



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia

Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**IL PARAMETRO “RESIDENCE TIME” PREDICE L’EFFICACIA  
NEUROSTEROIDOGENICA E L’ATTIVITÀ ANSIOLITICA DI UN  
LIGANDO INDIRIZZATO ALLA PROTEINA TSPO**

**Relatore:**

Prof.ssa Barbara Costa

**Candidata:**

Sara Tosi

**Correlatore:**

Dott.ssa Eleonora Da Pozzo

Anno Accademico 2015/2016

## Sommario

Il Traslocatore proteico 18kDa (TSPO) è una proteina costituita da cinque domini transmembrana, localizzata sulla membrana mitocondriale esterna, in particolare nei punti di contatto tra membrana esterna ed interna del mitocondrio. Nonostante il TSPO sia una proteina ubiquitaria, risulta altamente espresso nei tessuti steroidogenici quali surrene e gonadi a livello periferico e nella glia a livello centrale. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno suggerito che il TSPO fa parte del complesso multiproteico che determina la traslocazione del colesterolo dal citoplasma alla membrana mitocondriale interna (considerato lo stadio limitante della steroidogenesi), dove l'enzima citocromo P450 CYP11A1 lo converte in pregnenolone, il precursore di tutti gli steroidi. A livello centrale tali steroidi prendono il nome di neurosteroidi ed hanno la capacità di modulare l'attività del sistema nervoso. Dato il coinvolgimento di queste molecole endogene in numerose funzioni del SNC e dato che alterazioni dei loro livelli sono state osservate in disordini psichiatrici tra cui disturbi dell'ansia, depressione e schizofrenia, il TSPO risulta un promettente target farmacologico e i suoi ligandi, quali promotori della neurosteroidogenesi, sono stati proposti come innovativi strumenti terapeutici. Tali molecole, così come le benzodiazepine, mostrano un'azione ansiolitica senza, tuttavia, provocare i tipici effetti collaterali delle benzodiazepine.

I programmi tradizionali di drug discovery, basati sulla stima dell'affinità di legame del ligando sintetico al target, hanno permesso di ottenere composti altamente affini al TSPO a cui però spesso non corrisponde un'elevata efficacia steroidogenica. Infatti uno dei problemi più ricorrenti riguardo i ligandi del TSPO consiste nella mancanza di correlazione tra affinità di legame ed efficacia steroidogenica. Questo fenomeno ha limitato, non solo l'identificazione di composti lead durante i programmi di drug discovery, ma ha anche messo in dubbio la specificità degli effetti osservati. Studi recenti hanno mostrato che

l'affinità di un farmaco per il suo target non definisce direttamente la sua azione biologica e la sua efficacia, che possono invece essere correlate al tempo che il farmaco spende in contatto con il suo target. Tale parametro è noto come "Residence Time" (RT) e corrisponde al reciproco della costante cinetica di dissociazione ( $K_{off}$ ).

Nel presente lavoro di tesi è stato determinato il valore di RT di alcuni ligandi sintetici del TSPO, tra cui composti appartenenti alla classe dei PIGA (composti a struttura fenil-indol-gliossilammidica) e l'XBD173 (chiamato anche Emapunil o AC-5216), un promettente candidato ansiolitico. È stato quindi investigato se il parametro RT è in grado di stimare in maniera più accurata l'efficacia steroidogenica dei ligandi del TSPO rispetto all'affinità di legame. Il valore di RT è stato determinato tramite saggio cinetico di binding radioattivo di associazione competitiva su membrane di rene e surrene di ratto utilizzando come probe radioattivo il PK11195 triziato, un ligando classico del TSPO. In parallelo, è stata valutata la capacità di tali composti di stimolare la steroidogenesi in termini di produzione di pregnenolone in un modello steroidogenico *in vitro* ben validato. Infine, per due dei composti testati, in collaborazione con un gruppo di ricerca di farmacologi, ne è stata valutata l'attività ansiolitica *in vivo* utilizzando il test Elevated Plus Maze. I dati ottenuti hanno dimostrato che ligandi caratterizzati da un lungo RT, a prescindere dalla loro affinità di legame, sono associati ad un'alta efficacia steroidogenica. Le prove *in vivo* hanno suggerito che un lungo RT potrebbe essere predittivo anche della promettente attività ansiolitica di un ligando del TSPO. Al fine di ottimizzare la selezione di ligandi basata sul parametro RT nei processi di drug discovery, è stato messo a punto un metodo di screening di binding radioattivo più rapido rispetto al laborioso saggio cinetico di associazione competitiva. Questo nuovo approccio richiede due soli tempi di incubazione per testare ogni ligando e sebbene questo metodo non permetta di quantificare esattamente il valore di RT, consente di predire se un ligando presenti un lungo o breve RT.

# Indice

<b>Capitolo 1 Introduzione</b>	<b>5</b>
1.1 Il Traslocatore Proteico Mitocondriale 18kDa (TSPO).....	6
1.2 Localizzazione, struttura e funzione steroidogenica del TSPO.....	7
1.3 Ligandi endogeni e sintetici del TSPO.....	13
1.4 Effetti ansiolitici di ligandi del TSPO.....	14
1.5 “Residence Time” (RT).....	18
<b>Capitolo 2 Scopo della tesi</b>	<b>20</b>
<b>Capitolo 3 Materiali e metodi</b>	<b>22</b>
3.1 Preparazione di membrane di rene e surrene di ratto.....	23
3.2 Determinazione della concentrazione proteica.....	23
3.3 Ligandi del TSPO testati nella presente tesi: PIGA, XBD173.....	25
3.4 Saggio cinetico di spiazzamento e saggio cinetico di associazione competitiva di ligandi non radiomarcati del TSPO.....	26
3.5 Linea cellulare C6 e condizioni di coltura.....	29
3.6 Misurazione dei livelli di pregnenolone mediante saggio ELISA.....	30
3.7 Elevated Plus Maze.....	33
3.8 Analisi dei dati.....	34

<b>Capitolo 4 Risultati e discussione</b>	<b>37</b>
4.1 Determinazione del parametro “Residence Time” per ligandi del TSPO.....	38
4.2 Efficacia steroidogenica dei ligandi del TSPO.....	43
4.3 Analisi di correlazione tra RT ed efficacia steroidogenica di ligandi del TSPO.....	46
4.4 Sviluppo di un metodo di screening cinetico per i ligandi del TSPO.....	47
4.5 Analisi dell’attività ansiolitica di ligandi PIGA.....	51
4.6 Conclusioni.....	53
<b>Bibliografia</b>	<b>55</b>

# *Capitolo 1*

## *Introduzione*

## **1.1 Il Traslocatore Proteico Mitocondriale 18kDa (TSPO)**

Il Traslocatore Proteico Mitocondriale 18kDa (TSPO) è stato identificato nel 1977 a livello del tessuto renale come sito di legame periferico per il Diazepam e denominato per questo recettore periferico delle benzodiazepine (PBR), per distinguerlo dal recettore centrale delle benzodiazepine (CBR), associato al recettore GABA<sub>A</sub> (Bastrup, C. et al., 1977).

Negli anni sono stati proposti diversi nomi alternativi per il PBR in funzione delle nuove scoperte riguardo la localizzazione, la struttura e le diverse funzioni della proteina. Infatti è stato osservato che non interagisce esclusivamente con le benzodiazepine, che non è localizzato esclusivamente a livello periferico e che non presenta una struttura recettoriale tradizionale. Recentemente la comunità scientifica gli ha attribuito la denominazione di Traslocatore Proteico Mitocondriale 18kDa (TSPO), nome che descrive in modo più specifico le sue funzioni a livello cellulare, tra cui il trasporto di molecole quali il colesterolo e le porfirine.

Nonostante i meccanismi molecolari alla base delle funzioni attribuite al TSPO non siano del tutto chiariti, il suo coinvolgimento è stato osservato in numerosi processi biologici tra cui la respirazione cellulare, la modulazione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, la crescita e il differenziamento cellulare, l'induzione dell'apoptosi, l'immunomodulazione, il trasporto delle porfirine, la biosintesi dell'eme, la risposta allo stress ossidativo e la steroidogenesi (Caballero, B. et al., 2013; Papadopoulos, V. et al., 2015).

Viste le numerose funzioni in cui è coinvolto, il TSPO rappresenta un target farmacologico di notevole interesse e i suoi ligandi sono stati proposti come innovativi strumenti terapeutici per il trattamento di numerose condizioni patologiche tra cui: disturbi dell'ansia (disturbo ossessivo-compulsivo, d'ansia sociale, d'ansia generalizzata, d'ansia da separazione dell'adulto), disturbo post-

traumatico da stress, depressione, patologie neurodegenerative, neuroinfiammazione e cancro.

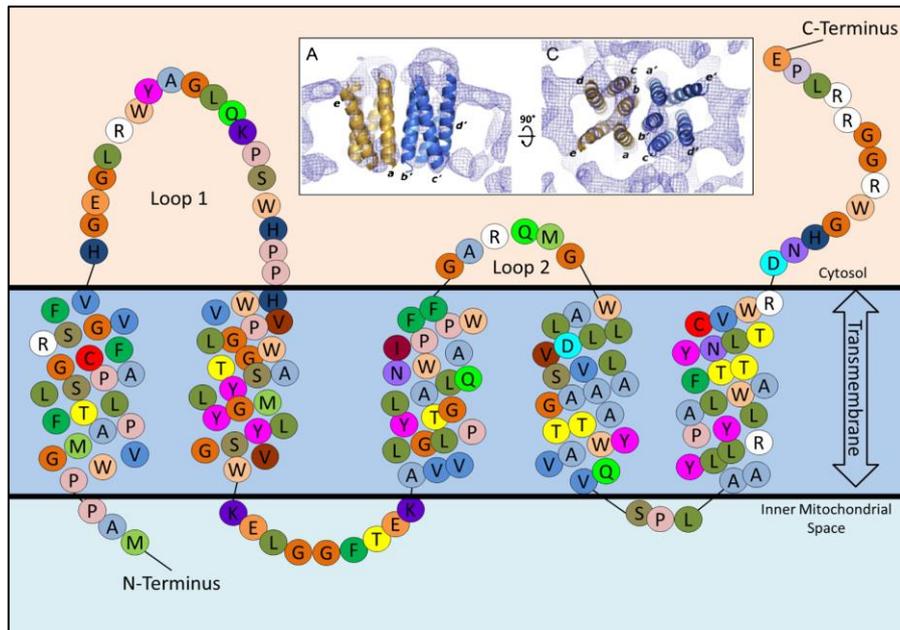
Rispetto alla sua azione steroidogenica, è stata dimostrata, in seguito all'induzione di un danno a livello centrale, una iperespressione del TSPO e delle proteine steroidogeniche associate e un aumento locale del livello di steroidi. Tale evidenza ha suggerito un ruolo neuroprotettivo del TSPO mediato dalla neurosteroidogenesi (Papadopoulos, V. et al., 2015).

## **1.2 Localizzazione, struttura e funzione steroidogenica del TSPO**

Localizzazione: il TSPO è una proteina pressoché ubiquitaria, infatti è stata osservata la sua presenza nel rene, nel cuore, nel polmone, nel tessuto ematopoietico, nel sistema nervoso centrale e nei tessuti endocrini. Risulta altamente espresso nei tessuti steroidogenici, sia a livello periferico (surrene, gonadi) che a livello centrale (cellule gliali) (Campiani, G. et al., 1996).

A livello subcellulare il TSPO è localizzato nel mitocondrio, in particolare nelle zone di contatto tra la membrana esterna ed interna del mitocondrio. Il TSPO è stato tuttavia identificato anche a livello nucleare nelle cellule cancerose, sulla membrana plasmatica degli eritrociti e sulle membrane di altri organelli cellulari.

Struttura: il TSPO è una proteina evolutivamente conservata, ha un peso molecolare di 18kDa, è altamente idrofobica ed è costituita da 169 amminoacidi. La struttura secondaria è costituita da cinque domini transmembrana ad  $\alpha$ -elica, ciascuno dei quali costituito da 21 amminoacidi, che attraversano il doppio strato fosfolipidico della membrana mitocondriale esterna. L'estremità carbossi-terminale è situata nel citoplasma, l'estremità ammino-terminale è rivolta verso l'interno del mitocondrio (Jamin, N. et al., 2005) (**Fig.1**).



**Figura 1. Struttura del TSPO.** Sequenza amminoacidica completa. (adattata da Austin, C. et al., 2013)

È stato suggerito che, a livello mitocondriale, il TSPO prende parte alla regolazione dell'attività del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (*mitochondrial permeability transition pore*, MTPT), la cui struttura non è ancora stata del tutto chiarita.

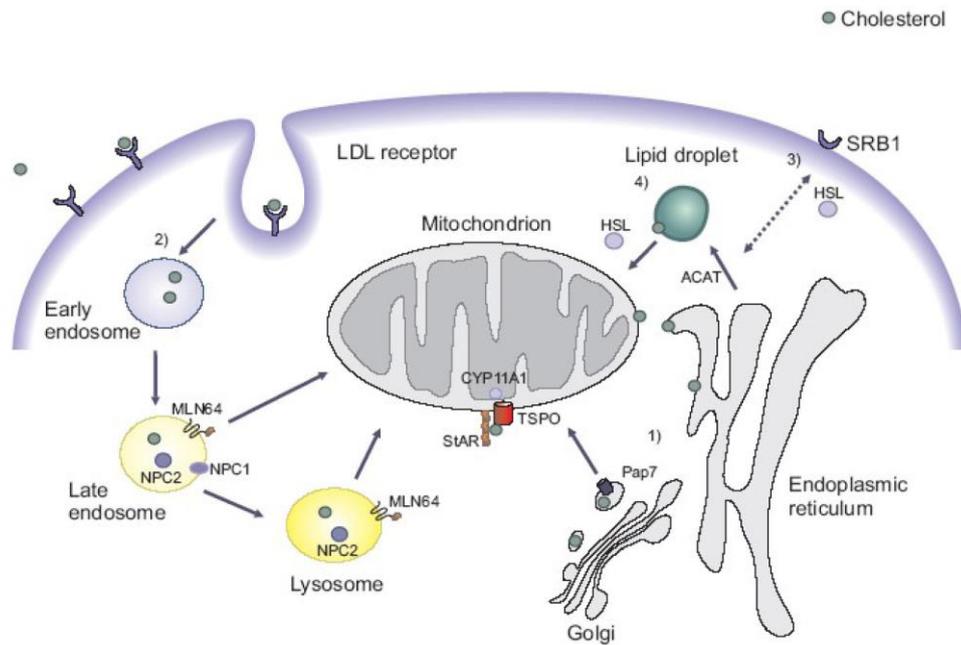
Ad oggi sono state identificate quattro proteine citoplasmatiche in grado di interagire con il complesso del TSPO:

- StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), proteina che lega il colesterolo e ne promuove il trasferimento mitocondriale
- PAP7 (*PBR associated protein 7*), proteina che regola anch'essa la steroidogenesi
- PRAX-1 (*Peripheral Benzodiazepine Receptor associated Protein 1*), proteina la cui funzione non è ancora chiarita, si ritiene comunque che sia coinvolta nella traslocazione, associandosi al TSPO
- P10, proteina di 10kDa che co-immunoprecipita con il TSPO

Sono stati svolti studi di molecular modeling e di mutagenesi sito specifica per identificare potenziali siti di legame del colesterolo al TSPO. Dall'analisi 3D della proteina è emerso che i cinque domini ad  $\alpha$ -elica collaborano per formare un canale in grado di legare una molecola di colesterolo (Rone, M. et al., 2009). Questi studi hanno mostrato un coinvolgimento della regione citosolica carbossi-terminale (amminoacido 144-169) del TSPO nel trasporto del colesterolo, evidenziando in tale regione una sequenza amminoacidica consenso di riconoscimento del colesterolo (CRAC) che contiene la maggior parte degli elementi critici che regolano il legame e il trasporto del colesterolo (Jamin, N. et al., 2005).

