

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
FARMACIA**

ATTIVATORI DEL PROTEASOMA COME AGENTI NEUROPROTETTIVI

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Davide Ognibeni, Mat. 480727

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE

1. IL PROTEASOMA UMANO

- 1.1 Generalità
- 1.2 L'ubiquitina
- 1.3 Il proteasoma 20S CP (o core particle)
- 1.4 Il proteasoma 26S
- 1.5 Proteolisi ubiquitina- e ATP-dipendente del proteasoma 26S
- 1.6 Proteolisi ubiquitina- e ATP-indipendente del proteasoma 20S
- 1.7 Localizzazione subcellulare e dinamica del proteasoma 20S

2. ATTIVITÀ DEL PROTEASOMA E PATOLOGIE CORRELATE

- 2.1 Età e senescenza cellulare
- 2.2 Morbo di Parkinson
- 2.3 Malattia di Alzheimer
- 2.4 Malattia di Huntington (o Corea di H.)
- 2.5 Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)
- 2.6 Elementi comuni e differenze tra le proteinopatie neurodegenerative

3. ATTIVATORI A PICCOLA MOLECOLA DEL PROTEASOMA 20S

- 3.1 Agonisti peptidici
 - 3.1.1 19S RP e PA200
 - 3.1.2 PA26 e PA28
 - 3.1.3 PAP1
- 3.2 SDS
- 3.3 Attivatori naturali
- 3.4 AM-404 e MK-886
- 3.5 Imidazoline
- 3.6 Fenotiazine: clorpromazina e composti correlati
- 3.7 Derivati 3,4-diidrochinazolinici
- 3.8 Fluspirilene e acilfluspirilene
- 3.9 Derivati pirazolonici

- 3.10 Considerazioni comparative sugli attivatori del proteasoma 20S
- 3.11 Nuove strategie di attivazione del proteasoma (2022-2026)
 - 3.11.1 Peptidomimetici Hb-Y-X e derivati da Bln10
 - 3.11.2 Antagonisti NMDAR come modulatori indiretti del 20S
 - 3.11.3 Prospettive di sviluppo e relazione struttura-attività
- 4. ATTIVATORI A PICCOLA MOLECOLA DEL PROTEASOMA 26S: REGOLAZIONE POST-TRADUZIONALE
 - 4.1 Inibitori delle deubiquitinasi
 - 4.2 Modulatori delle chinasi (PKA cAMP-dipendente e PKG cGMP-dip.)
 - 4.3 Manipolazione genetica
 - 4.3.1 Attivazione dell’Nrf2
 - 4.3.2 Sovraespressione di subunità proteasomiche
 - 4.3.3 Cap-Upregulation e generazione di “open-gate mutants”
 - 4.3.4 Inibizione delle p38 MAPK
 - 4.3.5 Modulazione del proteasoma mediata da p38 MAPK: meccanismi d’azione differenti
 - 4.4 Modulazione indiretta dell’UPS attraverso la SUMOilazione
 - 4.5 Attivazione del proteasoma e tumorigenesi: il ruolo della via KEAP1/NRF2
 - 4.6 Considerazioni comparative sulle strategie di attivazione indiretta del proteasoma 26S
 - 4.7 Altre molecole che potenziano l’attività del proteasoma
- 5. SFIDE E CONSIDERAZIONI SULLO SVILUPPO DI NUOVI MODULATORI
 - 5.1 Crosstalk tra proteasoma e autofagia
 - 5.2 Drug repurposing
 - 5.3 Assenza di saggi standard per la valutazione dell’efficacia
 - 5.4 Potenziale tossicità degli attivatori del proteasoma
 - 5.5 Considerazioni conclusive sulle prospettive terapeutiche
 - 5.5.1 Aspetti farmacocinetici e prospettive di sviluppo clinico
 - 5.6 Tabella sinottica comparativa dei modulatori descritti

6. CONCLUSIONI

RINGRAZIAMENTI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

L'omeostasi proteica, o proteostasi, rappresenta un processo essenziale per il mantenimento della funzionalità e della sopravvivenza cellulare. Essa dipende da un delicato equilibrio tra sintesi, ripiegamento e degradazione delle proteine, orchestrato da una rete altamente integrata che comprende ribosomi, chaperoni molecolari e sistemi proteolitici quali il proteasoma e il sistema lisosomiale-autofagico. (Hetz et al., 2011; Njomen et al., 2019)

In condizioni fisiologiche, tale rete garantisce il continuo rinnovamento del proteoma cellulare, prevenendo l'accumulo di proteine danneggiate, mal ripiegate o non più funzionali. I chaperoni molecolari facilitano il corretto folding delle proteine neosintetizzate e il recupero di conformazioni aberranti, mentre i sistemi degradativi assicurano l'eliminazione di substrati potenzialmente tossici, contribuendo così alla prevenzione della proteotossicità.

Tra i principali sistemi di degradazione, il proteasoma svolge un ruolo centrale nella regolazione della qualità proteica intracellulare. Il complesso 26S è deputato alla degradazione delle proteine ubiquitinate, mentre il proteasoma 20S è particolarmente efficiente nella rimozione delle proteine ossidativamente danneggiate, rappresentando una prima linea di difesa contro lo stress ossidativo. In condizioni di aumento delle specie reattive dell'ossigeno, fenomeno associato sia al normale metabolismo cellulare sia all'invecchiamento, si osserva infatti una rimodulazione dell'equilibrio tra le diverse forme del proteasoma. (Njomen et al., 2019)

In un quadro biologico più ampio, la progressiva compromissione della proteostasi è oggi riconosciuta come uno dei principali *hallmark*¹ dell'invecchiamento. Tale alterazione non si manifesta in modo isolato, ma si inserisce in una rete complessa di processi interconnessi che comprende instabilità genomica, alterazioni epigenetiche, disfunzione mitocondriale, senescenza cellulare e modificazioni della comunicazione intercellulare.

¹*Hallmark*: dall'inglese "segno distintivo" o "caratteristica distintiva".

In questo contesto, il proteasoma rappresenta un nodo funzionale centrale, poiché contribuisce non solo alla rimozione delle proteine danneggiate o mal ripiegate, ma anche al mantenimento dell'omeostasi cellulare durante l'invecchiamento e nelle condizioni patologiche ad esso associate. (López-Otín et al., 2013; Saez et al., 2014)

La perdita di efficienza dei sistemi deputati al controllo della qualità proteica determina infatti uno squilibrio tra sintesi, ripiegamento e degradazione delle proteine, favorendo l'accumulo di specie aberranti e l'insorgenza di stress proteotossico. Tale fenomeno assume particolare rilevanza nei tessuti post-mitotici, come il sistema nervoso centrale, nei quali la limitata capacità di rinnovo cellulare rende più critiche le alterazioni dei meccanismi di clearance proteica. In questo scenario, la funzionalità del proteasoma assume un significato non soltanto omeostatico, ma anche patogenetico e terapeutico. (Njomen et al., 2019; López-Otín et al., 2013)

Con l'avanzare dell'età, la progressiva compromissione dei sistemi di proteostasi determina l'accumulo di proteine danneggiate e aggregate, con conseguente alterazione delle vie di segnalazione cellulare e comparsa di stress proteotossico. Questo fenomeno è strettamente associato alla patogenesi di numerose malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la corea di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), nonché di diverse patologie oncologiche. (McNaught et al., 2001; Saez et al., 2014)

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che la riduzione dell'attività proteasomica e l'accumulo di proteine ubiquitinate rappresentano caratteristiche ricorrenti in tessuti patologici, suggerendo un ruolo diretto del fallimento della proteostasi nella progressione della malattia. In questo contesto, la modulazione dei sistemi proteolitici emerge come una promettente strategia terapeutica. L'aumento dell'attività del proteasoma, ottenuto mediante approcci genetici, modificazioni post-traduzionali o l'impiego di piccole molecole attivatrici, rappresenta infatti una potenziale strategia per contrastare l'accumulo patologico di proteine.

