

Validació de composts potencialment terapèutics per a la malaltia de Parkinson en un model cel·lular humà

TESI DE MÀSTER. INVESTIGACIÓ EN BIOLOGIA MOLECULAR, CEL·LULAR I
GENÈTICA (IBMCG). 2018-2019.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Edna Ripollés Campos

TUTORA: NURIA PARICIO ORTIZ. UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.
DEPARTAMENT DE GENÈTICA. GENÈTICA MOLECULAR DEL
DESENVOLUPAMENT I MODELS BIOMÈDICS.

Resum

La malaltia de Parkinson (PD) és un trastorn motriu de tipus neurodegeneratiu caracteritzat per la mort de les neurones dopaminèrgiques de la substància *nigra pars compacta* com a conseqüència de l'augment de l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial i la fallada energètica. En els darrers anys s'han identificat diverses formes de parkinsonisme familiar causades per mutacions en gens concrets, com *DJ-1*. Pel que fa als tractaments actuals, aquests no aturen la neurodegeneració, de manera que és necessari un canvi de paradigma cap a la identificació de nous composts amb efecte neuroprotector. Estudis recents han demostrat com l'augment de la taxa glicolítica podria constituir un mecanisme en aquesta neuroprotecció. En aquest context s'han identificat composts potencialment terapèutics per a la PD en un rastreig químic dut a terme amb un model de *Drosophila* basat en la deficiència de *DJ-1 β* . Amb l'objectiu de validar aquests composts en relació a la glicòlisi, s'ha provat el seu efecte sobre l'activitat catalítica dels enzims enolasa, hexoquinasa, fosfofructoquinasa i piruvat-quinasa en cèl·lules humanes deficientes en el gen *DJ-1*. Els nostres resultats mostren com els composts són capaços de modular el metabolisme de la glucosa pel que podrien constituir en el futur possibles fàrmacs pel tractament de la PD.

Paraules clau: malaltia de Parkinson, *DJ-1*, composts terapèutics, metabolisme de la glucosa, enzims glicolítics.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a motor-type neurodegenerative disorder characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta as a consequence of oxidative stress, mitochondrial dysfunction and energy failure. In recent years, several rare familial PD forms caused by mutation in specific genes such *DJ-1* have been identified. Concerning current treatments, these are not able to stop neurodegeneration, so it is necessary to change the paradigm towards the identification of new compounds with neuroprotective effect. Recent studies have shown that the increase in the glycolytic rate could be a mechanism involved in neuroprotection. In this context, potentially therapeutic compounds for PD have been identified in a chemical screening carried out with a *Drosophila* model based on the deficiency of *DJ-1 β* . In order to validate these compounds in relation to glycolysis, we have analysed their effect on the catalytic activity of enolase, hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase in

human DJ-1-deficient cells. Our results show that the compounds are capable of modulating the glucose metabolism so they could possibly become drugs for the treatment of PD in the future.

Key words: Parkinson's disease, *DJ-1*, therapeutic compounds, glucose metabolism, glycolytic enzymes.

Índex

Introducció.....	4
Materials i mètodes	7
Cultiu cel·lular i tractaments.....	7
Extracció i quantificació de proteïnes.....	8
Assajos enzimàtics	8
RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)	9
Anàlisi estadístic	9
Resultats i discussió.....	9
Efecte del dimetilfumarat.....	10
Efecte de la fentolamina.....	13
Efecte de la meclizina	15
Efecte del zaprinast	16
Efecte de l'àcid retinoic	17
Conclusió.....	20
Bibliografia.....	20
Material suplementari.....	25

Introducció

La malaltia de Parkinson (PD) és un trastorn motriu de tipus neurodegeneratiu que afecta al sistema nerviós central de forma crònica i progressiva (1). Constitueix la segona patologia neurodegenerativa més freqüent a nivell mundial rere la malaltia d'Alzheimer; als països industrialitzats, la seva prevalença en la població total és del 0,3% i al voltant d'un 1% en persones majors de 60 anys (2). Es caracteritza tant per signes motors extrapiramidals com per símptomes no-motors associats a la degeneració de les neurones dopaminèrgiques en la substància *nigra pars compacta* (SNpc) amb deposició de cossos de Lewy, uns agregats proteics tòxics composts majoritàriament per l' α -sinucleïna. Clàssicament els pacients desenvolupen tremolors en repòs, bradicinèsia, rigidesa muscular i inestabilitat postural. La PD també es pot veure associada amb un ample espectre de desordres neuropsiquiàtrics que inclouen el deteriorament cognitiu i la demència (1,3). Tot i que els mecanismes etiopatològics romanen en gran part desconeguts, actualment és àmpliament acceptat que l'augment d'estrès oxidatiu junt la disfunció mitocondrial es troben implicats en la mort de les neurones dopaminèrgiques de la SNpc, les quals podrien ser especialment vulnerables a causa dels seus elevats requisits bioenergètics (4).

La majoria dels casos de la PD són esporàdics i emergeixen d'una combinació de factors de risc ambientals i genètics. No obstant això, en la darrera dècada s'han identificat diverses formes familiars rares de parkinsonisme que es transmeten segons un patró d'herència mendelià i representen un 5-10% del total de casos. Des de la identificació al 1997 de la primera mutació en el gen *SNCA* causant d'una forma autosòmica dominant de la malaltia (5), s'han descrit fins 27 loci diferents (6-7). Un d'aquests correspon al gen *DJ-1*(8), el qual va ser descrit inicialment com un oncogen involucrat en la via de transducció del senyal dependent de Ras (9). Codifica per una petita proteïna de 189 aminoàcids que s'expressa de forma ubiqua en els teixits humans, incloent el sistema nerviós central. DJ-1 presenta una funció pleiotròpica que comprèn la neutralització d'espècies reactives d'oxigen (ROS) alhora que actua com un sensor d'estrès oxidatiu capaç d'iniciar una resposta incrementant l'expressió i activitat d'elements implicats en les defenses antioxidants cel·lulars. Per a això, l'estructura molecular de la proteïna juga un paper fonamental; en humans, presenta 3 residus de cisteïna altament conservats formant part del seu lloc actiu: Cys-46, Cys-53 i Cys-106. Cys-106 s'oxida seqüencialment des de la forma reduïda (-SH) a la sulfonada (-SOH), sulfinada (-SO₂H) i sulfònica (-SO₃H). El grau d'oxidació del residu determina l'activitat de DJ-1; mentre que la forma activa és la sulfinada, la sobreoxidació del residu causa la pèrdua de funció de la proteïna (10,11). En cervells de

pacients amb Parkinson idiopàtic s'ha demostrat com la ràtio dels nivells de la molècula oxidada/sobreoxidada es troba significativament disminuïda, fet que suggereix que la inactivació de la proteïna DJ-1 podria tindre un paper en els casos esporàdics més rellevant de l'esperat (12). A més de la neuroprotecció, DJ-1 presenta activitat xaperona, proteasa i glioxilasa; és un factor de transcripció, una proteïna d'unió al RNA i un regulador de la funció mitocondrial i l'autofàgia (10). La pèrdua de funció del gen *DJ-1* es troba relacionada amb l'augment dels nivells de ROS i la disfunció mitocondrial (alteració de la respiració mitocondrial, reducció del potencial de membrana i modificació de l'estructura de l'orgànul) (13).

La bioenergètica cel·lular i el metabolisme central del carboni es troben íntimament relacionats i la pertorbació d'aquest últim també sembla ser un tret comú entre els pacients de la PD, tant entre els casos familiars com en els esporàdics (14). En relació a *DJ-1*, s'ha vist com fibroblasts embrionaris de ratolí *knockout* per al gen mostren una major taxa glicolítica que els fibroblasts *wild type* (15). En un model de *Drosophila melanogaster* de la PD basat en la mutació del gen *DJ-1 β* , ortòleg del *DJ-1* humà que millor reproduceix les característiques fisiopatològiques de la malaltia (16), s'han trobat resultats similars. Un estudi previ de proteòmica redox dut a terme en el nostre grup d'investigació ha permès detectar proteïnes- més concretament l'enolasa (ENO) i la fosfofructoquinasa (PFK), dos enzims implicats en el metabolisme de la glucosa- que es troben més carbonilades en mosques model. El nivell de carbonilació de les proteïnes és un indicador d'estrès oxidatiu cel·lular. Aquest tipus de modificació proteica és irreversible i pot conduir en major o menor mesura a l'alteració de la funció biològica. L'anàlisi de l'activitat enzimàtica de l'ENO i la PFK junt als altres dos enzims clau en la regulació de la glicòlisi- l'hexoquinasa (HK) i la piruvat-quinasa (PK)- va revelar com l'activitat catalítica es troba significativament augmentada tant en mosques model com en cèl·lules humanes deficientes en *DJ-1*, la qual cosa suggereix que els canvis en la taxa glicolítica podrien ser rellevants en la patogènesi de la PD (resultats no publicats). En recolzament a aquesta hipòtesi, en els darrers anys s'ha publicat un creixent nombre d'estudis en models animals i cel·lulars de la PD que proven com l'estimulació de la glicòlisi pot suposar un mecanisme de compensació dels greuges metabòlics generats durant el procés de neurodegeneració; l'increment pot ajudar al control de la producció de ROS, el manteniment del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) i la restauració de la síntesis d'ATP per evitar la mort de les neurones (17–20).