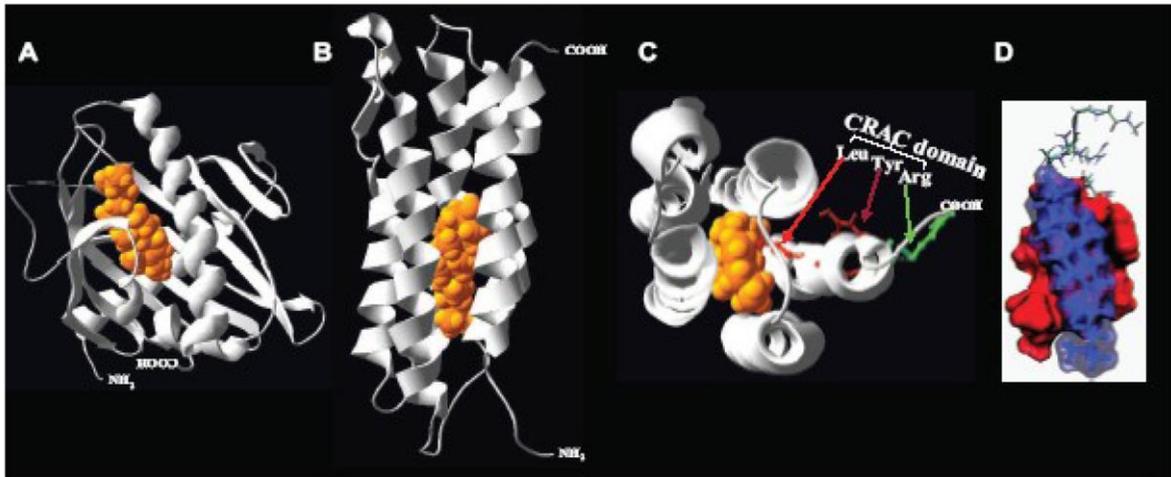
Funzione steroidogenica/neurosteroidogenica: numerosi studi hanno evidenziato che la proteina StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) è implicata nella regolazione della steroidogenesi, inducendo il trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio, mediato dalla porzione del TSPO situata sulla membrana mitocondriale esterna. Ciò ha reso evidente la necessità di un'interazione tra StAR e TSPO nel processo di biosintesi degli steroidi (**Fig. 3**).

All'interno della proteina StAR è stato identificato un dominio START (StAR-related lipid transfer) formato da 210 amminoacidi, con un importante ruolo nel legame con il colesterolo, in quanto è in grado di formare un canale idrofobico in grado di accogliere tale molecola. A livello della membrana mitocondriale esterna, la proteina StAR viene fosforilata dalla proteina chinasi A (PKA) ed interagisce con la proteina adattatrice PAP7 mediando il trasporto del colesterolo al TSPO. I risultati di tali studi hanno permesso di ipotizzare che il TSPO possa essere considerato come una sorta di "cancello" coinvolto nel passaggio di colesterolo e proteine all'interno del mitocondrio e che la proteina StAR gioca un ruolo di attivatore ormone-indotto, collaborando nella traslocazione del colesterolo (Rone, M. et al., 2009).



**Figura 2.** *Traffico del colesterolo al mitocondrio (Rone, M. et al., 2009).*

Il TSPO, quindi, riveste un ruolo fondamentale nella steroidogenesi e l'ingresso del colesterolo all'interno del mitocondrio è considerato lo stadio limitante del processo di biosintesi degli steroidi.



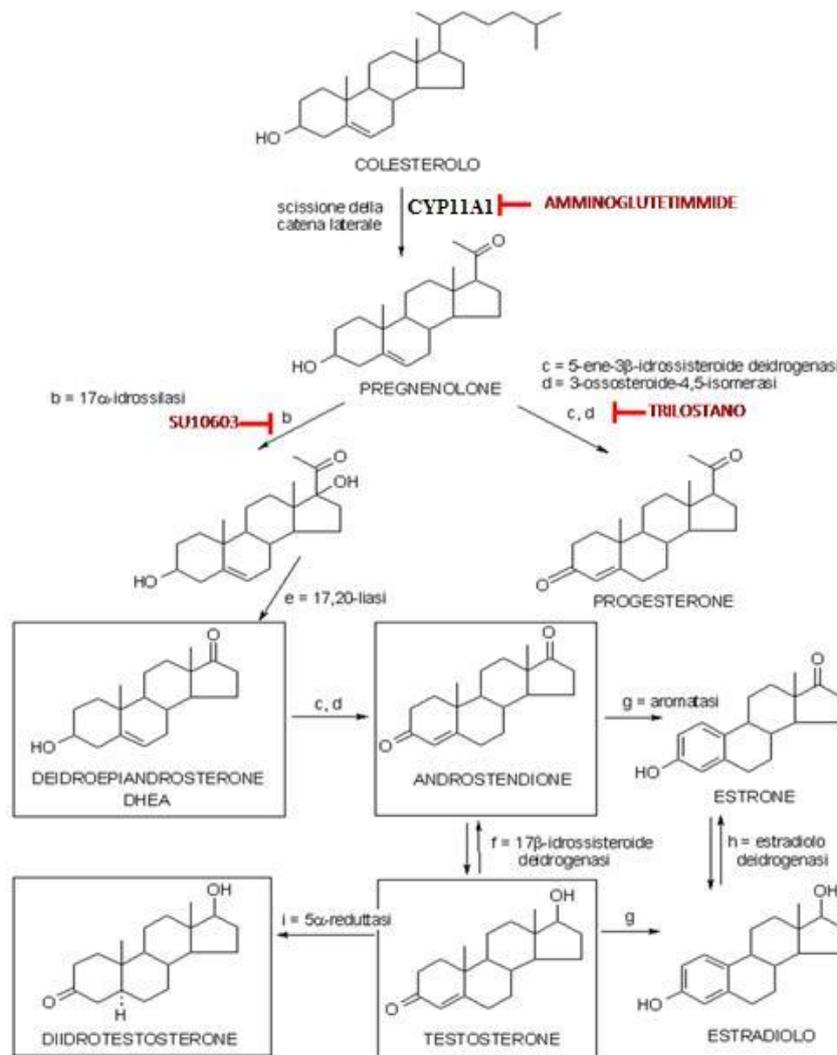
**Figura 3. Siti di legame della proteina StAR e del TSPO.** A) Modello molecolare della proteina StAR umana con il colesterolo (marrone); B) Modello molecolare del TSPO in presenza del colesterolo; C) Dominio CRAC del TSPO e colesterolo; D) Docking molecolare del colesterolo al dominio CRAC del TSPO (le superfici della proteina e del colesterolo sono rappresentate in rosso e blu rispettivamente). (Rone, M. et al., 2009).

Nella membrana mitocondriale interna è presente l'enzima citocromo P450 side-chain cleavage (CYP450scc, oggi chiamato CYP11A1) che converte il colesterolo in pregnenolone, il precursore di tutti gli steroidi. Tale conversione avviene attraverso tre reazioni: idrossilazione in posizione 20, idrossilazione in posizione 22 e scissione del legame carbonio 20 e carbonio 22. Queste reazioni avvengono attraverso la formazione di due intermedi, il 22R-idrossicolesterolo e il 20,22-idrossicolesterolo (Miller, W.L. et al., 2007).

Il pregnenolone formato, può andare incontro a diversi destini:

- può rimanere nel mitocondrio, dove viene idrossilato a 20 $\alpha$ -idrossipregnenolone sempre ad opera dell'enzima CYP11A1
- può uscire dal mitocondrio e raggiungere il reticolo endoplasmatico, dove attraverso vie enzimatiche diverse porta alla formazione di 20 $\alpha$ -diidropregnenolone, progesterone (PROG, che viene trasformato in

androstenedione, quindi in testosterone e infine estradiolo), deidropiandrosterone (DHEA, da cui si possono ottenere androstenedione, testosterone e estradiolo), 7 $\alpha$ -idrossipregnenolone (anch'esso trasformato in DHEA) (Rupprecht, R. et al., 2003) (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Schema di sintesi degli steroidi (adattata da [www.lem.ch.unito.it](http://www.lem.ch.unito.it))

### 1.3 Ligandi endogeni e di sintesi del TSPO

Una delle prime molecole endogene identificate con alta affinità per il TSPO isolata sia a livello centrale che periferico, soprattutto a livello di rene, surrene e gonadi, è stato un residuo di neuropeptide di 11kDa composto da 86 amminoacidi che inibisce il legame del Diazepam con il sito recettoriale delle benzodiazepine, chiamato appunto “inibitore del legame del Diazepam” (DBI), il precursore delle endozepine, una famiglia di neuropeptidi capaci di spiazzare le benzodiazepine dal loro sito di legame sul recettore GABA<sub>A</sub>.

Oltre a tale molecola e ad i suoi metaboliti sono stati identificati altri ligandi endogeni con alta affinità per il TSPO come le porfirine (protoporfirina IX, mesoporfirina IX ed emina) e il colesterolo.

Alcuni composti di sintesi del TSPO hanno mostrato capacità di aumentare la biosintesi di steroidi/neurosteroidi, come pregnenolone ed allopregnenolone, che sono modulatori allosterici positivi del recettore GABA<sub>A</sub>.

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati diversi ligandi di nuova sintesi del TSPO che sono stati testati per la loro potenziale capacità di stimolare la steroidogenesi e modulare la attività del recettore GABA<sub>A</sub>, in **Tab.1** sono riportati alcuni esempi:

**Tabella 1. Effetti di alcuni ligandi sintetici del TSPO.**

Ligando del TSPO	Effetto	References
XBD173 (Emapunil, AC-5216)	Potenziamento della neurotrasmissione GABA-ergica	Rupprecht, R. et al., 2009
Etifoxine	Aumento dei livelli di neurosteroidi	Verleye, M. et al., 2005
FGIN-1 (arylindole-acetamide derivatives)	Stimolazione della produzione di pregnenolone	Kozikowski, A.P. et al., 1993
Pyrralobenzoxazepine derivatives	Stimolazione della produzione di pregnenolone	Campiani, G. et al., 2002
Pyridopyrralobenzoxazepine derivatives	Stimolazione della produzione di pregnenolone	Amsterdam, A. et al., 1991
PIGA (phenylindolyl-glyoxylamide derivatives)	Stimolazione della produzione di pregnenolone	Primofiore, G. et al., 2004
M-PIGA (N,N-di-n-propyl-2-(4-methylphenyl)indol-3-ylglyoxylamide)	Stimolazione della produzione di progesterone e allopregnenolone	Costa, B. et al., 2010

#### 1.4 Effetti ansiolitici di ligandi del TSPO

I neurosteroidi sono molecole che hanno la capacità di controllare l'eccitabilità del SNC, agendo come regolatori allosterici positivi/negativi del recettore GABA<sub>A</sub>. Negli ultimi decenni, numerosi studi hanno dimostrato una relazione tra alterati livelli di neurosteroidi e disturbi psichiatrici, inclusi i disturbi d'ansia. In accordo con gli alterati livelli di neurosteroidi, sono stati documentati ridotti livelli di TSPO in pazienti con disturbi psichiatrici (**Tab.2**). La capacità di un ligando del TSPO di promuovere la neurosteroidogenesi e ripristinare concentrazioni di specifici

steroidi neuroattivi ha suggerito che il TSPO possa essere un promettente target farmacologico per il trattamento di disturbi psichiatrici (Costa, B. et al., 2012).

**Tabella 2. Livelli di espressione del TSPO in disturbi psichiatrici.**

Disturbo psichiatrico	Livelli TSPO	References
Depressione bipolare con ansia di separazione dell'adulto	Diminuiti	Abelli, M. et al., 2010
Depressione unipolare con ansia di separazione dell'adulto	Diminuiti	Chelli, B. et al., 2008
Panico e ansia di separazione dell'adulto	Diminuiti	Pini. S. et al., 2005
Fobia sociale generalizzata	Diminuiti	Johnson, M.R. et al., 1998
Disturbo post-traumatico da stress	Diminuiti	Gavish, M. et al., 1996
Schizofrenia	Diminuiti	Ritsner, M. et al., 2003
Disturbo d'ansia generalizzato	Diminuiti	Rocca, P. et al., 1991
Disturbo ossessivo compulsivo	Diminuiti	Rocca, P. et al., 1991
Attacchi di panico	Diminuiti	Marazziti, D. et al., 1994
Comportamento suicida adolescenziale	Diminuiti	Soreni, N. et al., 1999

A conferma di tale applicazione terapeutica dei ligandi del TSPO, il composto del TSPO XBD173 (Emapunil, AC-5216) ha dimostrato promettenti effetti ansiolitici (Rupprecht, R. et al., 2009; Kita, A. et al., 2004; Kita, A. et al., 2009). In particolare, test di laboratorio su animali e umani hanno mostrato che XBD173 produce, come le benzodiazepine, effetti ansiolitici a rapida insorgenza, tuttavia, senza indurre i tipici effetti collaterali delle benzodiazepine. A livello cellulare, il legame selettivo di XBD173 al TSPO, potenzia l'ampiezza e la durata delle correnti inibitorie post-sinaptiche mediate dal GABA. A differenza del Diazepam, XBD173 non agisce direttamente sul recettore post-sinaptico GABA<sub>A</sub> ma è in grado di potenziarne

l'attività indirettamente tramite la stimolazione di neurosteroidi con attività allosterica positiva sul recettore GABA<sub>A</sub>. Questo potrebbe giustificare la mancanza degli effetti collaterali tipici delle benzodiazepine, quali sedazione e tolleranza. Ad oggi XBD173 ha superato i trial clinici di fase 2 (ClinicalTrials.gov identifier:NCT00108836).