La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la proteostasi e l'attività del proteasoma risulta quindi fondamentale non solo per chiarire i processi alla base dell'invecchiamento cellulare, ma anche per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche rivolte alle malattie neurodegenerative e ad altre patologie caratterizzate da alterazioni dell'omeostasi proteica. (Bedford et al., 2008; Njomen et al., 2019)

1. IL PROTEASOMA UMANO

1.1 Generalità

Il proteasoma umano è un complesso proteico ad attività multienzimatica responsabile della degradazione selettiva di proteine danneggiate, mal ripiegate o non più necessarie, svolgendo un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi proteica cellulare. Esso rappresenta uno dei principali sistemi deputati al controllo della qualità del proteoma e alla regolazione dei processi intracellulari.

Nel presente elaborato verranno successivamente analizzate in dettaglio le principali caratteristiche strutturali e funzionali dei complessi proteasomici e il loro ruolo nella regolazione della proteostasi. In particolare, verrà discusso come l'attività proteolitica del proteasoma sia strettamente correlata ai processi di invecchiamento e all'insorgenza di diverse patologie neurodegenerative.

Infine, saranno prese in esame le principali classi di composti in grado di modulare l'attività del proteasoma, direttamente o indirettamente, potenziando la degradazione proteica mediata da questo sistema. (George et al., 2021)

1.2 L'ubiquitina

L'ubiquitina è una piccola proteina (circa 8600 Da) costituita da 76 amminoacidi e caratterizzata dalla presenza di sette residui di lisina (K) nelle posizioni 6, 11, 27, 29, 33, 48 e 63, attraverso i quali può essere legata alle proteine bersaglio. (Njomen et al., 2019; Vijay-Kumar et al., 1987)

Il processo di mono- e poli-ubiquitinazione delle proteine target richiede l'intervento di tre enzimi che agiranno in sequenza: l'enzima attivante l'ubiquitina (E1), il quale attiva il residuo di glicina C-terminale dell'ubiquitina tramite una reazione ATP-dipendente, il legame dell'ubiquitina a un residuo di cisteina dell'E1 porta alla formazione del complesso Ub-E1 tramite un legame tioesterico. Successivamente, l'enzima coniugante l'ubiquitina (E2) trasferisce l'ubiquitina dal complesso Ub-E1 a se stessa tramite una trans-tioesterificazione, formando il complesso Ub-E2 e liberando l'enzima E1 dal sistema.

Infine, l'ubiquitina ligasi (E3), assieme ad E2 è responsabile del trasferimento dell'ubiquitina ad una proteina target, la quale verrà destinata alla degradazione.

Dopo la mono-ubiquitinazione della proteina target, la porzione C-terminale di ulteriori ubiquitine può legarsi ad uno qualsiasi degli altri residui di lisina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) dell'ubiquitina precedente, così da poter estendere la catena e rendere la proteina poli-ubiquitinata. (George et al., 2021; Peng et al., 2003)

La poliubiquitinazione delle proteine target attraverso il residuo di lisina K48 costituisce il principale segnale di degradazione tramite il proteasoma 26S, mentre la coniugazione dell'ubiquitina su altri residui di lisina, come K63, indirizza invece le proteine verso la degradazione mediata da autofagia. (Kraft et al., 2010; Njomen et al., 2019)

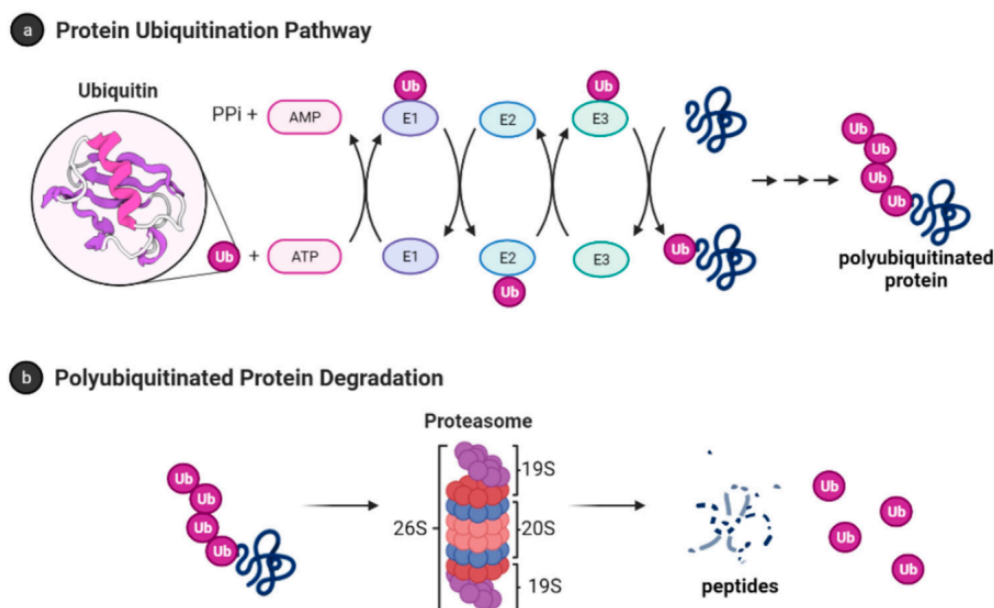


Figura 1 Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). (a) Processo di poliubiquitinazione proteica che coinvolge l'enzima attivante l'ubiquitina E1, gli enzimi coniuganti E2 e la ligasi E3; (b) In seguito alla deubiquitinazione, le proteine poliubiquitinate vengono degradate dal proteasoma 26S in piccoli peptidi. (George et al., 2021)

In generale, l'essere umano possiede due enzimi E1, circa 40 enzimi E2 e da 500 fino a 1000 enzimi E3. (Stewart et al., 2016)

1.3 Il proteasoma 20S CP (o core particle)

Il proteasoma 20S è una *treonin-proteasi*² a struttura cilindrica di circa 700 kDa, formata da quattro anelli eptamerici impilati secondo l'ordine $\alpha 1-7 / \beta 1-7 / \beta 1-7 / \alpha 1-7$.

