



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FLAVIA RODRIGUES SILVA

Ativação da Proteína Akt1 por Moduladores Alostéricos Positivos do Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 em Cultura Primária de Neurônios Estriatais

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Belo Horizonte/MG, 29 de junho de 2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FLAVIA RODRIGUES SILVA

Ativação da Proteína Akt1 por Moduladores Alostéricos Positivos do Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 em Cultura Primária de Neurônios Estriatais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiola M. Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Helton J. Reis

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Belo Horizonte/MG, 29 de Junho de 2012

COLABORADORES

CNPq (Centro Nacional de Pesquisas)

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)

DB Biotech, Kosice, Eslováquia

Ministério da Educação da República Eslovaca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Emilio e Jussara, que estiveram ao meu lado todos os dias e me apoiaram cegamente em todas as minhas decisões. Obrigada pelo suporte, pelo seu amor, carinho e sua compreensão, que fizeram com que as adversidades não me desviassem do caminho.

*Eu os amo muito.
Devo tudo que sou a vocês!*

AGRADECIMENTOS

O meu primeiro agradecimento se vai para o **Prof. Helton**, por ter me proporcionado a oportunidade de realização do mestrado, pela credibilidade e pela minuciosa co-orientação;

Prof^a. Fabiola, obrigada por ter me orientado tão dedicadamente, pelo constante acompanhamento e pela confiança depositada em mim. Ah! não posso deixar de te agradecer pelas suas aulas de matemática e bioquímica. Foi muito bom poder conviver com você e cultivar as expectativas deste trabalho. Obrigada por ter me feito chorar algumas vezes e compartilhar boas risadas. Agradeço também por me ensinar que nem sempre a conta do leite dá certo e, por todas as oportunidades que me deu, sendo a mais importante ter me tornado Mestre.

Prof^a Luciene, muito obrigada por ter colaborado na execução dos meus experimentos e pela sua prestatividade. Obrigada pelas correções e ensinamentos nos meus seminários. Por me preparar na fase final do meu trabalho.

Aos professores: **Eduardo e Ruth**, pela amizade na graduação e pelo incentivo à carreira acadêmica.

Pedro e Túlio, obrigada por terem disponibilizado tanto tempo para as incessantes eletroforeses de finais de semana e feriados. Foram dias e noites que teriam sido mais difíceis sem o incentivo e as brincadeiras de vocês.

Mariana, doutoranda em bioquímica, obrigada por me auxiliar nos meus primeiros dias de trabalho.

Juliana, você se tornou uma grande companheira de lab. Suas atitudes me estimularam a buscar sempre mais do que já havia alcançado. Obrigada pela companhia até 21h nos blots que nunca davam certo, pelas caronas e pelos filmes durante as eletroforeses tentando me manter acordada. Você tem uma grande participação por ter executado meus resultados no tempo necessário. Sem a sua colaboração, com certeza teria sido mais difícil.

Jéssica: Foi muito gratificante conviver com você. Obrigada por ter colaborado tão eficientemente na execução deste projeto. Obrigada por me ajudar com tantos experimentos. Obrigada pelos bons conselhos, que levarei por toda a minha vida e, principalmente, por não me deixar desanimar diante de tantos contratemplos e me mostrar sempre boas ideias e soluções.

Leidiane, obrigada pelo cuidado com meus animais e por manter tudo na mais perfeita ordem, até demais...

Pipa, seu apoio e sua prestatividade foram muito importantes. Foi um prazer enorme poder trabalhar com você, pois partilhamos das mesmas idéias.

Toniana, obrigada pelas perguntas pertinentes nos meus seminários, que me estimulava a buscar novos métodos e estudar mais. O incentivo de vocês foi muito importante.

Izabella, obrigada por me apoiar e estar sempre presente na última etapa desse projeto.

Preciso fazer um agradecimento importante aos colegas do laboratório de RNA de interferência: Primeiramente ao **prof. João**, pelo respeito e pela prestatividade desde os primeiros dias em que montamos o lab. **Zamira** e **Roenick**, obrigada pelo apoio nas análises estatísticas e por terem sido tão prestativos na resolução das minhas dúvidas. Agradeço também à **Ana Paula**, ao **Erick**, ao **André**, à **Érica**, **Karla**, **Carol** e **Manu** pelo apoio de vocês.

Agradeço à **Secretaria de Neurociências**, pela orientação e atenção durante o meu curso. Em especial à **Vanessa**.

Aos meus **parentes**, que participaram dessa trajetória, cada um a sua maneira de incentivar-me a nunca desistir.

Nutricionistas: **Fernanda Cruz**, **Thalita Oliveira** e **Flávia Sena**, que sempre depositaram confiança no meu trabalho e tiveram participação importante nessa escolha, pois me fizeram entender que nunca devemos estagnar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Philippe, você esteve presente na minha vida muito antes desse projeto se iniciar, se tornou um incentivo por eu ter prosseguido com ele e, hoje, é um dos principais motivos de ter sido finalizado. Obrigada pelo seu incentivo diário, pelo seu amor sincero, pela sua amizade transparente, confiança e principalmente sua inesgotável paciência durante todo esse tempo. O seu apoio e companheirismo, tornaram simples as minhas dificuldades.

Por ser sempre presente na minha vida.

Por ter sido um dos maiores colaboradores..

Por me fazer acreditar que, no final, tudo ia dar certo...

O meu amor por você é incondicional.

Juntos, chegamos até aqui, e juntos, conquistaremos muito mais!

“Somos o que repetidamente fazemos.

A excelência, portanto, não é um feito, mas, um hábito.”

Aristóteles

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1:** Mecanismo de excitotoxicidade celular
- **Figura 2:** Neurotransmissão glutamatérgica
- **Figura 3:** Receptores acoplados à proteína G
- **Figura 4:** Mecanismo de ativação do mGluR5
- **Figura 5:** Ativação da proteína Gαq/11
- **Figura 6:** Isoforma da Akt1
- **Figura 7:** Modelo proposto para a sinalização do mGluR5 e ativação da Akt1
- **Figura 8:** Estrutura química do DHPG
- **Figura 9:** Receptor metabotrópico glutamatérgico
- **Figura 10:** Estrutura química dos moduladores alostéricos positivos
- **Figura 11:** A Barreira Hemato-Encefálica
- **Figura 12:** A multiplicidade de atividades dos moduladores GPCR-alvos
- **Figura 13:** Modelo experimental de camundongo
- **Figura 14:** Teste de sensibilidade de anticorpos anti-Akt1
- **Figura 15:** Estimulação neuronal por DHPG
- **Figura 16:** DHPG promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 17:** Estimulação neuronal por CPPHA
- **Figura 18:** CPPHA não promove elevação de fosforilação da Akt1
- **Figura 19:** Estimulação neuronal por DFB
- **Figura 20:** DFB promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 21:** Estimulação neuronal por VU1545
- **Figura 22:** VU1545 promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 23:** Estimulação neuronal por VU1545 em baixas concentrações

- **Figura 24:** VU1545 em baixas concentrações promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 25:** Estimulação neuronal por CDPPB
- **Figura 26:** CDPPB promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 27:** Estimulação neuronal por CDPPB em baixas concentrações
- **Figura 28:** CDPPB em baixas concentrações promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1
- **Figura 29:** Liberação citosólica de Ca^{2+} por moduladores alostéricos positivos
- **Figura 30:** Representação esquemática do modelo proposto para as alterações do mGluR5 na Doença de Huntington
- **Figura 31:** Ativação da Akt por Homer/mGluR5
- **Figura 32:** Ciclo de fosforilação e desfosforilação

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- [Ca²⁺]: Concentração de cálcio
- μM: Micromolar
- °C: Graus Celsius
- Akt1-F: Akt1 fosforilada
- Akt1-T: Akt1 total
- Akt-v: Oncogene Akt viral
- AMPA: Ácido aminopropiônico
- AMPC: AMP cíclico
- APS: Persulfato de amônio
- BSA: Albumina do soro bovino
- CDPPB: 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida
- CPPHA: N-[5-cloro-2-[(1,3-dioxoisindolin-2-il)metil]fenil]-2-hidroxibenzamida
- DA: Doença de Alzheimer
- DFB: 3,3- Difluorobenzaldazina
- DH: Doença de Huntington
- DHPG: [(S)3,5 Dihidroxifenilglicina]
- DIV: Dias *in vitro*
- DM: 3,3-dimetoxibenzaldazina
- DP: Doença de Parkinson
- EM: Esclerose múltipla
- ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares
- FGF: Fator de crescimento do fibroblasto
- FURA2-AM: Sonda de Ca²⁺ rraciomérica
- G_α: Subunidade alfa da proteína G
- GAP: Proteína ativadora de GTPase
- GEF: Fator de troca de guanosina
- Gli: Glicina
- Gln: Glutamina
- Glu: Glutamato
- GPCR: Proteína G acoplada ao receptor metabotrópico
- GSK3β: Quinase reguladora de glicogênio sintase

HBSS: Solução Salina Tamponada com HEPES
Htt: Proteína Huntingtina
iGluR: receptor glutamatérgico ionotrópico
IP3: Inositol tri-fosfato
KA: Ácido caínico
mA: Miliamper
MAP: Modulador alostérico positivo
mGluR: Receptor metabotrópico glutamatérgico
Mm: Milimolar
MPEP: 2-metil-6(feniletinil) piridina
MAN: Modulador alostérico negativo
NFK β : Fator de necrose tumoral β
NMDA: N-metil d-aspartato
NMDAR: Receptor N-metil d-aspartado
p/v: Parte por volume
PDK1: Fosfatidilinositol quinase dependente 1
PDK2: Fosfatidilinositol quinase dependente 2
PH: *Plekstrin Homology*
PIKE-S: Forma curta do potencializador de PI3K
PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinase
PKA: Proteína quinase A
PKB: Proteína quinase B
PKC: Proteína quinase C
PLA: Fosfolipase A
PLC: Fosfolipase C
PLD: Fosfolipase D
p85: Subunidade regulatória da PI3K
RGS: Reguladores de sinalização da proteína G
RTKs: Receptores tirosina quinase
SDS: Dodecil-sulfato de sódio
Ser: Serina
SNC: Sistema Nervoso Central
TBS: Salina Tamponada com Tris
TEMED: Tetrametiletlenodiamina

Thr: Treonina

v/v: Volume por volume

V: Volt

VU1545: 4-nitro-N-(1-(2-fluorofenil)3-fenil-1H pirazol-5-il) benzamida

SUMÁRIO

1. Introdução	18
1.1 Excitotoxicidade	18
1.2 Glutamato	20
1.3 Proteína Akt1	24
1.3.1 A ativação da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e Akt1	25
1.3.2 Funções da Akt1 na sobrevivência neuronal	26
1.4 Moduladores Alostéricos do mGluR5	27
2. Objetivos	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
3. Material e Métodos	33
3.1 Material	33
3.2 Métodos	34
3.2.1 Modelo experimental de camundongo	35
3.2.2 Cultura primária de neurônios	35
3.2.3 Experimento de ativação da Akt1	36
3.2.4 Separação das amostras em gel SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e Western Blot	36
3.2.5 Experimento de liberação de Ca ²	38
3.2.6 Análise estatística	38
4. Resultados	39
4.1 Teste de sensibilidade de anticorpos anti-Akt1	39
4.2 O efeito de DHPG na ativação da Akt1	39
4.3 O efeito de CPPHA na ativação da Akt1	41
4.4 O efeito de DFB na ativação da Akt1	43
4.5 O efeito de VU1545 na ativação da Akt1	45
4.5.1 O efeito de VU-1545 em baixas concentrações na ativação da Akt1	47
4.6 O efeito de CDPPB na ativação da Akt1	49
4.6.1 O efeito de CDPPB em baixas concentrações na ativação da Akt1	51

4.7 O efeito dos moduladores alostéricos na liberação citosólica de Ca^{2+}	53
5. Discussão	54
5.1 O mGluR5 como alvo terapêutico	54
5.2 O efeito dos moduladores alostéricos do mGluR5 quanto à ativação da Akt1	56
5.2.1 A eficiência de DFB na fosforilação da Akt1	56
5.2.2 A não eficiência de CPPHA na fosforilação da Akt1	56
5.2.3 A eficiência de CDPPB na fosforilação da Akt1	57
5.3 Neuroproteção envolvendo a Akt1	57
5.4 O período de fosforilação da Akt1	59
5.5 O efeito dos moduladores alostéricos na liberação citosólica de Ca^{2+}	60
6. Perspectivas	62
Referências	63
Anexos	67

ABSTRACT

Considering the high incidence of neurodegenerative disorders in several countries, including Brazil, research aiming to develop therapeutic approaches that effectively alter the course of such diseases are highly relevant. Akt1 is a protein kinase involved in neuronal survival processes, having an important role in neurodegenerative diseases. It has been demonstrated that Akt1 can be activated by the metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). However, mGluR5 activation can also promote the release of intracellular Ca^{2+} , exacerbating the process of excitotoxicity, which occurs in various neurodegenerative disorders. Based on these data, we have selected four positive allosteric modulators (PAMs) for mGluR5: CPPHA, DFB, CDPPB, VU1545, and tested whether these PAMs were able to activate Akt1, but without increasing the release of cytosolic Ca^{2+} . Our results demonstrate that stimulation of striatal neurons with DFB, CDPPB, and VU1545 led to increased phosphorylation of Akt1, as compared to control group. Furthermore, these drugs did not cause an increase in intracellular Ca^{2+} release. Importantly, the phosphorylation of Akt1 by MAPs was as robust as that promoted by the mGluR5 agonist, DHPG. On the other hand, CPPHA failed to activate Akt1, but increased Ca^{2+} release. These results demonstrate that DFB, CDPPB, and VU1545 have the potential to protect against neuronal death, as they are able to activate protective pathways (Akt1) without activating processes that could lead to increased neuronal cell death (Ca^{2+}).

Keywords: mGluR5, Akt1, PAMs, Neurodegenerative diseases

RESUMO

Considerando que existe uma alta incidência de doenças neurodegenerativas em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que alterem eficientemente o curso de tais doenças. A Akt1 é uma proteína quinase que está envolvida em processos de sobrevivência neuronal e apresenta função importante em doenças neurodegenerativas. Estudos demonstram que Akt1 pode ser ativada por receptores glutamatérgicos do subtipo 5 (mGluR5), que são metabotrópicos. Porém, essa ativação do mGluR5 pode promover a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, o que poderia exacerbar os processos de excitotoxicidade que ocorrem em várias dessas doenças neurodegenerativas. Baseado nesses dados investigamos se quatro moduladores alostéricos positivos (MAPs) para o mGluR5 poderiam ativar a Akt1, sem porém aumentar a liberação de Ca^{2+} citosólico. São eles o CPPHA, o DFB, o CDPPB e VU1545. Nossos resultados demonstraram que a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária com DFB, CDPPB e VU1545 levou ao aumento da fosforilação da Akt1. Além disso, tais drogas não promoveram aumento da liberação de Ca^{2+} intracelular. É importante notar que a fosforilação da Akt1 pelos MAPs foi tão robusta quanto a promovida pelo agonista do mGluR5, o DHPG. Por outro lado, o CPPHA, além de não promover a ativação da Akt1, promoveu liberação de Ca^{2+} intracelular. Esses resultados sugerem que DFB, CDPPB e VU1545 possuem potencial para evitar a morte neuronal, uma vez que são capazes de ativar vias protetoras (Akt1) sem ativar vias que poderiam levar a um aumento da morte neuronal via liberação de Ca^{2+} intracelular.

UNITERMOS: mGluR5, Akt1, MAPs, Doenças neurodegenerativas

INTRODUÇÃO

Pacientes acometidos por doenças neurodegenerativas têm sua qualidade de vida reduzida. As principais manifestações podem incluir alterações da memória, cognição, fala, personalidade e dos movimentos especializados (Price, 1999). Dentre as principais doenças que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC) podemos destacar: a Epilepsia, a Doença de Alzheimer (DA), a Doença de Parkinson (DP), a Esclerose Múltipla (EM) e a Doença de Huntington (DH) (Ribeiro *et al.*, 2010).

Existe uma alta incidência de doenças neurodegenerativas em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, e o envelhecimento é um fator causal preponderante para o desenvolvimento de tais doenças (Lima, 2006). Uma vez que a população mundial apresenta um número cada vez maior de idosos, a tendência é que o número de pessoas acometidas por doenças neurodegenerativas seja cada vez maior (Choi, 1998; Lo *et al.*, 1998; Dewar *et al.*, 1999; Stys, 2005). Desse modo, pesquisas sobre os mecanismos subjacentes a essas doenças são de extrema importância para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Price, 1999).

1.1 Excitotoxicidade

A degeneração neuronal é considerada como um grupo de eventos destrutivos que ocasionam a morte de células nervosas (Tator e Fehlings, 1991; Yamaura *et al.*, 2002; LIMA, 2006). Em doenças neurodegenerativas do SNC uma lesão pode se alastrar e induzir a morte dos neurônios circunvizinhos, aumentando de forma significativa o déficit funcional (Tator e Fehlings, 1991).

A excitotoxicidade é tida como a habilidade de aminoácidos excitatórios, como por exemplo, o Glutamato (Glu), mediar a morte dos neurônios do SNC. Quando os níveis de glutamato atingem valores elevados, a neurotoxicidade leva à desintegração neuronal mediada pelo influxo excessivo de Ca^{2+} intracelular (Olney, 1990; Tator e Fehlings, 1991). Sabe-se que Cálcio exerce função importante por controlar uma grande variedade de funções celulares fisiológicas, tais como a transcrição e a divisão celular. Entretanto, o influxo excessivo de Ca^{2+} pode levar a processos de morte por excitotoxicidade (Berridge *et al.*, 2003; Clapham, 2007).

Durante o processo de excitotoxicidade (**FIG.1**) pode ocorrer aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , bem como de água, Inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). Níveis elevados de Ca^{2+} citoplasmático desencadeiam vários processos que podem resultar na degradação de proteínas neuronais estruturais (Tator e Fehlings, 1991 *apud* Lima, 2006).

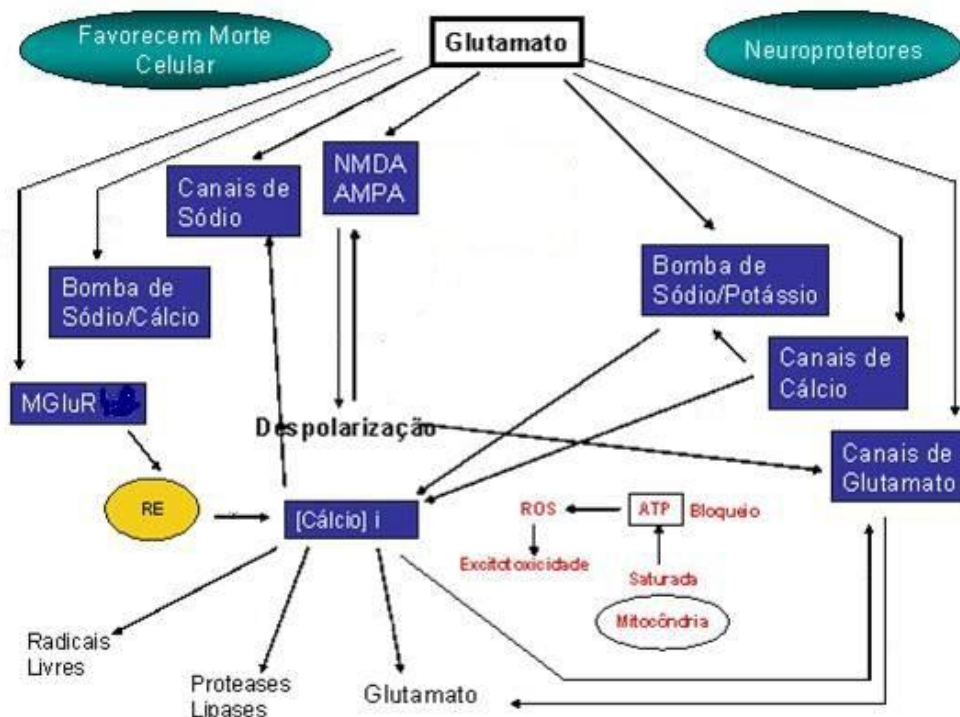


FIGURA 1: Excitotoxicidade celular. O diagrama representa o glutamato interagindo com receptores NMDA e AMPA – essa ativação determina a despolarização celular com entrada de Ca^{2+} . A despolarização causa abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCVD) liberando glutamato. Os receptores metabotrópicos promovem aumento do Ca^{2+} citosólico via retículo endoplasmático. O influxo de Na^+ contribui para o influxo de Ca^{2+} ao estimular a bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A despolarização, por sua vez, inibe ou reverte a captação de glutamato, elevando a sua concentração extracelular. Mecanismos que normalmente operam para neutralizar a elevação do Ca^{2+} intracelular: bomba de efluxo de Ca^{2+} e bomba de Na^+ . Mitocôndrias e retículos endoplasmáticos controlam os níveis de Ca^{2+} . Contudo, a sobrecarga das reservas mitocondriais compromete a síntese de ATP e, conseqüentemente, a energia cessa o funcionamento das bombas e gera altas concentrações de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático. O aumento do Ca^{2+} citosólico favorece os processos de formação dos radicais livres, ativação da lipases e proteases, ativação do NOS (óxido nítrico sintetase), ROS (espécies reativas de oxigênio) e aumento da liberação do ácido araquidônico

(Adaptado de: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=78&materiaver=1).

A ativação de processos que culminem em excitotoxicidade pode ocorrer, por exemplo, devido a um esgotamento energético celular. Quando os estoques de energia se esgotam o potencial de membrana é reduzido e os neurônios sofrem despolarização (Dirnagl *et al.*, 1999). Conseqüentemente, os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem são ativados, com liberação de neurotransmissores, dentre eles os aminoácidos excitatórios, particularmente o glutamato, devido a sua alta concentração citosólica. Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores são bloqueados aumentando o acúmulo de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular (Dirnagl *et al.*, 1999).

A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento do Ca^{2+} intracelular pela abertura direta de canais de cálcio (receptores glutamatérgicos ionotrópicos) e pela ativação dos receptores acoplados à proteína G (receptores glutamatérgicos metabotrópicos). A elevação de Ca^{2+} intracelular inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares e causa danos ao tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, lipases levando a célula a morte (Mitani *et al.*, 1998). Além disso, pode ocorrer produção de radicais livres e esgotamento dos estoques de antioxidantes, com conseqüente aumento do dano por peroxidação lipídica (Iadecola, 1997).

1.2 Glutamato

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais prevalente no SNC de vertebrados (Meldrum, 2000; Olive, 2009). Os neurônios glutamatérgicos possuem papel importante na fisiologia do SNC, onde o glutamato interage com receptores ionotrópicos e metabotrópicos (**FIG. 2**) (Somogyi *et al.*, 1998; Young, 2003; Li e Li, 2004)

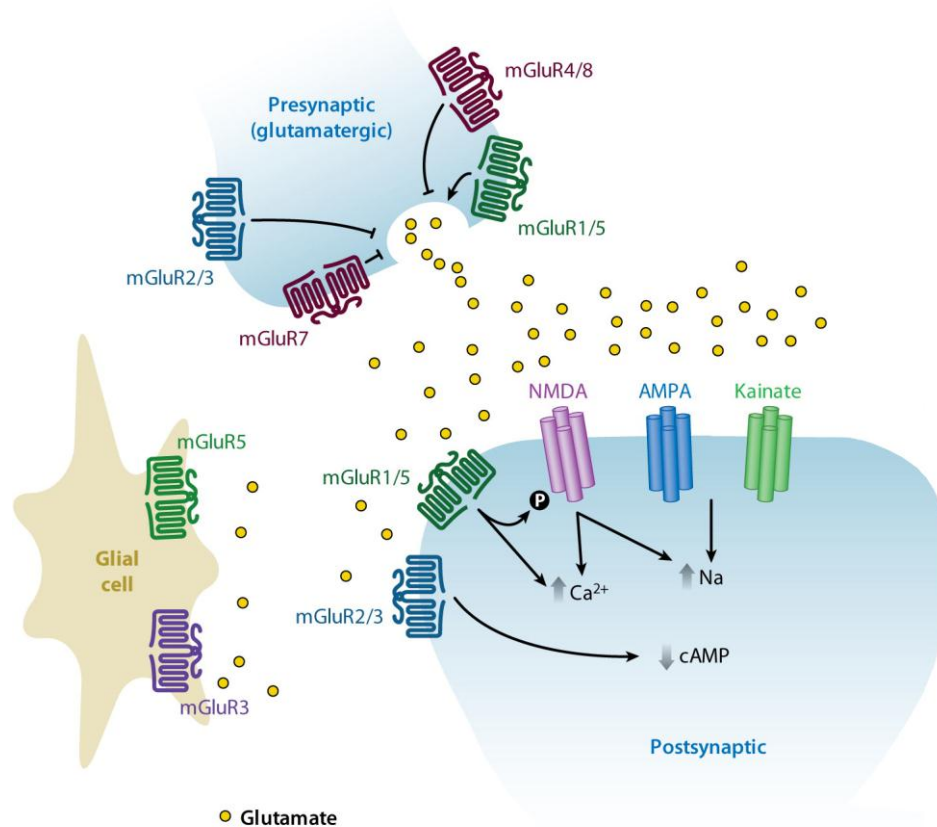


FIGURA 2: A neurotransmissão glutamatérgica. O glutamato é sintetizado e então transportado para vesículas no neurônio pré-sináptico. A partir de um estímulo excitatório, o glutamato é liberado das vesículas na fenda sináptica, por um processo de exocitose, onde interage com receptores ionotrópicos de N-metil D-aspartato (NMDA), Kainato (KA) e AMPA e com receptores metabotrópicos (mGluR1-8). A seta indica que o mGluR5 também pode interagir com NMDAR controlando o influxo de Ca^{2+} . O glutamato também pode ser sintetizado na glia, a partir da glutamina e retornar ao terminal pré-sináptico (Niswender e Conn, 2010).

Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos sensíveis ao ligante e são classificados em três subtipos: o primeiro é o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), que está presente em praticamente todos os neurônios do SNC (Olive, 2009). O receptor NMDA é altamente permeável ao Ca^{2+} . O segundo tipo compreende os receptores de Kainato (KAR), que são expressos em alta densidade no hipocampo, cerebelo e medula. Esses receptores também são permeáveis a Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Olive 2009).. E o terceiro tipo é o receptor Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), que está presente na maioria dos neurônios. A maioria dos AMPAR é permeável a Na^+ e K^+ , mas não a Ca^{2+} (Niswender e Conn, 2010).

Glutamato pode ativar tanto iGluR, quanto receptores do tipo metabotrópico (mGluR), que são receptores acoplados à proteína G (*G protein coupled receptor*, GPCR) (**FIG. 3**) (Nakanishi, 1994; Pin e Duvoisin, 1995; Johnson *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Esses receptores são formados por sete domínios transmembranares e apresentam uma porção amino terminal extracelular e outra carboxi terminal intracelular (MOURA, 2011).

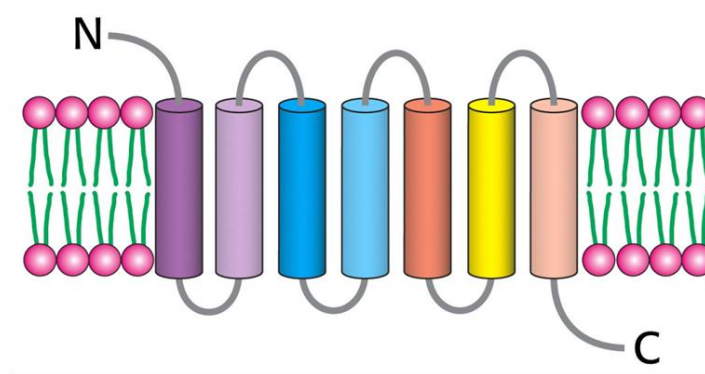


FIGURA 3: Receptor acoplado à proteína G. A figura mostra o receptor com sete domínios transmembrana, o terminal amino no meio extracelular e o terminal carboxila no meio intracelular (FONTE: Strayer, 2007).

Os mGluRs são classificados em três grupos. O grupo I ativa proteínas $G_{\alpha q/11}$, sendo formado por receptores mGluR1 e mGluR5. O grupo II, acoplado à proteínas $G_{i/o}$, é composto pelos receptores mGluR2 e mGluR3, e o Grupo III, acoplado à proteínas $G_{i/o}$, é composto pelos receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Cleva e Olive, 2011).

As proteínas G fazem parte de uma superfamília de proteínas que hoje compreende mais de 50 membros descritos (Moura, 2011). Elas são heterotrâmeros de alto peso molecular e são formadas por três cadeias polipeptídicas distintas, α , β e γ . Tais proteínas podem se ligar a grupos guanílicos, guanosina difosfato (GDP) e guanosina trisfosfato (GTP) (revisado por Moura, 2011). A subunidade α dessas proteínas modula a formação de segundos mensageiros, através da ativação de enzimas efetoras (**FIG. 4**), já o complexo $\beta\gamma$ quando associado à subunidade α , mantém a proteína G em seu estado heterotrimérico inativo (Conn e Pin, 1997).

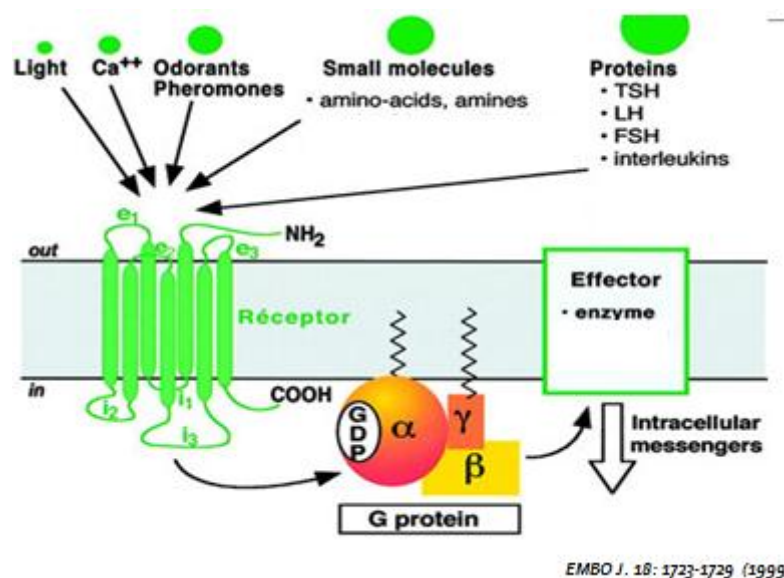


FIGURA 4: Mecanismo de ativação da proteína G. A figura mostra moléculas que interagem com o GPCR. Desse modo, o transdutor, uma proteína G-composta de subunidades $\alpha\beta\gamma$ - é ativada. Isso estimula um amplificador, que produz um segundo mensageiro. Uma cascata de reações enzimáticas altera o comportamento celular e gera fosforilações (www.nobelprize.org.).

A interação do ligante com o GPCR promove mudanças conformacionais na estrutura do receptor, promovendo a ativação da proteína G, sendo que uma característica importante da subunidade α é sua atividade GTPásica intrínseca, que dessa forma hidrolisa o γ -fosfato do GTP e devolve a afinidade da subunidade α pelo dímero $\beta\gamma$, de forma a encerrar o ciclo de transdução e manter o trímero disponível para um novo estímulo (Revisado por Moura, 2011).

A proteína G_q está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C, e participa da formação de segundos mensageiros (**FIG. 5**). Depois de ativada ela degrada o lipídeo fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) presente na membrana em duas outras moléculas: IP₃ e DAG. Estes são os dois segundos mensageiros envolvidos nas respostas fisiológicas, envolvendo o mGluR5, mediadas pela proteína G_q . O IP₃, dada sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e se liga a receptores específicos de IP₃ no retículo endoplasmático, promovendo a liberação do íon Ca^{2+} no citosol e aumentando a concentração desse íon. O DAG permanece associado à membrana plasmática devido à sua estrutura hidrofóbica, tendo a função de ativar a proteína cinase C (PKC), uma enzima que promove a fosforilação de radicais em diversas proteínas intracelulares. A transdução de sinais, mediadas pela proteína G_q , apresenta importantes funções no cérebro, como por exemplo, a regulação da sobrevivência neuronal (Revisado por Moura, 2011).

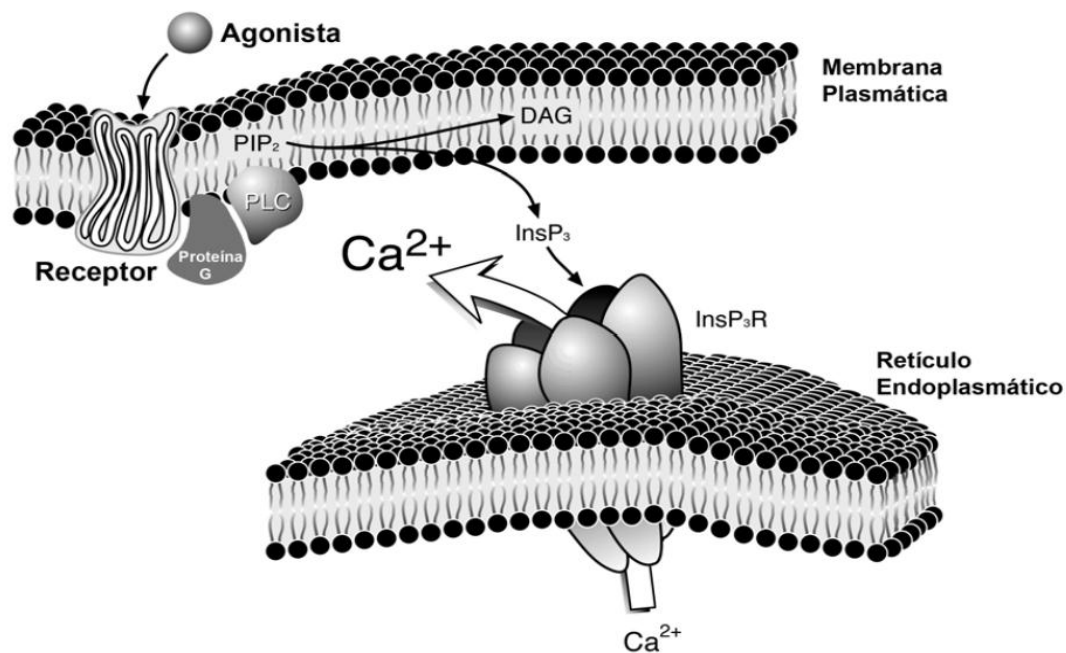


FIGURA 5: Mecanismo de ativação dos mGluRs do grupo I. Os receptores de membrana acoplados à proteína G, quando ativados por ligantes, induzem à hidrólise de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para formar diacilglicerol (DAG) e IP₃, através da ativação da fosfolipase C (PLC). O IP₃ liga-se aos IP₃R, presentes na membrana do retículo endoplasmático, induzindo à liberação de Ca²⁺ para o citosol (Leite, 2001; Gomes, 2006)

1.3 Proteína Akt1

O estudo da família de proteínas Akt iniciou-se quando dois genes, Akt 1 e 2, foram identificados no oncogene viral Akt-v, responsável por leucemia em camundongos (Staal, 1987). Por possuir similaridades com as proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), a Akt é conhecida como proteína quinase B (PKB) e os membros da sua família são denominados PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) (Nicholson e Anderson, 2002; Jiang *et al.*, 2003).

Semelhante a muitas outras proteínas quinases, a Akt1 contém uma estrutura de domínio conservada incluindo um domínio PH (*Pleckstrin Homology*), um domínio quinase central e um domínio carboxi-terminal regulador, que medeia a interação entre moléculas de sinalização (**FIG. 6**) (Jiang *et al.*, 2003; Fresno Vara *et al.*, 2004).



FIGURA6: Estrutura da variante da proteína Akt1. A estrutura proteica da Akt1 consiste de um domínio PH amino-terminal, um domínio quinase e um domínio regulatório carboxi-terminal. Círculos amarelos destacam os resíduos passíveis de fosforilação contidos dentro dos domínios quinase (Thr 308) e regulatório (Ser 473) (Nicholson e Anderson, 2002).

1.3.1 A ativação da fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) e Akt1

A fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) é uma enzima amplamente expressa, cuja atividade primária é a fosforilação de fosfatidilinositol (PI) na posição D3 do grupo inositol. A PI3K consiste de um complexo heterodimérico formado por uma subunidade p110 (catalítica) e uma p85 (reguladora). A PI3K é classificada em grupos I, II e III, sendo que a classe I é subdividida em A e B. A classe IA é ativada por receptores tirosina quinase (RTKs) e possui uma subunidade regulatória p85, essencial para essa interação. Diferentemente da classe IA, a IB é ativada por receptores acoplados à proteína G e todas as classes exercem papéis distintos na sinalização celular e levam à ativação de várias vias de sinalização que regulam o metabolismo, a sobrevivência, o crescimento e a diferenciação celular (Orcy *et al.*, 2008).

A PI3K medeia uma gama de efeitos biológicos através da ação de segundos mensageiros por ela gerados. Os IPs fosforilados interagem com o domínio PH da Akt1, recrutando-a para a membrana (Orcy *et al.*, 2008). A ativação da Akt1 é um processo que envolve várias etapas e proteínas adicionais. A translocação da Akt1 para a membrana plasmática e sua interação com o PIP3 de membrana promove modificação conformacional da Akt1. Isso permite que a quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (PDK1) e a quinase dependente de fosfoinosítídeos-2 (PDK2) fosforilem os resíduos Ser 473 e Thr 308, ativando totalmente a Akt1 (Coffer *et al.*, 1998; Filippa *et al.*, 1999). A formação de PIP3 de membrana pela PI3K também é responsável pelo recrutamento e ativação da PDK, a qual também apresenta domínio PH. Após sua ativação na membrana plasmática, a Akt1 passa a ter localização citoplasmática e nuclear (Filippa *et al.*, 1999).

1.3.2 Akt1 e sobrevivência neuronal

A Akt1 é uma das principais proteínas antiapoptóticas (Coffer *et al.*, 1998; Downward, 1998). A fosforilação e consequente ativação da Akt1 é particularmente importante, porque ela pode proteger contra a morte neuronal (Kandel e Hay, 1999). Na DH, por exemplo, a Akt1 pode fornecer um caminho de proteção através da fosforilação da proteína Htt mutada, o que leva a uma diminuição da formação de agregados e consequentemente da morte neuronal (Warby *et al.*, 2009).

As proteínas Homer são importantes para o acoplamento do mGluR5 aos receptores de IP₃ (Tu *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2005). Além disso, Homer também interage com PIKE-S, promovendo a ativação da PI3K e fosforilação de Akt1 por acoplamento de Homer/mGluR5/PI3K (Ye *et al.*, 2000; Rong *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2004; Guhan e Lu, 2004). Assim, a estimulação do mGluR5 pode promover a ativação da Akt1 e diminuição da morte celular (FIG. 7) (Rong *et al.*, 2003).

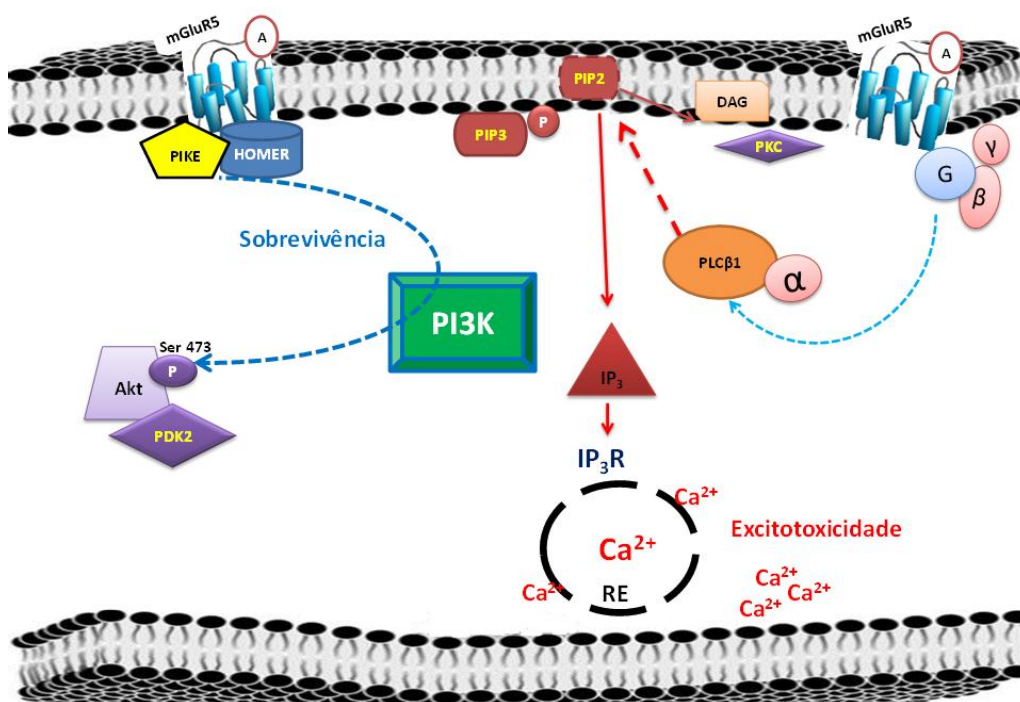


FIGURA 7: Modelo proposto para a sinalização do mGluR5 envolvendo ativação da Akt1. O diagrama mostra a sinalização por duas vias distintas: 1) o mGluR5 é acoplado à proteínas Gq/11, resultando em ativação da PLC, formação de diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP₃), com liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares; 2) a Akt1 também pode ser fosforilada por acoplamento de Homer/PIKE/mGluR5, permitindo a ativação de PI3K por PIKE, que resulta em um aumento de ativação da Akt.

1.4 Moduladores Alostéricos Positivos do mGluR5

O glutamato é o agonista fisiológico para todos os subtipos de receptores de glutamato e, como tal, os primeiros agentes seletivos identificados eram análogos de glutamato (Shipe *et al.*, 2005). O 3,5- dihidroxifenilglicina (DHPG) é um exemplo de agonista do mGluR1 e mGluR5 que se liga ao sítio ortostérico do receptor, sendo que a forma mais utilizada é o S-isômero (S)-3,5-dihidroxifenilglicina [(S)-3,5-DHPG] (**FIG. 8**), que é seletiva para os receptores do grupo I, apresentando afinidades similares para a ligação ao mGluR5 e ao mGluR1 (Wisniewski e Car, 2002).

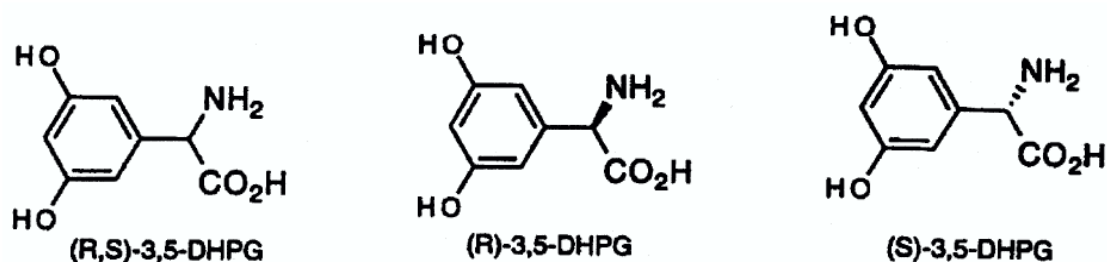


FIGURA: 8 Estrutura química do DHPG. São mostrados três isômeros da estrutura, sendo que a forma mais utilizada é a (S)-3,5-DHPG (Wisniewski e Car, 2002).

Estudos visando a identificação de ligantes sem analogias estruturais com o glutamato permitiram a obtenção de moduladores alostéricos que apresentassem alta afinidade pelo receptor. Esses moduladores podem atuar como negativos (NAM), quando minimizam ou bloqueiam a atividade do agonista, ou positivos (PAM), quando potencializam essa ação (Gasparini, 2007).

A literatura sugere que mais de 90% dos GPCRs são expressos no cérebro, controlando funções neuronais e endócrinas (Cleva, 2011). Considerando que vários desses GPCRs estão envolvidos em processos de morte celular, a exploração da farmacologia desses receptores para o desenvolvimento de tratamentos para distúrbios neurodegenerativos tornou-se um objetivo importante (Martin *et al.*, 2008).

Os MAPs do mGluR5 (**FIG. 9**) foram originalmente desenvolvidos com a intenção de aumentar a função do receptor de NMDA, apresentando potencial terapêutico promissor uma vez que diversos estudos sugerem que eles poderiam ter efeitos fisiologicamente significativos por potencializar as ações do glutamato (Chen Y, 2008; Conn *et al.*, 2009; Cleva e Olive, 2011). Os MAPs atuam no receptor através do

seu sítio de ligação alostérico, que é localizado no domínio transmembrana e apresentam inúmeras vantagens sobre os agonistas com ação direta como potenciais agentes terapêuticos (**FIG. 10**).

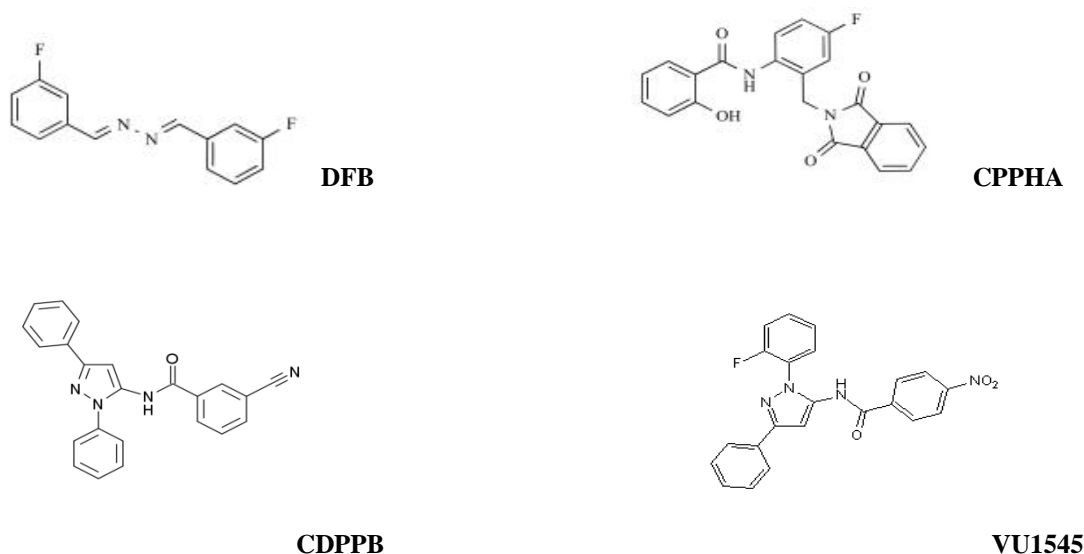


FIGURA 9: Estrutura química dos moduladores alostéricos positivos para o mGluR5. São representados os seguintes moduladores: DFB, CPPHA, CDPPB e VU1545 (Gasparini e Spooren, 2007; Chen et al, 2008).

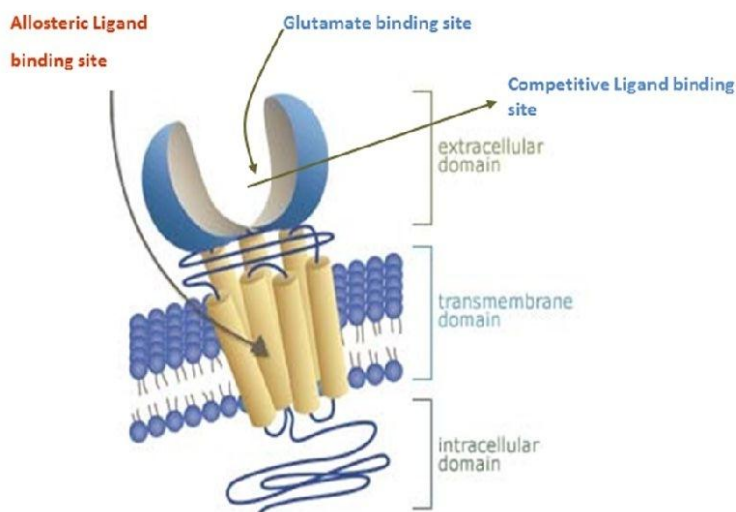


FIGURA 10: Receptor metabotrópico glutamatérgico. É ilustrado um receptor metabotrópico de glutamato apresentando seus respectivos sítios de ligação e três domínios distintos: um domínio amino-terminal, localizado extracelularmente, que interage com o ligante; um domínio transmembrana, que é regulatório e um domínio carboxi-terminal, que é responsável pela transdução de sinais, sendo intracelular. O sítio alostérico de ligação ao receptor é indicado na figura (Adaptado de: www.npsp.com/img/img_mGluR_diag.jpg).

A natureza pleiotrópica desses moduladores oferece vantagens potenciais sobre os agonistas ortostéricos (Wang *et al.*, 2009). Eles são vantajosos em relação a agonistas do mGluR5, como por exemplo o DHPG, pois oferecem discriminações entre os subtipos de mGluR. O sítio de ligação ao glutamato é muito similar entre os vários receptores de glutamato, devido ao alto grau de homologia de sequência (Cleva, 2011). Assim, agonistas ortostéricos não são seletivos para um tipo único receptor. Além disso, moduladores alostéricos, por apresentarem estrutura hidrofóbica, atravessam mais facilmente a barreira hemato-encefálica (**FIG. 11**) (Coffer *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2009).

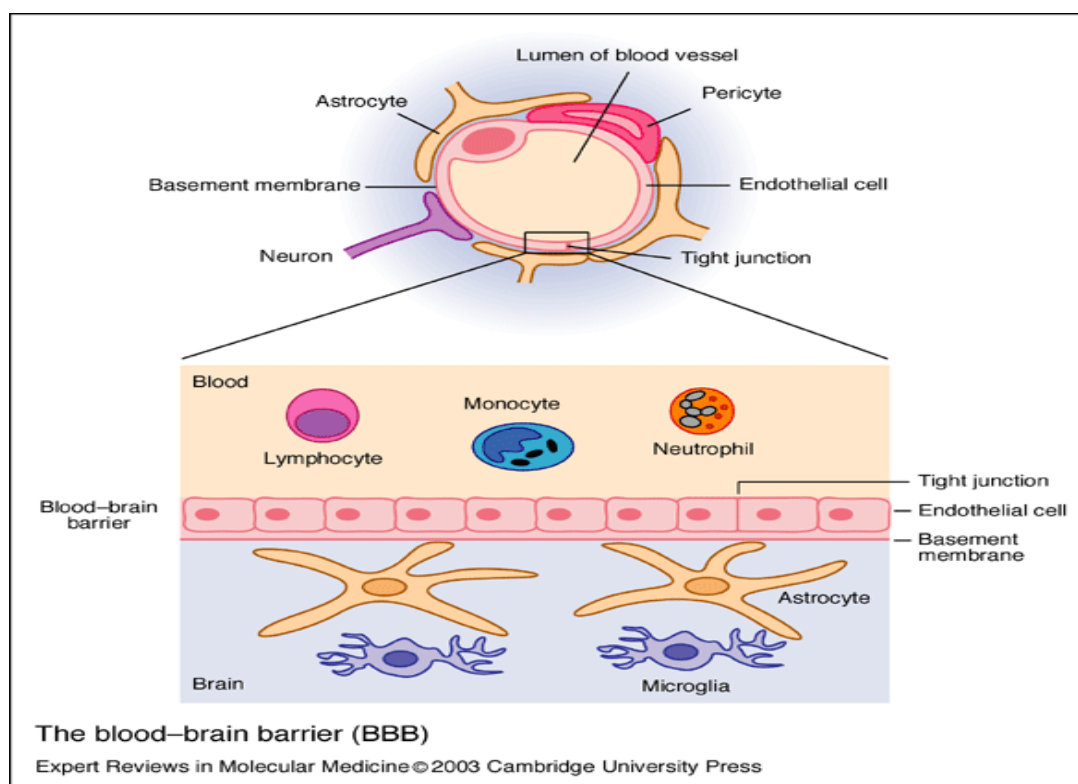


FIGURA 11: Representação ilustrativa da barreira hemato-encefálica. A figura destaca a presença da barreira hematoencefálica em quase todo o cérebro, evitando que substâncias ou agentes tóxicos lesionem o complexo neuronal. Histologicamente, a barreira hematoencefálica é composta por capilares revestidos por células endoteliais que estão fortemente unidas por “tight junctions” ou junções estreitas, por onde apenas moléculas muito pequenas ou seletas serão capazes de chegar aos neurônios (www.sistemanervoso.com).