Sono stati testati altri ligandi del TSPO (Costa, B. et al., 2012) in vari modelli sperimentali *in vivo*, quali il Test EPM, il Test del conflitto di Vogel, per la loro attività ansiolitica ed hanno mostrato gli effetti riportati in **Tab. 3**.

**Tabella 3. Effetti farmacologici di ligandi del TSPO.**

Modello animale	Ligando	Effetto farmacologico	References
Ratto deprivato delle ghiandole endocrine steroidogeniche e pre-trattato con Trilostano	FGIN-1-27 FGIN-1-44	Ridotta paura nel Test EPM	Romeo, E. et al., 1993
Ratto	FGIN-1-27	Effetti ansiolitici nel Test EPM e nel Test del conflitto di Vogel	Auta, J. et al., 1993
Ratto (ligando micro-iniettato nell'ippocampo dorsale)	FGIN-1-27	Effetti ansiolitici nel Test EPM	Bitran, D. et al., 2000
Ratto deprivato delle ghiandole endocrine steroidogeniche e pre-trattato con Trilostano	PK11195	Nessun effetto sui livelli cerebrali di pregnenolone	Romeo, E. et al., 1993
Ratto deprivato delle ghiandole endocrine steroidogeniche	CB34, CB50 CB54	CB34 (iniezione intra-peritoneale, 25 e 50 mg/kg) ha suscitato effetti positivi nel Test del conflitto di Vogel	Serra, M. et al., 1999
Ratto	DAA1097 DAA1106	Effetti ansiolitici nel Test EPM (somministrazione orale, 3 mg/kg)	Okuyama, S. et al., 1999
Ratto	XBD173	Effetti ansiolitici nel Test di Vogel (somministrazione orale, 0.1-3 mg/kg)	Kita, A. et al., 2004
Ratto, Topo	XBD173	Effetti ansiolitici nel Test EPM	Rupprecht, R. et al., 2009
Topo	XBD173	Effetti ansiolitici (somministrazione orale, 0.1 mg/kg)	Kita, A. et al., 2009
Ratto	M-PIGA	Effetti ansiolitici nel Test EPM (iniezione intra-peritoneale, 30 mg/kg)	Costa, B. et al., 2010

## 1.5 “Residence Time” (RT)

I programmi tradizionali di design e sviluppo di nuovi farmaci sono basati sull'affinità di legame e questo ha permesso di ottenere composti altamente affini al TSPO a cui però spesso non corrisponde un'elevata efficacia steroidogenica, determinando quindi scarsi effetti *in vivo*. Uno dei problemi più ricorrenti riguardo i ligandi del TSPO consiste nella mancanza di correlazione tra affinità di legame ed efficacia steroidogenica. Questo fenomeno ha limitato non solo l'identificazione di composti lead durante i programmi di drug discovery, ma ha anche messo in dubbio la specificità degli effetti osservati. Per questo motivo la ricerca si sta indirizzando verso lo sviluppo di nuovi modelli sperimentali in grado di fornire dati più predittivi sull'efficacia *in vivo* nelle prime fasi di studio di nuovi farmaci.

Un ligando esercita il suo effetto solo quando è legato al target e quindi tale interazione è il principale responsabile dell'attività farmacologica. La valutazione quantitativa di questa interazione può avvenire in modo diretto, attraverso la misurazione dei parametri di equilibrio termodinamico come l'affinità di legame ( $K_d$ ), o in modo indiretto, attraverso la misurazione degli effetti del ligando dovuti all'interazione con il target. Tali esperimenti prendono in considerazione un sistema chiuso, in cui le concentrazioni di ligando e target sono costanti e dove si ha una variazione della concentrazione di specie libera e legata man mano che il sistema raggiunge l'equilibrio. L'organismo però è un sistema aperto, nel quale le concentrazioni di ligando al sito recettoriale possono essere estremamente variabili a causa dei processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione, e difficilmente vengono raggiunte le condizioni di equilibrio. Per questi motivi prevedere l'efficacia *in vivo* di nuove molecole basandosi esclusivamente su parametri ottenuti all'equilibrio può non essere sufficiente. Studi recenti (Vauquelin, G. et al., 2010; Zhang, R. et al., 2009) hanno mostrato che l'affinità di un farmaco per il suo target non definisce direttamente la sua azione biologica e la sua efficacia *in vivo*, che possono invece essere correlate alla durata

dell'interazione tra il ligando e il suo target molecolare. Tale parametro è noto come "Residence Time" (RT) e corrisponde al reciproco della costante cinetica di dissociazione ( $K_{off}$ ) (Copeland, R. A. et al., 2006). Il RT offre quindi un'indicazione dell'efficacia *in vivo* di un ligando in quanto integra in modo adeguato i parametri di legame di equilibrio. Si suppone infatti, che maggiore è il RT, maggiore è la durata della formazione del complesso ligando-recettore, maggiore sarà la durata dell'effetto biologico *in vitro* e *in vivo*.

Dall'esame retrospettivo di cinquanta farmaci, approvati dalla FDA tra il 2001 e il 2004, indirizzati a diversi target, circa il 70% delle molecole con lungo RT ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto agli analoghi terapeutici con breve RT.

## *Capitolo 2*

### *Scopo della tesi*

La capacità dei ligandi di stimolare la produzione di steroidi/neurosteroidi a seguito della loro interazione con TSPO, ha reso tale proteina un target farmacologico attrattivo per numerose condizioni patologiche, inclusi i disturbi d'ansia. Tuttavia, una delle problematiche ricorrenti che riguardano i ligandi del TSPO consiste nella scarsa relazione tra l'affinità di legame al TSPO (in termini del parametro termodinamico all'equilibrio  $K_i$ ) e l'efficacia steroidogenica. Dal momento che, in altri sistemi biologici, sta emergendo che il tempo con cui un farmaco interagisce con il suo target, definito "Residence Time" (RT), si ripercuote direttamente sulla sua efficacia, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di esplorare se per i ligandi del TSPO, RT possa essere un parametro predittivo di efficacia steroidogenica e di attività ansiolitica. A tal fine sono stati testati ligandi del TSPO appartenenti alla classe chimica PIGAs e il candidato ansiolitico XBD173. I promettenti risultati ottenuti hanno suggerito di mettere a punto un metodo di screening rapido al fine di ottimizzare la selezione di ligandi del TSPO basata sul parametro RT.

*Capitolo 3*

*Materiali*

*e Metodi*

### **3.1 Preparazione di membrane di rene e surrene di ratto**

Per l'ottenimento di membrane di rene e surrene di ratto, dopo l'espianto dell'organo e successivo sminuzzamento, è prevista la sospensione (in rapporto 1:10) in un tampone contenente:

- Tris-HCl 50 mM (T50, pH 7.4)
- Saccarosio 0.32 M
- EDTA 1 mM
- Inibitori delle proteasi (benzamidina 160 µg/ml, bacitracina 200 µg/ml e inibitori della tripsina 20 µg/ml)

La sospensione viene quindi omogenizzata con Ultraturax e centrifugata (600 x g, 10 min, 4°C) per l'ottenimento di un sovrnatante S1 che viene conservato e un pellet P1. Quest'ultimo viene sospeso a sua volta nel tampone (in rapporto 1:10) omogenizzato con Ultraturax e centrifugato (600 x g, 10 min, 4°C). Da questa seconda centrifugazione otteniamo un sovrnatante S2 che viene unito a S1, e un pellet P2 che viene scartato. La soluzione risultante dall'unione di S1 e S2 viene quindi sottoposta a centrifugazione (10000 x g, 10 min, 4°C) e porta all'ottenimento di un sovrnatante S3 che viene scartato e un pellet P3 contenente le membrane di interesse. P3 viene quindi sospeso in T50, omogenizzato con Ultraturax, suddiviso in aliquote e conservato ad una temperatura di -20°C.

### **3.2 Determinazione della concentrazione proteica**

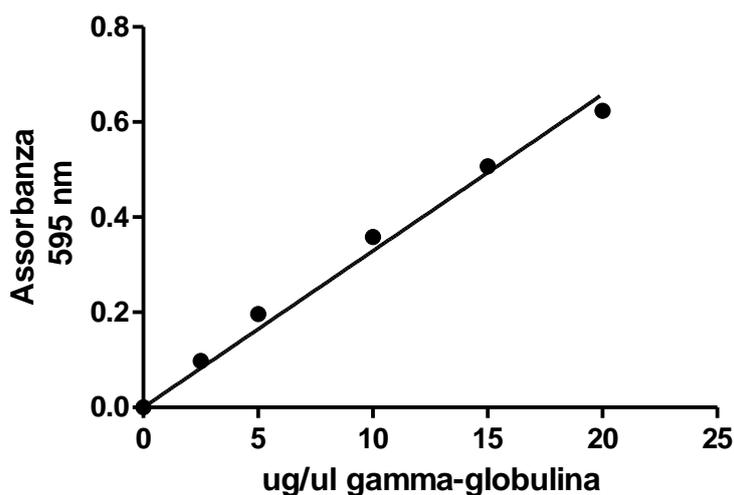
Per determinare la concentrazione proteica nei campioni di membrane di rene o surrene di ratto è stato utilizzato il metodo Bio-Rad. Tale dosaggio è basato sul metodo colorimetrico di Bradford, molto utilizzato perché rapido, economico e sensibile, che prevede l'utilizzo dell'agente colorimetrico acido Coomassie Brilliant Blue G-250, che vira dal colore rosso al blu in seguito al legame con residui

amminoacidici basici in forma anionica (soprattutto Lys, Arg) con massima assorbanza a  $\lambda=595$  nm. L'intensità della colorazione sviluppata è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica nel campione.

Il dosaggio proteico è stato effettuato in duplicato secondo il seguente schema:

	Acqua Milli-Q	Tampone (T50)	Membrane	Bio-Rad
Bianco	780 $\mu$ l	20 $\mu$ l	-	200 $\mu$ l
Bianco <sup>1</sup>	780 $\mu$ l	20 $\mu$ l	-	200 $\mu$ l
Campione	780 $\mu$ l	-	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Campione <sup>1</sup>	780 $\mu$ l	-	20 $\mu$ l	200 $\mu$ l

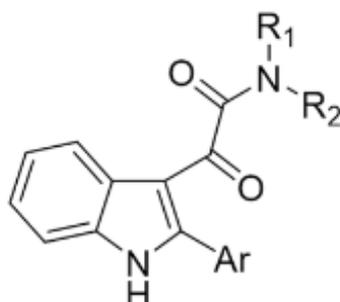
La quantità di proteine del campione viene determinata dal valore di assorbanza. Tutti i campioni vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595 nm e tramite la retta di taratura, precedentemente costruita utilizzando concentrazioni note di  $\gamma$ -globulina (**Fig. 5**), viene determinata la concentrazione proteica.



**Figura 5.** Retta di taratura costruita utilizzando concentrazioni note di  $\gamma$ -globulina.

### 3.3 Ligandi del TSPO testati nella presente tesi: PIGA, XBD173

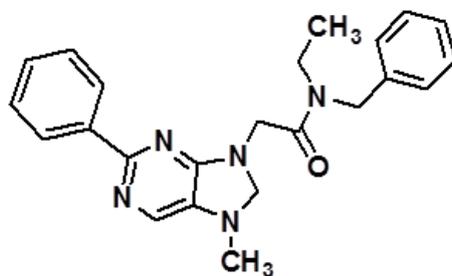
Nel presente lavoro di tesi sono stati testati ligandi sintetici del TSPO appartenenti alla classe dei ligandi PIGA (composti a struttura fenil-indol-gliossilammidica, sintetizzati presso il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Federico Da Settimo, Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa): PIGA720, PIGA839, PIGA1128, PIGA1136, PIGA1137, PIGA1138, PIGA1214. In **Tab.4** sono riportate le strutture chimiche dei composti.



**Tabella 4. Strutture dei ligandi PIGA.** (Primofiore, G. et al., 2004; Da Settimo, F. et al., 2008; Barresi, E. et al., 2015).

Ligando TSPO	R1	R2	Ar	K <sub>i</sub> (nM)
PIGA720	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1.40±0.28
PIGA839	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4Cl	5.50±0.47
PIGA1128	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	3-Thienyl	0.31±0.02
PIGA1136	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	2-Naphtyl	0.53±0.06
PIGA1137	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	2-Naphtyl	0.56±0.06
PIGA1138	CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	2-Naphtyl	0.34±0.03
PIGA1214	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-COOH	343.01±15.94

Nel presente lavoro di tesi è stato testato anche il promettente candidato ansiolitico XBD173 (Fig. 6).



**Figura 6.** *Struttura di XBD173 (Emapunil, AC-5216), N-benzyl-N-ethyl-2-(7,8-dihydro-7-methyl-8-oxo-2-phenyl-9H-purin-9-yl)acetamide.*

### **3.4 Saggio di spiazzamento e saggio cinetico di associazione competitiva di ligandi non radiomarcati del TSPO**

I saggi cinetici di associazione competitiva sono stati effettuati utilizzando membrane di rene e surrene di ratto, conservate a -20°C.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti seguendo le linee guida del Consiglio Direttivo della Comunità Europea 86-609 e approvate dal Comitato per la sperimentazione animale dell'Università di Pisa.

Per tutti i saggi di binding radioattivo, un'aliquota di membrane è stata scongelata, sospesa nel tampone (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) e omogenizzata con Ultraturrax. Il contenuto di proteine nell'omogenato ottenuto è stato determinato con il metodo di Bradford.

### 3.4.1 Saggio di spiazzamento

Per il saggio di spiazzamento gli omogenati di membrane (20 µg di proteine derivate dal rene e 4.5 µg di proteine derivate dal surrene) sono state incubate con concentrazioni crescenti di ligando e con [<sup>3</sup>H]PK11195 1 nM (85.7 µCi/nmol attività specifica) nel tampone per un volume finale di 500 µL, per 90 min a 0°C. Il legame non specifico del [<sup>3</sup>H]PK11195 è stato determinato in presenza di PK11195 1 µM. Trascorso il tempo di incubazione, i campioni sono stati filtrati sotto vuoto con 3 mL di tampone freddo, utilizzando filtri in fibra di vetro GF/C. Successivamente sono stati effettuati tre lavaggi e la radioattività intrappolata sul filtro è stata misurata tramite contatore a scintillazione liquida (Top Count; Perkin Elmer Life and Analytical Sciences; 65% di efficienza).