Gli anelli α esterni costituiscono una sorta di *gate* e interagiscono con particelle regolatorie che ne controllano l'apertura e la chiusura, ad esempio 19S RP, PA28 e PA200. Gli anelli β interni contengono sei siti proteolitici, tre per ciascun anello β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) ed hanno preferenze di substrato diverse: la subunità $\beta 1$ presenta un'attività *caspase-like* (*Casp-L*) e scinde preferenzialmente dopo residui acidi, le subunità $\beta 2$ e $\beta 5$ mostrano invece attività rispettivamente di tipo *trypsin-like* (*Tryp-L*) e *chymotrypsin-like* (*CT-L*) e scindono per lo più dopo residui basici e idrofobici. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

Il proteasoma 20S, quando non associato a complessi regolatori, è in grado di degradare proteine intrinsecamente disordinate (IDPs) attraverso una via indipendente dall'ubiquitina. (Baugh et al., 2009; Erales et al., 2014)

1.4 Il proteasoma 26S

Il proteasoma 26S è costituito da un complesso 20S CP a cui sono legate una o due subunità regolatorie 19S (RP), ad una o entrambe le estremità del core, ed ha un peso molecolare di circa 2,5 MDa.

La particella regolatoria 19S RP (nota anche come PA700) si lega alla subunità eptamerica 20S e ne favorisce l'apertura del *gate*, consentendo la degradazione proteolitica delle proteine poliubiquitinate. È inoltre responsabile del riconoscimento, dell'*unfolding* e della traslocazione dei substrati all'interno del core 20S.

Essa è composta da due sottocomplessi: la *base*, che interagisce direttamente con il core 20S, e un *lid* periferico. La *base* è formata da subunità AAA-ATPasi

²*Treonin-proteasi*: classe di enzimi che sfruttano un residuo N-terminale di treonina, dotato di un gruppo -OH nucleofilo, per svolgere la propria attività proteolitica;

esameriche (Rpt1–Rpt6) e da subunità non ATPasiche (Rpn1, Rpn2, Rpn10 e Rpn13), l'attività ATPasica è fondamentale per l'*unfolding* delle proteine, l'apertura del *gate* del 20S e la traslocazione dei substrati nel *core* catalitico.

Il *lid* è costituito da nove subunità non ATPasiche (Rpn3, Rpn5–Rpn9, Rpn11, Rpn12 e Sem1) e svolge un ruolo chiave nella regolazione del processo proteolitico. In particolare, la subunità Rpn11 agisce come deubiquitinasi, rimuovendo le catene di ubiquitina dai substrati una volta avviato il processo di degradazione proteasomiale. (Verma et al., 2002; Njomen et al., 2019)

Le subunità Rpn10 e Rpn13, insieme ad altre proteine associate in modo reversibile come Rad23 e Dsk2, funzionano da recettori dell'ubiquitina, indirizzando le proteine poliubiquitinate verso il proteasoma. (Husnjak et al., 2008; Elsasser et al., 2004)

Le subunità Rpn contribuiscono inoltre a creare siti di ancoraggio per ulteriori proteine, tra cui specifiche deubiquitinasi come USP14 (*ubiquitin specific peptidase 14*) e UCH37 (*ubiquitin C-terminal hydrolase 37*), che modulano ulteriormente il processo di degradazione. (Lee et al., 2011; Njomen et al., 2019)

1.5 Proteolisi ubiquitina e ATP-dipendente del proteasoma 26S

Il proteasoma 26S degrada principalmente proteine strutturate, sebbene una quota di proteine mal ripiegate e intrinsecamente disordinate (IDPs) possa essere degradata anche in modo indipendente dall'ubiquitina.

Le proteine destinate alla degradazione vengono marcate con catene di poliubiquitina, che fungono da segnale di degradazione. Le proteine poliubiquitinate sono riconosciute dai recettori dell'ubiquitina Rpn10 e Rpn13, l'ubiquitina viene poi rimossa ad opera delle deubiquitinasi Rpn11, USP14 e UCH37 ed infine, l'attività ATPasica della base del complesso 19S consente l'*unfolding* del substrato e la sua traslocazione nel *core* catalitico del proteasoma per la degradazione. (Etlinger et al., 1977; Njomen et al., 2019)

1.6 Proteolisi ubiquitina e ATP-indipendente del proteasoma 20S

A differenza del proteasoma 26S, che degrada principalmente proteine poliubiquitinate, il proteasoma 20S è in grado di degradare proteine mal ripiegate, danneggiate da stress ossidativo o intrinsecamente disordinate (IDPs), senza necessitare dell'unfolding mediato dalla base 19S né della poliubiquitinazione dei substrati. (Baugh et al., 2009; Erales et al., 2014)

Il proteasoma 20S si trova prevalentemente in conformazione “latente” in quanto l'accesso al sito catalitico è bloccato dalle estremità N-terminali delle subunità α . La degradazione avviene attraverso l'interazione diretta del substrato con specifiche subunità del complesso, ad esempio $\alpha 3$, che induce cambiamenti conformazionali e ne consente la proteolisi.

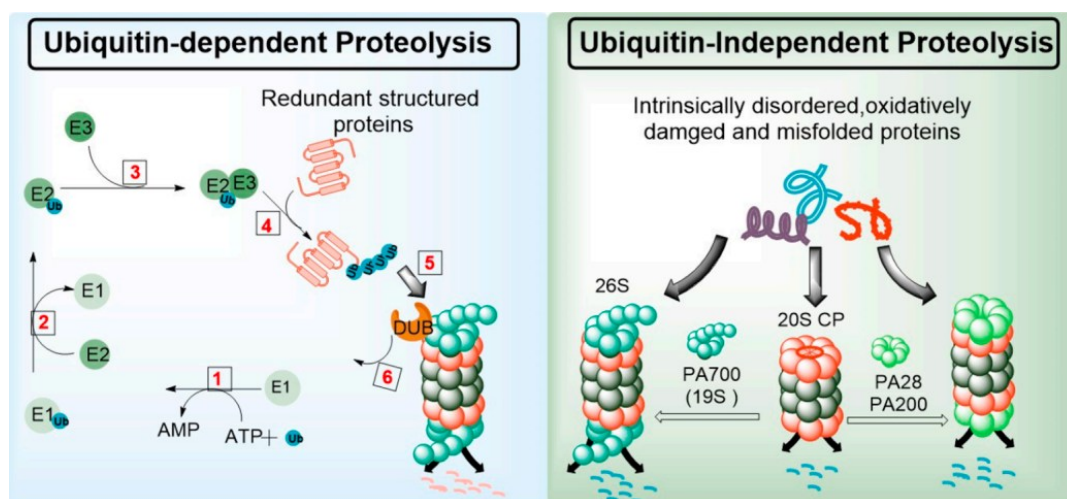


Figura 2. Sistema di degradazione proteasomiale. Le proteine correttamente strutturate e marcate con catene di poliubiquitina vengono degradate dal proteasoma 26S mediante un processo ATP dipendente (sinistra). Le proteine parzialmente denature, intrinsecamente disordinate o danneggiate da processi ossidativi vengono invece degradate direttamente dal proteasoma 26S, dal proteasoma 20S libero oppure dal proteasoma 20S associato a regolatori non ATPasici, quali PA28 e PA200, senza la necessità di poliubiquitinazione (destra). (Njomen et al., 2019)

Alcuni complessi regolatori non ATPasici, come il complesso 11S (PA28) e Blm10 (PA200), possono associarsi in maniera reversibile al core 20S legandosi agli anelli α e favorendo l'apertura del *gate*, questa conformazione aperta facilita il processo di degradazione indipendente da ubiquitina e ATP. (Stadtmueller et al., 2011)

Di conseguenza, piccole molecole in grado di stabilizzare lo stato *open-gated* del 20S possono mimare l'effetto di questi complessi regolatori e potenziare la proteolisi indipendente da ubiquitina e ATP. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

1.7 Localizzazione subcellulare e dinamica del proteasoma 20S

Il proteasoma 20S è distribuito in modo ubiquitario all'interno della cellula, con una prevalenza nel citoplasma, ma presenta anche una localizzazione subcellulare specifica e regolata. Una frazione minore è associata al citoscheletro e alle frazioni microsomiali, mentre a livello nucleare si localizza nel nucleoplasma, risultando assente dai nucleoli. Inoltre, il proteasoma 20S è presente in diversi domini nucleari specializzati, tra cui strutture perinucleari associate al centrosoma, corpi nucleari legati alla matrice e speckles inter-cromatinici, evidenziando una distribuzione subcellulare non casuale ma organizzata.