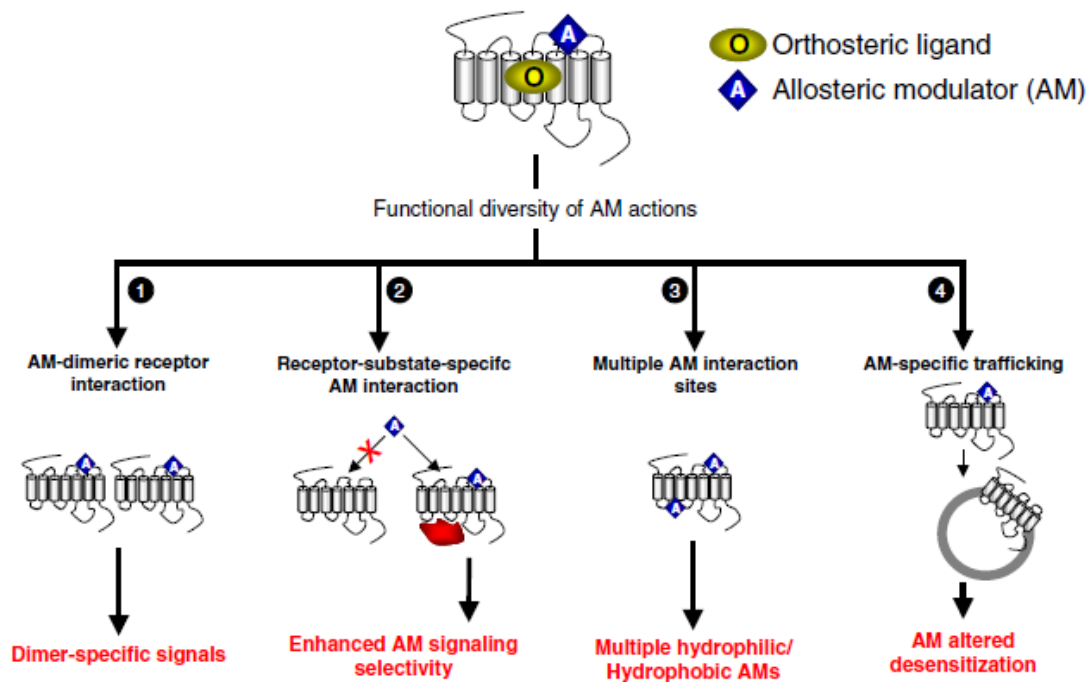


FIGURA 12: Multiplicidade de atividades dos moduladores alostéricos GPCR-alvo. A figura representa os mecanismos funcionais da pleiotropia de MAPs. Em comparação com os ligantes ortostéricos convencionais, os MAPs podem ser mais sensíveis em promoverem alterações na função dos GPCR. Os MAPs podem facilitar a dimerização do receptor (1) ou a sua interação com as proteínas formadoras de complexos sinalizadores intracelulares (2). Esta sensibilidade pode influenciar os efeitos de condicionamento de sinal do MAP. Os MAPs podem apresentar múltiplos sítios de ligação funcionais presentes em regiões extracelulares ou intracelulares (3), o que confere maior especificidade. Os compostos possuem uma capacidade de interação com a membrana plasmática (4). Os MAPs, além de modificar os processos de sinalização induzidas por um ligante ortostérico, podem também controlar a direção dos mecanismos de dessensibilização (Wang *et al.*, 2009).

O primeiro MAP para o mGluR5 a ser caracterizado foi o 3,3'-difluorobenzaldazina (DFB) (O'Brien, Lemaire *et al.* 2004). O DFB atua induzindo aumento significativo na ação do glutamato. Posteriormente caracterizou-se o N-[5-cloro-2-[-(1,3-dioxoisindolin-2-il)metil] fenil]-2-hidroxibenzamida (CPPHA). Ambos os compostos, CPPHA e DFB, apresentam-se como moduladores alostéricos de ativação mediada pelo receptor, sem reatividade cruzada nos outros subtipos de mGluR, nem em outros receptores do SNC (O'Brien *et al.*, 2004; Kinney *et al.*, 2005; Gasparini e Spooren, 2007). Em seguida desenvolveu-se o 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida (CDPPB) (Gasparini e Spooren, 2007).

Dados recentes demonstram que os moduladores alostéricos do mGluR5 podem privilegiar a ativação de determinadas vias de sinalização em detrimento a outras (Chen Y, 2008). Tendo-se em vista que altas concentrações de Ca^{2+} podem aumentar e a ativação da Akt e ERK 1/2 pode diminuir a morte neuronal, a seleção de um modulador alostérico do mGluR5 que seja capaz de promover uma ativação máxima de vias de sinalização protetoras com níveis mínimos de liberação de Ca^{2+} poderia ser uma opção farmacológica para prevenir a morte neuronal (Ribeiro *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o papel de moduladores alostéricos positivos do mGluR5 na promoção de ativação da Akt1 e sua relação com a concentração de Ca^{2+} citosólico em cultura primária de neurônios estriatais.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar anticorpos específicos para identificação das proteínas Akt1 total e Akt1 fosforilada;
- Estimular os neurônios em cultura primária com os moduladores alostéricos positivos do mGluR5: CPPHA, DFB, VU-1545 e CDPPB;
- Avaliar a fosforilação da Akt1 por moduladores alostéricos do mGluR5,
- Avaliar a liberação intracelular de Ca^{2+} em neurônios tratados com moduladores alostéricos do mGluR5.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich)

Ácido acético (Sigma)

Acrilamida (Sigma Aldrich)

Bis-acrilamida (Ludwig Biotech)

Anticorpo primário de coelho anti Akt1-F X20-A (DB Biotech)

Anticorpo primário de coelho anti Akt1-T 9972 (Cell Signalling)

Anticorpo primário de coelho anti Akt1-T C20-A (DB Biotech)

Anticorpo primário de coelho anti Akt1-T E28-L (DB Biotech)

Anticorpo primário de coelho anti Akt1-T H20-1 (DB Biotech)

Anticorpo secundário de coelho (Bio Rad Laboratories)

Azida de sódio (Sigma Aldrich)

Azul de bromofenol (Sigma Aldrich)

B27 (Invitrogen)

Bisacrilamida Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

CaCl₂ (Sigma Aldrich)

CDPPB (Tocris Bioscience)

Corante Bradford (BioRad Laboratories)

CPPHA (Tocris Bioscience)

DFB (Tocris Bioscience)

DHPG (Tocris Bioscience)

EGTA (Sigma Aldrich)

Eppendorff 1mL (Eppendorff)

Estreptomicina (Invitrogen)

FURA 2-AM ((Molecular Probes/EUA))

Glicerol (Sigma Adrich)

Glucose (Sigma Aldrich)

Glutamax (Invitrogen)

HEPES (Sigma Aldrich)

Inibidor de protease (Sigma Aldrich)
KCl (Sigma Aldrich)
KH₂PO₄ (Sigma Aldrich)
Lamínula 12mm (Pró cito Laboratórios)
Leite em pó desnatado Molico (Nestlé)
Membrana de nitrocelulose (Bio Rad Laboratories)
Metanol (Sigma Aldrich)
MgSO₄ (Sigma Aldrich)
N₂ (Invitrogen)
NaCl (Sigma Aldrich)
NaHCO₃ (Sigma Aldrich)
Penicilina (Invitrogen)
Persulfato de amônio (Sigma)
Pipeta Pasteur
Placa 12 *wells* Nunc
Placa 96 *wells* Nunc
Poli-L-ornitina (Invitrogrn)
Ponceau (Sigma)
Ponteiras 10 µL (Eppendorff)
Ponteiras 1000 µL (Eppendorff)
Ponteiras 200 µL (Eppendorff)
SDS (HEXAPUR/ Sigma)
TRIS (Sigma Aldrich)
TEMED (Sigma Aldrich)
Tris (Sigma Aldrich)
Triton X100 (Sigma Aldrich)
VU1545 (Tocris Bioscience)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Modelo de camundongo

Camundongos selvagens da linhagem C57 (**FIG.13**) foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em instalação própria para animais e mantidos a 23° C em um ciclo de luz 12h claro/escuro, com ração e água fornecidos *ad libitum*, em conformidade com as normas da Universidade e segundo protocolo aprovado pelo CETEA no parecer nº 3/2011 (**Anexo 1**). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a região utilizada foi a do corpo estriado.

Foram utilizados camundongos adultos de ambos os sexos para os testes de anticorpos. Para a realização dos experimentos com moduladores alostéricos do mGluR5, foram utilizados neurônios de embriões E15 desses camundongos.



FIGURA 13: Modelo experimental de camundongo. A ilustração representa a região correspondente ao estriado (Cp-caudado e putâme, Cc-corpo caloso, Cx-córtex) (www.biot.fm.usp.br)

3.2.2 Cultura primária de neurônios

Culturas neuronais foram preparadas a partir da região do corpo estriado do cérebro de embriões no décimo quinto dia de gestação (E15). Após a dissecação do tecido estriatal, o mesmo foi submetido à digestão com tripsina, seguido por dissociação celular mecânica com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur. As células foram então plaqueadas em placas de 12 poços tratadas com poli-L-ornitina em meio neurobasal suplementado com N2 e B27, 2 mM de Glutamax e 50 µg/ml da mistura penicilina-

estreptomicina. As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada e cultivadas durante 10 a 12 dias *in vitro*, com troca de meio a cada 4 dias.

3.2.3 Experimento de ativação da Akt1

As culturas primárias de embriões E15 foram incubadas em HBSS (KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 5 mM, HEPES 20 mM, Glucose 11 mM, NaCl 116.35 mM, KCl 4.83 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM), durante 20 min a 37°C. As culturas foram então estimuladas com DHPG na concentração de 10 µM por 0, 2 ou 5 min; CPPHA nas concentrações de 10 µM ou 100 µM, DFB nas concentrações de 10 µM ou 100 µM, VU1545 nas concentrações de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ou 100 µM e CDPPB nas concentrações de 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ou 100 µM. Todos pelos tempos de 5 ou 10 min a 37 °C.

Os neurônios foram lisados em tampão RIPA contendo inibidor de protease. A concentração protéica foi quantificada e 100 µg de proteína celular total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE), seguido de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. Em todos os experimentos utilizamos como grupo controle os neurônios não tratados com as drogas (NT) e um controle positivo com neurônios tratados com DHPG na concentração de 10 µM.

3.2.4 Separação das amostras em gel SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e *Western Blot*

Para a quantificação da concentração de proteínas foi utilizado o método descrito por (Bradford, 1976). Foi realizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida de acordo com Laemmli (LAEMMLI e cols., 1970). O gel de concentração utilizado foi: 4% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p; Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,005% (v/v). O gel de separação consistiu de 7,5% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 1,5 M, pH 8,7; SDS 0,15% (p/v); Persulfato de amônia 0,1% e TEMED 0,005% (v/v).

As amostras foram preparadas com tampão de amostra (composto de SDS 0,2% (p/v); glicerol 0,2% (v/v); 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v); azul de bromofenol 0,0001% (p/v), Tris-HCl 12,5 mM, pH 6,8) e separadas no gel SDS-PAGE a 200V em tampão de corrida (Tris-HCl pH 8,7, NaCl e SDS 0,1% (p/v) pH 8,3).

Ao término da eletroforese prosseguimos à transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Para tal, foi utilizado tampão de transferência (Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v); 0,013 mM SDS) e um sanduíche composto de papéis filtro, esponja e a membrana de nitrocelulose. Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (Ponceau S 1% (p/v) e ácido acético 10% (v/v)) em agitação constante para verificação da presença de bandas proteicas.

O experimento de *Western blot* foi realizado como descrito por (Ribeiro *et al.*, 2010). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em tampão de lavagem (150 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, e 0,075% de Triton™ X100 0,075%) durante 1 hora e, em seguida, incubadas com anticorpo primário anti-Akt1F 1:1000, em tampão de lavagem contendo 3% leite desnatado por 2 horas. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 5 min com tampão de lavagem (TBS triton 0,075%) .

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem. A detecção dos *imunoblots* foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o *Kit ECL plus* por 5 minutos. Após a sensibilização do filme de raio X, este foi submetido a solução reveladora e em seguida a solução fixadora para filmes raio X.

As membranas foram submetidas ao procedimento de *stripping* em tampão de *stripping* (TRIS pH 6,8 65 mM, SDS 2% e 2-mercaptoetanol 100 mM, adicionado fresco) e foram novamente bloqueadas. Em seguida, incubadas com anticorpo primário anti-Akt1T 1:1000. Em seguida, foram lavadas e colocadas em anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase anti-IgG diluído 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem e submetidas ao ECL e seguido de sensibilização do filme de raio X como descrito anteriormente.

3.2.5 Experimento de liberação de Ca^{2+} intracelular

Neurônios em cultura primária obtidos a partir de embriões E15 de camundongos C57 foram plaqueados em lamínulas de 12 mm tratadas com poli-L-orнитina por 1 h na concentração de 7,5%. Os neurônios foram marcados com fura-2 AM durante 20 min a 37°C. As lamínulas foram lavadas em meio Krebs (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM glicose, 25 mM HEPES, CaCl_2 1 mM pH 7.4) e montadas em uma cubeta, como descrito por (Marco A. ROMANO-SILVA, 1993). Os neurônios foram estimulados com as drogas: CPPHA, DFB, CDPPB, VU-1545 ou DHPG e a liberação de Ca^{2+} promovida por cada droga foi quantificada por fluorescência.

A liberação máxima de Ca^{2+} foi determinada através da despolarização dos neurônios com KCl 30 mM. Os resultados da liberação de Ca^{2+} promovidos por cada droga foram transformados em porcentagem, tomando-se a liberação de Ca^{2+} promovida por KCl como 100%.

3.2.6 Análise estatística

Bandas não saturadas da Akt1 foram quantificadas por sistema de densitometria óptica utilizando o *Image J* Software (National Institute of Mental Health). Os valores obtidos para Akt1-fosforilada foram corrigidos pelos valores da Akt total e a média e o erro padrão foram calculados para o número de experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras. O programa Graph Pad PRISM (versão 5 Graph Pad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, que foi determinada pelo método ANOVA de uma via e os mesmos foram considerados estatisticamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de sensibilidade de anticorpos anti-Akt1

De posse de anticorpos anti-Akt1 de várias empresas e com a finalidade de selecionar o que melhor atenderia nossas condições experimentais realizamos testes de imunoblots para Akt1 total (Akt1-T) e para Akt1 fosforilada (Akt1-F). Foram selecionados e avaliados quatro anticorpos anti-Akt1T, provenientes de dois fabricantes: 9972, H20-1, E28-L e C20-A. As proteínas totais foram quantificadas e 100 µg de proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE.

A (**FIG.14**) indica que o anticorpo 9972 imuno-detectou a Akt1-T. Porém, o anticorpo C20-A foi mais sensível para detectar a Akt1-T. Diferentemente, os anticorpos E28-1 e H20-1 não foram capazes de imuno-detectar a Akt1-T (**Fig. 14**).

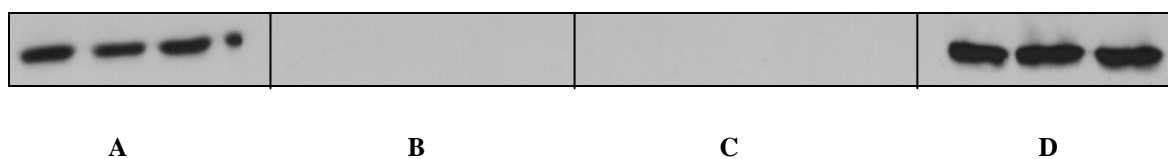


FIGURA 14: Teste de sensibilidade de anticorpos anti-Akt1. Imunoblot representativo da expressão da Akt1 em neurônios estriatais de camundongos C57 adultos, utilizando quatro anticorpos distintos anti-Akt1. Em **A**, anticorpo anti-Akt1 9972 1:1000, demonstrou boa sensibilidade na imunodeteccção da Akt1; em **B**, anticorpo E28-1 1:1000, não foi sensível no reconhecimento da proteína; em **C**, o anticorpo H20-1 1:1000 não imuno-detectou a Akt1 e em **D**, o anticorpo C20-A 1:1000, apresentou-se com alta sensibilidade na imuno-deteccção da Akt1. n=3

4.2 Efeito do DHPG na ativação da Akt1

Uma vez determinada a escolha do anticorpo que seria utilizado para o reconhecimento da Akt1 total, realizamos novos testes para avaliar o anticorpo anti-Akt1 fosforilada. Para isso, utilizamos neurônios em cultura primária e estimulamos as células com DHPG na concentração final de 10 µM, por tempos distintos de 2, 5 ou 10 min (**FIG. 15**).

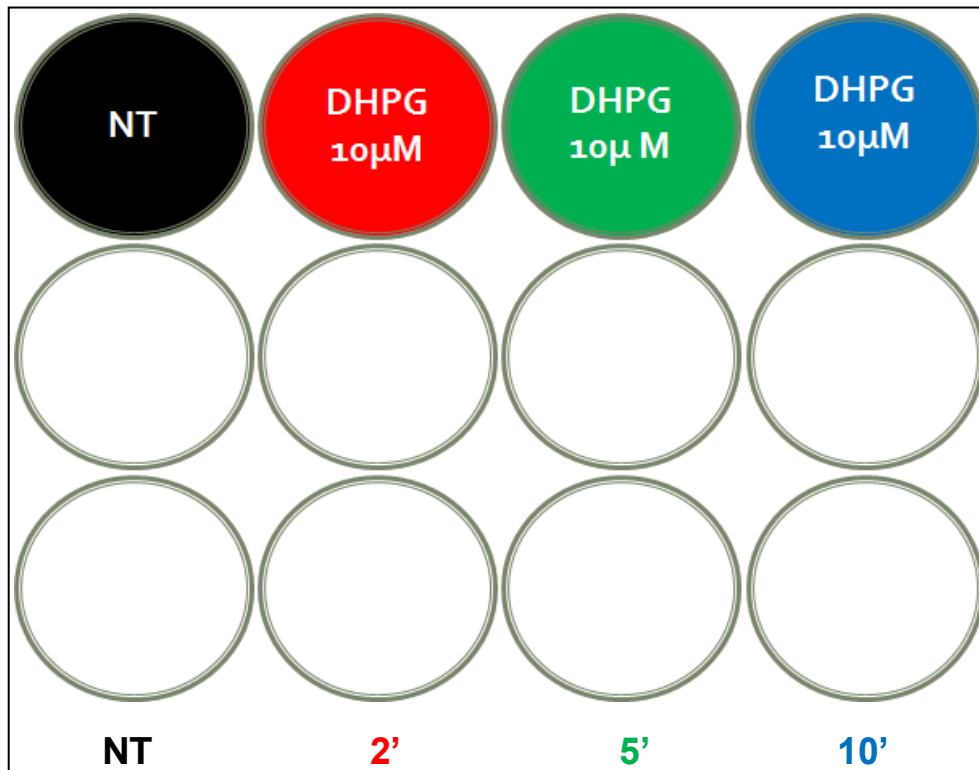


FIGURA 15: Estimulação neuronal pelo agonista DHPG. A figura ilustra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária, utilizando o agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μ M, pelos tempos de 2, 5 e 10 min. O NT representa o grupo controle não tratado com a droga.

Ribeiro *et al.* (2010) utilizando DHPG na concentração de 10 μ M já demonstraram que essa concentração promove fosforilação de Akt1. Nossos resultados indicam maior fosforilação de Akt1 nos tempos de 5 e 10 min de tratamento com DHPG (**FIG. 16**).

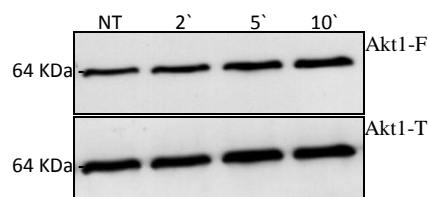


FIGURA 16: DHPG promove elevação nos níveis de fosforilação da Akt1. É mostrado um resultado de imunoblot representativo para a expressão da Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de cultura primária de neurônios estriatais de embriões E15, de camundongos C57, estimulados com 10 μ M de DHPG por tempos de 2, 5 ou 10 min e comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 μ g de lisado celular para cada amostra. n=6

4.3 Efeito de CPPHA na ativação da Akt1

Uma vez selecionados os anticorpos a serem utilizados para o reconhecimento das proteínas Akt1-T e Akt1-F (**FIG 14**) e determinado o tempo de ativação da Akt1 por DHPG (**FIG. 16**), prosseguimos com os experimentos para avaliação da ativação da Akt1 por moduladores alostéricos positivos de mGluR5.

A literatura indica que a ativação do mGluR5 por CPPHA e DFB potencializa o efeito do DHPG (Zhang *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2004). Considerando a ausência de estudos sobre a ação desses MAPs do mGluR5 quando administrados isoladamente sobre a ativação da via da Akt1, decidimos testar a capacidade desses moduladores alostéricos em ativar a Akt1. O primeiro modulador alostérico testado foi o CPPHA. Para tanto, incubamos neurônios em cultura primária com CPPHA em concentrações finais de 10 μ M e 100 μ M pelos tempos de 5 ou 10 min (**FIG. 17**).

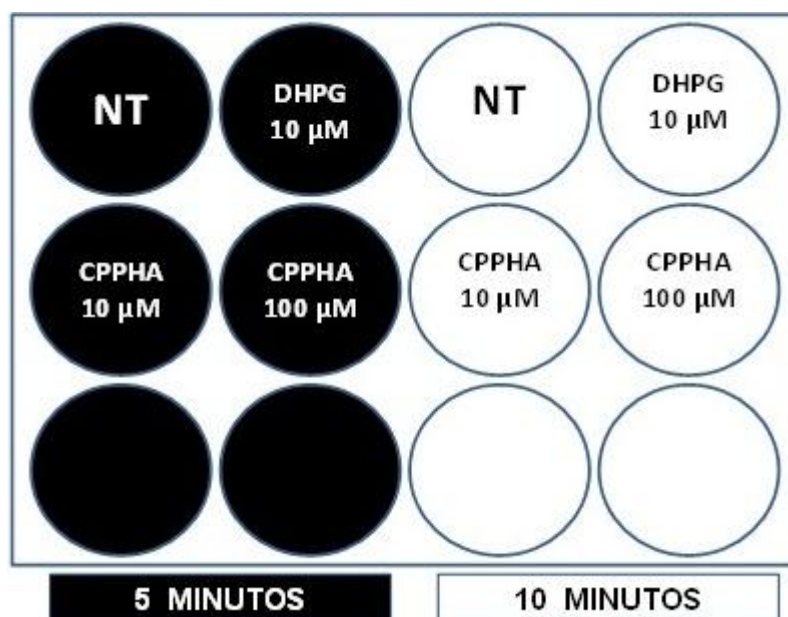


FIGURA 17: Estimulação neuronal pelo modulador alostérico CPPHA. A representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, CPPHA, em concentrações de 10 μ M e 100 μ M, e pelo o agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μ M, pelos tempos de 5 e 10 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

Nossos dados demonstram que CPPHA, na ausência de agonista, não promoveu a ativação da Akt1 em nenhum dos tempos avaliados, quando comparado ao grupo controle não tratado (NT) (**FIG. 18**).

