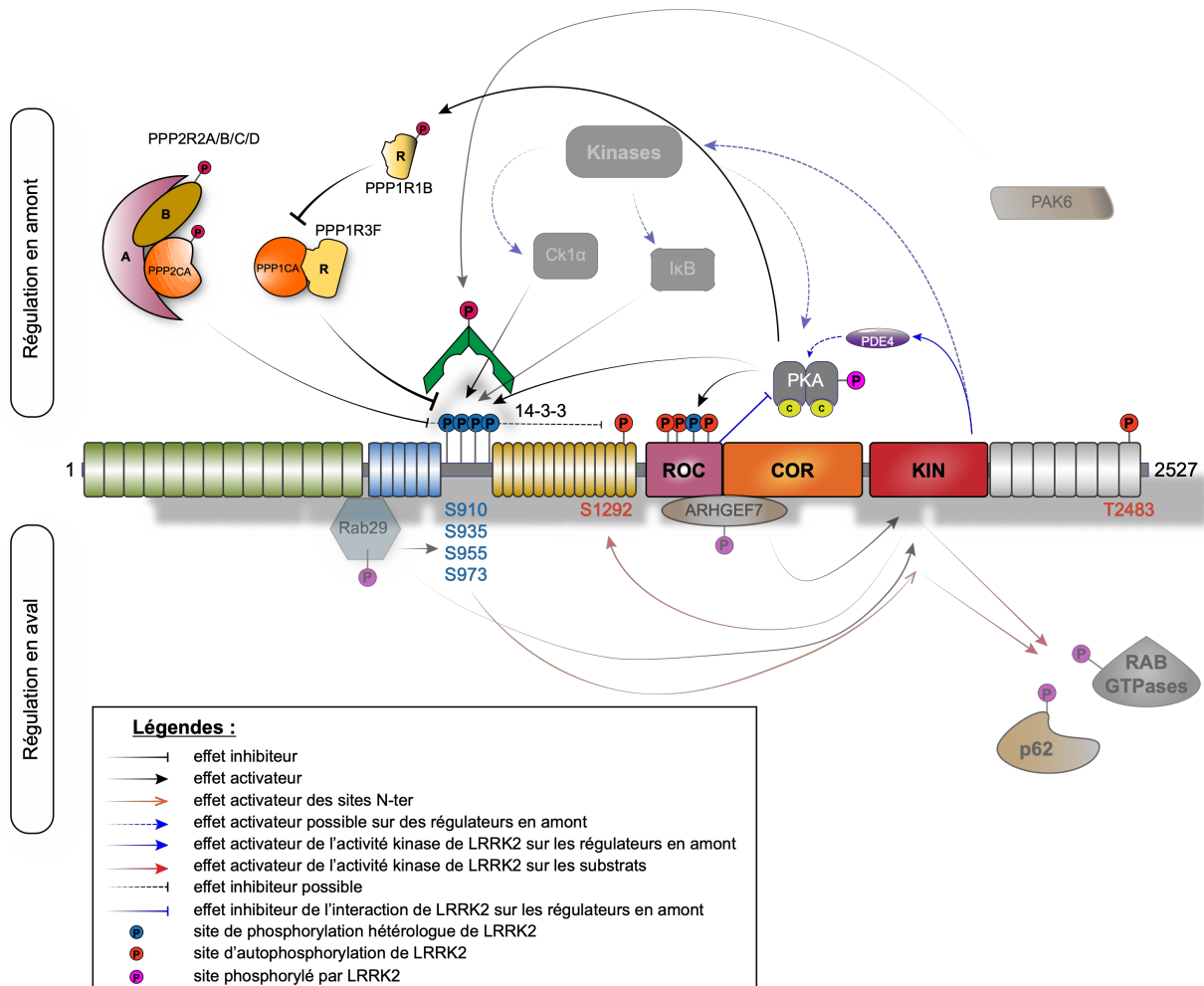


Figure 47 : Phosphorégulation de LRRK2 : un complexe de taille ?

La phosphorégulation de la protéine LRRK2 met en jeu un nombre important de partenaires qui peuvent eux aussi être régulés par LRRK2. Des protéines kinases et des phosphatases sont impliquées dans la régulation des sites N-ter (S910/935/955/973). En ce qui concerne les phosphatases, PPP1CA est confirmée mais les sous-régulatrices associées sont encore à déterminer même si nos travaux ont identifié PPP1R3F et PPP1R1B ; pour l'holoenzyme PP2A, les combinaisons sont PPP2CA+PPP2R2A/B/C et D. De plus, PP2A peut potentiellement réguler le site d'autophosphorylation S1292. (Evy Lobbstaël et al. 2013; Civiero, Cogo, et al. 2017; Purlyte et al. 2018; Kalogeropoulou et al. 2018; Steger et al. 2016; De Wit, Baekelandt, and Lobbstaël 2018; Chia et al. 2014; Xianting Li et al. 2011; N. Dzamko et al. 2012; R. J. Nichols et al. 2010; Athanasopoulos et al. 2016; Muda et al. 2014; Parisiadou et al. 2014; Russo et al. 2018).

Conclusion

La régulation de la phosphorylation de LRRK2 est complexe et implique un nombre important de partenaires (**Figure 47**). L'identification de ces partenaires est primordiale pour une meilleure compréhension des voies de signalisation de LRRK2 et des fonctions associées à ses voies.

La phosphorégulation de LRRK2 comme le montre la **Figure 47** apparaît comme un mécanisme complexe faisant intervenir de multiples partenaires. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux phosphatases régulant la phosphorylation en S935 de LRRK2. Nous avons pu confirmer l'implication de la sous-unité catalytique PPP1CA dans la régulation de S935. Nos données *in cellulo*, nous permettent de proposer comme les sous-unités régulatrices PPP1R1B et PPP1R3F associées à PPP1CA constituant l'holoenzyme ciblant LRRK2. Cependant, notre travail n'a pas permis de définir avec certitude ces deux sous-unités régulatrices, il reste d'autres étapes de validation pour s'assurer des sous-unités régulatrices de PPP1CA. D'un autre côté, nous avons pour la première fois identifié l'holoenzyme PP2A régulant LRRK2. Athanasopoulos *et al*, ont montré une interaction de PP2A avec LRRK2 mais n'avait pas confirmé son rôle dans la phosphorégulation de LRRK2 ni identifié les composants de l'holoenzyme (Athanasopoulos et al. 2016). Nous avons montré que le complexe PPP2CA+PPP2RA/B/C et D est un régulateur important de LRRK2. Nos études *in vitro* et *in cellulo* ont confirmé l'implication de cette holoenzyme composée de la sous-unité catalytique PPP2CA avec les sous-unités B (PPP2R2). De plus, la modulation endogène de la sous-unité régulatrice PPP2R2A démontre que cette dernière est fortement impliquée dans le ciblage de LRRK2. Il reste toutefois à mieux définir par quels mécanismes, l'holoenzyme PPP2CA+PPP2R2A induit des changements dans la phosphorylation de LRRK2 en S935 car nous avons pu observer que la variation des niveaux endogènes de PPP2R2A, à la fois une diminution ou une augmentation de son expression, menait à une augmentation de la phosphorylation de LRRK2.

Ce travail a aussi permis de mettre en évidence un mécanisme de recrutement des phosphatases au complexe de LRRK2 par l'utilisation d'inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2. Ce recrutement s'effectue différemment dans le temps avec une association immédiate de PP1 avec LRRK2 alors que le recrutement et l'association de PP2A avec LRRK2 sont différés d'une trentaine de minutes. Cependant, ce travail de thèse n'a pas établi quel était le mécanisme qui permettait ce recrutement des phosphatases avec LRRK2 au sein du cytoplasme.

Perspectives

Plusieurs perspectives sont ouvertes suite à ce travail. Tout d'abord, confirmer les phosphatases qui n'ont pas montrées les effets les plus forts sur la phosphorylation de LRRK2. De plus, dans notre étude, nous avons utilisé les lignées cellulaires HEK-293T et SH-SY5Y, mais il serait opportun d'étudier aussi les lignées de cellules immunes. Des travaux récents de l'équipe de Prof. E. Greggio (Université de Padoue) ont montré que suivant la lignée utilisée, les effets sur les voies de signalisation de LRRK2 étaient différents (Greggio, Bubacco, and Russo 2017; Russo et al. 2018). De plus, dans les cellules immunes, où l'expression de LRRK2 est très forte, il a été montré que les kinases I κ B phosphorylaient LRRK2 en S935 après stimulation de ces cellules. Il serait intéressant de regarder les effets de cette stimulation sur les phosphatases présentes dans ces cellules. Une notion importante et qui reste encore non élucidée, est le phénotype lié à la phosphorégulation de LRRK2. Est-ce que la phosphorylation de LRRK2 affecte en soi la toxicité de LRRK2 dans la cellule, et si oui la forme toxique de LRRK2 est-elle la forme hyperphosphorylée ou hypophosphorylée. Dans le cas présent, il est envisageable de moduler l'expression des sous-unités des holoenzymes de PP1 et PP2A agissant sur LRRK2 et de regarder les effets sur les phénotypes connus de la protéine LRRK2. Les premiers mécanismes à tester pourront être l'autophagie (macroautophagie et autophagie régulée par les protéines chaperonnes), le trafic vésiculaire dans lequel la phosphorylation des protéines Rab pourrait être analysée. D'autre part, et d'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant de mettre au point des stratégies thérapeutiques permettant de réguler la phosphorylation de LRRK2 en agissant sur l'activité de ces phosphatases. Enfin, l'examen des niveaux d'expression ou d'activation des phosphatases régulant LRRK2 pourrait être comparé entre des groupes témoins et des groupes de patients parkinsoniens. Ainsi la mesure de l'expression ou de l'activité des phosphatases pourrait servir comme potentiel biomarqueur de l'engagement d'un inhibiteur vis-à-vis de l'activité kinase de LRRK2. En effet, les inhibiteurs de la fonction kinase de LRRK2 induisent une déphosphorylation du site S935, qui est une manière indirecte de vérifier l'efficacité de l'inhibition. Il serait alors intéressant de mesurer pour les mêmes échantillons les niveaux d'expression des phosphatases et leur niveau d'activité pour ainsi vérifier s'il existe une corrélation entre la déphosphorylation observée de LRRK2 et l'activité des phosphatases cibles.

En conclusion, ce travail montre l'intérêt de continuer à examiner et valider des phosphatases agissant sur la régulation de la phosphorylation de LRRK2. Ces études permettront de mieux comprendre les modalités de la régulation de LRRK2 et ouvriront des voies de recherche pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs pour la MP.

Bibliographie

- Aasly, Jan O, Carles Vilariño-Güell, Justus C Dachsel, Philip J Webber, Andrew B West, Kristoffer Haugarvoll, Krisztina K Johansen, et al. 2010. "Novel Pathogenic LRRK2 p.Asn1437His Substitution in Familial Parkinson's Disease." *Movement Disorders* 25 (13): 2156–63. doi:10.1002/mds.23265.
- Abounit, Saïda, Luc Bousset, Frida Loria, Seng Zhu, Fabrice de Chaumont, Laura Pieri, Jean-Christophe Olivo-Marin, Ronald Melki, and Chiara Zurzolo. 2016. "Tunneling Nanotubes Spread Fibrillar α -Synuclein by Intercellular Trafficking of Lysosomes." *The EMBO Journal* 35 (19): 2120–38. doi:10.15252/embj.201593411.
- Albin, R L, A B Young, and J B Penney. 1989. "The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders." *Trends in Neurosciences* 12 (10): 366–75. doi:10.1146/annurev.ne.06.030183.000445.
- Alcalay, Roy N., Oren A. Levy, Cheryl C. Waters, Stanley Fahn, Blair Ford, Sheng-Han Kuo, Pietro Mazzoni, et al. 2015. "Glucocerebrosidase Activity in Parkinson's Disease with and without GBA Mutations." *Brain : A Journal of Neurology* 138 (Pt 9): 2648–58. doi:10.1093/brain/awv179.
- Alegre-Abarrategui, Javier, Helen Christian, Michele M P Lufino, Ruxandra Mutihac, Lara Lourenço Venda, Olaf Ansorge, and Richard Wade-Martins. 2009. "LRRK2 Regulates Autophagic Activity and Localizes to Specific Membrane Microdomains in a Novel Human Genomic Reporter Cellular Model." *Human Molecular Genetics* 18 (21): 4022–34. doi:10.1093/hmg/ddp346.
- Alessi, Dario R, and Esther Sammler. 2018. "LRRK2 Kinase in Parkinson's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 360 (6384): 36–37. doi:10.1126/science.aar5683.
- Alexander, Garrett E., Michael D. Crutcher, and M R DeLong. 1990. "Basal Ganglia-Thalamocortical Circuits: Parallel Substrates for Motor, Oculomotor, 'Prefrontal' and 'Limbic' Functions." *Progress in Brain Research* 85 (C): 119–46. doi:10.1016/S0079-6123(08)62678-3.
- Alvarez-Erviti, Lydia, Maria C. Rodriguez-Oroz, J. Mark Cooper, Cristina Caballero, Isidro Ferrer, Jose A. Obeso, and Anthony H V Schapira. 2010. "Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains." *Archives of Neurology* 67 (12): 1464–72. doi:10.1001/archneurol.2010.198.
- Andersen, Michael Aagaard, Karen Malene Wegener, Steen Larsen, Lassina Badolo, Garrick Paul Smith, Ross Jeggo, Poul Henning Jensen, Florence Sotty, Kenneth Vielsted Christensen, and Annemette Thougard. 2018. "PFE-360-Induced LRRK2 Inhibition Induces Reversible, Non-Adverse Renal Changes in Rats." *Toxicology* 395 (December 2017). Elsevier: 15–22. doi:10.1016/j.tox.2018.01.003.
- Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Carla M Lema Tomé, Peter Ekström, Bengt Mattsson, Anders Björklund, and Patrik Brundin. 2012. "Alpha-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons in Vivo." *PloS One* 7 (6): e39465. doi:10.1371/journal.pone.0039465.
- Appel, Stanley H. 2012. "Inflammation in Parkinson's Disease: Cause or Consequence?" *Movement Disorders* 27 (9): 1075–77. doi:10.1002/mds.25111.
- Arribas, Raquel L, Alejandro Romero, Javier Egea, and Cristóbal de los Ríos. 2018. "Modulation of Serine/Threonine Phosphatases by Melatonin: Therapeutic Approaches in

- Neurodegenerative Diseases.” *British Journal of Pharmacology* 175 (16): 3220–29. doi:10.1111/bph.14365.
- Atashrazm, Farzaneh, and Nicolas Dzamko. 2016. “LRRK2 Inhibitors and Their Potential in the Treatment of Parkinson’s Disease: Current Perspectives.” *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* Volume 8 (October): 177–89. doi:10.2147/CPAA.S102191.
- Athanasopoulos, Panagiotis S., Wright Jacob, Sebastian Neumann, Miriam Kutsch, Dirk Wolters, Eng K. Tan, Zoë Bichler, Christian Herrmann, and Rolf Heumann. 2016. “Identification of Protein Phosphatase 2A as an Interacting Protein of Leucine-Rich Repeat Kinase 2.” *Biological Chemistry* 397 (6): 541–54. doi:10.1515/hsz-2015-0189.
- Auluck, Pavan K., Gabriela Caraveo, and Susan Lindquist. 2010. “ α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson’s Disease.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 211–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113313.
- Baharians, Zora, and A. H. Schonthal. 1998. “Autoregulation of Protein Phosphatase Type 2A Expression.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (30): 19019–24. doi:10.1074/jbc.273.30.19019.
- Bailey, Rachel M., Jason P. Covy, Heather L. Melrose, Linda Rousseau, Ruth Watkinson, Joshua Knight, Sarah Miles, et al. 2013. “LRRK2 Phosphorylates Novel Tau Epitopes and Promotes Tauopathy.” *Acta Neuropathologica* 126 (6): 809–27. doi:10.1007/s00401-013-1188-4.
- Baldi, Isabelle, Anne Cantagrel, Pierre Lebailly, François Tison, Bénédicte Dubroca, Virginie Chrysostome, Jean-François Dartigues, and Patrick Brochard. 2003. “Association between Parkinson’s Disease and Exposure to Pesticides in Southwestern France.” *Neuroepidemiology* 22 (5): 305–10. doi:10.1159/000071194.
- Baptista, Marco A S, Kuldip D. Dave, Mark A. Frasier, Todd B. Sherer, Melanie Greeley, Melissa J. Beck, Julie S. Varsho, et al. 2013. “Loss of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) in Rats Leads to Progressive Abnormal Phenotypes in Peripheral Organs.” *PLoS ONE* 8 (11): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0080705.
- Bardien, Soraya, Suzanne Lesage, Alexis Brice, and Jonathan Carr. 2011. “Genetic Characteristics of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Associated Parkinson’s Disease.” *Parkinsonism and Related Disorders* 17 (7). Elsevier Ltd: 501–8. doi:10.1016/j.parkreldis.2010.11.008.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis a Romero, and Philippe Horvath. 2007. “CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes.” *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1709–12. doi:10.1126/science.1138140.
- Barrett, Jeffrey C., Sarah Hansoul, Dan L. Nicolae, Judy H. Cho, Richard H. Duerr, John D. Rioux, Steven R. Brant, et al. 2008. “Genome-Wide Association Defines More than 30 Distinct Susceptibility Loci for Crohn’s Disease.” *Nature Genetics* 40 (8): 955–62. doi:10.1038/ng.175.
- Baskaran, Rathinasamy, and Bharath Kumar Velmurugan. 2018. “Protein Phosphatase 2A as Therapeutic Targets in Various Disease Models.” *Life Sciences* 210 (August). Elsevier: 40–46. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.063.
- Beccano-Kelly, Dayne A., Mattia Volta, Lise N. Lise, Sarah A. Paschall, Igor Tatarnikov,

- Kimberley Co, Patrick Chou, et al. 2015. "LRRK2 Overexpression Alters Glutamatergic Presynaptic Plasticity, Striatal Dopamine Tone, Postsynaptic Signal Transduction, Motor Activity and Memory." *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddu543.
- Beccano-Kelly, Dayne A., Mattia Volta, Lise N Munsie, Sarah A. Paschall, Igor Tatarnikov, Kimberley Co, Patrick Chou, et al. 2015. "LRRK2 Overexpression Alters Glutamatergic Presynaptic Plasticity, Striatal Dopamine Tone, Postsynaptic Signal Transduction, Motor Activity and Memory." *Human Molecular Genetics* 24 (5): 1336–49. doi:10.1093/hmg/ddu543.
- Beilina, Alexandria, Iakov N Rudenko, Alice Kaganovich, Laura Civiero, Hien Chau, Suneil K Kalia, Lorraine V Kalia, et al. 2014. "Unbiased Screen for Interactors of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Supports a Common Pathway for Sporadic and Familial Parkinson Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (7): 2626–31. doi:10.1073/pnas.1318306111.
- Bendor, Jacob T, Todd P Logan, and Robert H Edwards. 2013. "The Function of α -Synuclein." *Neuron* 79 (6): 1044–66. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.004.
- Berg, Daniela, Ronald B. Postuma, Charles H. Adler, Bastiaan R. Bloem, Piu Chan, Bruno Dubois, Thomas Gasser, et al. 2015. "MDS Research Criteria for Prodromal Parkinson's Disease." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 30 (12): 1600–1611. doi:10.1002/mds.26431.
- Berthet, Amandine, Elyssa B. Margolis, Jue Zhang, Ivy Hsieh, Jiasheng Zhang, Thomas S. Hnasko, Jawad Ahmad, et al. 2014. "Loss of Mitochondrial Fission Depletes Axonal Mitochondria in Midbrain Dopamine Neurons." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (43): 14304–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.0930-14.2014.
- Berwick, Daniel C., and Kirsten Harvey. 2013. "LRRK2: An Éminence Grise of Wnt-Mediated Neurogenesis?" *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (May): 82. doi:10.3389/fncel.2013.00082.
- Biosa, Alice, Alzbeta Trancikova, Laura Civiero, Liliane Glauser, Luigi Bubacco, Elisa Greggio, and Darren J. Moore. 2013. "GTPase Activity Regulates Kinase Activity and Cellular Phenotypes of Parkinson's Disease-Associated LRRK2." *Human Molecular Genetics* 22 (6): 1140–56. doi:10.1093/hmg/dds522.
- Biskup, Saskia, Darren J. Moore, Fulvio Celsi, Shinji Higashi, Andrew B. West, Shaida A. Andrabi, Kaisa Kurkinen, et al. 2006. "Localization of LRRK2 to Membranous and Vesicular Structures in Mammalian Brain." *Annals of Neurology* 60 (5): 557–69. doi:10.1002/ana.21019.
- Biskup, Saskia, Darren J Moore, Alexis Rea, Bettina Lorenz-Deperieux, Candice E Coombes, Valina L Dawson, Ted M Dawson, and Andrew B West. 2007. "Dynamic and Redundant Regulation of LRRK2 and LRRK1 Expression." *BMC Neuroscience* 8 (1): 102. doi:10.1186/1471-2202-8-102.
- Björklund, Anders, Stephen B. Dunnett, Patrik Brundin, A. Jon Stoessl, Curt R. Freed, Robert E. Breeze, Marc Levivier, Marc Peschanski, Lorenz Studer, and Roger Barker. 2003. "Neural Transplantation for the Treatment of Parkinson's Disease." *The Lancet. Neurology* 2 (7): 437–45. doi:10.1016/S1474-4422(03)00442-3.

- Blanca Ramírez, Marian, Antonio Jesús Lara Ordóñez, Elena Fdez, Jesús Madero-Pérez, Adriano Gonnelli, Matthieu Drouyer, Marie-Christine Chartier-Harlin, et al. 2017. "GTP Binding Regulates Cellular Localization of Parkinson's Disease-Associated LRRK2." *Human Molecular Genetics* 26 (14): 2747–67. doi:10.1093/hmg/ddx161.
- Bliederaeuser, Corinna, Lisa Zondler, Veselin Grozdanov, Wolfgang P. Ruf, David Brenner, Heather L. Melrose, Peter Bauer, et al. 2016. "LRRK2 Contributes to Monocyte Dysregulation in Parkinson's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (1). Acta Neuropathologica Communications: 123. doi:10.1186/s40478-016-0396-2.
- Bollen, M. 2001. "Combinatorial Control of Protein Phosphatase-1." *Trends in Biochemical Sciences* 26 (7): 426–31. doi:S0968-0004(01)01836-9 [pii].
- Bollen, Mathieu, Wolfgang Peti, Michael J. Ragusa, and Monique Beullens. 2010. "The Extended PP1 Toolkit: Designed to Create Specificity." *Trends in Biochemical Sciences* 35 (8). Elsevier Ltd: 450–58. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.002.
- Bosch, Mariette, Xavier Cayla, Christine Van Hoof, Brian A. Hemmings, René Ozon, Wilfried Merlevede, and Jozef Goris. 1995. "The PR55 and PR65 Subunits of Protein Phosphatase 2A from *Xenopus Laevis*. Molecular Cloning and Developmental Regulation of Expression." *European Journal of Biochemistry* 230 (3): 1037–45. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20653.x.
- Bose, Anindita, and M. Flint Beal. 2016. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Journal of Neurochemistry* 139 Suppl: 216–31. doi:10.1111/jnc.13731.
- Bosgraaf, Leonard, and Peter J.M. Van Haastert. 2003. "Roc, a Ras/GTPase Domain in Complex Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1643 (1–3): 5–10. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.008.
- Boyle, Allison, and William Ondo. 2015. "Role of Apomorphine in the Treatment of Parkinson's Disease." *CNS Drugs* 29 (2): 83–89. doi:10.1007/s40263-014-0221-z.
- Braak, Heiko, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A I De Vos, Ernst N H Jansen Steur, and Eva Braak. 2003. "Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease." *Neurobiology of Aging* 24 (2): 197–211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
- Brás, José, Rita Guerreiro, and John Hardy. 2015. "SnapShot: Genetics of Parkinson's Disease." *Cell* 160 (3). Elsevier: 570–570.e1. doi:10.1016/j.cell.2015.01.019.
- Bravo-San Pedro, José M., Mireia Niso-Santano, Rubén Gómez-Sánchez, Elisa Pizarro-Estrella, Ana Aiastui-Pujana, Ana Gorostidi, Vicente Climent, et al. 2013. "The LRRK2 G2019S Mutant Exacerbates Basal Autophagy through Activation of the MEK/ERK Pathway." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (1): 121–36. doi:10.1007/s00018-012-1061-y.
- Brochard, Vanessa, Béhazine Combadière, Annick Prigent, Yasmina Laouar, Aline Perrin, Virginie Beray-Berthat, Olivia Bonduelle, et al. 2009. "Infiltration of CD4+ Lymphocytes into the Brain Contributes to Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (1): 182–92. doi:10.1172/JCI36470.
- Brouns, Stan J J, Matthijs M Jore, Magnus Lundgren, Edze R Westra, Rik J H Slijkhuis, Ambrosius P L Snijders, Mark J Dickman, Kira S Makarova, Eugene V Koonin, and John van der Oost. 2008. "Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes." *Science (New York, N.Y.)* 321 (5891): 960–64. doi:10.1126/science.1159689.
- Bryant, J C, R S Westphal, and B E Wadzinski. 1999. "Methylated C-Terminal Leucine Residue

- of PP2A Catalytic Subunit Is Important for Binding of Regulatory Balpha Subunit.” *The Biochemical Journal* 339 (Pt 2 (April): 241–46. doi:10.1042/0264-6021:3390241.
- Buhlman, Lori, Maria Damiano, Giulia Bertolin, Rosa Ferrando-Miguel, Anne Lombès, Alexis Brice, and Olga Corti. 2014. “Functional Interplay between Parkin and Drp1 in Mitochondrial Fission and Clearance.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1843 (9). Elsevier B.V.: 2012–26. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.012.
- Burn, David J. 2002. “Beyond the Iron Mask: Towards Better Recognition and Treatment of Depression Associated with Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 17 (3): 445–54. doi:10.1002/mds.10114.
- Burré, Jacqueline, Sandro Vivona, Jiajie Diao, Manu Sharma, Axel T. Brunger, and Thomas C. Südhof. 2013. “Properties of Native Brain α -Synuclein.” *Nature* 498 (7453): E4–6. doi:10.1038/nature12125.
- Caesar, Mareike, Susanne Zach, Coby B. Carlson, Kathrin Brockmann, Thomas Gasser, and Frank Gillardon. 2013. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Functionally Interacts with Microtubules and Kinase-Dependently Modulates Cell Migration.” *Neurobiology of Disease* 54. Elsevier Inc.: 280–88. doi:10.1016/j.nbd.2012.12.019.
- Calabrese, Vincent P. 2007. “Projected Number of People with Parkinson Disease in the Most Populous Nations, 2005 through 2030.” *Neurology* 69 (2): 223–4; author reply 224. doi:10.1212/01.wnl.0000271777.50910.73.
- Carlessi, Rodrigo, Vered Levin-Salomon, Sara Ciprut, Shani Bialik, Hanna Berissi, Shira Albeck, Yoav Peleg, and Adi Kimchi. 2011. “GTP Binding to the ROC Domain of DAP-Kinase Regulates Its Function through Intramolecular Signalling.” *EMBO Reports*. doi:10.1038/embor.2011.126.
- CARLSSON, A, M LINDQVIST, T MAGNUSSON, and B WALDECK. 1958. “On the Presence of 3-Hydroxytyramine in Brain.” *Science* 127 (3296): 471–471. doi:10.1126/science.127.3296.471.
- Casals, J., T. S. Elizan, and M. D. Yahr. 1998. “Postencephalitic Parkinsonism--a Review.” *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)* 105 (6–7): 645–76. doi:10.1007/s007020050086.
- Ceulemans, Hugo, and Mathieu Bollen. 2004. “Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button.” *Physiological Reviews* 84 (1): 1–39. doi:10.1152/physrev.00013.2003.
- Chalfant, Charles E, Katsuya Kishikawa, Marc C Mumby, Craig Kamibayashi, Alicja Bielawska, and Yusuf A Hannun. 1999. “Long Chain Ceramides Activate Protein Phosphatase-1 and Protein Phosphatase-2A. Activation Is Stereospecific and Regulated by Phosphatidic Acid.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (29): 20313–17.
- Chan, Diane, Allison Citro, Joanna M. Cordy, Grace C. Shen, and Benjamin Wolozin. 2011. “Rac1 Protein Rescues Neurite Retraction Caused by G2019s Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2).” *Journal of Biological Chemistry* 286 (18): 16140–49. doi:10.1074/jbc.M111.234005.
- Charpentier, Emmanuelle. 2015. “CRISPR-Cas9: How Research on a Bacterial RNA-Guided Mechanism Opened New Perspectives in Biotechnology and Biomedicine.” *EMBO Molecular Medicine* 7 (4): 363–65. doi:10.15252/emmm.201504847.

- Chartier-Harlin, Marie Christine, Jennifer Kachergus, Christophe Roumier, Vincent Mouroux, Xavier Douay, Sarah Lincoln, Clotilde Levecque, et al. 2004. “ α -Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson’s Disease.” *Lancet* 364 (9440): 1167–69. doi:10.1016/S0140-6736(04)17103-1.
- Chaudhuri, K Ray, Daniel G Healy, Anthony H V Schapira, and National Institute for Clinical Excellence. 2006. “Non-Motor Symptoms of Parkinson’s Disease: Diagnosis and Management.” *The Lancet. Neurology* 5 (3): 235–45. doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8.
- Chen, Baohui, Luke A. Gilbert, Beth A. Cimini, Joerg Schnitzbauer, Wei Zhang, Gene-Wei Li, Jason Park, et al. 2013. “Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System.” *Cell* 155 (7). Elsevier Inc.: 1479–91. doi:10.1016/j.cell.2013.12.001.
- Chen, Hongfan, Jihoon Choi, and Scott Bailey. 2014. “Cut Site Selection by the Two Nuclease Domains of the Cas9 RNA-Guided Endonuclease.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13284–94. doi:10.1074/jbc.M113.539726.
- Chen, J, B L Martin, and D L Brautigan. 1992. “Regulation of Protein Serine-Threonine Phosphatase Type-2A by Tyrosine Phosphorylation.” *Science (New York, N.Y.)* 257 (5074): 1261–64. doi:10.1126/science.1325671.
- Chen, Ling, Sile Zhang, Yanmei Liu, Hua Hong, Hongxuan Wang, Yifan Zheng, Hongyan Zhou, et al. 2011. “LRRK2 R1398H Polymorphism Is Associated with Decreased Risk of Parkinson’s Disease in a Han Chinese Population.” *Parkinsonism & Related Disorders* 17 (4). Elsevier Ltd: 291–92. doi:10.1016/j.parkreldis.2010.11.012.
- Chen, Yongchang, Yinghui Zheng, Yu Kang, Weili Yang, Yuyu Niu, Xiangyu Guo, Zhuchi Tu, et al. 2015. “Functional Disruption of the Dystrophin Gene in Rhesus Monkey Using CRISPR/Cas9.” *Human Molecular Genetics* 24 (13): 3764–74. doi:10.1093/hmg/ddv120.
- Chia, Ruth, Sara Haddock, Alexandra Beilina, Iakov N Rudenko, Adamantios Mamais, Alice Kaganovich, Yan Li, Ravindran Kumaran, Michael A Nalls, and Mark R Cookson. 2014. “Phosphorylation of LRRK2 by Casein Kinase 1 α Regulates Trans-Golgi Clustering via Differential Interaction with ARHGEF7.” *Nature Communications*. doi:10.1038/ncomms6827.
- Cho, Hyun Jin, Guoxiang Liu, Seok Min Jin, Loukia Parisiadou, Chengsong Xie, Jia Yu, Lixin Sun, et al. 2013. “MicroRNA-205 Regulates the Expression of Parkinson’s Disease-Related Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Protein.” *Human Molecular Genetics* 22 (3): 608–20. doi:10.1093/hmg/ddt470.
- Cho, Uhn Soo, and Wenqing Xu. 2007. “Crystal Structure of a Protein Phosphatase 2A Heterotrimeric Holoenzyme.” *Nature* 445 (7123): 53–57. doi:10.1038/nature05351.
- Choi, Hwan Geun, Jinwei Zhang, Xianming Deng, John M. Hatcher, Matthew P. Patricelli, Zheng Zhao, Dario R. Alessi, and Nathanael S. Gray. 2012. “Brain Penetrant LRRK2 Inhibitor.” *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3 (8): 658–62. doi:10.1021/ml300123a.
- Choi, Insup, Beomsue Kim, Ji-won Byun, Sung Hoon Baik, Yun Hyun Huh, Jong-hyeon Kim, Inhee Mook-Jung, et al. 2015. “LRRK2 G2019S Mutation Attenuates Microglial Motility by Inhibiting Focal Adhesion Kinase.” *Nature Communications* 6. Nature Publishing Group: 8255. doi:10.1038/ncomms9255.
- Christensen, K.V., G.P. Smith, and D.S. Williamson. 2017. “Development of LRRK2 Inhibitors

- for the Treatment of Parkinson's Disease." In *Progress in Medicinal Chemistry*, 1st ed., 56:37–80. Elsevier B.V. doi:10.1016/bs.pmch.2016.11.002.
- Chu, Yaping, and Jeffrey H. Kordower. 2007. "Age-Associated Increases of Alpha-Synuclein in Monkeys and Humans Are Associated with Nigrostriatal Dopamine Depletion: Is This the Target for Parkinson's Disease?" *Neurobiology of Disease* 25 (1): 134–49. doi:10.1016/j.nbd.2006.08.021.
- Cirnaru, Maria D, Antonella Marte, Elisa Belluzzi, Isabella Russo, Martina Gabrielli, Francesco Longo, Ludovico Arcuri, et al. 2014. "LRRK2 Kinase Activity Regulates Synaptic Vesicle Trafficking and Neurotransmitter Release through Modulation of LRRK2 Macro-Molecular Complex." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (May): 49. doi:10.3389/fnmol.2014.00049.
- Ciron, Carine, Lu Zheng, Wojciech Bobela, Graham W. Knott, Teresa C. Leone, Daniel P. Kelly, and Bernard L. Schneider. 2015. "PGC-1 α Activity in Nigral Dopamine Neurons Determines Vulnerability to α -Synuclein." *Acta Neuropathologica Communications* 3 (April): 16. doi:10.1186/s40478-015-0200-8.
- Civiero, Laura, and Luigi Bubacco. 2012. "Human Leucine-Rich Repeat Kinase 1 and 2: Intersecting or Unrelated Functions?" *Biochemical Society Transactions* 40 (5): 1095–1101. doi:10.1042/BST20120123.
- Civiero, Laura, Maria Daniela Cirnaru, Alexandra Beilina, Umberto Rodella, Isabella Russo, Elisa Belluzzi, Evy Lobbestael, et al. 2015. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Interacts with P21-Activated Kinase 6 to Control Neurite Complexity in Mammalian Brain." *Journal of Neurochemistry*. doi:10.1111/jnc.13369.
- Civiero, Laura, Susanna Cogo, Anneleen Kiekens, Claudia Morganti, Isabella Tessari, Evy Lobbestael, Veerle Baekelandt, et al. 2017. "PAK6 Phosphorylates 14-3-3 γ to Regulate Steady State Phosphorylation of LRRK2." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (December): 417. doi:10.3389/fnmol.2017.00417.
- Civiero, Laura, Isabella Russo, Luigi Bubacco, and Elisa Greggio. 2017. "Molecular Insights and Functional Implication of LRRK2 Dimerization." *Advances in Neurobiology* 14: 107–21. doi:10.1007/978-3-319-49969-7_6.
- Civiero, Laura, Ren??e Vancraenenbroeck, Elisa Belluzzi, Alexandra Beilina, Evy Lobbestael, Laurant Reyniers, Fangye Gao, et al. 2012. "Biochemical Characterization of Highly Purified Leucine-Rich Repeat Kinases 1 and 2 Demonstrates Formation of Homodimers." *PLoS ONE* 7 (8). doi:10.1371/journal.pone.0043472.
- Cohen, P T. 1997. "Novel Protein Serine/Threonine Phosphatases: Variety Is the Spice of Life." *Trends in Biochemical Sciences* 22 (7): 245–51. doi:https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01060-8.
- Cohen, PTW. 2002. "Protein Phosphatase 1 – Targeted in Many Directions." *Journal of Cell Science* 115 (2): 241–56.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D Hsu, et al. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819–23. doi:10.1126/science.1231143.
- Cook, D. A., G. T. Kannarkat, A. F. Cintron, Laura M. Butkovich, Kyle B. Fraser, J. Chang, N. Grigoryan, et al. 2017. "LRRK2 Levels in Immune Cells Are Increased in Parkinson's

- Disease.” *NPJ Parkinson’s Disease* 3 (1). Springer US: 11. doi:10.1038/s41531-017-0010-8.
- Cookson, Mark R. 2016. “Cellular Functions of LRRK2 Implicate Vesicular Trafficking Pathways in Parkinson’s Disease.” *Biochemical Society Transactions* 44 (6): 1603–10. doi:10.1042/BST20160228.
- Cooper, Oliver, Hyemyung Seo, Shaida Andrabi, Cristina Guardia-Laguarta, John Graziotto, Maria Sundberg, Jesse R McLean, et al. 2012. “Pharmacological Rescue of Mitochondrial Deficits in iPSC-Derived Neural Cells from Patients with Familial Parkinson’s Disease.” *Science Translational Medicine* 4 (141): 141ra90. doi:10.1126/scitranslmed.3003985.
- Corti, Olga, Suzanne Lesage, and Alexis Brice. 2011. “What Genetics Tells Us about the Causes and Mechanisms of Parkinson’s Disease.” *Physiological Reviews* 91 (4): 1161–1218. doi:10.1152/physrev.00022.2010.
- Crick, F. 1970. “Central Dogma of Molecular Biology.” *Nature* 227 (5258): 561–63. doi:10.1038/227561a0.
- Cuervo, Ana Maria, and Esther Wong. 2014. “Chaperone-Mediated Autophagy: Roles in Disease and Aging.” *Cell Research* 24 (1). Nature Publishing Group: 92–104. doi:10.1038/cr.2013.153.
- Dächsel, Justus C., Julie P. Taylor, Su San Mok, Owen A. Ross, Kelly M. Hinkle, Rachel M. Bailey, Jacob H. Hines, et al. 2007. “Identification of Potential Protein Interactors of Lrrk2.” *Parkinsonism and Related Disorders* 13 (7): 382–85. doi:10.1016/j.parkreldis.2007.01.008.
- Dächsel, Justus C, Bahareh Behrouz, Mei Yue, Joel E. Beever, Heather L. Melrose, and Matthew J. Farrer. 2010. “A Comparative Study of Lrrk2 Function in Primary Neuronal Cultures.” *Parkinsonism & Related Disorders* 16 (10). Elsevier Ltd: 650–55. doi:10.1016/j.parkreldis.2010.08.018.
- Daher, João P L, Hisham A. Abdelmotilib, Xianzhen Hu, Laura A. Volpicelli-Daley, Mark S. Moehle, Kyle B. Fraser, Elie Needle, et al. 2015. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates α -Synuclein Gene-Induced Neurodegeneration.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (32): 19433–44. doi:10.1074/jbc.M115.660001.
- Daher, João P L, Laura A Volpicelli-Daley, Jonathan P Blackburn, Mark S Moehle, and Andrew B West. 2014. “Abrogation of α -Synuclein-Mediated Dopaminergic Neurodegeneration in LRRK2-Deficient Rats.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1403215111.
- Daniëls, Veronique, Renée Vancaenenbroeck, Bernard M H Law, Elisa Greggio, Evy Lobbestael, Fangye Gao, Marc De Maeyer, et al. 2011. “Insight into the Mode of Action of the LRRK2 Y1699C Pathogenic Mutant.” *Journal of Neurochemistry* 116 (2): 304–15. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07105.x.
- de Broucker, Amélie, Pierre Semaille, Katia Cailliau, Alain Martoriati, Thomas Comptdaer, Jean-François Bodart, Alain Destée, and Marie-Christine Chartier-Harlin. 2015. “Xenopus Laevis as a Model to Identify Translation Impairment.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 103 (September): 1–9. doi:10.3791/52724.
- De Wit, Tina, Veerle Baekelandt, and Evy Lobbestael. 2018. “LRRK2 Phosphorylation: Behind the Scenes.” *The Neuroscientist*, January, 107385841875630. doi:10.1177/1073858418756309.
- Deas, Emma, Nicholas W. Wood, and Hélène Plun-Favreau. 2011. “Mitophagy and Parkinson’s