La localizzazione del proteasoma è dinamica e modulabile in risposta a specifici stimoli cellulari. In condizioni di stress, quali deprivazione di glucosio o ipossia nei tumori solidi, è stato osservato un incremento della sua presenza nucleare. Analogamente, in seguito a radiazioni ionizzanti, il proteasoma può accumularsi sulla cromatina in associazione con PA200, mentre durante la depolarizzazione mitocondriale viene reclutato verso i mitocondri in cellule fibroblastiche. Tali evidenze suggeriscono l'esistenza di meccanismi regolatori in grado di ridistribuire il proteasoma tra diversi compartimenti intracellulari in funzione delle esigenze cellulari, sebbene la distinzione funzionale tra complessi 20S e 26S non sia sempre completamente definita.

Oltre alla localizzazione intracellulare, il proteasoma 20S è stato identificato anche in compartimenti extracellulari, tra cui siero, liquido cerebrospinale e liquido di lavaggio broncoalveolare. I livelli di proteasomi circolanti risultano aumentati in diverse condizioni patologiche caratterizzate da stress cellulare, danno tissutale o neoplasie. Sebbene tali proteasomi siano prevalentemente costituiti da particelle

20S, non è ancora chiarito se possano agire in associazione con complessi regolatori.

La funzione dei proteasomi extracellulari non è ancora completamente definita; tuttavia, essi potrebbero essere coinvolti nella degradazione di proteine extracellulari, nei processi di presentazione antigenica o in ulteriori funzioni non ancora caratterizzate. Nel complesso, il proteasoma 20S si configura come un complesso ampiamente distribuito e dinamicamente regolato, la cui localizzazione rappresenta un elemento chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nella risposta allo stress. (Ben-Nissan et al., 2014)

2. ATTIVITÀ DEL PROTEASOMA E PATOLOGIE CORRELATE

Le principali malattie neurodegenerative condividono un elemento patogenetico comune rappresentato dall'accumulo di proteine mal ripiegate, ossidate o aggregate, che riflette un progressivo collasso dei meccanismi deputati al mantenimento della proteostasi. In questo senso, patologie quali morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington e sclerosi laterale amiotrofica possono essere considerate, almeno in parte, come proteinopatie dell'invecchiamento. La disfunzione del proteasoma si colloca quindi in una posizione centrale nel collegamento tra aging cellulare e neurodegenerazione. (López-Otín et al., 2013; Saez et al., 2014)

Con l'invecchiamento si verifica una progressiva riduzione dell'attività del proteasoma, causata da una minore espressione delle sue subunità, da danni ossidativi e dalla disassemblazione del complesso 26S. Questa perdita di efficienza compromette la degradazione delle proteine danneggiate o non necessarie, favorendone l'accumulo e l'aggregazione.

Tra le proteine maggiormente coinvolte vi sono le proteine intrinsecamente disordinate (IDP), come l'amiloide- β e l' α -sinucleina, il cui accumulo è strettamente correlato allo sviluppo di numerose malattie neurodegenerative. Le loro forme oligomeriche solubili sono considerate particolarmente tossiche, poiché

non solo contribuiscono al danno neuronale, ma interferiscono ulteriormente con la funzione del proteasoma, alimentando un circolo vizioso che accelera la progressione della malattia. (Jones et al., 2017; George et al., 2021)

Quando la produzione delle IDP supera la capacità di degradazione cellulare, queste si accumulano, si aggregano e innescano processi citotossici che contribuiscono alla neurodegenerazione. Nell'ambito di tali processi, il proteasoma 20S svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della proteostasi, degradando direttamente proteine ossidate e altamente disordinate senza necessità di ubiquitinazione. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

Recenti studi hanno evidenziato come il potenziamento dell'attività proteolitica del proteasoma possa limitare l'accumulo di queste proteine, ridurre il danno cerebrale e migliorare le funzioni cognitive nei modelli sperimentali. (Leestemaker et al., 2017)

2.1 Età e senescenza cellulare

Durante l'invecchiamento, le proteine diventano progressivamente più suscettibili a modificazioni ossidative e post-traduzionali, tra cui ossidazione, glicazione, glicossidazione e adduzione con prodotti della perossidazione lipidica. Tali alterazioni compromettono la funzionalità e la stabilità conformazionale delle proteine, favorendone l'accumulo intracellulare in forma danneggiata. (George et al., 2021)

È stato dimostrato che l'attività proteolitica del proteasoma si riduce con l'avanzare dell'età, compromettendo la capacità della cellula di eliminare efficacemente le proteine ossidate. Il declino dell'attività proteasomiale osservato durante l'invecchiamento è stato descritto in numerosi tessuti e modelli sperimentali ed è considerato uno dei principali meccanismi responsabili della progressiva perdita della proteostasi cellulare. La ridotta efficienza del sistema ubiquitina-proteasoma determina infatti una minore rimozione delle proteine ossidate, mal ripiegate o danneggiate, favorendone l'accumulo intracellulare. Tali proteine, oltre a

compromettere la funzionalità cellulare, possono interferire con il corretto funzionamento del proteasoma, instaurando un circolo vizioso che amplifica il danno proteotossico associato all'età. (Saez et al., 2014; George et al., 2021)

A ciò si associa una ridotta capacità della cellula di rispondere efficacemente allo stress proteotossico, dovuta sia al progressivo deterioramento dei sistemi di ripiegamento mediati dai chaperoni, sia alla diminuita integrazione funzionale tra proteasoma e autofagia. Ne deriva una condizione in cui il danno proteico non viene più contenuto in maniera efficiente, ma tende a propagarsi, contribuendo alla disfunzione cellulare tipica dell'invecchiamento. (Saez et al., 2014; López-Otín et al., 2013)

La progressiva perdita di funzionalità del proteasoma, associata all'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), favorisce ulteriormente l'accumulo di proteine alterate e predisposte all'aggregazione. Gli aggregati proteici risultanti possono a loro volta interagire con il proteasoma, inibendone l'attività e contribuendo ad aumentare il carico di proteine danneggiate dall'ossidazione, con conseguente aggravamento dell'omeostasi proteica cellulare. (George et al., 2021)

2.2 Morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson (PD) è la seconda malattia neurodegenerativa più prevalente e colpisce circa 10 milioni di individui a livello globale. L'incidenza di questa malattia aumenta con l'età, tuttavia si stima che circa il 4% dei pazienti riceva una diagnosi prima dei 50 anni. (Parkinson's Disease Foundation)

Dal punto di vista patologico, è caratterizzato dalla progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici nella *pars compacta* della *substantia nigra* (SNc), associata all'accumulo di inclusioni intracellulari note come corpi di Lewy. Questi rappresentano un marker istopatologico distintivo della malattia e sono costituiti principalmente da α -sinucleina, ubiquitina, parkina, componenti del proteasoma e altre proteine alterate del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Quindi, queste

alterazioni di proteine UPS-correlate, tra cui parkina e UCH-L1, sono coinvolte nella patogenesi del PD.