La concentrazione di ligando non marcato che inibisce il legame del [<sup>3</sup>H]PK11195 (valore di IC<sub>50</sub>) è stato ottenuto da curve di inibizione ed è stato convertito in valore di K<sub>i</sub> utilizzando l'equazione di Cheng e Prusoff.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_d}}$$

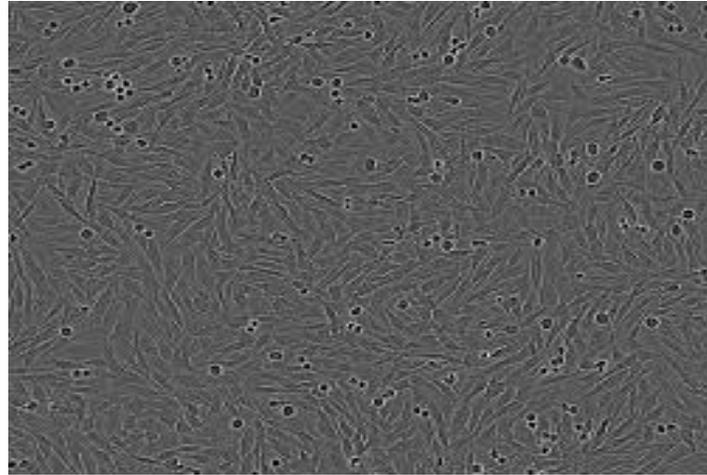
### 3.4.2 Saggio di associazione competitiva

I parametri cinetici dei ligandi non radiomarcato del TSPO sono stati determinati utilizzando il *saggio di associazione competitiva*, basato sul modello teorico matematico di Motulsky e Mahan. A differenza dei metodi nei quali un composto viene pre-equilibrato con il target, questo approccio prevede la simultanea addizione di radioligando e competitore (ligando non radiomarcato) alla

preparazione contenente il target di interesse, in modo tale che al  $t=0$  il sito di legame non sia occupato.

Il [ $^3\text{H}$ ]PK11195 (circa 30 nM, attività specifica 21.4  $\mu\text{Ci/nmol}$ ) è stato quindi aggiunto contemporaneamente al competitore (ad una concentrazione pari a tre volte il valore di  $K_i$ ) agli omogenati di membrane (30  $\mu\text{g}$  di proteine derivate da rene e 7  $\mu\text{g}$  di proteine derivate da surrene) nel tampone in un volume finale di 500  $\mu\text{l}$ . Il legame non specifico del [ $^3\text{H}$ ]PK11195 è stato determinato in presenza di PK11195 1  $\mu\text{M}$ . Il legame al TSPO del radioligando è stato determinato a vari tempi per filtrazione e misurazione tramite il contatore a scintillazione liquida.

### 3.5 Linea cellulare C6 e condizioni di coltura



**Figura 7.** *Cellule di glioma di ratto C6. (immagine adattata da [www.phe-culturecollections.org.uk](http://www.phe-culturecollections.org.uk))*

La linea cellulare C6 (**Fig. 7**), derivante da cellule di glioma di ratto, è stata coltivata utilizzando il mezzo di coltura DMEM integrato con il 10% di siero fetale bovino, L-glutammina 2M, penicillina 100U/ml e streptomina 100 µg/ml. Le colture cellulari sono state mantenute in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub> e il 95% di aria a 37°C.

### 3.6 Misurazione dei livelli di pregnenolone mediante saggio ELISA

Per la determinazione quantitativa del pregnenolone è stato utilizzato il test immunoenzimatico ELISA (**Fig. 8**). Tale metodo si basa sulla competizione tra un antigene non marcato e un antigene marcato con un enzima per un limitato numero di siti di legame dell'anticorpo presente sul fondo dei pozzetti di una piastra multiwell. Le procedure di lavaggio permettono la rimozione del materiale non legato. Al termine di tali lavaggi, viene addizionato il substrato dell'enzima in modo da innescare la reazione enzimatica che porta alla formazione di un prodotto colorato. Tale reazione termina per addizione di una *Stop Solution*. Viene quindi misurata l'assorbanza allo spettrofotometro. L'intensità della colorazione sviluppata sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di pregnenolone nel campione che viene determinata grazie ad un set di standard che permettono di ottenere una retta di taratura. Una maggiore concentrazione di pregnenolone diminuirà la probabilità che l'antigene coniugato con l'enzima si leghi all'anticorpo presente sul fondo del pozzetto e quindi minore sarà la produzione del composto colorato rilevato allo spettrofotometro.

Per determinare la quantità di pregnenolone prodotto sono state utilizzate cellule di glioma di ratto C6, seminate in un multiwell da 96 pozzetti alla densità di  $10^5$  cellule/well. È stato quindi seguito il seguente protocollo:

- È stato aspirato il mezzo di coltura dai pozzetti del multiwell contenenti le cellule C6;
- È stato effettuato un lavaggio con 100  $\mu$ l di soluzione A, precedentemente riscaldata, che è stato quindi aspirata;

#### Soluzione A:

NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, glucosio 10 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7.4)

- Sono stati aggiunti 59.4  $\mu\text{l}$  di soluzione C ad ogni pozzetto;

#### Soluzione C:

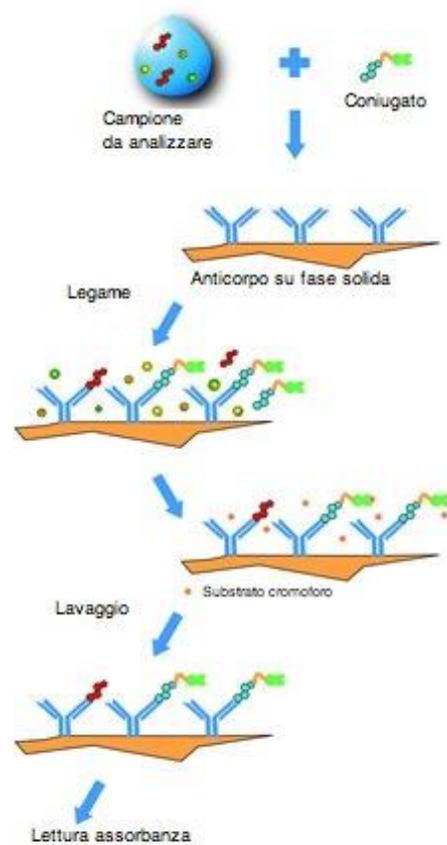
Soluzione B + inibitori del metabolismo del pregnenolone quali Trilostano (25  $\mu\text{M}$ ) e SU10603 (10  $\mu\text{M}$ ). Nello specifico, il primo inibisce l'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi, il secondo l'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi.

#### Soluzione B:

100  $\mu\text{l}$  Soluzione A+ 0.1% di albumina sierica bovina (BSA)

- Sono stati aggiunti 0.6  $\mu\text{l}$  di ligando da testare;
- Le cellule sono state incubate per 2h a 37°C con una pressione parziale di CO<sub>2</sub> pari al 5%;
- In pozzetti separati forniti nel kit sul cui fondo è adeso l'anticorpo specifico per il pregnenolone sono stati inseriti:
  - 50 $\mu\text{l}$  di campione
  - 50 $\mu\text{l}$  di soluzione C
  - 50 $\mu\text{l}$  di soluzione B
  - 50 $\mu\text{l}$  di *Pregnenolone Calibrators* (soluzioni standard a concentrazione nota di pregnenolone, necessarie per costruire la retta di taratura per determinare la concentrazione incognita nei campioni)
- In ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 $\mu\text{l}$  di *Pregnenolone Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate* (antigene coniugato con l'enzima) e la piastra è stata posta in agitazione per 1 h su oscillatore basculante;
- Dopo 3 lavaggi con *Wash Buffer* a ciascun pozzetto è stato aggiunto 150  $\mu\text{l}$  di *TMB Substrate* e lasciati in incubazione per 10 minuti fino allo sviluppo di una colorazione blu nei pozzetti contenenti gli standard;
- Sono stati quindi aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di *Stop Solution* ed è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

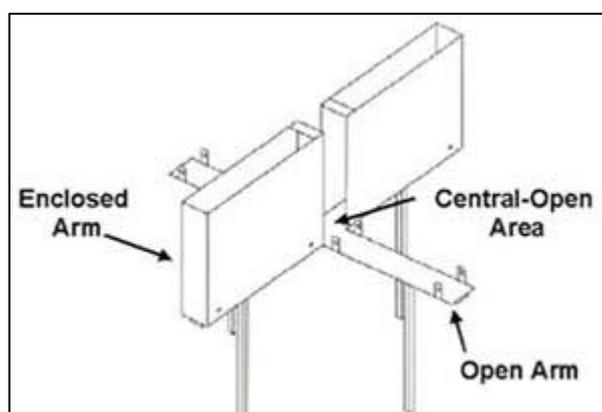
L'aggiunta di PK11195, composti PIGA e XBD173 alle cellule C6 è stata effettuata per completo cambio del mezzo salino con un mezzo contenente concentrazioni crescenti dei composti in un range tra 100 nM e 100  $\mu$ M. Per quanto riguarda XBD173 la massima concentrazione testata è stata 40  $\mu$ M (data la sua insolubilità a 100  $\mu$ M). La concentrazione finale del veicolo (DMSO o etanolo) era la stessa per tutti i campioni e inferiore allo 0.5% (v/v) in modo tale da non influenzare la produzione di steroidi.



**Figura 8.** Scema Test Immunoenzimatico ELISA di tipo competitivo. (adattata da [www.mousecliv.de](http://www.mousecliv.de))

### 3.7 Elevated Plus Maze

L'Elevated Plus Maze (EPM, labirinto a croce elevato) è un test sperimentale utilizzato per lo studio dell'emozionalità di roditori, quali ratti e topi. Grazie anche alla sua facilità di esecuzione è il test comportamentale maggiormente utilizzato nello studio di farmaci per il trattamento dei disturbi d'ansia. Questo test sfrutta il conflitto del roditore tra l'avversione per gli spazi aperti e l'istinto di esplorare ambienti nuovi.



**Figura 9.** Test in vivo Elevated Plus Maze (adattata da [www.augusta.edu](http://www.augusta.edu))

Il Test EPM (**Fig. 9**) consiste in un apparato dalla forma a croce, da cui deriva il nome, formato da due bracci aperti e due bracci chiusi, sollevato dal pavimento di circa 40-70 cm. Una bassa latenza alla prima visita in uno dei bracci aperti e un aumento del tempo trascorso in questi bracci, rispetto ai bracci chiusi, rappresentano un buon indice di bassi livelli di ansia.

Il test inizia ponendo l'animale al centro del labirinto e lasciandolo libero di esplorare l'apparato per 5 minuti durante i quali la sessione viene videoregistrata per mezzo di una telecamera posta sopra l'apparato. Successivamente il comportamento dei soggetti sperimentali viene analizzato e quantificato tramite

l'utilizzo di software dedicati. Comportamenti considerati indicativi dello stato emozionale dell'animale sono: latenza, frequenza e durata delle visite nei bracci aperti e chiusi. Il numero totale di ingressi nei bracci è utilizzato come indice generale di attività. Altri comportamenti osservabili in questo test che possono suggerire una maggiore o minore "disinibizione" del soggetto sperimentale sono i cosiddetti comportamenti (esplorativi) di valutazione del rischio (*risk assessment*).

L'EPM è frequentemente utilizzato nell'industria farmaceutica per lo studio di farmaci modulatori dei livelli di ansia; infatti, in seguito alla somministrazione di sostanze dalle caratteristiche ansiolitiche, è possibile osservare una diminuzione di comportamenti quali la latenza e un aumento della frequenza di esplorazione dei bracci aperti e della durata di permanenza in essi. Viceversa farmaci che provocano effetti opposti possono essere considerati ansiogeni.

### **3.8 Analisi dei dati**

Tutti gli esperimenti sono stati analizzati sia con una regressione lineare che non lineare utilizzando Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). La correlazione dei dati è stata analizzata con il test statistico di Pearson.

I parametri della velocità di associazione e dissociazione dei vari ligandi testati, non radiomarcati, sono stati determinati utilizzando come modello il saggio di "binding cinetico di associazione competitiva".

In tale modello, per derivare i valori di  $K_3$  e  $K_4$  sono stati utilizzati i valori di  $K_1$  e  $K_2$ , rispettivamente  $K_{on}$  e  $K_{off}$  di [ $^3$ H]PK11195, tramite l'equazione:

$$[RL] = \frac{NK_1 [L]}{K_F - K_S} \left[ \frac{K_4(K_F - K_S)}{K_F K_S} + \frac{(K_4 - K_F)}{K_F} \exp(-K_F t) - \frac{(K_4 - K_S)}{K_S} \exp(-K_S t) \right]$$

$$K_F = 0.5 \left[ (K_A + K_B + \sqrt{(K_A - K_B)^2 + 4K_1 K_3 [L] [I]}) \right]$$

$$K_S = 0.5 \left[ (K_A + K_B + \sqrt{(K_A - K_B)^2 + 4K_1 K_3 [L] [I]}) \right]$$

$$K_A = K_1 [L] + K_2$$

$$K_B = K_3 [I] + K_4$$

Dove: [RL] indica il complesso recettore–radioligando, come legame specifico del [ $^3$ H]PK11195 (fmol/mg di proteine);

[L] indica la concentrazione del [ $^3$ H]PK11195 usata (nM);

[I] indica la concentrazione del ligando non radiomarcato (nM);

t indica il tempo (min);

N indica la concentrazione totale di TSPO (fmol/mg di proteine);

$K_1$  e  $K_2$  indicano rispettivamente la  $K_{on}$  ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e la  $K_{off}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) del [ $^3$ H]PK11195 determinate da saggi di associazione;

$K_3$  indica il valore di  $K_{on}$  del ligando non radiomarcato ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ );

$K_4$  indica il valore di  $K_{off}$  del ligando non radiomarcato ( $\text{min}^{-1}$ );

Per il modello di screening, il primo “time point” ( $t_1$ ) è stato fissato come tempo in cui il legame del radioligando ha raggiunto l’equilibrio, cioè quando si ha il 99.5% del legame, definito con la seguente equazione:

$$t_1 = 8 \ln_2 / (K_{on} [\text{radioligando}] + K_{off})$$

Il secondo “time point” ( $t_2$ ) viene arbitrariamente stabilito ad un tempo sufficientemente lungo da permettere al ligando il raggiungimento del plateau.