- Disease: The PINK1–Parkin Link.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (4). Elsevier B.V.: 623–33. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.08.007.
- Dehay, Benjamin, Jordi Bové, Natalia Rodríguez-Muela, Celine Perier, Ariadna Recasens, Patricia Boya, and Miquel Vila. 2010. “Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson’s Disease.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (37): 12535–44. doi:10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010.
- DeLong, Mahlon R., and Thomas Wichmann. 2007. “Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia.” *Archives of Neurology* 64 (1): 20. doi:10.1001/archneur.64.1.20.
- Deltcheva, Elitza, Krzysztof Chylinski, Cynthia M. Sharma, Karine Gonzales, Yanjie Chao, Zaid A. Pirzada, Maria R. Eckert, Jörg Vogel, and Emmanuelle Charpentier. 2011. “CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III.” *Nature* 471 (7340): 602–7. doi:10.1038/nature09886.
- Deng, Junpeng, Patrick A. Lewis, Elisa Greggio, Eli Sluch, Alexandra Beilina, and Mark R. Cookson. 2008. “Structure of the ROC Domain from the Parkinson’s Disease-Associated Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Reveals a Dimeric GTPase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1499–1504. doi:10.1073/pnas.0709098105.
- Deng, Xianming, Nicolas Dzamko, Alan Prescott, Paul Davies, Qingsong Liu, Qingkai Yang, Jiing-dwan Lee, et al. 2011. “Characterization of a Selective Inhibitor of the Parkinson’s Disease Kinase LRRK2.” *Nature Chemical Biology* 7 (4). Nature Publishing Group: 203–5. doi:10.1038/nchembio.538.
- Di Fonzo, Alessio, Christan F Rohé, Joaquim Ferreira, Hsin F Chien, Laura Vacca, Fabrizio Stocchi, Leonor Guedes, et al. 2005. “A Frequent LRRK2 Gene Mutation Associated with Autosomal Dominant Parkinson’s Disease.” *Lancet (London, England)* 365 (9457): 412–15. doi:10.1016/S0140-6736(05)17829-5.
- Di Maio, Roberto, Eric K Hoffman, Emily M Rocha, Matthew T Keeney, Laurie H Sanders, Briana R De Miranda, Alevtina Zharikov, et al. 2018. “LRRK2 Activation in Idiopathic Parkinson’s Disease.” *Science Translational Medicine* 10 (451): 1–13. doi:10.1126/scitranslmed.aar5429.
- Dickson, Dennis W., Heiko Braak, John E. Duda, Charles Duyckaerts, Thomas Gasser, Glenda M. Halliday, John Hardy, et al. 2009. “Neuropathological Assessment of Parkinson’s Disease: Refining the Diagnostic Criteria.” *The Lancet. Neurology* 8 (12). Elsevier Ltd: 1150–57. doi:10.1016/S1474-4422(09)70238-8.
- Ding, Xiaodong, and Matthew S. Goldberg. 2009. “Regulation of LRRK2 Stability by the E3 Ubiquitin Ligase CHIP.” *PloS One* 4 (6): e5949. doi:10.1371/journal.pone.0005949.
- Dobrowsky, Rick T., Craig Kamibayashi, Marc C. Mumby, and Yusuf A. Hannun. 1993. “Ceramide Activates Heterotrimeric Protein Phosphatase 2A.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (21): 15523–30.
- Doggett, Elizabeth A., Jing Zhao, Christina N. Mork, Dongmei Hu, and R. Jeremy Nichols. 2012. “Phosphorylation of LRRK2 Serines 955 and 973 Is Disrupted by Parkinson’s Disease Mutations and LRRK2 Pharmacological Inhibition.” *Journal of Neurochemistry* 120 (1): 37–45. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07537.x.
- Dominguez, Antonia A., Wendell A. Lim, and Lei S. Qi. 2016. “Beyond Editing: Repurposing

- CRISPR-Cas9 for Precision Genome Regulation and Interrogation.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (1). Nature Publishing Group: 5–15. doi:10.1038/nrm.2015.2.
- Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. 2014. “Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9.” *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213): 1258096. doi:10.1126/science.1258096.
- Du, Dan, and Lei S. Qi. 2016a. “An Introduction to CRISPR Technology for Genome Activation and Repression in Mammalian Cells.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (1): pdb.top086835. doi:10.1101/pdb.top086835.
- Du, Dan, and Lei S. Qi. 2016b. “CRISPR Technology for Genome Activation and Repression in Mammalian Cells.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (1): pdb.prot090175. doi:10.1101/pdb.prot090175.
- Duncan, Gordon W., Tien K. Khoo, Alison J. Yarnall, John T. O’Brien, Shirley Y. Coleman, David J. Brooks, Roger A. Barker, and David J. Burn. 2014. “Health-Related Quality of Life in Early Parkinson’s Disease: The Impact of Nonmotor Symptoms.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 29 (2): 195–202. doi:10.1002/mds.25664.
- Dusonchet, Julien, Hu Li, Maria Guillily, Min Liu, Klodjan Stafa, Claudio Derada Troletti, Joon Y. Boon, et al. 2014. “A Parkinson’s Disease Gene Regulatory Network Identifies the Signaling Protein RGS2 as a Modulator of LRRK2 Activity and Neuronal Toxicity.” *Human Molecular Genetics* 23 (18). doi:10.1093/hmg/ddu202.
- Dzamko, Nicolas, Germaine Chua, Madelaine Ranola, and Dominic B. Rowe. 2013. “Measurement of LRRK2 and Ser910/935 Phosphorylated LRRK2 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Idiopathic Parkinson’s Disease Patients.” *Journal of Parkinson’s Disease* 3 (2): 145–52. doi:10.3233/JPD-130174.
- Dzamko, Nicolas, Maria Deak, Faycal Hentati, Alastair D Reith, Alan R Prescott, Dario R Alessi, and R Jeremy Nichols. 2010. “Inhibition of LRRK2 Kinase Activity Leads to Dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), Disruption of 14-3-3 Binding and Altered Cytoplasmic Localization.” *The Biochemical Journal* 430 (3): 405–13. doi:10.1042/BJ20100784.
- Dzamko, Nicolas, Amanda M. Gysbers, Rina Bandopadhyay, Marc F. Bolliger, Akiko Uchino, Ye Zhao, Masaki Takao, et al. 2017. “LRRK2 Levels and Phosphorylation in Parkinson’s Disease Brain and Cases with Restricted Lewy Bodies.” *Movement Disorders* 32 (3): 423–32. doi:10.1002/mds.26892.
- Dzamko, Nicolas, Francisco Inesta-Vaquera, Jiazhen Zhang, Chengsong Xie, Huaibin Cai, Simon Arthur, Li Tan, et al. 2012. “The IkappaB Kinase Family Phosphorylates the Parkinson’s Disease Kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-like Receptor Signaling.” *PLoS One* 7 (6): e39132. doi:10.1371/journal.pone.0039132.
- Dzamko, Nicolas L. 2017. “LRRK2 and the Immune System.” *Advances in Neurobiology* 14: 123–43. doi:10.1007/978-3-319-49969-7_7.
- Dzamko, Nicolas, Dominic B. Rowe, and Glenda M. Halliday. 2016. “Increased Peripheral Inflammation in Asymptomatic Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Mutation Carriers.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 31 (6): 889–97. doi:10.1002/mds.26529.

- Egloff, M P, D F Johnson, G Moorhead, P T Cohen, P Cohen, and D Barford. 1997. "Structural Basis for the Recognition of Regulatory Subunits by the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 1." *The EMBO Journal* 16 (8): 1876–87. doi:10.1093/emboj/16.8.1876.
- Eichhorn, Pieter J A, Menno P. Creyghton, and René Bernards. 2009. "Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits and Cancer." *Biochimica et Biophysica Acta* 1795 (1). Elsevier B.V.: 1–15. doi:10.1016/j.bbcan.2008.05.005.
- Elbaz, A, L Carcaillon, S Kab, and F Moisan. 2016. "Epidemiology of Parkinson's Disease." *Revue Neurologique* 172 (1). Elsevier Masson SAS: 14–26. doi:10.1016/j.neurol.2015.09.012.
- Emre, Murat. 2003. "Dementia Associated with Parkinson's Disease." *The Lancet. Neurology* 2 (4): 229–37. doi:10.1016/S1474-4422(03)00351-X.
- Esteves, A. R., M. G-Fernandes, D. Santos, C Januário, and S. M. Cardoso. 2015. "The Upshot of LRRK2 Inhibition to Parkinson's Disease Paradigm." *Molecular Neurobiology* 52 (3): 1804–20. doi:10.1007/s12035-014-8980-6.
- Esteves, A. Raquel, and Sandra M. Cardoso. 2017. "LRRK2 at the Crossroad Between Autophagy and Microtubule Trafficking." *The Neuroscientist* 23 (1): 16–26. doi:10.1177/1073858415616558.
- Estrada, Anthony a., Xingrong Liu, Charles Baker-glenn, Alan Beresford, Daniel J. Burdick, Mark Chambers, Bryan K. Chan, et al. 2012. "Discovery of Highly Potent, Selective, and Brain-Penetrable Leucine- Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Small Molecule Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry* 2 (22): 1–6. doi:10.1021/jm301020q.
- Faggiani, E., and A. Benazzouz. 2017. "Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Parkinson's Disease: From History to the Interaction with the Monoaminergic Systems." *Progress in Neurobiology* 151. Elsevier Ltd: 139–56. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.07.003.
- Fan, Ying, Andrew J M Howden, Adil R Sarhan, Pawel Lis, Genta Ito, Terina N Martinez, Kathrin Brockmann, Thomas Gasser, Dario R Alessi, and Esther M Sammler. 2018. "Interrogating Parkinson's Disease LRRK2 Kinase Pathway Activity by Assessing Rab10 Phosphorylation in Human Neutrophils." *The Biochemical Journal* 475 (1): 23–44. doi:10.1042/BCJ20170803.
- FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Alistair R R Forrest, Hideya Kawaji, Michael Rehli, J. Kenneth Baillie, Michiel J L de Hoon, Vanja Haberle, et al. 2014. "A Promoter-Level Mammalian Expression Atlas." *Nature* 507 (7493). Nature Publishing Group: 462–70. doi:10.1038/nature13182.
- Fardilha, M, S L C Esteves, L Korrodi-Gregório, O A B da Cruz e Silva, and F F da Cruz e Silva. 2010. "The Physiological Relevance of Protein Phosphatase 1 and Its Interacting Proteins to Health and Disease." *Current Medicinal Chemistry* 17 (33): 3996–4017. doi:10.2174/092986710793205363.
- Fasano, Alfonso, Naomi P Visanji, Louis W C Liu, Antony E Lang, and Ronald F. Pfeiffer. 2015. "Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease." *The Lancet. Neurology* 14 (6): 625–39. doi:10.1016/S1474-4422(15)00007-1.
- Fell, Matthew J, Christian Mirescu, Kallol Basu, Boonlert Cheewatrakoolpong, Duane E DeMong, J Michael Ellis, Lynn A Hyde, et al. 2015. "MLi-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2

- Kinase Inhibition.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 355 (3): 397–409. doi:10.1124/jpet.115.227587.
- Ferrazza, Ruggero, Susanna Cogo, Heather Melrose, Luigi Bubacco, Elisa Greggio, Graziano Guella, Laura Civiero, and Nicoletta Plotegher. 2016. “LRRK2 Deficiency Impacts Ceramide Metabolism in Brain.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (3). Elsevier Ltd: 1141–46. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.082.
- Ferrigno, P, T A Langan, and P Cohen. 1993. “Protein Phosphatase 2A1 Is the Major Enzyme in Vertebrate Cell Extracts That Dephosphorylates Several Physiological Substrates for Cyclin-Dependent Protein Kinases.” *Molecular Biology of the Cell* 4 (7): 669–77. doi:10.1091/mbc.4.7.669.
- Franke, Andre, Dermot P B McGovern, Jeffrey C. Barrett, Kai Wang, Graham L. Radford-Smith, Tariq Ahmad, Charlie W. Lees, et al. 2010. “Genome-Wide Meta-Analysis Increases to 71 the Number of Confirmed Crohn’s Disease Susceptibility Loci.” *Nature Genetics* 42 (12). Nature Publishing Group: 1118–25. doi:10.1038/ng.717.
- Fraser, Kyle B., Mark S. Moehle, João P L Daher, Philip J. Webber, Jeri Y. Williams, Carrie A. Stewart, Talene A. Yacoubian, et al. 2013. “LRRK2 Secretion in Exosomes Is Regulated by 14-3-3.” *Human Molecular Genetics* 22 (24): 4988–5000. doi:10.1093/hmg/ddt346.
- Fraser, Kyle B., Ashlee B. Rawlins, Rachel G. Clark, Roy N. Alcalay, David G. Standaert, Nianjun Liu, Parkinson’s Disease Biomarker Program Consortium, and Andrew B. West. 2016. “Ser(P)-1292 LRRK2 in Urinary Exosomes Is Elevated in Idiopathic Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 31 (10): 1543–50. doi:10.1002/mds.26686.
- Fraser, Kyle B, Mark S Moehle, Roy N Alcalay, Andrew B West, and LRRK2 Cohort Consortium. 2016. “Urinary LRRK2 Phosphorylation Predicts Parkinsonian Phenotypes in G2019S LRRK2 Carriers.” *Neurology*. doi:10.1212/WNL.0000000000002436.
- Fu, Yanfang, Jennifer A. Foden, Cyd Khayter, Morgan L. Maeder, Deepak Reyon, J. Keith Joung, and Jeffry D. Sander. 2013. “High-Frequency off-Target Mutagenesis Induced by CRISPR-Cas Nucleases in Human Cells.” *Nature Biotechnology* 31 (9). Nature Publishing Group: 822–26. doi:10.1038/nbt.2623.
- Fuji, Reina N, Michael Flagella, Miriam Baca, Marco A. S. Baptista, Jens Brodbeck, Bryan K Chan, Brian K Fiske, et al. 2015. “Effect of Selective LRRK2 Kinase Inhibition on Nonhuman Primate Lung.” *Science Translational Medicine* 7 (273): 273ra15–273ra15. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3634.
- Fujimoto, Tetta, Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, Maria Sakurai, Tadayuki Komori, and Takeshi Iwatsubo. 2017. “Parkinson’s Disease-Associated Mutant LRRK2 Phosphorylates Rab7L1 and Modifies Trans-Golgi Morphology.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, December. Elsevier Ltd, 1–8. doi:10.1016/j.bbrc.2017.12.024.
- Funayama, M, Y Li, H Tomiyama, H Yoshino, Y Imamichi, M Yamamoto, M Murata, T Toda, Y Mizuno, and N Hattori. 2007. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 G2385R Variant Is a Risk Factor for Parkinson Disease in Asian Population.” *Neuroreport* 18 (3): 273–75. doi:10.1097/WNR.0b013e32801254b6.
- Funayama, Manabu, Kazuko Hasegawa, Hisayuki Kowa, Masaaki Saito, Shoji Tsuji, and Fumiya Obata. 2002. “A New Locus for Parkinson’s Disease (PARK8) Maps to Chromosome

- 12p11.2-Q13.1.” *Annals of Neurology* 51 (3): 296–301. doi:10.1002/ana.10113.
- Funayama, Manabu, Kazuko Hasegawa, Etsuro Ohta, Noriko Kawashima, Masaru Komiyama, Hisayuki Kowa, Shoji Tsuji, and Fumiya Obata. 2005. “An LRRK2 Mutation as a Cause for the Parkinsonism in the Original PARK8 Family.” *Annals of Neurology* 57 (6): 918–21. doi:10.1002/ana.20484.
- Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas. 2013. “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering.” *Trends in Biotechnology* 31 (7). Elsevier Ltd: 397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- Gallagher, David A., and Anette Schrag. 2012. “Psychosis, Apathy, Depression and Anxiety in Parkinson’s Disease.” *Neurobiology of Disease* 46 (3). Elsevier B.V.: 581–89. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.041.
- Galter, Dagmar, Marie Westerlund, Andrea Carmine, Eva Lindqvist, Olof Sydow, and Lars Olson. 2006. “LRRK2 Expression Linked to Dopamine-Innervated Areas.” *Annals of Neurology* 59 (4): 714–19. doi:10.1002/ana.20808.
- Galvan, Adriana, Annaelle Devergnas, and Thomas Wichmann. 2015. “Alterations in Neuronal Activity in Basal Ganglia-Thalamocortical Circuits in the Parkinsonian State.” *Frontiers in Neuroanatomy* 9 (February): 5. doi:10.3389/fnana.2015.00005.
- Gandhi, Payai N., Xinglong Wang, Xiongwei Zhu, Shu G. Chen, and Amy L. Wilson-Delfosse. 2008. “The Roc Domain of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Sufficient for Interaction with Microtubules.” *Journal of Neuroscience Research* 86 (8): 1711–20. doi:10.1002/jnr.21622.
- Gardel, Margaret L., Ian C. Schneider, Yvonne Aratyn-Schaus, and Clare M. Waterman. 2010. “Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 315–33. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036.
- Gardet, A., Y. Benita, C. Li, B. E. Sands, I. Ballester, C. Stevens, J. R. Korzenik, et al. 2010. “LRRK2 Is Involved in the IFN- Response and Host Response to Pathogens.” *The Journal of Immunology* 185 (9): 5577–85. doi:10.4049/jimmunol.1000548.
- Garneau, Josiane E., Marie-Ève Dupuis, Manuela Villion, Dennis A. Romero, Rodolphe Barrangou, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, Philippe Horvath, Alfonso H. Magadán, and Sylvain Moineau. 2010. “The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA.” *Nature* 468 (7320): 67–71. doi:10.1038/nature09523.
- Gasper, Raphael, Simon Meyer, Katja Gotthardt, Minhajuddin Sirajuddin, and Alfred Wittinghofer. 2009. “It Takes Two to Tango: Regulation of G Proteins by Dimerization.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (6): 423–29. doi:10.1038/nrm2689.
- Gautier, C. A., O. Corti, and A. Brice. 2014. “Mitochondrial Dysfunctions in Parkinson’s Disease.” *Revue Neurologique* 170 (5). Elsevier Masson SAS: 339–43. doi:10.1016/j.neurol.2013.06.003.
- Gibb, W R, and A J Lees. 1988. “The Relevance of the Lewy Body to the Pathogenesis of Idiopathic Parkinson’s Disease.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 51 (6): 745–52.
- Gibbons, Jennifer A., Lukasz Kozubowski, Kelly Tatchell, and Shirish Shenolikar. 2007. “Expression of Human Protein Phosphatase-1 in *Saccharomyces Cerevisiae* Highlights the Role of Phosphatase Isoforms in Regulating Eukaryotic Functions.” *The Journal of*

- Biological Chemistry* 282 (30): 21838–47. doi:10.1074/jbc.M701272200.
- Gilbert, Luke A., Max A. Horlbeck, Britt Adamson, Jacqueline E. Villalta, Yuwen Chen, Evan H. Whitehead, Carla Guimaraes, et al. 2014. “Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation.” *Cell* 159 (3). Elsevier Inc.: 647–61. doi:10.1016/j.cell.2014.09.029.
- Gilbert, Luke A., Matthew H. Larson, Leonardo Morsut, Zairan Liu, Gloria A. Brar, Sandra E. Torres, Noam Stern-Ginossar, et al. 2013. “CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes.” *Cell* 154 (2). Elsevier Inc.: 442–51. doi:10.1016/j.cell.2013.06.044.
- Gillardon, F., R. Schmid, and H. Draheim. 2012. “Parkinson’s Disease-Linked Leucine-Rich Repeat Kinase 2(R1441G) Mutation Increases Proinflammatory Cytokine Release from Activated Primary Microglial Cells and Resultant Neurotoxicity.” *Neuroscience* 208 (April): 41–48. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.02.001.
- Gillardon, Frank. 2009. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Phosphorylates Brain Tubulin-Beta Isoforms and Modulates Microtubule Stability - A Point of Convergence in Parkinsonian Neurodegeneration?” *Journal of Neurochemistry* 110 (5): 1514–22. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06235.x.
- Gilsbach, Bernd K, Marita Eckert, and Christian Johannes Gloeckner. 2018. “Regulation of LRRK2: Insights from Structural and Biochemical Analysis.” *Biological Chemistry* 399 (7): 637–42. doi:10.1515/hsz-2018-0132.
- Gloeckner, Christian Johannes. 2005. “The Parkinson Disease Causing LRRK2 Mutation I2020T Is Associated with Increased Kinase Activity.” *Human Molecular Genetics* 15 (2): 223–32. doi:10.1093/hmg/ddi439.
- Gloeckner, Christian Johannes, Karsten Boldt, Felix Von Zweydford, Sandra Helm, Ludwig Wiesent, Hakan Sarioglu, and Marius Ueffing. 2010. “Phosphopeptide Analysis Reveals Two Discrete Clusters of Phosphorylation in the N-Terminus and the Roc Domain of the Parkinson-Disease Associated Protein Kinase LRRK2.” *Journal of Proteome Research* 9 (4): 1738–45. doi:10.1021/pr9008578.
- Godena, Vinay K, Nicholas Brookes-Hocking, Annekathrin Moller, Gary Shaw, Matthew Oswald, Rosa M Sancho, Christopher C J Miller, Alexander J Whitworth, and Kurt J De Vos. 2014. “Increasing Microtubule Acetylation Rescues Axonal Transport and Locomotor Deficits Caused by LRRK2 Roc-COR Domain Mutations.” *Nature Communications* 5. Nature Publishing Group: 5245. doi:10.1038/ncomms6245.
- Goedert, M, E S Cohen, R Jakes, and P Cohen. 1992. “P42 MAP Kinase Phosphorylation Sites in Microtubule-Associated Protein Tau Are Dephosphorylated by Protein Phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer’s Disease [Corrected].” *FEBS Letters* 312 (1): 95–99. doi:10.1016/0014-5793(92)81444-Q.
- Goldberg, Yves. 1999. “Protein Phosphatase 2A: Who Shall Regulate the Regulator?” *Biochemical Pharmacology* 57 (4): 321–28. doi:10.1016/S0006-2952(98)00245-7.
- Gómez-Suaga, Patricia, Pilar Rivero-Ríos, Elena Fdez, Marian Blanca Ramírez, Isidro Ferrer, Ana Aiausti, Adolfo López De Munain, and Sabine Hilfiker. 2014. “LRRK2 Delays Degradative Receptor Trafficking by Impeding Late Endosomal Budding through Decreasing Rab7 Activity.” *Human Molecular Genetics* 23 (25): 6779–96.

doi:10.1093/hmg/ddu395.

- Gotthardt, Katja, Michael Weyand, Arjan Kortholt, Peter J M Van Haastert, and Alfred Wittinghofer. 2008. "Structure of the Roc-COR Domain Tandem of *C. Tepidum*, a Prokaryotic Homologue of the Human LRRK2 Parkinson Kinase." *The EMBO Journal* 27 (16): 2239–49. doi:10.1038/emboj.2008.150.
- Götz, J, A Probst, E Ehler, B Hemmings, and W Kues. 1998. "Delayed Embryonic Lethality in Mice Lacking Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit Calpha." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12370–75. doi:10.1073/pnas.95.21.12370.
- Greengard, Paul, Patrick B Allen, and Angus C Nairn. 1999. "Beyond the Dopamine Receptor." *Neuron* 23 (3): 435–47. doi:10.1016/S0896-6273(00)80798-9.
- Greggio, Elisa, Luigi Bubacco, and Isabella Russo. 2017. "Cross-Talk between LRRK2 and PKA: Implication for Parkinson's Disease?" *Biochemical Society Transactions* 45 (1): 261–67. doi:10.1042/BST20160396.
- Greggio, Elisa, and Mark R Cookson. 2009. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Mutations and Parkinson's Disease: Three Questions." *ASN Neuro* 1 (1): AN20090007. doi:10.1042/AN20090007.
- Greggio, Elisa, Shushant Jain, Ann Kingsbury, Rina Bandopadhyay, Patrick Lewis, Alice Kaganovich, Marcel P. van der Brug, et al. 2006. "Kinase Activity Is Required for the Toxic Effects of Mutant LRRK2/Dardarin." *Neurobiology of Disease* 23 (2): 329–41. doi:10.1016/j.nbd.2006.04.001.
- Greggio, Elisa, Jean Marc Taymans, Eugene Yuejun Zhen, John Ryder, Renée Vancraenenbroeck, Alexandra Beilina, Peng Sun, et al. 2009. "The Parkinson's Disease Kinase LRRK2 Autophosphorylates Its GTPase Domain at Multiple Sites." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.163.
- Greggio, Elisa, Ibarido Zambrano, Alice Kaganovich, Alexandra Beilina, Jean Marc Taymans, Veronique Daniëls, Patrick Lewis, et al. 2008. "The Parkinson Disease-Associated Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Is a Dimer That Undergoes Intramolecular Autophosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 283 (24): 16906–14. doi:10.1074/jbc.M708718200.
- Guaitoli, Giambattista, Francesco Raimondi, Bernd K. Gilsbach, Yacob Gómez-Llorente, Egon Deyaert, Fabiana Renzi, Xianting Li, et al. 2016. "Structural Model of the Dimeric Parkinson's Protein LRRK2 Reveals a Compact Architecture Involving Distant Interdomain Contacts." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201523708. doi:10.1073/pnas.1523708113.
- Guerreiro, Patrícia Silva, Ellen Gerhardt, Tomás Lopes da Fonseca, Mathias Bähr, Tiago Fleming Outeiro, and Katrin Eckermann. 2016. "LRRK2 Promotes Tau Accumulation, Aggregation and Release." *Molecular Neurobiology* 53 (5): 3124–35. doi:10.1007/s12035-015-9209-z.
- Guerreiro, Patrícia Silva, Yue Huang, Amanda Gysbers, Danni Cheng, Wei Ping Gai, Tiago Fleming Outeiro, and Glenda Margaret Halliday. 2013. "LRRK2 Interactions with α -Synuclein in Parkinson's Disease Brains and in Cell Models." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 91 (4): 513–22. doi:10.1007/s00109-012-0984-y.
- Guo, Luxuan, Payal N. Gandhi, Wen Wang, Robert B. Petersen, Amy L. Wilson-Delfosse, and

- Shu G. Chen. 2007. "The Parkinson's Disease-Associated Protein, Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2), Is an Authentic GTPase That Stimulates Kinase Activity." *Experimental Cell Research* 313 (16): 3658–70. doi:10.1016/j.yexcr.2007.07.007.
- Haebig, Karina, Christian Johannes Gloeckner, Marta Garcia Miralles, Frank Gillardon, Claudia Schulte, Olaf Riess, Marius Ueffing, Saskia Biskup, and Michael Bonin. 2010. "ARHGEF7 (BETA-PIX) Acts as Guanine Nucleotide Exchange Factor for Leucine-Rich Repeat Kinase 2." Edited by Mel B. Feany. *PLoS ONE* 5 (10): e13762. doi:10.1371/journal.pone.0013762.
- Hakimi, Mansoureh, Thirumahal Selvanantham, Erika Swinton, Ruth F. Padmore, Youren Tong, Ghassan Kabbach, Katerina Venderova, et al. 2011. "Parkinson's Disease-Linked LRRK2 Is Expressed in Circulating and Tissue Immune Cells and Upregulated Following Recognition of Microbial Structures." *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)* 118 (5): 795–808. doi:10.1007/s00702-011-0653-2.
- Hamza, Taye H., Cyrus P. Zabetian, Albert Tenesa, Alain Laederach, Jennifer Montimurro, Dora Yearout, Denise M. Kay, et al. 2010. "Common Genetic Variation in the HLA Region Is Associated with Late-Onset Sporadic Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 42 (9). Nature Publishing Group: 781–85. doi:10.1038/ng.642.
- Hansen, Christian, Elodie Angot, Ann-louise Bergström, Jennifer a Steiner, Laura Pieri, Gesine Paul, Tiago F Outeiro, et al. 2011. "α-Synuclein Propagates from Mouse Brain to Grafted Dopaminergic Neurons and Seeds Aggregation in Cultured Human Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 715–25. doi:10.1172/JCI43366.
- Hatano, Taku, Shin ichiro Kubo, Satoshi Imai, Masahiro Maeda, Kiyoshi Ishikawa, Yoshikuni Mizuno, and Nobutaka Hattori. 2007. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Associates with Lipid Rafts." *Human Molecular Genetics* 16 (6): 678–90. doi:10.1093/hmg/ddm013.
- Haugarvoll, K., R. Rademakers, J. M. Kachergus, K. Nuytemans, O. A. Ross, J. M. Gibson, E-K Tan, et al. 2008. "Lrrk2 R1441C Parkinsonism Is Clinically Similar to Sporadic Parkinson Disease." *Neurology* 70 (Issue 16, Part 2): 1456–60. doi:10.1212/01.wnl.0000304044.22253.03.
- Hawkes, Christopher H., Kelly Del Tredici, and Heiko Braak. 2009. "Parkinson's Disease: The Dual Hit Theory Revisited." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170 (July): 615–22. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04365.x.
- Healy, Daniel G., Mario Falchi, Sean S. O'Sullivan, Vincenzo Bonifati, Alexandra Durr, Susan Bressman, Alexis Brice, et al. 2008. "Phenotype, Genotype, and Worldwide Genetic Penetrance of LRRK2-Associated Parkinson's Disease: A Case-Control Study." *The Lancet Neurology* 7 (7): 583–90. doi:10.1016/S1474-4422(08)70117-0.
- Heckl, Dirk, and Emmanuelle Charpentier. 2015. "Toward Whole-Transcriptome Editing with CRISPR-Cas9." *Molecular Cell* 58 (4). Elsevier Inc.: 560–62. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.016.
- Heckman, Michael G., Alexandra I. Soto-Ortolaza, Jan O. Aasly, Nadine Abahuni, Grazia Annesi, Justin A. Bacon, Soraya Bardien, et al. 2013. "Population-Specific Frequencies for LRRK2 Susceptibility Variants in the Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 28 (12): 1740–44. doi:10.1002/mds.25600.
- Hemmings, Brian A., Carolyn Adams-Pearson, Francisca Maurer, Peter Müller, Jozef Goris,

- Wilfried Merlevede, Jan Hofsteenge, and Stuart R. Stone. 1990. "Alpha- and Beta-Forms of the 65-KDa Subunit of Protein Phosphatase 2A Have a Similar 39 Amino Acid Repeating Structure." *Biochemistry* 29 (13): 3166–73. doi:10.1021/bi00465a002.
- Hemmings, H C, Paul Greengard, H Y Tung, and Philip Cohen. 1984. "DARPP-32, a Dopamine-Regulated Neuronal Phosphoprotein, Is a Potent Inhibitor of Protein Phosphatase-1." *Nature* 310 (5977). Nature Publishing Group: 503–5.
- Hemmings, H C, A C Nairn, D W Aswad, and P Greengard. 1984. "DARPP-32, a Dopamine- and Adenosine 3':5'-Monophosphate-Regulated Phosphoprotein Enriched in Dopamine-Innervated Brain Regions. II. Purification and Characterization of the Phosphoprotein from Bovine Caudate Nucleus." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 4 (1): 99–110.
- Henderson, Jaclyn L., Bethany L. Kormos, Matthew M. Hayward, Karen J. Coffman, Jayasankar Jasti, Ravi G. Kurumbail, Travis T. Wager, et al. 2015. "Discovery and Preclinical Profiling of 3-[4-(Morpholin-4-Yl)-7H-Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidin-5-Yl]Benzonitrile (PF-06447475), a Highly Potent, Selective, Brain Penetrant, and in Vivo Active LRRK2 Kinase Inhibitor." *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (1): 419–32. doi:10.1021/jm5014055.
- Henderson, Robin, Roger Kurlan, J M Kersun, and Peter Como. 1992. "Preliminary Examination of the Comorbidity of Anxiety and Depression in Parkinson's Disease." *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 4 (3): 257–64. doi:10.1176/jnp.4.3.257.
- Hendrix, Peter, Patric Turowski, Regina E. Mayer-Jaekel, Jozef Goris, Jan Hofsteenge, Wilfried Merlevede, and Brian A. Hemmings. 1993. "Analysis of Subunit Isoforms in Protein Phosphatase 2A Holoenzymes from Rabbit and Xenopus." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (10): 7330–37.
- Henry, Anastasia G, Soheil Aghamohammadzadeh, Harry Samaroo, Yi Chen, Kewa Mou, Elie Needle, and Warren D Hirst. 2015. "Pathogenic LRRK2 Mutations, through Increased Kinase Activity, Produce Enlarged Lysosomes with Reduced Degradative Capacity and Increase ATP13A2 Expression." *Human Molecular Genetics* 24 (21): 6013–28. doi:10.1093/hmg/ddv314.
- Heo, Hye Young, Kwang-Soo Kim, and Wongi Seol. 2010. "Coordinate Regulation of Neurite Outgrowth by LRRK2 and Its Interactor, Rab5." *Experimental Neurobiology* 19 (September): 97. doi:10.5607/en.2010.19.2.97.
- Hernán, Miguel A., Bahi Takkouche, Francisco Caamaño-Isorna, and Juan J. Gestal-Otero. 2002. "A Meta-Analysis of Coffee Drinking, Cigarette Smoking, and the Risk of Parkinson's Disease." *Annals of Neurology* 52 (3): 276–84. doi:10.1002/ana.10277.
- Heroes, Ewald, Bart Lesage, Janina Görnemann, Monique Beullens, Luc Van Meervelt, and Mathieu Bollen. 2013. "The PP1 Binding Code: A Molecular-Lego Strategy That Governs Specificity." *The FEBS Journal* 280 (2): 584–95. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x.
- Herzig, Martin C., Carine Kolly, Elke Persohn, Diethilde Theil, Tatjana Schweizer, Thomas Hafner, Christine Stemmelen, et al. 2011. "LRRK2 Protein Levels Are Determined by Kinase Function and Are Crucial for Kidney and Lung Homeostasis in Mice." *Human Molecular Genetics* 20 (21): 4209–23. doi:10.1093/hmg/ddr348.
- Ho, Dong Hwan, Jihoon Jang, Eun-hye Joe, Ilhong Son, Hyemyung Seo, and Wongi Seol. 2016. "G2385R and I2020T Mutations Increase LRRK2 GTPase Activity." *BioMed Research*

- International* 2016: 1–8. doi:10.1155/2016/7917128.
- Ho, Dong Hwan, A Reum Je, Haejin Lee, Ilhong Son, Hee-Seok Kweon, Hyung-Gun Kim, and Wongi Seol. 2018. “LRRK2 Kinase Activity Induces Mitochondrial Fission in Microglia via Drp1 and Modulates Neuroinflammation.” *Experimental Neurobiology* 27 (3): 171–80. doi:10.5607/en.2018.27.3.171.
- Hongge, Li, Guo Kexin, Mou Xiaojie, Xiong Nian, and Huang Jinsha. 2015. “The Role of LRRK2 in the Regulation of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells.” *Journal of Molecular Neuroscience* 55 (1): 233–39. doi:10.1007/s12031-014-0312-9.
- Honkanen, R E, and T Golden. 2002. “Regulators of Serine/Threonine Protein Phosphatases at the Dawn of a Clinical Era?” *Current Medicinal Chemistry* 9 (22): 2055–75. doi:10.2174/0929867023368836.
- Hsu, Patrick D., Eric S. Lander, and Feng Zhang. 2014. “Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering.” *Cell* 157 (6). Elsevier: 1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
- Hui, Ken Y., Heriberto Fernandez-Hernandez, Jianzhong Hu, Adam Schaffner, Nathan Pankratz, Nai-Yun Hsu, Ling-Shiang Chuang, et al. 2018. “Functional Variants in the LRRK2 Gene Confer Shared Effects on Risk for Crohn’s Disease and Parkinson’s Disease.” *Science Translational Medicine* 10 (423): eaai7795. doi:10.1126/scitranslmed.aai7795.
- Hunter, Tony. 1995. “Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling.” *Cell* 80 (2): 225–36. doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0.
- Hunter, Tony. 2000. “Signaling--2000 and Beyond.” *Cell* 100 (1): 113–27. doi:10.1016/j.surg.2006.06.009.
- Hunter, Tony. 2007. “The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond.” *Molecular Cell* 28 (5): 730–38. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.019.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J-R Joanna Yeh, and J. Keith Joung. 2013. “Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System.” *Nature Biotechnology* 31 (3). Nature Publishing Group: 227–29. doi:10.1038/nbt.2501.
- Ibáñez, P., A-M Bonnet, B. Débarges, E. Lohmann, F. Tison, P. Pollak, Y. Agid, A. Dürr, and A Brice. 2004. “Causal Relation between Alpha-Synuclein Gene Duplication and Familial Parkinson’s Disease.” *Lancet (London, England)* 364 (9440): 1169–71. doi:10.1016/S0140-6736(04)17104-3.
- Inoshita, Tsuyoshi, Taku Arano, Yuka Hosaka, Hongrui Meng, Yujiro Umezaki, Sakiko Kosugi, Takako Morimoto, et al. 2017. “Vps35 in Cooperation with LRRK2 Regulates Synaptic Vesicle Endocytosis through the Endosomal Pathway in Drosophila.” *Human Molecular Genetics*, May. doi:10.1093/hmg/ddx179.
- Islam, Md Shariful, Hendrik Nolte, Wright Jacob, Anna B Ziegler, Stefanie Pütz, Yael Grosjean, Karolina Szczepanowska, et al. 2016. “Human R1441C LRRK2 Regulates the Synaptic Vesicle Proteome and Phosphoproteome in a Drosophila Model of Parkinson’s Disease.” *Human Molecular Genetics*, October, ddw352. doi:10.1093/hmg/ddw352.
- Ito, Genta, Tetta Fujimoto, Shogo Kamikawaji, Tomoki Kuwahara, and Takeshi Iwatsubo. 2014. “Lack of Correlation between the Kinase Activity of LRRK2 Harboring Kinase-Modifying Mutations and Its Phosphorylation at Ser910, 935, and Ser955.” *PloS One* 9 (5): e97988.

doi:10.1371/journal.pone.0097988.