L'espressione di α -sinucleina mutata compromette l'attività proteolitica del proteasoma, favorendo l'accumulo di proteine ubiquitinate non degradate, la formazione di inclusioni intracellulari e la morte neuronale.

Nel complesso, la disfunzione del sistema proteasomiale è implicata sia nelle forme familiari sia in quelle sporadiche della malattia. (George et al., 2021; McNaught et al., 2001)

Diversi modelli sperimentali hanno indagato il ruolo del proteasoma nella patogenesi di questa malattia, alcuni modelli animali trattati con inibitori del proteasoma hanno evidenziato deficit motori simil-parkinsoniani e la presenza di inclusioni contenenti α -sinucleina e ubiquitina, sebbene tali risultati presentino una limitata riproducibilità, riducendone l'affidabilità come modello sperimentale. (George et al., 2021; Matsuda et al., 2010)

In alternativa, sono stati sviluppati modelli murini con delezione di subunità del proteasoma, in generale la perdita globale di componenti del proteasoma è incompatibile con lo sviluppo embrionale, mentre la delezione neuronale della subunità ATPasica Psmc1/Rpt2 nei neuroni dopaminergici determina formazione di inclusioni positive per α -sinucleina e ubiquitina, seguita da neurodegenerazione e manifestazioni tipiche di questa malattia.

Tali evidenze supportano il coinvolgimento diretto della disfunzione del proteasoma neuronale nei processi che portano alla formazione di inclusioni simil-corpi di Lewy. (Bedford et al., 2008; George et al., 2021)

2.3 Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) rappresenta la principale causa di demenza ed è stata classificata come la sesta causa di morte negli Stati Uniti nel 2019. (Fast Stats-Leading Causes of Death)

È caratterizzata da un progressivo deterioramento delle funzioni cognitive, tra cui memoria, pensiero e capacità di ragionamento, che compromette progressivamente l'autonomia dell'individuo nello svolgimento delle normali attività della vita quotidiana³.

Dal punto di vista neuropatologico, questa patologia è strettamente associata al misfolding e all'aggregazione proteica, con formazione ed accumulo di placche extracellulari di β -amiloide e ammassi neurofibrillari intracellulari costituiti principalmente da proteina tau iperfosforilata. (Tiwari et al., 2019; George et al., 2021)

Numerose evidenze sperimentali e cliniche indicano che i principali responsabili della disfunzione sinaptica, del declino cognitivo e della perdita neuronale siano gli oligomeri solubili tossici di β -amiloide piuttosto che le placche amiloidi insolubili, difatti tali oligomeri sono in grado di compromettere l'attività proteolitica del proteasoma. (Ferreira et al., 2015; George et al., 2021)

Il sistema ubiquitina–proteasoma (UPS) svolge un ruolo chiave nella degradazione della β -amiloide ed è strettamente coinvolto nella patogenesi della malattia. (Hong et al., 2014)

Studi condotti su pazienti affetti da AD hanno evidenziato una riduzione dell'attività proteasomiale in specifiche regioni cerebrali, tra cui l'ippocampo, il giro paraippocampale, il giro temporale medio e il lobulo parietale inferiore, aree coinvolte nei processi di memoria episodica e semantica, apprendimento, orientamento spaziale e funzioni cognitive superiori. È stato anche osservato che l'ubiquilina, una proteina contenente domini ubiquitin-like (UBL), si localizza in corrispondenza dei corpi di Lewy e dei grovigli neurofibrillari, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nei meccanismi patogenetici della malattia. (Riederer et al., 2011)

³ *Alzheimer's Association. 2026 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimers Dement* 2026;22. <https://doi.org/10.1002/alz.71345>.

Inoltre, l'inibizione del proteasoma 26S determina l'accumulo di β -amiloide nei neuroni e negli astrociti, suggerendo che questa proteina rappresenti un substrato della degradazione proteasomiale. Tali osservazioni indicano che il potenziamento dell'attività del proteasoma potrebbe costituire una strategia promettente per contrastare i processi patologici associati alla malattia di Alzheimer. (Lopez Salon et al., 2003; George et al., 2021)

2.4 Malattia di Huntington (o Corea di H.)

La malattia di Huntington (HD) è una patologia neurodegenerativa autosomica dominante causata da mutazioni del gene che codifica per la proteina huntingtina (HTT), ed è caratterizzata da disturbi del movimento, alterazioni dell'umore e un progressivo declino delle funzioni cognitive, associati alla degradazione selettiva di specifiche aree del sistema nervoso centrale, in particolare dello striato e della corteccia.

La mutazione consiste nell'espansione instabile delle ripetizioni trinucleotidiche CAG nel gene "IT15" (*Interesting Transcript 15*), il quale è localizzato sul cromosoma 4 (*4p63*) e codifica per l'huntingtina. Ciò determina un'estensione anomala della sequenza poli-glutaminica nella regione N-terminale della proteina, tale alterazione ne favorisce il *misfolding* e la formazione di aggregati fibrillari con proprietà neurotossiche. (Vonsattel et al., 1998; George et al., 2021)

Nonostante la mutazione, la huntingtina mutata conserva parte delle funzioni fisiologiche della proteina nativa, la gravità della malattia e l'età di insorgenza sono strettamente correlate al numero di ripetizioni CAG presenti nel gene HTT: individui con 36–40 ripetizioni possono sviluppare o meno i sintomi della malattia, mentre espansioni superiori a 40 ripetizioni determinano inevitabilmente l'insorgenza della patologia; un numero di ripetizioni superiore a 50 è invece associato a forme giovanili a esordio precoce. (George et al., 2021)

Numerosi studi indicano che la huntingtina mutata possa interferire con il sistema ubiquitina–proteasoma (UPS), anche se i meccanismi alla base di tale interazione

non sono ancora completamente chiariti. Le inclusioni proteiche osservate nella malattia sono state associate a effetti neurotossici, sebbene il loro ruolo preciso nella progressione della neurodegenerazione resti oggetto di dibattito. È stato tuttavia osservato che il potenziamento della degradazione proteasomiale, così come la sovraespressione dell'attivatore PA28 γ , può migliorare la sopravvivenza cellulare in modelli sperimentali, suggerendo un possibile coinvolgimento del proteasoma nei meccanismi patogenetici della malattia. (Seo et al., 2007; George et al., 2021)