Il valore di KI (indice cinetico) è stato calcolato dividendo il legame specifico del radioligando misurato al tempo  $t_1$  per il suo legame al tempo  $t_2$  in presenza di un competitore non marcato.

*Capitolo 4*

*Risultati e*

*Discussione*

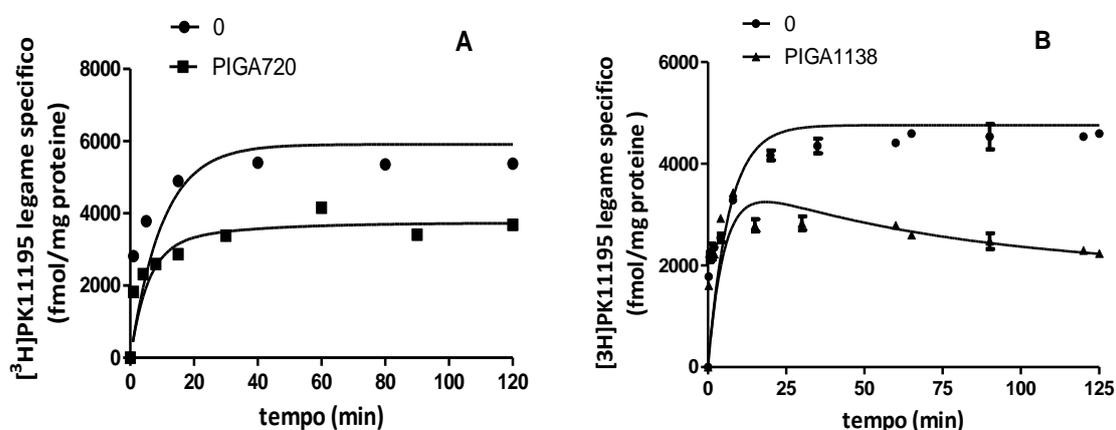
## 4.1 Determinazione del parametro “Residence Time” per ligandi del TSPO

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di determinare, per ligandi del TSPO, il valore di Residence Time (RT) e valutare la potenziale correlazione di tale parametro con l'efficacia steroidogenica *in vitro*.

Nel laboratorio di ricerca presso cui ho svolto la tesi, era stato precedentemente messo a punto un metodo cinetico per la determinazione di RT di ligandi del TSPO, chiamato “saggio di associazione competitiva” (Costa, B. et al, 2016), basato sul modello matematico teorico di Motulsky e Mahan (Motulsky, H. J. & Mahan, L. C., 1984). Tale metodo prevede la valutazione nel tempo della competizione di un ligando del TSPO non radiomarcato con il radioligando [<sup>3</sup>H]PK11195, usato come probe selettivo per TSPO, aggiunti simultaneamente alla preparazione biologica di interesse. Come modello sperimentale, sono state utilizzate membrane comunemente impiegate nei saggi di binding con il radioligando [<sup>3</sup>H]PK11195 e derivate dal rene di ratto, un tessuto ricco in TSPO. Questo esperimento permette di ricavare le costanti di associazione ( $K_{on}$ ) e dissociazione ( $K_{off}$ ) del ligando non radiomarcato; dalla  $K_{off}$  può essere ricavato il valore di RT, essendo quest'ultimo il reciproco di  $K_{off}$ .

Nel presente lavoro di tesi, come primo step è stato determinato il valore di RT dei seguenti ligandi di nuova sintesi appartenenti alla classe delle indol-gliossil-ammidici (PIGA) : PIGA720, PIGA839, PIGA1128, PIGA1136, PIGA1137, PIGA1138, PIGA1214. In parallelo è stato testato anche il ligando PK11195 impiegato come standard di riferimento. Tutti i ligandi sono stati testati alla concentrazione corrispondente a tre volte il loro valore di  $K_i$ , poiché tale concentrazione è stata precedentemente stimata come ottimale per l'esecuzione del saggio cinetico di associazione competitiva. Per i ligandi testati i valori di  $K_i$  erano già stati stimati e pubblicati (Costa, B. et al, 2016, Da Pozzo, E. et al, 2016).

In **Fig.10** sono riportate le curve cinetiche rappresentative ottenute con due dei composti PIGA testati.



**Figura 10. Saggio cinetico di associazione competitiva di ligandi del TSPO.** Curve rappresentative ottenute utilizzando una concentrazione pari a tre volte il valore di  $K_i$  dei ligandi PIGA720 e PIGA1138. La valutazione è stata effettuata utilizzando membrane di rene di ratto.

In accordo con i precedenti dati riportati in letteratura (Costa, B., et al, 2016), l'analisi dei risultati, ha portato all'identificazione di due modelli di legame al sito del [<sup>3</sup>H]PK11195 a seconda del tempo di residenza del ligando competitore usato:

- se il competitore si dissocia più velocemente del radioligando dal target, il legame specifico del radioligando in presenza del competitore aumenta gradualmente fino al raggiungimento dell'equilibrio;
- se invece il competitore si dissocia più lentamente del radioligando, la curva di associazione del radioligando consiste in due fasi: il legame specifico del radioligando in presenza del competitore aumenta gradualmente, tuttavia ad un certo tempo "supera" l'equilibrio per poi diminuire fino al raggiungimento dell'equilibrio.

Come si può osservare dai grafici, il composto PIGA720 (**Fig. 10A**) mostra un profilo di più rapida dissociazione rispetto al radioligando, che corrisponde ad un breve valore di RT ( $K_{on} = 2.18 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_{off} = 0.039 \text{ min}^{-1}$ ; RT=26 min); al contrario il composto PIGA1138 (**Fig. 10B**) mostra un profilo di più lenta dissociazione rispetto al radioligando che corrisponde ad un lungo valore di RT ( $K_{on} = 4.30 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $K_{off} = 0.007 \text{ min}^{-1}$ ; RT=141 min).

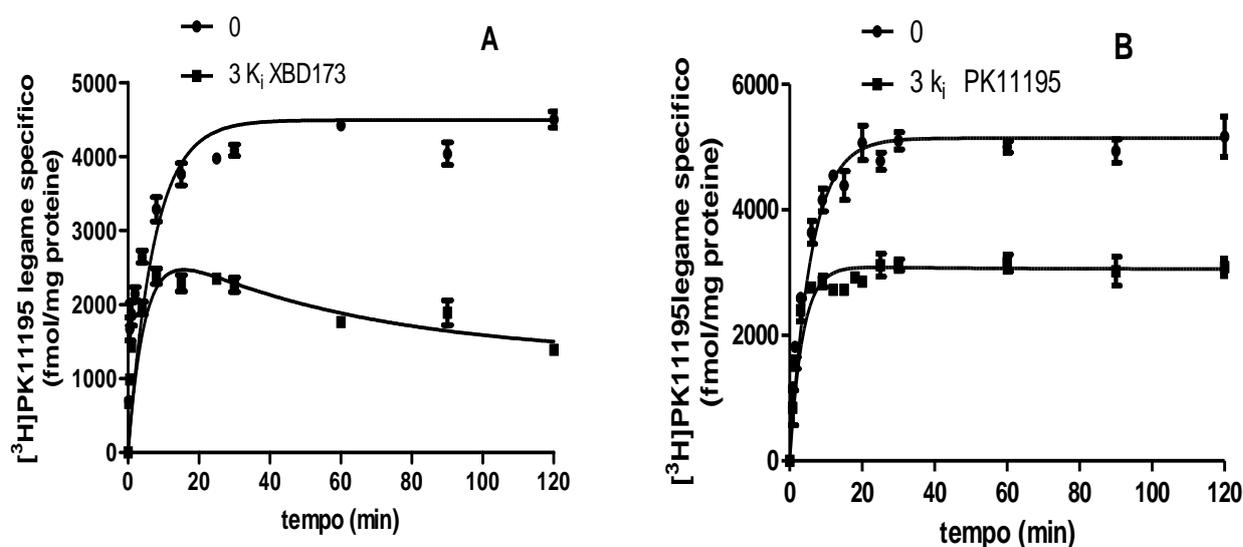
In **Tab. 5** sono riportati i risultati ottenuti per i ligandi PIGA testati e PK11195:

Ligando TSPO	$K_{on}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	RT = $1/K_{off}$ (min)
PIGA720	$2.18 \pm 0.29 \times 10^7$	$0.039 \pm 0.004$	$26 \pm 2$
PIGA839	$1.69 \pm 0.27 \times 10^6$	$0.009 \pm 0.001$	$109 \pm 4$
PIGA1128	$8.10 \pm 0.36 \times 10^7$	$0.018 \pm 0.001$	$55 \pm 2$
PIGA1136	$2.52 \pm 0.21 \times 10^7$	$0.018 \pm 0.001$	$56 \pm 4$
PIGA1137	$3.56 \pm 0.30 \times 10^7$	$0.019 \pm 0.002$	$54 \pm 3$
PIGA1138	$4.30 \pm 0.30 \times 10^7$	$0.007 \pm 0.001$	$141 \pm 4$
PIGA1214	$9.05 \pm 0.51 \times 10^4$	$0.030 \pm 0.004$	$39 \pm 2$
PK11195	$9.30 \pm 0.94 \times 10^6$	$0.029 \pm 0.003$	$34 \pm 3$

**Tabella 5. Parametri cinetici dei ligandi del TSPO ottenuti da *saggio cinetico di associazione competitiva*. Valori di  $K_{on}$ ,  $K_{off}$  e RT di ligandi PIGA e PK11195. I Valori sono medie  $\pm$  SEM di tre esperimenti condotti in duplicato.**

La valutazione di RT è stata inoltre effettuata per XBD173, ligando del TSPO che ha dimostrato promettenti attività ansiolitiche non solo in modelli animali ma anche nell'uomo (Clinical Trials. gov identifier: NCT 00108836; Rupprecht, R. et al., 2009; Kita, A. et al., 2004, Kita, A. et al., 2009).

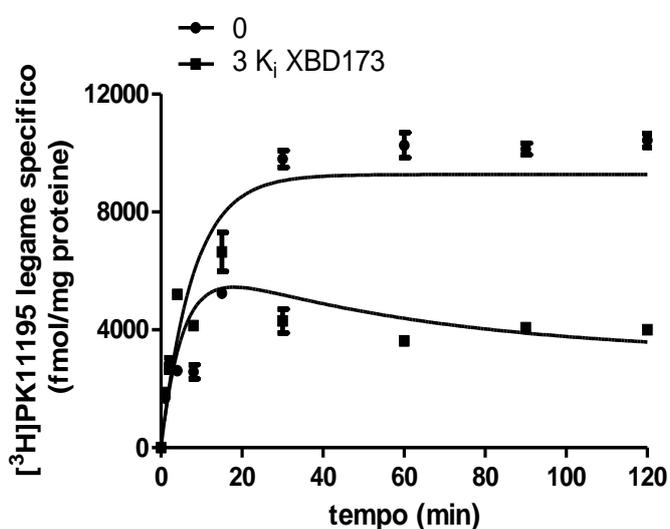
Anche in questo caso è stato eseguito il *saggio cinetico di associazione competitiva* utilizzando una concentrazione di XBD173 pari a tre volte il valore della sua  $K_i$ . Il valore di  $K_i$  di XBD173 è stato misurato nelle membrane di rene di ratto ed è risultato di 2.41 nM, in accordo con i dati riportati in letteratura ( $K_i = 3.04$  nM) e ricavati utilizzando cellule di glioma di ratto C6 (Zhang, L. et al., 2014).



**Figura 11. Parametri cinetici tramite saggio di associazione competitiva.** *Le figure mostrano curve cinetiche di associazione competitiva di XBD173 e di PK11195 ottenute testando una concentrazione di ligando pari a tre volte il valore di  $K_i$ . La valutazione è stata effettuata in membrane di rene di ratto.*

Per XBD173, l'analisi dei dati ottenuti ha evidenziato i seguenti parametri di  $K_{on}$  e  $K_{off}$ :  $K_{on} = 1.23 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{off} = 0.0079 \text{ min}^{-1}$ . Il valore di RT calcolato è stato di 127 min, risultando quindi un composto con un lungo RT (**Fig. 11A**). In **Fig. 11** è riportata anche la curva cinetica di associazione competitiva per PK11195 (**Fig. 11B**), impiegato come ligando del TSP0 di riferimento ( $K_{on} = 9.30 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{off} = 0.0029 \text{ min}^{-1}$ , RT = 34 min).

Per verificare se il dato ottenuto utilizzando membrane di rene di ratto potesse essere esteso ai tessuti steroidogenici, i saggi di binding sono stati condotti utilizzando membrane di surrene di ratto. Inizialmente è stato determinato il valore di  $K_i$  di XBD173, ottenendo un valore pari a 2.2 nM. Successivamente, testando il composto alla concentrazione pari a tre volte la sua  $K_i$ , è stata effettuata la cinetica di associazione competitiva che ha dimostrato valori di parametri cinetici sovrapponibili a quelli trovati nelle membrane di rene di ratto ( $K_{on}= 1.15 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{off}= 0.0083 \text{ min}^{-1}$ ,  $RT= 120 \text{ min}$ ) (**Fig. 12**).