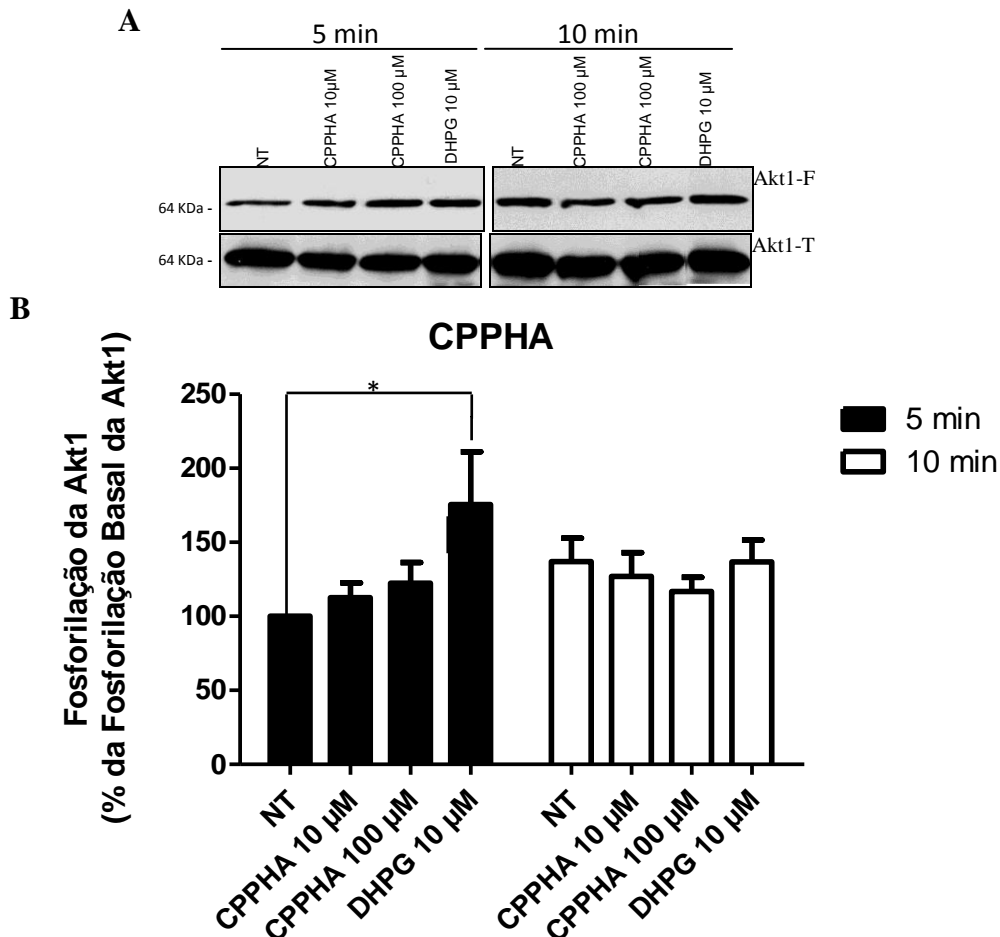


FIGURA 18: CPPHA não promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1 . Em **A**, é mostrado um imunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurónios estriatais de embriões E15 de camundongos C57. Os neurónios foram estimulados com CPPHA nas concentrações de 10 μ M e 100 μ M ou DHPG na concentração 10 μ M pelos tempos de 5 e 10 min e comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 μ g de lisado celular para cada amostra. Em **B**, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão Akt1-F, normalizada pela Akt1-T. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como percentagem da fosforilação basal da Akt1 (NT).

* indica diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratados (NT) ($p < 0,05$).

4.4 Efeito de DFB na ativação da Akt1

O segundo modulador testado foi o DFB. Neurônios estriatais em cultura primária foram estimulados com DFB nas concentrações de 10 μM ou 100 μM pelos tempos de 5 ou 10 min (**FIG. 19**).

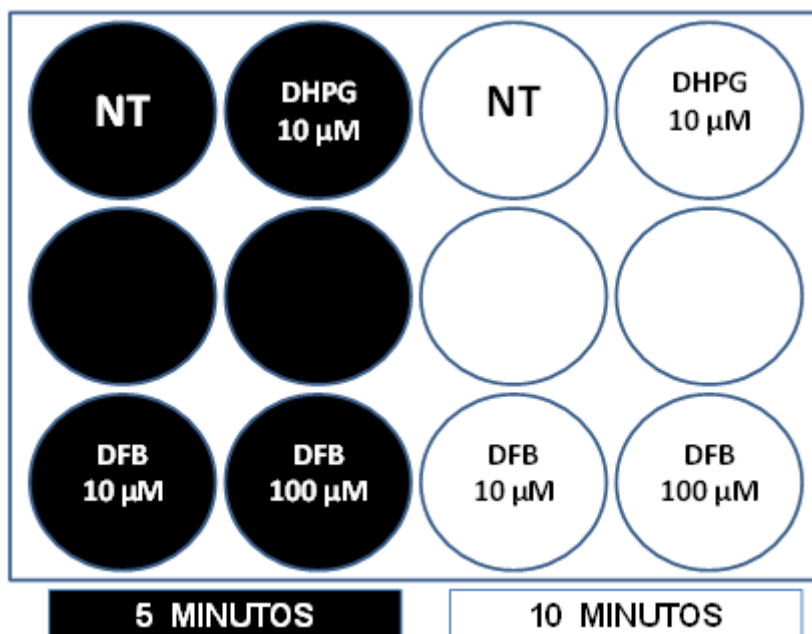


FIGURA 19: Estimulação neuronal pelo modulador alostérico DFB. A Representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, DFB, nas concentrações de 10 μM ou 100 μM , e pelo agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μM , pelos tempos de 5 ou 10 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

Observamos que DFB provocou fosforilação de Akt1 na concentração de 100 μM , mas não na de 10 μM , no tempo de 5 minutos de estimulação, quando comparado ao grupo controle não tratado (NT) (**FIG. 20**). Porém, ao estimularmos as células com DFB ou DHPG por 10 min não houve ativação da Akt1 maior que o NT (**FIG. 20**). Vale ressaltar que, apesar de ter ocorrido uma tendência a aumento na fosforilação da Akt1 com DFB na concentração de 100 μM por 10 min, esse aumento não foi considerado estatisticamente significativo.

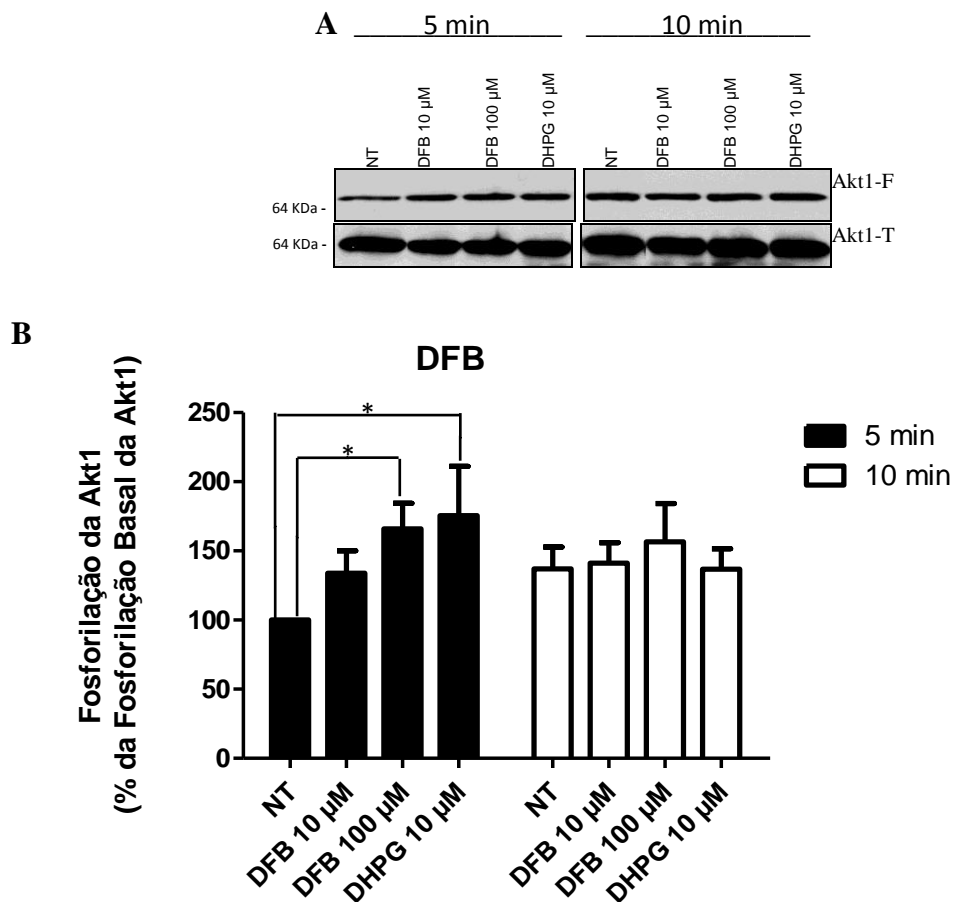


FIGURA 20: DFB promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1 . Em **A**, é mostrado um imunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurónios estriatais de embriões E15 de camundongos C57, estimulados com DFB nas concentrações de 10 μ M ou 100 μ M ou DHPG na concentração de 10 μ M pelos tempos de 5 ou 10 min, comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 μ g de lisado celular para cada amostra. Em **B**, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão da Akt1-F, normalizada pela Akt1-T. Os dados representam uma média de seis experimentos independentes, expressos como percentagem da fosforilação basal da Akt1. *indica diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratado (NT) ($p < 0,05$).

4.5 Efeito de VU1545 na fosforilação da Akt1

Neurônios do estriado em cultura primária foram estimulados com VU1545 nas concentrações de 10 μM ou 100 μM por 5 ou 10min – (FIG. 21). Os neurônios foram lisados e 100 μg das proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE.

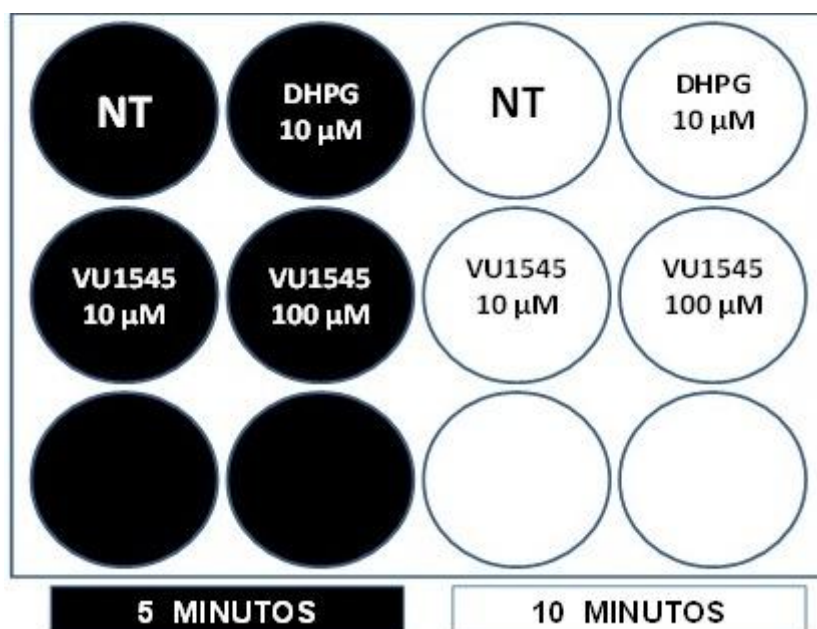


FIGURA 21: Estimulação neuronal pelo modulador alostérico VU1545. A representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária, pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, VU1545, nas concentrações de 10 μM ou 100 μM , e pelo o agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μM , pelos tempos de 5 ou 10 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

Observamos que VU1545 promoveu fosforilação da Akt1 nas concentrações de 10 μM e 100 μM por 5 min, quando comparado com o grupo controle (NT) (FIG. 22). Não verificamos ativação da Akt1 quando tratamos os neurônios por 10 min com VU1545 nas concentrações 10 μM e 100 μM (FIG. 22). Outro achado relevante é que VU1545 promoveu altos níveis de ativação da Akt1 tanto na concentração de 10 μM quanto na concentração de 100 μM . Assim, concentrações inferiores a 10 μM do modulador alostérico VU1545 foram testadas quanto a promoção de ativação da Akt1.

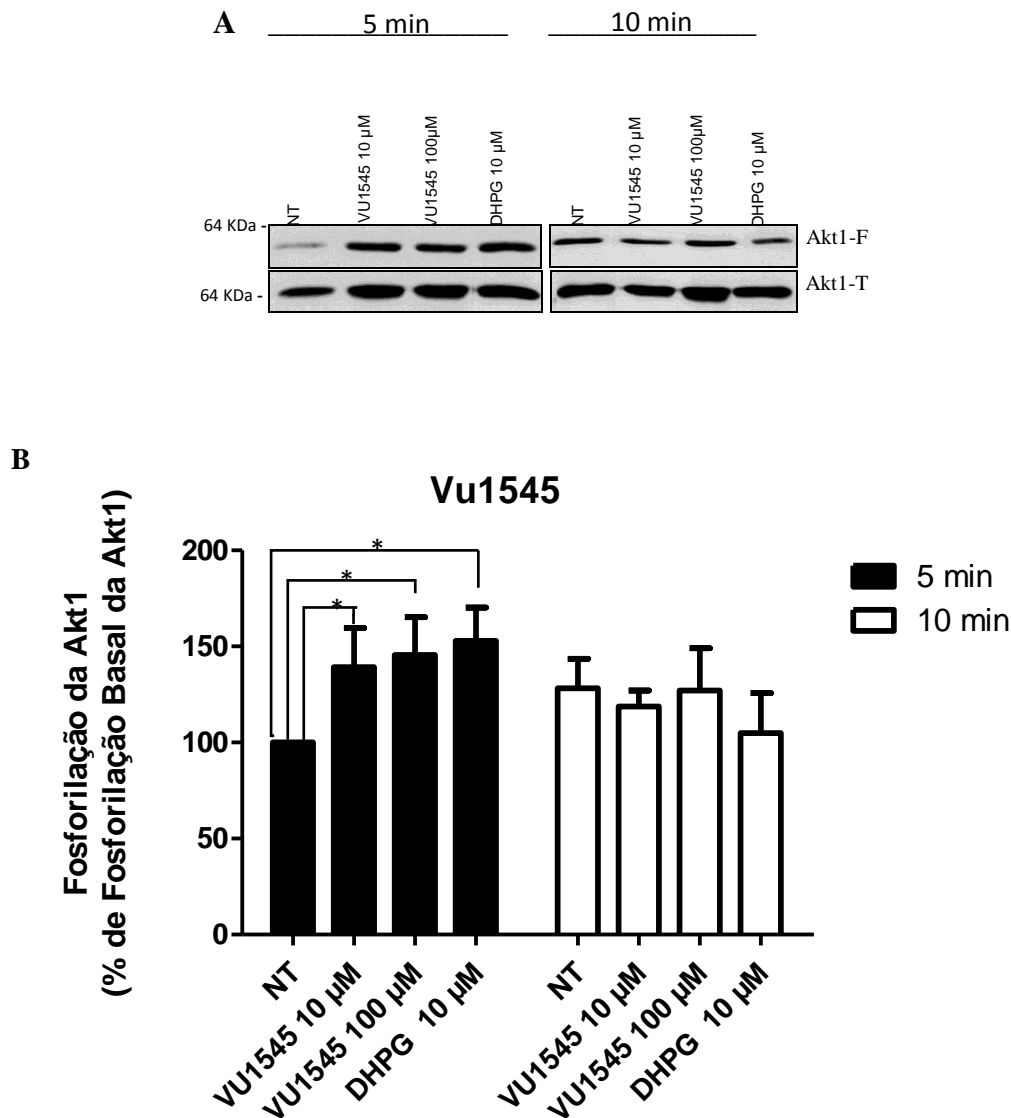


FIGURA 22: VU1545 promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1. Em A, é mostrado um imunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurônios estriatais de embriões E15 de camundongos C57, estimulados com VU1545 nas concentrações de 10 μM ou 100 μM ou DHPG na concentração 10 μM pelos tempos de 5 ou 10 min e comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 μg de lisado celular para cada amostra. Em B, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão da Akt1-F, normalizada pela Akt1-T. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como porcentagem da fosforilação basal da Akt1. * indica diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratado (NT) ($p < 0,05$).

4.5.1 Efeito de VU1545 em baixas concentrações na ativação da Akt1

Para testar a hipótese de que baixas concentrações de VU1545 seriam capazes de ativar Akt1, utilizamos neurônios do estriado em cultura primária e os estimulamos com VU1545 nas concentrações de 0,1 μM e 1 μM somente por 5 min (**FIG. 23**). Após, 100 μg de proteínas totais foram obtidas a partir do lisado desses neurônios e separadas em gel SDS PAGE.

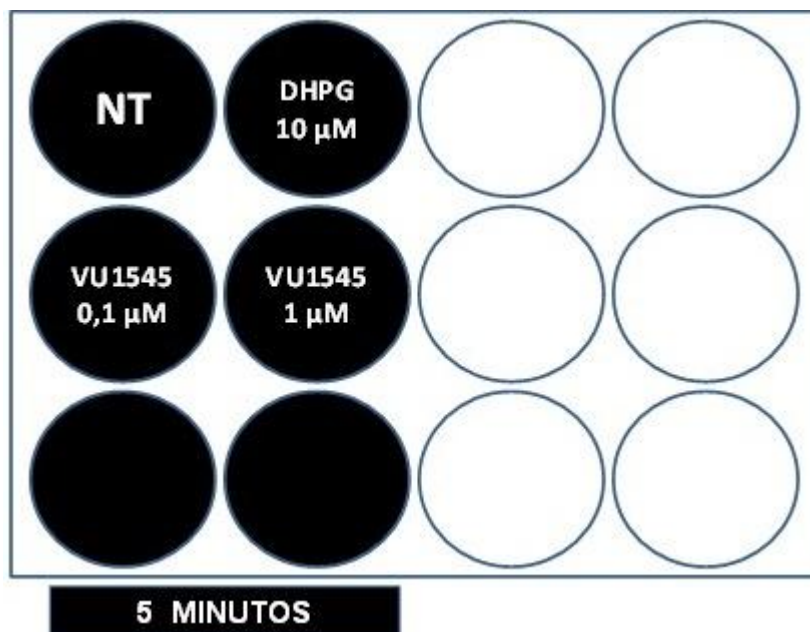


FIGURA 23: Estimulação neuronal pelo modulador alostérico VU1545 em baixas concentrações. A representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária, pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, CPPHA, em concentrações de 0,1 μM ou 1 μM , e pelo agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μM , pelo tempo de 5 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

A análise das bandas imunoreativas através de *Western blot* nos mostrou que VU1545 1 μM promoveu altos níveis de fosforilação da Akt1, quando comparado ao grupo controle não tratado (NT). Notamos que a fosforilação da Akt1 por VU1545 também ocorreu quando utilizamos concentrações baixas desse modulador, como por exemplo 0,1 μM (**FIG. 24**).

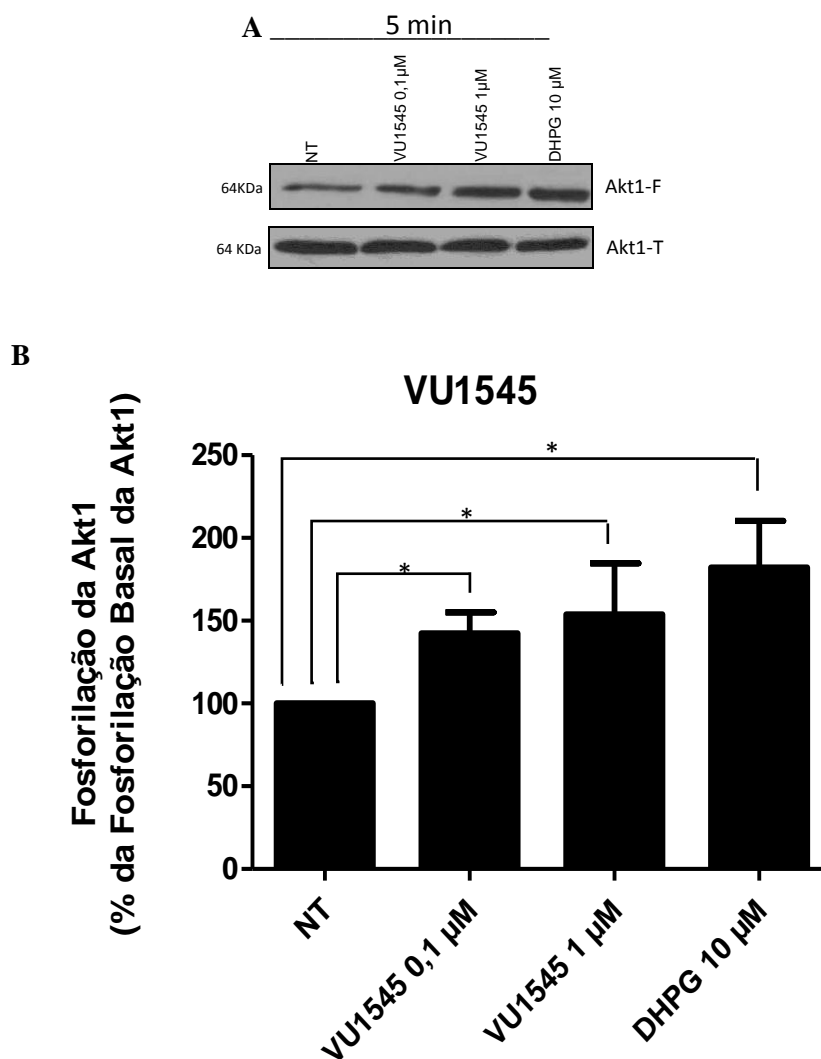


FIGURA 24: VU1545 em baixas concentrações promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1. Em **A**, é mostrado um imunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurônios estriatais de embriões E15 de camundongos C57, estimulados com VU1545 nas concentrações de 0,1 μM ou 1 μM ou DHPG na concentração 10 μM por 5 min e comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 μg de lisado celular para cada amostra. Em **B**, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão da Akt1-F, normalizada pela Akt1-T. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como percentagem de fosforilação basal da Akt1. * indica diferença significativa em comparação ao grupo controle não tratados (NT) ($p < 0,05$).

4.6 Efeito de CDPPB na fosforilação da Akt1

Partimos para a avaliação da eficácia do nosso último modulador alostérico, CDPPB, em promover a fosforilação da Akt1. Neurônios estriatais em cultura primária foram estimulados com concentrações de 10 μM ou 100 μM de CDPPB pelos tempos de 5 ou 10 min (**FIG.25**) e 100 μg de proteínas foram separadas em gel SDS PAGE.

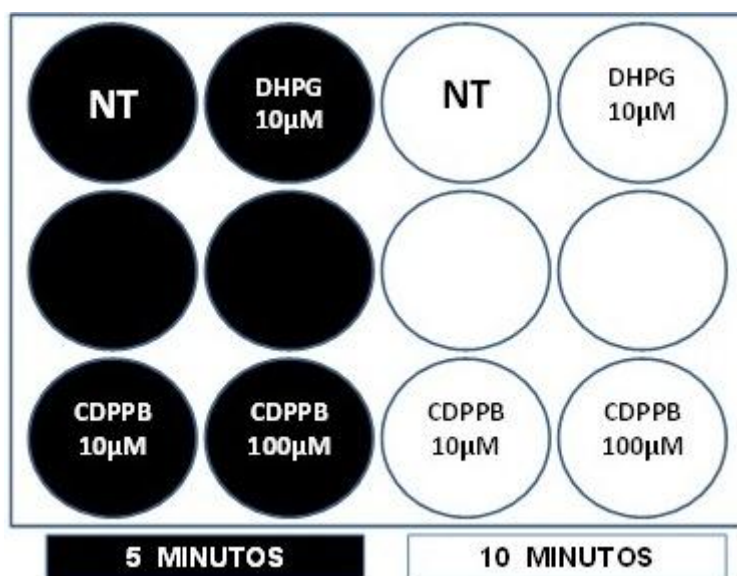


FIGURA 25: Estimulação neuronal pelo modulador alostérico CDPPB. A representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, CDPPB, em concentrações finais 10 μM ou 100 μM , e pelo agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μM pelos tempos de 5 ou 10 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

A análise do *Western blot* mostrou um expressivo aumento na fosforilação de Akt1 tanto quando os neurônios foram estimulados com CDPPB 10 μM quanto 100 μM por 5 min, quando comparado ao controle não tratado (NT) (**FIG. 26**).

Nossos resultados demonstraram que CDPPB também ativou Akt1 de maneira semelhante nas concentrações de 10 μM e 100 μM , as quais foram tão eficientes quanto DHPG (**FIG. 26**). Confirmamos também que no tempo de 10 min não houve ativação da Akt1 por CDPPB, ocorrendo novamente uma diminuição significativa na fosforilação dessa proteína quando aumentamos o tempo de estimulação com o modulador alostérico.

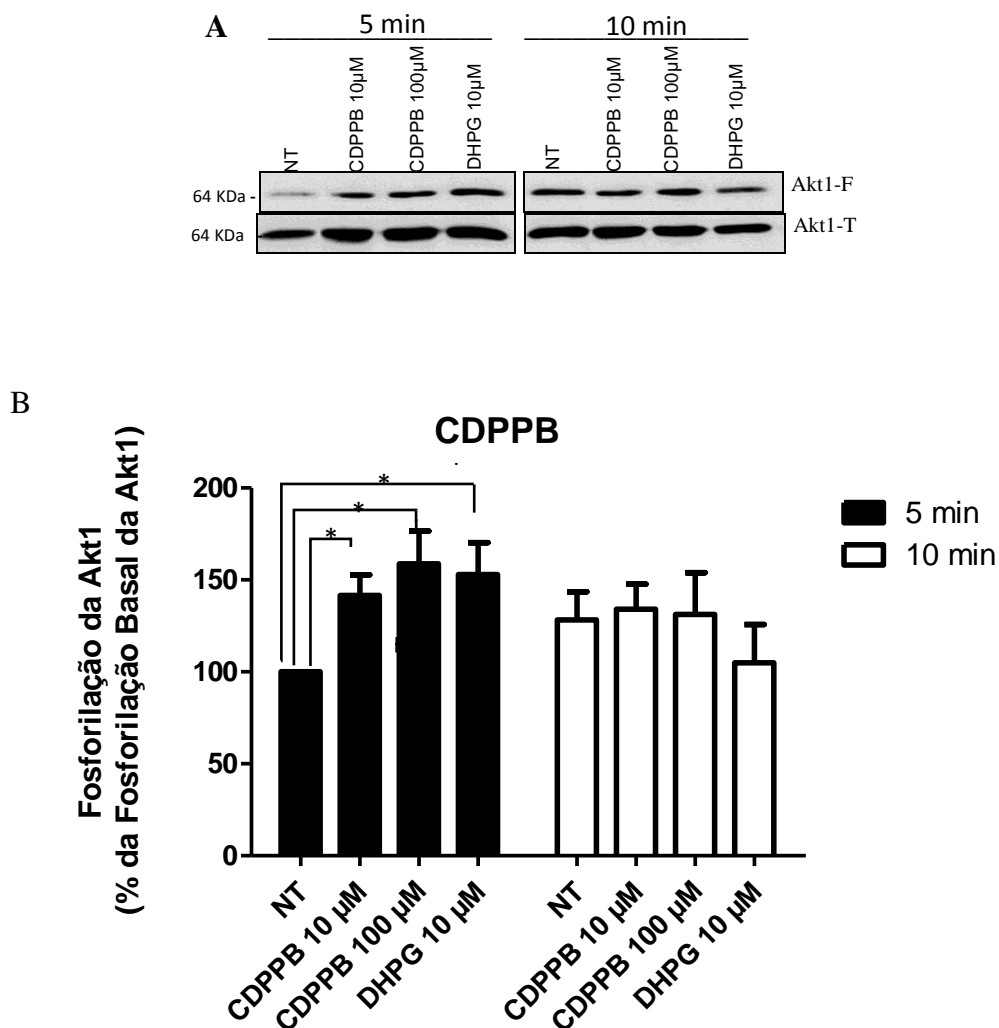


FIGURA 26: CDPPB promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1. Em **A**, é mostrado um imunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurônios estriatais de embriões E15 de camundongos C57, estimulados com CDPPB nas concentrações de 10 µM ou 100 µM ou DHPG na concentração de 10 µM pelos tempos de 5 ou 10 min, comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 µg de lisado celular para cada amostra. Em **B**, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão Akt1-F, normalizada pela Akt1-T. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como porcentagem da fosforilação basal da Akt1. * indica diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratados (NT) ($p < 0,05$).