- Ito, Genta, Kristina Katsemonova, Francesca Tonelli, Pawel Lis, Marco A S Baptista, Natalia Shpiro, Graham Duddy, et al. 2016. “Phos-Tag Analysis of Rab10 Phosphorylation by LRRK2: A Powerful Assay for Assessing Kinase Function and Inhibitors.” *The Biochemical Journal* 473 (17): 2671–85. doi:10.1042/BCJ20160557.
- Jaleel, Mahaboobi, R Jeremy Nichols, Maria Deak, David G Campbell, Frank Gillardon, Axel Knebel, and Dario R Alessi. 2007. “LRRK2 Phosphorylates Moesin at Threonine-558: Characterization of How Parkinson’s Disease Mutants Affect Kinase Activity.” *The Biochemical Journal* 405 (2): 307–17. doi:10.1042/BJ20070209.
- James, Katherine A., and Deborah A. Hall. 2015. “Groundwater Pesticide Levels and the Association with Parkinson Disease.” *International Journal of Toxicology* 34 (3): 266–73. doi:10.1177/1091581815583561.
- Jankovic, J. 2008. “Parkinson’s Disease: Clinical Features and Diagnosis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79 (4): 368–76. doi:10.1136/jnnp.2007.131045.
- Janssens, V, and J Goris. 2001. “Protein Phosphatase 2A: A Highly Regulated Family of Serine/Threonine Phosphatases Implicated in Cell Growth and Signalling.” *The Biochemical Journal* 353 (Pt 3): 417–39. doi:10.1042/bj3530417.
- Janssens, Veerle, Sari Longin, and Jozef Goris. 2008. “PP2A Holoenzyme Assembly: In Cauda Venenum (the Sting Is in the Tail).” *Trends in Biochemical Sciences* 33 (3): 113–21. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.004.
- Jeong, Ga Ram, Eun-hae Jang, Jae Ryul Bae, Soyoung Jun, Ho Chul Kang, Chi-hu Park, Joo-ho Shin, et al. 2018. “Dysregulated Phosphorylation of Rab GTPases by LRRK2 Induces Neurodegeneration.” *Molecular Neurodegeneration* 13 (1). Molecular Neurodegeneration: 8. doi:10.1186/s13024-018-0240-1.
- Jiang, Wenyan, David Bikard, David Cox, Feng Zhang, and Luciano A. Marraffini. 2013. “RNA-Guided Editing of Bacterial Genomes Using CRISPR-Cas Systems.” *Nature Biotechnology* 31 (3). Nature Publishing Group: 233–39. doi:10.1038/nbt.2508.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816–21. doi:10.1126/science.1225829.
- Johnson, Sam A., and Tony Hunter. 2005. “Kinomics: Methods for Deciphering the Kinome.” *Nature Methods* 2 (1): 17–25. doi:10.1038/nmeth731.
- Jorgensen, Nathan D., Yong Peng, Cherry C-Y Ho, Hardy J. Rideout, Donald Petrey, Peng Liu, and William T. Dauer. 2009. “The WD40 Domain Is Required for LRRK2 Neurotoxicity.” *PloS One* 4 (12): e8463. doi:10.1371/journal.pone.0008463.
- Kab, Sofiane, Johan Spinosi, Laura Chaperon, Aline Dugravot, Archana Singh-Manoux, Frédéric Moisan, and Alexis Elbaz. 2017. “Agricultural Activities and the Incidence of Parkinson’s Disease in the General French Population.” *European Journal of Epidemiology* 32 (3): 203–16. doi:10.1007/s10654-017-0229-z.
- Kachergus, Jennifer, Ignacio F. Mata, Mary Hulihan, Julie P. Taylor, Sarah Lincoln, Jan Aasly, J. Mark Gibson, et al. 2005. “Identification of a Novel LRRK2 Mutation Linked to Autosomal Dominant Parkinsonism: Evidence of a Common Founder across European Populations.”

- The American Journal of Human Genetics* 76 (4): 672–80. doi:10.1086/429256.
- Kahle, P J, M Neumann, L Ozmen, V Muller, H Jacobsen, A Schindzielorz, M Okochi, et al. 2000. “Subcellular Localization of Wild-Type and Parkinson’s Disease-Associated Mutant Alpha -Synuclein in Human and Transgenic Mouse Brain.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (17): 6365–73. doi:20/17/6365 [pii].
- Kalia, Lorraine V., and Anthony E. Lang. 2015. “Parkinson’s Disease.” *The Lancet* 386 (9996). Elsevier Ltd: 896–912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- Kalia, Lorraine V., Anthony E. Lang, Lili-Naz Hazrati, Shinsuke Fujioka, Zbigniew K. Wszolek, Dennis W. Dickson, Owen A. Ross, et al. 2015. “Clinical Correlations with Lewy Body Pathology in LRRK2-Related Parkinson Disease.” *JAMA Neurology* 72 (1): 100–105. doi:10.1001/jamaneurol.2014.2704.
- Kalogeropoulou, Alexia F, Jing Zhao, Marc F Bolliger, Anna Memou, Shreya Narasimha, Tyler P Molitor, William H Wilson, Hardy J Rideout, and R Jeremy Nichols. 2018. “P62/SQSTM1 Is a Novel Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Substrate That Enhances Neuronal Toxicity.” *The Biochemical Journal* 475 (7): 1271–93. doi:10.1042/BCJ20170699.
- Kamikawaji, Shogo, Genta Ito, and Takeshi Iwatsubo. 2009. “Identification of the Autophosphorylation Sites of LRRK2.” *Biochemistry* 48 (46): 10963–75. doi:10.1021/bi9011379.
- Kaushik, Susmita, and Ana Maria Cuervo. 2015. “Proteostasis and Aging.” *Nature Medicine* 21 (12). Nature Publishing Group: 1406–15. doi:10.1038/nm.4001.
- Kawakami, Fumitaka, Takatoshi Yabata, Etsuro Ohta, Tatsunori Maekawa, Naoki Shimada, Minori Suzuki, Hiroko Maruyama, Takafumi Ichikawa, and Fumiya Obata. 2012. “LRRK2 Phosphorylates Tubulin-Associated Tau but Not the Free Molecule: LRRK2-Mediated Regulation of the Tau-Tubulin Association and Neurite Outgrowth.” *PLoS ONE* 7 (1): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0030834.
- Kearns, Nicola A., Hannah Pham, Barbara Tabak, Ryan M. Genga, Noah J. Silverstein, Manuel Garber, and René Maehr. 2015. “Functional Annotation of Native Enhancers with a Cas9-Histone Demethylase Fusion.” *Nature Methods* 12 (5): 401–3. doi:10.1038/nmeth.3325.
- Kett, Lauren R., Daniela Boassa, Cherry Cheng Ying Ho, Hardy J. Rideout, Junru Hu, Masako Terada, Mark Ellisman, and William T. Dauer. 2012. “LRRK2 Parkinson Disease Mutations Enhance Its Microtubule Association.” *Human Molecular Genetics* 21 (4): 890–99. doi:10.1093/hmg/ddr526.
- Khew-Goodall, Y, Regina E Mayer, Francisca Maurer, Stuart R Stone, and Brian A Hemmings. 1991. “Structure and Transcriptional Regulation of Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit Genes.” *Biochemistry* 30 (1): 89–97. doi:10.1021/bi00215a014.
- Kiely, Maeve, and Patrick A. Kiely. 2015. “PP2A: The Wolf in Sheep’s Clothing?” *Cancers* 7 (2): 648–69. doi:10.3390/cancers7020648.
- Kim, Daniel, and John Rossi. 2008. “RNAi Mechanisms and Applications.” *BioTechniques* 44 (5): 613–16. doi:10.2144/000112792.
- Kim, Kwang Soo, Paul C Marcogliese, Jungwoo Yang, Steve M Callaghan, Virginia Resende, Elizabeth Abdel-Messih, Connie Marras, et al. 2018. “Regulation of Myeloid Cell Phagocytosis by LRRK2 via WAVE2 Complex Stabilization Is Altered in Parkinson’s Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, May, 201718946.

doi:10.1073/pnas.1718946115.

- Kim, W G, R P Mohney, B Wilson, G H Jeohn, B Liu, and J S Hong. 2000. "Regional Difference in Susceptibility to Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity in the Rat Brain: Role of Microglia." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (16): 6309–16. doi:20/16/6309 [pii].
- Kish, Stephen J., Kathleen Shannak, and Oleh Hornykiewicz. 1988. "Uneven Pattern of Dopamine Loss in the Striatum of Patients with Idiopathic Parkinson's Disease. Pathophysiologic and Clinical Implications." *The New England Journal of Medicine* 318 (14): 876–80. doi:10.1056/NEJM198804073181402.
- Kluss, Jillian H, Melissa M Conti, Alice Kaganovich, Aleksandra Beilina, Heather L Melrose, Mark R Cookson, and Adamantios Mamais. 2018. "Detection of Endogenous S1292 LRRK2 Autophosphorylation in Mouse Tissue as a Readout for Kinase Activity." *NPJ Parkinson's Disease* 4 (December 2017). Springer US: 13. doi:10.1038/s41531-018-0049-1.
- Knott, C., G. Stern, and G. P. Wilkin. 2000. "Inflammatory Regulators in Parkinson's Disease: INOS, Lipocortin-1, and Cyclooxygenases-1 and -2." *Molecular and Cellular Neurosciences* 16 (6): 724–39. doi:10.1006/mcne.2000.0914.
- Ko, Han Seok, Rachel Bailey, Wanli W. Smith, Zhaohui Liu, Joo-Ho Shin, Yun-Il Lee, Yong-Jie Zhang, et al. 2009. "CHIP Regulates Leucine-Rich Repeat Kinase-2 Ubiquitination, Degradation, and Toxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2897–2902. doi:10.1073/pnas.0810123106.
- Konermann, Silvana, Mark D. Brigham, Alexandro E. Trevino, Julia Joung, Omar O. Abudayyeh, Clea Barcena, Patrick D. Hsu, et al. 2015. "Genome-Scale Transcriptional Activation by an Engineered CRISPR-Cas9 Complex." *Nature* 517 (7536). Nature Publishing Group: 583–88. doi:10.1038/nature14136.
- Kordower, Jeffrey H., Yaping Chu, Robert A. Hauser, Thomas B. Freeman, and C. Warren Olanow. 2008. "Lewy Body-like Pathology in Long-Term Embryonic Nigral Transplants in Parkinson's Disease." *Nature Medicine* 14 (5): 504–6. doi:10.1038/nm1747.
- Kordower, Jeffrey H., Yaping Chu, Robert A. Hauser, C. Warren Olanow, and Thomas B. Freeman. 2008. "Transplanted Dopaminergic Neurons Develop PD Pathologic Changes: A Second Case Report." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 23 (16): 2303–6. doi:10.1002/mds.22369.
- Korrodi-Gregório, Luís, Sara L C Esteves, and Margarida Fardilha. 2014. "Protein Phosphatase 1 Catalytic Isoforms: Specificity toward Interacting Proteins." *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 164 (5): 366–91. doi:10.1016/j.trsl.2014.07.001.
- Kozina, Elena, Shankar Sadasivan, Yun Jiao, Yuchen Dou, Zhijun Ma, Haiyan Tan, Kiran Kodali, Timothy Shaw, Junmin Peng, and Richard J Smeyne. 2018. "Mutant LRRK2 Mediates Peripheral and Central Immune Responses Leading to Neurodegeneration in Vivo." *Brain* 141 (6): 1753–69. doi:10.1093/brain/awy077.
- Kremmer, Elisabeth, K Ohst, Julie Kiefer, Neil Brewis, and G Walter. 1997. "Separation of PP2A Core Enzyme and Holoenzyme with Monoclonal Antibodies against the Regulatory A Subunit: Abundant Expression of Both Forms in Cells." *Molecular and Cellular Biology* 17 (3): 1692–1701. doi:10.1128/MCB.17.3.1692.

- Kubo, Makoto, Yoshiko Kamiya, Ryuichi Nagashima, Tatsunori Maekawa, Koji Eshima, Sadahiro Azuma, Etsuro Ohta, and Fumiya Obata. 2010. "LRRK2 Is Expressed in B-2 but Not in B-1 B Cells, and Downregulated by Cellular Activation." *Journal of Neuroimmunology* 229 (1–2). Elsevier B.V.: 123–28. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.07.021.
- Kumar, Ganesan Senthil, Ezgi Gokhan, Sofie De Munter, Mathieu Bollen, Paola Vagnarelli, Wolfgang Peti, and Rebecca Page. 2016. "The Ki-67 and RepoMan Mitotic Phosphatases Assemble via an Identical, yet Novel Mechanism." *ELife* 5 (AUGUST): 1–15. doi:10.7554/eLife.16539.
- Kumaran, Ravindran, and Mark R. Cookson. 2015. "Pathways to Parkinsonism Redux: Convergent Pathobiological Mechanisms in Genetics of Parkinson's Disease." *Human Molecular Genetics* 24 (R1): R32–44. doi:10.1093/hmg/ddv236.
- Kuss, Martin, Eleni Adamopoulou, and Philipp J. Kahle. 2014. "Interferon- γ Induces Leucine-Rich Repeat Kinase LRRK2 via Extracellular Signal-Regulated Kinase ERK5 in Macrophages." *Journal of Neurochemistry* 129 (6): 980–87. doi:10.1111/jnc.12668.
- Kuzuhara, S, H Mori, N Izumiyama, M Yoshimura, and Y Ihara. 1988. "Lewy Bodies Are Ubiquitinated." *Acta Neuropathologica* 75 (4): 345.
- LaFountaine, Justin S., Kristin Fathe, and Hugh D C Smyth. 2015. "Delivery and Therapeutic Applications of Gene Editing Technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9." *International Journal of Pharmaceutics* 494 (1). Elsevier B.V.: 180–94. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.029.
- Lang, Anthony E., and Alberto J. Espay. 2018. "Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations." *Movement Disorders* 00 (00): 1–18. doi:10.1002/mds.27360.
- Langston, J W, P Ballard, J W Tetrad, and I Irwin. 1983. "Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis." *Science (New York, N.Y.)* 219 (4587): 979–80. doi:10.1126/science.6823561.
- Larsen, S. B., Z. Hanss, and R. Krüger. 2018. "The Genetic Architecture of Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Cell and Tissue Research* 373 (1). Cell and Tissue Research: 21–37. doi:10.1007/s00441-017-2768-8.
- Latourelle, Jeanne C., Mei Sun, Mark F. Lew, Oksana Suchowersky, Christine Klein, Lawrence I. Golbe, Margery H. Mark, et al. 2008. "The Gly2019Ser Mutation in LRRK2 Is Not Fully Penetrant in Familial Parkinson's Disease: The GenePD Study." *BMC Medicine* 6 (November): 32. doi:10.1186/1741-7015-6-32.
- Lavalley, Nicholas J, Sunny R Slone, Huiping Ding, Andrew B West, and Talene A Yacoubian. 2016. "14-3-3 Proteins Regulate Mutant LRRK2 Kinase Activity and Neurite Shortening." *Human Molecular Genetics* 25 (1): 109–22. doi:10.1093/hmg/ddv453.
- Law, B. M. H., V. A. Spain, V. H. L. Leinster, R. Chia, A. Beilina, H. J. Cho, J.-M. Taymans, et al. 2014. "A Direct Interaction between Leucine-Rich Repeat Kinase 2 and Specific -Tubulin Isoforms Regulates Tubulin Acetylation." *Journal of Biological Chemistry* 289 (2): 895–908. doi:10.1074/jbc.M113.507913.
- Lawhorn, Ingrid E B, Joshua P. Ferreira, and Clifford L. Wang. 2014. "Evaluation of SgRNA Target Sites for CRISPR-Mediated Repression of TP53." *PloS One* 9 (11): e113232. doi:10.1371/journal.pone.0113232.

- Lee, Byoung Dae, Valina L Dawson, and Ted M Dawson. 2012. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) as a Potential Therapeutic Target in Parkinson's Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 33 (7): 365–73. doi:10.1016/j.tips.2012.04.001.
- Lee, Byoung Dae, Joo-Ho Shin, Jackalina VanKampen, Leonard Petrucelli, Andrew B West, Han Seok Ko, Yun-Il Lee, et al. 2010. "Inhibitors of Leucine-Rich Repeat Kinase-2 Protect against Models of Parkinson's Disease." *Nature Medicine* 16 (9): 998–1000. doi:10.1038/nm.2199.
- Lee, Jang-Won, and Jason R. Cannon. 2015. "LRRK2 Mutations and Neurotoxicant Susceptibility." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 240 (6): 752–59. doi:10.1177/1535370215579162.
- Lesage, Suzanne, and Alexis Brice. 2009. "Parkinson's Disease: From Monogenic Forms to Genetic Susceptibility Factors." *Human Molecular Genetics* 18 (R1): R48-59. doi:10.1093/hmg/ddp012.
- Leulliot, Nicolas, Sophie Quevillon-Cheruel, Isabelle Sorel, Ines Li de La Sierra-Gallay, Bruno Collinet, Marc Graille, Karine Blondeau, et al. 2004. "Structure of Protein Phosphatase Methyltransferase 1 (PPM1), a Leucine Carboxyl Methyltransferase Involved in the Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 8351–58. doi:10.1074/jbc.M311484200.
- Lewis, Patrick A. 2009. "The Function of ROCO Proteins in Health and Disease." *Biology of the Cell* 101 (3): 183–91. doi:10.1042/BC20080053.
- Lewis, Patrick A., Elisa Greggio, Alexandra Beilina, Shushant Jain, Acacia Baker, and Mark R. Cookson. 2007. "The R1441C Mutation of LRRK2 Disrupts GTP Hydrolysis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357 (3): 668–71. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.006.
- Li, Jia-Yi, Elisabet Englund, Janice L. Holton, Denis Soulet, Peter Hagell, Andrew J. Lees, Tammamaryn Lashley, et al. 2008. "Lewy Bodies in Grafted Neurons in Subjects with Parkinson's Disease Suggest Host-to-Graft Disease Propagation." *Nature Medicine* 14 (5): 501–3. doi:10.1038/nm1746.
- Li, Kai, Bei-sha Tang, Zhen-hua Liu, Ji-feng Kang, Yuan Zhang, Lu Shen, Nan Li, Xin-xiang Yan, Kun Xia, and Ji-feng Guo. 2015. "LRRK2 A419V Variant Is a Risk Factor for Parkinson's Disease in Asian Population." *Neurobiology of Aging* 36 (10). Elsevier Inc: 2908.e11-5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.07.012.
- Li, M, and Z Damuni. 1998. "I1PP2A and I2PP2A. Two Potent Protein Phosphatase 2A-Specific Inhibitor Proteins." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 93: 59–66. doi:10.1385/0-89603-468-2:59.
- Li, Tianxia, Xinhua He, Joseph M. Thomas, Dejun Yang, Shijun Zhong, Fengtian Xue, and Wanli W. Smith. 2015. "A Novel GTP-Binding Inhibitor, FX2149, Attenuates LRRK2 Toxicity in Parkinson's Disease Models." *PloS One* 10 (3): e0122461. doi:10.1371/journal.pone.0122461.
- Li, Tianxia, Dejun Yang, Shijun Zhong, Joseph M. Thomas, Fengtian Xue, Jingnan Liu, Lingbo Kong, et al. 2014. "Novel LRRK2 GTP-Binding Inhibitors Reduced Degeneration in Parkinson's Disease Cell and Mouse Models." *Human Molecular Genetics* 23 (23): 6212–22. doi:10.1093/hmg/ddu341.

- Li, Xianting, Jyoti C. Patel, Jing Wang, Marat V. Avshalumov, Charles Nicholson, Joseph D. Buxbaum, Gregory A. Elder, Margaret E. Rice, and Zhenyu Yue. 2010. "Enhanced Striatal Dopamine Transmission and Motor Performance with LRRK2 Overexpression in Mice Is Eliminated by Familial Parkinson's Disease Mutation G2019S." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (5): 1788–97. doi:10.1523/JNEUROSCI.5604-09.2010.
- Li, Xianting, Yin Cai Tan, Shibu Poulouse, C. Warren Olanow, Xin Yun Huang, and Zhenyu Yue. 2007. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)/PARK8 Possesses GTPase Activity That Is Altered in Familial Parkinson's Disease R1441C/G Mutants." *Journal of Neurochemistry* 103 (1): 238–47. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04743.x.
- Li, Xianting, Qing Jun Wang, Nina Pan, Sangkyu Lee, Yingming Zhao, Brian T Chait, and Zhenyu Yue. 2011. "Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Binding to LRRK2 Is Impaired by Common Mutations of Familial Parkinson's Disease." *PloS One* 6 (3): e17153. doi:10.1371/journal.pone.0017153.
- Li, Xiaojie, Darren J Moore, Yulan Xiong, Ted M. Dawson, and Valina L Dawson. 2010. "Reevaluation of Phosphorylation Sites in the Parkinson Disease-Associated Leucine-Rich Repeat Kinase 2." *Journal of Biological Chemistry* 285 (38): 29569–76. doi:10.1074/jbc.M110.127639.
- Li, Xinghai, and David M Virshup. 2002. "Two Conserved Domains in Regulatory B Subunits Mediate Binding to the A Subunit of Protein Phosphatase 2A." *European Journal of Biochemistry* 269 (2): 546–52.
- Liao, H., Y. Li, D. L. Brautigan, and G. G. Gundersen. 1998. "Protein Phosphatase 1 Is Targeted to Microtubules by the Microtubule-Associated Protein Tau." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (34): 21901–8. doi:10.1074/jbc.273.34.21901.
- Liao, Jingling, C.-X. Wu, Christopher Burlak, S. Zhang, Heather Sahm, Mu Wang, Z.-Y. Zhang, et al. 2014. "Parkinson Disease-Associated Mutation R1441H in LRRK2 Prolongs the 'Active State' of Its GTPase Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (11): 4055–60. doi:10.1073/pnas.1323285111.
- Lill, Christina M. 2016. "Genetics of Parkinson's Disease." *Molecular and Cellular Probes*. doi:10.1016/j.mcp.2016.11.001.
- Linhart, Radek, Sarah Anne Wong, Jieyun Cao, Melody Tran, Anne Huynh, Casey Ardrey, Jong Min Park, et al. 2014. "Vacuolar Protein Sorting 35 (Vps35) Rescues Locomotor Deficits and Shortened Lifespan in *Drosophila* Expressing a Parkinson's Disease Mutant of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)." *Molecular Neurodegeneration* 9 (1): 23. doi:10.1186/1750-1326-9-23.
- Lis, Pawel, Sophie Burel, Martin Steger, Matthias Mann, Fiona Brown, Federico Diez, Francesca Tonelli, et al. 2018. "Development of Phospho-Specific Rab Protein Antibodies to Monitor in Vivo Activity of the LRRK2 Parkinson's Disease Kinase." *The Biochemical Journal* 475 (1): 1–22. doi:10.1042/BCJ20170802.
- Liu, Honglei, Zheng Wei, Antonia Dominguez, Yanda Li, Xiaowo Wang, and Lei S. Qi. 2015. "CRISPR-ERA: A Comprehensive Design Tool for CRISPR-Mediated Gene Editing, Repression and Activation." *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (22): 3676–78. doi:10.1093/bioinformatics/btv423.

- Liu, Weiwei, Xia'nan Liu, Yu Li, Junjie Zhao, Zhenshan Liu, Zhuqin Hu, Ying Wang, et al. 2017. "LRRK2 Promotes the Activation of NLRC4 Inflammasome during Salmonella Typhimurium Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (10): 3051–66. doi:10.1084/jem.20170014.
- Liu, Zhihua, Jinwoo Lee, Scott Krummey, Wei Lu, Huaibin Cai, and Michael J Lenardo. 2011. "The Kinase LRRK2 Is a Regulator of the Transcription Factor NFAT That Modulates the Severity of Inflammatory Bowel Disease." *Nature Immunology* 12 (11): 1063–70. doi:10.1038/ni.2113.
- Liu, Zhiyong, Nicole Bryant, Ravindran Kumaran, Alexandra Beilina, Asa Abeliovich, Mark R Cookson, and Andrew B West. 2017. "LRRK2 Phosphorylates Membrane-Bound Rabs and Is Activated by GTP-Bound Rab7L1 to Promote Recruitment to the Trans-Golgi Network." *Human Molecular Genetics* 0 (November): 1–11. doi:10.1093/hmg/ddx410.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lo, Albert, and Lei Qi. 2017. "Genetic and Epigenetic Control of Gene Expression by CRISPR-Cas Systems ." *F1000Research* 6 (May): 747. doi:10.12688/f1000research.11113.1.
- Lobbestael, E., L. Civiero, T. De Wit, J.-M. Taymans, E. Greggio, and V. Baekelandt. 2016. "Pharmacological LRRK2 Kinase Inhibition Induces LRRK2 Protein Destabilization and Proteasomal Degradation." *Scientific Reports* 6 (August 2015): 33897. doi:10.1038/srep33897.
- Lobbestael, Evy, Veerle Baekelandt, and Jean-marc Taymans. 2012. "Phosphorylation of LRRK2: From Kinase to Substrate." *Biochemical Society Transactions* 40 (5): 1102–10. doi:10.1042/BST20120128.
- Lobbestael, Evy, Veerle Reumers, Abdelilah Ibrahimi, Kirsten Paesen, Irina Thiry, Rik Gijssbers, Chris Van den Haute, Zeger Debyser, Veerle Baekelandt, and Jean-Marc Taymans. 2010. "Immunohistochemical Detection of Transgene Expression in the Brain Using Small Epitope Tags." *BMC Biotechnology* 10: 16. doi:10.1186/1472-6750-10-16.
- Lobbestael, Evy, Jing Zhao, Iakov N Rudenko, Aleksandra Beylina, Fangye Gao, Justin Wetter, Monique Beullens, et al. 2013. "Identification of Protein Phosphatase 1 as a Regulator of the LRRK2 Phosphorylation Cycle." *The Biochemical Journal* 456 (1): 119–28. doi:10.1042/BJ20121772.
- Longin, Sari, Karen Zwaenepoel, Justin V. Louis, Stephen Dilworth, Jozef Goris, and Veerle Janssens. 2007. "Selection of Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits Is Mediated by the C Terminus of the Catalytic Subunit." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 26971–80. doi:10.1074/jbc.M704059200.
- Lubbe, Steven, and Huw R. Morris. 2014. "Recent Advances in Parkinson's Disease Genetics." *Journal of Neurology* 261 (2): 259–66. doi:10.1007/s00415-013-7003-2.
- Lull, Melinda E., and Michelle L. Block. 2010. "Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration." *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7 (4): 354–65. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.014.
- Lunati, A., S. Lesage, and A. Brice. 2018. "The Genetic Landscape of Parkinson's Disease." *Revue Neurologique*, September. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.neurol.2018.08.004.

- Luzón-Toro, Berta, Elena Rubio de la Torre, Asunción Delgado, Jordi Pérez-Tur, and Sabine Hilfiker. 2007. “Mechanistic Insight into the Dominant Mode of the Parkinson’s Disease-Associated G2019S LRRK2 Mutation.” *Human Molecular Genetics* 16 (17): 2031–39. doi:10.1093/hmg/ddm151.
- MacLeod, David A., Herve Rhinn, Tomoki Kuwahara, Ari Zolin, Gilbert Di Paolo, Brian D. MacCabe, Karen S. Marder, et al. 2013. “RAB7L1 Interacts with LRRK2 to Modify Intra-neuronal Protein Sorting and Parkinson’s Disease Risk.” *Neuron* 77 (3). Elsevier: 425–39. doi:10.1016/j.neuron.2012.11.033.
- MacLeod, David, Julia Dowman, Rachel Hammond, Thomas Leete, Keiichi Inoue, and Asa Abeliovich. 2006. “The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology.” *Neuron* 52 (4): 587–93. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.008.
- Madero-Pérez, Jesús, Elena Fdez, Belén Fernández, Antonio J. Lara Ordóñez, Marian Blanca Ramírez, Patricia Gómez-Suaga, Dieter Waschbüsch, et al. 2018. “Parkinson Disease-Associated Mutations in LRRK2 Cause Centrosomal Defects via Rab8a Phosphorylation.” *Molecular Neurodegeneration* 13 (1). Molecular Neurodegeneration: 3. doi:10.1186/s13024-018-0235-y.
- Madero-Pérez, Jesús, Belén Fernández, Antonio Jesús Lara Ordóñez, Elena Fdez, Evy Lobbstaël, Veerle Baekelandt, and Sabine Hilfiker. 2018. “RAB7L1-Mediated Relocalization of LRRK2 to the Golgi Complex Causes Centrosomal Deficits via RAB8A.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (November): 1–19. doi:10.3389/fnmol.2018.00417.
- Maeder, Morgan L., Samantha J. Linder, Vincent M. Cascio, Yanfang Fu, Quan H. Ho, and J. Keith Joung. 2013. “CRISPR RNA-Guided Activation of Endogenous Human Genes.” *Nature Methods* 10 (10). Nature Publishing Group: 977–79. doi:10.1038/nmeth.2598.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, Omer S. Alkhnbashi, Fabrizio Costa, Shiraz A. Shah, Sita J. Saunders, Rodolphe Barrangou, et al. 2015. “An Updated Evolutionary Classification of CRISPR-Cas Systems.” *Nature Reviews. Microbiology* 13 (11). Nature Publishing Group: 722–36. doi:10.1038/nrmicro3569.
- Mali, Prashant, John Aach, P. Benjamin Stranges, Kevin M. Esvelt, Mark Moosburner, Sriram Kosuri, Luhan Yang, and George M. Church. 2013. “CAS9 Transcriptional Activators for Target Specificity Screening and Paired Nickases for Cooperative Genome Engineering.” *Nature Biotechnology* 31 (9): 833–38. doi:10.1038/nbt.2675.
- Mali, Prashant, Luhan Yang, Kevin M. Esvelt, John Aach, Marc Guell, James E. DiCarlo, Julie E. Norville, and George M. Church. 2013. “RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 823–26. doi:10.1126/science.1232033.
- Malicki, Jarema J., and Colin A. Johnson. 2017. “The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit.” *Trends in Cell Biology* 27 (2). Elsevier Ltd: 126–40. doi:10.1016/j.tcb.2016.08.002.
- Mamais, Adamantios, Ruth Chia, Alexandra Beilina, David N. Hauser, Christine Hall, Patrick A. Lewis, Mark R. Cookson, and Rina Bandopadhyay. 2014. “Arsenite Stress Down-Regulates Phosphorylation and 14-3-3 Binding of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2), Promoting Self-Association and Cellular Redistribution.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (31): 21386–400. doi:10.1074/jbc.M113.528463.
- Manning, G, D B Whyte, R Martinez, T Hunter, and S Sudarsanam. 2002. “The Protein Kinase

- Complement of the Human Genome.” *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600): 1912–34. doi:10.1126/science.1075762.
- Manzoni, Claudia, Paul Denny, Ruth C Lovering, and Patrick a Lewis. 2015. “Computational Analysis of the LRRK2 Interactome.” *PeerJ* 3 (February): e778. doi:10.7717/peerj.778.
- Manzoni, Claudia, Adamantios Mamais, Sybille Dihanich, Rosella Abeti, Marc P M Soutar, Helene Plun-Favreau, Paola Giunti, Sharon A. Tooze, Rina Bandopadhyay, and Patrick A. Lewis. 2013. “Inhibition of LRRK2 Kinase Activity Stimulates Macroautophagy.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833 (12). The Authors: 2900–2910. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.020.
- Marín, Ignacio. 2006. “The Parkinson Disease Gene LRRK2: Evolutionary and Structural Insights.” *Molecular Biology and Evolution* 23 (12): 2423–33. doi:10.1093/molbev/msl114.
- Marras, C, B Schüle, B Schuele, R P Munhoz, E Rogaeva, J W Langston, M Kasten, et al. 2011. “Phenotype in Parkinsonian and Nonparkinsonian LRRK2 G2019S Mutation Carriers.” *Neurology* 77 (4): 325–33. doi:10.1212/WNL.0b013e318227042d.
- Martinez-Martin, Pablo, Carmen Rodriguez-Blazquez, Monica M. Kurtis, K. Ray Chaudhuri, and NMSS Validation Group. 2011. “The Impact of Non-Motor Symptoms on Health-Related Quality of Life of Patients with Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 26 (3): 399–406. doi:10.1002/mds.23462.
- Martinez-Vicente, Marta, and Ana Maria Cuervo. 2007. “Autophagy and Neurodegeneration: When the Cleaning Crew Goes on Strike.” *The Lancet. Neurology* 6 (4): 352–61. doi:10.1016/S1474-4422(07)70076-5.
- Masuda-Suzukake, Masami, Takashi Nonaka, Masato Hosokawa, Takayuki Oikawa, Tetsuaki Arai, Haruhiko Akiyama, David M A Mann, and Masato Hasegawa. 2013. “Prion-like Spreading of Pathological α -Synuclein in Brain.” *Brain : A Journal of Neurology* 136 (Pt 4): 1128–38. doi:10.1093/brain/awt037.
- Mata, Ignacio F., Marie Y. Davis, Alexis N. Lopez, Michael O. Dorschner, Erica Martinez, Dora Yearout, Brenna A. Cholerton, et al. 2016. “The Discovery of LRRK2 p.R1441S, a Novel Mutation for Parkinson’s Disease, Adds to the Complexity of a Mutational Hotspot.” *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 171 (7): 925–30. doi:10.1002/ajmg.b.32452.
- Mata, Ignacio F, William J Wedemeyer, Matthew J Farrer, Julie P Taylor, and Kathleen A Gallo. 2006. “LRRK2 in Parkinson’s Disease: Protein Domains and Functional Insights.” *Trends in Neurosciences* 29 (5): 286–93. doi:10.1016/j.tins.2006.03.006.
- Mattea, Sebastian, Marco Baptista, Paul Reichert, April Spinale, Jian Wu, Marc Allaire, Brian Fiske, and Stefan Knapp. 2018. “Crystallizing the Parkinson’s Disease Protein LRRK2 Under Microgravity Conditions.” *BioRxiv*, 259655. doi:http://dx.doi.org/10.1101/259655.
- Mayer-Jaekel, Regina E., and Brian A. Hemmings. 1994. “Protein Phosphatase 2A — a ‘Ménage à Trois.’” *Trends in Cell Biology* 4 (8): 287–91. doi:10.1016/0962-8924(94)90219-4.
- McConnell, Jamie L, and Brian E Wadzinski. 2009. “Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development.” *Molecular Pharmacology* 75 (6): 1249–61. doi:10.1124/mol.108.053140.
- McFarland, Nikolaus R. 2016. “Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes.”

- Continuum (Minneapolis, Minn.)* 22 (4 Movement Disorders): 1117–42.
doi:10.1212/CON.0000000000000348.
- McGeer, P L, S Itagaki, B E Boyes, and E G McGeer. 1988. “Reactive Microglia Are Positive for HLA-DR in the Substantia Nigra of Parkinson’s and Alzheimer’s Disease Brains.” *Neurology* 38 (8): 1285–91.
- McNaught, Kevin St P., Roger Belizaire, Ole Isacson, Peter Jenner, and C. Warren Olanow. 2003. “Altered Proteasomal Function in Sporadic Parkinson’s Disease.” *Experimental Neurology* 179 (1): 38–46. doi:10.1006/exnr.2002.8050.
- Melrose, H. L. 2015. “LRRK2 and Ubiquitination: Implications for Kinase Inhibitor Therapy.” *Biochemical Journal*. doi:10.1042/BJ20150785.
- Melrose, H. L., J. C. Dächsel, B. Behrouz, S. J. Lincoln, M. Yue, K. M. Hinkle, C. B. Kent, et al. 2010. “Impaired Dopaminergic Neurotransmission and Microtubule-Associated Protein Tau Alterations in Human LRRK2 Transgenic Mice.” *Neurobiology of Disease* 40 (3): 503–17. doi:10.1016/j.nbd.2010.07.010.
- Mendivil-Perez, Miguel, Carlos Velez-Pardo, and Marlene Jimenez-Del-Rio. 2016. “Neuroprotective Effect of the LRRK2 Kinase Inhibitor PF-06447475 in Human Nerve-Like Differentiated Cells Exposed to Oxidative Stress Stimuli: Implications for Parkinson’s Disease.” *Neurochemical Research*, no. 52. Springer US. doi:10.1007/s11064-016-1982-1.
- Michel, Patrick P., Etienne C. Hirsch, and Stéphane Hunot. 2016. “Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease.” *Neuron* 90 (4): 675–91. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.038.
- Migheli, Rossana, Maria Grazia Del Giudice, Ylenia Spissu, Giovanna Sanna, Yulan Xiong, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, et al. 2013. “LRRK2 Affects Vesicle Trafficking, Neurotransmitter Extracellular Level and Membrane Receptor Localization.” *PLoS ONE* 8 (10). doi:10.1371/journal.pone.0077198.
- Miklossy, J, T Arai, J P Guo, a Klegeris, S Yu, E G McGeer, and P L McGeer. 2006. “LRRK2 Expression in Normal and Pathologic Human Brain and in Human Cell Lines.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (10): 953–63. doi:10.1097/01.jnen.0000235121.98052.54.
- Mir, Rafeeq, Francesca Tonelli, Pawel Lis, Thomas Macartney, Nicole K Polinski, Terina N Martinez, Meng-Yun Chou, et al. 2018. “The Parkinson’s Disease VPS35[D620N] Mutation Enhances LRRK2-Mediated Rab Protein Phosphorylation in Mouse and Human.” *The Biochemical Journal* 475 (11): 1861–83. doi:10.1042/BCJ20180248.
- Mittermeyer, Gabriele, Chadwick W. Christine, Kathryn H. Rosenbluth, Suzanne L. Baker, Philip Starr, Paul Larson, Paul L. Kaplan, John Forsayeth, Michael J. Aminoff, and Krystof S. Bankiewicz. 2012. “Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson’s Disease.” *Human Gene Therapy* 23 (4): 377–81. doi:10.1089/hum.2011.220.
- Mizuno, Yoshikuni, Shigeo Ohta, Masashi Tanaka, Shinzaburo Takamiya, Keiji Suzuki, Takeshi Sato, Hiroshi Oya, Takayuki Ozawa, and Yasuo Kagawa. 1989. “Deficiencies in Complex I Subunits of the Respiratory Chain in Parkinson’s Disease.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 163 (3): 1450–55. doi:10.1016/0006-291X(89)91141-8.
- Moehle, Mark S, João Paulo Lima Daher, Travis D Hull, Ravindra Boddu, Hisham A Abdelmotilib, James Mobley, George T Kannarkat, Malú G Tansey, and Andrew B West.