Pel que fa als tractaments farmacològics per a la PD disponibles actualment, són composts pal·liatius dirigits a contrarestar els símptomes motors derivats de la interrupció en la transmissió de dopamina en la via nigroestriatal i, per tant, en la deficiència d'aquest neurotransmissor als nuclis caudat i putamen dels ganglis basals. Generalment es basen en precursors de la dopamina, agonistes dopaminèrgics, inhibidors d'enzims catabolitzadors de la dopamina (monoaminoxidases i catecol o-metiltransferases) i antagonistes dels receptors glutamatèrgics àcid N-metil-D-aspartic (NMDA). Aquests fàrmacs no són adequats per demorar o aturar el procés degeneratiu. A més, l'administració a llarg termini provoca una disminució de la seua eficàcia i l'aparició de complicacions i efectes secundaris indesitjables (21). Donada la complexitat de la fisiopatologia de la PD i l'aparició dels primers signes motors quan l'estat de degeneració es troba avançat- generalment l'alteració de la motricitat apareix quan el 80% de les neurones dopaminèrgiques ha mort (22)- es requereix un canvi de paradigma cap a la identificació de nous composts que actuen sobre diferents dianes al mateix temps, incloent la neuroprotecció (21,23).

Tal i com s'ha esmentat, l'increment de la taxa glicolítica pot ser un dels mecanismes implicats en la neuroprotecció, per la qual cosa la identificació de composts amb capacitat moduladora sobre el metabolisme dels glúcids podria suposar l'establiment d'un nou front estratègic per frenar la neurodegeneració. En aquest context, un *screening* químic a gran escala junt a altre d'específic duts a terme en el nostre grup d'investigació amb el model de *D. melanogaster* ha detectat una sèrie de composts amb potencial terapèutic per a la PD. Aquests són el dimetilfumarat, la fentolamina, la meclizina, el zaprinast i l'àcid retinoic. Tots ells milloren la capacitat d'escalada en mosques, alleujant així el fenotip locomotor patològic, i incrementen la viabilitat de les cèl·lules deficientes en DJ-1 en cultiu en presència d'estrès oxidatiu. Amb l'objectiu de validar aquests composts en relació a la taxa glicolítica, s'ha dut a terme l'anàlisi del seu efecte en un model cel·lular humà de la PD amb el gen *DJ-1* silenciats. Per a això s'ha dut a terme la inducció d'estrès oxidatiu amb peròxid d'hidrogen (H₂O₂) en aquestes cèl·lules rere la incubació amb els composts candidats durant 24 hores. Tot seguit, s'ha determinat l'activitat de les proteïnes implicades en la regulació del catabolisme dels glúcids mencionades anteriorment mitjançant el monitoreig de la dinàmica de diferents assajos enzimàtics acoblats.

Materials i mètodes

Cultiu cel·lular i tractaments

El model cel·lular per la PD ha consistit en cèl·lules humanes de neuroblastoma SH-SY5Y amb el gen *DJ-1* silenciats. Aquesta línia cel·lular és una sublínia de la SK-N-SH, la qual es va establir als anys 70 a partir d'una biòpsia de medul·la òssia d'un neuroblastoma metastàtic infantil (24). El silenciament de l'expressió del gen *DJ-1* ha estat dut a terme prèviament al laboratori per tècniques d'RNA interferent (iRNA). Les cèl·lules resultants presenten una reducció dels nivells de proteïna DJ-1 en un 91% (25).

Les cèl·lules SH-SY5Y van ser cultivades en flascons de 75 cm² amb medi de cultiu Eagle Modificat de Dulbecco/Mix de Nutrients F12 (DMEM/F-12) suplementat amb un 10% (v/v) de sèrum fetal boví inactivat per calor (FBS), 100 mg/ml de penicil·lina-estreptomicina i 1 mg/ml de puromicina (antibiòtic selectiu per a les cèl·lules transfectades), a 37 °C en una atmosfera amb CO₂ al 5% fins a adquirir una confluència del 90%. Tots els materials destinats al cultiu cel·lular van ser adquirits de Biowest.

En el moment en què s'assolí el 90% de confluència, les cèl·lules van ser incubades durant 24 hores amb cadascun dels composts candidats (Sigma-Aldrich) o amb DMSO al 0.1% com a control. Es va emprar DMSO com vehicle de dissolució dels composts de manera que l'assaig es va dur a terme a una concentració de DMSO al 0.1% en ambdós grups experimentals (tractament/control). Els composts testats han estat els següents: dimetilfumarat (1 µM), fentolamina (50 µM), meclizina (50 µM), zaprinast (1 µM) i àcid retinoic (20 µM). L'àcid retinoic, la fentolamina i el zaprinast han estat identificats com potencialment terapèutics en el rastreig a gran escala realitzat amb 1120 composts pertanyents a la llibreria Prestwick. El dimetilfumarat i la meclizina es van seleccionar en el rastreig específic. Tots són composts que han passat amb seguretat les diferents fases dels assajos clínics i es troben actualment comercialitzats pel tractament de diverses patologies no relacionades amb la PD. Les concentracions òptimes van ser estimades en un assaig de dosi pilot on es va determinar la concentració de compost a la qual la viabilitat cel·lular és màxima en presència d'estrès oxidatiu.

Estudis anteriors han demostrat que la viabilitat de cèl·lules deficientes en DJ-1 sols es veu afectada sota condicions oxidatives (26), per la qual cosa les cèl·lules es van estressar amb H₂O₂ (50 µM) durant 2.5 hores passat el temps d'incubació amb el compost/DMSO.

Extracció i quantificació de proteïnes

Els extractes proteics es van obtenir a partir de les cèl·lules tractades amb compost/DMSO dels flascons de 75 cm². Per a això, les cèl·lules es van tripsinitzar i recuperar amb tampó fosfat salí (PBS, Biowest) al 1% en alíquotes d'aproximadament 4x10⁶ cèl·lules. A continuació, les suspensions cel·lulars es van centrifugar durant 5 min a 300 g i s'eliminà el sobrenedant per incubar les cèl·lules 1 min amb tampó de lisi FT (KCl 600 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.4). Pel trencament de les membranes cel·lulars, les suspensions es van sotmetre a 3 cicles successius de congelació en nitrogen líquid-descongelació en gel-vortexat. Els lisats es van centrifugar a 15.000 g durant 10 min a 4°C i els sobrenedants es van reservar per dur a terme la quantificació de la concentració total de proteïna mitjançant el kit *BCA Protein Assay* (PierceTM, ThermoFisher Scientific) seguint les instruccions del fabricant.

Assajos enzimàtics

L'activitat de l'ENO, la PFK, l'HK i la PK va ser calculada a partir de la dinàmica de la densitat òptica fruit de l'oxidació del β -NADH o la reducció del NADP⁺, depenent de l'assaig enzimàtic acoblat. La composició dels tampons de reacció per a cada enzim així com el seu valor de pH, i la concentració adequada de substrat i cofactors han estat determinades a partir de la literatura descrita (27–29) i s'han modificat lleugerament per assegurar l'activitat enzimàtica òptima. Tots els assajos es van realitzar a 37 °C. A més, a fi d'obtenir resultats comparables, la concentració proteica dels extractes va ser corregida i igualada entre totes les mostres biològiques: 15 µg de proteïna per als assajos d'ENO, HK i PK, i 40 µg de proteïna per a l'assaig de la PFK. Tant l'esquema de les reaccions enzimàtiques acoblades com la composició dels tampons es troben descrites en el Material Suplementari.

L'absorbància es va enregistrar a 340 nm cada 30 segons durant 30 minuts en el lector de plaques Infinite[®] 200 PRO (Tecan Trading AG). Prèviament, també es van prendre mesures durant 5 minuts sense algun dels substrats necessaris per encetar les reaccions enzimàtiques per tal d'assegurar que els canvis d'absorbància observats es deuen al consum de NADH o NADP⁺. Tots els assajos enzimàtics van ser duts a terme emprant tres rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques per a cada grup experimental.