4.6.1 Efeito de CDPPB em baixas concentrações na ativação da Akt1

Com o objetivo de verificar se CDPPB em menores concentrações continuaria sendo eficiente na ativação de Akt1, estimulamos neurônios com CDPPB em concentrações de 0,1 μM ou 1 μM por 5 min (FIG. 27).

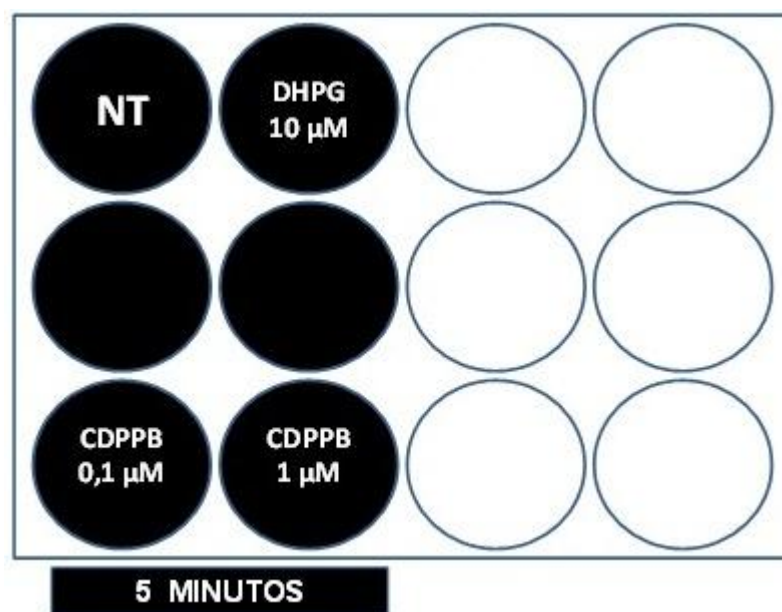


FIGURA 27: Estimulação neuronal pelo modulador CDPPB em baixas concentrações. A representação mostra a estimulação de neurônios estriatais em cultura primária pelo modulador alostérico positivo do mGluR5, CDPPB, nas concentrações de 0,1 μM ou 1 μM , e pelo agonista do mGluR5, DHPG, na concentração de 10 μM , pelo tempo de 5 min. O NT representa o grupo controle não tratado com as drogas.

Observamos que os níveis de fosforilação da Akt1 aumentaram quando neurônios foram estimulados por 5 min com CDPPB 0,1 μM e 1 μM , quando comparados ao grupo controle não tratado (NT) (FIG. 28).

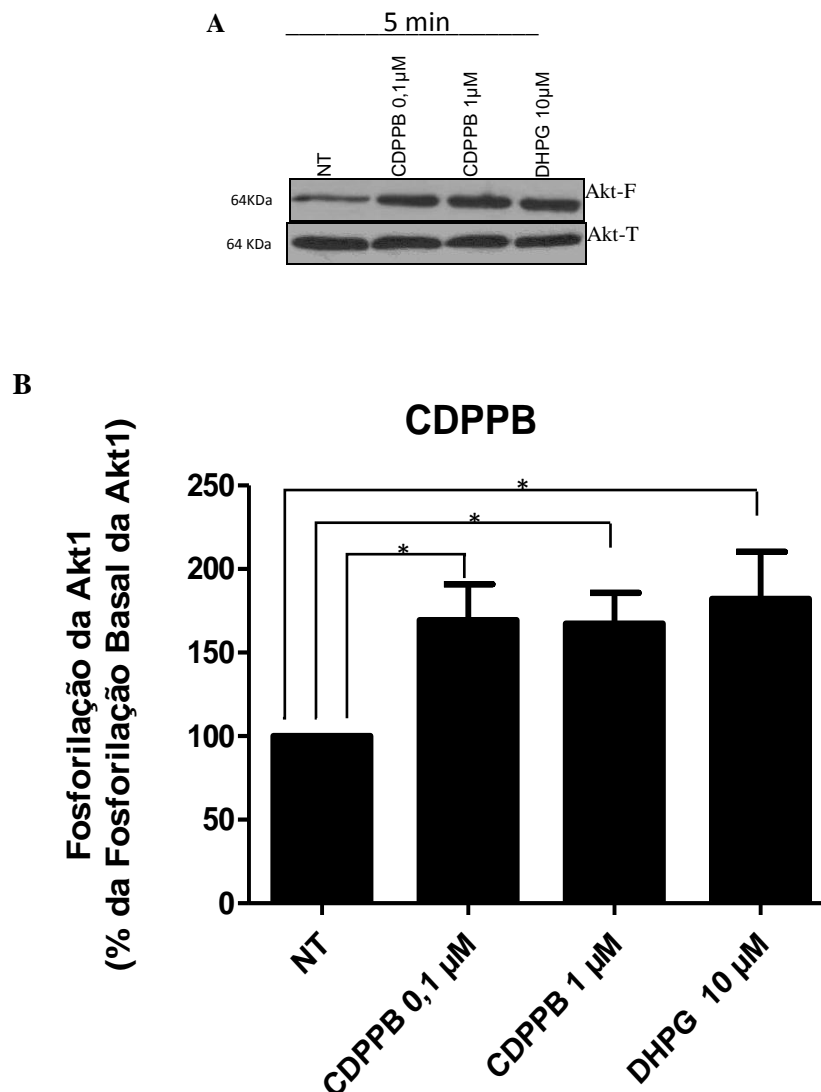


FIGURA 28: CDPPB em baixas concentrações promove elevação dos níveis de fosforilação da Akt1. Em **A**, é mostrado um immunoblot representativo para a Akt1-F (painel superior) e Akt1-T (painel inferior), obtido a partir de culturas primárias de neurônios estriatais de embriões E15 de camundongos C57, estimulados com CDPPB nas concentrações de 0,1 µM ou 1 µM ou DHPG na concentração 10 µM pelo tempo de 5 min e comparados ao grupo controle não tratado (NT). Utilizamos 100 µg de lisado celular para cada amostra. Em **B**, um gráfico mostrando a quantificação da análise densitométrica da expressão Akt1-F normalizada pela Akt1-T. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como porcentagem da fosforilação basal da Akt1. * indica diferença significativa em comparação com o grupo controle não tratados (NT) ($p < 0,05$).

4.7 Efeito dos moduladores alostéricos na liberação citosólica de Ca^{2+}

Dados da literatura indicam que os MAPs do mGluR5 promovem liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares quando associados a um agonista (Bradley, 2009). Assim, decidimos avaliar se os MAPs aplicados isoladamente, ou seja, na ausência de um agonista do mGluR5, poderiam causar uma alta liberação de Ca^{2+} intracelular, uma vez que essas drogas foram potentes na ativação da Akt1 na ausência de agonista.

Os dados obtidos por espectrofluorometria demonstraram que, conforme esperado, o agonista DHPG 10 μM causou altos níveis de liberação de Ca^{2+} intracelular. A liberação de Ca^{2+} promovida por CPPHA 10 μM foi quase tão alta quanto a promovida por DHPG (FIG. 29). Já DFB 10 μM , VU1545 10 μM e CDPPB 10 μM não promoveram liberação de Ca^{2+} intracelular diferente dos níveis basais (FIG. 29).

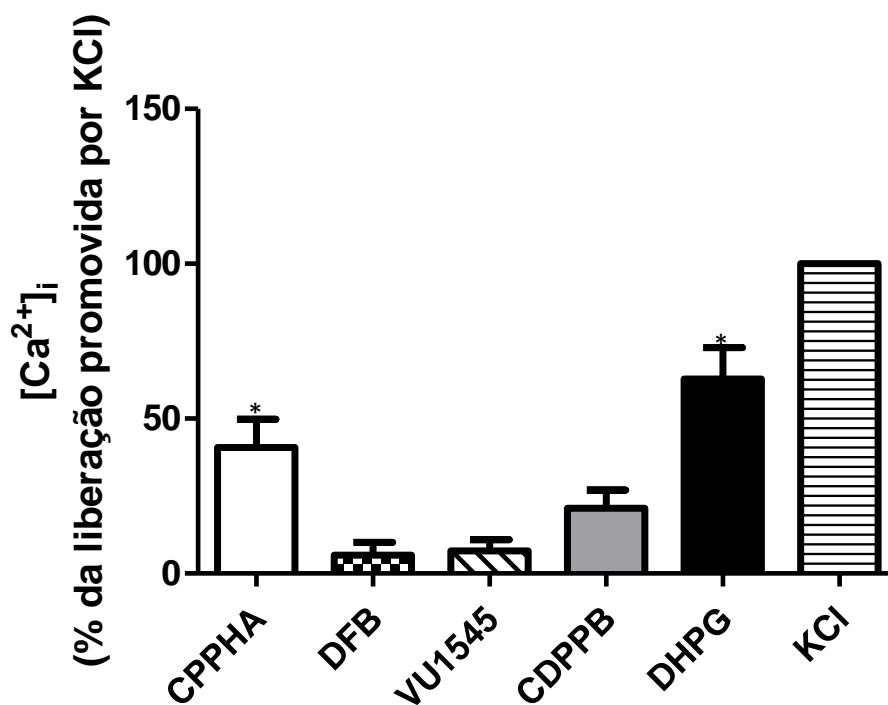


FIGURA 29: Liberação citosólica de Ca^{2+} por moduladores alostéricos positivos. O gráfico mostra que os moduladores que ativam a Akt, não promovem a liberação de Ca^{2+} . Gráfico representativo da liberação de Ca^{2+} em cultura primária de neurônios estriatais estimulados com CPPHA 10 μM , DFB 10 μM , VU1545 10 μM , CDPPB 10 μM , DHPG 10 μM ou KCl 30 mM. Os dados representam a média de seis experimentos independentes, expressos como porcentagem da liberação de Ca^{2+} promovida por KCl 30 mM. * indica diferença significativa quando comparados à liberação basal de Ca^{2+} ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Há uma intensa busca por drogas que atuem sobre o mGluR5 afim de prevenir morte de células neuronais, uma vez que esse é o evento causal principal para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Vonsattel *et al.*, 1985) *apud* Ribeiro *et al.*, 2010). Logo, a busca por drogas que minimizem a perda neuronal é o objetivo central para o desenvolvimento de terapias eficientes para tratar pacientes que apresentem tais desordens (Abdul-Ghani *et al.*, 1996; Dewar *et al.*, 1999).

5.1 O mGluR5 como alvo terapêutico

Receptores metabotrópicos de glutamato têm sido propostos como alvos para o tratamento de uma variedade de desordens neurodegenerativas (Marino e Conn, 2006). Em modelos animais de esquizofrenia, por exemplo, é sugerido que a utilização de MAPs do mGluR5 promova melhora dos sintomas da doença (Conn *et al.*, 2009).

É bem descrito que o NMDAR está intimamente associado a processos de morte neuronal (Choi, 1998). Entretanto, não optamos por bloquear os receptores glutamatérgicos ionotrópicos devido à possibilidade de tais bloqueadores causarem efeitos adversos, uma vez que esses são os principais receptores excitatórios do cérebro de mamíferos (Gerber & Vallano, 2006; Ikonomidou & Turski, 2002). Visto que o mGluR5 apresenta uma função predominantemente modulatória, esse receptor representa um alvo terapêutico bastante promissor e o seu papel em desordens do sistema nervoso central (SNC) tem sido bastante estudado, porém sua função sobre a morte neuronal permanece ainda controversa (Olive, 2010; Chen *et al.*, 2012).

É possível que o tipo de droga, bem como a concentração e o tempo de exposição a ela, promova a ativação de distintas vias de sinalização através do mGluR5 e a literatura indica que a ativação de vias protetoras, tais como as vias envolvendo a ERK 1/2, poderia promover neuroproteção (Chen *et al.*, 2012). Porém, ao mesmo tempo, a via de formação de IP₃ promove aumento da liberação de Ca²⁺ intracelular, o que poderia facilitar o processo de excitotoxicidade e

ocasionar morte neuronal (Nakanishi, 1994; Conn e Pin, 1997; Mao e Wang, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005)

Evidências demonstram que o bloqueio da atividade do mGluR5 possa produzir efeitos terapêuticos em inúmeras desordens neuronais (Movsesyan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Porém, existem outras publicações demonstrando que a ativação do mGluR5 possa ser protetora através da ativação da Akt e ERK 1/2 (FIG. 30) (Ribeiro *et al.*, 2010, Chen, 2012). No nosso modelo de estudo demonstramos que a ativação do mGluR5 pode promover ativação da via Akt1, sugerindo função neuroprotetora.

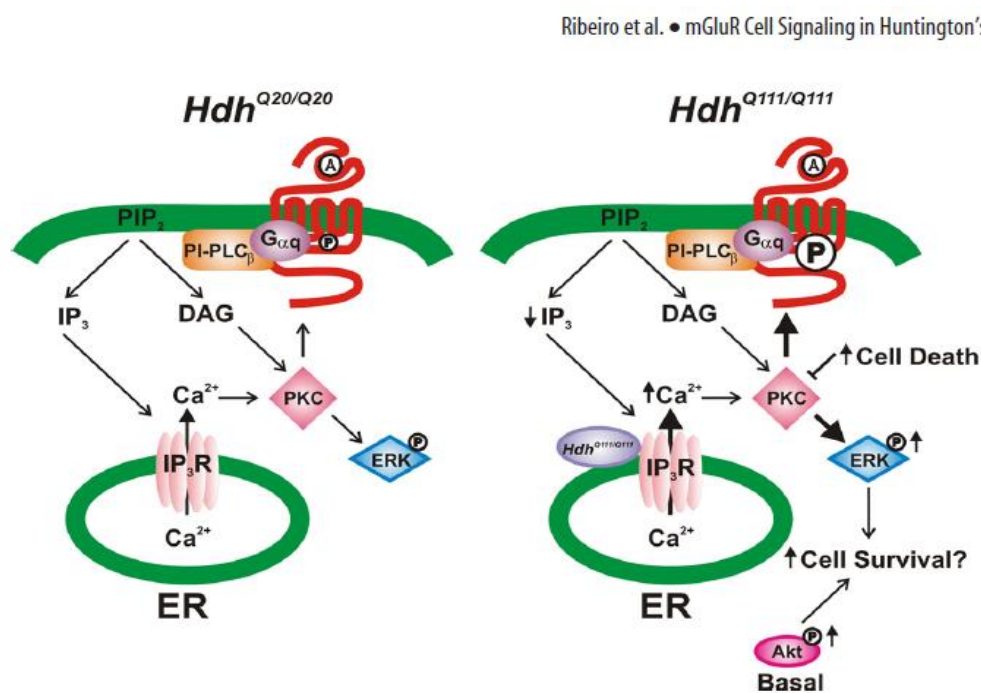


FIGURA 30: Representação esquemática do modelo proposto para as alterações de sinalização mGluR1/5 na DH. mGluR1/5 são acoplados à proteínas Gq/11, e sua ativação gera a formação de diacilglicerol (DAG) e liberação de IP₃ e Ca²⁺ a partir de reservas intracelulares e ativação de PKC, assim como a ativação de ERK e AKT. Em um camundongo modelo da doença de Huntington, *Hdh*^{Q111/Q111}, a formação de IP₃ é diminuída devido ao aumento da ativação da PKC. Apesar de a formação de IP₃ apresentar-se diminuída, a liberação de cálcio, bem como a ativação de AKT ERK apresentam-se aumentadas em camundongos *Hdh*^{Q111/Q111}, em comparação ao camundongo controle, *Hdh*^{Q20/Q20}. Isto é provavelmente consequência de uma resposta adaptativa, na tentativa de manter neurônios *Hdh*^{Q111/Q111} saudáveis na fase pré-sintomática da doença. A inibição da PKC levou ao aumento da morte celular promovida por DHPG em neurônios derivados de camundongos *Hdh*^{Q111/Q111}, em comparação aos *Hdh*^{Q20/Q20} (Ribeiro *et al.*, 2010).

5.2 O efeito dos moduladores alostéricos do mGluR5 quanto à ativação da Akt1

5.2.1 A eficiência de DFB na fosforilação da Akt1

Em um estudo realizado por (Zhang *et al.*, 2005), em que foram utilizadas culturas de astrócitos corticais, foi avaliado o efeito de DFB, quando associado a um agonista, quanto à fosforilação da via neuroprotetora ERK 1/2. Neste estudo, ao se determinar o efeito do DFB na modulação do mGluR5, foi observado que não houve efeito potencializador sobre o receptor, quando DFB foi administrado sozinho na concentração de 100µM, mas apenas quando associado ao agonista DHPG. Opostamente, nosso trabalho demonstra que DFB na concentração de 100 µM exerceu função estimulatória sobre o mGluR5, ativando a Akt1 em neurônios do estriado, mesmo quando utilizado isoladamente (**FIG. 20**).

5.2.2 A não eficiência de CPPHA na fosforilação da Akt1

Zhang e colaboradores (2005) avaliaram o papel do CPPHA na concentração de 10 µM quanto à fosforilação da ERK 1/2 em astrócitos corticais e observaram que CPPHA promoveu aumento significativo na fosforilação da ERK 1/2, quando associado ao agonista DHPG na concentração de 1 µM. Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que CPPHA na concentração de 10 µM foi capaz de inibir a fosforilação da ERK 1/2 quando DHPG foi administrado na concentração de 10 µM. Porém, quando administrado na ausência de DHPG, CPPHA promoveu leve aumento na fosforilação da ERK 1/2.

Embora a literatura sugira que CPPHA potencialize a atividade do mGluR5 (O'Brien *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005), em nossas condições experimentais, CPPHA não promoveu ativação da Akt1 de maneira estatisticamente significativa (**FIG. 18**). Inferimos que o CPPHA ative o mGluR5 de maneira distinta dos demais MAPs, uma vez que DFB, CDPPB e VU1545 se ligam a um sítio que se sobrepõe ao sítio ao qual o MPEP se liga. Já o CPPHA interage com outra região do receptor, referente ao domínio heptaélico transmembrana (7TM) do receptor mGluR5 (Chen *et al.*, 2008; Bradley, 2009; Hammond *et al.*, 2010).

5.2.3 A eficiência de CDPPB na fosforilação da Akt1

Em um trabalho realizado por (Chen *et al.*, 2012), utilizando neurônios corticais, foi estudada a ativação do mGluR5 por CDPPB e pelo agonista CHPG, ambos isoladamente, quanto à fosforilação da ERK 1/2. Os resultados desse trabalho demonstraram que ambos promoveram a fosforilação da ERK 1/2. Porém, enquanto a ERK 1/2 foi fosforilada por uma concentração de 1000 μ M de CHPG, ao se utilizar o modulador alostérico CDPPB, foi suficiente uma concentração de 200 μ M do CHPG para promover aumento da fosforilação de ERK 1/2. No nosso modelo de estudo observamos que CDPPB nas concentrações de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M foi capaz de promover ativação do mGluR5 e fosforilação da Akt1 (**FIGs 26 e 28**).

O VU1545 foi desenvolvido a partir de estudos de melhoramento farmacológico do CDPPB (de Paulis *et al.*, 2006). Não existem publicações até o momento que relacionem VU1545 com ativação de vias neuroprotetoras. Nossos resultados demonstram efeitos semelhantes entre VU1545 e CDPPB quanto à ativação da Akt1 em concentrações de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M (**FIGs. 22 e 24**).

5.3 Neuroproteção envolvendo a Akt1

Tem sido bem demonstrado que a fosforilação da Akt1 por receptores de glutamato é importante para proteger contra a morte neuronal (Datta *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2010). Dentre os inúmeros mecanismos envolvendo a Akt1 na sobrevivência celular, pode-se destacar, por exemplo, que a Akt1 possui efeitos diretos em vias de apoptose, sendo capaz de inibir proteínas pró-apoptóticas, tais como BAD, caspase-9, fator *Forkhead* e GSK3 β (Downward, 1998; Datta *et al.*, 1999; Mejillano *et al.*, 2001).

Outros estudos demonstram que após a indução de isquemia cerebral em camundongos, observa-se um aumento da Akt1 fosforilada no córtex cerebral, enquanto que o bloqueio da via PI3K, com consequente inibição da Akt1, poderia ser responsável pelo dano celular ao DNA (Noshita *et al.*, 2003). Há também inferências de que o mGluR5 pode modular a via PI3K/Akt/GSK3 β no hipocampo, sendo que a modulação dessa via de sinalização pode reverter a toxicidade neuronal induzida pelo neuropeptídeo β -amilóide, como ocorre por exemplo na DA (Liu *et al.*, 2005).

Vários trabalhos indicam que MAPs do mGluR5 podem ativar a ERK1/2 quando administrados isoladamente (Bradley *et al.*, 2009). Uma vez que a via de ativação tanto da ERK 1/2 quanto da Akt ocorre através da formação do complexo mGluR5-HOMER, decidimos investigar se MAPs do mGluR5 também poderiam ser capazes de ativar a Akt1. Além disso, a Akt1 também pode promover fosforilação da proteína Htt mutante reduzindo a formação de agregados e morte neuronal na DH (Warby *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010).

Conforme mencionado anteriormente, há estudos demonstrando que a ativação da Akt1 pode ocorrer por acoplamento às proteínas Homer, com consequente ativação de vias neuroprotetoras envolvendo Akt1 e ERK 1/2 (**FIG. 31**) (Rong *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2005; McGinty *et al.*, 2008; Menard e Quirion, 2012).

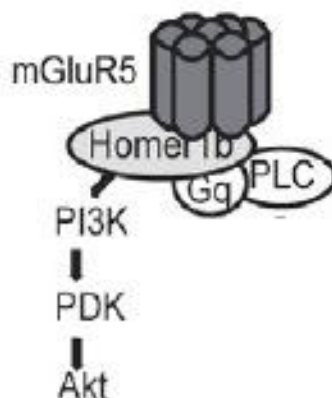


FIGURA 31: Ativação da Akt via mGluR5/Homer. É demonstrado um complexo de ativação entre mGluR5 e Homer1b, Além da ativação de proteínas G e da PLC, Homer promove ativação da PI3K, com recrutamento da PDK e consequente ativação da Akt1 (Menard e Quirion, 2012).

A estimulação do mGluR5 promove a formação de um complexo funcional mGluR5/Homer/PIKE, que resulta em potencialização da PI3K por PIKE e consequente fosforilação da Akt1 (**FIG. 7**), promovendo redução da morte celular (Rong *et al.*, 2003). Com base nesses dados, mostramos no nosso trabalho que a ativação da Akt1 por DFB, CDPPB e VU1545 foi tão ou mais robusta quanto a promovida pelo DHPG (**FIGs 20, 22, 24, 26 e 28**) e que essa ativação pode ter ocorrido via Homer, por um mecanismo

independente de IP_3/Ca^{2+} , pois não observamos aumento da liberação de Ca^{2+} citosólico ao utilizarmos esses MAPs dos mGluR5 (**FIG. 29**).

5.4 Período de fosforilação da Akt1

Já foi demonstrado em culturas de neurônios hipocâmpais que Akt1 é fosforilada no sítio da Serina 473 (Kitagawa *et al.*, 2002). A fosforilação retornou aos níveis basais em 3 horas. Os autores não observaram alteração na fosforilação da Akt1 na treonina 308. Curiosamente alterações na atividade da proteína foram observadas, mostrando que não basta fosforilação na serina 473 para que a proteína exerça sua função, embora seja considerado que a fosforilação deste resíduo exerce uma condição indispensável para a atividade da Akt1 (Kitagawa *et al.*, 2002).

Em um estudo publicado por (Perkinton *et al.*, 2002), foi investigado se a ativação do NMDAR também poderia induzir fosforilação da Akt1 em cultura primária de neurônios estriatais. Foi observada robusta ativação da Akt1 na Serina 473, quando as células foram estimuladas com glutamato na concentração de 100 μ M pelo tempo de 5 min, demonstrando que a Akt1 também pode ser ativada através de receptores ionotrópicos, além de receptores metabotrópicos. Porém, nesse estudo, a desfosforilação da Akt1 não foi avaliada (Perkinton *et al.*, 2002).

No nosso estudo, demonstramos que DHPG 10 μ M exerceu potencializou o mGluR5 levando a uma ativação de Akt1 no tempo de incubação de 5 minutos, mas não no tempo de 10 min, quando comparado à ativação da Akt1 em neurônios não estimulados (**FIG. 16**). Esses dados corroboram com resultados publicados anteriormente pelo nosso grupo, onde foi demonstrado que, em neurônios estriatais, a ativação da Akt1 por DHPG 10 μ M é rápida, ocorrendo em um tempo entre 2 e 5 min de estimulação com a droga (Ribeiro *et al.*, 2010).