2015. “The G2019S LRRK2 Mutation Increases Myeloid Cell Chemotactic Responses and Enhances LRRK2 Binding to Actin-Regulatory Proteins.” *Human Molecular Genetics* 24 (15): 4250–67. doi:10.1093/hmg/ddv157.
- Moehle, Mark S, Philip J Webber, Tonia Tse, Nour Sukar, David G Standaert, Tara M Desilva, Rita M Cowell, et al. 2012. “LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses.” *Journal of Neuroscience* 32 (5): 1602–11. doi:10.1523/JNEUROSCI.5601-11.2012.
- Moorhead, Greg B. G., Laura Trinkle-Mulcahy, and Annegret Ulke-Lemée. 2007. “Emerging Roles of Nuclear Protein Phosphatases.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (3): 234–44. doi:10.1038/nrm2126.
- Mortiboys, Heather, Krisztina K. Johansen, Jan O. Aasly, and Oliver Bandmann. 2010. “Mitochondrial Impairment in Patients with Parkinson Disease with the G2019S Mutation in LRRK2.” *Neurology* 75 (22): 2017–20. doi:10.1212/WNL.0b013e3181ff9685.
- Mougenot, Anne-Laure, Simon Nicot, Anna Bencsik, Eric Morignat, Jérémy Verchère, Latefa Lakhdar, Stéphane Legastelois, and Thierry Baron. 2012. “Prion-like Acceleration of a Synucleinopathy in a Transgenic Mouse Model.” *Neurobiology of Aging* 33 (9). Elsevier Inc.: 2225–28. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.022.
- Mouton-Liger, Francois, Maxime Jacoupy, Jean-christophe Corvol, and Olga Corti. 2017. “PINK1/Parkin-Dependent Mitochondrial Surveillance: From Pleiotropy to Parkinson’s Disease.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (May): 1–15. doi:10.3389/fnmol.2017.00120.
- Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson’s Disease. 2003. “The Unified Parkinson’s Disease Rating Scale (UPDRS): Status and Recommendations.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 18 (7): 738–50. doi:10.1002/mds.10473.
- Muda, Kathrin, Daniela Bertinetti, Frank Gesellchen, Jennifer Sarah Hermann, Felix von Zweyendorf, Arie Geerlof, Anette Jacob, Marius Ueffing, Christian Johannes Gloeckner, and Friedrich W. Herberg. 2014. “Parkinson-Related LRRK2 Mutation R1441C/G/H Impairs PKA Phosphorylation of LRRK2 and Disrupts Its Interaction with 14-3-3.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (1): E34–43. doi:10.1073/pnas.1312701111.
- Mutez, Eugénie, Aurore Nkiliza, Karim Belarbi, Amélie de Broucker, Christel Vanbesien-Mailliot, Séverine Bleuse, Aurélie DufLOT, et al. 2014. “Involvement of the Immune System, Endocytosis and EIF2 Signaling in Both Genetically Determined and Sporadic Forms of Parkinson’s Disease.” *Neurobiology of Disease* 63: 165–70. doi:10.1016/j.nbd.2013.11.007.
- Nalls, Mike a, Nathan Pankratz, Christina M Lill, Chuong B Do, Dena G Hernandez, Mohamad Saad, Anita L DeStefano, et al. 2014. “Large-Scale Meta-Analysis of Genome-Wide Association Data Identifies Six New Risk Loci for Parkinson’s Disease.” *Nature Genetics* 056 (9). Nature Publishing Group: 1–7. doi:10.1038/ng.3043.
- Narendra, Derek P., and Richard J. Youle. 2011. “Targeting Mitochondrial Dysfunction: Role for PINK1 and Parkin in Mitochondrial Quality Control.” *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (10): 1929–38. doi:10.1089/ars.2010.3799.
- Neer, E J, C J Schmidt, R Nambudripad, and T F Smith. 1994. “The Ancient Regulatory-Protein

- Family of WD-Repeat Proteins.” *Nature* 371 (6495): 297–300. doi:10.1038/371297a0.
- Nematullah, Md, M. N. Hoda, and Farah Khan. 2018. “Protein Phosphatase 2A: A Double-Faced Phosphatase of Cellular System and Its Role in Neurodegenerative Disorders.” *Molecular Neurobiology* 55 (2): 1750–61. doi:10.1007/s12035-017-0444-3.
- Nguyen, Maria, and Dimitri Krainc. 2018. “LRRK2 Phosphorylation of Auxilin Mediates Synaptic Defects in Dopaminergic Neurons from Patients with Parkinson’s Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May, 1–6. doi:10.1073/pnas.1717590115.
- Nichols, R Jeremy. 2017. “LRRK2 Phosphorylation.” *Advances in Neurobiology* 14: 51–70. doi:10.1007/978-3-319-49969-7_3.
- Nichols, R Jeremy, Nicolas Dzamko, Nicholas a Morrice, David G Campbell, Maria Deak, Alban Ordureau, Thomas Macartney, et al. 2010. “14-3-3 Binding to LRRK2 Is Disrupted by Multiple Parkinson’s Disease-Associated Mutations and Regulates Cytoplasmic Localization.” *The Biochemical Journal* 430 (3): 393–404. doi:10.1042/BJ20100483.
- Nichols, William C, Nathan Pankratz, Dena Hernandez, Coro Paisán-Ruiz, Shushant Jain, Cheryl A Halter, Veronika E Michaels, et al. 2005. “Genetic Screening for a Single Common LRRK2 Mutation in Familial Parkinson’s Disease.” *Lancet (London, England)* 365 (9457): 410–12. doi:10.1016/S0140-6736(05)17828-3.
- Niu, Jingwen, Mei Yu, Chunyan Wang, and Zhiheng Xu. 2012. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Disturbs Mitochondrial Dynamics via Dynamin-like Protein.” *Journal of Neurochemistry* 122 (3): 650–58. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07809.x.
- Nixon-Abell, Jonathon, Daniel C Berwick, Simone Grannó, Victoria A Spain, Craig Blackstone, and Kirsten Harvey. 2016. “Protective LRRK2 R1398H Variant Enhances GTPase and Wnt Signaling Activity.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9 (March): 18. doi:10.3389/fnmol.2016.00018.
- Nucifora, Frederick C, Leslie G. Nucifora, Chee-Hoe Ng, Nicolas Arbez, Yajuan Guo, Elaine Roby, Vered Shani, et al. 2016. “Ubiquitination via K27 and K29 Chains Signals Aggregation and Neuronal Protection of LRRK2 by WSB1.” *Nature Communications* 7 (June). Nature Publishing Group: 11792. doi:10.1038/ncomms11792.
- Oaks, Joshua, and Besim Ogretmen. 2014. “Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling.” *Frontiers in Oncology* 4 (January): 388. doi:10.3389/fonc.2014.00388.
- Oertel, Wolfgang, and Jörg B. Schulz. 2016. “Current and Experimental Treatments of Parkinson Disease: A Guide for Neuroscientists.” *Journal of Neurochemistry* 139 Suppl (October): 325–37. doi:10.1111/jnc.13750.
- Ogris, Egon, Daryl M. Gibson, and David C. Pallas. 1997. “Protein Phosphatase 2A Subunit Assembly: The Catalytic Subunit Carboxy Terminus Is Important for Binding Cellular B Subunit but Not Polyomavirus Middle Tumor Antigen.” *Oncogene* 15 (8): 911–17. doi:10.1038/sj.onc.1201259.
- Olanow, C. Warren, and Patrik Brundin. 2013. “Parkinson’s Disease and Alpha Synuclein: Is Parkinson’s Disease a Prion-Like Disorder?” *Movement Disorders* 28 (1): 31–40. doi:10.1002/mds.25373.
- Olanow, C Warren, and Kevin St P McNaught. 2006. “Ubiquitin-Proteasome System and Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder*

Society 21 (11): 1806–23. doi:10.1002/mds.21013.

- Olsen, Jesper V., Blagoy Blagoev, Florian Gnad, Boris Macek, Chanchal Kumar, Peter Mortensen, and Matthias Mann. 2006. “Global, in Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks.” *Cell* 127 (3): 635–48. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026.
- Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. “Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy during Mitosis.” *Science Signaling* 3 (104): ra3. doi:10.1126/scisignal.2000475.
- Orenstein, Samantha J, Sheng-Han Kuo, Inmaculada Tasset, Esperanza Arias, Hiroshi Koga, Irene Fernandez-Carasa, ETTY Cortes, et al. 2013. “Interplay of LRRK2 with Chaperone-Mediated Autophagy.” *Nature Neuroscience* 16 (4): 394–406. doi:10.1038/nn.3350.
- Ou, Young, and J. B. Rattner. 2004. “The Centrosome in Higher Organisms: Structure, Composition, and Duplication.” *International Review of Cytology* 238 (SPEC. ISS.): 119–82. doi:10.1016/S0074-7696(04)38003-4.
- Paisán-Ruíz, Coro, Shushant Jain, E. Whitney Evans, William P. Gilks, Javier Simón, Marcel Van Der Brug, Adolfo López De Munain, et al. 2004. “Cloning of the Gene Containing Mutations That Cause PARK8-Linked Parkinson’s Disease.” *Neuron* 44 (4): 595–600. doi:10.1016/j.neuron.2004.10.023.
- Paisán-Ruíz, Coro, Priti Nath, Nicole Washecka, J. Raphael Gibbs, and Andrew B. Singleton. 2008. “Comprehensive Analysis of LRRK2 in Publicly Available Parkinson’s Disease Cases and Neurologically Normal Controls.” *Human Mutation* 29 (4): 485–90. doi:10.1002/humu.20668.
- Pajarillo, Edward, Asha Rizor, Jayden Lee, Michael Aschner, and Eunsook Lee. 2018. “The Role of Posttranslational Modifications of α -Synuclein and LRRK2 in Parkinson’s Disease: Potential Contributions of Environmental Factors.” *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, November. Elsevier B.V, #pagerange#. doi:10.1016/j.bbdis.2018.11.017.
- Palfi, Stéphane, Jean Marc Gurruchaga, G Scott Ralph, Helene Lepetit, Sonia Lavis, Philip C. Buttery, Colin Watts, et al. 2014. “Long-Term Safety and Tolerability of ProSavin, a Lentiviral Vector-Based Gene Therapy for Parkinson’s Disease: A Dose Escalation, Open-Label, Phase 1/2 Trial.” *Lancet (London, England)* 383 (9923): 1138–46. doi:10.1016/S0140-6736(13)61939-X.
- Papapetropoulos, Spiridon, Carlos Singer, Owen A Ross, Mathias Toft, Joseph L Johnson, Matthew J Farrer, and Deborah C Mash. 2006. “Clinical Heterogeneity of the LRRK2 G2019S Mutation.” *Archives of Neurology* 63 (9): 1242–46. doi:10.1001/archneur.63.9.1242.
- Parisiadou, Loukia, and Huaibin Cai. 2010. “LRRK2 Function on Actin and Microtubule Dynamics in Parkinson Disease.” *Communicative and Integrative Biology* 3 (5): 396–400. doi:10.4161/cib.3.5.12286.
- Parisiadou, Loukia, Chengsong Xie, Hyun Jin Cho, Xian Lin, Xing-Long Gu, Cai-Xia Long, Evy Lobbstaël, et al. 2009. “Phosphorylation of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins by LRRK2 Promotes the Rearrangement of Actin Cytoskeleton in Neuronal Morphogenesis.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (44):

13971–80. doi:10.1523/JNEUROSCI.3799-09.2009.

- Parisiadou, Loukia, Jia Yu, Carmelo Sgobio, Chengsong Xie, Guoxiang Liu, Lixin Sun, Xing-Long Gu, et al. 2014. “LRRK2 Regulates Synaptogenesis and Dopamine Receptor Activation through Modulation of PKA Activity.” *Nature Neuroscience* 17 (3): 367–76. doi:10.1038/nn.3636.
- Park, Hye-Jin, Kang-Woo Lee, Eun S Park, Stephanie Oh, Run Yan, Jie Zhang, Thomas G Beach, et al. 2016. “Dysregulation of Protein Phosphatase 2A in Parkinson Disease and Dementia with Lewy Bodies.” *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3 (10): 769–80. doi:10.1002/acn3.337.
- Park, Jong-Jin, Emma Dempewolf, Wenzheng Zhang, and Zeng-Yu Wang. 2017. “RNA-Guided Transcriptional Activation via CRISPR/DCas9 Mimics Overexpression Phenotypes in Arabidopsis.” *PloS One* 12 (6): e0179410. doi:10.1371/journal.pone.0179410.
- Park, Sangwook, Seulki Han, Insup Choi, Beomsue Kim, Seung Pyo Park, Eun-Hye Joe, and Young Ho Suh. 2016. “Interplay between Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) and P62/SQSTM-1 in Selective Autophagy.” *Plos One* 11 (9): e0163029. doi:10.1371/journal.pone.0163029.
- Parkinson, James. 2002. “An Essay on the Shaking Palsy. 1817.” *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 14 (2): 223–36; discussion 222. doi:10.1176/jnp.14.2.223.
- Patterson, Kate I., Tilman Brummer, Philippa M O’Brien, and Roger J. Daly. 2009. “Dual-Specificity Phosphatases: Critical Regulators with Diverse Cellular Targets.” *The Biochemical Journal* 418 (3): 475–89. doi:10.1042/BJ20082234.
- Perera, G., M. Ranola, D. B. Rowe, G. M. Halliday, and N. Dzamko. 2016. “Inhibitor Treatment of Peripheral Mononuclear Cells from Parkinson’s Disease Patients Further Validates LRRK2 Dephosphorylation as a Pharmacodynamic Biomarker.” *Scientific Reports* 6 (April). Nature Publishing Group: 31391. doi:10.1038/srep31391.
- Perez-Pinera, Pablo, D. Dewran Kocak, Christopher M. Vockley, Andrew F. Adler, Ami M. Kabadi, Lauren R. Polstein, Pratiksha I. Thakore, et al. 2013. “RNA-Guided Gene Activation by CRISPR-Cas9-Based Transcription Factors.” *Nature Methods* 10 (10): 973–76. doi:10.1038/nmeth.2600.
- Perez Carrion, Maria, Francesca Pischedda, Alice Biosa, Isabella Russo, Letizia Straniero, Laura Civiero, Marianna Guida, et al. 2018. “The LRRK2 Variant E193K Prevents Mitochondrial Fission Upon MPP+ Treatment by Altering LRRK2 Binding to DRP1.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (February): 1–18. doi:10.3389/fnmol.2018.00064.
- Peti, Wolfgang, Angus C. Nairn, and Rebecca Page. 2013. “Structural Basis for Protein Phosphatase 1 Regulation and Specificity.” *The FEBS Journal* 280 (2): 596–611. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08509.x.
- Piccoli, Giovanni, Steven B Condliffe, Matthias Bauer, Florian Giesert, Karsten Boldt, Silvia De Astis, Andrea Meixner, et al. 2011. “LRRK2 Controls Synaptic Vesicle Storage and Mobilization within the Recycling Pool.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (6): 2225–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.3730-10.2011.
- Piguet, Françoise, Sandro Alves, and Nathalie Cartier. 2017. “Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future.” *Human Gene Therapy* 28 (11):

988–1003. doi:10.1089/hum.2017.160.

- Plowey, Edward D., Salvatore J. Cherra, Yong Jian Liu, and Charleen T. Chu. 2008. “Role of Autophagy in G2019S-LRRK2-Associated Neurite Shortening in Differentiated SH-SY5Y Cells.” *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 1048–56. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x.
- Poewe, Werner, Klaus Seppi, Caroline M. Tanner, Glenda M. Halliday, Patrik Brundin, Jens Volkmann, Anette-Eleonore Schrag, and Anthony E. Lang. 2017. “Parkinson Disease.” *Nature Reviews Disease Primers* 3: 17013. doi:10.1038/nrdp.2017.13.
- Polymeropoulos, Mihael H, Christian Lavedan, Elisabeth Leroy, Susan E Ide, Anindya Dehejia, Amalia Dutra, Brian Pike, et al. 1997. “Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson’s Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 276 (5321): 2045–47. doi:10.1126/science.276.5321.2045.
- Prusiner, Stanley B. 2012. “Cell Biology. A Unifying Role for Prions in Neurodegenerative Diseases.” *Science (New York, N.Y.)* 336 (6088): 1511–13. doi:10.1126/science.1222951.
- Pungaliya, Pooja P., Yuchen Bai, Kerri Lipinski, Vasanti S. Anand, Saurabh Sen, Eugene L. Brown, Brian Bates, et al. 2010. “Identification and Characterization of a Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Consensus Phosphorylation Motif.” *PLoS ONE* 5 (10): 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0013672.
- Purlyte, Elena, Herschel S Dhekne, Adil R Sarhan, Rachel Gomez, Pawel Lis, Melanie Wightman, Terina N Martinez, Francesca Tonelli, Suzanne R Pfeffer, and Dario R Alessi. 2018. “Rab29 Activation of the Parkinson’s Disease-Associated LRRK2 Kinase.” *The EMBO Journal* 37 (1): 1–18. doi:10.15252/embj.201798099.
- Qi, Lei S., Matthew H. Larson, Luke A. Gilbert, Jennifer A. Doudna, Jonathan S. Weissman, Adam P. Arkin, and Wendell A. Lim. 2013. “Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression.” *Cell* 152 (5). Elsevier Inc.: 1173–83. doi:10.1016/j.cell.2013.02.022.
- Radziskeuskaya, Aliaksandra, Daria Shlyueva, Iris Müller, and Kristian Helin. 2016. “Optimizing SgRNA Position Markedly Improves the Efficiency of CRISPR/DCas9-Mediated Transcriptional Repression.” *Nucleic Acids Research* 44 (18): e141. doi:10.1093/nar/gkw583.
- Ramonet, David, João Paulo L Daher, Brian M. Lin, Klodjan Stafa, Jaekwang Kim, Rebecca Banerjee, Marie Westerlund, et al. 2011. “Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2.” *PLoS ONE* 6 (4): 13–19. doi:10.1371/journal.pone.0018568.
- Ramsden, Nigel, Jessica Perrin, Zhao Ren, Byoung Dae Lee, Nico Zinn, Valina L. Dawson, Danny Tam, et al. 2011. “Chemoproteomics-Based Design of Potent LRRK2-Selective Lead Compounds That Attenuate Parkinson’s Disease-Related Toxicity in Human Neurons.” *ACS Chemical Biology* 6 (10): 1021–28. doi:10.1021/cb2002413.
- Rana, Abdul Qayyum, Uzma S Ahmed, Zishan M Chaudry, and Sai Vasan. 2015. “Parkinson’s Disease: A Review of Non-Motor Symptoms.” *Expert Review of Neurotherapeutics* 15 (5): 549–62. doi:10.1586/14737175.2015.1038244.
- Rassu, Mauro, Maria Grazia Del Giudice, Simona Sanna, Jean Marc Taymans, Michele Morari, Alberto Brugnoli, Martina Frassinetti, et al. 2017. “Role of LRRK2 in the Regulation of

- Dopamine Receptor Trafficking.” Edited by Darren J Moore. *PLOS ONE* 12 (6): e0179082. doi:10.1371/journal.pone.0179082.
- Rebelo, Sandra, Mariana Santos, Filipa Martins, Edgar F da Cruz e Silva, and Odete A B da Cruz e Silva. 2015. “Protein Phosphatase 1 Is a Key Player in Nuclear Events.” *Cellular Signalling* 27 (12). Elsevier Inc.: 2589–98. doi:10.1016/j.cellsig.2015.08.007.
- Recasens, Ariadna, Benjamin Dehay, Jordi Bové, Iria Carballo-Carbajal, Sandra Dovero, Ana Pérez-Villalba, Pierre-Olivier Fernagut, et al. 2014. “Lewy Body Extracts from Parkinson Disease Brains Trigger α -Synuclein Pathology and Neurodegeneration in Mice and Monkeys.” *Annals of Neurology* 75 (3): 351–62. doi:10.1002/ana.24066.
- Reinhardt, Peter, Benjamin Schmid, Lena F Burbulla, David C Schöndorf, Lydia Wagner, Michael Glatza, Susanne Höing, et al. 2013. “Genetic Correction of a LRRK2 Mutation in Human iPSCs Links Parkinsonian Neurodegeneration to ERK-Dependent Changes in Gene Expression.” *Cell Stem Cell* 12 (3): 354–67. doi:10.1016/j.stem.2013.01.008.
- Reith, Alastair D., Paul Bamborough, Karamjit Jandu, Daniele Andreotti, Lucy Mensah, Pamela Dossang, Hwan Geun Choi, et al. 2012. “GSK2578215A; a Potent and Highly Selective 2-Arylmethoxy-5-Substituent-N-Arylbenzamide LRRK2 Kinase Inhibitor.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (17). Elsevier Ltd: 5625–29. doi:10.1016/j.bmcl.2012.06.104.
- Reyniers, Laurant, Maria Grazia Del Giudice, Laura Civiero, Elisa Belluzzi, Evy Lobbstaël, Alexandra Beilina, Giorgio Arrigoni, et al. 2014. “Differential Protein-Protein Interactions of LRRK1 and LRRK2 Indicate Roles in Distinct Cellular Signaling Pathways.” *Journal of Neurochemistry*, 1–12. doi:10.1111/jnc.12798.
- Reynolds, April, Elizabeth A Doggett, Steve M Riddle, Connie S Lebakken, and R Jeremy Nichols. 2014. “LRRK2 Kinase Activity and Biology Are Not Uniformly Predicted by Its Autophosphorylation and Cellular Phosphorylation Site Status.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (June): 54. doi:10.3389/fnmol.2014.00054.
- Rocha, Emily M., Gaynor A. Smith, Eric Park, Hongmei Cao, Eilish Brown, Melissa A. Hayes, Jonathan Beagan, et al. 2015. “Glucocerebrosidase Gene Therapy Prevents α -Synucleinopathy of Midbrain Dopamine Neurons.” *Neurobiology of Disease* 82 (October). The Authors: 495–503. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.009.
- Ross, Owen A., Yih-Ru Wu, Mei-Ching Lee, Manabu Funayama, Meng-Ling Chen, Alexandra I. Soto, Ignacio F. Mata, et al. 2008. “Analysis of Lrrk2 R1628P as a Risk Factor for Parkinson’s Disease.” *Annals of Neurology* 64 (1): 88–92. doi:10.1002/ana.21405.
- Ross, Owen A, Alexandra I Soto-Ortolaza, Michael G Heckman, Jan O Aasly, Nadine Abahuni, Grazia Annesi, Justin A Bacon, et al. 2011. “Association of LRRK2 Exonic Variants with Susceptibility to Parkinson’s Disease: A Case-Control Study.” *The Lancet Neurology* 10 (10): 898–908. doi:10.1016/S1474-4422(11)70175-2.
- Rubinsztein, David C. 2006. “The Roles of Intracellular Protein-Degradation Pathways in Neurodegeneration.” *Nature* 443 (7113): 780–86. doi:10.1038/nature05291.
- Rudenko, Iakov N., Alice Kaganovich, David N. Hauser, Aleksandra Beylina, Ruth Chia, Jinhui Ding, Dragan Maric, Howard Jaffe, and Mark R. Cookson. 2012. “The G2385R Variant of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Associated with Parkinson’s Disease Is a Partial Loss-of-Function Mutation.” *Biochemical Journal* 446 (1): 99–111. doi:10.1042/BJ20120637.

- Rudenko, Iakov N, Ruth Chia, and Mark R Cookson. 2012. "Is Inhibition of Kinase Activity the Only Therapeutic Strategy for LRRK2-Associated Parkinson's Disease?" *BMC Medicine* 10 (1). BioMed Central Ltd: 20. doi:10.1186/PREACCEPT-3356971966272323.
- Ruediger, Ralf, Jill E Van Wart Hood, Marc Mumby, and Gernot Walter. 1991. "Constant Expression and Activity of Protein Phosphatase 2A in Synchronized Cells." *Molecular and Cellular Biology* 11 (8): 4282–85.
- Russo, Isabella, Luigi Bubacco, and Elisa Greggio. 2014. "LRRK2 and Neuroinflammation: Partners in Crime in Parkinson's Disease?" *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 52. doi:10.1186/1742-2094-11-52.
- Russo, Isabella, Giulietta Di Benedetto, Alice Kaganovich, Jinhui Ding, Daniela Mercatelli, Michele Morari, Mark R Cookson, Luigi Bubacco, and Elisa Greggio. 2018. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Controls Protein Kinase A Activation State through Phosphodiesterase 4." *Journal of Neuroinflammation* 15 (1). Journal of Neuroinflammation: 297. doi:10.1186/s12974-018-1337-8.
- Ryan, Brent J., Selim Hoek, Edward A. Fon, and Richard Wade-Martins. 2015. "Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's: From Familial to Sporadic Disease." *Trends in Biochemical Sciences* 40 (4): 200–210. doi:10.1016/j.tibs.2015.02.003.
- Sacco, Francesca, Anna Mattioni, Karsten Boldt, Simona Panni, Elena Santonico, Luisa Castagnoli, Marius Ueffing, and Gianni Cesareni. 2016. "A Subset of RAB Proteins Modulates PP2A Phosphatase Activity." *Scientific Reports* 6 (1): 32857. doi:10.1038/srep32857.
- Sakakibara, Ryuji, Masahiko Kishi, Emina Ogawa, Fuyuki Tateno, Tomoyuki Uchiyama, Tatsuya Yamamoto, and Tomonori Yamanishi. 2011. "Bladder, Bowel, and Sexual Dysfunction in Parkinson's Disease." *Parkinson's Disease* 2011: 924605. doi:10.4061/2011/924605.
- Sakakibara, Ryuji, Fuyuki Tateno, Masahiko Kishi, Yohei Tsuyuzaki, Tomoyuki Uchiyama, and Tatsuya Yamamoto. 2012. "Pathophysiology of Bladder Dysfunction in Parkinson's Disease." *Neurobiology of Disease* 46 (3). Elsevier Inc.: 565–71. doi:10.1016/j.nbd.2011.10.002.
- Sánchez-Danés, Adriana, Yvonne Richaud-Patin, Iria Carballo-Carbajal, Senda Jiménez-Delgado, Carles Caig, Sergio Mora, Claudia Di Guglielmo, et al. 2012. "Disease-Specific Phenotypes in Dopamine Neurons from Human IPS-Based Models of Genetic and Sporadic Parkinson's Disease." *EMBO Molecular Medicine* 4 (5): 380–95. doi:10.1002/emmm.201200215.
- Sander, Jeffrey D., and J. Keith Joung. 2014. "CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes." *Nature Biotechnology* 32 (4). Nature Publishing Group: 347–55. doi:10.1038/nbt.2842.
- Sanna, Giovanna, Maria Grazia Del Giudice, Claudia Crosio, and Ciro Iaccarino. 2012. "LRRK2 and Vesicle Trafficking." *Biochemical Society Transactions* 40 (5): 1117–22. doi:10.1042/BST20120117.
- Sapranaukas, Rimantas, Giedrius Gasiunas, Christophe Fremaux, Rodolphe Barrangou, Philippe Horvath, and Virginijus Siksnys. 2011. "The Streptococcus Thermophilus CRISPR/Cas System Provides Immunity in Escherichia Coli." *Nucleic Acids Research* 39 (21): 9275–82.

doi:10.1093/nar/gkr606.

- Savitt, Joseph M, Valina L Dawson, and Ted M Dawson. 2006. "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: Molecules to Medicine." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1744–54. doi:10.1172/JCI29178.
- Schapansky, Jason, Saurabh Khasnavis, Mark P. DeAndrade, Jonathan D. Nardozi, Samuel R. Falkson, Justin D. Boyd, John B. Sanderson, Tim Bartels, Heather L. Melrose, and Matthew J. LaVoie. 2018. "Familial Knockin Mutation of LRRK2 Causes Lysosomal Dysfunction and Accumulation of Endogenous Insoluble α -Synuclein in Neurons." *Neurobiology of Disease* 111 (August 2017). Elsevier: 26–35. doi:10.1016/j.nbd.2017.12.005.
- Schapansky, Jason, Jonathan D. Nardozi, Fredrik Felizia, and Matthew J. LaVoie. 2014. "Membrane Recruitment of Endogenous LRRK2 Precedes Its Potent Regulation of Autophagy." *Human Molecular Genetics* 23 (16): 4201–14. doi:10.1093/hmg/ddu138.
- Schapira, A H V, T S J M Cooper, J B Clark, P Jenner, and T C D Marsden. 1990. "Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease.," 823–27. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x.
- Schapira, Anthony H V, K. Ray Chaudhuri, and Peter Jenner. 2017. "Non-Motor Features of Parkinson Disease." *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (7). Nature Publishing Group: 435–50. doi:10.1038/nrn.2017.62.
- Schapira, Anthony H V, and Eduardo Tolosa. 2010. "Molecular and Clinical Prodrome of Parkinson Disease: Implications for Treatment." *Nature Reviews. Neurology* 6 (6). Nature Publishing Group: 309–17. doi:10.1038/nrneurol.2010.52.
- Schenk, Dale B., Martin Koller, Daniel K. Ness, Sue G. Griffith, Michael Grundman, Wagner Zago, Jay Soto, George Atiee, Susanne Ostrowitzki, and Gene G. Kinney. 2017. "First-in-Human Assessment of PRX002, an Anti- α -Synuclein Monoclonal Antibody, in Healthy Volunteers." *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 32 (2): 211–18. doi:10.1002/mds.26878.
- Schmidt, Karsten, Stefan Kins, Andreas Schild, Roger M. Nitsch, Brian A. Hemmings, and Jürgen Götz. 2002. "Diversity, Developmental Regulation and Distribution of Murine PR55/B Subunits of Protein Phosphatase 2A." *European Journal of Neuroscience* 16 (11): 2039–48. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02274.x.
- Schrempf, Wiebke, Moritz D. Brandt, Alexander Storch, and Heinz Reichmann. 2014. "Sleep Disorders in Parkinson's Disease." *Journal of Parkinson's Disease* 4 (2): 211–21. doi:10.3233/JPD-130301.
- Schulte, Claudia, and Thomas Gasser. 2011. "Genetic Basis of Parkinson's Disease: Inheritance, Penetrance, and Expression." *The Application of Clinical Genetics* 4: 67–80. doi:10.2147/TACG.S11639.
- Schwab, Andrew J., and Allison D. Ebert. 2015. "Neurite Aggregation and Calcium Dysfunction in iPSC-Derived Sensory Neurons with Parkinson's Disease-Related LRRK2 G2019S Mutation." *Stem Cell Reports* 5 (6). The Authors: 1039–52. doi:10.1016/j.stemcr.2015.11.004.
- Scott, Jack D., Duane E. DeMong, Thomas J. Greshock, Kallol Basu, Xing Dai, Joel Harris, Alan Hruza, et al. 2017. "Discovery of a 3-(4-Pyrimidinyl) Indazole (MLi-2), an Orally Available and Selective Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Inhibitor That Reduces Brain Kinase

- Activity.” *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (7): 2983–92.
doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00045.
- Sejwal, Kushal, Mohamed Chami, Hervé Rémigy, Renée Vancraenenbroeck, William Sibrán, Rosmarie Sütterlin, Paul Baumgartner, et al. 2017. “Cryo-EM Analysis of Homodimeric Full-Length LRRK2 and LRRK1 Protein Complexes.” *Scientific Reports* 7 (1): 8667.
doi:10.1038/s41598-017-09126-z.
- Sents, Ward, Elitsa Ivanova, Caroline Lambrecht, Dorien Haesen, and Veerle Janssens. 2013. “The Biogenesis of Active Protein Phosphatase 2A Holoenzymes: A Tightly Regulated Process Creating Phosphatase Specificity.” *The FEBS Journal* 280 (2): 644–61.
doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08579.x.
- Seshacharyulu, Parthasarathy, Poomy Pandey, Kaustubh Datta, and Surinder K. Batra. 2013. “Phosphatase: PP2A Structural Importance, Regulation and Its Aberrant Expression in Cancer.” *Cancer Letters* 335 (1). Elsevier Ireland Ltd: 9–18.
doi:10.1016/j.canlet.2013.02.036.
- Sheng, Zejuan, Shuo Zhang, Daisy Bustos, Tracy Kleinheinz, Claire E Le Pichon, Sara L Dominguez, Hilda O Solanoy, et al. 2012. “Ser1292 Autophosphorylation Is an Indicator of LRRK2 Kinase Activity and Contributes to the Cellular Effects of PD Mutations.” *Science Translational Medicine* 4 (164): 164ra161. doi:10.1126/scitranslmed.3004485.
- Shi, Yigong. 2009. “Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure.” *Cell* 139 (3): 468–84. doi:10.1016/j.cell.2009.10.006.
- Shin, Narae, Hyerhan Jeong, Jungsun Kwon, Hye Young Heo, Jung June Kwon, Hye Jin Yun, Cy Hyun Kim, et al. 2008. “LRRK2 Regulates Synaptic Vesicle Endocytosis.” *Experimental Cell Research* 314 (10): 2055–65. doi:10.1016/j.yexcr.2008.02.015.
- Sierra, María, Sébastien Carnicella, Antonio P. Strafella, Amélie Bichon, Eugénie Lhommée, Anna Castrioto, Stephan Chabardes, Stéphane Thobois, and Paul Krack. 2015. “Apathy and Impulse Control Disorders: Yin & Yang of Dopamine Dependent Behaviors.” *Journal of Parkinson’s Disease* 5 (3): 625–36. doi:10.3233/JPD-150535.
- Singleton, A B, M Farrer, J Johnson, A Singleton, S Hague, J Kachergus, M Hulihan, et al. 2003. “Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646): 841. doi:10.1126/science.1090278.
- Smith, G. A., J. Jansson, E. M. Rocha, T. Osborn, P. J. Hallett, and O. Isacson. 2016. “Fibroblast Biomarkers of Sporadic Parkinson’s Disease and LRRK2 Kinase Inhibition.” *Molecular Neurobiology* 53 (8): 5161–77. doi:10.1007/s12035-015-9435-4.
- Sontag, Estelle, Christa Hladik, Lisa Montgomery, Ampa Luangpirom, Ingrid Mudrak, Egon Ogris, and Charles L White. 2004. “Downregulation of Protein Phosphatase 2A Carboxyl Methylation and Methyltransferase May Contribute to Alzheimer Disease Pathogenesis.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63 (10): 1080–91.
doi:10.1093/jnen/63.10.1080.
- Sontag, Estelle, Viyada Nunbhakdi-Craig, George S. Bloom, and Marc C. Mumby. 1995. “A Novel Pool of Protein Phosphatase 2A Is Associated with Microtubules and Is Regulated during the Cell Cycle.” *The Journal of Cell Biology* 128 (6): 1131–44.
doi:10.1083/jcb.128.6.1131.
- Spillantini, M G, R A Crowther, R Jakes, M Hasegawa, and M Goedert. 1998. “Alpha-Synuclein

- in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6469–73. doi:10.1073/pnas.95.11.6469.
- Spillantini, M G, R A Crowther, Ross Jakes, Nigel J. Cairns, Peter L. Lantos, and Michel Goedert. 1998. "Filamentous Alpha-Synuclein Inclusions Link Multiple System Atrophy with Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Neuroscience Letters* 251 (3): 205–8. doi:10.1016/S0304-3940(98)00504-7.
- Spillantini, Maria Grazia, Marie Luise Schmidt, Virginia M.-Y. Lee, John Q. Trojanowski, Ross Jakes, and Michel Goedert. 1997. "Alpha-Synuclein in Lewy Bodies." *Nature* 388 (6645): 839–40. doi:10.1038/42166.
- Stafa, Klodjan, Alzbeta Trancikova, Philip J Webber, Liliane Glauser, Andrew B West, and Darren J. Moore. 2012. "GTPase Activity and Neuronal Toxicity of Parkinson's Disease-Associated LRRK2 Is Regulated by ArfGAP1." Edited by Harry T. Orr. *PLoS Genetics* 8 (2): e1002526. doi:10.1371/journal.pgen.1002526.
- Stafa, Klodjan, Elpida Tsika, Roger Moser, Alessandra Musso, Liliane Glauser, Amy Jones, Saskia Biskup, et al. 2014. "Functional Interaction of Parkinson's Disease-Associated LRRK2 with Members of the Dynamin GTPase Superfamily." *Human Molecular Genetics* 23 (8): 2055–77. doi:10.1093/hmg/ddt600.
- Steger, Martin, Federico Diez, Herschel S Dhekne, Pawel Lis, Raja Sekhar Nirujogi, Ozge Karayel, Francesca Tonelli, et al. 2017. "Systematic Proteomic Analysis of LRRK2-Mediated Rab GTPase Phosphorylation Establishes a Connection to Ciliogenesis." *ELife* 6 (i): 1–22. doi:10.7554/eLife.31012.
- Steger, Martin, Francesca Tonelli, Genta Ito, Paul Davies, Matthias Trost, Melanie Vetter, Stefanie Wachter, et al. 2016. "Phosphoproteomics Reveals That Parkinson's Disease Kinase LRRK2 Regulates a Subset of Rab GTPases." *ELife* 5 (January): 1–28. doi:10.7554/eLife.12813.
- Stievenard, Alicia, Mathieu Méquignon, Zane B. Andrews, Alain Destée, Marie-Christine Chartier-Harlin, Odile Viltart, and Christel C. Vanbesien-Mailliot. 2017. "Is There a Role for Ghrelin in Central Dopaminergic Systems? Focus on Nigrostriatal and Mesocorticolimbic Pathways." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 73. Elsevier Ltd: 255–75. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.11.021.
- Stone, Stuart R., Jan Hofsteenge, and Brian A. Hemmings. 1987. "Molecular Cloning of cDNAs Encoding Two Isoforms of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A." *Biochemistry* 26 (23): 7215–20. doi:10.1021/bi00397a003.
- Strack, S., S. Kini, F F Ebner, B E Wadzinski, and R J Colbran. 1999. "Differential Cellular and Subcellular Localization of Protein Phosphatase 1 Isoforms in Brain." *The Journal of Comparative Neurology* 413 (3): 373–84. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991025)413:3<373::AID-CNE2>3.0.CO;2-Z.
- Strack, Stefan, Dennis Chang, Julie A. Zaucha, Roger J. Colbran, and Brian E. Wadzinski. 1999. "Cloning and Characterization of B δ , a Novel Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A." *FEBS Letters* 460 (3): 462–66. doi:10.1016/S0014-5793(99)01377-0.
- Strack, Stefan, Julie a Zaucha, Ford F Ebner, Roger J Colbran, and Brian E Wadzinski. 1998. "Brain Protein Phosphatase 2A: Developmental Regulation and Distinct Cellular and

- Subcellular Localization by B Subunits.” *The Journal of Comparative Neurology* 392 (4): 515–27. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980323)392:4<515::AID-CNE8>3.0.CO;2-3.
- Su, Yu-Chin, and Xin Qi. 2013. “Inhibition of Excessive Mitochondrial Fission Reduced Aberrant Autophagy and Neuronal Damage Caused by LRRK2 G2019S Mutation.” *Human Molecular Genetics* 22 (22): 4545–61. doi:10.1093/hmg/ddt301.
- Sveinbjornsdottir, Sigurlaug. 2016. “The Clinical Symptoms of Parkinson’s Disease.” *Journal of Neurochemistry* 139 Suppl (October): 318–24. doi:10.1111/jnc.13691.
- Tan, Eng-King, Rong Peng, Yik-Ying Teo, Louis C. Tan, Dario Angeles, Patrick Ho, Meng-Ling Chen, et al. 2010. “Multiple LRRK2 Variants Modulate Risk of Parkinson Disease: A Chinese Multicenter Study.” *Human Mutation* 31 (5): 561–68. doi:10.1002/humu.21225.
- Tanenbaum, Marvin E., Luke A. Gilbert, Lei S. Qi, Jonathan S. Weissman, and Ronald D. Vale. 2014. “A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging.” *Cell* 159 (3). Elsevier Inc.: 635–46. doi:10.1016/j.cell.2014.09.039.
- Tansey, Malú G., and Matthew S. Goldberg. 2010. “Neuroinflammation in Parkinson’s Disease: Its Role in Neuronal Death and Implications for Therapeutic Intervention.” *Neurobiology of Disease* 37 (3). Elsevier Inc.: 510–18. doi:10.1016/j.nbd.2009.11.004.
- Taymans, Jean-Marc. 2014. “Can the Increasing Number of Newly Developed Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Inhibitors Validate or Invalidate a Potential Disease-Modifying Therapeutic Approach for Parkinson’s Disease?” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24 (7): 727–30. doi:10.1517/13543776.2014.915945.
- Taymans, Jean-Marc, Fangye Gao, and Veerle Baekelandt. 2013. “Metabolic Labeling of Leucine Rich Repeat Kinases 1 and 2 with Radioactive Phosphate.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 79: e50523. doi:10.3791/50523.
- Taymans, Jean-marc, and Elisa Greggio. 2016. “LRRK2 Kinase Inhibition as a Therapeutic Strategy for Parkinson’s Disease, Where Do We Stand?” *Current Neuropharmacology* 14 (3): 214–25.
- Taymans, Jean-Marc, Eugénie Mutez, Matthieu Drouyer, William Sibrán, and Marie-Christine Chartier-Harlin. 2017. “LRRK2 Detection in Human Biofluids: Potential Use as a Parkinson’s Disease Biomarker?” *Biochemical Society Transactions* 45 (1): 207–12. doi:10.1042/BST20160334.
- Taymans, Jean-marc, Chris Van den Haute, and Veerle Baekelandt. 2006. “Distribution of PINK1 and LRRK2 in Rat and Mouse Brain.” *Journal of Neurochemistry* 98 (3): 951–61. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03919.x.
- Taymans, Jean-marc, Ren?e Vancraenenbroeck, Petri Ollikainen, Alexandra Beilina, Evy Lobbestael, Marc De Maeyer, Veerle Baekelandt, and Mark R. Cookson. 2011. “LRRK2 Kinase Activity Is Dependent on LRRK2 GTP Binding Capacity but Independent of LRRK2 GTP Binding.” Edited by Philipp J. Kahle. *PLoS ONE* 6 (8): e23207. doi:10.1371/journal.pone.0023207.
- Teismann, Peter, Kim Tieu, Oren Cohen, Dong-Kug Choi, Du Chu Wu, Daniel Marks, Miquel Vila, Vernice Jackson-Lewis, and Serge Przedborski. 2003. “Pathogenic Role of Glial Cells in Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society* 18 (2): 121–29. doi:10.1002/mds.10332.
- Terrak, Mohammed, Frederic Kerff, Knut Langsetmo, Terence Tao, and Roberto Dominguez.