RT-PCR quantitativa (RT-qPCR)

Donat el mecanisme molecular d'acció de l'àcid retinoic, es van analitzar els possibles canvis en l'expressió dels gens diana en cèl·lules tractades amb aquest compost en comparació al control. Els gens estudiats han estat els següents: *enolasa 1 (ENO1)*, *enolasa 2 (ENO2)*, *fosfofructoquinasa-P (PFKP)*, *fosfofructoquinasa-M (PFKM)*, *hexoquinasa 1 (HK1)* i *piruvat-quinasa (PK)*.

L'RNA total es va aïllar emprant el kit *TRItidy GTM* (PanReac AppliChem ITW Reagents) segons les instruccions del fabricant a partir de les cèl·lules SH-SY5Y en cultiu al 90% de confluència tractades com s'ha descrit anteriorment. El cDNA es va sintetitzar amb el kit *FIREScript RT cDNA Synthesis MIX* (Solis BioDyne). Per últim, les reaccions quantitatives de RT-PCR es van realitzar per triplicat per a cada mostra emprant el termociclador StepOne Plus (Applied-Biosystems) i el kit *HOT FIREPol[®] SolisGreen qPCR Mix*. La seqüència dels encebadors emprats es mostra en el Material Suplementari. La seva eficiència va ser testada abans de realitzar les reaccions de quantificació. El nivell d'expressió dels gens diana va ser normalitzat en relació al gen de referència endogen (*β-tubulina*) i calculat mitjançant el mètode comparatiu $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Anàlisi estadístic

Totes les dades es mostren com mitjana \pm desviació estàndard (SD). Les diferències entre els grups experimentals (tractament i control) s'han comprovat aplicant el Test T per a mostres independents. Les diferències s'han considerat significativament estadístiques quan el p-valor < 0.05 .

Resultats i discussió

Com ja s'ha explicat anteriorment, en un assaig de proteòmica redox en el model de *D. melanogaster* mutant en el gen *DJ-1β* dut a terme en el nostre laboratori- amb la finalitat inicial de descobrir biomarcadors per al diagnòstic de forma primerenca- es van identificar una sèrie de proteïnes més carbonilades en mosques model, algunes d'elles implicades en el metabolisme de la glucosa (l'ENO i la PFK). Donat que la carbonilació és un tipus de modificació post-transcripcional que pot alterar la funció de la proteïna, els resultats suggerien que el metabolisme de la glucosa podria trobar-se pertorbat. Per tal de confirmar aquesta hipòtesi es

va analitzar l'activitat catalítica de les proteïnes implicades en la regulació de la glicòlisi (ENO, PFK, HK i PK) tant en les mosques mutants en *DJ-1 β* com en els cultius cel·lulars deficientes en *DJ-1*. Els resultats van mostrar un augment de l'activitat dels enzims glicolítics en els models amb el gen *DJ-1* alterat, cosa que indica que la ruta glicolítica es troba augmentada en alguns dels seus punts (resultats no publicats).

Fins el moment la plasticitat metabòlica no s'ha associat generalment a les neurones, no obstant, diversos estudis recents desafien aquesta premissa. Per exemple, les cèl·lules nervioses *in vitro* resistents als agregats β -amiloides- uns cúmuls proteics típics en la malaltia d'Alzheimer similars als formats per l' α -sinucleïna- mostren una major captació de la glucosa i un increment del flux de la via glicolítica, cosa que suggereix que la modulació del metabolisme central del carboni pot mitjançar la resistència a l'estrès induït pels agregats (17). L'evidència insinua que una major dependència de la glicòlisi per a la producció d'ATP provoca una caiguda en el consum d'oxigen que ajuda al control de la producció de ROS i prevé la despolarització mitocondrial, dos fenòmens que es troben relacionats amb el desencadenament de la via apoptòtica intrínseca per augment de la permeabilitat de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (30). En altres paraules, l'efecte Warburg (glicòlisi aeròbica) podria oferir a les cèl·lules un avantatge en l'entorn hostil que es dona en els cervells afectats per una malaltia neurodegenerativa com la PD.

Per comprovar si els composts identificats com potencialment terapèutics són capaços de modular la taxa glicolítica, s'ha mesurat el seu efecte sobre l'activitat enzimàtica de l'ENO, la PFK, l'HK i la PK en cultius cel·lulars SH-SY5Y amb el gen *DJ-1* silenciats. A continuació es mostren i discuteixen els resultats obtinguts per a cadascun d'ells: el dimetilfumarat, la fentolamina, la meclizina, el zaprinast i l'àcid retinoic.

Efecte del dimetilfumarat

El dimetilfumarat (DMF) és un èster de l'àcid fumàric α,β -insaturat. La incubació de les cèl·lules model amb DMF (1 μ M) ha provocat l'increment significatiu de l'activitat dels enzims PFK i PK respecte les cèl·lules no tractades amb compost (Figura 1).

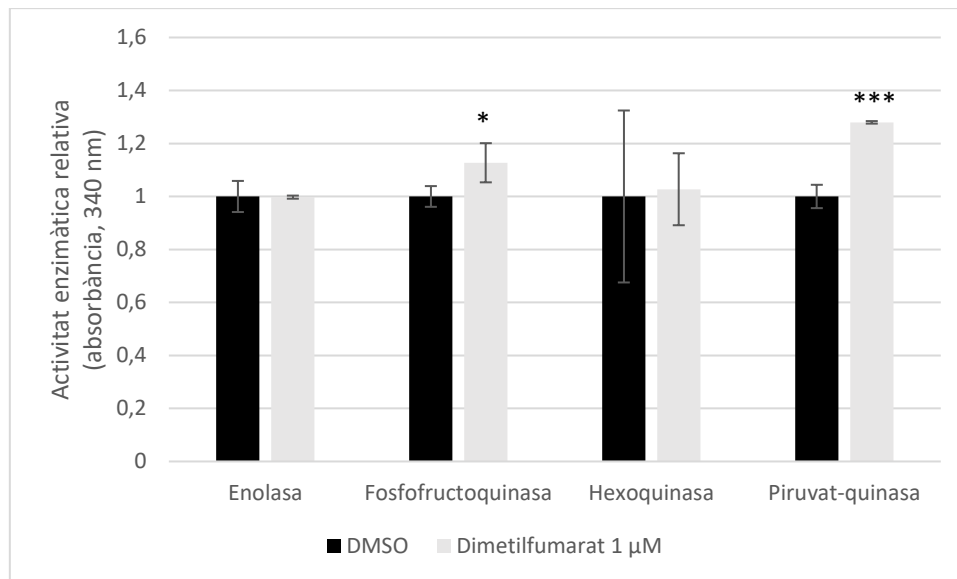


Figura 1. Representació de l'activitat enzimàtica en cèl·lules tractades amb DMF a 1 μM en comparació a la de les cèl·lules tractades amb la solució control (DMSO al 0.1%). El DMF augmenta significativament l'activitat de la PFK i la PK (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Les barres d'error mostren la s.d. de tres rèpliques biològiques i tècniques.

La base molecular del mecanisme d'acció del DMF constitueix encara un objecte de debat. Es pensa que el DMF junt el monometilfumarat (MMF, producte de la hidròlisi del DMF) poden modular l'expressió de gens antiinflamatoris, antioxidants, citoprotectors i bioenergètics a través de l'activació del factor nuclear 2 relacionat amb el factor eritroide 2 (Nrf2). Malgrat que actualment els fàrmacs basats en èsters de l'àcid fumàric s'empren sobretot per la pal·liació de la psoriasi, l'activació de la via de senyalització mediada pel factor Nrf2 sembla ser també una de les aproximacions prometedores en el tractament de malalties neurodegeneratives com la PD (31).

Pel que fa a la glicòlisi, l'augment en l'activitat de la PK en cèl·lules tractades amb el compost es pot explicar assumint el següent escenari. La desmetilació del DMF provoca l'acumulació de fumarat i els metabòlits que el succeeixen en el cicle dels àcids tricarboxílics (TCA). De fet, estudis previs han demostrat que en cultius tractats durant 24 hores amb DMF a una concentració de 10 μM es detecta un increment d'entre 3-4 vegades en el nivells intracel·lulars dels metabòlits adjacents al fumarat en el TCA (32). Part de l'oxalacetat excedent pot emprar-se en la síntesi de 2-fosfoenolpiruvat, cosa que explicaria l'increment en l'activitat de la PK. D'aquesta manera, el piruvat acumulat pot desviar-se cap a la formació de lactat i regenerar els nivells de NAD^+ per assegurar la continua producció d'ATP a través de la glicòlisi (Figura 2).