Ao realizarmos o mesmo experimento utilizando os MAPs do mGluR5, observamos que houve ativação da Akt1 somente no tempo de 5 minutos de estimulação com as drogas (**FIGs. 20, 22, 24, 26 e 28**). Assim, os níveis de Akt1 fosforilada via moduladores alostéricos positivos do mGluR5 foi menor à medida que aumentamos o tempo de estimulação. É provável que enzimas fosfatases tenham promovido a desfosforilação da proteína Akt1 após períodos mais prolongados de estimulação, como

no tempo de 10 min de estimulação com as drogas (**FIG. 32**) (McConnell e Wadzinski, 2009).

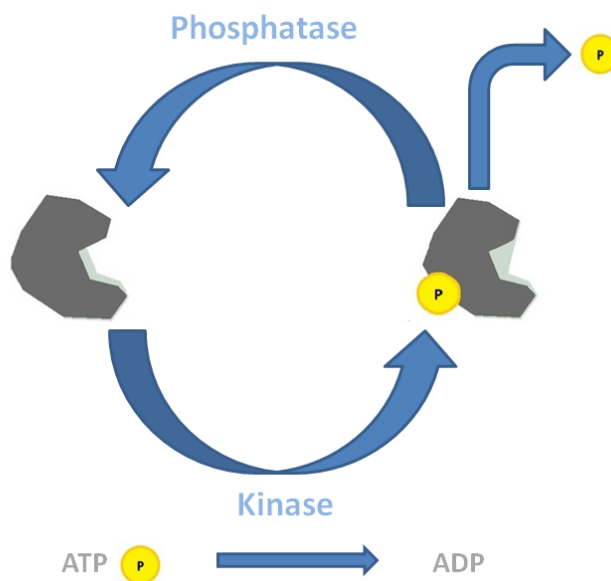


FIGURA 32: Ciclos de fosforilação e desfosforilação. A representação esquemática mostra a fosforilação reversível de uma proteína. A proteína fosfatase remove um fosfato a partir do grupo da fosfoproteína e a proteína quinase transfere o grupo fosfato do ATP para a fosfoproteína.

5.5 Liberação citosólica de Ca^{2+} por moduladores alostéricos

É bem elucidado que a ativação do mGluR5 promove liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (Hermans e Challiss, 2001; Mannaoni *et al.*, 2001; Ferraguti e Shigemoro, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2010). Além disso, há estudos demonstrando que os MAPs do mGluR5, incluindo DFB, CPPHA e CDPPB, levam a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares quando utilizados na presença de um agonista ortostérico (Zhang *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2009).

No nosso estudo, o propósito de testar os moduladores alostéricos quanto à ativação do mGluR5 visa a sua utilização na ausência de um agonista. Nossos resultados refletem, de acordo com a literatura, que o agonista DHPG foi capaz de promover elevação da concentração de Ca^{2+} a níveis superiores aos basais (**FIG. 29**), comprovando que o DHPG é uma droga potente para ativar o mGluR5 e promover a elevação dos níveis citosólicos de Ca^{2+} (Bradley *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010).

Observamos no nosso trabalho que CPPHA foi capaz de promover a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, quase tão robustamente quanto DHPG (**FIG. 29**). Opostamente, os moduladores alostéricos DFB, VU1545 e CDPPB não promoveram uma liberação de Ca^{2+} diferente da liberação basal (**FIG. 29**). Isso indica que o uso de DFB, VU1545 e CDPPB não iria exacerbar o processo excitotóxico por não promoverem um aumento da liberação de Ca^{2+} no citosol. Desse modo, nosso estudo torna-se uma importante ferramenta para o desenvolvimento de terapias para tratar desordens relacionadas ao mGluR5, considerando que esses moduladores apresentam potencial neuroprotetor uma vez que promovem ativação da proteína Akt1 e liberação mínima dos estoques intracelulares de Ca^{2+} .

6. PERSPECTIVAS

Certamente nossos resultados necessitam ser aprofundados e levantam importantes questões sobre os mecanismos de ativação da Akt1 e potencial neuroprotetor. Desse modo, nossos futuros trabalhos incluem:

1. Prosseguir com esses experimentos em modelos animais de neurodegeneração (camundongos modelo da doença de Huntington);
2. Determinar se os MAPs são efetivos como neuroprotetores;
3. Silenciar a via IP_3/Ca^{2+} e investigar se a ativação da Akt1 por MAPs é promovida via Homer/PIKE/mGluR5,
4. Bloquear a via da Akt1 a fim de estabelecer que ela está intimamente relacionada com neuroproteção.

7 REFERÊNCIAS

- Abdul-Ghani, M. A., T. A. Valiante, *et al.* (1996). "Metabotropic glutamate receptors coupled to IP₃ production mediate inhibition of IAHP in rat dentate granule neurons." *J Neurophysiol* 76(4): 2691-2700.
- Ahn, J. Y., R. Rong, *et al.* (2004). "PIKE (phosphatidylinositol 3-kinase enhancer)-A GTPase stimulates Akt activity and mediates cellular invasion." *J Biol Chem* 279(16): 16441-16451.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, *et al.* (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.
- Bradley, S. J., J. M. Watson, *et al.* (2009). "Effects of positive allosteric modulators on single-cell oscillatory Ca²⁺ signaling initiated by the type 5 metabotropic glutamate receptor." *Mol Pharmacol* 76(6): 1302-1313.
- Chen, T., L. Cao, *et al.* (2012). "Protective Effects of mGluR5 Positive Modulators Against Traumatic Neuronal Injury Through PKC-Dependent Activation of MEK/ERK Pathway." *Neurochem Res* 37(5): 983-990.
- Chen Y, G. C., Pin JP, Conn PJ. (2008). "N-{4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide (CPPHA) acts through a novel site as a positive allosteric modulator of group 1 metabotropic glutamate receptors." *Mol Pharmacol*.
- Choi, D. (1998). "Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke?" *Mt Sinai J Med* 65(2): 133-138.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." *Cell* 131(6): 1047-1058.
- Cleva, R. M. and M. F. Olive (2011). "Positive allosteric modulators of type 5 metabotropic glutamate receptors (mGluR5) and their therapeutic potential for the treatment of CNS disorders." *Molecules* 16(3): 2097-2106.
- Coffer, P. J., J. Jin, *et al.* (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." *Biochem J* 335 (Pt 1): 1-13.
- Conn, P. J., A. Christopoulos, *et al.* (2009). "Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders." *Nat Rev Drug Discov* 8(1): 41-54.
- Conn, P. J., C. W. Lindsley, *et al.* (2009). "Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia." *Trends Pharmacol Sci* 30(1): 25-31.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237.
- Datta, S. R., A. Brunet, *et al.* (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* 13(22): 2905-2927.
- de Paulis, T., K. Hemstapat, *et al.* (2006). "Substituent effects of N-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-yl)benzamides on positive allosteric modulation of the metabotropic glutamate-5 receptor in rat cortical astrocytes." *J Med Chem* 49(11): 3332-3344.
- Dewar, D., P. Yam, *et al.* (1999). "Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter." *Eur J Pharmacol* 375(1-3): 41-50.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, *et al.* (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." *Trends Neurosci* 22(9): 391-397.
- Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-267.
- Filippa, N., C. L. Sable, *et al.* (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase." *Mol Cell Biol* 19(7): 4989-5000.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, *et al.* (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." *Cancer Treat Rev* 30(2): 193-204.

- Gasparini, F. and W. Spooren (2007). "Allosteric modulators for mGlu receptors." Curr Neuropharmacol 5(3): 187-194.
- Gomes, D. A. (2006). Funções do cálcio nuclear e citosólico na sinalização celular Tese de Doutorado, UFMG.
- Guhan, N. and B. Lu (2004). "Homer-PIKE complex: a novel link between mGluRI and PI 3-kinase." Trends Neurosci 27(11): 645-648.
- Iadecola, C. (1997). "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury." Trends Neurosci 20(3): 132-139.
- Jiang, Z. Y., Q. L. Zhou, *et al.* (2003). "Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing." Proc Natl Acad Sci U S A 100(13): 7569-7574.
- Johnson, M. P., E. S. Nisenbaum, *et al.* (2004). "Allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors: lessons learnt from mGlu1, mGlu2 and mGlu5 potentiators and antagonists." Biochem Soc Trans 32(Pt 5): 881-887.
- Kandel, E. S. and N. Hay (1999). "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." Exp Cell Res 253(1): 210-229.
- Kinney, G. G., J. A. O'Brien, *et al.* (2005). "A novel selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 5 has in vivo activity and antipsychotic-like effects in rat behavioral models." J Pharmacol Exp Ther 313(1): 199-206.
- Kitagawa, K., K. Takasawa, *et al.* (2002). "Differential Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in cultured neurons after exposure to glutamate in rats." Neurosci Lett 333(3): 187-190.
- Leite, M. F. a. N., M.H. 2001 (2001). "Ca²⁺ Signaling in the liver." In The liver: Biology and Pathobiology: pp. 537-554.
- Li, S. H. and X. J. Li (2004). "Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease." Trends Genet 20(3): 146-154.
- LIMA, R. R. (2006). "DEGENERAÇÃO NEURONAL SECUNDÁRIA E EXCITOTOXICIDADE." Revista Paraense de Medicina 21.
- Liu, F., X. Gong, *et al.* (2005). "The inhibition of glycogen synthase kinase 3beta by a metabotropic glutamate receptor 5 mediated pathway confers neuroprotection to Abeta peptides." J Neurochem 95(5): 1363-1372.
- Lo, W. D., R. Chen, *et al.* (1998). "Effect of neutrophil depletion in acute cerebritis." Brain Res 802(1-2): 175-183.
- Mao, L. and J. Q. Wang (2003). "Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons." Eur J Neurosci 17(4): 741-750.
- Mao, L., L. Yang, *et al.* (2005). "The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons." J Neurosci 25(10): 2741-2752.
- Marco A. ROMANO-SILVA, R. R.-S., Angela M. RIBEIRO, Marcus V. GOMEZ, Carlos R. DINIZ, Marta N. CORDEIRO e Michael J. BRAMMER (1993). "Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization." J. Biochem. 296: 313-319.
- Marino, M. J. and P. J. Conn (2006). "Glutamate-based therapeutic approaches: allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors." Curr Opin Pharmacol 6(1): 98-102.
- McConnell, J. L. and B. E. Wadzinski (2009). "Targeting protein serine/threonine phosphatases for drug development." Mol Pharmacol 75(6): 1249-1261.
- McGinty, J. F., X. D. Shi, *et al.* (2008). "Regulation of psychostimulant-induced signaling and gene expression in the striatum." J Neurochem 104(6): 1440-1449.

- Mejillano, M., M. Yamamoto, *et al.* (2001). "Regulation of apoptosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibition of caspases, and caspase inactivation of phosphatidylinositol phosphate 5-kinases." *J Biol Chem* 276(3): 1865-1872.
- Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." *J Nutr* 130(4S Suppl): 1007S-1015S.
- Menard, C. and R. Quirion (2012). "Successful cognitive aging in rats: a role for mGluR5 glutamate receptors, homer 1 proteins and downstream signaling pathways." *PLoS One* 7(1): e28666.
- Mitani, A., S. Namba, *et al.* (1998). "Postschismic enhancements of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptor-mediated responses in hippocampal CA1 pyramidal neurons." *J Cereb Blood Flow Metab* 18(10): 1088-1098.
- MOURA, P. R., VIDAL, FAP (2011). "Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G." *Scientia Medica (Porto Alegre)* 21.
- Movsesyan, V. A., B. A. Stoica, *et al.* (2004). "MGLuR5 activation reduces beta-amyloid-induced cell death in primary neuronal cultures and attenuates translocation of cytochrome c and apoptosis-inducing factor." *J Neurochem* 89(6): 1528-1536.
- Nakanishi, S. (1994). "Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity." *Neuron* 13(5): 1031-1037.
- Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal* 14(5): 381-395.
- Niswender, C. M. and P. J. Conn (2010). "Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322.
- Noshita, N., T. Sugawara, *et al.* (2003). "Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice." *Stroke* 34(6): 1513-1518.
- O'Brien, J. A., W. Lemaire, *et al.* (2004). "A novel selective allosteric modulator potentiates the activity of native metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rat forebrain." *J Pharmacol Exp Ther* 309(2): 568-577.
- Olive, M. F. (2009). "Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction." *Curr Drug Abuse Rev* 2(1): 83-98.
- Olive, M. F. (2010). "Cognitive effects of Group I metabotropic glutamate receptor ligands in the context of drug addiction." *Eur J Pharmacol* 639(1-3): 47-58.
- Olney, J. W. (1990). "Excitotoxicity: an overview." *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E: 47-57; discussion 57-48.
- Perkinton, M. S., J. Ip, *et al.* (2002). "Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurones." *J Neurochem* 80(2): 239-254.
- Pin, J. P. and R. Duvoisin (1995). "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." *Neuropharmacology* 34(1): 1-26.
- Price, D. L. (1999). "New order from neurological disorders." *Nature* 399(6738 Suppl): A3-5.
- Ribeiro, F. M., M. Paquet, *et al.* (2010). "Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(5): 574-595.
- Ribeiro, F. M., M. Paquet, *et al.* (2010). "Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease." *J Neurosci* 30(1): 316-324.
- Rong, R., J. Y. Ahn, *et al.* (2003). "PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis." *Nat Neurosci* 6(11): 1153-1161.
- Shipe, W. D., S. E. Wolkenberg, *et al.* (2005). "Recent advances in positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors." *Curr Opin Drug Discov Devel* 8(4): 449-457.
- Somogyi, P., G. Tamas, *et al.* (1998). "Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex." *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 113-135.

- Stys, P. K. (2005). "General mechanisms of axonal damage and its prevention." J Neurol Sci 233(1-2): 3-13.
- Tang, T. S., E. Slow, *et al.* (2005). "Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 102(7): 2602-2607.
- Tator, C. H. and M. G. Fehlings (1991). "Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms." J Neurosurg 75(1): 15-26.
- Tu, J. C., B. Xiao, *et al.* (1998). "Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors." Neuron 21(4): 717-726.
- Vonsattel, J. P., R. H. Myers, *et al.* (1985). "Neuropathological classification of Huntington's disease." J Neuropathol Exp Neurol 44(6): 559-577.
- Wang, L., B. Martin, *et al.* (2009). "Allosteric modulators of G protein-coupled receptors: future therapeutics for complex physiological disorders." J Pharmacol Exp Ther 331(2): 340-348.
- Warby, S. C., C. N. Doty, *et al.* (2009). "Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments." Mol Cell Neurosci 40(2): 121-127.
- Wisniewski, K. and H. Car (2002). "(S)-3,5-DHPG: a review." CNS Drug Rev 8(1): 101-116.
- Yamaura, I., K. Yone, *et al.* (2002). "Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression." Spine (Phila Pa 1976) 27(1): 21-26.
- Ye, K., K. J. Hurt, *et al.* (2000). "PDK1, a nuclear GTPase that enhances PI3kinase activity and is regulated by protein 4.1N." Cell 103(6): 919-930.
- Young, A. B. (2003). "Huntingtin in health and disease." J Clin Invest 111(3): 299-302.
- Zhang, Y., A. L. Rodriguez, *et al.* (2005). "Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes." J Pharmacol Exp Ther 315(3): 1212-1219.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 3/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Investigação da função do receptor MGLUR5 na ativação da quinase AKT e de sua sinalização subsequente, em conexão com a patologia da doença de huntington (DH)*", que tem como responsável(is) **Fabiola Mara Ribeiro**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **27/ 04/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 3/2011**, related to the project entitled "*na identification of mGluR5 receptor's role for activation of Akt kinase and subsequent signaling thereof, connected with a pathology of Huntington's disease (HD)*", under the supervisors of **Fabiola Mara Ribeiro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 27, 2011**.

This certificate expires in **April 27, 2016**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Cópia do Artigo submetido ao The Journal of Neuroscience

Journal section: Cellular and Molecular

**METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR 5 POSITIVE ALLOSTERIC MODULATORS ARE
NEUROPROTECTIVE IN A MOUSE MODEL OF HUNTINGTON'S DISEASE**

Abbreviated title: mGluR5 positive allosteric modulators are neuroprotective in HD

Juliana G. Dória^{1*}, Flavia R. Silva^{1,*}, Jessica M. de Souza², Luciene B. Vieira³, Helton J. Reis⁴,
Tomas Dobransky⁵ and Fabiola M. Ribeiro^{1,2#}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

* These authors contribute equally for this manuscript.

Corresponding author: Dr. Fabiola M. Ribeiro, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Ave. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil, CEP: 31270-901, Tel.: 55-31-3409-2655; fmribeiro@icb.ufmg.br.

Number of figures: 8

Number of pages: 32

Number of words for Abstract: 250 (max 250), *Introduction:* 475 (Max 500); and *Discussion:* 1380 (max 1500)

Keywords: metabotropic glutamate receptor 5, AKT, cell signaling, Huntington's disease, glutamate, cell death, calcium. **Abstract**

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion in the amino-terminal region of the huntingtin protein (Htt). The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is coupled to $G_{\alpha q}$ and plays an important role in neuronal survival. We have previously demonstrated that mGluR5 cell signalling pathways are altered in a mouse model of HD. Although mGluR5-dependent protective pathways are more activated in HD neurons, Ca^{2+} release from intracellular stores is also more pronounced, which could contribute to excitotoxicity. Thus, drugs acting on mGluR5 that could activate protective pathways without triggering high levels of Ca^{2+} release could be an interesting tool to prevent neuronal death. Based on this rationale, in the present study we aim to investigate whether mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) could be neuroprotective in HD. We find that the PAMs, CPPHA, DFB, VU1545, and CDPPB, can protect striatal neurons from the excitotoxic neuronal cell death promoted by elevated concentrations of glutamate. mGluR5 PAMs are capable of activating AKT without triggering increased intracellular Ca^{2+} concentration. AKT activation by PAMs appears to be very important for preventing neuronal death, as AKT blockage leads to loss of PAMs-mediated neuroprotection. Importantly, PAMs' potential as drugs to treat neurodegenerative diseases is highlighted by the neuroprotection exerted by mGluR5 PAMs on striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD. Moreover, VU1545 is more efficient to activate AKT in primary cultured BACHD striatal neurons than in wild type neurons, contributing to potentiate the neuroprotective effect of this PAM in HD.

Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion in the amino-terminal region of the huntingtin (Htt) protein (Huntington's disease collaborative Research Group, 1993). HD patients exhibit a progressive neuronal cell loss in the caudate-putamen and neocortical regions of the brain, which leads to loss of cognitive function, psychiatric disturbance, and death (Young, 2003; Li and Li, 2004).

Glutamate is postulated to play an important role in excitotoxic neuronal cell loss (DiFiglia, 1990; Nicoletti et al., 1996; Calabresi et al., 1999) (Ribeiro 2010). Although it is well established that overstimulation of ionotropic glutamate receptors, such as N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), lead to excitotoxicity, the role of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in neuronal cell death processes is not completely understood (Zeron et al., 2002; Schiefer et al., 2004). Group I mGluRs (mGluR1 and mGluR5) are coupled to the activation of $G\alpha_{q/11}$ proteins, which stimulate the activation of phospholipase C β 1 resulting in diacylglycerol and inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3) formation, release of Ca^{2+} from intracellular stores and activation of protein kinase C (PKC). Activation of mGluR1/5 expressed in neurons from a mouse model of HD leads to high levels of Ca^{2+} release from intracellular compartments, which can contribute to excitotoxic processes (Tang et al 2005; Ribeiro et al 2010). However, mGluR1/5 stimulation also leads to activation of other signaling pathways important for cell survival/proliferation, such as extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AKT (Rong et al., 2003; Hou and Klann, 2004; Mao et al., 2005). Interestingly, mGluR5 activation leads to higher levels of ERK and AKT activation in HD than in control neurons (Ribeiro et al. 2010). Thus, mGluR5 can produce either excitotoxicity or neuroprotection depending on which cell signalling pathway is activated.

To characterize drugs that could be neuroprotective in HD, we have investigated a

number of compounds acting on mGluR5. We find that neither blocking nor activating mGluR5 is effective to promote neuroprotection. The failure of mGluR5 agonists and antagonists to promote neuroprotection might be due to overstimulation of Ca^{2+} release or blockage of protective pathways, respectively. mGluR5 positive allosteric modulators (PAMs) can activate one signalling pathway without triggering others (Chen and Conn 2008, *Drugs Fut.* **33**, 355-365). Thus, we decided to investigate whether mGluR5 PAMs could have a neuroprotective role. We find that PAMs are capable of protecting neurons from glutamate induced neuronal cell death. Most tested PAMs are capable of activating AKT without promoting intracellular Ca^{2+} release and blockage of AKT stimulation abrogates PAMs mediated neuroprotection. PAMs are also capable of promoting neuroprotection in striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD, and one of the tested PAMs, VU1545, is more efficient to activate AKT and promote neuroprotection in BACHD neurons than in wild type (WT) neurons. Thus, our results indicate that mGluR5 PAMs exhibit the potential to prevent neuronal death as these drugs activate protective pathways without promoting increased Ca^{2+} release.

Material and Methods

Material: Neurobasal media, N2 and B27 supplements, glutamax (50 µg/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin), Fura-2, and Live/Dead viability assay were purchased from Life Technologies (Sao Paulo, Brazil). (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), [(3-Fluorophenyl)methylene]hydrazone-3-fluorobenzaldehyde (DFB), *N*-[1-(2-Fluorophenyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-yl]-4-nitrobenzamide (VU1545), and 3-Cyano-*N*-(1,3-diphenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)benzamide (CDPPB) were purchased from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody was from BioRad (Hercules, CA). ECL Western blotting detection reagents were from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Rabbit anti-phospho AKT and anti-AKT antibodies were from DB Biotech (Kosice, Slovak). *N*-{4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide (CPPHA), 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4*H*)-benzopyran-4-one hydrochloride (LY294002) and all other biochemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Sao Paulo, Brazil).

Mouse model: FVB/NJ (wild type) and FVB/N-Tg(HTT*97Q)IXwy/J (BACHD) transgenic mice (Gray M 2008, Neurobiology of Disease) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were housed in an animal care facility at 23°C on a 12 h light/12 h dark cycle with food and water provided *ad libitum*. Animal care was in accordance with the Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee in Animal experimentation, CETEA.

Neuronal primary culture preparation: Neuronal cultures were prepared from the striatal region of E15 mouse embryo brains. Animal procedures were approved by Ethics Committee in Animal experimentation, CETEA/UFMG. After dissection, striatal tissue was submitted to

trypsin digestion followed by cell dissociation using a fire-polished Pasteur pipette. Cells were plated on poly-L-ornithine coated dishes in neurobasal media supplemented with N2 and B27 supplements, 2 mM glutamax, 50 µg/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator and cultured for 10 to 12 days *in vitro* (DIV) with media replenishment every 4 days.

AKT activation experiments: Neuronal primary cultures from WT and BACHD embryos were incubated in Hank's balanced salt solution (HBSS) for 20 min at 37°C. Cultures were then stimulated with DHPG, CPPHA, DFB, VU1545, and CDPBB at concentrations indicated in the Figure Legends for 5 min at 37°C. When LY294002 was used, it was added 5 min prior to and kept during mGluR5 stimulation. Neurons were lysed in RIPA buffer (0.15 M NaCl, 0.05 M tris-HCl, pH 7.2, 0.05 M EDTA, 1% nonidet P40, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (1 mM AEBSF and 10 µg/ml of both leupeptin and aprotinin). 50 µg of total cellular protein for each sample were subjected to SDS-PAGE, followed by electroblotting onto nitrocellulose membranes.

Immunoblotting: Membranes were blocked with 5% BSA in wash buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.0, and 0.05% Tween 20) for 1h and then incubated with rabbit anti-phospho AKT (S473) (1:1000) antibodies in wash buffer containing 3% BSA for 2h at room temperature. Membranes were rinsed three times with wash buffer and then incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:5000 in wash buffer containing 3% skim milk for 1h. Membranes were rinsed three times with wash buffer and incubated with ECL Western blotting detection reagents. Antibodies were then stripped and membranes were incubated with anti-AKT (1:1000) for 2h and probed with secondary antibody to determine total AKT expression. Non-saturated, immunoreactive AKT bands were

quantified by scanning densitometry. Immuno-band intensity was calculated using ImageJ software and the number of pixels of AKT phospho-bands was divided by the number of pixels of total AKT to normalize phosphorylation levels of kinases to total kinase expression.

Cell death assay: Neurons were incubated for 20 hours with either vehicle or drug (glutamate, DHPG, MPEP, CPPHA, DFB, VU1545, CDPPB and/or LY294002), as indicated in the *Figure Legend*, and cell death was determined by Live/Dead viability assay, as described previously (Ribeiro et al, 2010). Briefly, neurons were stained with 2 μ M Calcein acetoxymethyl ester (AM) and 2 μ M ethidium homodimer-1 for 15 min and the fraction of live (Calcein AM positive) and dead (ethidium homodimer-1 positive) cells were determined. Neurons were visualized by fluorescence microscopy and images were captured using a Floid™ Cell Imaging Station (Life Technologies; Foster City, CA). Images were captured and scored by a blinded observer and a minimum of 300 cells were analyzed per well in triplicate using ImageJ software. Dead cells were expressed as a percentage of the total number of cells.

Measurement of intracellular Ca^{2+} concentration: Neuronal primary cultures from WT and BACHD embryos seeded on 12 mm coverslips were loaded with 0.2 μ M fura-2 AM for 20 min at 37°C. Coverslips were washed with HBSS and inserted into a cuvette filled with 2 mL of HBSS. Neurons were stimulated with 10 μ M CPPHA, 10 μ M DFB, 10 μ M VU1545, 10 μ M CDPPB, 10 μ M DHPG or 30 mM KCl and illuminated with alternating 345- and 380-nm light, with the 510-nm emission detected using a PTI spectrofluorimeter. Baseline (60 sec) measurements were obtained before addition of agonist. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was calibrated using the method of Grynkiewicz et al. (Grynkiewicz et al., 1985). The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promoted by depolarization induced by 30 mM KCl was taken as 100%.