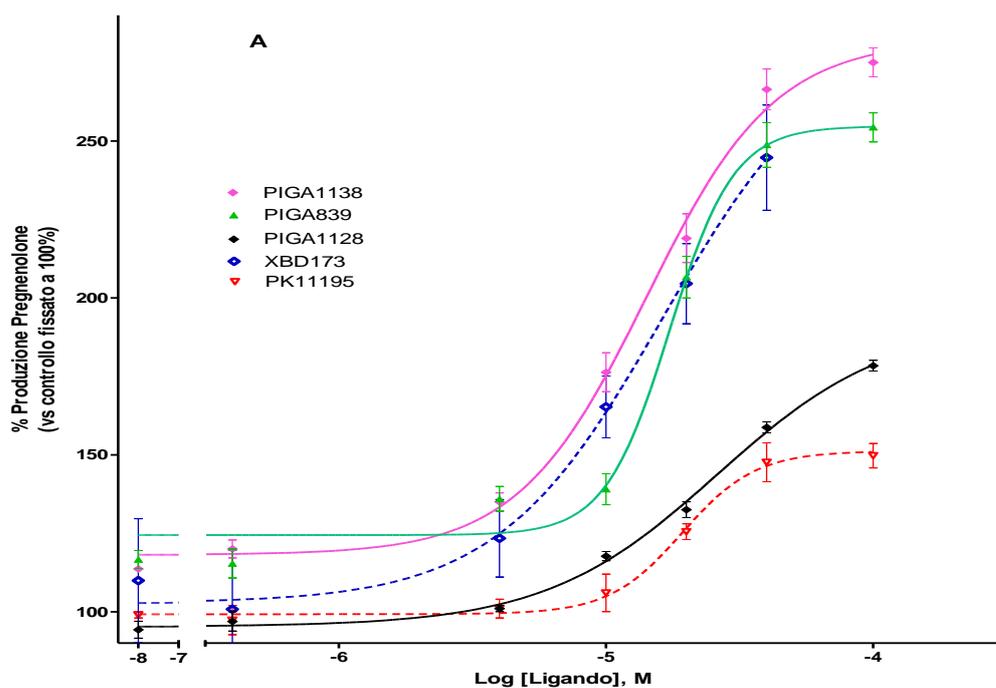


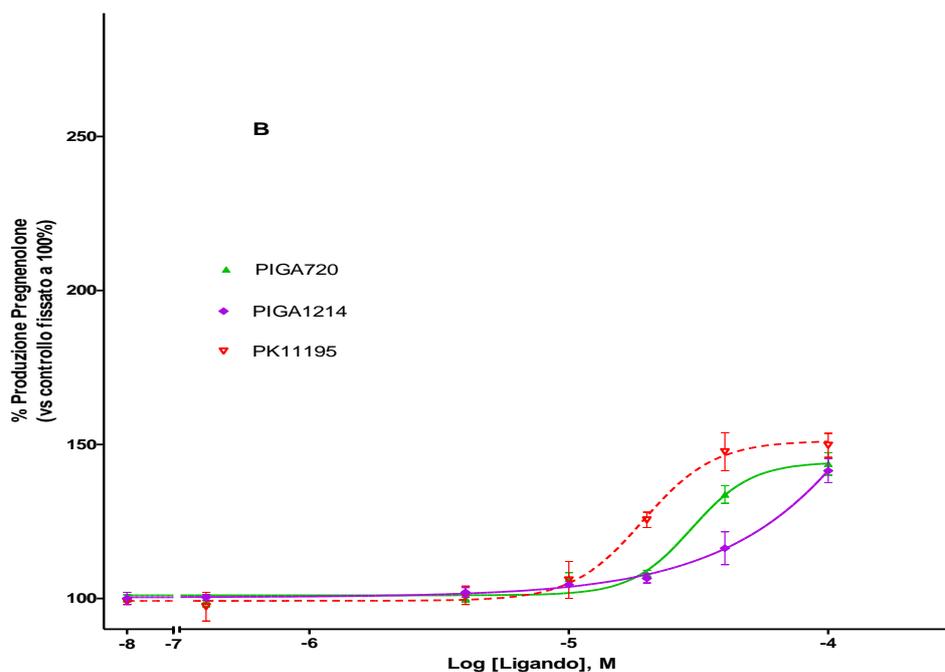
**Figura 12. Parametri cinetici XBD173.** Curva rappresentativa di XBD173 ottenuta tramite saggio cinetico di associazione competitiva (testando una concentrazione pari a tre volte la  $K_i$ ) utilizzando membrane di surrene di ratto.

Tale risultato suggerisce che il dato ottenuto utilizzando membrane di rene di ratto può essere applicato ai “classici” tessuti steroidogenici.

## 4.2 Efficacia steroidogenica dei ligandi del TSPO

L'efficacia steroidogenica ( $E_{max}$ ) dei ligandi del TSPO testati è stata misurata in termini di produzione di pregnenolone *in vitro*, utilizzando cellule di glioma di ratto C6 come modello steroidogenico. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di ligando a tempi di incubazione fissi (2h), in presenza degli inibitori dell'ulteriore metabolismo del pregnenolone Trilostano e SU10603 e la quantità di pregnenolone rilasciata nel mezzo "serum-free" è stata determinata con il test immunoenzimatico ELISA. In **Fig.13** sono riportati gli effetti steroidogenici dose-dipendenti di composti con lungo RT (**Fig. 13A**) e con breve RT (**Fig. 13B**).





**Figura 13. Efficacia steroidogenica dei composti testati.** A) *Effetti steroidogenici dose-dipendenti di composti con lungo RT.* B) *Effetti steroidogenici dose-dipendenti di composti con breve RT.*

Per ciascun ligando è stata determinata l'efficacia massima, corrispondente al valore di  $E_{max}$ , relativa alla più alta concentrazione testata. Tale valore è stato determinato alla concentrazione di 100  $\mu$ M per i ligandi PIGA, nel caso del ligando XBD173 la massima concentrazione testata è stata di 40  $\mu$ M a causa della sua insolubilità alla concentrazione di 100  $\mu$ M.

La quantità di pregnenolone prodotto è stata determinata rispetto al controllo (campione trattato solo con DMSO) che rappresenta la produzione basale di pregnenolone (fissando tale valore al 100% della produzione). Al fine di effettuare un'analisi comparativa tra i ligandi testati, è stato condotto il confronto tra i valori di  $E_{max}$  ottenuti alla concentrazione di 40  $\mu$ M. I valori ottenuti, riportati in **Tab.6**, sono il risultato di tre esperimenti effettuati in duplicato.

**Tabella 6. Valori di  $E_{max}$  di ligandi del TSPO.** L'efficacia steroidogenica ( $E_{max}$ ) corrisponde alla quantità di pregnenolone rilasciata da cellule C6 di glioma di ratto a seguito dell'esposizione per 2h con ligandi PIGA o XBD173 o con lo standard di riferimento PK11195.

Ligando	$E_{max}$ (a 40 $\mu$ M) (veicolo 100%)
TSPO	
PIGA720	133 $\pm$ 3
PIGA839	249 $\pm$ 7
PIGA1128	159 $\pm$ 2
PIGA1136	164 $\pm$ 2
PIGA1137	208 $\pm$ 5
PIGA1138	266 $\pm$ 7
PIGA1214	116 $\pm$ 5
XBD173	245 $\pm$ 17
PK11195	148 $\pm$ 6

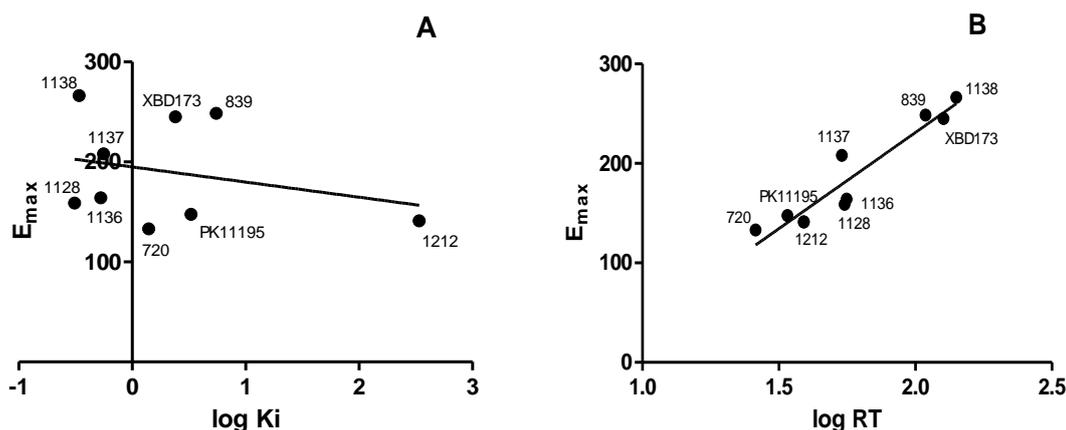
Tra i ligandi testati, i composti PIGA839, PIGA1137, PIGA1138 e XBD173 sono risultati altamente steroidogenici, con il composto PIGA1138 che è risultato avere la maggiore efficacia ( $E_{max}$  di 266%) mentre i composti PIGA720, PIGA1128, PIGA1136, PIGA1214 e PK11195 sono risultati poco steroidogenici, con il composto PIGA720 che è risultato avere la minore efficacia ( $E_{max}$  di 133%).

### 4.3 Analisi di correlazione tra RT ed efficacia steroidogenica dei ligandi del TSPO

Al fine di determinare se l'efficacia steroidogenica dei ligandi del TSPO potesse essere messa in relazione al "tempo di residenza" o all'affinità, di legame sono state effettuate due analisi di correlazione:

- 1) tra il valore di  $E_{max}$  e il logaritmo del parametro RT
- 2) tra il valore di  $E_{max}$  e il logaritmo del parametro  $K_i$

I risultati delle analisi di correlazione sono riportati in **Fig.14**.



**Figura 14.** Analisi di correlazione tra efficacia steroidogenica e i parametri di legame (RT e  $K_i$ ) dei ligandi del TSPO. A) Analisi di correlazione tra  $E_{max}$  e  $\log K_i$ . B) Analisi di correlazione tra  $E_{max}$  e  $\log RT$ .

Come si può osservare dal grafico riportato in **Fig. 14A**, l'efficacia steroidogenica ( $E_{max}$ ) non è risultata significativamente correlata con il logaritmo di  $K_i$  (Pearson  $r=-0.2742$ ;  $P=0.4752$ ;  $r^2=0.07520$ ). Al contrario,  $E_{max}$  è correlata in maniera altamente significativa con il logaritmo di RT (Pearson  $r=0.9491$ ;  $P<0.0001$ ;  $r^2=0.9008$ ) (**Fig. 14B**).

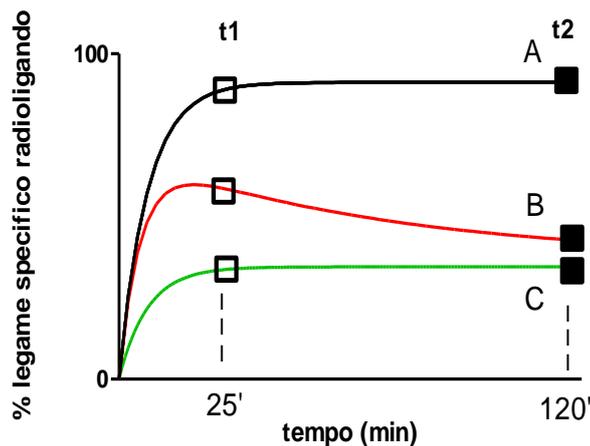
## 4.4 Sviluppo di un metodo di screening cinetico per i ligandi del TSPO

Nonostante il *saggio di associazione competitiva* messo a punto sia stato semplificato, mediante l'utilizzo di una singola concentrazione di competitore, rispetto al metodo "tradizionale", che prevede l'utilizzo di tre concentrazioni, tale saggio risulta comunque laborioso e dispendioso. Quindi, per ottimizzare la selezione di ligandi lead del TSPO basata sul parametro RT, è stato messo a punto un metodo di screening più rapido.

Questo nuovo approccio prevede la valutazione del legame specifico del [<sup>3</sup>H]PK11195 in presenza di un competitore non marcato, a soli due tempi di incubazione ( $t_1$  e  $t_2$ ) rendendolo adatto allo screening di un gran numero di ligandi del TSPO (**Fig.15**).

Sono stati analizzati i dati cinetici ottenuti da vari ligandi PIGA (PIGA720, PIGA839, PIGA1128, PIGA1136, PIGA1137, PIGA1138, PIGA1214), il ligando classico PK11195 e XBD173, prendendo in considerazione il legame specifico del radioligando ai due tempi di incubazione:

- $t_1$  corrisponde al tempo di incubazione nel quale il legame del radioligando raggiunge l'equilibrio in assenza del competitore ed è stato fissato a 25 min.
- $t_2$  corrisponde al tempo di incubazione sufficientemente lungo da equilibrare il radioligando e il competitore al target ed è stato fissato a 120 min.

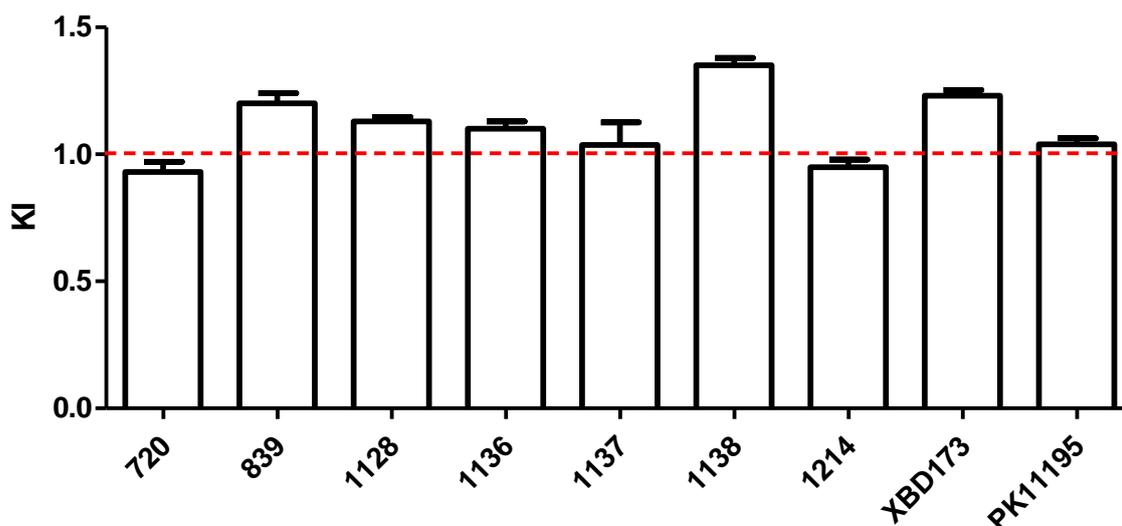


**Figura 15.** Metodo di screening cinetico per determinare l'indice cinetico di ligandi del TSPO. A) Curva in assenza di competitore. B) Curva in presenza di competitore con RT maggiore rispetto al radioligando. C) Curva in presenza di competitore con RT uguale o minore rispetto al radioligando.

Per ciascun composto è stato calcolato il rapporto del legame specifico a  $t_1$  e  $t_2$ , indicato come indice cinetico (*kinetic index*, KI).

$$KI = \frac{t_1}{t_2}$$

Nel caso in cui il competitore si dissocia in modo simile o più velocemente del radioligando, il valore di KI sarà pari o minore di 1; se invece il competitore si dissocia più lentamente del radioligando, sarà maggiore di 1.