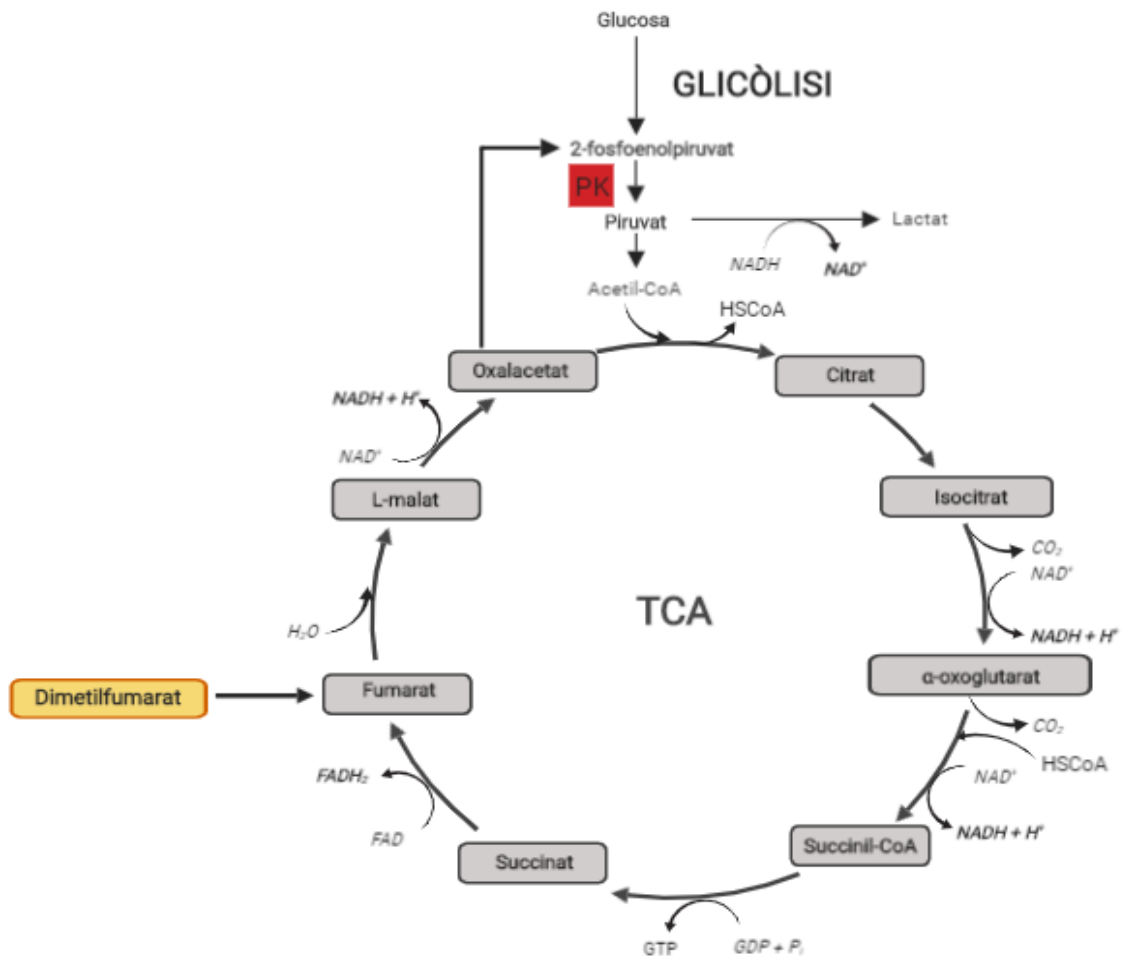


Figura 2. Esquema de la influència del DMF en les rutes bioquímiques de la glicòlisi i el TCA.

D'altra banda, altre estudi ha demostrat com el DMF i el MMF modifiquen covalentment l'enzim gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa (GAPDH) a través d'una reacció anomenada succinació. La GAPDH és el sisè enzim en actuar en la via glicolítica i catalitza la formació d'1,3-bifosfoglicerat a partir de gliceraldehid-3-fosfat (Figura 3). Pel que fa a la succinació, és un tipus de modificació covalent post-transcripcional de proteïnes on una molècula de fumarat reacciona amb un residu de cisteïna formant un grup S-2-succinocisteïna. Aquesta reacció pot alterar significativament la funcionalitat de la proteïna. Anteriorment s'ha provat com el DMF provoca la succinació de la cisteïna 152 (Cys-152) de la GAPDH *in vitro* i *in vivo*, la qual cosa du a la seva inactivació irreversible (33). L'aturada de la glicòlisi provoca l'acumulació de metabòlits anteriors al punt de bloqueig que poden derivar-se a la ruta dels fosfats de pentosa (PPP). Les principals funcions d'aquesta ruta d'oxidació de la glucosa són la formació i utilització de ribosa, el subministre de poder reductor (NADPH) necessari per a les reaccions biosintètiques (per exemple síntesi d'àcids grassos i esteroides) i la regeneració de les reserves

de glutatió. El NADPH i el glutatió són components centrals i indispensables dels sistemes antioxidants neuronals. Donat el context cel·lular d'estrès oxidatiu en el que es troben les cèl·lules model deficientes en DJ-1, podria ser que la incubació amb DMF provoqués un augment en l'activitat de la PFK, tal i com mostren els resultats, per tal de seguir mantenint el flux actiu cap a la PPP.



Figura 3. Esquema de la ruta bioquímica de la glicòlisi.

Efecte de la fentolamina

La incubació de les cèl·lules amb la fentolamina a una concentració de 50 μ M ha resultat en l'augment significatiu de l'activitat de la PFK respecte el control. La resta d'enzims analitzats mostren un nivell d'activitat equivalent en ambdues condicions experimentals (Figura 4).

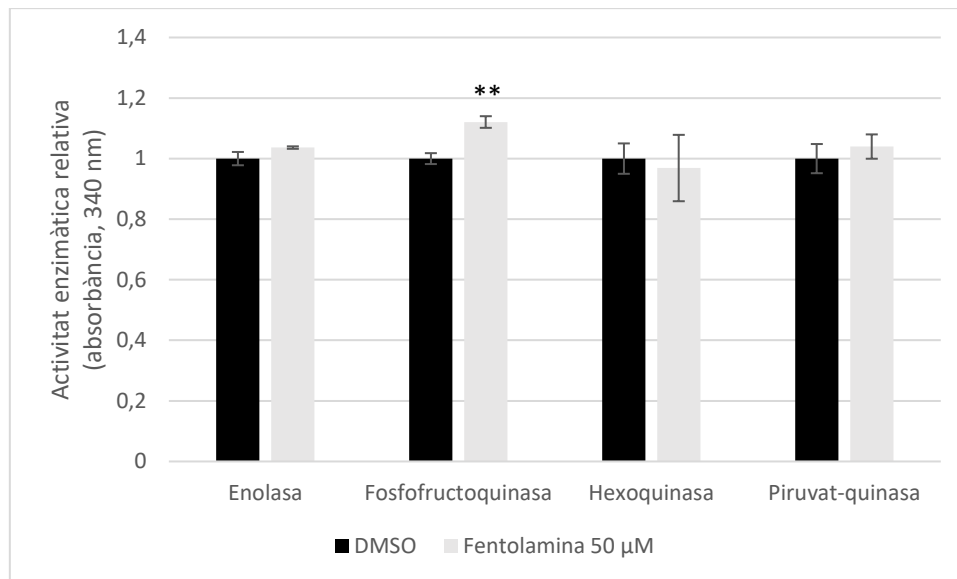


Figura 4. Representació de l'activitat enzimàtica en cèl·lules tractades amb fentolamina a 50 µM en comparació a la de les cèl·lules tractades amb la solució control (DMSO al 0.1%). La fentolamina augmenta significativament l'activitat de la PFK (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Les barres d'error mostren la s.d. de tres rèpliques biològiques i tècniques.