2.5 Sclerosi laterale amiotrofica (SLA)

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa progressiva che colpisce i motoneuroni del cervello e del midollo spinale, causando debolezza muscolare, atrofia, spasticità e paralisi. La malattia presenta generalmente una prognosi sfavorevole, con un'aspettativa di vita di 3–5 anni dalla diagnosi. La maggior parte dei casi è sporadica (sSLA), mentre circa il 10% presenta una componente ereditaria (fSLA) associata a mutazioni genetiche; tuttavia, le due forme risultano clinicamente indistinguibili. (George et al., 2021)

Tra le mutazioni associate alla SLA, una delle prime identificate interessa il gene della superossido dismutasi 1 (SOD1), mentre espansioni della sequenza GGGGCC nel gene *C9orf72* rappresentano la causa genetica più frequente delle forme familiari. Tali espansioni determinano la produzione di proteine anomale che tendono ad aggregare e possono interferire con la funzione del sistema ubiquitina–proteasoma (UPS). In particolare, è stato osservato che gli aggregati della proteina poly-GA reclutano numerosi complessi proteasomali 26S, compromettendo potenzialmente la proteostasi neuronale e i processi di degradazione proteica. (Guo et al., 2018)

Sia le forme sporadiche sia quelle familiari della SLA sono considerate proteinopatie, in quanto caratterizzate dall'accumulo di proteine mal ripiegate e aggregate all'interno dei neuroni danneggiati. Un tratto distintivo della malattia è

rappresentato dalla presenza di inclusioni intracellulari ricche di proteine ubiquitinate nei motoneuroni, osservate sia nei pazienti sia nei modelli sperimentali. L'accumulo di tali inclusioni e le evidenze ottenute da studi cellulari e animali supportano un ruolo rilevante del sistema ubiquitina–proteasoma nei processi che conducono alla formazione degli aggregati proteici e alla neurodegenerazione caratteristici della SLA. (George et al., 2021; Strong et al., 2005)

2.6 Elementi comuni e differenze tra le proteinopatie neurodegenerative

Le principali malattie neurodegenerative condividono un nucleo patogenetico comune rappresentato dalla perdita della proteostasi e dal conseguente accumulo di proteine misfolded o aggregate. Tale disfunzione si associa a un progressivo deterioramento dei sistemi di controllo qualità intracellulari, tra cui il sistema ubiquitina-proteasoma, contribuendo all'amplificazione dello stress proteotossico e alla disfunzione neuronale.

Malattia di Alzheimer, morbo di Parkinson, malattia di Huntington e sclerosi laterale amiotrofica (SLA) possono essere interpretate come differenti manifestazioni di una vulnerabilità comune legata all'invecchiamento e al declino dei sistemi proteostatici. (López-Otín et al., 2013; George et al., 2021)

Nonostante questa convergenza patogenetica, ciascuna condizione presenta caratteristiche molecolari specifiche. Nell'Alzheimer predominano l'accumulo di β -amiloide e tau iperfosforilata, con conseguente alterazione della funzione sinaptica. Nel Parkinson, la disfunzione proteostatica si associa all'accumulo di α -sinucleina e alla degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici della substantia nigra. La malattia di Huntington è causata da un'espansione CAG nel gene HTT che produce una proteina con proprietà tossiche intrinseche. Nella SLA, infine, l'aggregazione proteica nei motoneuroni riflette meccanismi eterogenei che coinvolgono sia forme sporadiche che genetiche. (Strong et al., 2005; George et al., 2021)

In questo scenario, il sistema ubiquitina-proteasoma rappresenta un asse funzionale comune ma differenzialmente coinvolto nelle diverse patologie. Il proteasoma 20S appare particolarmente rilevante nella degradazione di proteine ossidate o intrinsecamente disordinate, mentre il proteasoma 26S è maggiormente coinvolto nella degradazione ubiquitina-dipendente di substrati strutturati. Tale distinzione suggerisce che l'impatto della disfunzione proteasomiale e le possibili strategie di modulazione possano variare tra le diverse proteinopatie, in funzione del tipo di proteine accumulate e del contesto cellulare. Nel loro insieme, queste evidenze indicano che le proteinopatie neurodegenerative condividono un meccanismo centrale comune, pur differenziandosi per specificità molecolare e cellulare. Il sistema proteasomiale rappresenta quindi un possibile bersaglio trasversale, la cui modulazione richiede tuttavia un approccio contestuale e altamente selettivo. (Njomen et al., 2019; George et al., 2021)

3. ATTIVATORI A PICCOLA MOLECOLA DEL PROTEASOMA 20S

3.1 Agonisti peptidici

3.1.1 19S RP e PA200

Il complesso regolatorio 19S (19S Regulatory Particle, RP) e l'attivatore PA200 (Blm10) promuovono l'apertura del gate del proteasoma 20S attraverso l'interazione dei loro residui C-terminali con specifiche tasche localizzate tra subunità α adiacenti. In particolare, le subunità ATPasiche del complesso 19S possiedono un motivo conservato idrofobico–tirosina–qualsiasi amminoacido (*Hb–Y–X*), il cui inserimento nelle tasche intersubunità induce modificazioni conformazionali che favoriscono la rotazione degli anelli α e la stabilizzazione della conformazione a *gate* aperto. Questo processo consente l'accesso dei substrati al compartimento proteolitico del core 20S e rappresenta uno dei principali meccanismi fisiologici di regolazione dell'attività proteasomiale.

Inoltre, sulla base di questo meccanismo sono stati sviluppati peptidi sintetici contenenti il motivo *Hb–Y–X*, alcuni dei quali, derivati dalle sequenze C-terminali

delle subunità Rpt2 e Rpt5, hanno mostrato la capacità di aumentare in vitro la degradazione di substrati peptidici e proteici da parte del proteasoma 20S. (Njomen et al., 2019)

3.1.2 PA26 e PA28

Un diverso meccanismo di apertura del gate è osservato negli attivatori proteasomiali PA26 e PA28. A differenza delle subunità ATPasiche del complesso 19S, questi attivatori non possiedono il motivo conservato *Hb-Y-X* e pertanto non inducono l'apertura del gate mediante la rotazione degli anelli α .

L'attivazione avviene invece attraverso una regione denominata *activation loop*, che interagisce con specifici residui localizzati nella porzione N-terminale delle subunità α . In particolare, tali interazioni determinano lo spostamento di un *reverse-turn loop* contenente il residuo Pro17, elemento strutturale essenziale per il mantenimento della conformazione chiusa del *gate*. La conseguente riorganizzazione conformazionale favorisce l'apertura del canale centrale e l'accesso dei substrati al compartimento catalitico del proteasoma.

La comprensione di questi differenti meccanismi di attivazione ha costituito la base per la progettazione di agonisti peptidici in grado di riprodurre le interazioni degli attivatori naturali e modulare selettivamente l'attività proteasomiale. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

3.1.3 PAPI (*proteasome-activating peptide 1*)

Peptide sintetico, descritto come in grado di aumentare l'attività CT-L del proteasoma attraverso un meccanismo di apertura del gate nell'anello α del 20S CP. In un modello cellulare di sclerosi laterale amiotrofica (SLA) ha impedito l'aggregazione della superossido dismutasi 1 (SOD1). (Dal Vechio et al., 2014; Njomen et al., 2019)

3.2 SDS (*Sodio dodecil solfato*)

Anche detto *SLS (sodiolauril solfato)*, è un potente tensioattivo anionico utilizzato come detergente, oppure come componente di prodotti farmaceutici o alimentari.