Data Analysis: Means \pm SEM are shown for the number of independent experiments indicated in *Figure Legends*. GraphPad Prism software was used to analyze data for statistical significance and for curve fitting. Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) testing followed by post-hoc Multiple Comparison testing.

Results:

Neither activation nor blockage of mGluR5 is efficient to protect against glutamate induced neuronal cell death.

Increased levels of glutamate promote neuronal cell death by activating excitotoxic mechanisms mainly due to augmentation of cytosolic Ca^{2+} concentration (DiFiglia, 1990; Nicoletti et al., 1996; Calabresi et al., 1999). Primary cultured striatal neuronal stimulated with 50 μM glutamate for 20h exhibited $29.46 \pm 0.7\%$ neuronal cell death above basal levels (Fig. 1). Higher levels of glutamate, such as 100 and 250 μM glutamate, promoted $36.82 \pm 2.1\%$ and $52.23 \pm 3.5\%$ neuronal cell death, respectively (data not shown). Glutamate-mediated excitotoxic neuronal cell death occurs mainly via NMDAR activation, although, group 1 mGluRs stimulation also play a role in this cell death process (DiFiglia, 1990; Nicoletti et al., 1996; Calabresi et al., 1999). As it is not clear whether mGluR1/5 activation can exacerbate or protect against neuronal cell death, we decided to investigate whether either MPEP, which is an mGluR5 negative allosteric modulator (NAM) that acts as an inverse agonist, or DHPG, which is a mGluR1/5 agonist, could protect against glutamate induced neuronal cell death. MPEP was not efficient to protect neurons from glutamate induced neuronal cell death (Fig. 1E). Moreover, MPEP in the absence of glutamate was neurotoxic (Fig. 1E). DHPG treatment decreased glutamate induced neuronal death; however the difference in neuronal death between cells treated with glutamate and glutamate + DHPG did not reach statistical significance (Fig. 1E). mGluR5 can both increase cytosolic Ca^{2+} concentration and activate protective pathways (Rong et al., 2003; Hou and Klann, 2004; Mao et al., 2005). Thus, the failure of mGluR5 agonists and antagonists to promote neuroprotection might be due to overstimulation of Ca^{2+} release and blockage of protective pathways, respectively.

mGluR5 PAMs activate AKT without increasing intracellular Ca²⁺ concentration and p against glutamate induced neuronal cell death.

Drugs acting on mGluR5 that could activate protective pathways, such as AKT, but without triggering Ca²⁺ release, might have effective neuroprotective actions. It has been demonstrated that mGluR5 PAMs can activate one signalling pathway without triggering others (Chen and Conn 2008, *Drugs Fut.* **33**, 355-365). Thus, we decided to investigate whether PAMs in the absence of agonist were able to promote AKT activation without triggering Ca²⁺ release. To test that, striatal neuronal cultures were labeled with FURA2-AM and stimulated with 10 μM CPPHA, 10 μM DFB, 10 μM VU1545, 10 μM CDPPB, 10 μM DHPG, or 30 mM KCl. DFB, VU1545 and CDPPB did not promote an increase in [Ca²⁺]_i above basal levels (Fig. 2). CPPHA increased [Ca²⁺]_i above basal levels; however CPPHA stimulated Ca²⁺ release was inferior to that promoted by DHPG (Fig. 2). DHPG promoted an increase in [Ca²⁺]_i that was 62.87 ± 10,0% of that promoted by 30 mM KCl depolarization (Fig. 2).

To determine whether PAMs could activate AKT in the absence of an mGluR5 agonist, we stimulated primary cultured striatal neurons with PAMs and determined AKT phosphorylation by Western blot experiments. 10 and 100 μM CPPHA promoted a slight increase in AKT activation (Fig. 3A and 3B). However, statistical analysis indicated that AKT activation by CPPHA was not different from AKT basal activation levels (Fig. 3A and 3B). 10 μM DFB was not sufficient to activate AKT above basal levels (Fig. 3C and 3D). However, 100 μM DFB was efficient to promote AKT activation above basal levels and DFB-mediated AKT activation was as robust as that promoted by 10 μM DHPG (Fig. 3C and 3D). In addition, both VU1545 at the concentration of 10 and 100 μM (Fig. 3E and 3F) and CDPPB also at the concentration of 10 and 100 μM (Fig. 3G and 3H) activated AKT above basal levels as robustly as 10 μM DHPG. As VU1545 and CDPPB promoted AKT phosphorylation as efficiently at the concentration of 10 μM as at the concentration of 100 μM, we decided to test whether these

drugs could activate AKT when employed at lower concentrations. Both VU1545 (Fig. 4A and 4B) and CDPPB (Fig. 4C and 4D) at the concentrations of 0.1 and 1 μ M were efficient to promote AKT activation above basal levels. Moreover, AKT activation by VU1545 (Fig. 4A and 4B) and CDPPB (Fig. 4C and 4D) at the concentrations of 0.1 and 1 μ M were as efficient as 10 μ M DHPG to promote AKT activation. These data indicate that mGluR5 PAMs can activate AKT in the absence of an mGluR5 agonist, having the potential to be neuroprotective. Moreover low doses of VU1545 and CDPPB could be sufficient to induce neuroprotection.

As most tested mGluR5 PAMs were efficient to activate AKT without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$, we decided to test whether these drugs could be neuroprotective. To investigate that, primary cultured striatal neurons were treated with glutamate in the presence or absence of PAMs for 20h. Neuronal cell death induced by 50 and 100 μ M glutamate was significantly reduced by co-stimulating the cultures with CPPHA, DFB, VU1545, and CDPPB at the concentration of 10 (Fig. 5A) and 1 μ M (Fig. 5B). These data highlights the potential of mGluR5 PAMs as neuroprotective drugs.

PAMs neuroprotective effect is dependent on AKT activation.

To determine whether AKT activation by PAMs was important for mGluR5 PAMs neuroprotective effect, we have blocked AKT stimulation by using a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitor, LY294002. PI3K is responsible for phosphorylating AKT on the serine-473, promoting AKT activation (Rong 2003). Thus, blocking PI3K with LY293002 leads to AKT inhibition. Western blot experiments indicated that primary cultured striatal neurons that were pre-incubated with 25 μ M LY294002 for 5 min prior to 10 μ M VU1545 stimulation for 5 min exhibited no AKT phosphorylation above basal levels (data not shown). To test whether AKT activation by VU1545 was responsible for VU1545 induced neuroprotection, we have added 25 μ M LY294002 to primary cultured striatal neurons that were treated with either 50

μM glutamate or 50 μM glutamate + 1 μM VU1545 for 20h. VU1545 neuroprotection against glutamate induced neuronal cell death was eliminated by the addition of 25 μM LY294002 (Fig. 6). These data indicate that VU1545-mediated neuroprotection is dependent on AKT activation.

mGluR5 PAMs can protect striatal neurons from a mouse model of HD against glutamate induced neuronal cell death.

To test whether mGluR5 PAMs could be an efficient neuroprotective drug in neurodegenerative diseases, we have tested these compounds in primary cultured striatal neurons from a mouse model of HD, BACHD. Neuronal cell death induced by glutamate was slightly higher in BACHD neurons than in WT neurons (Fig. 7). However, this difference did not reach statistical significance. When both WT and BACHD neurons were co-stimulated with 1 μM CPPHA (Fig. 7A), 1 μM DFB (Fig. 7B), 1 μM VU1545 (Fig. 7C), and 1 μM CDPPB (Fig. 7D), glutamate induced neuronal cell death was significantly reduced. Interestingly, VU1545 neuroprotective effect appeared higher in BACHD neurons than in WT neurons (Fig. 7C). Supporting these observations, statistical analysis (two-way ANOVA) indicated that there is a significant interaction between genotype and VU1545 treatment [$\pm(2.030)=3,446$; $p=0.045$].

We have previously demonstrated that AKT activation by DHPG appeared more pronounced in neurons from a knock-in mouse model of HD than in control mice, although these difference did not reach statistical significance (Ribeiro et al 2010). Thus, we decided to investigate whether the increased neuroprotective effect of VU1545 in BACHD neurons could be due to increased AKT activation in BACHD striatal neurons. To test that, primary cultured striatal neurons from WT and BACHD embryos were stimulated with either 10 μM DHPG or 10 μM VU1545. 10 μM DHPG promoted AKT activation in BACHD neurons to the same levels as those observed in WT neurons (Fig. 8A and 8B). However, VU1545-mediated AKT

phosphorylation was more pronounced in BACHD neurons than in WT neurons (Fig. 8A and 8B).

Stimulation of striatal neurons from a knock-in and from a transgenic mouse model of HD with either glutamate or DHPG causes increased $[Ca^{2+}]_i$, as compared to that observed in neurons from control mice (Tang et al 2003, Tang et al 2005, Ribeiro et al 2010). VU1545 did not increase $[Ca^{2+}]_i$ in WT striatal neurons above basal levels (Fig. 2). To test the effect of VU1545 on $[Ca^{2+}]_i$ in BACHD neurons, primary cultured striatal neurons from BACHD mice were labeled with FURA2-AM and stimulated with 10 μ M VU1545. As observed in the case of WT neurons, VU1545 did not promote an increase in BACHD neurons $[Ca^{2+}]_i$ above basal levels (data not shown). Moreover, the levels of $[Ca^{2+}]_i$ in BACHD neurons were not different of those observed in WT neurons (data not shown). Taken together, these data indicate that VU1545 does not trigger increased $[Ca^{2+}]_i$ when stimulating either BACHD or WT striatal neurons. Moreover, VU1545 can be more efficient to promote AKT phosphorylation and neuroprotection in BACHD than in WT neurons.

Discussion

The loss of neuronal tissue is the main factor leading to the development of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and HD (Donev R, Kolev M 2009, J Cell Mol Med 4329-48; Bagetta V, Ghiglieri V 2010 Biochem Soc Trans 493-7; Vonsattel 1985, Ribeiro 2011 Molecular Neurobiology). Thus, a drug that could protect neurons from cell death processes would be an important therapeutic tool to treat such diseases. In the present study we show that mGluR5 PAMs, such as CPPHA, DFB, VU1545, and CDPFB, have a significant neuroprotective effect, reducing glutamate induced neuronal cell death. mGluR5 PAMs are capable of activating AKT without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, mGluR5 PAMs neuroprotective effect is dependent on AKT activation, as blockage of this kinase leads to loss of PAMs-mediated neuroprotection. Importantly, PAMs potential as drugs to treat neurodegenerative diseases is highlighted by the neuroprotection exerted by PAMs on BACHD neurons stimulated with excitotoxic concentrations of glutamate. Moreover, VU1545 is more efficient to activate AKT in primary cultured BACHD striatal neurons, which seems to potentiate the neuroprotective effect of this drug.

mGluR5 stimulation can lead to activation of pathways that can either protect neurons from cell death or exacerbate neurotoxicity (Zeron 2002, Shiefer 2004, Tang 2005, Bruno 2001, Baskis 2005). Activation of intracellular Ca^{2+} release by mGluR5 occurs via $G\alpha_{q/11}$ proteins, leading to activation of phospholipase $C\beta_1$ and InsP3 production. High levels of $[Ca^{2+}]_i$ can contribute to excitotoxic processes, exacerbating neuronal death (Orrenius S, Zhivotovsky B, 2003, Nat Rev Mol Cell Biol 552-65). Moreover, mGluR5 contributes to NMDAR activation, which may also add to neurotoxicity as NMDAR stimulation is intimately associated with excitotoxic neuronal cell death (Awad H 2000 J Neurosci 20, 7871-9). In agreement with this rationale, mGluR5 blockage with MPEP decreases glutamate-induced apoptosis of striatal neurons from a transgenic HD mouse model (Tang et al., 2005). However, our data show

opposite results, as we have demonstrated that MPEP is not capable of reducing glutamate induced neuronal cell death (Fig. 1). In addition, MPEP is neurotoxic when applied in the absence of glutamate (Fig. 1). We have stimulated the neurons with glutamate in the presence or absence of MPEP for 20h, instead of 8h as performed by (Tang et al 2005). Thus, it is possible that MPEP could be neuroprotective initially as it blocks Ca^{2+} release, but, as it also blocks activation of protective pathways, it becomes toxic when applied for longer periods. In addition to activating Ca^{2+} release via InsP3 receptors, mGluR5 can also activate neuroprotective pathways, such as ERK1/2 and AKT (Mao 2005, Rong 2003). Consistent with a mGluR5 neuroprotective role, it has been shown that DHPG can protect against NMDAR induced neuronal cell death (Bruno et al., 2001; Baskys et al., 2005). We have shown here that DHPG offers a tendency to be neuroprotective against glutamate induced neuronal cell death. However, this neuroprotection is not statistically significant (Fig. 1). In addition to activate neuroprotective pathways, DHPG also triggers Ca^{2+} release from intracellular stores, which might contribute to excitotoxicity. We hypothesize that neither blocking mGluR5 with MPEP nor activating it with DHPG is the best strategy to promote neuroprotection.

The activation of AKT by group I mGluRs involves PI3K and phosphoinositide-dependent kinase (PDK1) (Rong et al., 2003; Hou and Klann, 2004). A PI3K enhancer (PIKE) couples group I mGluRs to PI3K via Homer proteins (Rong et al., 2003). Importantly, formation of the functional complex mGluR1-Homer-PIKE allows PI3K activation by PIKE, which results in reduced apoptosis (Rong et al., 2003). Thus, activation of AKT by mGluR5 appears to be independent of the InsP3/ Ca^{2+} pathway. It has been demonstrated that mGluR5 PAMs have the potential to activate one signalling pathway without triggering others (Chen and Conn 2008, *Drugs Fut.* **33**, 355-365; Zhang Y and Rodriguez 2005). Stimulation of cortical astrocytes with DFB, CPPHA and CDPPB in the absence of mGluR5 agonist fails to increase Ca^{2+} release above basal levels (Zhang Y and Rodriguez 2005, Bradley SJ, Watson JM *Molecular Pharmacology* 2009). However, DFB and CPPHA increase ERK1/2 activation even in the

absence of mGluR5 agonist in cortical astrocytes (Zhang Y and Rodriguez 2005). Moreover, primary cultured cortical neurons treated with CDPBB exhibit high levels of ERK1/2 activation (Chen T 2012, Neurochem Res). As mGluR5 activates ERK1/2 and AKT in a similar manner, which occurs via HOMER, we decided to investigate whether mGluR5 PAMs could activate AKT in the absence of agonist. Our data show that mGluR5 PAMs are efficient to activate AKT without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$. AKT activation by mGluR5 PAMs appears to be essential for preventing glutamate induced neuronal death, as blockage of AKT activation abrogates PAMs induced neuroprotection.

CPPHA stimulation promotes a slight increase in AKT activation; however this increase is not statistically different from basal AKT activation (Fig. 3). Despite of not being able to robustly activate AKT, CPPHA, as the other tested mGluR5 PAMs, offers neuroprotection against glutamate induced cell death (Fig. 5). AKT is not the only protective pathway activated by mGluR5, as it has been demonstrated that stimulation of this receptor can also activate ERK1/2, promoting neuroprotection (Mao 2005). Supporting this hypothesis, it has been demonstrated that administration of CPPHA to cortical astrocytes stimulates increased ERK1/2 activation (Zhang 2005). Thus, it is possible that CPPHA, as well as other PAMs, could also activate ERK1/2 to promote neuroprotection. Moreover, it is also possible that a different dose of CPPHA, as well as a different period of stimulation with this drug could have led to robust AKT activation. Neurons were incubated with drugs for 20h during cell death experiments and only for 5 min in the case of AKT activation assays. Therefore, although we do not observe AKT activation when neurons are stimulated for 5 min with CPPHA, we cannot rule out the possibility that the neuroprotection offered by CPPHA when this drug is applied for 20h is dependent on AKT. Thus, CPPHA neuroprotective mechanism might involve AKT activation, as well as other protective pathways, and further experiments will be important to elucidate this point.

AKT activation can protect against neuronal death (Datta et al., 1999; Kandel and Hay, 1999). Moreover, AKT can also promote phosphorylation of mutated Htt protein, which functions to reduce Htt aggregate formation and neuronal cell death, providing a protective pathway in HD (Humbert et al., 2002; Warby et al., 2009). We and others have shown that basal AKT phosphorylation is increased in HD (Gines 2003, Ribeiro 2010). Furthermore, basal AKT activation appears to be dependent on glutamate receptors as both NMDAR antagonist MK801 and mGluR5 antagonist MPEP decrease AKT activation in HD neurons to WT levels (Gines 2003, Ribeiro 2010). DHPG mediated AKT activation in striatal neurons from a knock-in (Ribeiro et al 2010) and a transgenic (Fig. 8) mouse model of HD is not different from that observed in control neurons. Interestingly, VU1545 promotes higher levels of AKT activation in BACHD striatal neurons than in WT neurons (Fig. 8). Moreover, VU1545 appears more efficient to prevent cell death of BACHD neurons than of WT neurons (Fig. 7). These data highlights the potential of mGluR5 PAMs, especially VU1545, as therapeutic tools to prevent the neuronal cell death that takes place in HD.

mGluR5 PAMs are very selective to mGluR5 and are currently being tested to treat other disorders of the central nervous system (Ritzen et al. 2005, *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**, 202-213; Conn et al. 2009, *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 25–31; Rodriguez AL, Conn PJ *Mol Pharmacol.* 2010 Dec;78(6):1105-23). *In vivo* animal tests and human clinical trials indicate that mGluR5 PAMs might be a good therapeutic option to treat schizophrenia, exhibiting low toxicity and being well tolerated by patients (Rodriguez AL, Conn PJ *Mol Pharmacol.* 2010 Dec;78(6):1105-23; Spear N, *Eur J Pharmacol.* 2011 Jun 1;659(2-3):146-54; Gray et al. 2012, *Curr. Pharm. Biotechnol., Epub ahead of print*). The data presented here demonstrate that mGluR5 PAMs can activate AKT without promoting increased $[Ca^{2+}]_i$, offering neuroprotection against glutamate induced neurotoxicity. Moreover, VU1545 activates AKT and protects neurons from a mouse model of HD in a more robust manner than that observed in the case of WT neurons. Thus PAMs are potential drugs to treat neurodegenerative

diseases, especially HD. As HD diagnostic can be established early in life by genotypic tests, mGluR5 PAMs could be used to slow neuronal loss and, consequently, disease progression.

Acknowledgements

We thank L. R. Souza for technical assistance. This work was supported by CNPq grant to F. M. R. and by the grant from the Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic to T. D.

Abbreviations

HD, Huntington's disease; Htt, huntingtin; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; mGluR, metabotropic glutamate receptor; InsP3, inositol-1,4,5-triphosphate; PKC, protein kinase C; ERK, extracellular signal-regulated kinase; PAM, positive allosteric modulator; NAM, negative allosteric modulator; DHPG, (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine; MPEP, 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine; DFB, [(3-Fluorophenyl)methylene]hydrazone-3-fluorobenzaldehyde; VU1545, *N*-[1-(2-Fluorophenyl)-3-phenyl-1*H*-pyrazol-5-yl]-4-nitrobenzamide; CDPPB, 3-Cyano-*N*-(1,3-diphenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)benzamide; CPPHA, *N*-{4-Chloro-2-[(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide; LY294002, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4*H*)-benzopyran-4-one hydrochloride; DIV, days *in vitro*; HBSS, Hank's balanced salt solution; ANOVA, analysis of variance (ANOVA); $[Ca^{2+}]_i$, intracellular Ca^{2+} concentration; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase; and PIKE, PI3K enhancer.

Reference List

Alagarsamy S, Marino MJ, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Conn PJ (1999) Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nat Neurosci* 2:234-240.

Alagarsamy S, Saugstad J, Warren L, Mansuy IM, Gereau RW, Conn PJ (2005) NMDA-induced potentiation of mGluR5 is mediated by activation of protein phosphatase 2B/calcineurin. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1:135-145.

Anborgh PH, Godin C, Pampillo M, Dhimi GK, Dale LB, Cregan SP, Truant R, Ferguson SS (2005) Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. *J Biol Chem* 280:34840-34848.

Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J (2005) Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1:146-156.

Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW (1991) Chronic quinolic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 11:1649-1659.

Bruno V, Battaglia G, Copani A, Cespedes VM, Galindo MF, Cena V, Sanchez-Prieto J, Gasparini F, Kuhn R, Flor PJ, Nicoletti F (2001) An activity-dependent switch from facilitation to inhibition in the control of excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 13:1469-1478.

Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Bernardi G (1999) Metabotropic glutamate receptors and cell-type-specific vulnerability in the striatum: implication for ischemia and Huntington's disease. *Exp Neurol* 158:97-108.

Catania MV, Aronica E, Sortino MA, Canonico PL, Nicoletti F (1991) Desensitization of metabotropic glutamate receptors in neuronal cultures. *J Neurochem* 56:1329-1335.

Chen N, Luo T, Wellington C, Metzler M, McCutcheon K, Hayden MR, Raymond LA (1999) Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* 72:1890-1898.

Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 13:1407-1420.

Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905-2927.

Dhami GK, Anborgh PH, Dale LB, Sterne-Marr R, Ferguson SS (2002) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 277:25266-25272.

Dhami GK, Babwah AV, Sterne-Marr R, Ferguson SS (2005) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 1 signaling requires g protein-coupled receptor kinase 2 binding to the second intracellular loop. *J Biol Chem* 280:24420-24427.

Dhami GK, Ferguson SS (2006) Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* 111:260-271.

DiFiglia M (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13:286-289.

Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park DS, Slack RS (2001) APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 155:207-216.

Gines S, Ivanova E, Seong IS, Saura CA, MacDonald ME (2003) Enhanced Akt signaling is an early pro-survival response that reflects N-methyl-D-aspartate receptor activation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *J Biol Chem* 278:50514-50522.

Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544-553.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.

Hou L, Klann E (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24:6352-6361.

Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2:831-837.

Kandel ES, Hay N (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.

Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20:146-154.

Lu YM, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz JM, Roder JC (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17:5196-5205.

Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, Wang JQ (2005) The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci* 25:2741-2752.

Nakanishi S (1994) Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-1037.

Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knopfel T (1996) Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19:267-271.

Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731-736.

Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.

Ribeiro FM, Pinthong M, Black SA, Gordon AC, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2007) Regulated recycling and plasma membrane recruitment of the high-affinity choline transporter. *Eur J Neurosci* 26:3437-3448.

Ribeiro FM, Ferreira LT, Paquet M, Cregan T, Ding Q, Gros R, Ferguson SSG (2009) Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor 5 desensitization and internalization by G protein-coupled receptor kinase 2 in striatal neurons. *J Biol Chem* 284:23444-53.

Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, van den Pol AN, Olney JW (1995) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 355:455-469.

Ronesi JA, Huber KM (2008) Homer interactions are necessary for metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression and translational activation. *J Neurosci* 28:543-547.

Rong R, Ahn JY, Huang H, Nagata E, Kalman D, Kapp JA, Tu J, Worley PF, Snyder SH, Ye K (2003) PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat Neurosci* 6:1153-1161.

Schiefer J, Sprunken A, Puls C, Luesse HG, Milkereit A, Milkereit E, Johann V, Kosinski CM (2004) The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP and the mGluR2 agonist LY379268 modify disease progression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* 1019:246-254.

Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF (2001) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276:24713-24718.

Tang TS, Slow E, Lupu V, Stavrovskaya IG, Sugimori M, Llinas R, Kristal BS, Hayden MR, Bezprozvanny I (2005) Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2602-2607.

Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, Hayden MR, Bezprozvanny I (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39:227-239.

Tappe A, Klugmann M, Luo C, Hirlinger D, Agarwal N, Benrath J, Ehrenguber MU, During MJ, Kuner R (2006) Synaptic scaffolding protein Homer1a protects against chronic inflammatory pain. *Nat Med* 12:677-681.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971-983.

Vonsattel JP, DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.

Warby SC, Doty CN, Graham RK, Shively J, Singaraja RR, Hayden MR (2009) Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol Cell Neurosci* 40:121-127.

Wheeler VC, Auerbach W, White JK, Srinidhi J, Auerbach A, Ryan A, Duyao MP, Vrbanac V, Weaver M, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME (1999) Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum Mol Genet* 8:115-122.

Young AB (2003) Huntingtin in health and disease. *J Clin Invest* 111:299-302.

Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 17:41-53.

Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849-860.