Aquests resultats poden explicar-se pel tipus de diana a la qual s'uneix aquest compost. La fentolamina és un antagonista α -adrenèrgic reversible i no selectiu- pot blocar tant els receptors α_1 com α_2 . Els receptors α_1 (α_{1a} , α_{1b} i α_{1d}) es troben acoblats a proteïnes $G_{q\alpha}$. La unió de l'adrenalina o la noradrenalina a aquesta classe de receptors estimula l'efector de la proteïna $G_{q\alpha}$, la fosfolipasa C, la qual catalitza la hidròlisi del fosfatidil inositol 4,5-bifosfat (PIP₂) en inositol trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). D'altra banda, els receptors α_2 (α_{2a} , α_{2b} i α_{2c}) s'acoblen a proteïnes $G_{i\alpha}$ l'activació de les quals produeix la inhibició de l'adenilat-ciclasa i, com a conseqüència, el decrement en la concentració de fosfat d'adenosina cíclic (AMPc) (34). La fentolamina modula l'activitat de la PFK a través del bloqueig d'aquests últims receptors descrits (35).

En unir-se als receptors adrenèrgics de tipus α_2 , el compost suprimeix la repressió de l'acció de l'adenilat-ciclasa de manera que els nivells d'AMPc augmenten. Aquest fenomen desencadena la següent cascada de reaccions: l'AMPc s'uneix als llocs reguladors de la proteïna quinasa dependent d'AMPc (PKA) i indueix l'exposició dels seus centres catalítics. Llavors, la PKA activada fosforila el residu serina 461 (Ser-461) del domini regulador de l'enzim 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3). PFKFB3 fosforilat és actiu i mitjança la síntesi de la fructosa-2,6-bifosfat, un activador al·lostèric de la PFK (36). D'aquesta manera es produeix l'increment en l'activitat de la PFK, com mostren els resultats. En recolzament a

aquesta hipòtesi, l'estudi dels mecanismes que acoblen la inhibició de la respiració mitocondrial i l'activació de la glicòlisi revelen que existeix una ràpida fosforilació de la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) que, al seu torn, també activa la PFKFB3. L'AMPK és un complex enzimàtic que actua com un sensor energètic cel·lular i s'activa en incrementar la ràtio AMP/ATP. Aquesta troballa demostra que la inhibició de la respiració produeix una crisi bioenergètica en la que la concentració de 5'AMP format a partir d' AMPc augmenta i estimula la glicòlisi indirectament a través de l'AMPK (37). A més, s'ha demostrat com la senyalització d'AMPK evita la mort cel·lular de neurones dopaminèrgiques en models químics de la PD induïts per la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o el paraquat, un herbicida actualment prohibit en la Unió Europea pels seus efectes neurotòxics. Del mateix mode, el seu paper en la regulació de la bioenergètica mitocondrial podria ser responsable de la protecció contra la toxicitat induïda per les mutacions en *SNCA* (α -sinucleïna), *LRRK2* i *Parkin*, altres gens implicats en formes familiars de Parkinson de desenvolupament primerenc (38).

Efecte de la meclizina

La meclizina és un fàrmac emprat habitualment com agent antihistamínic (és un antagonista tipus H1 de la histamina). La incubació de les cèl·lules amb meclizina 50 μ M durant 24 hores ha provocat l'augment significatiu de l'activitat dels enzims PFK i HK (Figura 5).

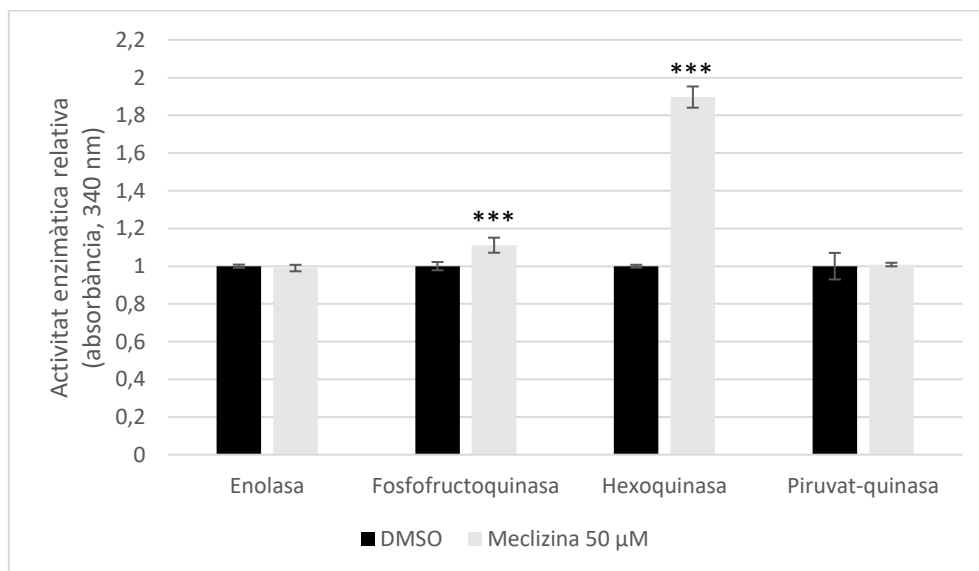


Figura 5. Representació de l'activitat enzimàtica en cèl·lules tractades amb meclizina a 50 μ M en comparació a la de les cèl·lules tractades amb la solució control (DMSO al 0.1%). La meclizina augmenta significativament l'activitat de la PFK i l'HK (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Les barres d'error mostren la s.d. de tres rèpliques biològiques i tècniques.

Recentment s'ha comprovat l'efectivitat de la meclizina com agent neuroprotector en models d'accident cerebrovascular isquèmic, en la malaltia de Huntington i en la PD. Aquest efecte anti-apoptòtic sobre les cèl·lules nervioses sembla ser directament dependent de l'augment en la glicòlisi (39). La meclizina augmenta l'expressió de l'enzim PFKFB3 (39,40) el qual, com s'ha descrit anteriorment, catalitza la síntesi de fructosa-2,6-bifosfat, un activador al·lostèric de la PFK. Els resultats mostrats reflexen aquest increment significatiu en l'activitat de la PFK. A més, donat que la fructosa-2,6-bifosfat se sintetitza a expenses del consum de fructosa-6-fosfat-un dels metabòlits intermediaris de la glicòlisi (Figura 3)-, l'augment en l'activitat de l'HK podria donar-se per assegurar el consum de glucosa i mantindre el flux en la via glicolítica.

Efecte del zaprinast

El zaprinast és un inhibidor de les fosfodiesterases (PDE) específiques del GMPc (PDE5, PDE6, PDE10 i PDE11). També se l'ha descrit com un agonista del receptor acoblat a la proteïna G35 (GPR35) (41). La incubació de les cèl·lules model de la PD amb zaprinast a una concentració de 1 μ M ha provocat l'augment significatiu de l'activitat enzimàtica de l'ENO, l'HK i la PK (Figura 6).

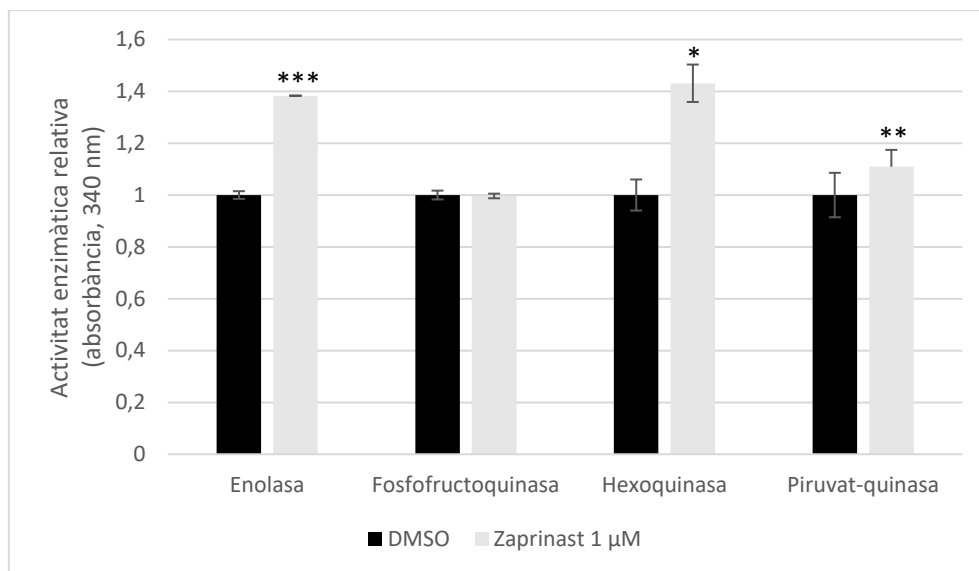


Figura 6. Representació de l'activitat enzimàtica en cèl·lules tractades amb zaprinast a 1 μ M en comparació a la de les cèl·lules tractades amb la solució control (DMSO al 0.1%). El zaprinast augmenta significativament l'activitat de l'ENO, l'HK i la PK (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Les barres d'error mostren la s.d. de tres rèpliques biològiques i tècniques.