Nel 1988 è stato dimostrato che basse concentrazioni di SDS (0,04–0,08%) sono in grado di aumentare l'attività proteolitica del proteasoma 20S, mentre a concentrazioni superiori allo 0,08% si ha l'effetto opposto, l'attività del proteasoma 20S viene quindi inibita. (Tanaka et al., 1988; Tanaka et al., 1989)

Si ritiene che l'SDS induca l'apertura del *gate* del proteasoma mediante una denaturazione parziale del complesso 20S, facilitando così l'ingresso dei substrati nel core catalitico.

Tuttavia, il reale meccanismo di attivazione del proteasoma da parte dell'SDS non è ancora del tutto chiaro. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

3.3 Attivatori naturali

L'identificazione di agonisti del proteasoma con potenziale impiego terapeutico ha finora registrato progressi limitati, sebbene siano stati individuati alcuni composti di particolare interesse. Le molecole in grado di interagire con il proteasoma 20S, o con entrambe le forme 20S e 26S, possono aumentare l'attività proteasomiale attraverso differenti meccanismi allosterici.

Alcuni composti favoriscono l'ingresso dei substrati nel compartimento catalitico inducendo l'apertura del *gate* costituito dagli anelli α del proteasoma 20S (*Gate-openers*). Altri, invece, incrementano la degradazione proteica promuovendo il legame con il substrato e/o l'attività catalitica di uno o più siti attivi del proteasoma (*Stimulators*). (Njomen et al., 2019)

Tra i composti naturali in grado di modulare l'attività del proteasoma 20S figurano triterpeni, polifenoli, fosfolipidi e acidi grassi, che negli ultimi anni hanno suscitato

notevole interesse per il loro potenziale terapeutico nelle patologie caratterizzate dall'accumulo di proteine aberranti.

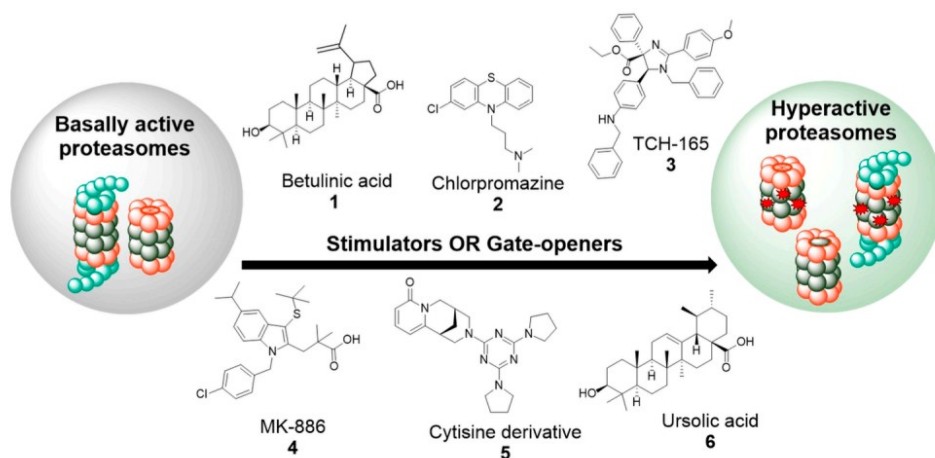


Figura 3. Agonisti del proteasoma a basso peso molecolare. Le piccole molecole in grado di interagire direttamente con il proteasoma aumentano l'attività dell'enzima promuovendo l'apertura del canale di accesso (gate-opening) oppure attraverso meccanismi allosterici che incrementano il riconoscimento, il legame e/o la degradazione dei substrati proteici. (Njomen et al., 2019)

Tra i primi attivatori descritti vi è l'*acido betulinico*, un triterpene naturale presente principalmente nella corteccia della betulla (*Betula pubescens*), noto per le sue proprietà antitumorali, antiossidanti e antinfiammatorie. Inizialmente identificato come inibitore selettivo del melanoma umano, è stato successivamente dimostrato che induce morte cellulare programmata nelle cellule di neuroblastoma e nei tumori neuroectodermici. Inoltre, rappresenta uno dei primi potenziatori del proteasoma 20S descritti in letteratura, essendo in grado di aumentare selettivamente l'attività *chymotrypsin-like* (CT-L) del proteasoma. (George et al., 2021; Huang et al., 2007)

Un altro triterpene naturale dotato di attività analoga è l'*acido ursolico*, che condivide con l'acido betulinico la capacità di incrementare l'attività CT-L del proteasoma 20S. Nonostante la notevole somiglianza strutturale tra i due composti, il meccanismo attraverso cui l'acido ursolico promuove l'attivazione del proteasoma sembra essere differente, evidenziando la complessità dei processi

coinvolti nella modulazione del complesso proteasomico da parte di molecole appartenenti alla stessa classe chimica. (George et al., 2021; Huang et al., 2007)

Un ulteriore composto naturale con attività attivatrice sul proteasoma è l'*oleuropeina*, un polifenolo presente nelle foglie e nei frutti dell'olivo. Studi biochimici hanno dimostrato che essa è in grado di attivare il proteasoma attraverso un meccanismo simile a quello osservato con il sodio dodecil solfato (SDS), favorendo l'apertura del gate del complesso proteasomico e l'accesso dei substrati al *core* catalitico. (Njomen et al., 2019)

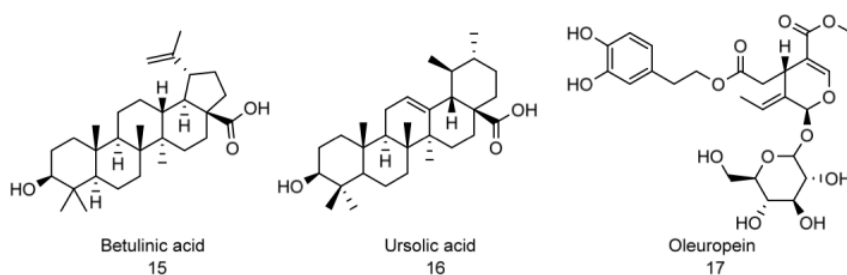


Figura 4. Attivatori del proteasoma 20S derivati da prodotti naturali. (George et al., 2021)

Tra i modulatori lipidici del proteasoma riveste particolare interesse la *cardiolipina*, un fosfolipide essenziale della membrana mitocondriale interna identificato nel corso di studi sull'effetto dei fosfolipidi sulle attività catalitiche del proteasoma. In cellule di fegato di ratto, la cardiolipina si è dimostrata un potente attivatore del complesso, inducendo un incremento fino a 60 volte dell'attività *chymotrypsin-like* (CT-L) e fino a 30 volte dell'attività *caspase-like* (C-L).