2004. “Structural Basis of Protein Phosphatase 1 Regulation.” *Nature* 429 (6993): 780–84. doi:10.1038/nature02582.
- Thévenet, Jonathan, Rosanna Gobert, Robertus Hooft van Huijsduijnen, Christoph Wiessner, and Yves Jean Sagot. 2011. “Regulation of LRRK2 Expression Points to a Functional Role in Human Monocyte Maturation.” *PLoS ONE* 6 (6). doi:10.1371/journal.pone.0021519.
- Thirstrup, Kenneth, Justus C Dächsel, Felix S. Oppermann, Douglas S. Williamson, Garrick P. Smith, Karina Fog, and Kenneth V. Christensen. 2017. “Selective LRRK2 Kinase Inhibition Reduces Phosphorylation of Endogenous Rab10 and Rab12 in Human Peripheral Mononuclear Blood Cells.” *Scientific Reports* 7 (1): 10300. doi:10.1038/s41598-017-10501-z.
- Thomas, Joseph M., Tianxia Li, Wei Yang, Fengtian Xue, Paul S. Fishman, and Wanli W. Smith. 2016. “68 and FX2149 Attenuate Mutant LRRK2-R1441C-Induced Neural Transport Impairment.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (January): 337. doi:10.3389/fnagi.2016.00337.
- Tir, Melissa, David Devos, Serge Blond, Gustavo Touzet, Nicolas Reyns, Alain Duhamel, Olivier Cottencin, et al. 2007. “Exhaustive, One-Year Follow-up of Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation in a Large, Single-Center Cohort of Parkinsonian Patients.” *Neurosurgery* 61 (2): 297-304; discussion 304-5. doi:10.1227/01.NEU.0000285347.50028.B9.
- Tofaris, George K. 2012. “Lysosome-Dependent Pathways as a Unifying Theme in Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders* 27 (11): 1364–69. doi:10.1002/mds.25136.
- Tolstykh, T., J Lee, S Vafai, and J B Stock. 2000. “Carboxyl Methylation Regulates Phosphoprotein Phosphatase 2A by Controlling the Association of Regulatory B Subunits.” *The EMBO Journal* 19 (21): 5682–91. doi:10.1093/emboj/19.21.5682.
- Tong, Youren, Emilie Giaime, Hiroo Yamaguchi, Takaharu Ichimura, Yumin Liu, Huiqing Si, Huaibin Cai, Joseph V Bonventre, and Jie Shen. 2012. “Loss of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Causes Age-Dependent Bi-Phasic Alterations of the Autophagy Pathway.” *Molecular Neurodegeneration* 7 (1): 2. doi:10.1186/1750-1326-7-2.
- Tong, Youren, Antonio Pisani, Giuseppina Martella, Maha Karouani, Hiroo Yamaguchi, Emmanuel N Pothos, and Jie Shen. 2009. “R1441C Mutation in LRRK2 Impairs Dopaminergic Neurotransmission in Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (34): 14622–27. doi:10.1073/pnas.0906334106.
- Tong, Youren, Hiroo Yamaguchi, Emilie Giaime, Scott Boyle, Raphael Kopan, Raymond J. Kelleher, and Jie Shen. 2010. “Loss of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Causes Impairment of Protein Degradation Pathways, Accumulation of Alpha-Synuclein, and Apoptotic Cell Death in Aged Mice.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21): 9879–84. doi:10.1073/pnas.1004676107.
- Tozzi, Alessandro, Michela Tantucci, Saverio Marchi, Petra Mazzocchetti, Michele Morari, Paolo Pinton, Andrea Mancini, and Paolo Calabresi. 2018. “Dopamine D2 Receptor-Mediated Neuroprotection in a G2019S Lrrk2 Genetic Model of Parkinson’s Disease.” *Cell Death & Disease* 9 (2). Springer US: 204. doi:10.1038/s41419-017-0221-2.
- Trinh, Joanne, and Matt Farrer. 2013. “Advances in the Genetics of Parkinson Disease.” *Nature Reviews. Neurology* 9 (8). Nature Publishing Group: 445–54.

doi:10.1038/nrneuro.2013.132.

- Tsika, Elpida, Meghna Kannan, Caroline Shi-Yan Foo, Dustin Dikeman, Liliane Glauser, Sandra Gellhaar, Dagmar Galter, et al. 2014. “Conditional Expression of Parkinson’s Disease-Related R1441C LRRK2 in Midbrain Dopaminergic Neurons of Mice Causes Nuclear Abnormalities without Neurodegeneration.” *Neurobiology of Disease* 71 (1). Elsevier Inc.: 345–58. doi:10.1016/j.nbd.2014.08.027.
- Tsika, Elpida, and Darren J Moore. 2013. “Contribution of GTPase Activity to LRRK2-Associated Parkinson Disease.” *Small GTPases* 4 (3): 164–70. doi:10.4161/sgtp.25130.
- Usui, Hirofumi, R Inoue, Osamu Tanabe, Yasumasa Nishito, Masahiro Shimizu, Hideyuki Hayashi, Hiroyuki Kagamiyama, and M Takeda. 1998. “Activation of Protein Phosphatase 2A by CAMP-Dependent Protein Kinase-Catalyzed Phosphorylation of the 74-KDa B” (Delta) Regulatory Subunit in Vitro and Identification of the Phosphorylation Sites.” *FEBS Letters* 430 (3): 312–16.
- Valdés, Pamela, and Bernard L Schneider. 2016. “Gene Therapy: A Promising Approach for Neuroprotection in Parkinson’s Disease?” *Frontiers in Neuroanatomy* 10 (December): 123. doi:10.3389/fnana.2016.00123.
- Vancraenenbroeck, Renée, Joren De Raeymaecker, Evy Lobbestael, Fangye Gao, Marc De Maeyer, Arnout Voet, Veerle Baekelandt, and Jean-Marc Taymans. 2014. “In Silico, in Vitro and Cellular Analysis with a Kinome-Wide Inhibitor Panel Correlates Cellular LRRK2 Dephosphorylation to Inhibitor Activity on LRRK2.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (June): 51. doi:10.3389/fnmol.2014.00051.
- Verbinnen, Iris, Monica Ferreira, and Mathieu Bollen. 2017. “Biogenesis and Activity Regulation of Protein Phosphatase 1.” *Biochemical Society Transactions* 45 (1): 89–99. doi:10.1042/BST20160154.
- Verstraeten, Aline, Jessie Theuns, and Christine Van Broeckhoven. 2015. “Progress in Unraveling the Genetic Etiology of Parkinson Disease in a Genomic Era.” *Trends in Genetics* 31 (3). Elsevier Ltd: 140–49. doi:10.1016/j.tig.2015.01.004.
- Virshup, David M., and Shirish Shenolikar. 2009. “From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover.” *Molecular Cell* 33 (5). Elsevier Inc.: 537–45. doi:10.1016/j.molcel.2009.02.015.
- Volpicelli-Daley, L. A., H. Abdelmotilib, Z. Liu, L. Stoyka, J. P. L. Daher, A. J. Milnerwood, V. K. Unni, et al. 2016. “G2019S-LRRK2 Expression Augments α -Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons.” *Journal of Neuroscience* 36 (28): 7415–27. doi:10.1523/JNEUROSCI.3642-15.2016.
- Voon, Valerie, Arpan R. Mehta, and Mark Hallett. 2011. “Impulse Control Disorders in Parkinson’s Disease: Recent Advances.” *Current Opinion in Neurology* 24 (4): 324–30. doi:10.1097/WCO.0b013e3283489687.
- Walaas, S I, and Paul Greengard. 1984. “DARPP-32, a Dopamine- and Adenosine 3’:5’-Monophosphate-Regulated Phosphoprotein Enriched in Dopamine-Innervated Brain Regions. I. Regional and Cellular Distribution in the Rat Brain.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 4 (1): 84–98.
- Wallings, Rebecca, Claudia Manzoni, and Rina Bandopadhyay. 2015. “Cellular Processes Associated with LRRK2 Function and Dysfunction.” *The FEBS Journal* 282 (15): 2806–26.

doi:10.1111/febs.13305.

- Wang, Haifeng, Marie La Russa, and Lei S. Qi. 2016. "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond." *Annual Review of Biochemistry* 85 (1): 227–64. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
- Wang, Shijie, Zhiyong Liu, Tao Ye, Omar S. Mabrouk, Tyler Maltbie, Jan Aasly, and Andrew B. West. 2017. "Elevated LRRK2 Autophosphorylation in Brain-Derived and Peripheral Exosomes in LRRK2 Mutation Carriers." *Acta Neuropathologica Communications* 5 (1). *Acta Neuropathologica Communications*: 86. doi:10.1186/s40478-017-0492-y.
- Wang, Xinglong, Michael H. Yan, Hisashi Fujioka, Jun Liu, Amy Wilson-Delfosse, Shu G. Chen, George Perry, Gemma Casadesus, and Xiongwei Zhu. 2012. "LRRK2 Regulates Mitochondrial Dynamics and Function through Direct Interaction with DLP1." *Human Molecular Genetics* 21 (9): 1931–44. doi:10.1093/hmg/ddc003.
- Wang, Zhang, Seda Arat, Michal Magid-Slav, and James R. Brown. 2018. "Meta-Analysis of Human Gene Expression in Response to Mycobacterium Tuberculosis Infection Reveals Potential Therapeutic Targets." *BMC Systems Biology* 12 (1). *BMC Systems Biology*: 3. doi:10.1186/s12918-017-0524-z.
- Webber, Philip J., Archer D. Smith, Saurabh Sen, Matthew B. Renfrow, James A. Mobley, and Andrew B. West. 2011. "Autophosphorylation in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) GTPase Domain Modifies Kinase and GTP-Binding Activities." *Journal of Molecular Biology* 412 (1): 94–110. doi:10.1016/j.jmb.2011.07.033.
- Weintraub, Daniel, Paul J. Moberg, John E. Duda, Ira R. Katz, and Matthew B. Stern. 2004. "Effect of Psychiatric and Other Nonmotor Symptoms on Disability in Parkinson's Disease." *Journal of the American Geriatrics Society* 52 (5): 784–88. doi:10.1111/j.1532-5415.2004.52219.x.
- West, Andrew B., Rita M. Cowell, João P L Daher, Mark S. Moehle, Kelly M. Hinkle, Heather L. Melrose, David G. Standaert, and Laura A. Volpicelli-Daley. 2014. "Differential LRRK2 Expression in the Cortex, Striatum, and Substantia Nigra in Transgenic and Nontransgenic Rodents." *Journal of Comparative Neurology* 522 (11): 2465–80. doi:10.1002/cne.23583.
- West, Andrew B., Darren J. Moore, Catherine Choi, Shaida A. Andrabi, Xiaojie Li, Dustin Dikeman, Saskia Biskup, et al. 2007. "Parkinson's Disease-Associated Mutations in LRRK2 Link Enhanced GTP-Binding and Kinase Activities to Neuronal Toxicity." *Human Molecular Genetics* 16 (2): 223–32. doi:10.1093/hmg/ddl471.
- West, Andrew B. 2017. "Achieving Neuroprotection with LRRK2 Kinase Inhibitors in Parkinson Disease." *Experimental Neurology*, no. May (July). Elsevier: 1–10. doi:10.1016/j.expneurol.2017.07.019.
- West, Andrew B., Darren J Moore, Saskia Biskup, Artem Bugayenko, Wanli W Smith, Christopher a Ross, Valina L Dawson, and Ted M Dawson. 2005. "Parkinson's Disease-Associated Mutations in Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Augment Kinase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16842–47. doi:10.1073/pnas.0507360102.
- Westerlund, M., A. C. Belin, A. Anvret, P. Bickford, L. Olson, and D. Galter. 2008. "Developmental Regulation of Leucine-Rich Repeat Kinase 1 and 2 Expression in the Brain and Other Rodent and Human Organs: Implications for Parkinson's Disease." *Neuroscience*

152 (2): 429–36. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.062.

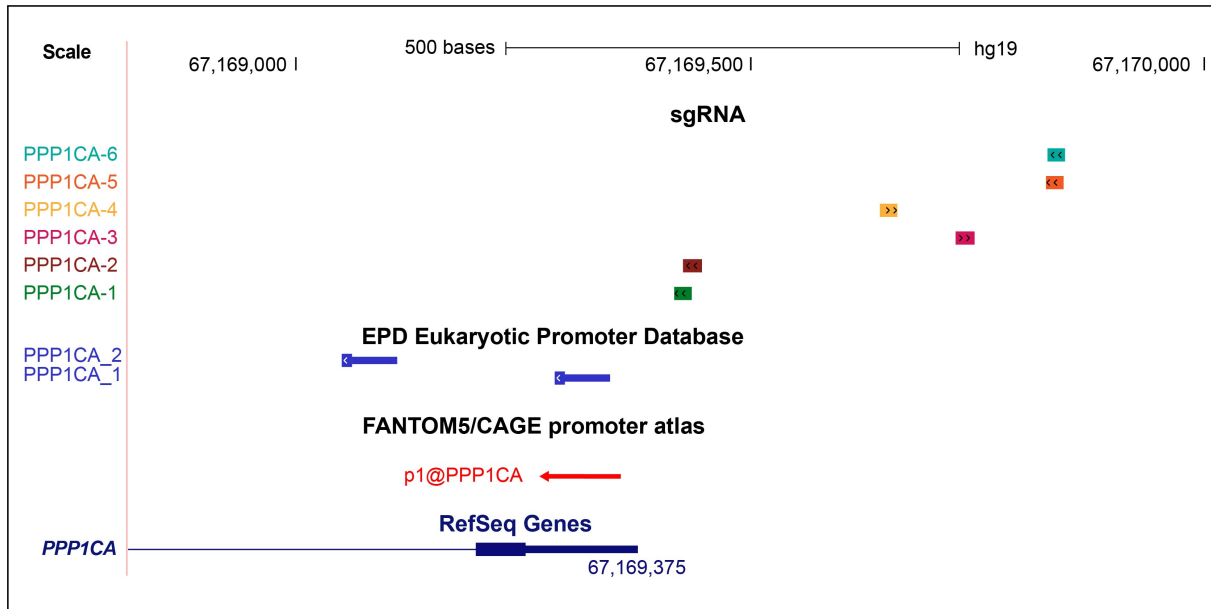
- Wider, Christian, Dennis W. Dickson, and Zbigniew K. Wszolek. 2010. “Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Gene-Associated Disease: Redefining Genotype-Phenotype Correlation.” *Neuro-Degenerative Diseases* 7 (1–3): 175–79. doi:10.1159/000289232.
- Winner, B., H.L. Melrose, C. Zhao, K.M. Hinkle, M. Yue, C. Kent, A.T. Braithwaite, S. Ogholikhan, R. Aigner, and J. Winkler. 2011. “Adult Neurogenesis and Neurite Outgrowth Are Impaired in LRRK2 G2019S Mice.” *Neurobiology of Disease* 41 (3). Elsevier B.V.: 706–16. doi:10.1016/j.nbd.2010.12.008.
- Wu, J., T Tolstykh, J Lee, K Boyd, J B Stock, and J R Broach. 2000. “Carboxyl Methylation of the Phosphoprotein Phosphatase 2A Catalytic Subunit Promotes Its Functional Association with Regulatory Subunits in Vivo.” *The EMBO Journal* 19 (21): 5672–81. doi:10.1093/emboj/19.21.5672.
- Xiao-Jie, Lu, Xue Hui-Ying, Ke Zun-Ping, Chen Jin-Lian, and Ji Li-Juan. 2015. “CRISPR-Cas9: A New and Promising Player in Gene Therapy.” *Journal of Medical Genetics* 52 (5): 289–96. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102968.
- Xiong, Yulan, Candice E. Coombes, Austin Kilaru, Xiaojie Li, Aaron D. Gitler, William J. Bowers, Valina L Dawson, Ted M. Dawson, and Darren J. Moore. 2010. “GTPase Activity Plays a Key Role in the Pathobiology of LRRK2.” *PLoS Genetics* 6 (4): e1000902. doi:10.1371/journal.pgen.1000902.
- Xu, Yanhui, Yu Chen, Ping Zhang, Philip D. Jeffrey, and Yigong Shi. 2008. “Structure of a Protein Phosphatase 2A Holoenzyme: Insights into B55-Mediated Tau Dephosphorylation.” *Molecular Cell* 31 (6): 873–85. doi:10.1016/j.molcel.2008.08.006.
- Xu, Yanhui, Yongna Xing, Yu Chen, Yang Chao, Zheng Lin, Eugene Fan, Jong W Yu, Stefan Strack, Philip D Jeffrey, and Yigong Shi. 2006. “Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme.” *Cell* 127 (6): 1239–51. doi:10.1016/j.cell.2006.11.033.
- Xu, Z, and B R Williams. 2000. “The B56alpha Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A Is a Target for Regulation by Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (14): 5285–99. doi:10.1128/MCB.20.14.5285-5299.2000.
- Yao, Chen, William M. Johnson, Yue Gao, Wen Wang, Jinwei Zhang, Maria Deak, Dario R. Alessi, et al. 2013. “Kinase Inhibitors Arrest Neurodegeneration in Cell and C. Elegans Models of LRRK2 Toxicity.” *Human Molecular Genetics* 22 (2): 328–44. doi:10.1093/hmg/ddt431.
- Yu, Miao, Muhammad Arshad, Wenmin Wang, Dongyu Zhao, Li Xu, and Linkang Zhou. 2018. “LRRK2 Mediated Rab8a Phosphorylation Promotes Lipid Storage.” *Lipids in Health and Disease* 17 (1): 34. doi:10.1186/s12944-018-0684-x.
- Yue, M., K. M. Hinkle, P. Davies, E. Trushina, F. C. Fiesel, T. A. Christenson, A. S. Schroeder, et al. 2015. “Progressive Dopaminergic Alterations and Mitochondrial Abnormalities in LRRK2 G2019S Knock-in Mice.” *Neurobiology of Disease* 78 (June): 172–95. doi:10.1016/j.nbd.2015.02.031.
- Yun, Hye Jin, Hyejung Kim, Inhwa Ga, Hakjin Oh, Dong Hwan Ho, Jiyoung Kim, Hyemyung Seo, Ilhong Son, and Wongi Seol. 2015. “An Early Endosome Regulator, Rab5b, Is an LRRK2 Kinase Substrate.” *Journal of Biochemistry*. doi:10.1093/jb/mvv005.

- Zalatan, Jesse G., Michael E. Lee, Ricardo Almeida, Luke A. Gilbert, Evan H. Whitehead, Marie La Russa, Jordan C. Tsai, et al. 2015. "Engineering Complex Synthetic Transcriptional Programs with CRISPR RNA Scaffolds." *Cell* 160 (1–2). Elsevier Inc.: 339–50. doi:10.1016/j.cell.2014.11.052.
- Zhang, Fu-Ren, Wei Huang, Shu-Min Chen, Liang-Dan Sun, Hong Liu, Yi Li, Yong Cui, et al. 2009. "Genomewide Association Study of Leprosy." *New England Journal of Medicine* 361 (27): 2609–18. doi:10.1056/NEJMoa0903753.
- Zhang, Mengmeng, S. D. Yogesha, Joshua E. Mayfield, Gordon N. Gill, and Yan Zhang. 2013. "Viewing Serine/Threonine Protein Phosphatases through the Eyes of Drug Designers." *FEBS Journal* 280 (19): 4739–60. doi:10.1111/febs.12481.
- Zhang, Qin, Ying Pan, Ruiqing Yan, Benhua Zeng, Haifang Wang, Xinwen Zhang, Wenxia Li, Hong Wei, and Zhihua Liu. 2015. "Commensal Bacteria Direct Selective Cargo Sorting to Promote Symbiosis." *Nature Immunology* 16 (9): 918–26. doi:10.1038/ni.3233.
- Zhao, Jing, Tyler P Molitor, J William Langston, and R Jeremy Nichols. 2015. "LRRK2 Dephosphorylation Increases Its Ubiquitination." *Biochemical Journal* 469 (1): 107–20. doi:10.1042/BJ20141305.
- Zhao, Ye, Shikara Keshiya, Farzaneh Atashrazm, Jianqun Gao, Lars M. Ittner, Dario R. Alessi, Glenda M. Halliday, Yuhong Fu, and Nicolas Dzamko. 2018. "Nigrostriatal Pathology with Reduced Astrocytes in LRRK2 S910/S935 Phosphorylation Deficient Knockin Mice." *Neurobiology of Disease* 120 (August). Elsevier: 76–87. doi:10.1016/j.nbd.2018.09.003.
- Zheng, Yi, Wei Shen, Jian Zhang, Bo Yang, Yao-Nan Liu, Huihui Qi, Xia Yu, et al. 2018. "CRISPR Interference-Based Specific and Efficient Gene Inactivation in the Brain." *Nature Neuroscience* 21 (3). Springer US: 447–54. doi:10.1038/s41593-018-0077-5.
- Zhou, Hongxia, Cao Huang, Jianbin Tong, Weimin C. Hong, Yong-Jian Liu, and Xu-Gang Xia. 2011. "Temporal Expression of Mutant LRRK2 in Adult Rats Impairs Dopamine Reuptake." *International Journal of Biological Sciences* 7 (6): 753–61. doi:10.7150/ijbs.7.753.
- Zhou, Jin, Huong T. Pham, Ralf Ruediger, and Gernot Walter. 2003. "Characterization of the Aalpha and Abeta Subunit Isoforms of Protein Phosphatase 2A: Differences in Expression, Subunit Interaction, and Evolution." *The Biochemical Journal* 369 (Pt 2): 387–98. doi:10.1042/BJ20021244.
- Zimprich, Alexander, Saskia Biskup, Petra Leitner, Peter Lichtner, Matthew Farrer, Sarah Lincoln, Jennifer Kachergus, et al. 2004. "Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology." *Neuron* 44 (4): 601–7. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.005.
- Zolnierowicz, Stanislaw. 2000. "Type 2A Protein Phosphatase, the Complex Regulator of Numerous Signaling Pathways." *Biochemical Pharmacology* 60 (8): 1225–35. doi:10.1016/S0006-2952(00)00424-X.

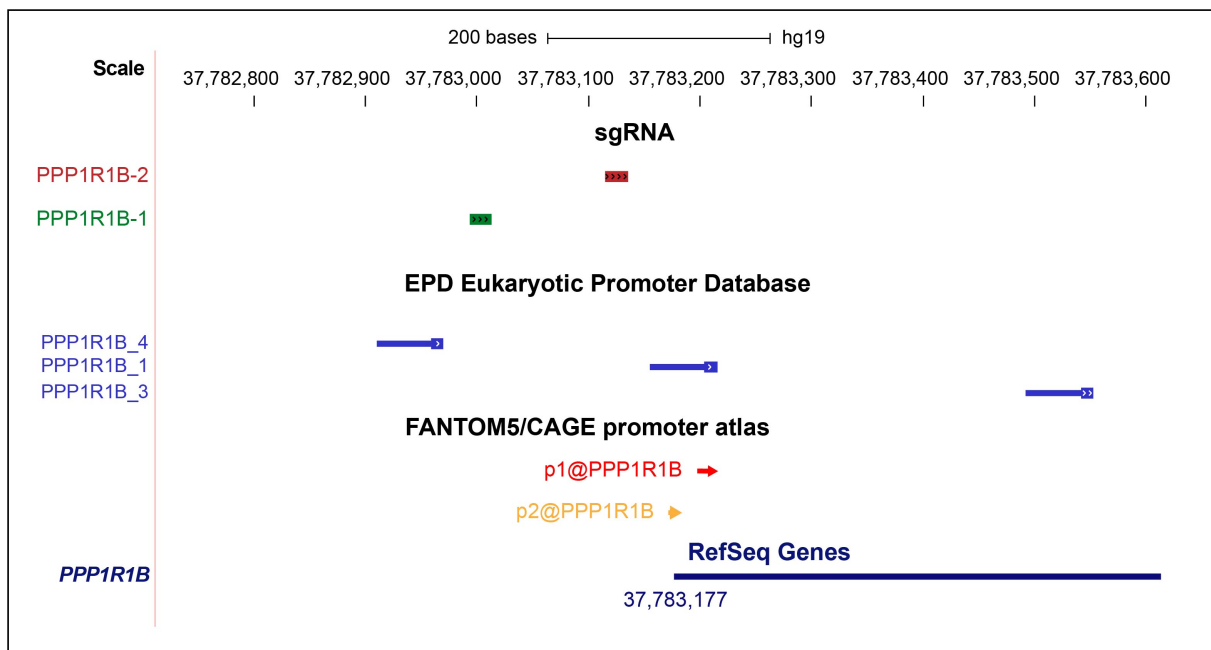
Annexes

Annexe 1 : Position des sgARN par rapport aux promoteurs

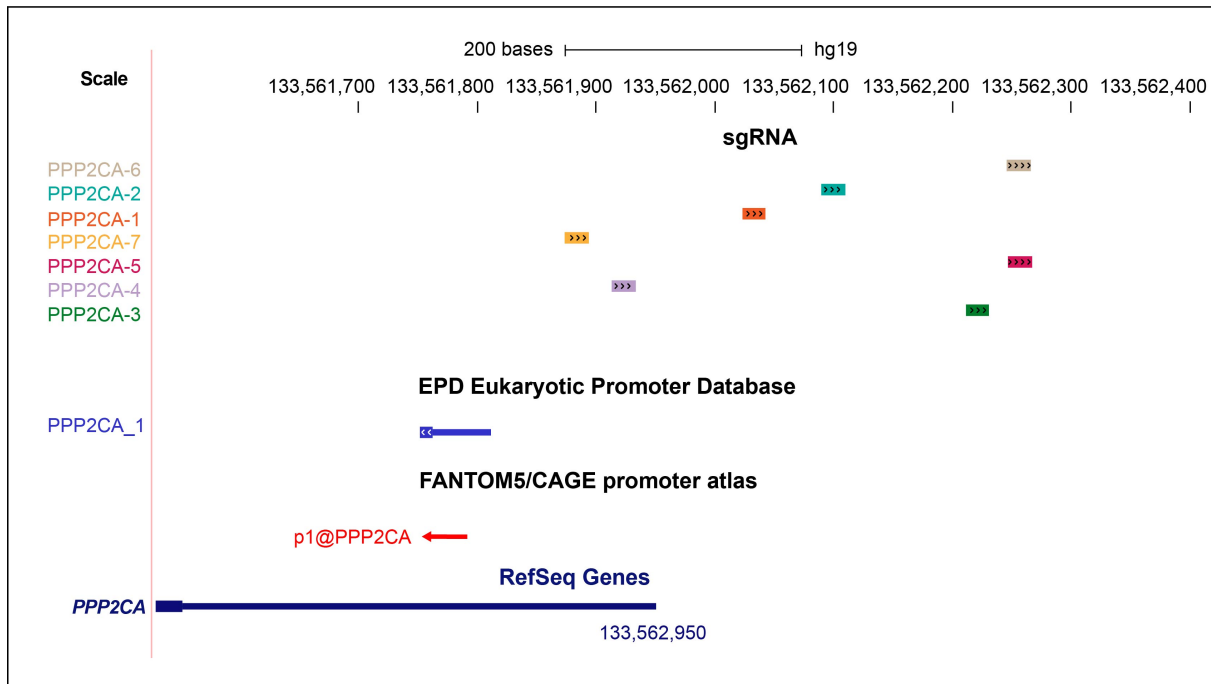
Position des sgARN ciblant PPP1CA :



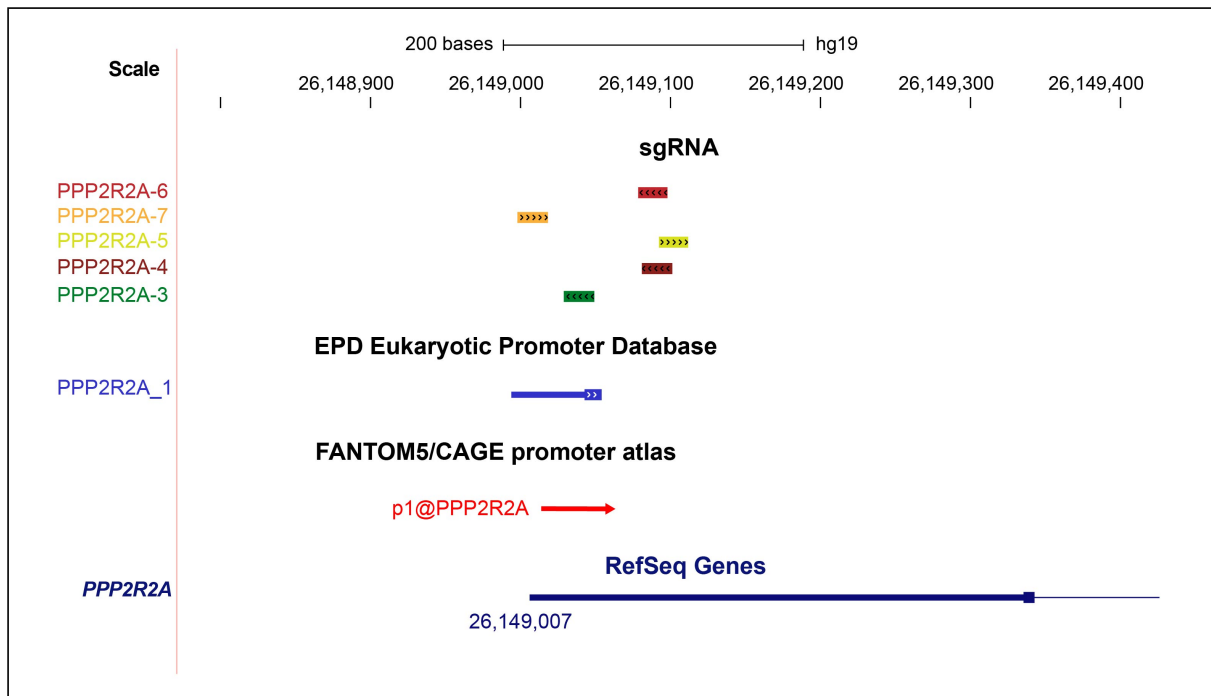
Position des sgARN ciblant PPP1R1B :



Position des sgARN ciblant PPP2CA :



Position des sgARN ciblant PPP2R2A :



Annexe 2 : Etude pilote sur l'investigation du niveau d'expression des phosphatases dans des cellules provenant de patients parkinsoniens

La notion de biomarqueur est un indicateur essentiel dans le domaine médical. Or pour la MP, la découverte de biomarqueurs est devenue cruciale comme outil pour diagnostiquer la maladie plus rapidement et à un stade précoce. Le biomarqueur est aussi un outil qui peut servir d'indicateur de l'efficacité des traitements.

Par le lien de notre équipe avec le service de Neurologie du CHU de Lille, nous disposons d'échantillons biologiques tels que du sang ou des échantillons de liquide céphalorachidien (ou même des fibroblastes) provenant de patients parkinsoniens (génétiques et sporadiques) et de sujets témoins.

Les lymphoblastoïdes sont des lymphocytes du sang périphérique qui ont été immortalisés par l'Epstein-Barr Virus (EBV). Ils ont un intérêt scientifique important car ils sont issus directement des patients. Il est alors possible de travailler sur du matériel biologique relevant, pour les études de différentes maladies (pas seulement la MP). Nous avons donc mesuré les niveaux d'expression des phosphatases PPP1CA, PPP2CA et PPP2R2A dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes issues de patients sporadiques (n=5, âge moyen de 58,40±6,43 ans), de patients porteurs de la mutation LRRK2 G2019S (n=6, âge moyen de 60,00±9,74 ans) et de sujets témoins appariés (n=7, âge moyen de 58,29±10,81 ans) (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Données démographiques et cliniques de sujets sains, de patients sporadiques et de patients porteurs de la mutation LRRK2 G2019S analysés dans la Figure 48.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	TEM	SPO	SPO	SPO	SPO	SPO	G20	G20	G20	G20	G20	G20
Sexe	M	M	M	F	F	F	F	M	M	M	F	F	M	M	F	F	F	F
Age	42	50	57	55	62	68	74	51	62	65	52	62	50	53	54	60	68	75
AAO	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38	59	62	47	59	43	34	45	59	61	70

Abréviations : TEM, sujets témoins ; SPO, patients parkinsoniens sporadiques ; G20, patients parkinsoniens porteur de la mutation LRRK2 G2019S ; AAO, date début de la maladie ; N/A, non applicable.

Dans les lysats de cellules lymphoblastoïdes provenant de ces sujets, nous avons mesuré différents paramètres tels que la phosphorylation de LRRK2 en S935 chez les trois groupes. Pour chacun des

trois groupes, les niveaux d'expression des sous-unités PPP1CA, PPP2CA et PPP2RR2A ont été mesurés par WB (**Figure 48**).

La question posée dans cette expérimentation est : Est-ce que la mesure de la phosphorylation est corrélée avec la mesure des niveaux d'expression des phosphatases testées ?

Comme on peut l'observer sur la **Figure 48A et B** ci-dessous, la phosphorylation en pS935 est diminuée chez les patients sporadiques par rapport au groupe Témoin ($p=0.17$), cette diminution est significativement différente comparée au groupe G2019S ($p<0.05$).

De manière intéressante, chez le groupe sporadique, où la diminution en pS935 est observée, une augmentation significative du niveau d'expression de la sous-unité catalytique PPP2CA est retrouvée par rapport au groupe témoin (**Figure 48D**). Le niveau de la sous-unité régulatrice PPP2R2A est retrouvé inchangé chez les patients sporadiques alors qu'il est augmenté chez le groupe G2019S par comparaison au groupe témoin ($p<0.05$) (**Figure 48E**). Au contraire de la sous-unité PPP1CA où aucun changement n'est observé entre les trois groupes (**Figure 48F**).

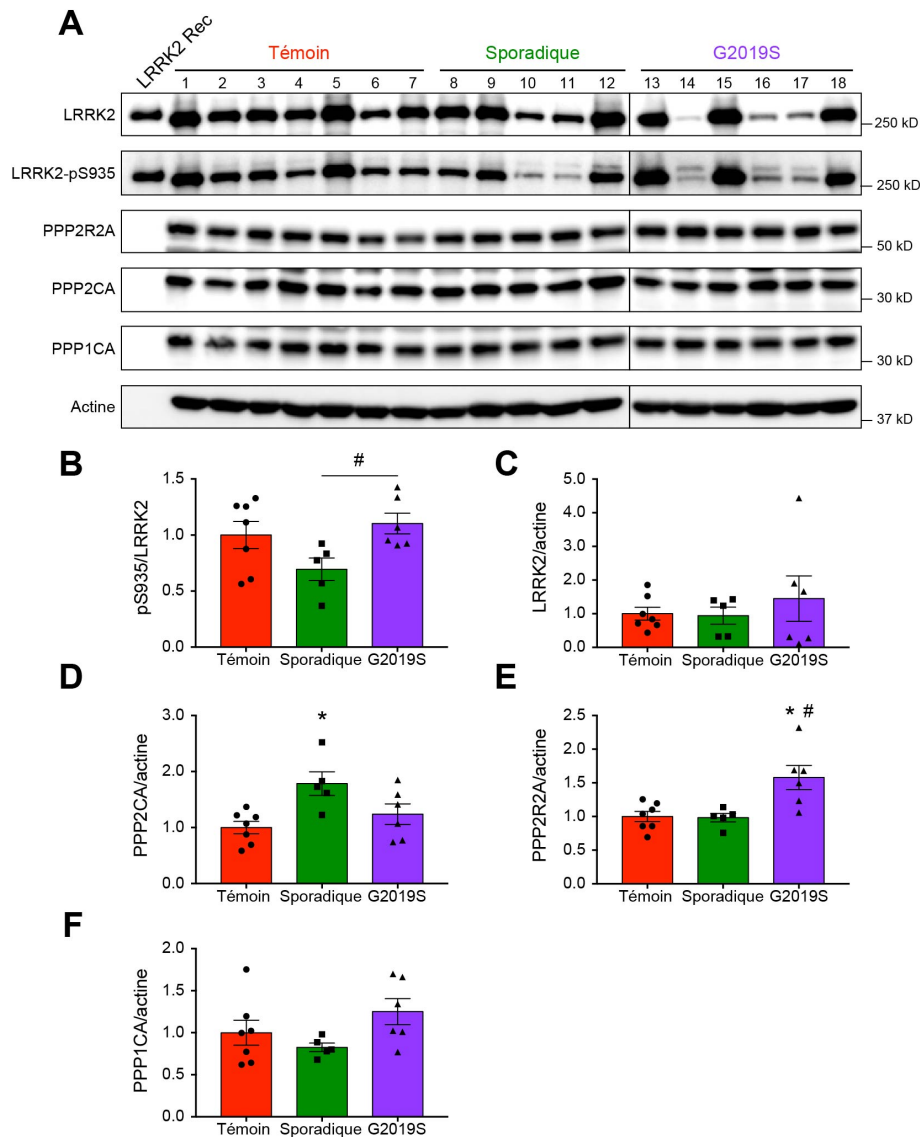


Figure 48 : Expression de la protéine LRRK2 et des sous-unités PPP2CA, PPP2R2A et PPP1CA dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes immortalisées par EBV issues de patients sporadiques, G2019S et de sujets témoins.

Des cellules lymphocytaires du sang périphérique ont été isolées chez 7 sujets témoins, 5 patients avec MP sporadiques et 6 patients porteurs de la mutation G2019S. Des lysats de protéines ont été collectés et analysés pour la protéine LRRK2, LRRK2 phosphorylée en sérine 935, les protéines PPP2CA, PPP2R2A et PPP1CA (A). Les quantifications du rapport de LRRK2 phosphorylée sur la sérine 935 à LRRK2 totale ont été déterminées (B) ainsi que l'expression des protéines totales pour LRRK2 (C), PPP2CA (D), PPP2RA (E) et PPP1CA (F). Tous les immunoblots ont été normalisés avec la bactine. Les résultats sont représentés en moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ comparaison entre Groupe Sporadique ou G2019S et Groupe Témoin ; # $p < 0.05$ comparaison entre Groupe Sporadique et Groupe G2019S. Les différences entre les valeurs moyennes des groupes ont été déterminées par une analyse Kruskal-Wallis suivie d'un test post-hoc de Dunn.