L'efecte de zaprinast sobre la glicòlisi podria estar mitjançat pel receptor GPR35. Aquest és considerat un receptor orfe; tot i que s'ha mapejat en els cromosomes humans, s'ha estudiat la seva estructura i la seva expressió en els diferents teixits, poc més se'n sap d'ell (41). Molt recentment s'ha descobert la relació que guarda amb la bioenergètica cel·lular. GPR35 interactua i promou l'activitat de la Na^+/K^+ -ATPasa, una de les principals bombes iòniques encarregades del manteniment actiu del gradient electroquímic de la cèl·lula- de fet, la seva activitat presenta el 30% del consum total d'energia cel·lular. L'augment de l'activitat de la Na^+/K^+ -ATPasa presenta profundes conseqüències per al potencial de membrana cel·lular, l'homeòstasi del calci (Ca^{2+}) i el metabolisme energètic. Pel que fa a aquest últim, s'ha comprovat com tant la inhibició del funcionament de la bomba com de l'expressió del receptor anul·la la capacitat de captar glucosa per part de les cèl·lules (42).

Si el zaprinast actua sobre els receptors GPR35 sobreestimulant-los, és esperable que el major consum de glucosa augmente l'activitat de la ruta glicolítica de manera general, tal com s'observa en els resultats. Fins el moment no s'ha descrit cap mecanisme molecular que relacione directament GFR35 amb l'augment de l'activitat de manera específica de cap de les proteïnes analitzades.

Efecte de l'àcid retinoic

L'àcid retinoic (RA) és un derivat de la vitamina A que es presenta principalment en dues isoformes biològicament actives: all-trans RA i 9-cis RA. La incubació de les cèl·lules SH-SY5Y durant 24 hores amb RA a 20 μM ha provocat l'augment significatiu de l'activitat dels tres enzims clau en la regulació de la taxa glicolítica (l'HK, la PFK i la PK) a més de l'ENO (Figura 7).

L'RA és un potent factor de diferenciació que afecta a un ample ventall de llocs promotors en les cèl·lules neurals i glials en cadascuna de les etapes del desenvolupament nerviós embrionari i postnatal. Es troba implicat en el creixement axonal, l'establiment de noves connexions sinàptiques i la diferenciació de les cèl·lules nervioses (43).

S'ha demostrat que aquest compost presenta un efecte neuroprotector front toxines dopaminèrgiques com la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o l'MPTP tant en models murins com en cèl·lules SH-SY5Y en cultiu. Concretament, l'RA pot augmentar l'expressió de certs factors

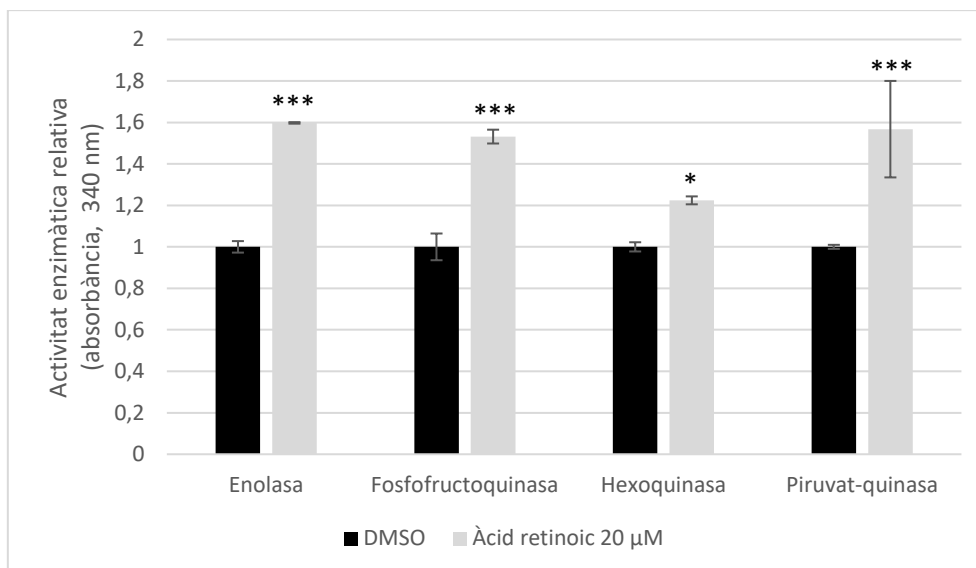


Figura 7. Representació de l'activitat enzimàtica en cèl·lules tractades amb RA a 20 μM en comparació a la de les cèl·lules tractades amb la solució control (DMSO al 0.1%). L'RA augmenta significativament l'activitat de tots els enzims estudiats: ENO, PFK, HK i PK (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). Les barres d'error mostren la s.d. de tres rèpliques biològiques i tècniques.

tròfics com la proteïna morfogènica òssia-7 (BMP7) i impedir la translocació del factor Nur77 cap al citosol on indueix l'apoptosi promovent l'alliberament del citocrom c de la cadena de transport electrònic mitocondrial (43,44). Els nostres resultats mostren com altra possible vessant en la neuroprotecció podria estar relacionada amb l'augment de la taxa glicolítica.

El flux a través d'una ruta bioquímica pot modular-se potenciant l'expressió dels gens codificants dels enzims implicats o mitjançant canvis en l'activitat dels catalitzadors ja presents. Estudis anteriors han mostrat com l'administració continua d'RA en cèl·lules indiferenciades de neuroblastoma SH-SY5Y provoca canvis en els patrons d'expressió gènica detectables a les 24 hores. Els gens que presenten una major expressió corresponen als integrants de la defensa antioxidant cel·lular i la via del factor nuclear kappa B (NF-κB)- factor relacionat en la resposta inflamatòria i immunològica, i la protecció front l'estrès- així com els implicats en el catabolisme de la glucosa (45).

Tenint en compte aquesta informació, es va realitzar una RT-qPCR per comprovar l'efecte de l'RA en l'expressió dels enzims glicolítics i, a més, distingir la contribució relativa a l'activitat enzimàtica de les diferents isoformes existents en humans que s'expressen específicament en la línia cel·lular SH-SY5Y. Aquestes són: *enolasa 1 (ENO1)*, *enolasa 2 (ENO2)*, *hexoquinasa 1 (HK1)*, *fosfofructoquinasa-M (PFKM)*, *fosfofructoquinasa-P (PFKP)* i *piruvat-quinasa (PK)*.

La incubació de les cèl·lules SH-SY5Y durant 24 hores amb RA a 20 μ M ha provocat l'augment significatiu en l'expressió de les isoformes gèniques *HK1*, *PFKM* i *PK* en comparació als cultius no tractats amb compost (Figura 8).

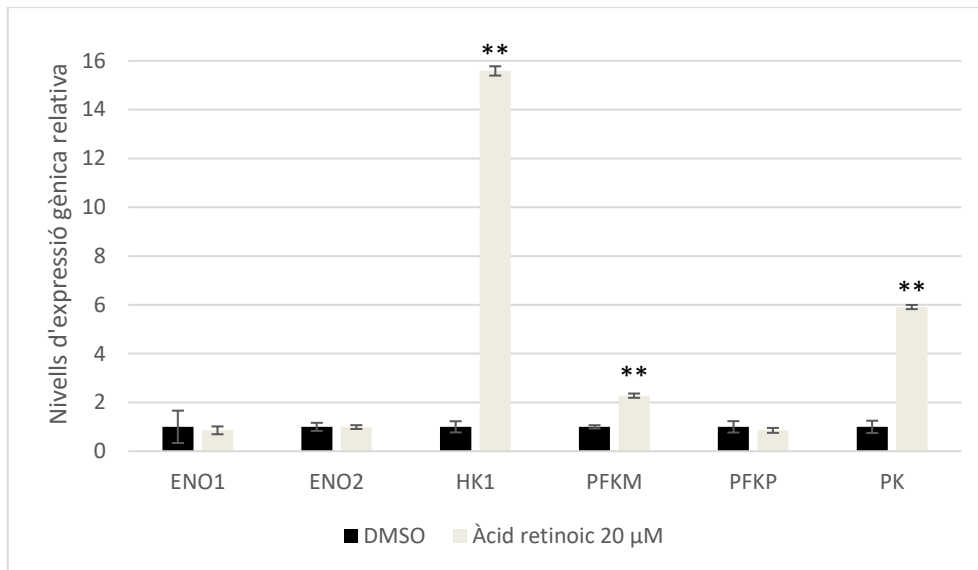


Figura 8. Efecte de l'RA (20 μ M) en l'expressió en mRNA dels gens *ENO1*, *ENO2*, *HK1*, *PFKM*, *PFKP* i *PK* en cèl·lules SH-SY5Y amb el gen *DJ-1* silenciats. L'RA augmenta significativament l'expressió mesurada com nivell de mRNA dels gens *HK1*, *PFKM* i *PK* (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Les barres d'error mostren la s.d. de quatre rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques.