Figure 1

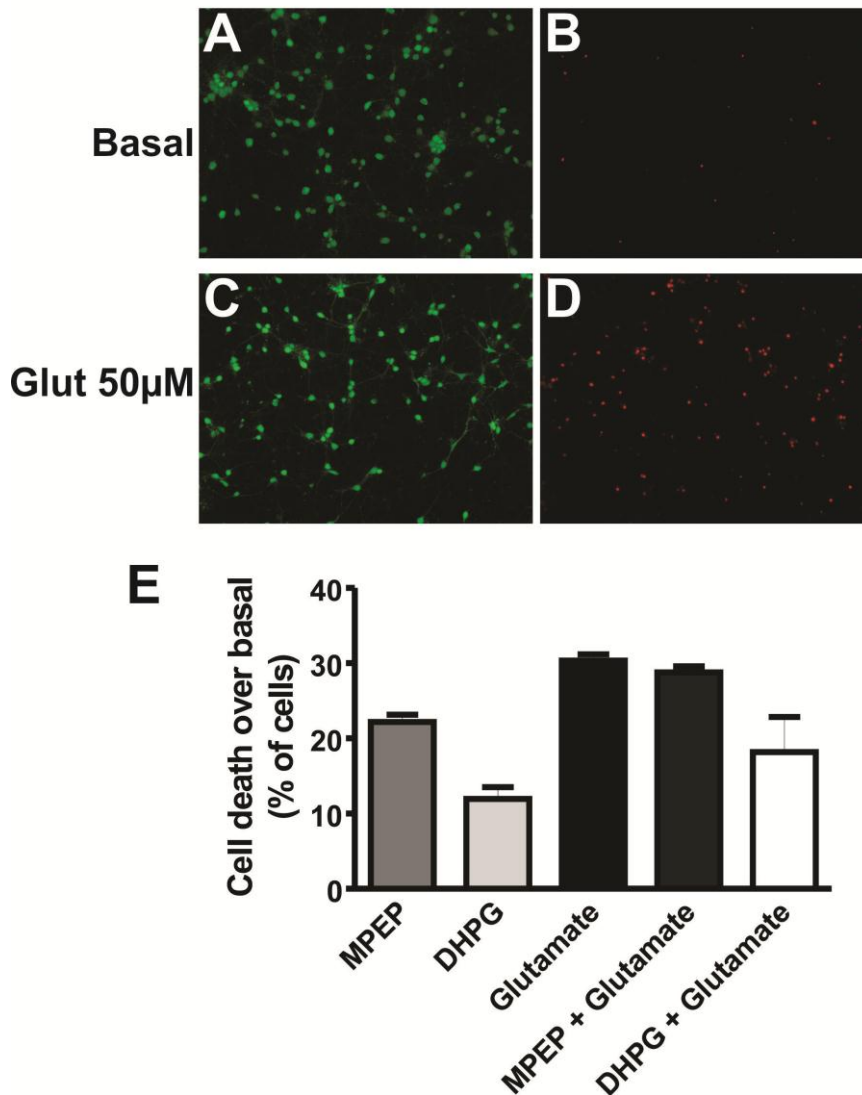


Figure 1: MPEP and DHPG do not protect against glutamate induced neuronal cell death. Shown is a representative image for primary cultured striatal neurons labeled with calcein AM (A, green, live cells) and ethidium homodimer-1 (B, red, dead cells) exhibiting basal neuronal death. Also shown is a representative image for primary cultured striatal neurons treated with 50 μM glutamate for 20h and labeled with calcein AM (C) and ethidium homodimer-1 (D). Graph shows percentage of neuronal cell death in primary cultured striatal neurons that were treated with 10 μM MPEP, 10 μM DHPG, 50 μM glutamate, 10 μM MPEP + 50 μM glutamate, and 10 μM DHPG +

50 μM glutamate for 20 hours. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments.

Figure 2

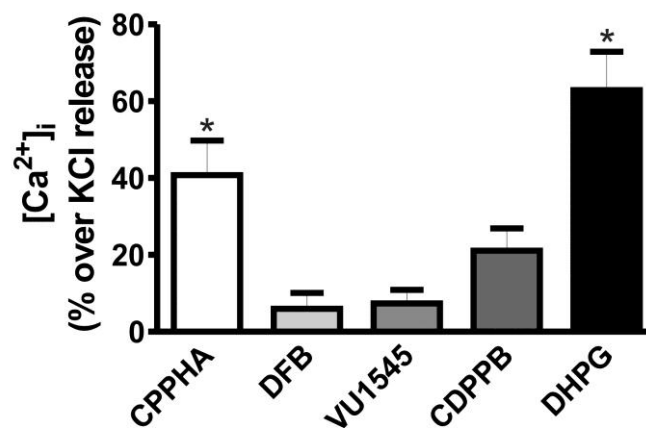


Figure 2: *mGluR5* PAMs do not promote increased intracellular Ca^{2+} concentration. Graph shows intracellular Ca^{2+} concentration in primary cultured striatal neurons stimulated with 10 μM CPPHA, 10 μM DFB, 10 μM VU1545, 10 μM CDPPB, and 10 μM DHPG. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments expressed as percentage of 30 mM KCl induced Ca^{2+} release. Asterisks indicate significant differences as compared to basal Ca^{2+} release ($p < 0.05$).

Figure 3

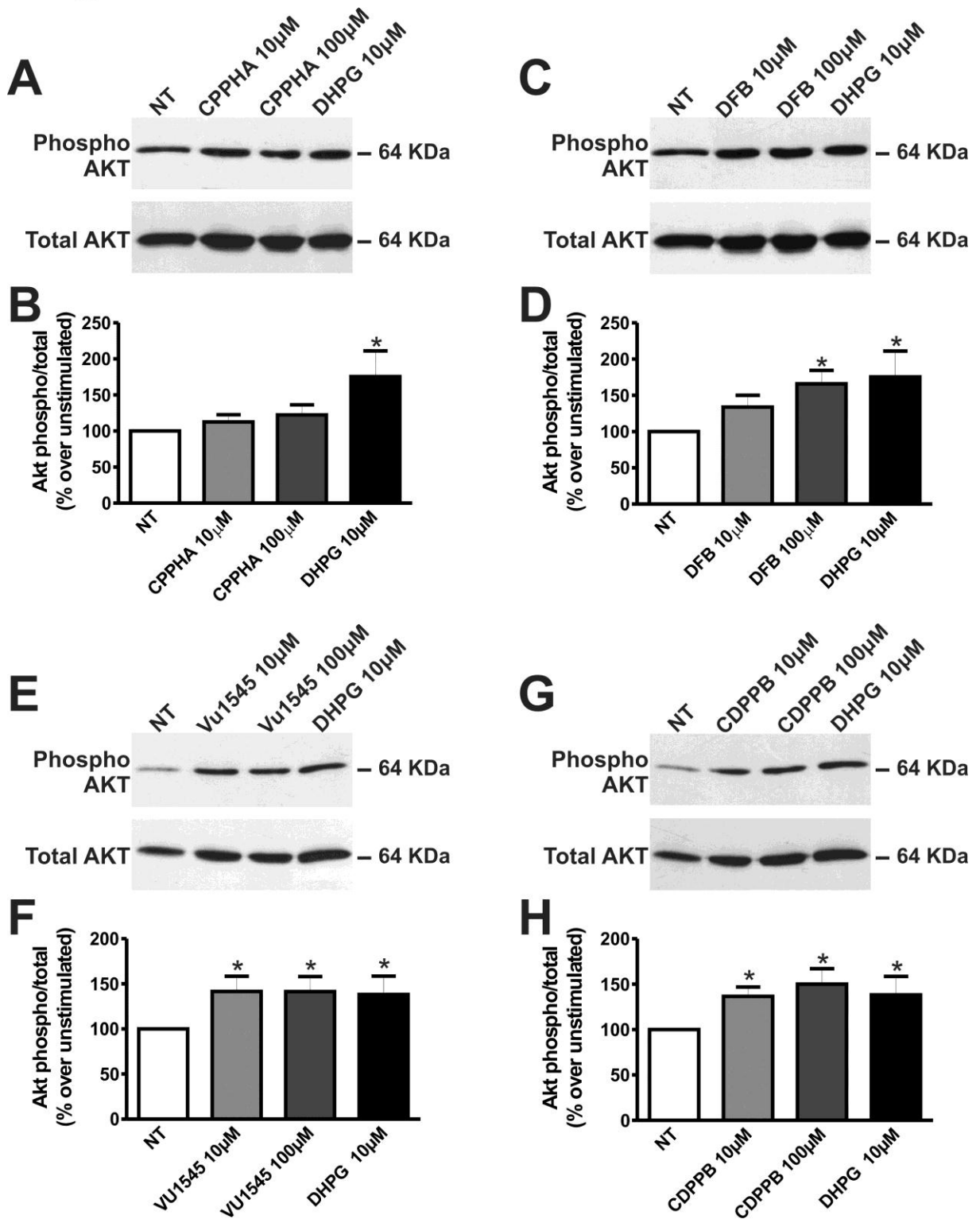


Figure 3: DFB, VU1545, and CDPPB promote AKT activation. Shown are representative immunoblots for phospho- (*upper panel*) and total-AKT expression (*lower panel*) in primary cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10 μ M DHPG, 10 or 100

μM CPPHA **(A)**, 10 or 100 μM DFB **(C)**, 10 or 100 μM VU1545 **(E)**, and 10 or 100 μM CDPPB **(G)** for 5 min. 100 μg of cell lysate is used for each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in primary cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10 μM DHPG, 10 or 100 μM CPPHA **(B)**, 10 or 100 μM DFB **(D)**, 10 or 100 μM VU1545 **(F)**, and 10 or 100 μM CDPPB **(H)** for 5 min. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal AKT phosphorylation. Asterisks indicate significant differences as compared to untreated neurons ($p < 0.05$).

Figure 4

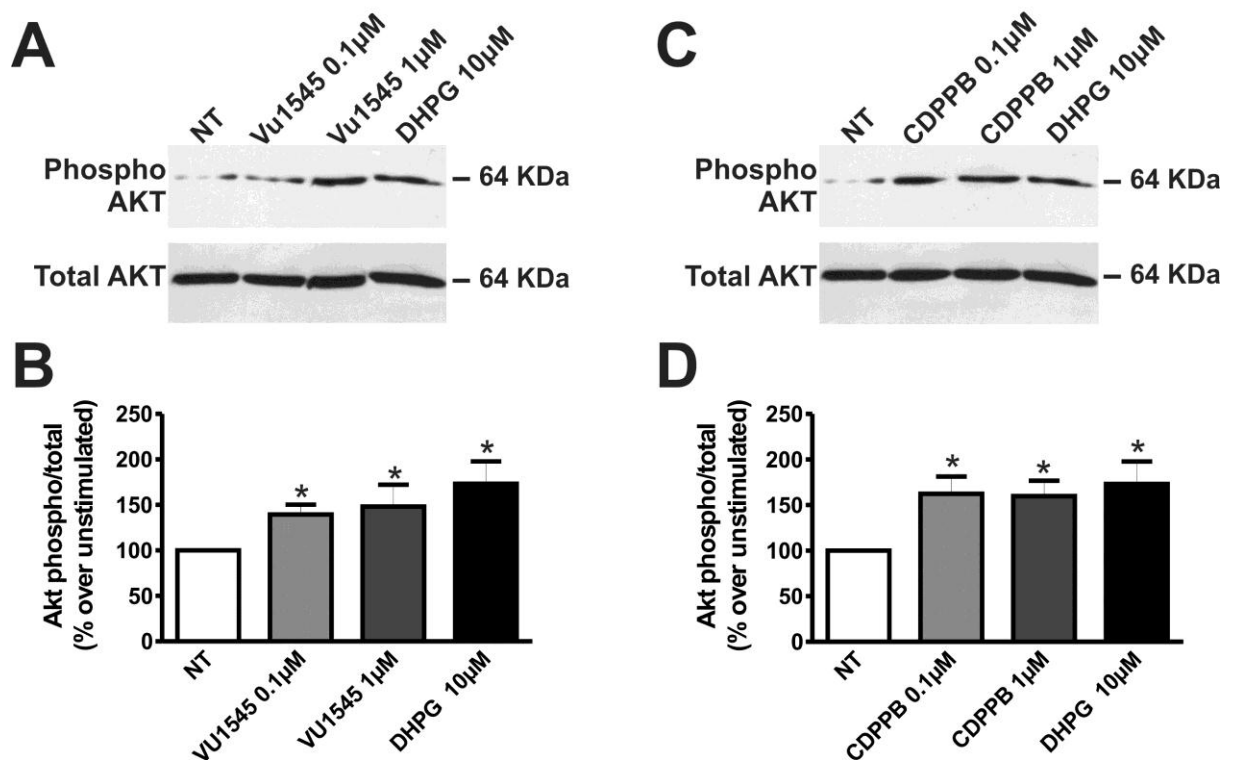


Figure 4: VU1545 and CDPPB promote AKT activation even at lower concentrations. Shown are representative immunoblots for phospho- (*upper panel*) and total-AKT expression (*lower panel*) in primary cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10 μM DHPG, 0.1 or 1 μM VU1545 **(A)**, and 0.1 or 1 μM CDPPB **(C)** for 5 min. 100 μg of cell lysate is used for

each sample. Graphs show the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in primary cultured striatal neurons that were either untreated (NT) or treated with 10 μ M DHPG, 0.1 or 1 μ M VU1545 (**B**), and 0.1 or 1 μ M CDPPB (**D**) for 5 min. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal AKT phosphorylation. Asterisks indicate significant differences as compared to untreated neurons ($p < 0.05$).

Figure 5

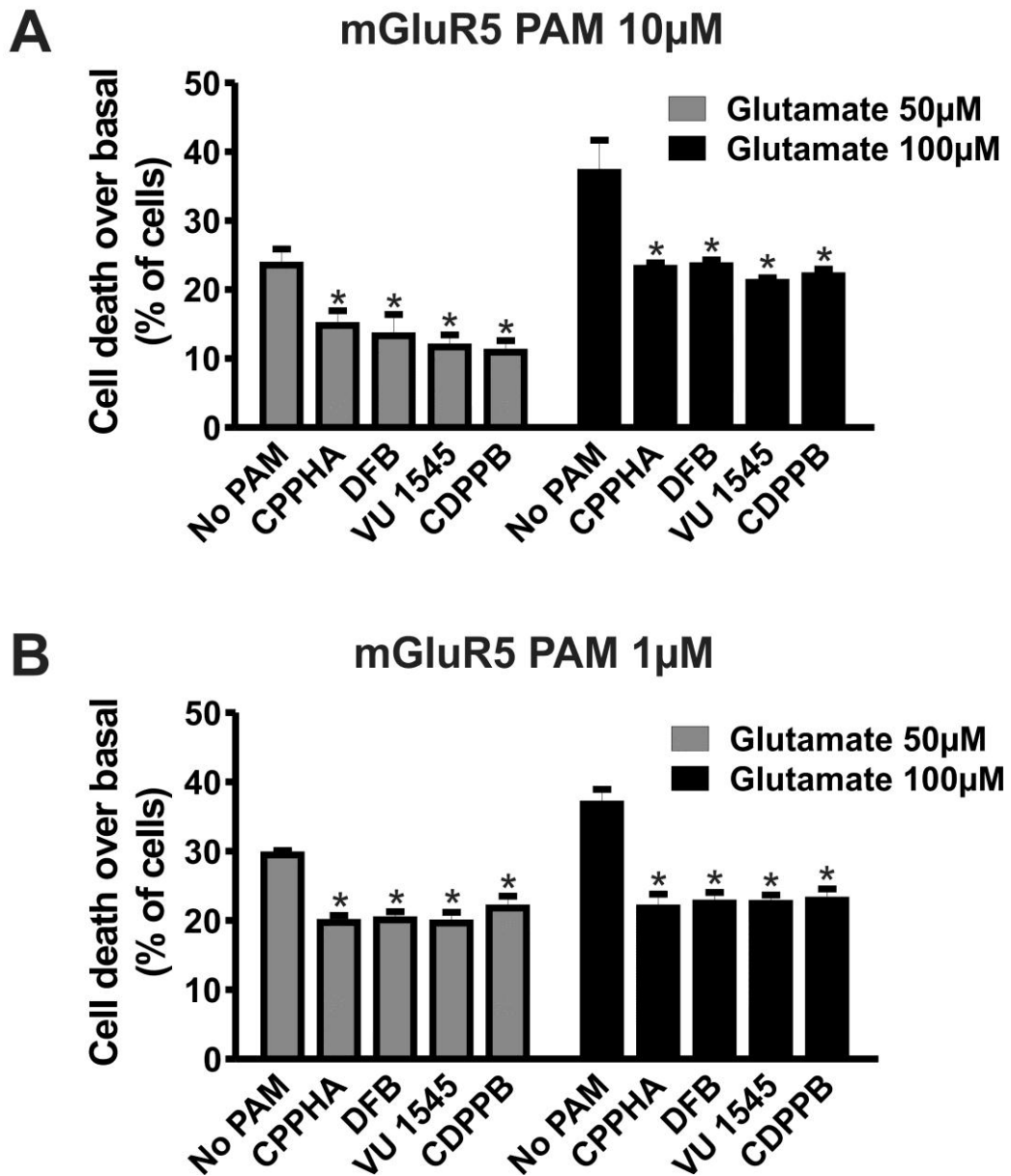


Figure 5: mGluR5 PAMs protect against glutamate induced neuronal cell death. Graph shows percentage of neuronal cell death induced by either 50 or 100 μ M glutamate in primary cultured striatal neurons that were either untreated (no PAM) or treated with CPPHA, DFB, VU1545 and CDPPB at the concentrations of 10 (**A**) and 1 (**B**) μ M for 20 hours. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments. Asterisks indicate significant differences as compared to neurons treated with glutamate in the absence of PAMs ($p < 0.05$).

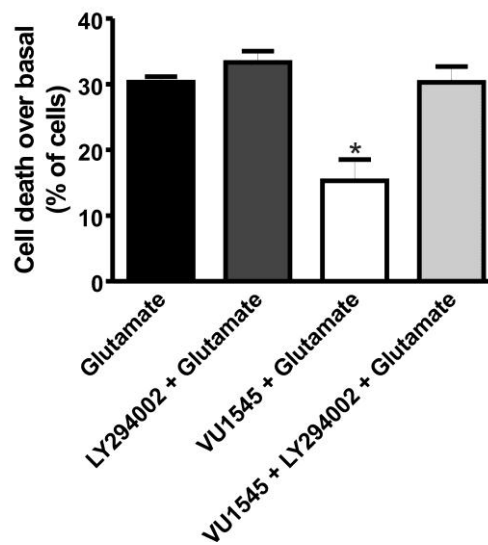
Figure 6

Figure 6: PAMs mediated neuroprotection is dependent on AKT activation. Graph shows percentage of neuronal cell death in primary cultured striatal neurons that were treated with 50 μ M glutamate, 25 μ M LY294002 + 50 μ M glutamate, 10 μ M VU1545 + 50 μ M glutamate, and 10 μ M VU1545 + 25 μ M LY294002 + 50 μ M glutamate for 20 hours. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments. Asterisk indicates significant difference as compared to neurons treated with glutamate ($p < 0.05$).

Figure 7

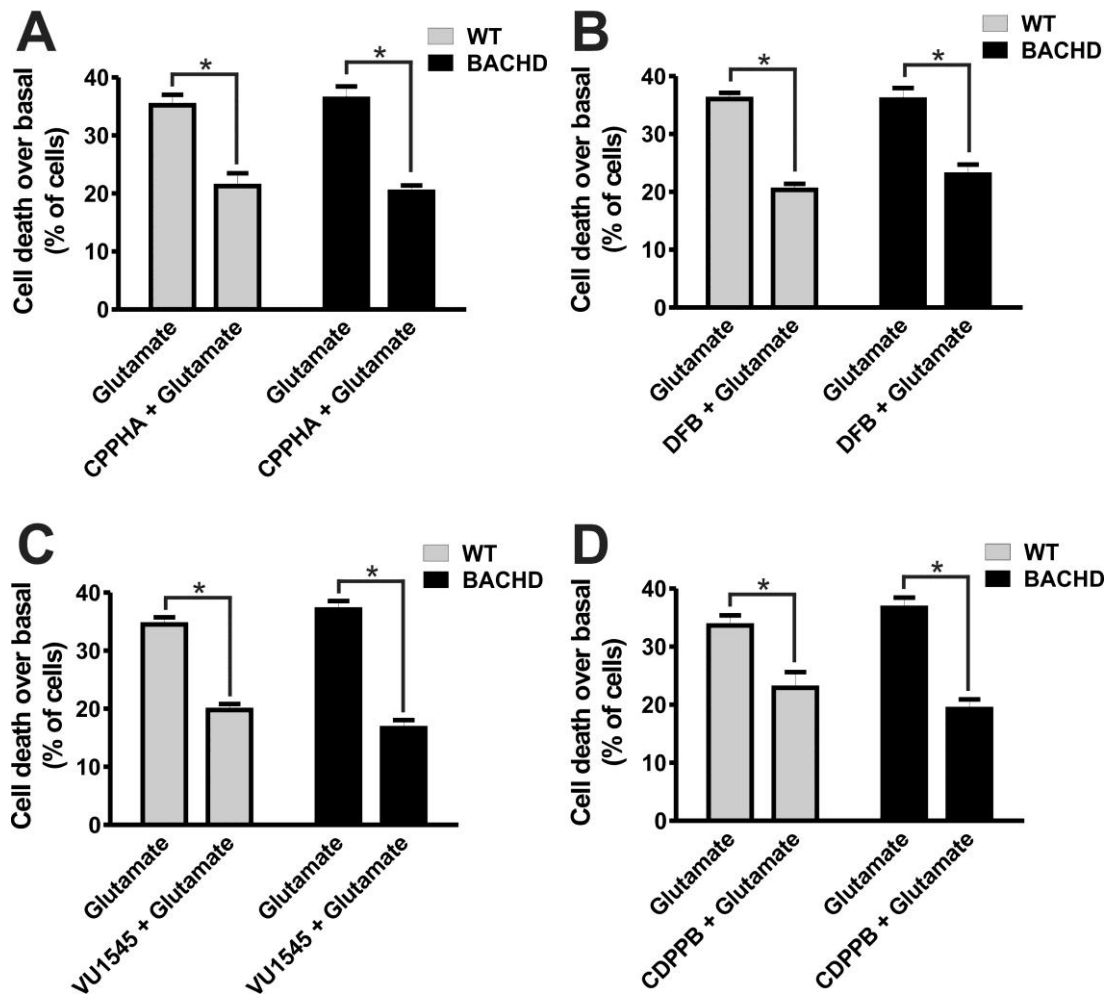


Figure 7: *mGluR5* PAMs protect BACHD neurons from glutamate induced neuronal cell death.

Graphs show percentage of neuronal cell death induced by 50 μM glutamate in either BACHD or WT primary cultured striatal neurons in the presence or absence of 1 μM CPPHA (A), 1 μM DFB (B), 1 μM VU1545 (C), and 1 μM CDPPB (D) for 20 hours. Data represent the means \pm SEM of four to six independent experiments. Asterisks indicate significant differences as compared to neurons treated with glutamate in the absence of PAMs ($p < 0.05$).

Figure 8

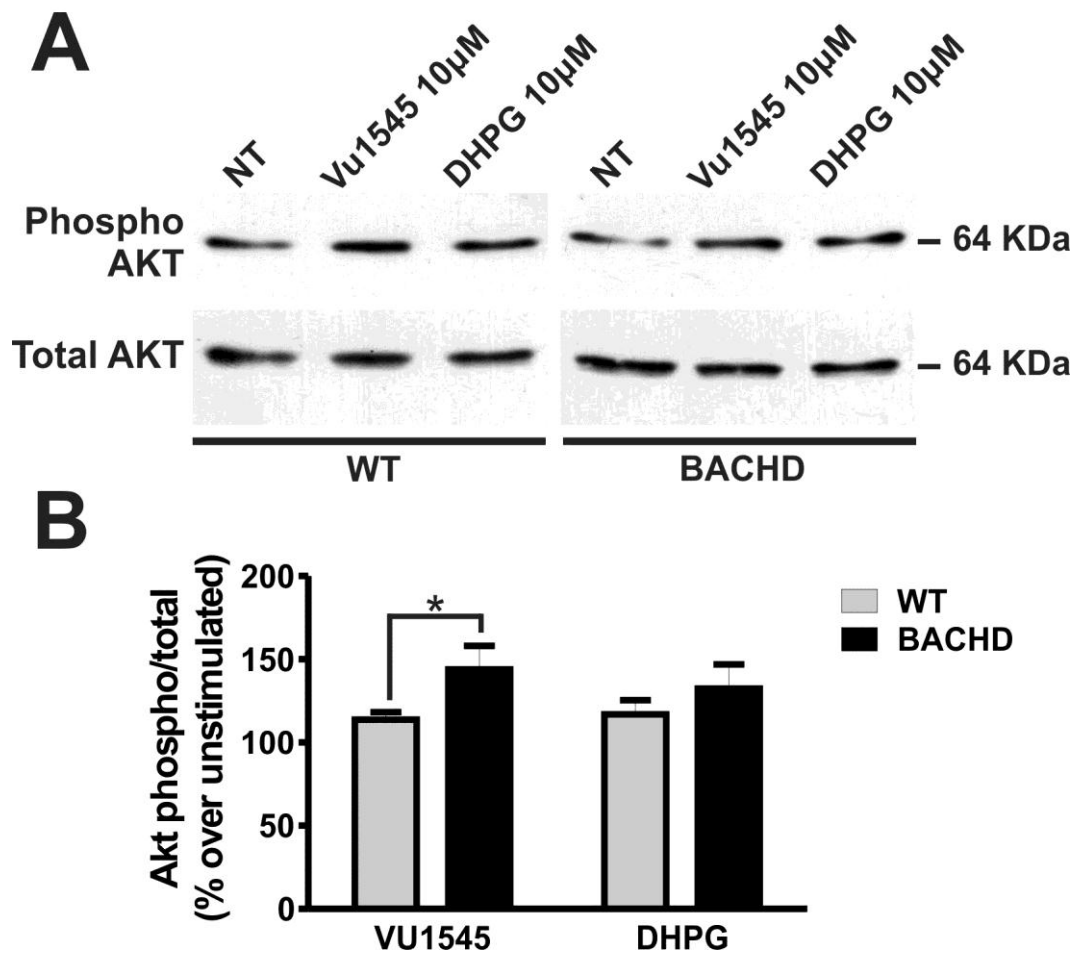


Figure 8: VU1545 activates AKT more robustly in BACHD than in WT neurons. (A) Shown is a representative immunoblot for phospho- (*upper panel*) and total-AKT expression (*lower panel*) in primary cultured striatal neurons from either wild type (WT) or BACHD mice that were either untreated (NT) or treated with 10 µM DHPG or 10 µM VU1545. 100 µg of cell lysate is used for each sample. (B) Graph shows the densitometric analysis of phospho-AKT normalized to total-AKT expression in primary cultured striatal neurons from either wild type (WT) or BACHD mice that were either untreated (NT) or treated with 10 µM DHPG or 10 µM VU1545. Data represent the means \pm SEM of six independent experiments, expressed as percentage of basal AKT phosphorylation. Asterisk indicates significant difference as compared to matched treated wild type (WT) neurons ($p < 0.05$).