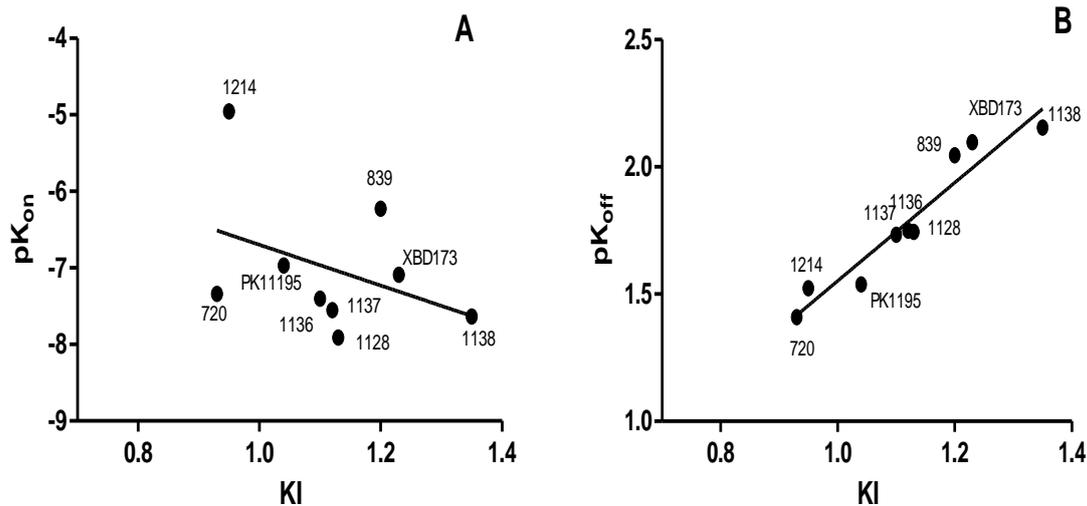


**Figura 16.** Indice cinetico dei ligandi del TSPO testati. L'Indice cinetico (KI) è mostrato come valore medio di tre esperimenti separati.

Come si osserva dalla **Fig.16**, i valori di KI risultano  $\leq 1$  per i ligandi PIGA720, PIGA 1214, PIGA1136, PK11195 e ciò suggerisce una più rapida dissociazione dal target rispetto al [ $^3$ H]PK11195; risultano invece  $> 1$  per i ligandi PIGA839, PIGA1128, PIGA1137, PIGA1138, XBD173 indicando la loro più lenta dissociazione dal TSPO.

Coerentemente con tali risultati, i ligandi del TSPO con valori di KI  $\leq 1$  o  $>1$  hanno mostrato valori di RT, rispettivamente, più brevi e più lunghi comparati con il [ $^3$ H]PK11195 (vedi **Tab.5**).

Sebbene questo metodo di screening non permetta di quantificare il valore di RT, può predire se un ligando presenterà lungo o breve RT. Nel caso in cui un ligando presenti un indice cinetico  $>1$ , potrà essere selezionato e analizzato con il saggio cinetico di associazione competitiva al fine di determinarne il valore di RT.



**Figura 17.** Analisi di correlazione di KI con  $pK_{on}$  e  $pK_{off}$

L'analisi di correlazione tra l'indice cinetico e il parametro cinetico di associazione ( $K_{on}$ ) e dissociazione ( $K_{off}$ ) ha evidenziato i seguenti risultati:

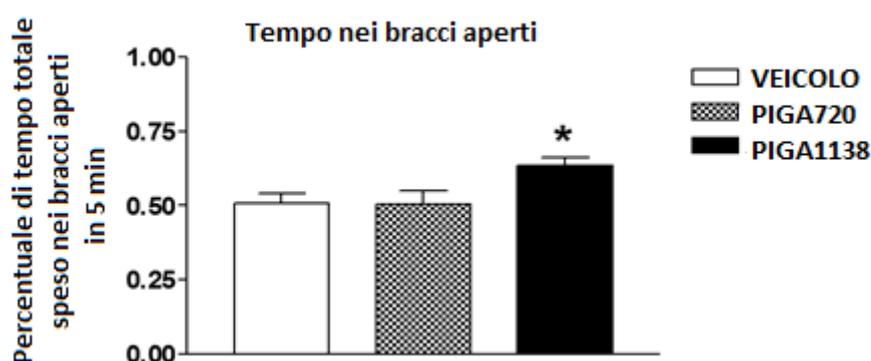
- 1) nessuna correlazione significativa tra KI e il logaritmo negativo di  $K_{on}$  (Pearson  $r=-0.3920$ ,  $P= 0.2967$ ;  $r^2=0.1537$ ) (**Fig. 17A**).
- 2) una correlazione altamente significativa tra KI e il logaritmo negativo di  $K_{off}$  (Pearson  $r= 0.9605$ ;  $P<0.0001$ ;  $r^2= 0.9226$ ) (**Fig. 17B**).

Questi risultati suggeriscono che l'indice cinetico è un buon valore per predire la  $K_{off}$  di un ligando del TSPO e di conseguenza il suo RT.

## 4.5 Analisi dell'attività ansiolitica di ligandi PIGA

In collaborazione con un gruppo di ricerca di farmacologi dell'Università di Cagliari, è stato effettuato il test Elevated Plus Maze (EPM) per verificare i potenziali effetti ansiolitici di due ligandi PIGA con differenti profili di permanenza al TSPO (PIGA1138 con lungo RT e PIGA720 con breve RT). A tale scopo i composti PIGA1138 e PIGA720 sono stati somministrati in ratti alla dose di 30 mg/kg per via intra-peritoneale.

Sono stati misurati vari parametri includenti la durata di permanenza degli animali sia nei bracci aperti che chiusi del labirinto (**Fig.18**).



**Figura 18. Test EPM.** Durata permanenza degli animali nei bracci aperti del labirinto, dose somministrata 30 mg/kg per via intra-peritoneale.

In tale modello sperimentale, il composto PIGA1138, è risultato con attività ansiolitica, come dimostrato dalla significativa durata di permanenza degli animali nei bracci aperti del labirinto. Al contrario, il composto PIGA720, non ha evidenziato la capacità di determinare effetti ansiolitici.

## 4.6 Conclusioni

I dati ottenuti nel presente lavoro di tesi hanno permesso di classificare i ligandi testati in ligandi a breve e lungo tempo di permanenza (RT) al sito di legame del [<sup>3</sup>H]PK11195. Sono risultati appartenenti alla prima categoria il composto PIGA720, PIGA1136 e PIGA1214 mentre i composti PIGA839, PIGA1128, PIGA1137, PIGA1138, XBD173 alla seconda categoria.

Mediante l'uso dei ligandi del TSPO è stato possibile evidenziare una correlazione positiva altamente significativa tra il tempo che un ligando spende a contatto con il TSPO e la sua capacità di stimolare la steroidogenesi, suggerendo che il RT possa essere usato come nuovo parametro *in vitro* predittivo di efficacia steroidogenica.

Per quanto riguarda l'aspetto terapeutico, questo nuovo concetto apre la strada all'identificazione di farmaci attivi sul TSPO con una promettente attività ansiolitica. A sostegno di tale ipotesi, il composto PIGA1138, caratterizzato da un lungo RT al TSPO e alta capacità steroidogenica, ha evidenziato un effetto ansiolitico nel modello dell'EPM.

Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha rivolto l'attenzione a questo genere di composti per il trattamento di disturbi psichiatrici, tra cui disturbi dell'ansia, depressione e schizofrenia, in quanto tali molecole hanno mostrato una rapida azione ansiolitica senza i tipici effetti indesiderati delle benzodiazepine, quali sedazione e tolleranza (Yoshimura, R. F., et al., 2014). Questa strategia quindi apre la strada allo sviluppo di ligandi del TSPO come nuova classe di farmaci ansiolitici con favorevoli profili di sicurezza e tollerabilità. A differenza delle benzodiazepine che agiscono come modulatori diretti del recettore GABA<sub>A</sub>, i ligandi del TSPO aumentano la trasmissione GABAergica attraverso la promozione della sintesi di neurosteroidi, considerati le più potenti molecole endogene dell'attività del recettore GABA<sub>A</sub>.

La messa a punto del metodo di screening che richiede due soli tempi di incubazione per testare ciascun ligando, aumenta notevolmente l'efficienza della selezione di tali molecole. Anche se in questo modo non è possibile quantificare esattamente il RT, tramite l'indice cinetico possiamo classificare un ligando come avente lungo o breve RT al sito di legame del [<sup>3</sup>H]PK11195. Successivamente per quantificare il RT di un ligando di interesse può essere eseguito un saggio cinetico di associazione competitiva.

Questa strategia consente di ottimizzare lo screening dei ligandi del TSPO basata sul RT durante i programmi di drug discovery, permettendo una riduzione dei tempi e dei costi della ricerca.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che il valore di RT è un parametro migliore per stimare l'efficacia steroidogenica di un ligando del TSPO rispetto al parametro di equilibrio termodinamico  $K_i$ . Questi dati, in combinazione con la futura disponibilità di un database di valori di RT, aprono la via all'ottimizzazione dei ligandi del TSPO come promettenti strumenti terapeutici.

## Bibliografia

Abelli, M., Chelli, B., Costa, B., Lari, L., Cardini, A., Gesi, C., Muti, M., Lucacchini, A., Martini, C., Cassano, G. B., and Pini, S. (2010) Reductions in platelet 18-kDa translocator protein density are associated with adult separation anxiety in patients with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 62, 98–103.

Austin, C. J., Kahlert, J., Kassiou, M., and Rendina, L. M. (2013). The translocator protein (TSPO): A novel target for cancer chemotherapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 1212-1216.

Auta, J., Romeo, E., Kozikowski, A., Ma, D., Costa, E., Guidotti, A. (1993) Participation of mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anticonflict, antineophobic and anticonvulsant action of 2-aryl-3-indoleacetamide and imidazopyridine derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 649-656.

Bae, K., Shim, H., Balu, D., Kim, S., and Yu, S. (2014). Translocator protein 18 kDa negatively regulates inflammation in microglia. *J Neuroimmune Pharmacol.*, 9(3), 424–37.

Braestrup, C., Albrechtsen, R., Squires, R.F. (1977). High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature*, 269, 702–704.

Barresi, E., Bruno, A., Taliani, S., Cosconati, S., Da Pozzo, E., Salerno, S., Simorini, F., Daniele, S., Giacomelli, C., Marini, A. M., La Motta, C., Marinelli, L., Cosimelli, B., Novellino, E., Greco, G., Da Settimo, F., and Martini, C. (2015) Deepening the Topology of the Translocator Protein Binding Site by Novel N,N-Dialkyl-2-arylindol-3-ylglyoxylamides. *J. Med. Chem.*, 58, 6081–6092.

Bernassau, J. M., Reversat, J. L., Ferrara, P., Caput, D. & Lefur, G. (1993) A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. *J. Mol. Graph.*, 11, 236–244.

Bitran, D., Foley, M., Audette, D., Leslie, N. & Frye, C. A. (2000) Activation of peripheral mitochondrial benzodiazepine receptors in the hippocampus stimulates allopregnenolone synthesis and produces anxiolytic-like effects in the rat. *Psychopharmacology*, 151, 64-71.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.

Caballero, B., Veenman, L., Gavish, M. (2013) Role of mitochondrial translocator protein (18kDa) on mitochondrial- related cell death process. *Rec. Pat. End. Metab. Immune Drug Discovery*, 7(2), 86-101.

Campiani G., Nacci V., Fiorini I., De Filippis M. P., Garofalo A., Ciani S. M., Greco G., Novellino E., Williams D. C., Zisterer D. M., Woods M. J., Mihai C., Manzoni C., Mennini T. (1996) Synthesis, biological activity, and SARs of Pyrrolobenzoxazepine derivatives, a new class of specific “peripheral-type” benzodiazepine receptor ligands., *J. Med. Chem.*, 39, 3435-50.

Campiani, G., Ramunno, A., Fiorini, I., Nacci, V., Morelli, E., Novellino, E., Goegan, M., Mennini, T., Sullivan, S., Zisterer, D. M., Williams, C. D. (2002) Synthesis of new molecula probes for investigation of steroid biosynthesis induced by selective interaction with peripheral type benzodiazepine receptors (PBR). *J. Med. Chem*, 45, 4276-4281.

Chelli, B., Pini, S., Abelli, M., Cardini, A., Lari, M., Muti, M., Gesi, C., Cassano, G. B., Lucacchini, A., Martini, C. (2008) Platelet 18 kDa Translocator Protein density in reduced in depressed patients with adult separation anxiety. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, *18*, 249-254.

Chelli, B., Salvetti, A., Da Pozzo, E., Rechichi, M., Spinetti, F., Rossi, L., Costa, B., Lena, A., Rainaldi, G., Scatena, F., Vanacore, R., Gremigni, V., and Martini, C. (2008) PK 11195 differentially affects cell survival in human wild-type and 18 kDa Translocator protein silenced ADF astrocytoma cells. *J. Cell. Biochem.*, *105*, 712–723.

Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* *22*, 3099–3108.

Copeland, R. A., Pompliano, D. L., Meek, T. D. (2006) Drug–target residence time and its implications for lead optimization. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*, 730-739.

Costa, B., Da Pozzo, E., Cavallini, C., Taliani, S., Da Settimo, F., and Martini, C. (2016) Long Residence Time at the Neurosteroidogenic 18 kDa Translocator Protein Characterizes the Anxiolytic Ligand XBD173. *ACS. Chem. Neurosci.*

Costa, B., Da Pozzo, E., Chelli, B., Simola, N., Morelli, M., Luisi, M., Maccheroni, M., Taliani, S., Simorini, F., Da Settimo, F., Martini, C. (2010) Anxiolytic properties of a 2-phenylindolglyoxylamide TSPO ligand: Stimulation of *in vitro* neurosteroid production affecting GABAA receptor activity. *Psychoneuroendocrinology.*, *36*, 463–472.

Costa, B., Da Pozzo, E., Giacomelli, C., Barresi, E., Taliani, S., Da Settimo, F., and Martini, C. (2016) TSPO ligand residence time: a new parameter to predict compound neurosteroidogenic efficacy. *Sci. Rep.* 6, 18164.

Costa, B., Da Pozzo, E., and Martini, C. (2012) Translocator protein as a promising target for novel anxiolytics. *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (4), 270-85.

Costa, B., Pini, S., Martini, C., Abelli, M., Gabelloni, P., Landi, S., Muti, M., Gesi, C., Lari, L., Cardini, A., Galderisi, S., Mucci, A., Lucacchini, A., Cassano, G. B. (2009) Ala147Thr substitution in translocator protein is associated with adult separation anxiety in patients with depression. *Psychiatr. Genet.*, 19, 110-111.