Existeix una correlació positiva de l'activitat de la PK-expressió del gen PK i activitat de la PFK-expressió de la isoforma *PFKM*. Aquestes dades indiquen que l'increment de l'activitat enzimàtica de la PFK i la PK mesurada als assajos enzimàtics podria ser intrínsec a la proteïna o també deure's a l'augment de la seva síntesi. D'altra banda, es pot observar com l'*HK1* es troba fortament sobreexpressada en cultius tractats amb RA tot i que la mesura de l'activitat enzimàtica no mostra un increment equivalent. L'HK és el primer enzim implicat en la ruta de la glicòlisi (Figura 3) i catalitza la conversió de la glucosa en glucosa-6-fosfat. És possible que els resultats siguin deguts a la saturació en l'activitat catalítica per la limitació de substrat en el medi, la glucosa. Per últim, l'augment de l'activitat de l'ENO no es troba relacionat amb una major expressió de caps de les isoformes del gen, pel que, en aquest cas, sí que es pot concloure que l'RA regula directament la funció catalítica de l'ENO.

En general, la promoció de la diferenciació neuronal implica una reordenació complexa dels programes cel·lulars intrínsecs, la re-definició d'interaccions cèl·lula-cèl·lula i un augment en la demanda energètica per la síntesi de productes i el desenvolupament de noves funcions (45).

L'increment de la taxa glicolítica permetria abastir les cèl·lules d'ATP suficient per dur a terme aquests processos. No obstant, fins el moment no s'ha relacionat l'RA amb l'alteració del metabolisme de la glucosa en cèl·lules nervioses completament diferenciades. El disseny d'un model cel·lular més adient permetria validar aquest compost pel tractament de la PD.

Conclusió

Mentre que malalties com el càncer són ja considerades com trastorns metabòlics, poc es coneix encara sobre el rol del metabolisme central del carboni en la neurodegeneració. La reprogramació metabòlica cap a una major dependència de la glicòlisi proporciona a les cèl·lules nervioses en pacients de la PD- no sols els casos amb mutacions en el gen *DJ-1* sinó també en els casos idiopàtics- un mecanisme per compensar o superar les condicions pro-oxidatives provocades per la disfunció mitocondrial. Els composts químics que presenten la capacitat de modular la via glicolítica com els analitzats en aquest treball podrien esdevenir composts d'interès per al tractament de la PD. És interessant destacar que el dimetilfumarat, la fentolamina, la meclizina, el zaprinast i l'àcid retinoic han passat les diferents etapes dels assajos clínics i es troben comercialitzats, per la qual cosa el seu ús en pacients de la PD podria arribar a establir-se en un futur pròxim. Per altra banda, la caracterització dels mecanismes pels quals la glucòlisi es regula a l'alça revelaria futures possibles aproximacions terapèutiques no plantejades fins el moment.

Bibliografia

1. Capriotti T, Terzakis K. Parkinson Disease. Home Healthc now. 2016;34(6):300–7.
2. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. J Neural Transm. 2017;124(8):901–5.
3. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. J Neurochem. 2016;318–24.
4. Pacelli C, Giguère N, Bourque MJ, Lévesque M, Slack RS, Trudeau LÉ. Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. Curr Biol. 2015;25(18):2349–60.
5. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science (80-).

- 1997;276(5321):2045–7.
6. Zeng XS, Geng WS, Jia JJ, Chen L, Zhang PP. Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(109):1–16.
 7. Lunati A, Lesage S, Brice A. The genetic landscape of Parkinson’s disease. *Rev Neurol (Paris).* 2018;174(9):628–43.
 8. Bonifati V. Autosomal Recessive Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011;18(1):S1.
 9. Iguchi-Arigo SM, Taira T, Arigo H, Nagakubo D, Kitaura H, Ikeda M, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;231(2):509–13.
 10. Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, Zinchenko VP, Abramov AY. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson’s disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2019;51(3):175–88.
 11. Wilson MA. The Role of Cysteine Oxidation in DJ-1 Function and Dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 2010;15(1):111–22.
 12. Piston D, Alvarez-Erviti L, Bansal V, Gargano D, Yao Z, Szabadkai G, et al. DJ-1 is a redox sensitive adapter protein for high molecular weight complexes involved in regulation of catecholamine homeostasis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(20):4028–41.
 13. Krebiehl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, Kieper N, Maurer B, Waak J, et al. Reduced basal autophagy and impaired mitochondrial dynamics due to loss of Parkinson’s disease-associated protein DJ-1. *PLoS One.* 2010;5(2).
 14. Anandhan A, Jacome MS, Lei S, Hernandez-Franco P, Pappa A, Panayiotidis MI, et al. Metabolic Disorder Dysfunction in Parkinson’s Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. *Brain Res Bull.* 2017;133:12–30.
 15. Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Jimenez-Blasco D, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP. DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally upregulating pink1. *Biochem J.* 2015;467(2):303–10.
 16. Lavara-Culebras E, Paricio N. Drosophila DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene.* 2007;400(1–2):158–65.
 17. Newington JT, Pitts A, Chien A, Arseneault R, Schubert D, Cumming RC. Amyloid beta resistance in nerve cell lines is mediated by the warburg effect. *PLoS One.* 2011;6(4).
 18. Mazzio E, Soliman KFA. D-(+)-glucose rescue against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity through anaerobic glycolysis in neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2003;962(1–2):48–60.

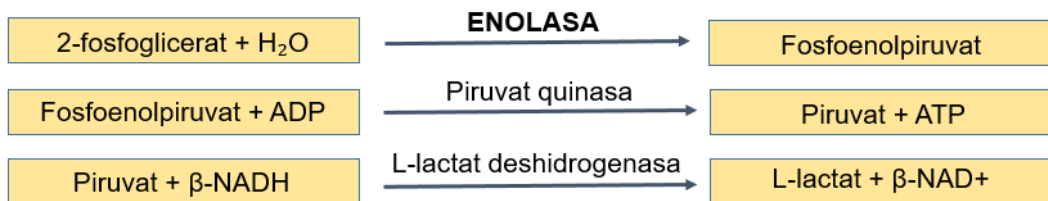
19. Williams ZR, Goodman CB, Soliman KFA. Anaerobic glycolysis protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity in C6 glioma cells. *Neurochem Res.* 2007;32(6):1071–80.
20. Newington JT, Rappon T, Albers S, Wong DY, Rylett RJ, Cumming RC. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid β and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2012;287(44):37245–58.
21. Athauda D, Foltynie T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(1):25–40.
22. Chung KKK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, et al. Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein, synphilin-1: Implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med.* 2001;7(10):1144–50.
23. Carrera I, Cacabelos R. Current Drugs and Potential Future Neuroprotective Compounds for Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(3):295–306.
24. Biedler JL, Schachner M. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* 1978;38(11):3751–7.
25. Sanz FJ, Solana-Manrique C, Muñoz-Soriano V, Calap-Quintana P, Moltó MD, Paricio N. Identification of potential therapeutic compounds for Parkinson's disease using *Drosophila* and human cell models. *Free Radic Biol Med.* 2017;108:683–91.
26. Gao JW, Yamane T, Maita H, Ishikawa S, Iguchi-Arigo SMM, Pu XP, et al. DJ-1-Mediated Protective Effect of Protocatechuic Aldehyde Against Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells. *J Pharmacol Sci.* 2010;115(1):36–44.
27. Muller FL, Colla S, Aquilanti E, Manzo VE, Genovese G, Lee J, et al. Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature.* 2012;488(7411):337–42.
28. Hengartner H, Harris JI. Purification by affinity chromatography, properties and crystallisation of phosphofructokinase from thermophilic micro-organisms. *FEBS Lett.* 1975;55(1):282–5.
29. Eanes WF, Merritt TJS, Flowers JM, Kumagai S, Sezgin E, Zhu CT. Flux control and excess capacity in the enzymes of glycolysis and their relationship to flight metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(51):19413–8.
30. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev.* 2007;87(1):99–163.
31. Ahuja M, Ammal Kaidery N, Yang L, Calingasan N, Smirnova N, Gaisin A, et al.