Annexe 3 : Article en soumission

Protein phosphatase 2A holoenzymes regulate leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylation and accumulation

Marc F. Bolliger^{1,§}, Matthieu Drouyer^{2,3,§}, Evy Lobbestael^{4,§}, Chris Van den Haute⁴, Marco Emanuele^{2,3}, Réginald Lefebvre^{2,3}, William Sibrán^{2,3}, Tina De Wit⁴, Nicolas Dzakmo^{5,6}, Glenda M. Halliday^{5,6}, Shigeo Murayama⁷, Alain Martoriat⁸, Katia Cailliau⁸, Jean-François Bodart⁸, Marie-Christine Chartier-Harlin^{2,3,*}, Veerle Baekelandt^{4,*}, R. Jeremy Nichols^{1,9,*}, Jean-Marc Taymans^{2,3,4,*}

¹Parkinson's Institute and Clinical Center, Sunnyvale, CA 94085, USA

²Université de Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S1172, JPArc, Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, 59000 Lille, France

³Inserm, UMR-S 1172, Team "Early stages of Parkinson's disease", 59000 Lille, France

⁴KU Leuven, Laboratory for Neurobiology and Gene Therapy, Department of Neurosciences, 3000 Leuven, Belgium

⁵Central Clinical School, University of Sydney, Camperdown, NSW, 2050

⁶School of Medical Sciences, University of NSW, Kensington, NSW, 2033

⁷Department of Neuropathology, Brain Bank for Aging Research, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan, 173-0015

⁸Team "Signal Division Regulation", CNRS UMR 8576, University of Lille, 59650 Villeneuve-d'Ascq, France

⁹Department of Pathology, Stanford University, Palo Alto, CA 94305

§equal contributors

*shared senior authorship

Please send correspondence to Jean-Marc Taymans (jean-marc.taymans@inserm.fr),

Jeremy Nichols (rjnichols@stanford.edu), Veerle Baekelandt

(veerle.baekelandt@kuleuven.be) and Marie-Christine Chartier-Harlin (marie-

christine.chartier-harlin@inserm.fr).

LRRK2 is a highly phosphorylated multidomain protein and mutations in the gene encoding LRRK2 are a major genetic determinant of Parkinson's disease (PD). Dephosphorylation at LRRK2's S910/S935/S955/S973 phosphosite cluster is observed in several conditions including in sporadic PD brain, in several disease mutant forms of

LRRK2 and after pharmacological LRRK2 kinase inhibition. However, the mechanism of LRRK2 dephosphorylation is poorly understood. Therefore, we performed a phosphatome-wide reverse genetics screen, revealing LRRK2 phosphorylation regulators linked to the PP1 and PP2A holoenzyme complexes as well as CDC25 phosphatases. Testing in mammalian cells, *Xenopus* oocytes and *in vitro*, including confirmation on endogenously expressed proteins using CRISPR/dCas9 singled out the PP2A holoenzyme PPP2CA:PPP2R2 as a powerful phosphoregulator of pS935-LRRK2. Furthermore, we demonstrated that this specific PP2A holoenzyme triggers LRRK2 ubiquitination, suggesting its involvement in LRRK2 clearance. The identification of the PPP2CA:PPP2R2 complex regulating LRRK2 S910/S935/S955/S973 phosphorylation paves the way for studies refining PD therapeutic strategies that impact LRRK2 phosphorylation.

Significance

LRRK2 is a multiphosphorylated protein implicated in Parkinson disease. Dephosphorylation of LRRK2 at specific sites is associated with PD, however a systematic search for LRRK2 phosphatases has yet to be reported. Here, we present the first unbiased search for LRRK2 phosphatases, using a reverse genetics screen, identifying a LRRK2 phosphorylation complex composed of PP2A catalytic and regulatory subunits that act together as a holoenzyme to regulate LRRK2 phosphorylation. In addition, we have found that this PP2A holoenzyme regulates not only LRRK2 phosphorylation but also LRRK2 expression levels, suggesting a phosphatase mediated regulation of LRRK2 clearance. These data provide key mechanistic insight into the regulation of LRRK2 phosphorylation and accumulation that are key features of LRRK2 disease and LRRK2 therapeutic targeting.

Mutations in the *leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* gene are one of the most prevalent causes of monogenic PD (1) with several mutant forms of LRRK2 segregating with disease, including N1437H, R1441C/G/H, Y1699C, G2019S and I2020T (2). LRRK2 mutations are also present in apparently sporadic cases of PD, with prevalence of 2% to up to 40% in certain population groups. In addition, LRRK2 was genetically associated to PD in several independent genome-wide association studies (GWAS) (3–5). Moreover, PD patients carrying the LRRK2 mutations, such as the G2019S mutation in the LRRK2 kinase domain, show a clinical and neuropathological profile that is very similar to sporadic PD (6, 7), indicating that LRRK2 contributes to a PD disease pathway common to both familial and sporadic PD. Finally, LRRK2 kinase activity is shown to be activated in both familial and sporadic PD (8, 9) making LRRK2 a priority therapeutic target for novel disease-modifying therapies for PD.

LRRK2 is a complex protein of 2527 amino acids containing several predicted functional domains consisting of a ROC-type GTPase domain as well as a serine/threonine protein kinase domain (10). LRRK2 is highly phosphorylated with two notable classes of phosphorylation sites, one of autophosphorylation sites clustering in or near LRRK2's Ras-GTPase-like domain (termed ROC) and another of heterologous phosphorylation sites in the N-terminal ANK-LRR interdomain region (11). Evidence of a physiological role for LRRK2 phosphorylation has accumulated in recent years for those phosphosites of the N-terminal region, a.o. at positions S910, S935, S955 and S973. Phosphorylation levels at these sites are reduced for several pathogenic mutants such as N1437H, R1441C/G, Y1699C and I2020T compared to wild type LRRK2 when

expressed in cell culture or animal models (2, 12–14). Also, all of these sites are rapidly dephosphorylated upon LRRK2 inhibitor treatment, considered as a potential therapeutic approach.

Interestingly dephosphorylation of the phosphosites of the LRRK2 N-terminal region in the presence of LRRK2 PD mutations or inhibition of LRRK2 led to similar cellular LRRK2 phenotypes such as its accumulation in cytoplasmic inclusions and filamentous skein-like structures, loss of 14-3-3 binding and increased binding of PP1 in cell (and animal) models (2, 13, 15). In addition, phosphorylation at these sites is reduced in PD brains (16), suggesting that LRRK2 dephosphorylation is linked to PD pathogenesis. Furthermore, phosphoregulation of these sites indirectly regulates LRRK2 substrate phosphorylation (17, 18), and therefore the kinases and phosphatases that modify LRRK2 are prime targets for elucidation.

To date, several studies have reported kinases phosphorylating LRRK2 including casein kinase 1 α , cAMP-dependent protein kinase, or I κ B kinases (15, 19–21), while the involvement of protein phosphatases in the regulation of LRRK2 phosphorylation and function has not been extensively explored. Our previous study revealed that the protein phosphatase 1 (PP1) catalytic subunit PPP1CA can regulate S935-LRRK2 phosphorylation levels (13), although, precise regulatory subunits are not yet known. Indeed, PP1, like PP2A, functions solely as a multimeric enzyme (a.k.a. holoenzyme) consisting of a catalytic and a regulatory subunit, and does not function as free monomers in eukaryotic cells (22). Besides the regulation of LRRK2 by PP1, other phosphatases have been reported in relation to LRRK2 as interactors (23, 24) or genes whose expression is regulated by LRRK2 (25). However, the effects of these phosphatases on LRRK2 phosphorylation are still unknown. Note that PP1 and PP2A refers to proteins that constitute heterodimeric or heterotrimeric holoenzyme complexes, respectively, formed by the association of catalytic with regulatory subunits as well as a scaffolding subunit for PP2A, while individual catalytic or regulatory subunits are denoted by their HUGO gene nomenclature.

Therefore, in order to identify additional LRRK2 phosphorylation regulators, we performed a phosphatome-wide reverse genetics screen. The reverse genetics approach has previously successfully been employed to identify the components of phosphatase holoenzymes (26). Here the findings from our primary screen were confirmed in secondary screens and extensively characterized by using a combination of different models and techniques. Our results both confirmed a role for PP1 and revealed a role for a specific PP2A holoenzyme, denoted PPP2CA:PPPR2RA/B/C/D, in LRRK2 phosphoregulation.

Results

Phosphatome-wide reverse genetics screen for regulators of Ser935-LRRK2 phosphorylation. In order to identify phosphatases involved in the dephosphorylation of

the LRRK2 phosphosites clustered in the interdomain region between the ankyrin repeat (ANK) domain and leucine-rich repeat (LRR) domain (S910/S935/S955/S973; Fig. 1 A), we performed a phosphatome-wide RNAi screen using siRNAs directed against 298 phosphatases and phosphatase regulatory proteins in LRRK2 expressing U2OS cells (Fig. 1 B). As readout, we chose a previously developed high throughput method using time-resolved FRET that detects pS935-LRRK2 levels in cellular lysates (27). Assay performance was confirmed on each plate using multiple controls, including reduced pS935-LRRK2 following pharmacological LRRK2 kinase inhibition as well as following siRNA knockdown of LRRK2. In addition, we observed no significant difference in pS935-LRRK2 levels between untransfected cells and cells transfected with a non-targeting negative control siRNA.

A graphic overview of the effects of siRNA mediated knockdown of individual phosphatases on pS935-LRRK2 is given (Fig. 1 C). Values of pS935-LRRK2 levels averaged over the three siRNAs tested per phosphatase/phosphatase regulator are ranked from lowest to highest and range from -55% to +55% relative to the no knockdown control. At a macro level, it is apparent that the majority of the siRNAs lead to an increase in LRRK2 phosphorylation levels. From the 298 different phosphatases and phosphatase regulators tested in this primary screen (Fig. 1 C and *Datasets*), we selected 39 candidate phosphatases/phosphatase regulators for confirmation in a secondary screening (*SI Appendix, Table S1*). This selection was based firstly on the amplitude of the change in LRRK2 pS935 phosphorylation effected by the phosphatases/phosphatase regulator knockdown. The most important changes were categorized under PP1-related, PP2A-related, tyrosine phosphatases, as well as dual specificity and other phosphatases. As observed in *SI Appendix, Table S1*, some additional phosphatases were included for further testing based on their close homology to positive hits. For instance, PPP1CA and PPP1CC were included in the list despite a modest effect of the knockdown because of their close homology with PPP1CB, one of the top hits.

Secondary screen via phosphatase subunit knockdown. For each of the 39 selected hits, two knockdown constructs per hit were cloned in LV transfer plasmids encoding a miRNA embedded short hairpin sequence directed against the different phosphatase hits (pLV_miR (28), see *SI Appendix, Table S2*). LVs for phosphatase/phosphatase regulator knockdown were used to transduce LRRK2 expressing cells both in the presence and the absence of the compound LRRK2-IN1. Although the S935 site and other sites in this phosphosite cluster were demonstrated to be heterologous phosphorylation sites (21, 29), rapid dephosphorylation of these sites can be induced in particular by LRRK2-IN1(30) and in general by most inhibitors of LRRK2 kinase activity (14, 31). As we have shown previously that LRRK2-IN1 mediated S935-LRRK2 dephosphorylation is dependent on phosphatases (13), we here combined phosphatase knockdown with LRRK2 inhibitor treatment in order to test candidate LRRK2 phosphatases in dephosphorylation conditions (Fig. 1 D and F and *SI Appendix, Table S1*). The secondary knockdown screen revealed

an overall trend to increases in LRRK2 phosphorylation and knockdown hits mostly related to PP2A were confirmed to modulate LRRK2 phosphorylation under these test conditions.

Secondary screen via overexpression of catalytic and regulatory phosphatase subunits. Prior to selecting hits for in-depth characterization, we decided to also test the effects of phosphatase overexpression on LRRK2 S935 phosphorylation, for the PP1-, PP2A- and CDC-related hits. We tested the activity of reconstituted complexes on LRRK2 in cells, using co-expression (Fig. 2). Of the seven putative PP1 regulatory subunits that scored highly in our screens as potential LRRK2 regulators, we found that the PPP1CA:PPP1R3F complex reproducibly induced LRRK2 dephosphorylation across multiple sites of the S935 cluster (Fig. 2 A). We next tested co-expression of catalytic PP2A subunits along with the various regulatory subunits, with the scaffolding subunit being constant at endogenous levels. For the eight different regulatory subunits tested, we found that PPP2R2A/B/C/D and to a lesser extent PPP2R3C induced reductions in LRRK2 phosphorylation (Fig. 2 B). We also found that expression of CDC25A/B/C all induced LRRK2 dephosphorylation (Fig. 2 C), with CDC25C showing the greatest effect.

Subcellular co-localization analysis of LRRK2 and phosphatase subunits via fluorescence microscopy and videomicroscopy. Based on the results of the primary screen and secondary screens, we decided to further characterize the PP1, PP2A and CDC related hits (*SI Appendix, Table S1*).

One way of further confirming candidate LRRK2 phosphatases is to examine their overlap with LRRK2 in subcellular localization. LRRK2 is diffusely located in the cytoplasm under basal conditions. However, after the induction of LRRK2 dephosphorylation by kinase inhibition or in the presence of some LRRK2 clinical mutants, LRRK2 will relocate to discrete filamentous accumulations or punctae. Therefore, we proceeded to test subcellular co-localization of LRRK2 and phosphatases under basal conditions and in conditions of kinase inhibitor induced dephosphorylation. We assessed whether the colocalization between candidate LRRK2 phosphatases and LRRK2 is modulated in conditions of LRRK2 dephosphorylation in HEK-293T cells co-transfected with FLAG-phosphatases (17 different candidate phosphatases, *SI Appendix, Table S1*) and GFP-LRRK2 and treated one hour with LRRK2 inhibitor HG-10-102-01 (32) or DMSO.

As previously described (14, 30, 33), GFP-tagged wild-type LRRK2 protein was found in a purely cytosolic localization in the majority of cells (Fig. 3 A). Under basal condition, PP1 isoforms colocalized with LRRK2 in the cytoplasm except for PPP1CC, PPP1R3B, PPP1R3F, PPP1R16B and PPP1R8 (Fig. 3 A and *SI Appendix, Fig. S1*). Most of the PP2A isoforms were primary localized in the nucleus (Fig. 3 A and *SI Appendix, Fig. S2*). We observed an increased colocalization for LRRK2 with PPP1CC, PPP1R1B and PPP1R3B after one hour treatment with HG-10-102-01 compound (Fig. 3 A and B). Interestingly, we observed a significant enhancement of the colocalization between LRRK2 and PPP2CA, PPP2CB, PPP2R2A and PPP2R3C in the cytoplasm of the cells after inhibitor treatment (Fig. 3 A and B). We also performed live cell imaging to test PP1

and PP2A recruitment to LRRK2 in conditions of dephosphorylation with the PF-06447475 LRRK2 kinase inhibitor (34) (Fig. 3 C and D and *SI Appendix*, Fig. S3). In cells co-transfected with mCherry-tagged catalytic subunits and GFP-tagged LRRK2, colocalization of PPP1CA and PPP1CB with LRRK2 was enhanced rapidly after inhibitor addition (Fig. 3 C and D and *SI Appendix*, Fig. S3 A). We also observed an enhanced colocalization between LRRK2 and PPP2CA (Fig. 3 C and D) and PPP2CB (*SI Appendix*, Fig. S3 C) within minutes after application of LRRK2 kinase inhibitor, consistent with the observation in the immunocytochemistry experiment (Fig. 3 B).

Analysis of interaction between LRRK2 and phosphatases via proximity ligation assay (PLA). In our initial study, we found that dephosphorylation of LRRK2 was accompanied by a dynamic recruitment of PP1 to the LRRK2 complex (13). Therefore, besides changes in subcellular localization we wanted to know which candidate phosphatases physically interact with LRRK2 in the cell. We used *in situ* detection of LRRK2-phosphatase holoenzymes by PLA on cells co-expressing FLAG-tagged phosphatases and GFP-LRRK2 and quantified the number of individual ligation amplification signals per cell (Fig. 3 E and F and *SI Appendix*, Fig. S4). We observed a significant increase of PLA signals after treatment with the LRRK2 dephosphorylation inducers HG-10-102-01 or MLI-2 for PPP1CA, PPP2CA and the two regulatory subunits of PP2A (PPP2R2A and PPP2R2B), but not for PPP2CB (Fig. 3 E and F and *SI Appendix*, Fig. S4 A and C). Control amplifications with GFP-LRRK2 alone yielded no PLA signals (*SI Appendix*, Fig. S4 B).

In vitro dephosphorylation of LRRK2 by PP2A. An important step in validating candidate LRRK2 phosphatases is to assess the capacity of these to directly dephosphorylate LRRK2 *in vitro*. We have previously shown that PPP1CA efficiently dephosphorylates LRRK2 *in vitro* (13). PP2A holoenzymes were prepared by isolating regulatory subunits with immunoaffinity chromatography, and co-purifying endogenous scaffolding and catalytic subunits (*SI Appendix*, Fig. S5). Full-length recombinant wild type LRRK2 and the G2019S, R1441C and D1994A mutants were dephosphorylated by the PPP2CA/B:PPP2R1A/B:PPP2R2D holoenzyme complex (Fig. 4 A). This dephosphorylation was blocked by the PP2A inhibitor okadaic acid (Fig. 4 B). These experiments confirmed that LRRK2 ANK-LRR interdomain phosphosites are direct substrates for PP2A. Recombinant CDC25 did not induce LRRK2 dephosphorylation *in vitro* (Fig. 4 C), despite being implicated in LRRK2 dephosphorylation in HEK-293 cells (Fig. 2 C) indicating an indirect effect on LRRK2 dephosphorylation.

Assessment of LRRK2 phosphorylation in phosphatase-injected *Xenopus laevis* oocytes. As further validation by *in vitro* experiments, we tested reconstituted PP2A holoenzymes in *Xenopus* oocytes that allows testing of recombinant proteins in a cellular environment following direct microinjection (Fig. 4 D), thereby circumventing the issue of the large time difference between the phosphorylation changes of LRRK2 occurring in

short time frames (<1 hour) and the longer times needed to achieve overexpression or knockdown of phosphatases via plasmid or LV constructs (Fig. 4 *E* and *F*). When we injected PP2A subunits, we found that the catalytic subunit PPP2CA alone did not significantly dephosphorylate LRRK2 compared to the control. Interestingly, when the PP2A holoenzyme was completed with PPP2R2A or PPP2R2B regulatory subunits, we observed a significant and rapid dephosphorylation of LRRK2 compared to both the group injected with PPP2CA alone and the buffer control group (Fig. 4 *F*).

Validation of LRRK2 phosphatase holoenzymes by modulation of phosphatase subunit expression. To further investigate whether specific PP2A holoenzymes regulate LRRK2 phosphorylation, we generated SH-SY5Y cells with stable overexpression of LRRK2 and stable combined knock down of the catalytic PPP2CA subunit and regulatory PPP2R2A/B/C subunits. Treatment for 24 hours with LRRK2 kinase inhibitor PF-06447475 revealed that reduced levels of PP2CA and PPP2R2A/B/C can prevent LRRK2 dephosphorylation at S935 (Fig. 5 *B*), which was not the case at 2 hours treatment (Fig. 5 *A*).

Given the inhibitor-induced LRRK2 protein destabilization (Fig. 5 *B* and reference (35)), we set out to examine the effect of PPP2CA knock down on LRRK2 protein levels. Although reduced levels of the catalytic subunit PPP2CA alone did not affect inhibitor-induced LRRK2 protein destabilization 48h after treatment, it resulted in a significant increase in LRRK2 protein levels in basal conditions (Fig. 5 *C*).

LRRK2 is ubiquitinated in the presence of PP2A. We previously published that LRRK2 kinase inhibitor treatment induces dephosphorylation and ubiquitination of the protein (36). As we also observed an effect of PP2A knockdown on LRRK2 protein levels (Fig. 5 *C*) we wondered if the dephosphorylation observed in HEK-293 cells by reconstituted phosphatase holoenzymes (Fig. 2 *B*) could induce LRRK2 ubiquitination. In cells expressing these effective PP2A holoenzymes (containing the regulatory subunits PPP2R2A/B/C/D), ubiquitination of LRRK2 was increased, while in cells expressing other PP2A holoenzyme combinations ubiquitination levels of LRRK2 were not significantly altered (Fig. 5 *D*).

Modulation of endogenous phosphatases affects endogenous LRRK2 phosphorylation. In order to study the effects of depletion and overexpression of PP1 and PP2A catalytic and regulatory subunits we opted for a genetic manipulation method, i.e. clustered interspaced short palindromic repeats (CRISPR) technology which can be used to direct transcriptional repressors or activators to specific genes for depletion or overexpression of the endogenous protein (37) in order to identify those that affect LRRK2 phosphorylation. We developed several CRISPR constructs that were validated

for activation and repression of the selected target phosphatases subunit listed in [SI Appendix, Table S4](#).

We analyzed phosphorylation levels in SH-SY5Y cells stably expressing dCas9-VP64 or dCas9-KRAB (CRISPRa and CRISPRi, respectively). Modulation of endogenous expression of PPP1CA led to no change in LRRK2 phosphorylation nor in total LRRK2 levels ([SI Appendix, Fig. S6](#)). This may be explained by incomplete change of expression or the involvement of other unknown factors. When endogenous expression of PPP1R1B (38), the regulatory inhibitor of PPP1CA, was increased, we observed an increase in LRRK2 phosphorylation ([SI Appendix, Fig. S6 B](#)). Conversely, knockdown of PPP1R1B by CRISPRi did not alter LRRK2 phosphorylation.

Interestingly, PPP2CA endogenous overexpression leads to no change in LRRK2 phosphorylation nor in total LRRK2 levels ([SI Appendix, Fig. S6 C](#)), while either PPP2R2A CRISPRa or CRISPRi induce an increase of LRRK2 phosphorylation ([SI Appendix, Fig. S6 C and D](#)). Taken together, these results suggest that phosphatase regulatory subunits play key roles in LRRK2 phosphoregulation.

Expression levels of PP2A subunits in PD brains. In order to investigate clinical correlates for LRRK2 phosphatases, we verified whether their expression was altered in the brains of PD patients. Brain samples from a prior collaboration between the PICC and Dr. Dzamko/Dr. Halliday at the University of Sydney (Australia) (16) were tested for changes in expression levels of PP2A subunits ([SI Appendix, Fig. S7](#)). These experiments revealed that the levels of PP2A regulatory ([SI Appendix, Fig. S7 A](#)) and catalytic ([SI Appendix, Fig. S7 B](#)) subunits were unchanged in three brain areas of PD patients compared to healthy controls (occipital cortex, frontal cortex, amygdala), with only the regulatory subunits showing a slight decrease in the substantia nigra. This is in agreement with an immunohistochemical study reporting no changes in PPP2CA/B and PPP2R2A/B/C/D levels in both cortical and substantia nigral samples of PD patients (39).

Discussion

The phosphorylation state of LRRK2 at the ANK-LRR interdomain region containing the S910/S935/S955/S973 phosphorylation sites plays a central role in the normal function of LRRK2, governing LRRK2's subcellular localization. Furthermore, LRRK2 is dephosphorylated in PD patient brains (16) as are LRRK2 disease mutants expressed in mammalian cells and animal models (2, 12, 13, 15), implicating LRRK2 dephosphorylation in the development of PD. In addition, LRRK2 kinase inhibition, a proposed PD therapeutic strategy, induces LRRK2 dephosphorylation. By consequence, identifying the phosphatases involved in LRRK2 dephosphorylation is important in understanding LRRK2 function in health and disease. Crucially, several phosphatases function as complexes called holoenzymes composed of a catalytic subunit and one or more additional subunits filling a regulatory or scaffolding role thus providing substrate specificity to the otherwise promiscuous catalytic subunit. In these cases, the identification of the LRRK2 phosphatase involves confirming the activity of a multiprotein complex. Here we present evidence showing that the phosphatase holoenzyme PPP2CA:PPP2R2 is a direct upstream regulator of LRRK2 phosphorylation at the ANK-LRR interdomain region.

Several pieces of evidence support the identification of PPP2CA:PPP2R2 as a LRRK2 phosphatase holoenzyme: (1) an unbiased siRNA primary screen; (2) a secondary shRNA(28) and overexpression screen of 39 candidate phosphatases selected from the primary screen; (3) the recruitment of candidate phosphatases to the LRRK2 compartment in cells under dephosphorylation conditions; (4) reconstitution of the effects *in vitro* and in micro-injected oocytes with purified proteins; (5) the lack of inhibitor-induced LRRK2 dephosphorylation in conditions of combined knock down; (6) confirmation of the dephosphorylation dependent effect of LRRK2 ubiquitination via PPP2CA:PPP2R2; (7) confirmation of the effect of endogenous PPP2R2A on endogenous LRRK2 phosphorylation via expression modulation with CRISPR/dCas9.

Importantly, our study demonstrates that the dephosphorylation of LRRK2 by the PP2A complex depends on the presence of the regulatory subunits PPP2R2. In overexpression testing, we found that LRRK2 dephosphorylation in the presence of PP2A catalytic subunits alone was weak, however it is significantly increased for PP2A when PPP2R2A/B/C/D are co-expressed. These data are complemented by experiments with direct injection of purified phosphatases in *Xenopus* oocytes, a system with the benefit of overcoming the large time frame of overexpression experiments. Using this technique, we observed that injection of the PPP2CA subunit alone was insufficient to dephosphorylate LRRK2, while the complementation of PPP2CA with regulatory subunits PPP2R2A/B produced robust LRRK2 dephosphorylation. These are indications that the combination of PPP2CA with PPP2R2A/B/C/D is a candidate phosphatase holoenzyme for LRRK2. These observations are also consistent with previous studies that have demonstrated that the PP2A holoenzyme is more effective to dephosphorylate specific target proteins (for example Tau protein) than the core dimer and even more than the PPP2CA alone (40–42).

The importance of the PP2A regulatory subunits PPP2R2 obtained in overexpression systems were confirmed for endogenous proteins in cells with neuronal phenotype. Here we show that reducing the endogenous levels of PPP2CA and PPP2R2A/B/C in SH-SY5Y neuroblastoma cells can prevent the LRRK2 dephosphorylation at S935, induced by 24h of LRRK2 kinase inhibition, but not at 2h of treatment. This is an interesting observation as we have previously shown that molecular inhibition of PP1 can prevent LRRK2 kinase inhibitor-induced dephosphorylation of LRRK2, after 30 minutes of treatment (13). This might indicate that the very fast LRRK2 S935 dephosphorylation induced by inhibitor treatment is mediated by PP1, while PP2A holoenzymes are involved in the more sustained dephosphorylation during chronic inhibition, which is likely to be related to LRRK2 ubiquitination and degradation.

In addition, we used a CRISPR/dCas9 system to repress or activate expression of endogenous phosphatases in SH-SY5Y neuroblastoma cells coupled to analysis of endogenous LRRK2 phosphorylation. Expression changes obtained for the PP2A subunit PPP2R2A were moderate with 50-60% reduction or increase of expression levels. Interestingly, both the decreased and increased endogenous expression of PPP2R2A led to an increase of pS935-LRRK2 level, confirming PPP2R2A as strong regulator of LRRK2 phosphorylation. This result also suggests a tight relationship between PPP2R2A expression and endogenous LRRK2 phosphorylation that merits further attention in future studies. By comparison, a similar increase in PPP2CA endogenous expression led to only a moderate change in LRRK2 phosphorylation that did not reach statistical significance, again underscoring the importance of the regulatory PP2A subunit in LRRK2 phosphoregulation.

An important step in characterizing candidate LRRK2 phosphatases is to assess their ability to dephosphorylate LRRK2 directly in a cell-free system. Indeed, we previously tested LRRK2 dephosphorylation *in vitro* using commercial recombinant PP2A catalytic subunits and found no significant dephosphorylation of LRRK2 at S910/S935/S955/S973 (13). Here, we were able to repeat the *in vitro* dephosphorylation experiments using purified holoenzyme complexes that included the catalytic (PPP2CA/B) as well as the regulatory (PPP2R2D) and scaffolding subunits (PPP2R1A/B) of the PP2A complex and found robust dephosphorylation of LRRK2. This dephosphorylation is sensitive to the PP2A inhibitor okadaic acid, indicating that the PPP2CA:PPP2R2D holoenzyme is capable of directly dephosphorylating LRRK2. By contrast, recombinant CDC25C does not induce LRRK2 dephosphorylation *in vitro*, consistent with an indirect effect on LRRK2 dephosphorylation or the absence of an additional factor required for dephosphorylation of LRRK2 by CDC25 (Fig. 4 C). Future research will be required to elucidate this point.

It is interesting to note that knockdown of the PP1 catalytic subunit PPP1CA did not yield significant changes in LRRK2 dephosphorylation under screen conditions, despite our recent report that PPP1CA controls the LRRK2 phosphorylation cycle (13). Indeed, we had shown that LRRK2 is dephosphorylated *in vitro* by PP1 and that pharmacological inhibition of PP1 modulates LRRK2 phosphorylation. Also, we previously found that PPP1CA was recruited to LRRK2 when dephosphorylation is

pharmacologically induced using a LRRK2 kinase inhibitor as well as in the presence of constitutively dephosphorylated LRRK2 variants (N1437H, R1441G and Y1699C) (13). The present study confirms the involvement of PP1 in LRRK2 dephosphorylation, as we observe the rapid recruitment of PPP1CA in conditions of LRRK2 dephosphorylation using colocalization and PLA analysis. By contrast, several regulatory subunits of PP1 were identified in our study, however further testing did not provide sufficient evidence to confirm a functional interaction with the catalytic subunit to propose a LRRK2 active PP1 holoenzyme. Therefore, further research is needed to define PP1 holoenzymes active on LRRK2.

The action of the PPP2CA:PPP2R2 complex on LRRK2 dephosphorylation is also supported by the recruitment of the phosphatase subunits to the LRRK2 complex in intact cells under dephosphorylation conditions. Assessing colocalization under dephosphorylation conditions via immunocytochemistry (at 1 hour after pharmacological dephosphorylation induction) or using videomicroscopy, have shown an increase in relocalization to the LRRK2 compartment for both PP1 and PP2A subunits. The videomicroscopy revealed that this relocalization was detectable within minutes after application of LRRK2 kinase inhibitor for PPP1CA and after approximately 30 minutes for PPP2CA, further suggesting that PP2A may have slightly slower kinetics for LRRK2 dephosphorylation compared to PP1. The rapid changing of colocalization is accompanied with an enhanced interaction between LRRK2 and PPP1CA, PPP2CA, PPP2R2A and PP2R2B after acute inhibition with two different LRRK2 kinase inhibitors. We and others have previously identified PPP1CA (13) as well as PPP2R1A and PPP2CA (23) as interacting proteins of LRRK2, and those findings are confirmed in the present study. Considering that physical interaction with their cognate phosphatases may be a hallmark of all dephosphorylation substrates (22), these data support the conclusion that LRRK2 is a true substrate for both PPP1CA and PPP2CA.

Recent reports have suggested that LRRK2 ubiquitination is related to LRRK2 dephosphorylation (36) and that sustained LRRK2 kinase inhibition alters steady state LRRK2 expression levels (35, 36, 43). Therefore, we tested whether the phosphatases dephosphorylating LRRK2 would induce the ubiquitination of LRRK2, and found that this was indeed the case (Fig. 5 E). Conversely, our results show that the double knockdown of PP2A catalytic and regulatory subunits (Fig. 5, A and B) or knock-down of PPP2CA alone (Fig. 5 C and D) affect the level of LRRK2 by increasing LRRK2 levels. Our results therefore show an interplay between LRRK2 phosphorylation and LRRK2 ubiquitination/stability, suggesting that LRRK2 can be placed in the class of molecules and pathways regulated by the interplay of phosphorylation and ubiquitination (44) in which phosphatases regulate both phosphorylation and expression levels of LRRK2.

Dzamko and colleagues recently reported a decrease in LRRK2 phosphorylation in PD brain (16). Therefore, one hypothesis is that this may be due to altered expression of LRRK2 phosphatase holoenzymes in PD brain. We tested PP2A expression levels in these post-mortem PD brain samples and found no changes in PPP2CA/B and PPP2R2A/B/C/D protein levels in PD vs. control brains with the exception of the substantia nigra where a slight decrease in PP2A regulatory subunit levels was observed. A precedent study by Park and colleagues also observed no changes in total PPP2CA/B

and total PPP2R2A/B/C/D subunits in PD and dementia with Lewy body (DLB) brains (39); the authors also demonstrated a markedly decreased expression of methylated PP2A leading to reduce PP2A activity. In addition to brain, LRRK2 is also known to be highly expressed in other tissues (lung, kidney, spleen, peripheral blood cells), while PP2A subunits are not uniformly expressed all across the human body. In fact, PP2A regulatory subunits PPP2R2A and PPP2R2D have a wide-spread tissue distribution similar to LRRK2 (45), while the expression of PPP2R2B (testis, brain) and PPP2R2C (only brain) is much more restricted (46, 47). Therefore, further research on LRRK2 phosphatases in PD should investigate PP2A holoenzyme activity in disease brains as well as expression and activity of phosphatases extracerebral tissues.

It is interesting to speculate whether the findings from our study may be linked to other partners in the LRRK2 pathway. For instance several RAB proteins including RAB8A, RAB10, RAB29 are reported as *bona fide* substrates of LRRK2 (17, 48–52). In that regard, Sacco et al have shown that the PPP2CA-PPP2R1A dimer can be disrupted by RAB8 and RAB9 proteins and represent a novel molecular mechanism to regulate the catalytic activity of the PP2A holoenzyme in different subcellular compartments (53). This opens the possibility of a potential mutually regulatory mechanism whereby the LRRK2 could regulate its own phosphorylation level via the regulation of PP2A by its RAB substrates.

In summary, our unbiased search for LRRK2 phosphatases confirms the involvement of PP1 in LRRK2 dephosphorylation and reveals the PP2A complex PPP2CA:PPP2R2 as a key physiological upstream regulator of LRRK2. Crucially, the catalytic subunit PPP2CA is rather inefficient at dephosphorylating LRRK2, while complementation with a PPP2R2 regulatory subunit yields a phosphatase complex that is a robust LRRK2 dephosphorylating. As depicted in the summary of the proposed mechanism ([SI Appendix, Fig. S8](#)), both PPP1CA and the PPP2CA:PPP2R2 complex are recruited to LRRK2 under dephosphorylation conditions. In addition to dephosphorylating LRRK2, this PP2A holoenzyme is able to induce LRRK2 ubiquitination and affect LRRK2 expression levels, suggesting that the PPP2CA:PPP2R2 complex plays a key role in LRRK2 function by priming LRRK2 for degradation via its dephosphorylation. The identification of the PPP2CA:PPP2R2 complex regulating LRRK2 S910/S935/S955/S973 phosphorylation paves the way for studies refining PD therapeutic strategies that impact LRRK2 phosphorylation

Materials and Methods

Cell culture and transfection. Tissue culture reagents were from Thermo Fisher Scientific or Life Technologies. Human embryonic kidney (HEK)-293T or HEK-293 cells and SH-SY5Y neuroblastoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8-15% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotic/antimycotic solution at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The Flp-In T-REx system was from Invitrogen and stable T-Rex 293 cell lines were generated as per manufacturer instructions by selection with 10-15 µg/ml blasticidin and 100 µg/ml hygromycin B. T-REx cultures were induced to express the indicated protein by inclusion of 1 µg/ml doxycycline in the culture medium for 24 hours. Transfections were performed 8-24 hours after seeding with linear polyethylenimine (PEI; Polysciences), Lipofectamine 3000 (Invitrogen) or Fugene 6 (Promega) according to the manufacturer's instructions. All cultures were tested and mycoplasma-free.

RNAi screening procedure. Phosphatome-wide siRNA screen was performed using the *Silencer*® Select Human Phosphatase siRNA Library (Thermo Fisher) directed against 298 phosphatases, including both catalytic and regulatory phosphatase subunits with three siRNA sequences per target. siRNAs were transfected in 96-well plates into U2OS cells expressing GFP-LRRK2 via transduction with a baculoviral vector (BacMam, Thermo Fisher). Following siRNA treatment, LRRK2 pS935 levels were measured using a FRET signal derived from energy transfer occurring between the GFP tag of LRRK2 and a terbium-marked anti-pS935-LRRK2 antibody (TR-FRET LanthaScreen assay mentioned below). Each plate contained several controls, including wells treated with LRRK2-IN1 (1 µM for 1 hour) as a dephosphorylation control (30) and wells treated with siRNA directed against LRRK2 or GFP (positive knockdown controls), as well as wells without siRNA or wells treated with non-targeting siRNA control (negative knockdown controls). siRNA screening was performed in quadruplicate in 384-well plates. Only those plates that showed no significant changes between the basal condition and negative knockdown control as well as significant changes between the basal condition and positive knockdown control were taken into account in the analysis. Changes in pS935-LRRK2 levels for a given phosphatase are calculated as a percentage relative to the change observed between the LRRK2 siRNA transfected cells and the non-transfected control. Primary selection of the hits was based on conditions effecting the biggest changes in LRRK2 phosphorylation and hits with minimum 30% change, corresponding to more than three times the variance of the measure on the control condition.

TR- FRET LanthaScreen cellular assay for LRRK2 pS935. LanthaScreen pS935 assays were performed essentially as described previously (27). In brief, U2OS cells were transduced with BacMam LRRK2-GFP expressing baculoviral vector (Thermo Fisher) overnight. Cells were replated at 10,000 cells per well in 384 well plates. The cells were either left untreated or treated with siRNA (see above) or 1 µM LRRK2-IN1 (for 60 minutes). Cells were directly lysed in the presence of terbium-labeled pS935 antibody

and after 3 hours incubation, TR-FRET ratios for Tb and GFP were read on a Perkin Elmer EnVision plate reader.

In vitro dephosphorylation assays. Phosphatase assays were set up in a total volume of 20 μ l with 5 nM recombinant full-length LRRK2 (Invitrogen) and 5 nM purified phosphatase in reaction buffer (PP2A: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, 0.1% BSA; CDC25: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM DTT), in the presence or absence of okadaic acid (LC Laboratories). Reactions were incubated for 30 minutes at 30°C (PP2A) or 37°C (CDC25), then terminated by the addition of 4xLDS sample buffer (Invitrogen) and boiling for 5 minutes.

Assessment of LRRK2 phosphorylation in phosphatase-injected *Xenopus laevis* oocytes. Oocyte micromanipulation and microinjection of purified proteins were performed as described previously (54). Fifty nanoliters of purified 3xFLAG-LRRK2 protein was injected first followed after 30 minutes by the microinjection of fifty nanoliters of protein phosphatases (either catalytic subunit alone or with the regulatory subunit) representing time point 0 of the experiment. Oocytes were collected at 30 minutes, 1, 2 and 4 hours post-injection of PP2A subunits. Ten oocytes were collected and assayed per experimental replicate, all experimental conditions were performed in triplicates.

Statistics. All data presented in this study were either averages or representative data from at least three independent experiments. The number of independent experiments and sample size are indicated in the figure legends. Statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software). Data are expressed as mean \pm s.e.m. Significance levels in the figures are denoted as ns, *, **, ***, **** corresponding to not significant ($P>0.05$), $P<0.05$; $P<0.01$; $P<0.001$ and $P<0.0001$, respectively.

Additional materials and methods are described in [SI Appendix, SI Materials and Methods](#).