Da Pozzo, E., Costa, B., and Martini, C. (2012) Translocator protein (TSPO) and neurosteroids: implications in psychiatric disorders. *Curr. Mol. Med.* 12,426-442.

Da Pozzo, E., Giacomelli, C., Costa, B., Cavallini, C., Taliani, S., Barresi, E., Da Settimo, F., and Martini, C. (2016) TSPO PIGA ligands promote neurosteroidogenesis and human astrocyte well-being. *Int. J. of Mol. Sci.*, 17 (7)

Da Settimo, F., Simorini, F., Taliani, S., La Motta, C., Marini, A. M., Salerno, S., Bellandi, M., Novellino, E., Greco, G., Cosimelli, B., Da Pozzo, E., Costa, B., Simola, N., Morelli, M., and Martini, C. (2008) Anxiolytic-like effects of N,N-dialkyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides by modulation of translocator protein promoting neurosteroid biosynthesis. *J. Med. Chem.*, 51, 5798–5806.

Fan, J., Campioli, E., Midzak, A., Culty, M., and Papadopoulos, V. (2015) Conditional steroidogenic cell-targeted deletion of TSPO unveils a crucial role in viability and hormone-dependent steroid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112 (23), 7261-6.

Ferzaz, B., Brault, E., Bourliaud, G., Robert, J. P., Poughon, G., Claustre, Y., Marguet, F., Liere, P., Schumacher, M., Nowicki, J. P., Fournier, J., Marabout, B., Sevrin, M.,

George, P., Soubrie, P., Benavides, J., Scatton, B. (2002) SSR180575 (7-chloro-N,N,5-trimethyl-4-oxo-3-phenyl-3,5-dihydro-4H-pyridazino[4,5-b]indole-1-acetamide), a peripheral benzodiazepine receptor ligand, promotes neuronal survival and repair. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301, 1067–1078.

Galiegue, S., Tinel, N., Casellas, P. (2003) The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target. *Curr. Med. Chem.*, 10 (16), 1563-72.

Gatliff, J. & Campanella, M. (2012). The 18 kDa translocator protein (TSPO): a new perspective in mitochondrial biology. *Curr. Mol. Med.*, 12, 356–368.

Gavish, M., Laor, N., Bidder, M., Fisher, D., Fonia, O., Muller, U., Reiss, A., Wolmer, L., Karp, L., and Weizman, R. (1996) Altered platelet peripheral type benzodiazepine receptor in posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, 14, 181–186.

Giorgio, V., Von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., Lippe, G., and Bernardi, P. (2013) Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5887–5892.

Girard, C. (2012) Axonal regeneration and neuroinflammation: roles for the translocator protein 18 kDa. *Neuroendocrinol.*, 24, 71–81.

Guo, D., van Dorp, E. J., Mulder-Krieger, T., van Veldhoven, J. P., Brussee, J., Ijzerman, A. P., and Heitman, L. H. (2013) Dual-point competition association assay: a fast and high-throughput kinetic screening method for assessing ligand-receptor binding kinetics. *J. Biomol. Screening*, 18 (3), 309–320.

Jamin, N., Neumann, J.M., Ostuni, M.A., Vu, T.K., Yao, Z. X., Murail, S., Robert, J. C., Giatzakis, C., Papadopoulos, V., Lacapère, J. J. (2005) Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Molecular Endocrinolog.*, 19, 588-94.

Johnson, M. R., Marazziti, D., Brawman-Mintzer, O., Emmanuel, N. P., Ware, M. R., Morton, W. A., Rossi, A., Cassano, G. B., and Lydiard, R. B. (1998) Abnormal peripheral benzodiazepine receptor density associated with generalized social phobia. *Biol. Psychiatry*, 43, 306–9.

Kita, A., and Furukawa, K. (2008) Involvement of neurosteroids in the anxiolytic-like effects of AC-5216 in mice. *Pharmacol., Biochem. Behav.*, 89, 171–178.

Kita, A., Kinoshita, T., Kohayakawa, H., Furukawa, K., and Akaike, A. (2009) Lack of tolerance to anxiolysis and withdrawal symptoms in mice repeatedly treated with AC-5216, a selective TSPO ligand. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 33 (6), 1040–5.

Kita, A., Kohayakawa, H., Kinoshita, T., Ochi, Y., Nakamichi, K., Kurumiya, S., Furukawa, K., and Oka, M. (2004) Antianxiety and antidepressant-like effects of AC-5216, a novel mitochondrial benzodiazepine receptor ligand. *Br. J. Pharmacol.*, 142 (7), 1059–72.

Kreisl, W. C., Lyoo, C. H., McGwier, M., Snow, J., Jenko, K. J., Kimura, N., Corona, W., Morse, C. L., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., McMahon, F. J., Turner, R. S., Innis, R. B., and the Biomarkers Consortium PET Radioligand Project Team (2013). In vivo radioligand binding to translocator protein correlates with severity of alzheimer's disease. *Brain*, 136(7), 2228–2238.

Marazziti, D., Rotondo, A., Martini, C., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Pancioli-Guadagnucci, M. L., Diamone, B. I., Borison, R., Cassano, G. B. (1994) Changes in peripheral benzodiazepine receptors in patients with panic disorder and obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology*, 29, 8-11.

Miller W.L., (2007) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 663–76.

Motulsky, H. & Christopoulos, A. (2003) Analyzing kinetic binding data. In: Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. *A practical guide to curve fitting*. New-York: Oxford University Press., 245–251.

Motulsky, H. J., and Mahan, L. C. (1984) The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol. Pharmacol.*, 25, 1–9.

Mukhin, A. G., Papadopoulos, V., Costa, E. & Krueger, K. E. (1989) Mitochondrial benzodiazepine receptors regulate steroid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9813–9816.

Northdurfter, C., Rammes, G., Baghai, C.T., Schüle, C., Schumachers, M., Papadopoulos, V., and Rupprecht, R., (2011) Translocator protein (18kDa) as a target for novel anxiolytics with a favourable side-effect profile. *J. Neuroendocrinol.*, 24, 82-92.

Okuyama, S., Chaki, S., Yoshikawa, R., Ogawa, S., Suzuki, Y., Okubo, T., Nakazato, A., Nagamine, M., Tomisawa, K. (1999) Neuropharmacological profile of peripheral benzodiazepine receptor agonists. DAA1097 and DAA1106. *Life Sci.*, 64, 1455-1464.

Papadopoulos, V., Aghazadeh, Y., Fan, J., Campioli, E., Zirkin, B., and Midzak, A. (2015) Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 408, 90–8.

Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapere, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., and Gavish, M. (2006). Translocator protein (18kda): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(8), 402–409.

Pini, S., Martini, C., Abelli, M., Muti, M., Gesi, C., Montali, M., Chelli, B., Lucacchini, A., and Cassano, G. B. (2005) Peripheral-type benzodiazepine receptor binding sites in platelets of patients with panic disorder associated to separation anxiety symptoms. *Psychopharmacology (Berl)*, 181, 407–11.

Porcu, P., Barron, A. M., Frye, C. A., Walf, A. A., Yang, S. Y., He, X. Y., Morrow, A. L., Panzica, G. C., and Melcangi, R. C. (2016) Neurosteroidogenesis today: novel targets for neuroactive steroid synthesis and action and their relevance for translational research. *J. Neuroendocrinol.*, DOI: 10.1111/jne.12351.

Primofiore, G., Da Settimo, F., Taliani, S., Simorini, F., Patrizi, M. P., Novellino, E., Greco, G., Abignente, E., Costa, B., Chelli, B., and Martini, C. (2004) N,N-dialkyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides. A new class of potent and selective ligands at the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Med. Chem.*, 47, 1852–1855.

Rägo, L., Saano, V., Auvinen, T., Adojaan, A., Holma, R., Airaksinen, M. M. (1992) The effect of chronic treatment with peripheral benzodiazepine receptor ligands on behavior and GABA<sub>A</sub>/ benzodiazepine receptors in rat. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 346, 432–436.

Ravikumar, B., Crawford, D., Dellovade, T., Savinainen, A., Graham, D., Liere, P., Oudinet, J. P., Webb, M., and Hering, H. (2016) Differential efficacy of the TSPO ligands etifoxine and XBD-173 in two rodent models of Multiple Sclerosis. *Neuropharmacology*, *108*, 229–237.

Rechichi, M., Salvetti, A., Chelli, B., Costa, B., Da Pozzo, E., Spinetti, F., Lena, A., Evangelista, M., Rainaldi, G., Martini, C., Gremigni, V., and Rossi, L. (2008). Tspo over-expression increases motility, transmigration and proliferation properties of c6 rat glioma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1782*(2), 118 – 125.

Ritsner, M., Modai, I., Gibel, A., Leschiner, S., Silver, H., Tsinovoy, G., Weizman, A., Gavish, M. (2003) Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in persistently violent schizophrenia patients. *J. Psychiatr. Res.*, *37*, 549-556.

Rocca, P., Beoni, A. M., Eva, C., Ferrero, P., Maina, G., Bogetto, F., and Ravizza, L. (2000) Lymphocyte peripheral benzodiazepine receptor mRNA decreases in obsessive compulsive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *10*, 337–40.

Rocca, P., Beoni, A. M., Eva, C., Ferrero, P., Zanalda, E., Ravizza, L. (1998) Peripheral benzodiazepine receptors messenger RNA is decreased in lymphocytes of generalized anxiety disorder patients. *Biol. Psychiatry*, *43*, 767-773.

Rocca, P., Ferrero, P., Gualerzi, A., Zanalda, E., Maina, G., Bergamasco, M., Ravizza, L. (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors in anxiety disorders. *Acta Psychiatr. Scand.*, *84*, 537-544.

Romeo, E., Cavallario, S., Korneyev, A., Kozikowski, A. P., Ma, D., Polo, A., Costa, E., Guidotti, A. (1993) Stimulation of brain steroidogenesis by 2-aryl-indole-3

acetamide derivatives acting at the mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267, 462-471.

Rone M. B., Fan J., Papadopoulos V. (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 646-58.

Rosenberg, N., Rosenberg, O., Weizman, A., Veenman, L., and Gavish, M. (2013). In vitro catabolic effect of protoporphyrin ix in human osteoblast-like cells: possible role of the 18 kDa mitochondrial translocator protein. *J Bioenerg Biomembr.*, 45(4), 333-41.

Rupprecht R. (2003) Neuroactive steroids: mechanism of action and neuropsychopharmacological properties., *Psyconeuroendocrinology*, 28, 139-68.

Rupprecht, R., Papadopoulos, V., Rammes, G., Baghai, T.C., Fan, J., Akula, N., Groyer, G., Adams, D., Schumacher, M. (2010) Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 9, 971-988.

Rupprecht, R., Rammes, G., Eser, D., Baghai, T. C., Schüle, C., Nothdurfter, C., Troxler, T., Gentsch, C., Kalkman, H. O., Chaperon, F., Uzunov, V., McAllister, K. H., Bertaina-Anglade, V., La Rochelle, C. D., Tuerck, D., Floesser, A., Kiese, B., Schumacher, M., Landgraf, R., Holsboer, F., and Kucher, K. (2009) Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. *Science*, 325 (5939), 490-3.

Scarf, A. M., Auman, K. M., and Kassiou, M. (2012) Is there any correlation between binding and functional effects at the Translocator protein (TSPO) (18 kDa)? *Curr. Mol. Med.*, *12*, 387–397.

Serra, M., Madau, P., Chessa, M. F., Caddeo, M., Sanna, E., Trapani, G., Franco, M., Liso, G., Purdy, R. H., Barbaccia, M. L., Biggio, G. (1999) 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflit action in rats. *Br. J. Pharmacol.*, *127*, 177-187.

Soreni, N., Apter, A., Weizman, A., Don-Tufeled, O., Leschiner, S., Karp, L., Gavish, M. (1999) Decreased platelet peripheral-type benzodiazepine receptors in adolescent inpatients with repeated suicide attempts. *Biol. Psychiatry*, *46*, 484-488.

Suto, F., Wood, A. T., Kobayashi, M., Komaba, J., Duffy, K., and Bruce, M. (2015) Safety, tolerability, and pharmacokinetic profile of the novel Translocator protein 18 kDa antagonist ONO-2952 in healthy volunteers. *Clin. Ther.*, *37* (9), 2071–84.

Taliani, S., Da Settimo, F., Da Pozzo, E., Chelli, B., and Martini, C. (2009) Translocator protein ligands as promising therapeutic tools for anxiety disorders. *Curr. Med. Chem.*, *16* (26), 3359–80.

Vauquelin, G., Charlton, S. J. (2010) Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *Br. J. Pharmacol.*, *161*(3), 488-508.

Veenman, L., Gavish, M. (2006) The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implication for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, *110*, 503-24.

Veenman, L. & Gavish, M. (2012) The role of 18 kDa mitochondrial translocator protein (TSPO) in programmed cell death, and effects of steroids on TSPO expression. *Curr. Mol. Med.*, 12, 398–412.

Verleye, M., Akwa, Y., Liere, P., Ladurelle, N., Pianos, A., Eychenne, B., Schumacher, M., Gillardin, J. M. (2005) The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 82, 712-720.

Wolf, L., Bauer, A., Melchner, D., Hallof-Buestrich, H., Stoertebecker, P., Haen, E., Kreutz, M., Sarubin, N., Milenkovic, V. M., Wetzel, C. H., Rupprecht, R., and Nothdurfter, C. (2015) Enhancing neurosteroid synthesis—relationship to the pharmacology of translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligands and benzodiazepines. *Pharmacopsychiatry*, 48, 72–77.

Yoshimura, R. F., Tran, M. B., Hogenkamp, D. J., Johnstone, T.B., Xie, J. Y., Porreca, F., Gee, K. W. (2014) *J. Psychopharmacol.*, 28 (5), 472-8.

Zhang, R., Monsma, F. (2009). The importance of drug–target residence time. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 12, 488-496

Zhang, L. M., Zhao, N., Guo, W. Z., Jin, Z. L., Qiu, Z. K., Chen, H. X., Xue, R., Zhang, Y. Z., Yang, R. F., and Li, Y. F. (2014) Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa). *Neuropharmacology* 81, 116–125.

Zhang, L. M., Zhao, N., Guo, W. Z., Jin, Z. L., Qiu, Z. K., Chen, H. X., Xue, R., Zhang, Y. Z., Yang, R. F., Li, Y. F. (2014) Anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for

the translocator protein (18 kDa) in animal models of post-traumatic stress disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1659–69.