- Distinct Nrf2 Signaling Mechanisms of Fumaric Acid Esters and Their Role in Neuroprotection against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Experimental Parkinson's-Like Disease. *J Neurosci*. 2016;36(23):6332–51.
32. Huang H, Taraboletti A, Shriver LP. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes. *Redox Biol*. 2015;5:169–75.
 33. Kornberg MD, Bhargava P, Kim PM, Putluri V, Snowman AM, Putluri N, et al. Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science* (80-). 2018;360(6387):449–53.
 34. Civantos-Calzada B, Aleixandre De Artiñano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001;44(3):195–208.
 35. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology* 14E. Basic & Clinical Pharmacology. 2015. 203 p.
 36. Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, et al. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5784–92.
 37. Ng CH, Guan MSH, Koh C, Ouyang X, Yu F, Tan EK, et al. AMP Kinase Activation Mitigates Dopaminergic Dysfunction and Mitochondrial Abnormalities in Drosophila Models of Parkinson's Disease. *J Neurosci*. 2012;32(41):14311–7.
 38. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci*. 2010;35(3):145–9.
 39. Zhuo M, Gorgun MF, Englander EW. Augmentation of glycolytic metabolism by meclizine is indispensable for protection of dorsal root ganglion neurons from hypoxia-induced mitochondrial compromise. *Free Radic Biol Med*. 2016;99:20–31.
 40. Hong CT, Chau KY, Schapira AHV. Meclizine-induced enhanced glycolysis is neuroprotective in Parkinson disease cell models. *Sci Rep*. 2016;6:25344.
 41. Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Lett*. 2006;580(21):5003–8.
 42. Schneditz G, Elias JE, Pagano E, Zaeem Cader M, Saveljeva S, Long K, et al. GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump. *Sci Signal*. 2019;12(562).
 43. Yin LH, Shen H, Diaz-Ruiz O, Bäckman CM, Bae E, Yu SJ, et al. Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci*. 2012;13(120).

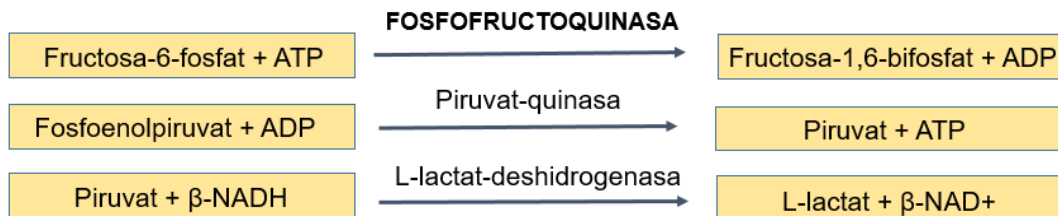
44. Reiner DJ, Yu SJ, Shen H, He Y, Bae E, Wang Y. 9-Cis retinoic acid protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in nigrostriatal dopamine neurons. *Neurotox Res.* 2014;25(3):248–61.
45. de Bittencourt Pasquali MA, de Ramos VM, Albanus RD, Kunzler A, de Souza LHT, Dalmolin RJS, et al. Gene Expression Profile of NF- κ B, Nrf2, Glycolytic, and p53 Pathways During the SH-SY5Y Neuronal Differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Mol Neurobiol.* 2016;53(1):423–35.

Material suplementari

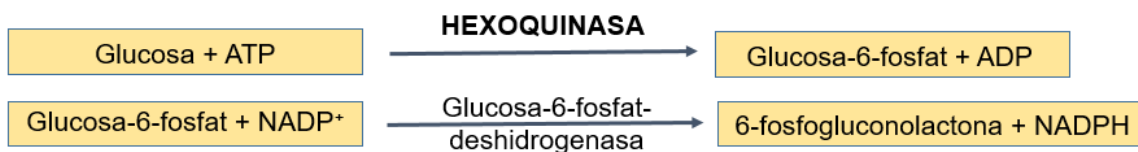
Assajos enzimàtics: disseny assajos enzimàtics acoblats.



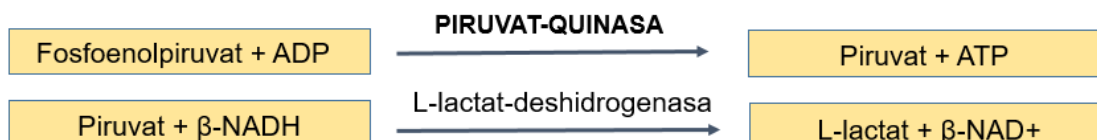
S1. Esquema de les reaccions bioquímiques acoblades per l'assaig enzimàtic de l'enolasa. Els canvis en l'absorbància a 340 nm (disminució progressiva en el temps) són deguts a l'oxidació del β-NADH en β-NAD⁺ donada de manera indirecta per la conversió de 2-fosfoglicerat a fosfoenolpiruvat.



S2. Esquema de les reaccions bioquímiques acoblades per a l'assaig enzimàtic de la fosfofructoquinasa. Els canvis en l'absorbància a 340 nm (disminució progressiva en el temps) són deguts a l'oxidació del β-NADH en β-NAD⁺ donada de manera indirecta per la conversió de fructosa-6-fosfat en fructosa-1,6-bifosfat.



S3. Esquema de les reaccions bioquímiques acoblades per a l'assaig enzimàtic de l'hexoquinasa. Els canvis en l'absorbància a 340 nm (augment progressiu en el temps) són deguts a la reducció de NADP⁺ en NADPH donada de manera indirecta per la conversió de glucosa a glucosa-6-fosfat.



S4. Esquema de les reaccions bioquímiques acoblades per a l'assaig enzimàtic de la piruvat-quinasa. Els canvis en l'absorbància a 340 nm (disminució progressiva) són deguts a l'oxidació del β-NADH en β-NAD⁺ donada de manera indirecta per la conversió de fosfoenolpiruvat en piruvat.

Assajos enzimàtics: composició dels tampons o buffers de reacció.

Taula 1. Composició del tampó de reacció per a l'enzim enolasa. pH 7.4.

Compost	Concentració
HEPES pH 7	20 mM
MgCl₂	10 mM
KCl	100 mM
ADP	1.75 mM
Piruvat-quinasa (PK)	15 U/ml
Lactat-deshidrogenasa (LDH)	15 U/ml

Taula 2. Composició del tampó de reacció per a l'enzim fosfofructoquinasa. pH 8.

Compost	Concentració
Tris pH 9	91.1 mM
MgSO₄	2 mM
KCl	5 mM
ATP	1 mM
Fosfoenolpiruvat (PEP)	728 µM
Piruvat-quinasa (PK)	5 U/ml
Lactat-deshidrogenasa (LDH)	10 U/ml

Taula 3. Composició del tampó de reacció per a l'enzim hexoquinasa. pH 8.

Compost	Concentració
Tris pH 9	20 mM
MgCl₂	2 mM
Glucosa	100 mM
Glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (G6Pdh)	5 U/ml

Taula 4. Composició del tampó de reacció per a l'enzim piruvat-quinasa. pH 7.4.

Compost	Concentració
HEPES pH 7.4	20 mM
MgSO₄	8 mM
KCl	60 mM
Fosfoenolpiruvat (PEP)	4 mM
Lactat-deshidrogenasa (LDH)	10 U/ml

RT-qPCR. Seqüència del primers.

Taula 5. Seqüència dels encebadors emprats en la RT-qPCR.

Encebador	Seqüència nucleotídica
Tubulina-F	5'- GTATCTCTATCCATGTTGGTCAGG-3'
Tubulina-R	5'- AGA CGG CAT CTG GCC ATCG-3'
ENO1-F	5'- ACCCAAAGAGGATCGCCAAG-3'
ENO1-R	5'- AACCAGGTCAGCGATGAAGG-3'
ENO2-F	5'- TGCACAGGCCAGATCAAGAC-3'
ENO2-R	5'- ACAGCACACTGGGATTACGG-3'
PFKM-F	5'- CTGCCCCTCATGGAATGTGT-3'
PFKM-R	5'- CCTCTCAGCTTCAGGGCTTC-3'
PFKP-F	5'- ATCATCGGTGGATTTCGAGGC-3'
PFKP-R	5'- TTGGACACAGTAGCGGGAAC-3'
HK1-F	5'- CATGCTGCTGGAGGTGAAGA-3'
HK1-R	5'- CAGGGCCAAGAAGTCACCAT-3'
PK-F	5'- GGTCCTGGGAGAGAAGGGAA-3'
PK-R	5'- CTAGATCACCACGAGCCACC-3'