ACKNOWLEDGEMENTS. The work was funded by the Michael J. Fox Foundation (grants 06709, 06709.01, 06709.02). Support from the KU Leuven, Flanders Innovation & Entrepreneurship (VLAIO) (doctoral fellowship TDW IWT.141396), Research Foundation Flanders (FWO, projects G0E1917N and SBOS006617N) the researcher attraction program of the Nord Pas-de-Calais Region (currently Hauts de France Region, France, Individual fellowship to J.-M.T.), the Doctoral School Biology Health of Lille (doctoral scholarship to M.D.), Inserm, Université de Lille, CHU de Lille is gratefully acknowledged. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 659183 (Marie Skłodowska-Curie individual fellowship to J.-M.T., project RECOLOR). The

authors gratefully acknowledge the support of several technological platforms and core facilities, including the Bio Imaging Center Lille (BiCEL, www.bicel.org), the Leuven viral vector core and the JPARC Lille viral vector facility. We acknowledge the Sydney Brain Bank at Neuroscience Research Australia and the Brain Bank for Aging Research at the Tokyo Metropolitan Geriatric hospital for supply of brain tissue to access to post-mortem brain samples. The authors thank Christel Vanbesien, Karim Belarbi, Malika Hamdane and Robert-Alain Toillon for fruitful discussions and also acknowledge the technical and logistical support of Thomas Comptdaer, Pierre Semaille, Fangye Gao and Stephanie Deman.

References

1. Zimprich A, et al. (2004) Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 44(4):601–607.
2. Nichols RJ, et al. (2010) 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochem J* 430(3):393–404.
3. Lill CM, et al. (2012) Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 8(3):e1002548.
4. Simón-Sánchez J, et al. (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41(12):1308–12.
5. Satake W, et al. (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41(12):1303–7.
6. Healy DG, et al. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 7(7):583–590.
7. Haugarvoll K, et al. (2008) Lrrk2 R1441C parkinsonism is clinically similar to sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70(Issue 16, Part 2):1456–1460.
8. Di Maio R, et al. (2018) LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 10(451):1–13.
9. Taymans J, Greggio E (2016) LRRK2 Kinase Inhibition as a Therapeutic Strategy for Parkinson's Disease, Where Do We Stand? *Curr Neuropharmacol* 14(3):214–25.
10. Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA (2006) LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 29(5):286–293.
11. Gloeckner CJ, et al. (2010) Phosphopeptide analysis reveals two discrete clusters of phosphorylation in the N-terminus and the Roc domain of the Parkinson-disease associated protein kinase LRRK2. *J Proteome Res* 9(4):1738–1745.
12. Doggett EA, Zhao J, Mork CN, Hu D, Nichols RJ (2012) Phosphorylation of LRRK2 serines 955 and 973 is disrupted by Parkinson's disease mutations and LRRK2 pharmacological inhibition. *J Neurochem* 120(1):37–45.
13. Lobbestael E, et al. (2013) Identification of protein phosphatase 1 as a regulator of the LRRK2 phosphorylation cycle. *Biochem J* 456(1):119–28.
14. Dzamko N, et al. (2010) Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochem J* 430(3):405–13.

15. Li X, et al. (2011) Phosphorylation-dependent 14-3-3 binding to LRRK2 is impaired by common mutations of familial Parkinson's disease. *PLoS One* 6(3):e17153.
16. Dzamko N, et al. (2017) LRRK2 levels and phosphorylation in Parkinson's disease brain and cases with restricted Lewy bodies. *Mov Disord* 32(3):423–432.
17. Ito G, et al. (2016) Phos-tag analysis of Rab10 phosphorylation by LRRK2: a powerful assay for assessing kinase function and inhibitors. *Biochem J* 473(17):2671–85.
18. Kalogeropoulou AF, et al. (2018) P62/SQSTM1 is a novel leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) substrate that enhances neuronal toxicity. *Biochem J* 475(7):1271–1293.
19. Dzamko N, et al. (2012) The IkappaB kinase family phosphorylates the Parkinson's disease kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-like receptor signaling. *PLoS One* 7(6):e39132.
20. Ito G, et al. (2007) GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 46(5):1380–1388.
21. Chia R, et al. (2014) Phosphorylation of LRRK2 by casein kinase 1 α regulates trans-Golgi clustering via differential interaction with ARHGEF7. *Nat Commun*. doi:10.1038/ncomms6827.
22. Virshup DM, Shenolikar S (2009) From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Mol Cell* 33(5):537–545.
23. Athanasopoulos PS, et al. (2016) Identification of protein phosphatase 2A as an interacting protein of leucine-rich repeat kinase 2. *Biol Chem* 397(6):541–554.
24. Liu Z, et al. (2011) The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat Immunol* 12(11):1063–70.
25. Häbig K, Walter M, Poths S, Riess O, Bonin M (2008) RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics* 9(2):83–94.
26. Schmitz MH a, et al. (2010) Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55 α and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells. *Nat Cell Biol* 12(9):886–93.
27. Hermanson SB, et al. (2012) Screening for Novel LRRK2 Inhibitors Using a High-Throughput TR-FRET Cellular Assay for LRRK2 Ser935 Phosphorylation. *PLoS One* 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043580.
28. Osório L, et al. (2014) Viral vectors expressing a single microRNA-based short-hairpin RNA result in potent gene silencing in vitro and in vivo. *J Biotechnol*

- 169(1):71–81.
29. Ito G, Fujimoto T, Kamikawaji S, Kuwahara T, Iwatsubo T (2014) Lack of correlation between the kinase activity of LRRK2 harboring kinase-modifying mutations and its phosphorylation at Ser910, 935, and Ser955. *PLoS One* 9(5):e97988.
 30. Deng X, et al. (2011) Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nat Chem Biol* 7(4):203–205.
 31. Vancraenenbroeck R, et al. (2014) In silico, in vitro and cellular analysis with a kinome-wide inhibitor panel correlates cellular LRRK2 dephosphorylation to inhibitor activity on LRRK2. *Front Mol Neurosci* 7(June):51.
 32. Choi HG, et al. (2012) Brain penetrant LRRK2 inhibitor. *ACS Med Chem Lett* 3(8):658–662.
 33. Sheng Z, et al. (2012) Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations. *Sci Transl Med* 4(164):164ra161.
 34. Henderson JL, et al. (2015) Discovery and preclinical profiling of 3-[4-(morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzotrile (PF-06447475), a highly potent, selective, brain penetrant, and in vivo active LRRK2 kinase inhibitor. *J Med Chem* 58(1):419–432.
 35. Lobbstaël E, et al. (2016) Pharmacological LRRK2 kinase inhibition induces LRRK2 protein destabilization and proteasomal degradation. *Sci Rep* 6(August 2015):33897.
 36. Zhao J, Molitor TP, Langston JW, Nichols RJ (2015) LRRK2 dephosphorylation increases its ubiquitination. *Biochem J* 469(1):107–120.
 37. Gilbert LA, et al. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154(2):442–51.
 38. Hemmings HC, Greengard P, Tung HY, Cohen P (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310(5977):503–5.
 39. Park H-J, et al. (2016) Dysregulation of protein phosphatase 2A in parkinson disease and dementia with lewy bodies. *Ann Clin Transl Neurol* 3(10):769–780.
 40. Ferrigno P, Langan TA, Cohen P (1993) Protein phosphatase 2A1 is the major enzyme in vertebrate cell extracts that dephosphorylates several physiological substrates for cyclin-dependent protein kinases. *Mol Biol Cell* 4(7):669–77.
 41. Goedert M, Cohen ES, Jakes R, Cohen P (1992) p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease [corrected]. *FEBS Lett* 312(1):95–9.

42. Xu Y, et al. (2006) Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme. *Cell* 127(6):1239–1251.
43. Fuji RN, et al. (2015) Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci Transl Med* 7(273):273ra15-273ra15.
44. Hunter T (2007) The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* 28(5):730–8.
45. Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353(Pt 3):417–39.
46. Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S (2003) A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem* 278(27):24976–85.
47. Strack S, Zaucha J a, Ebner FF, Colbran RJ, Wadzinski BE (1998) Brain protein phosphatase 2A: developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *J Comp Neurol* 392(4):515–27.
48. Liu Z, et al. (2017) LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet* 0(November):1–11.
49. Christensen KV, Smith GP, Williamson DS (2017) Development of LRRK2 Inhibitors for the Treatment of Parkinson’s Disease. *Progress in Medicinal Chemistry* (Elsevier B.V.), pp 37–80. 1st Ed.
50. Steger M, et al. (2016) Phosphoproteomics reveals that Parkinson’s disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife* 5:1–28.
51. Steger M, et al. (2017) Systematic proteomic analysis of LRRK2-mediated Rab GTPase phosphorylation establishes a connection to ciliogenesis. *Elife* 6(i):1–22.
52. Purlyte E, et al. (2018) Rab29 activation of the Parkinson’s disease-associated LRRK2 kinase. *EMBO J* 37(1):1–18.
53. Sacco F, et al. (2016) A subset of RAB proteins modulates PP2A phosphatase activity. *Sci Rep* 6(1):32857.
54. de Broucker A, et al. (2015) *Xenopus laevis* as a Model to Identify Translation Impairment. *J Vis Exp* (103):1–9.

Figures

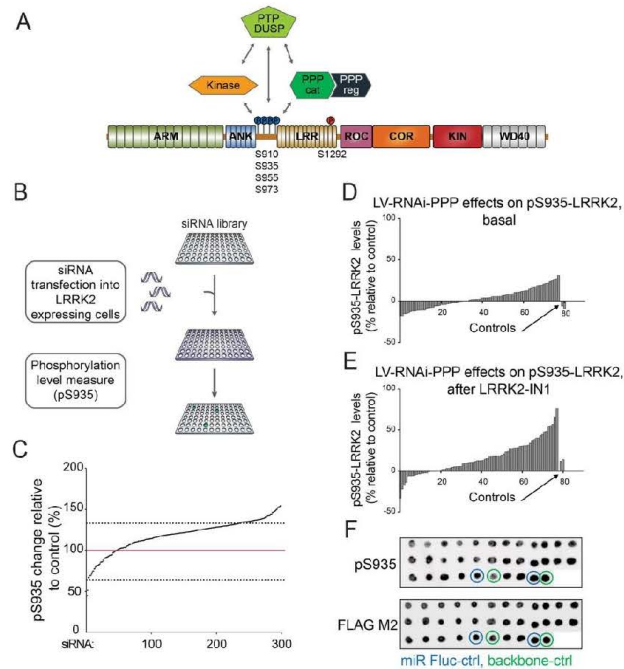


Fig. 1. Identification of candidate phosphatases as upstream regulators of LRRK2 via reverse genetics with a phosphatome-wide siRNA library and genetic depletion. (A) Schematic representation of LRRK2 domain structure, indicating the relative position of the phosphosites studied. Abbreviations: PPP: phosphoprotein phosphatase (serine/threonine), PTP: protein tyrosine phosphatase, DUSP: dual specificity phosphatase. (B) Schematic approach of the siRNA screen against phosphatases. (C) Changes in LRRK2 S935 phosphorylation induced by siRNA-mediated knockdown of 298 phosphatases and phosphatase regulators are depicted in the diagram, with values relative to control ranked from lowest to highest. Numerical values are given in *Datasheets*. (D and E) Secondary screen of candidate phosphatases via genetic depletion. For the different phosphatase hits, two knockdown constructs per hit were cloned into lentiviral vector (LV) transfer plasmids encoding a miRNA embedded short hairpin sequence. Changes in LRRK2 S935 phosphorylation induced by short hairpin mediated-knockdown of 39 candidate phosphatases in basal condition (D) and in the presence of LRRK2-IN1 (E). Numerical values of the graphs in (D and E) are given in *SI Appendix, Table S1*. (F) Representative dot blot from the secondary screen.

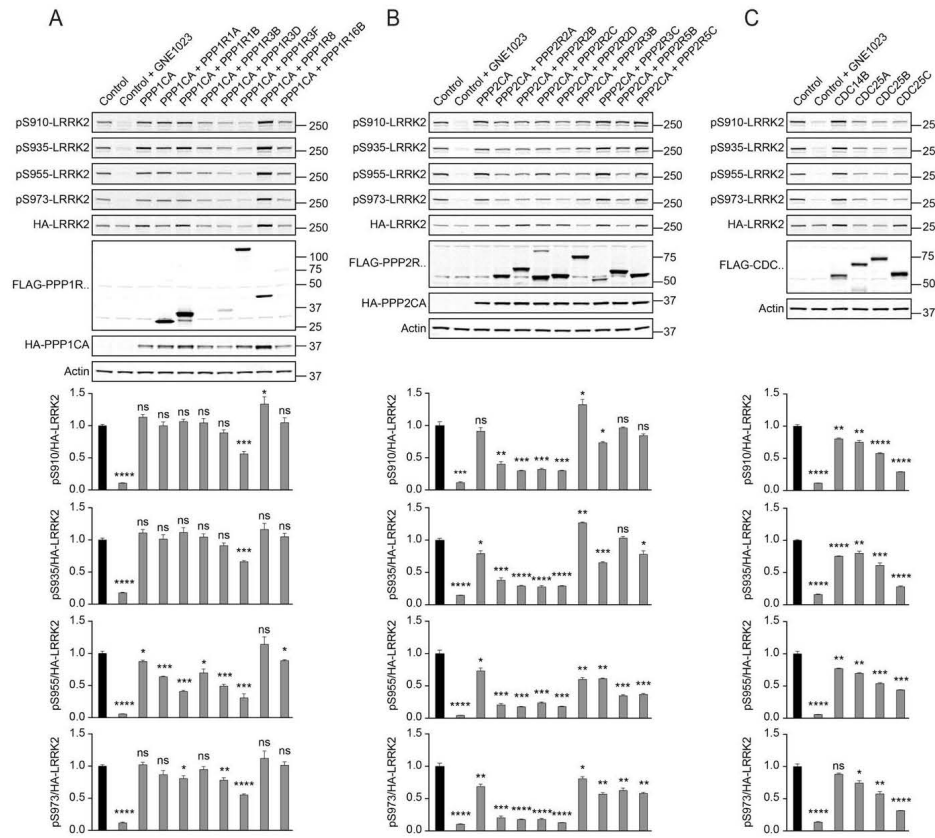
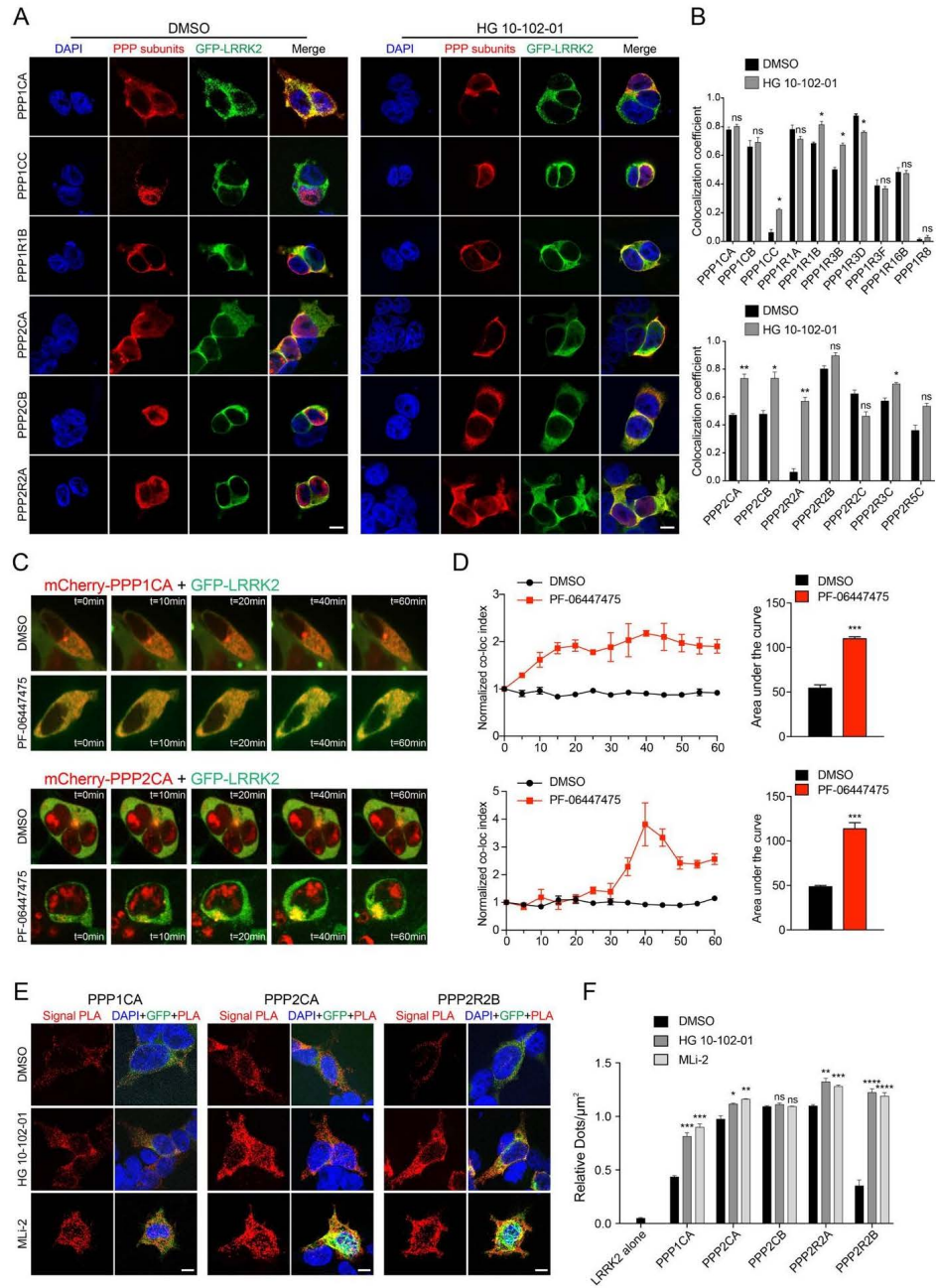


Fig. 2. Secondary screen of candidate LRRK2 phosphatases via overexpression analysis of PP1 and PP2A catalytic and regulatory subunits and CDCs. (A) HEK-293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding HA-tagged LRRK2, HA-tagged catalytic PP1 subunits, and FLAG-tagged regulatory PP1 subunits, as indicated. Changes in LRRK2 phosphorylation at S910, S935, S955, and S973 were measured by quantitation of immunoblots. (B) HEK-293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding HA-tagged LRRK2, HA-tagged catalytic PP2A subunits, and FLAG-tagged regulatory PP2A subunits, as indicated. (C) HEK-293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding HA-tagged LRRK2 and FLAG-tagged CDC14B, CDC25A, CDC25B, or CDC25C. Graphs show mean \pm s.e.m. (n=3). Statistical significance tested with two-tailed t-test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; **** P <0.0001; ns=not significant).



22

Fig. 3. Pharmacological induction of LRRK2 dephosphorylation results in a physical recruitment of PP1 and PP2A phosphatases to the LRRK2 compartment. (A) Colocalization assay from transfected HEK-293T cells treated with DMSO or 1 μ M HG-10-102-01 for 1 hour. HEK-293T cells were transfected with FLAG-tagged catalytic and regulatory subunits of protein phosphatases and GFP-tagged LRRK2. Cells were stained with DAPI to visualize nuclei (blue, first column of images) and proteins were detected by immunofluorescence using FLAG for PPP isoforms (red, second column) and eGFP for LRRK2 (green, third column). Merged images are shown in the right-hand panels. Scale bar shown is 10 μ m. (B) Quantification of the LRRK2/phosphatases correlation coefficient (Rcoloc) values for PP1 and PP2A isoforms shown in panel (A) and in [SI Appendix, Figs. S1 and S2](#). Data are from three independent co-transfection experiments. Graphs show mean \pm s.e.m. Statistical significance tested with Student's t-test (* P <0.05; ** P <0.01; ns=not significant). (C) Dynamic relocation of phosphatases with LRRK2 under pharmacological inhibition. Live images of HEK-293T cells transfected with GFP-tagged LRRK2 and mCherry-tagged PPP1CA or PPP2CA as indicated at distinct time points after adding DMSO or 150 nM PF-06447475. (D) Quantification of the colocalization index between LRRK2 and phosphatases during a period of 60 minutes and the area under the curve for data shown in (C). Graphs show mean \pm s.e.m. (n=5). Statistical significance tested with Student's t-test (*** P <0.001). Results of the same experiments performed for PPP1CB, PPP1CC and PPP2CB are given in [SI Appendix, Fig. S3](#). (E) The interaction between phosphatases and LRRK2 was analysed in HEK-293T cells in the presence of LRRK2 kinase inhibitors using *in situ* PLA, as described in the methods section. HEK-293T cells were transfected with GFP-tagged LRRK2 and FLAG-tagged phosphatases as indicated. At 48 hours after transfection, cells were subjected to PLA using primary antibodies against GFP and FLAG. Representative confocal images are shown for cells expressing PPP1CA, PPP2CA or PPP2R2B, either treated with DMSO (control), or with inhibitors HG-10-102-01 (1 μ M) or MLI-2 (10 nM) for 1 hour. Scale bar shown is 10 μ m. (F) PLA signals per cell were quantified using ImageJ software and the Cell Counter plugin, for conditions depicted in panel (E) as well as control and test conditions shown in [SI Appendix, Fig. S4](#). Values are means \pm s.e.m. of three separate experiments. Statistical significance was tested with Student's t-test (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; **** P <0.0001; ns=not significant).

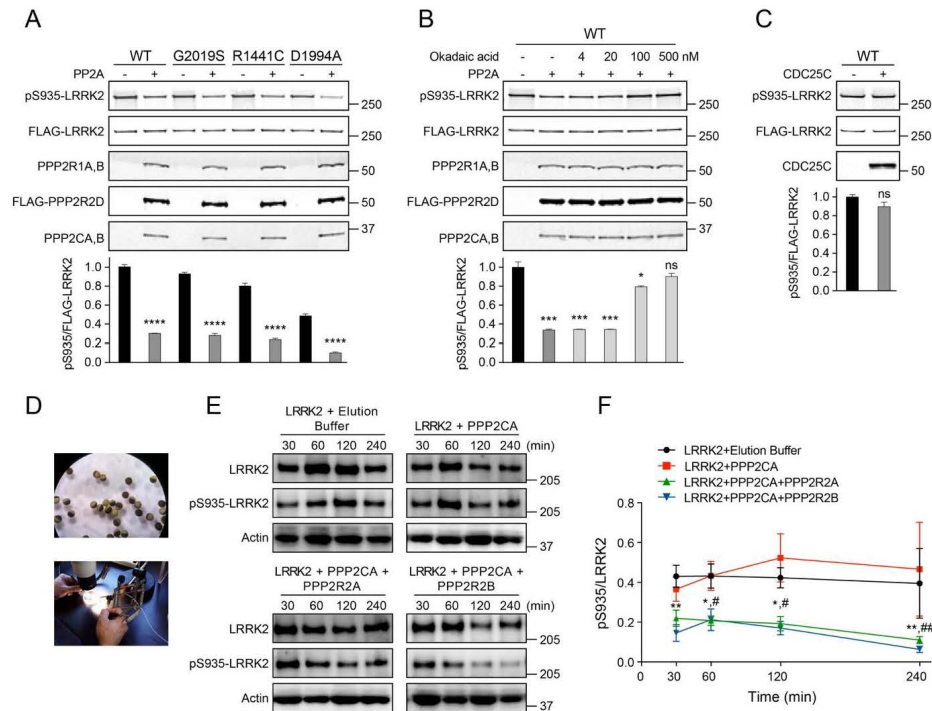


Fig. 4. PP2A directly dephosphorylates LRRK2 in vitro and in *Xenopus oocytes*. (A) Wild-type and mutant LRRK2 were significantly dephosphorylated at S935 in the presence of purified trimeric PP2A complexes (consisting of recombinant, FLAG-tagged PPP2R2D regulatory subunit and endogenous catalytic and scaffolding subunits). (B) Dephosphorylation of LRRK2 by PP2A was sensitive to okadaic acid. (C) Purified CDC25C had no effect on LRRK2 dephosphorylation. Graphs show mean±s.e.m. (n=3). Statistical significance tested with two-tailed t-test (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001; ns=not significant). (D) Experimental overview of microinjection of recombinant phosphoprotein phosphatase complex PPP2CA+PPP2R2A and PPP2CA+PPP2R2B in *Xenopus*. (E) Effect of phosphatase injection on the overall LRRK2-S935 phosphorylation level. *Xenopus oocytes* were microinjected first with LRRK2 protein and then with PP2A (catalytic subunit alone or in combination with its regulatory subunits) as indicated. Blots show representative results of three experiments. (F) Quantification of blots shown in (E). Graph shows mean±s.e.m. Statistical significance tested by 2-way ANOVA with time and phosphatase combination as factors followed by Bonferroni post-hoc test to compare the effects of test groups against control group (LRRK2+elution buffer) condition for each time point (*[#]P<0.05; **^{##}P<0.01; ns=not significant; symbols * and # denote significant differences for LRRK2+PPP2CA:PPP2R2B or LRRK2+PPP2CA:PPP2R2A groups which show

reduced LRRK2 phosphorylation compared to the LRRK2+elution buffer control group). The experiment was carried out three times from two independent microinjections.

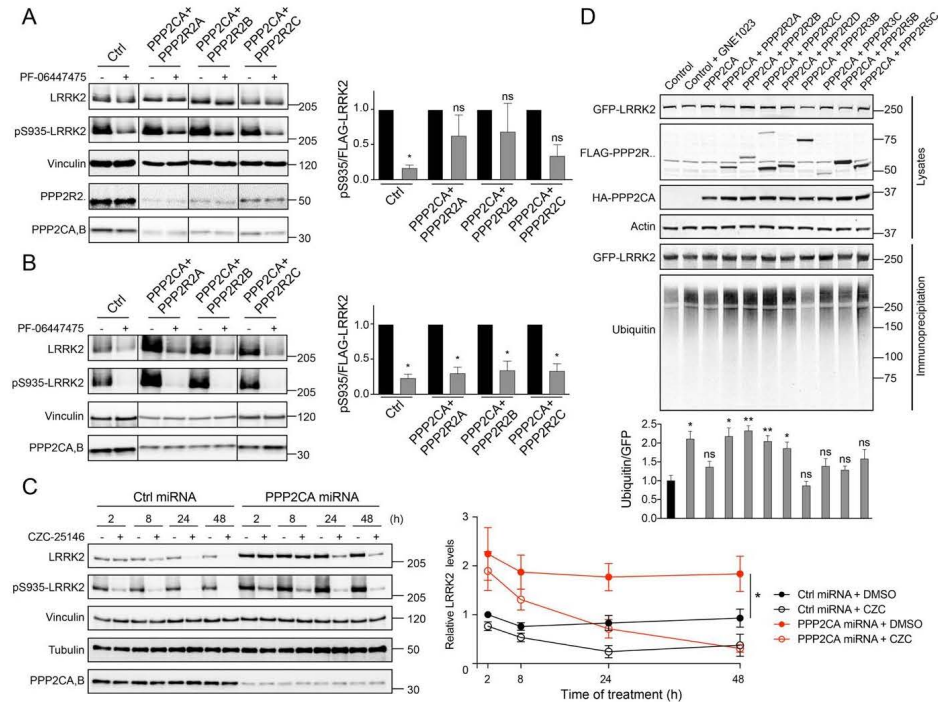


Fig. 5. PP2A affects LRRK2 protein level. (A and B) Effect of combined PP2A catalytic and regulatory subunit knockdown on LRRK2 S935 phosphorylation. SH-SY5Y cells with stable expression of LRRK2 and stable combined knock down of PPP2CA and PPP2R2A, B or C were treated with LRRK2 kinase inhibitor for 2 hours (A) or 24 hours (B). Representative blots are shown. Quantifications of LRRK2 S935 phosphorylation are shown in (A) and (B) (right panels). Graph shows mean±s.e.m. ($n \geq 3$ (except for PPP2R2B at 24 hours $n=2$)). Statistical significance was tested with column statistics with Bonferroni correction ($*P < 0.05$; ns=not significant). (C) SH-SY5Y cells with stable expression of LRRK2 and stable knock down of PPP2CA were treated with LRRK2 kinase inhibitor for different periods of time as indicated. Representative blots (C) and quantification of LRRK2 levels (right panels) are shown. (D) HEK-293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding GFP-tagged LRRK2, HA-tagged catalytic PP2A subunits, and various FLAG-tagged regulatory PP2A subunits, as indicated. LRRK2 was immunoprecipitated with GFP-Trap A beads, and ubiquitination was measured by immunoblotting. Graph shows mean±s.e.m. ($n=3$). Statistical significance tested with two-tailed t-test ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; ns=not significant).

Supplementary Information Text

SI materials and methods

Constructs and vectors

LRRK2 lentiviral expression constructs: 3xFLAG-LRRK2 expression in eukaryotic cells was performed using the lentiviral transfer plasmids pCHMWS-3xFLAG-LRRK2 (1, 2) and pCHMWS-3xFLAG-LRRK2-ires-hygromycin (3).

Phosphatase knockdown constructs: For short hairpin mediated gene knockdown, lentiviral vector (LV) transfer plasmids encoding a miRNA embedded short hairpin sequence (pLV-miR) directed against the different phosphatase hits were generated as described previously (4). These knockdown constructs co-express eGFP as well as a zeocin selection marker. Short hairpin sequences cloned are given in *SI Appendix, Table S2*. Controls for the knockdown vectors included empty vector control as well as vectors encoding short hairpin sequences targeting firefly luciferase (FLuc) (5).

Phosphatase and LRRK2 expression constructs: Constructs were prepared using the Invitrogen Gateway technology. In brief, PCR primers with incorporated attB sites were used to amplify the coding regions of human phosphatase subunits from the plasmids described in *SI Appendix, Table S3*. PPP1R3D and PPP1R3F were gene synthesized, with attB sites on either end. Construct pcDNA5-Frt-GFP LRRK2 was provided by Dr. Dario Alessi (MRC-PPU, University of Dundee, U.K.) and served as template to generate a human LRRK2 PCR fragment flanked by attB sites. All reading frames were open at the 5' end. These fragments served as substrates in Gateway BP recombination reactions with donor vector pDONR221 to generate entry clones. Errors leading to amino acid exchanges were corrected using the GeneArt site-directed mutagenesis system from Invitrogen. Expression clones with 5' FLAG, HA or mCherry tags were then created in Gateway LR recombination reactions between the entry clones and destination vectors which were based on the pcDNA5/FRT/TO vector and generated using the Gateway vector conversion system from Invitrogen.

CRISPR/dCas9 LV constructs: LVs used for this study were pgRNA-humanized (#44248 from Addgene) as well as an in-house designed pLenti-gRNA-J1, containing a gRNA expressed under control of a H1 promoter and containing an anti-hygromycin selection marker. The transcription start site (TSS) was identified using the FANTOM5/CAGE promoter atlas (6, 7). The sgRNA were designed to target the DNA region from -200 to 100 bp relative to the TSS of the candidate genes, using the web tool (<http://crispr.mit.edu/>) to minimize the off-target effect (8) (*SI Appendix, Table S4*).

Chemicals and antibodies

The following LRRK2 inhibitors were used: LRRK2-IN1 (9), HG-10-102-01 (10), PF-06447475 (11), GNE1023 (12), CZC-25146 (13), MLI-2 (14, 15). Mouse anti-GFP (mixture of clones 7.1 and 13.1) and rat anti-HA (3F10) antibodies were from Roche. Rabbit anti-GFP antibody was from Life Technologies. Mouse anti-FLAG (M2), anti- β -tubulin (TUB 2.1), anti-vinculin (hVIN-1) and rabbit anti-FLAG antibodies were from Sigma-Aldrich. Mouse anti- β -actin (AC-15) antibodies were from Sigma-Aldrich and Abcam. Mouse anti-ubiquitin (P4D1) and rabbit antibodies against GFP (D5.1), pan-actin

(D18C11), PPP2R1A/B (81G5), PPP2R2A/B/C/D (100C1 and 4953), and PPP2CA/B (52F8) were from Cell Signaling Technology. Mouse anti-PPP2R2A/B/C/D (2G9) antibody was from Thermo Fisher Scientific. Mouse anti-PPP1CA (E-9) antibody was from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti-LRRK2 (N241A/34) antibody was from NeuroMab. Rabbit anti-pS910-LRRK2 (UDD1), anti-pS935-LRRK2 (UDD2), anti-pS955-LRRK2 (MJF-R11), anti-pS973-LRRK2 (MJF-R12), and anti-DARPP32 (EP720Y) antibodies were from Abcam. Secondary antibodies for immunoblotting were from LI-COR Biosciences (IRDye 680RD and 800CW conjugates) and Invitrogen (horseradish peroxidase conjugates). Secondary antibodies for immunofluorescence were from Molecular Probes (Alexa Fluor conjugates).

Lentiviral vector (LV) production and cellular transduction

LVs encoding human 3xFLAG-LRRK2 under control of the cytomegalovirus (CMV) promoter and co-expressing a hygromycin selection marker via an internal ribosomal entry site element and LVs encoding short hairpins and CRISPR-dCas9 constructs were prepared and used for cellular transduction, essentially as previously described (3, 4, 16–18). In brief, after seeding HEK-293T cells in a 10-cm dish, we performed a triple transient transfection with the respective transfer plasmids, a packaging plasmid and an envelope plasmid. The medium was replaced after 24 hours. Cell supernatant containing lentiviral vectors was collected on day 3 post-transfection, filtered through a 0.45 μ m pore size filter (Merck-Millipore) and concentrated using an Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Sigma).

Expression of LRRK2, dCas9-VP64, dCas9-KRAB, short hairpin constructs or gRNA constructs in HEK-293T and SH-SY5Y cells was obtained by transduction with LVs generated as described above. For transduction in cell culture, 20,000–50,000 HEK-293T or 50,000–100,000 SH-SY5Y cells were plated in a 24-well plate. Vector was applied to the cells for 2 days. In the event of selection with an antibiotic, the following concentrations were used: 200 μ g/ml hygromycin, 1 μ g/ml puromycin and 100 μ g/ml zeocin. For conditions with low expression, this transduction procedure was repeated up to two times with the same cells to obtain up to triple transduced cells. Following transduction, cells were lysed for Western blot analysis and/or expanded for use in experiments.

Secondary RNAi screening using lentiviral vector-mediated knockdown

For phosphatase/phosphatase regulators selected from the primary RNAi screen, pLV_miR knockdown lentivectors were generated as described above. Screening was performed by transduction of HEK-293T cells stably expressing 3xFLAG-LRRK2 as previously described (4) with phosphatase targeting pLV_miR lentivectors and lysates were tested for changes in pS935-LRRK2 levels via dot blot at 72 hours post-transduction (3). Transduction conditions in 96-well plates were such that at least 85% of cells were transduced as verified by flow cytometry analysis using the coexpressed eGFP marker at 72 hours post-transduction. In the event of pharmacological treatment of transduced cells, pharmacological agents were diluted in pre-warmed culture medium to the concentration and applied for the time indicated in the results section. Cells were rinsed in PBS and lysed in lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Tween-20 or 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail and phosphatase

inhibitor cocktail (Roche)]. Lysates were spotted on hydrated polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes, and LRRK2 phospho-Ser935 levels as well as total LRRK2 levels were sequentially determined by immunoblot analysis. Densitometric analysis of the immunoreactive spots was performed using Aida analyzer v1.0 (Raytest). Phosphorylation levels were determined as the ratio of phospho-Ser935-LRRK2 to total LRRK2, normalized to values measured for the FLuc short hairpin negative control.

Expression and purification of recombinant phosphatase subunits and LRRK2

For *in vitro* experiments, heterotrimeric PP2A holoenzymes (consisting of recombinant FLAG-tagged PPP2R2D and endogenous PPP2R1A/B and PPP2CA/B subunits) and FLAG-tagged CDC25C were purified according to Adams and Wadzinski (19).

In brief, T-REx 293 cells were grown in 15-cm dishes for 24 hours, and treated with 1 µg/ml doxycycline to induce overexpression of the FLAG-tagged phosphatases subunits. 48 hours later, cells were rinsed with cold PBS, lysed in 1.2 ml lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, and protease inhibitors), and centrifuged at 15,000 g for 15 minutes. Cleared supernatants from two dishes were combined and rotated end-over-end with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 4°C. Beads were then washed three times with lysis buffer and once with storage buffer (PP2A: 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 µg/ml BSA; CDC25: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 µM EDTA, 250 µM DTT, 150 mM NaCl). Phosphatases were eluted from the beads with 100 µg/ml of 3xFLAG peptide (Sigma-Aldrich) in storage buffer by rotating for 30 minutes at 4°C. Protein solutions were supplemented with 50% (PP2A) or 25% (CDC25) glycerol for storage at -20°C. Catalytic subunits were quantitated by silver stain analysis, with BSA as a standard. PP2A activity was tested using the EnzChek phosphatase assay kit from Molecular Probes (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate as substrate). CDC25 activity was assayed with the Biomol Green reagent from Enzo Life Sciences (3-O-methylfluorescein phosphate as substrate).

For *Xenopus* oocyte microinjection experiments, FLAG-tagged proteins were purified essentially as described previously (16). HEK-293T cells were cultured in 15-cm dishes and transfected at 70–80% confluence with 30 µg of FLAG-tagged LRRK2 or FLAG-tagged phosphatases subunits constructs using linear PEI (Polysciences). Lysates were made from cells 48 hours after transfection in 500 µl of lysis buffer [20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 10% glycerol including protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific)] for 30 minutes at 4°C on a rotary wheel followed by clarification of extracts by centrifugation at 14,000 g for 10 minutes at 4°C. Supernatant was then incubated for 2 hours with constant rocking at 4°C with 40 µl of anti-FLAG M2-agarose per 0.5 ml of lysate. Beads were then washed four times in wash buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 1% Triton]. Proteins with beads were washed twice in elution buffer prior to elution for 15 minutes at 4°C with constant rocking with elution buffer containing 1 mM DTT and 100 µg/ml of 3xFLAG peptide.

Cell lysis, immunoprecipitation, and Western blotting

Cell lysates were prepared by washing with cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysing *in situ* with lysis buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 270 mM sucrose, 1% Nonidet P-40 and protease inhibitors) or lysis buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 10% glycerol, supplemented with protease and phosphatase inhibitors) on ice. To study ubiquitination, lysis buffer was supplemented with 10 mM N-ethylmaleimide (NEM). Lysates were subsequently centrifuged at 15,000 g for 15 minutes at 4°C to pellet cell debris. Protein content of cell lysates was determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein determination assay (Pierce Biotechnology) or the Bradford method (Thermo Scientific) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. After addition of LDS sample buffer and boiling, 10-20 µg cell lysates were resolved by electrophoresis on NuPAGE 3-8% Tris-Acetate gradient gels, 4-12% Bis-Tris gradient gels, 4-12% Tris-Glycine gradient gels or 12.5% SDS gels (LifeTechnologies). Separated proteins were transferred to PVDF (Bio-Rad) or nitrocellulose (Amersham) membranes, and non-specific binding sites were blocked for 30 minutes in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 5% non-fat milk or 5% BSA. After overnight incubation at 4°C with the appropriate antibodies, blots were washed three times with TBS-T. After incubation with the secondary antibodies, blots were washed again. Bands were visualized using enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech) or LI-COR dual probes. Densitometric analysis of the bands on the blot autoradiograms were performed using Aida analyzer v1.0 (Raytest), image analyzer ImageQuant 600 (GE Healthcare Bio-Sciences), or a LI-COR Odyssey infrared imaging system.

For immunoprecipitations, 500 µl of lysates was incubated end-over-end with GFP-Trap_A beads (ChromoTek) for 1 hour at 4°C. Beads were then washed twice with lysis buffer A supplemented with 300 mM NaCl, and twice with wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 mM EGTA, 270 mM sucrose, 50 mM NaCl). Immune complexes were incubated at 70°C for 10 minutes in LDS sample buffer, and passed through a Spin-X column (Corning) to separate the eluates from the beads, then boiled before loading on gels.

Immunofluorescence and determination of degree of co-localization

Transfected HEK-293T cells cultured on poly-D-lysine coated coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature, followed by three wash steps with PBS, permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 5 minutes, and were then blocked for 30 minutes at room temperature using blocking solution (0.5% BSA in PBS). The coverslips were incubated overnight with primary antibodies (anti-FLAG M2 and anti-GFP) in PBS. After three washes with PBS for 5 minutes, the cells were incubated for 1 hour with secondary antibody (Alexa Fluor conjugates) and washed three times for 5 minutes with PBS. The coverslips were mounted on a microscope slide with UltraCruz hard-set mounting medium (Santa Cruz Biotechnology). Capture of confocal images was performed using a laser scanning confocal microscope (LSM 710, Zeiss) with a 63X oil-immersion objective. Pearson's correlation coefficient (PCC) value was given by the JACoP plug-in using ImageJ software for each individual cell.

Videomicroscopy

HEK-293T cells were plated on 35 mm glass-bottom culture μ -dishes (Biovalley) and transfected with GFP-LRRK2 and mCherry-PPP1CA, mCherry-PPP1CB, mCherry-PPP1CC, mCherry-PPP2CA or mCherry-PPP2CB. Capture of confocal time-lapse images was performed using a Zeiss Observer Z1 spinning disk confocal microscope (Bio Imaging Center Lille) with a 63X oil-immersion objective at one frame per minute for 60 minutes with recordings starting when the LRRK2 inhibitor PF-06447475 compound was added to the medium. Confocal microscope settings were kept constant for all scans in each experiment. The analysis of the PCC was performed using ImageJ software and the JACoP plug-in. PCC was measured for each individual cell by hand-drawing a region of interest (ROI) over the image.

Proximity ligation assay

Proximity ligation assays (PLA) were performed on formaldehyde-fixed cells as in immunocytochemistry experiments. After permeabilization for 5 minutes with PBS-T (PBS supplemented with 0.1% Triton X-100), cells were blocked with Duolink blocking solution for 30 minutes at 37°C. Immediately after blocking, the cells were incubated with indicated primary antibodies in the Duolink antibody diluent for 1 hour at room temperature. The cells were washed twice with Duolink wash buffer A for 5 minutes before the incubation of the PLUS and MINUS PLA probes. The cells were incubated with PLA probes for 1 hour at 37°C, followed by two times washing with wash buffer A for 5 minutes. The cells were then incubated with pre-mixed Ligation-Ligase solution at 37°C for 30 minutes. After two times washing with wash buffer A for 2 minutes, the cells were incubated with pre-mixed Amplification-Polymerase solution for 90 minutes, at 37°C. Finally, the cells were washed twice with Duolink wash buffer B for 10 minutes, followed by 0.01X wash buffer B for 1 minute. The coverslips were dried in the dark and mounted with UltraCruz hard-set mounting medium. Images were quantitated in ImageJ using the Cell Counter plugin.

Assessment of LRRK2 phosphorylation in phosphatase-injected *Xenopus laevis* oocytes.

Oocytes were homogenized in lysis buffer (100 μ l/10 oocytes) containing 25 mM MOPS pH 7.2, 60 mM β -glycerophosphate, 15 mM paranitrophenyl phosphate, 15 mM EDTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM orthosodium vanadate, 1 mM NaF, 1 mM phenylphosphate, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 10 μ M benzamidine, and subsequently centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 4°C. Lysate from ten oocytes was analyzed by immunoblotting. LRRK2 (recombinant protein; Life Technologies) was used as an internal control. Densitometric analysis of the immunoreactivity bands was performed using ImageJ software.

Measurement of PP2A subunit expression levels in post-mortem brain

Patient information as well as protein extraction and immunoblotting procedures were described in reference (20). Experiments using human brain tissue lysates were approved by the University of NSW Human Research Ethics Advisory (#HC14046).

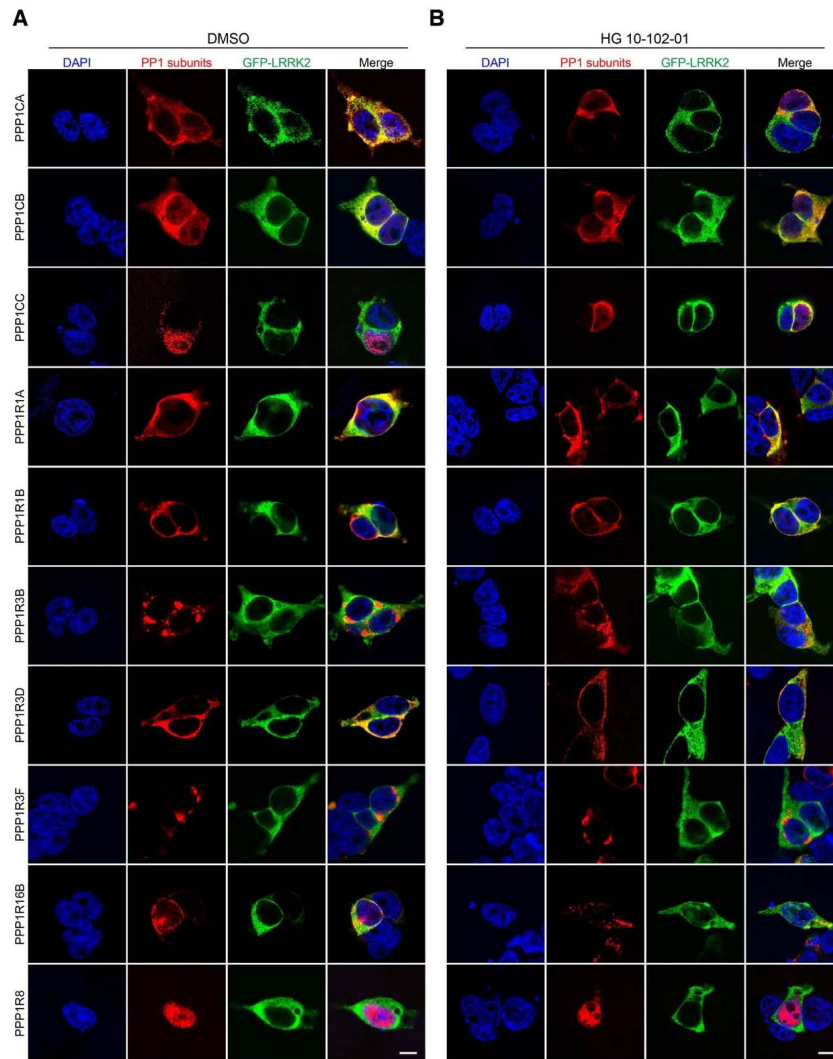


Fig. S1. Colocalization of PP1 phosphatase subunits with LRRK2 under basal and dephosphorylation conditions. (A and B) HEK-293T cells were transfected with FLAG-tagged PP1 catalytic and regulatory subunits and GFP-tagged LRRK2. Cells were stained with DAPI to visualize nuclei (blue, first column of images), and proteins were detected by immunofluorescence using anti-FLAG antibodies for PP1 subunits (red, second column) and eGFP for LRRK2 (green, third column). Merged images are shown in the right-hand column. Cells were treated with DMSO (A; control), or with the inhibitor HG-10-102-01 (B; 1 μ M) for 1 hour. Scale bar shown is 10 μ m.

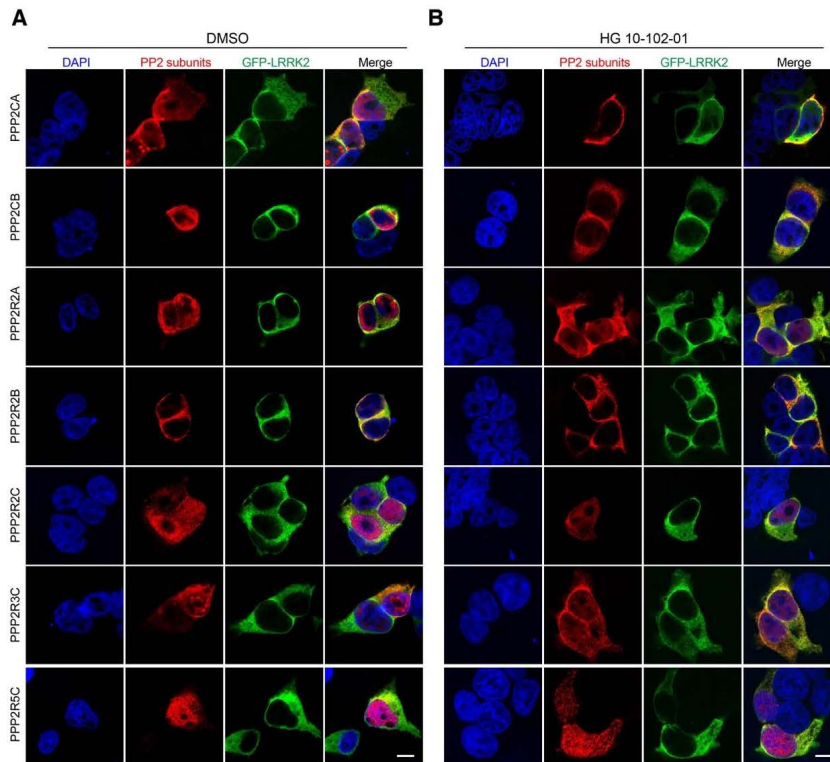


Fig. S2. Colocalization of PP2A phosphatase subunits with LRRK2 under basal and dephosphorylation conditions. (*A* and *B*) HEK-293T cells were transfected with FLAG-tagged PP2A catalytic and regulatory subunits and GFP-tagged LRRK2. Cells were stained with DAPI (blue, first column), and proteins were detected by immunofluorescence using anti-FLAG antibodies for PP2A subunits (red, second column) and eGFP for LRRK2 (green, third column). Merged images are shown in the right-hand column. Cells were treated with DMSO (*A*; control), or with the inhibitor HG-10-102-01 (*B*; 1 μ M) for 1 hour. Scale bar shown is 10 μ m.

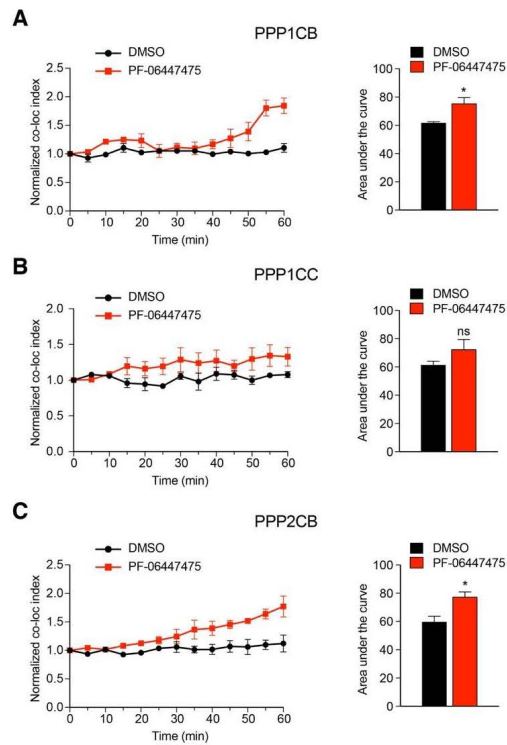


Fig. S3. Videomicroscopy of PPP1CB, PPP1CC and PPP2CB: Effect of pharmacological kinase inhibitor on LRRK2 and phosphatases subcellular localization. (A-C) Quantification of the colocalization index between LRRK2 and phosphatases during a period of 60 minutes and the area under the curve for (A) PPP1CB, (B) PPP1CC and (C) PPP2CB. Graphs show mean±s.e.m. (n=5). Statistical significance was tested with Student's t-test (* $P < 0.05$). Results of the same experiments performed for PPP1CA and PPP2CA are given in Fig. 3 C and D.

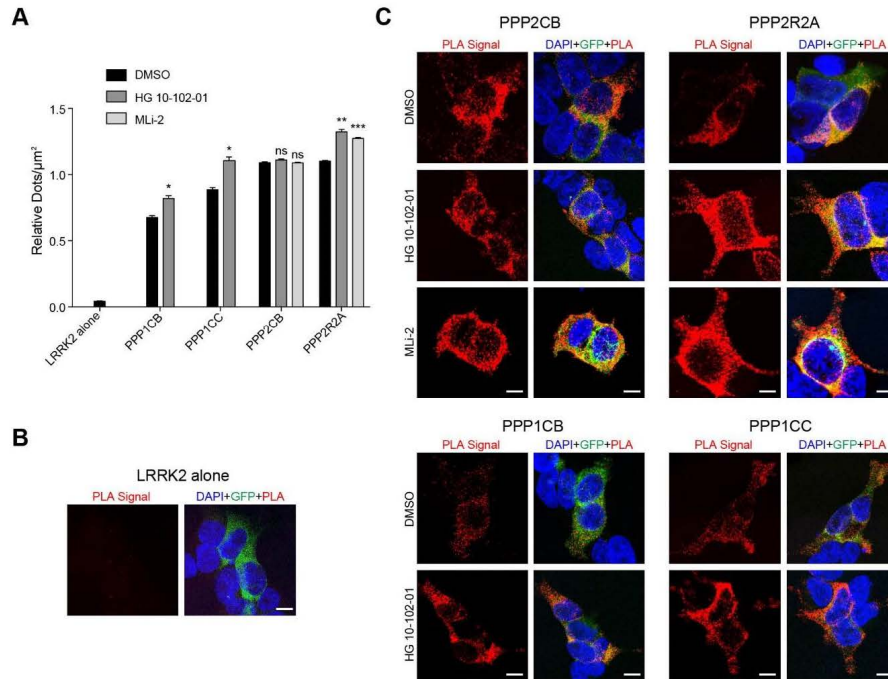


Fig. S4. Detection of LRRK2:phosphatases complexes by PLA demonstrated enhanced LRRK2 interaction with PP1 and PP2A subunits in the presence of LRRK2 kinase inhibitors. (A-C) HEK-293T cells were transfected with GFP-tagged LRRK2 and FLAG-tagged phosphatase subunits, as indicated. At 48 h after transfection, cells were subjected to PLA according to the manufacturer's protocol using primary antibodies against GFP and FLAG. (A) PLA signals per cell were quantified using ImageJ software and the Cell Counter plugin. Values are means \pm s.e.m. of three separate experiments. Statistical significance was tested with Student's t-test (* P <0.05; ** P <0.01 and *** P <0.001). (B) As control, PLA was performed using both primary antibodies in cells expressing GFP-LRRK2 without FLAG-phosphatases. (C) Representative confocal images for cells expressing PPP1CB, PPP1CC, PPP2CB or PPP2R2A and treated with DMSO (control), or with the inhibitors HG-10-102-01 (1 μ M) or MLI-2 (10 nM) for 1 hour. Scale bar shown is 10 μ m.

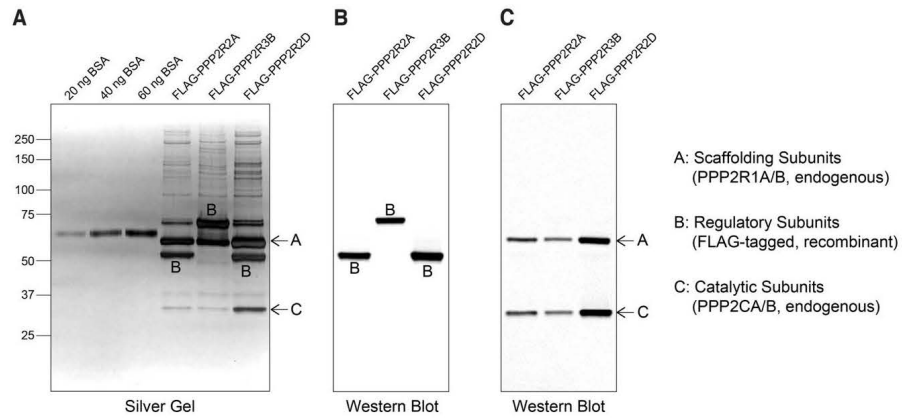


Fig. S5. Purification of PP2A phosphatases from mammalian cells. (A) Preparation of three PP2A holoenzymes by isolating FLAG-tagged regulatory subunits with immunoaffinity chromatography, and co-purifying endogenous scaffolding and catalytic subunits. (B and C) Western blot analysis indicates the presence of regulatory (B) or catalytic and scaffolding subunits (C).

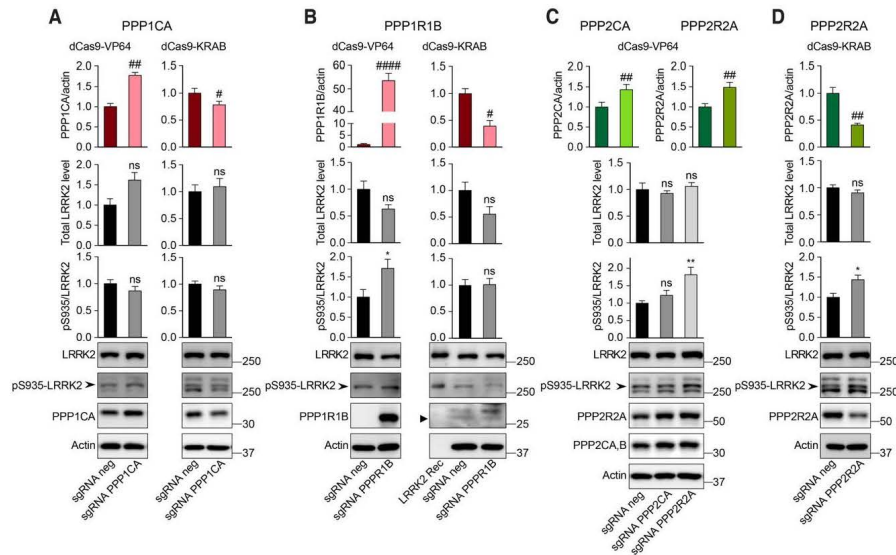


Fig. S6. Effects of activation or repression of endogenous phosphatase genes on LRRK2 phosphorylation in SH-SY5Y cells via the CRISPRa and CRISPRi system. (A-D) SH-SY5Y cells stably expressing either dCas9-VP64 or dCas9-KRAB were infected with lentivirus constructs expressing a negative control sgRNA or a sgRNA targeting phosphatases: (A) PPP1CA, (B) PPP1R1B, (C) PPP2CA and PPP2R2A and (D) PPP2R2A. Cells were grown for at least 10 days and then analyzed for phosphatase levels, total LRRK2 levels, and phospho-Ser935. β -Actin was used as the internal control. The data represent the outcomes of at least three biological replicate assays. Graphs show mean \pm s.e.m. Statistical significance was tested with non-parametric Mann-Whitney U test one-tailed for phosphatase levels and two-tailed for LRRK2 levels and phospho-Ser935 levels (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.0001; ns=not significant). (►) indicates endogenous phospho-Ser935 LRRK2 and (▶) indicates endogenous PPP1R1B.

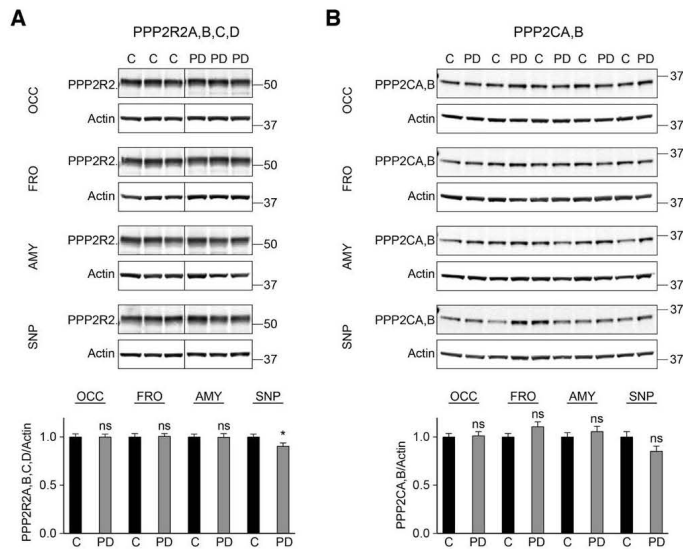


Fig. S7. Quantification of PP2A subunit expression levels in normal and PD brain. (*A* and *B*) Samples from four brain areas (OCC occipital cortex, FRO frontal cortex, AMY amygdala, SNP substantia nigra/putamen) from 25 PD patients and 25 healthy controls (C) were analyzed by immunoblotting. (*A*) Regulatory (PPP2R2A/B/C/D), and (*B*) catalytic (PPP2CA/B) subunits were visualized with specific antibodies. The figure shows representative blots. PP2A subunit levels were normalized to β -actin. Quantification revealed that the levels of all PP2A subunits were unchanged in brains from PD patients, except a slight decrease in PPP2R2 levels in the substantia nigra. Graphs show mean \pm s.e.m. Statistical significance was tested with two-tailed t-test ($*P < 0.05$; ns = not significant).

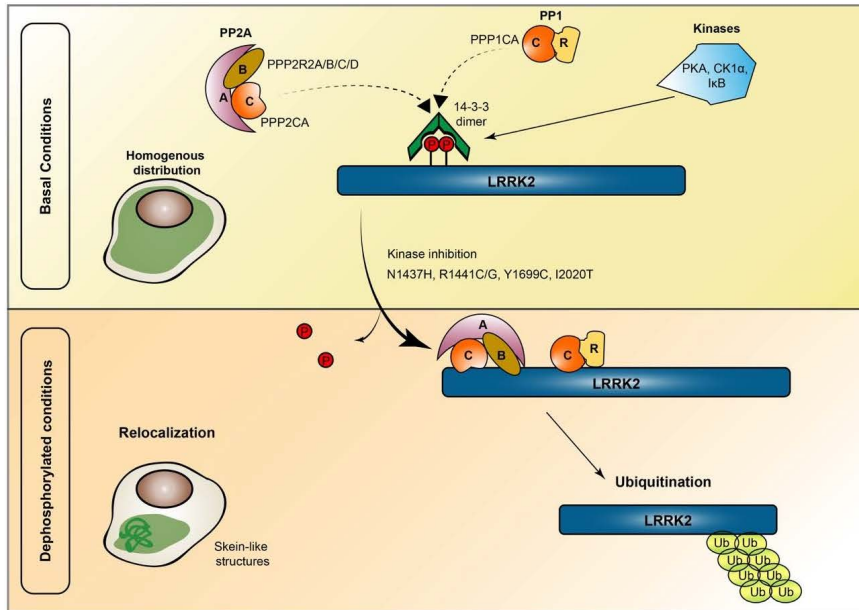


Fig. S8. Model of LRRK2-phosphatase recruitment mediated phosphoregulation. LRRK2 exists as a phosphorylated protein in cells with a diffuse cytoplasmic distribution. In case of LRRK2 kinase inhibition or for specific pathogenic mutant variants of LRRK2 such as N1437H, R1441C/G, Y1699C and I2020T, there is a physical recruitment of phosphatases to the LRRK2 complex. This is the case for the PP2A holoenzyme identified in this study (PPP2CA+PPP2R2A/B/C/D) as well as for PPP1CA. The dephosphorylation of LRRK2 leads to i) relocalization of LRRK2 resulting in intracellular accumulations, often described as filamentous, skein-like structures (21) and ii) promotion of the addition of ubiquitin to LRRK2 by a ubiquitin ligase, leading to degradation of LRRK2.

Table S1. Overview of secondary screening results of 39 hits selected from the phosphatome-wide siRNA screen. Following the primary screen, 39 genes were selected for secondary screening, as described in the materials and methods and results sections. Hits are numbered and identified with HGNC gene symbols. The % change in S935-LRRK2 phosphorylation levels as measured in the screen is given.

Symbol	Name	Primary RNAi screen (siRNA)	Secondary testing: RNAi		Secondary testing: RNAi +Inh		Secondary: overexpression	Selected for further characterization	ICC colocalization	Video microscopy	PLA		
			(LV- miRNA) 1	(LV- miRNA) 2	(LV- miRNA) (1)	(LV- miRNA) (2)					HG 10-102-01	PF-06447475	HG 10-102-01
PP1 related hits		AVG (3 siRNAs)	AVG	AVG	AVG	AVG	% change pS935-LRRK2 rate vs control		% change in colocalization rate vs control	% change in colocalization rate vs control	% change in interaction rate vs control	% change in interaction rate vs control	
1	PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme	-14,12	15,5	5,7	12,9	12,4	11,2	✓	2,9	101 (****)	89,1 (**)	112 (***)
2	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	32,30	3,7	2,3	-0,9	4,8		✓	4,6	22,1 (*)	20,4 (*)	
3	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	15,75	10,6	12,5	27,4	-5,41		✓	247 (*)	17,9	24,7 (*)	
5	PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	34,38	5,5	-4	5,6	8,6	1,3	✓	-8,9			
4	PPP1R1B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	10,39	-2,74	-4,02	42,9	-3,54	1,3	✓	18,8 (*)			
6	PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	34,93	-7,72	5,6	3	15,2	3,7	✓	33,8 (*)			
7	PPP1R3D	protein phosphatase 1, regulatory	31,48	-14,03	-11,98	-0,19	31,5	-8,8	✓	-13,2 (*)			

		(inhibitor) subunit 3D											
8	PPP1R3F	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3F	31,85	-18,48	-7,6	40,1	5,3	-33 (***)	✓	-5,6			
9	PPP1R3	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8	42,49	1,4	-0,36	27,9	-2,39	16,3	✓	88,8			
10	PPP1R16B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	-28,99	11,6	-0,64	48,2	10,5	5	✓	-2,2			
PP2A related hits													
11	PPP2CA	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme	41,11	20,7	30,9	23,3	56,7	-17,5	✓	55,7 (**)	134 (***)	24,7 (*)	18,8 (*)
12	PPP2CB	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	23,98	26,9	16,8	18,4	10,2		✓	53,8 (*)	29,7 (*)	0,9	0,4
13	PPP2R2A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform	33,84	-12,01	8,8	76,1	38,3	-60 (***)	✓	827,5 (**)		20 (*)	17,6 (**)
14	PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	31,04	-10,77	7,8	8,8	27,9	-70 (****)	✓	11,7		281,3 (***)	221,6 (***)
15	PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	34,61	-1,78	-8,42	3	30,8	-72,5 (****)	✓	-25,8			
16	PPP2R3B	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B', beta	30,52	2	11,1	17,7	9,1	27,5 (**)					
17	PPP2R3C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma	38,91	24,4	19,1	14,7	19,4	-37,5 (***)	✓	21,2 (*)			
18	PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', beta isoform	31,82	19,4	-1,27	47,6	30	3	✓				
19	PPP2R5C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma isoform	36,91	11,9	10,6	5,4	12,4	-23 (*)	✓	48,2			

Tyrosine phosphatases								
21	PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	44,02	25,9	21,5	33,9	18,4	
22	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	44,31	18,8	21,7	44,6	53,8	
24	PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	53,21	2	6,7	-0,12	37,1	
25	PTPN23	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23	-32,62	5,6	17,5	11,5	-0,43	
23	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	38,48	7,1	23,8	30,1	65,6	
20	PTPRS	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	42,50	-5,67	5,5	27,5	23,9	
Dual specificity and other phosphatases								
26	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	47,69	12,8	4,2	17,2	0,8	
27	CBP-P22	calcium binding protein P22	-55,48	-12,54	-3,87	-17,72	1,9	
28	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)	40,54	-8,03	1,9	20,8	17,4	-25
29	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	35,63	14,7	0,1	12,4	-22,12	-20
30	CDC25B	cell division cycle 25 homolog B (S. pombe)	52,03	-2,01	-2,05	1,8	-3,79	-41
31	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	37,49	7,9	-0,24	-13,95	-0,4	-72,5
32	DUPD1	dual specificity	-48,83	4	-3,12	-33,33	-6,05	

		phosphatase and pro kinase domain containing 1						
33	DUSP3	dual specificity phosphatase 3	47,98	3,9	2,2	55	39,9	
34	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	48,69	-15,22	-14,89	10,5	-0,41	
35	ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	34,37	-11,16	-5,9	-2,39	-5,78	
36	IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)- monophosphatase 1	52,38	-11,08	-18,12	5,2	3,6	
37	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	37,03	-10,82	-10,86	17,8	-4,35	
38	MINPP1	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1	53,06	-2,14	8,2	-2,66	-5,94	
39	PPM1A	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium- dependent, alpha isoform	54,34	3,9	-5,21	28,5	30,9	

Table S2. Short hairpin sequences cloned into miRNA based knockdown lentiviral vectors. 39 selected genes are listed per category (PP1-related, PP2A-related, tyrosine phosphatases and dual specificity/other phosphatases) with their gene symbol and name. For each gene, the two targeting sequences cloned into the miRNA embedded short hairpin of the pGAE (5) construct are given.

	Symbol	Name	shRNA (1)	shRNA (2)
PP1 related hits				
1	PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isozyme	ccgcatctatggtttctac	agatgatggattgattgaca
2	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme	ttatgagacctactgatgt	taacttaaggagacgggtaaa
3	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	gcatgattggacttata	gtgaccgattatgcttcttt
4	PPP1R1B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B	tcccacatctcaagtcacttt	aacggcaacggaagaagatgac
5	PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	tggctgaagtcctgaaggctcat	aatcagcaattgaaatgagaac
6	PPP1R3B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	acggaaltcgatgacccgctag	tggcactgtgaagttcagaac
7	PPP1R3D	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3D	atgtacatgtttgatcattatc	tggaaatctctgatttaataa
8	PPP1R3F	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3F	aaccagctctttgcacatgaat	acagatagaggtcaccagtgag
9	PPP1R8	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 8	aagccdtgattgtgcaatgag	aaggacagaccaagagaataag
10	PPP1R16B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B	ttgagaagaagtattactatf	tacaagcggatttctaccctta
PP2A related hits				
11	PPP2CA	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme	tggaaactgacgatactctaa	accggaatgtagtaacgattt
12	PPP2CB	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	aggttcttctgggagtatgt	agccgacaataaccacaagta
13	PPP2R2A	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform	tagcatcgcggaaaacaataa	aagcctagacttcaataagaaa
14	PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	accatcgagacttaccaggctc	aagggactactgaccgtcaaa
15	PPP2R2C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	acgggactaccttacagtcag	tggataaacctgaaggatgaa
16	PPP2R3B	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B', beta	atggtcaagccgaggactgaa	agcgttttacggaatgataaa
17	PPP2R3C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma	taccaccattctaatcgatttg	ttggttttctggacaaacac
18	PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', beta isoform	aggaacaalagatatacctaa	accgcaaacagtcaaccacat
19	PPP2R5C	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma isoform	tagtaatgttcttaacgaatt	ttgatttgcttaccactaaa
Tyrosine phosphatases				
20	PTPRS	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	tcggatcaagtgatcagtat	atcctattacgtctcgaatat
21	PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	atgctaattcctattaccag	aggaatattctgatcagat
22	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	acgcataaaactgaagtgag	atacatcgtcactgatcagaag
23	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	tccattcgaacctgtcttaa	aagggtccaactatctctac
24	PTPN13	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95 (Fas)-associated phosphatase)	aaggatgttattacgctcag	aagatggagattatcaaccag
25	PTPN23	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23	aggaacaaaagtgaaactccac	atggaagaacttctcagatg
Dual specificity and other phosphatases				
26	ASNA1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)	acggcttatcgatcaagaac	aacaacatctcagatgctttg
27	CBP-P22	calcium binding protein P22	aaggaccattcaggaggctgat	tcgcatgatgctcggagtaat

28	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	aaagatcagcaagaacccgaac	tgagacatcctatattccttc
29	CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>)	accaaggacctataggagac	ttcatcgactgctgatacccat
30	CDC25B	cell division cycle 25 homolog B (<i>S. pombe</i>)	acgagagctgattggagattac	aagcaacatcgtggataagttt
31	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>)	atcctttaccgtctgtccagat	aagaactccaagggcacaattt
32	DUPD1	dual specificity phosphatase and pro isomerase domain containing 1	aaagctctacattggcgalgag	aatccagcaagtgccaagaac
33	DUSP3	dual specificity phosphatase 3	aaaggactcggcatcacatac	aaaggctctcatgcacgtcaac
34	ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	aaggcattacctgactgattg	atggttcagcatagcccataat
35	ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	tggaccgctttaccattaa	acgggcatctcagaatttgcta
36	IMPA1	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	cagcagatgcatattatgaat	ttggtcttctaataatggaaa
37	INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	agcaatcactgtggaatataa	tagaagagcttgagaatgatg
38	MINPP1	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1	tagttccgaagtggtctcattg	aaagatagggtatactataa
39	PPM1A	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	aagactggaagtcactgatgac	aggatgttatgggaaatgaag

Table S3. Plasmids used to generate phosphatase entry clones. All plasmids encode human proteins and were selected based on maximal numbers of splice inserts. Calculated molecular weights of untagged proteins are given for the particular splice variant. PPP1R3D and PPP1R3F were gene synthesized, with the PPP1R3D sequence optimized for expression in humans. Errors leading to amino acid exchanges were corrected by site-directed mutagenesis as indicated in the remarks column.

Gene Symbol	Molecular Weight	Clone ID	Supplier	Reference Sequence	Remarks
PPP1CA	37.5 kDa	HsCD00004106	PlasmID	AY889979	-
PPP1R1A	18.9 kDa	31331	Addgene	NM_006741	-
PPP1R1B	23.0 kDa	IHS1380-213173417	Open Biosystems	NM_032192	-
PPP1R3B	32.6 kDa	HsCD00418687	PlasmID	BC043388	-
PPP1R3D	32.6 kDa	synthesized	Life Technologies	BC074861	codon optimized
PPP1R3F	82.8 kDa	synthesized	Life Technologies	NM_033215	-
PPP1R8	38.5 kDa	44221	Addgene	NM_014110	-
PPP1R16B	63.6 kDa	HsCD00347188	PlasmID	BC131801	-
PPP2CA	35.6 kDa	10689	Addgene	NM_002715	-
PPP2R2A	51.7 kDa	HsCD00337783	PlasmID	BC041071	-
PPP2R2B	58.9 kDa	HsCD00334557	PlasmID	BC031790	-
PPP2R2C	49.5 kDa	HsCD00333334	PlasmID	BC032954	-
PPP2R2D	52.0 kDa	HsCD00416382	PlasmID	BC047379	-
PPP2R3B	65.1 kDa	MHS6278-202801874	Open Biosystems	BC063429	Ala519 repaired
PPP2R3C	53.3 kDa	HsCD00323988	PlasmID	BC006823	-
PPP2R5B	57.4 kDa	HsCD00337252	PlasmID	BC045619	-
PPP2R5C	55.6 kDa	HsCD00021911	PlasmID	n/a	Ala466 repaired
CDC14B	56.8 kDa	HsCD00082789	PlasmID	NM_033331	-
CDC25A	59.1 kDa	HsCD00003644	PlasmID	BC007401	-
CDC25B	65.0 kDa	HsCD00337497	PlasmID	BC051711	-
CDC25C	53.4 kDa	HsCD00005087	PlasmID	M34065	-

Table S4. Sequences of guide RNAs used to target transcription start site regions of candidate LRRK2 phosphatases. These sequences were cloned into the pgRNA-humanized or pLenti-gRNA-J1 plasmids as described in materials and methods.

Target gene	Application	Sequence (5' to 3')	Position relative to TSS
PPP1CA	CRISPRi and CRISPRa	<u>CCGCGCCTCACGTCCAGCGGGG</u>	-72 / -91
PPP1R1B	CRISPRi and CRISPRa	TCAAGTTCTGGGGAGACCGC <u>AGG</u>	-185 / -204
PPP2CA	CRISPRa	CGGCCGCACGACCGGAGTTGGGG	-84 / -103
PPP2R2A	CRISPRi and CRISPRa	GACTACGACAGCGACGGCGG <u>GCGG</u>	+68 / +87

References

1. Daniëls V, et al. (2011) Insight into the mode of action of the LRRK2 Y1699C pathogenic mutant. *J Neurochem* 116(2):304–15.
2. Lobbstaël E, et al. (2013) Identification of protein phosphatase 1 as a regulator of the LRRK2 phosphorylation cycle. *Biochem J* 456(1):119–28.
3. Vancraenenbroeck R, et al. (2014) In silico, in vitro and cellular analysis with a kinome-wide inhibitor panel correlates cellular LRRK2 dephosphorylation to inhibitor activity on LRRK2. *Front Mol Neurosci* 7(June):51.
4. Reyniers L, et al. (2014) Differential protein-protein interactions of LRRK1 and LRRK2 indicate roles in distinct cellular signaling pathways. *J Neurochem*:1–12.
5. Osório L, et al. (2014) Viral vectors expressing a single microRNA-based short-hairpin RNA result in potent gene silencing in vitro and in vivo. *J Biotechnol* 169(1):71–81.
6. FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), et al. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* 507(7493):462–70.
7. Radzishheuskaya A, Shlyueva D, Müller I, Helin K (2016) Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression. *Nucleic Acids Res* 44(18):e141.
8. Hsu PD, et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31(9):827–32.
9. Deng X, et al. (2011) Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nat Chem Biol* 7(4):203–205.
10. Choi HG, et al. (2012) Brain penetrant LRRK2 inhibitor. *ACS Med Chem Lett* 3(8):658–662.
11. Henderson JL, et al. (2015) Discovery and preclinical profiling of 3-[4-(morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzotrile (PF-06447475), a highly potent, selective, brain penetrant, and in vivo active LRRK2 kinase inhibitor. *J Med Chem* 58(1):419–432.
12. Sheng Z, et al. (2012) Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations. *Sci Transl Med* 4(164):164ra161.
13. Ramsden N, et al. (2011) Chemoproteomics-based design of potent LRRK2-selective lead compounds that attenuate Parkinson's disease-related toxicity in human neurons. *ACS Chem Biol* 6(10):1021–1028.
14. Fell MJ, et al. (2015) MLI-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2 Kinase Inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 355(3):397–409.
15. Scott JD, et al. (2017) Discovery of a 3-(4-Pyrimidinyl) Indazole (MLi-2), an Orally Available and Selective Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Inhibitor that Reduces Brain Kinase Activity. *J Med Chem* 60(7):2983–2992.
16. Civiero L, et al. (2012) Biochemical Characterization of Highly Purified Leucine-Rich Repeat Kinases 1 and 2 Demonstrates Formation of Homodimers. *PLoS One* 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043472.
17. Lobbstaël E, et al. (2010) Immunohistochemical detection of transgene expression in the brain using small epitope tags. *BMC Biotechnol* 10:16.
18. Taymans J-M, Gao F, Baekelandt V (2013) Metabolic labeling of leucine rich repeat kinases 1 and 2 with radioactive phosphate. *J Vis Exp* (79):e50523.
19. Adams DG, Wadzinski BE (2007) Isolation and characterization of PP2A holoenzymes containing FLAG-tagged B subunits. *Methods Mol Biol* 365:101–11.
20. Dzamko N, et al. (2017) LRRK2 levels and phosphorylation in Parkinson's disease brain and cases with restricted Lewy bodies. *Mov Disord* 32(3):423–432.

21. Blanca Ramírez M, et al. (2017) GTP binding regulates cellular localization of Parkinson's disease-associated LRRK2. *Hum Mol Genet* 26(14):2747–2767.