Analogamente all'SDS, essa determina un aumento della $V_{\max}$ ed una diminuzione della K_m ⁴ dell'enzima, pur mostrando una maggiore capacità di incrementare la velocità massima della reazione. È stato inoltre osservato che cardiolipina e SDS esercitano un effetto additivo sull'attivazione del proteasoma, suggerendo che i due

⁴ K_m : o costante di Michaelis-Menten, è definita come il rapporto tra le costanti di velocità di dissociazione e di formazione del complesso ES (enzima-substrato), rappresenta la concentrazione di substrato per la quale la velocità di catalisi è pari alla metà della $V_{\max}$. È una stima dell'affinità dell'enzima per il substrato, all'aumentare del valore della costante diminuirà l'affinità, e viceversa.

composti interagiscano con siti distinti del complesso senza competere per il legame. (Ruiz de Mena et al., 1993; George et al., 2021)

Infine, tra gli attivatori naturali del proteasoma 20S sono stati identificati anche alcuni acidi grassi insaturi, tra cui l'*acido oleico*, l'*acido linoleico* e l'*acido linolenico*, isolati dalle foglie di spinaci. Questi composti sono in grado di aumentare l'attività proteolitica del proteasoma, potenziando principalmente le attività CT-L e C-L a concentrazioni significativamente inferiori rispetto a quelle richieste per l'SDS, comprese tra un terzo e un sesto della concentrazione necessaria per ottenere un livello comparabile di attivazione. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

3.4 AM-404 e MK-886

Questi composti, definiti *true proteasome enhancers*, sono stati identificati nell'ambito di studi finalizzati a valutare l'attività proteolitica del proteasoma mediante l'impiego di substrati peptidici di dimensioni maggiori rispetto alle tradizionali sonde fluorogeniche. La selezione e la validazione di tali molecole sono state effettuate sulla base della loro capacità di promuovere il turnover dell' α -sinucleina, una proteina strettamente associata ai processi neurodegenerativi. Entrambi i composti determinano un incremento di circa 3–4 volte dell'attività del proteasoma 20S e favoriscono la degradazione dell' α -sinucleina in colture cellulari. (Trader et al., 2017; George et al., 2021)

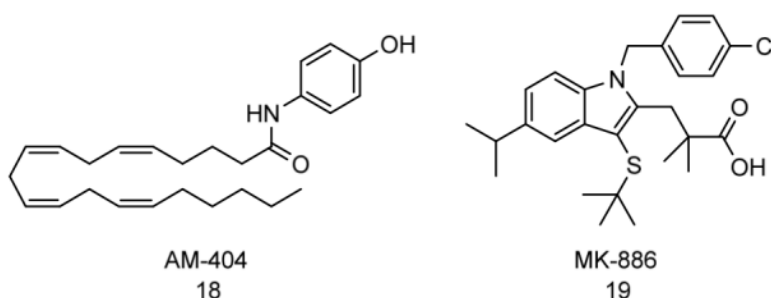


Figura 5. Struttura di AM-404 e MK-886. (George et al., 2021)

3.5 Imidazoline

Le *imidazoline* costituiscono una classe di composti eterociclici di notevole interesse farmacologico e biologico, ampiamente distribuiti sia in molecole naturali sia in derivati sintetici. Negli ultimi anni, tali composti hanno attirato crescente attenzione grazie alla loro capacità di interagire con numerosi bersagli cellulari coinvolti in processi fisiologici e patologici. Tra le attività biologiche attribuite alle imidazoline figurano la modulazione del proteasoma e della via di segnalazione mediata da *NF-κB*⁵, entrambe fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e la regolazione della risposta infiammatoria. Inoltre, le imidazoline presentano un ampio spettro di proprietà farmacologiche, che comprende attività antifungine, antitumorali, antielmintiche, antiiperglicemiche e antipertensive, rendendole promettenti candidati per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche. (George et al., 2021)

Tra i più promettenti attivatori del proteasoma 20S appartenenti alla classe delle imidazoline vi è *TCH-165*, identificato come un potente *enhancer* del proteasoma 20S, con un'attività osservabile già a basse concentrazioni (1,5 μM). Studi condotti in colture cellulari hanno dimostrato che TCH-165 promuove la degradazione mediata dal proteasoma 20S di diverse proteine intrinsecamente disordinate, tra cui α-sinucleina, tau, ornitina decarbossilasi e c-Fos.

Al contrario, il composto non influenza la degradazione di proteine correttamente ripiegate e strutturate, come la GAPDH, evidenziando una certa selettività d'azione. È stato proposto che TCH-165 agisca impedendo l'associazione della particella regolatoria 19S con il core 20S, probabilmente attraverso un legame diretto con l'anello α del proteasoma 20S. Tale interazione determinerebbe uno spostamento dell'equilibrio tra le forme 26S e 20S a favore di una maggiore presenza di

⁵*NF-κB*: fattore di trascrizione centrale nella regolazione della risposta infiammatoria e immunitaria, è coinvolto nell'attivazione di numerosi geni che controllano processi come infiammazione, sopravvivenza cellulare, proliferazione e stress ossidativo.

proteasoma 20S attivo, favorendo così la degradazione delle proteine intrinsecamente disordinate.

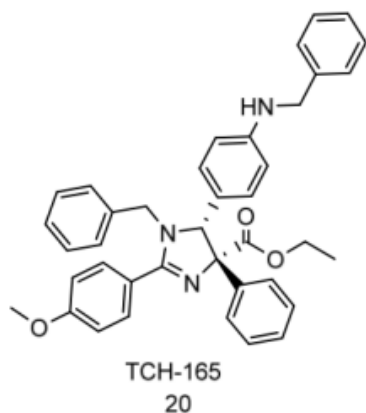


Figura 6. L'imidazolina TCH-165 potenzia l'attività del proteasoma e promuove la degradazione delle proteine intrinsecamente disordinate. (George et al., 2021)

I risultati di alcuni esperimenti supportano ulteriormente l'ipotesi che TCH-165 sia in grado di indurre la conformazione *open-gated* del complesso 20S. Un aspetto particolarmente rilevante è che TCH-165 rappresenta, ad oggi, l'unica piccola molecola per la quale siano disponibili evidenze biofisiche dirette a sostegno dell'apertura del gate del proteasoma 20S. In particolare, analisi effettuate mediante microscopia a forza atomica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) hanno fornito dati biofisici a supporto dell'ipotesi che TCH-165 favorisca la conformazione aperta del proteasoma 20S. (George et al., 2021; Njomen et al., 2018)

3.6 Fenotiazine: clorpromazina e composti correlati

La *clorpromazina* è un antipsicotico tipico appartenente alla classe delle fenotiazine, tra i primi neurolettici introdotti nella pratica clinica. Agisce principalmente come antagonista dei recettori dopaminergici D2, ma interagisce anche con i recettori serotoninergici e istaminergici, ed è utilizzata principalmente nel trattamento della schizofrenia e di altri disturbi psicotici. Oltre alle sue applicazioni terapeutiche, la clorpromazina e altre fenotiazine correlate sono state identificate come attivatori del proteasoma 20S, in grado di incrementarne l'attività

proteolitica fino a circa 20 volte. In particolare, questi composti potenziano preferenzialmente l'attività chymotrypsin-like (CT-L) del proteasoma e promuovono la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate (IDPs), quali α -sinucleina e tau, senza influenzare in modo significativo il turnover di proteine strutturate. (George et al., 2021; Jones et al., 2017)

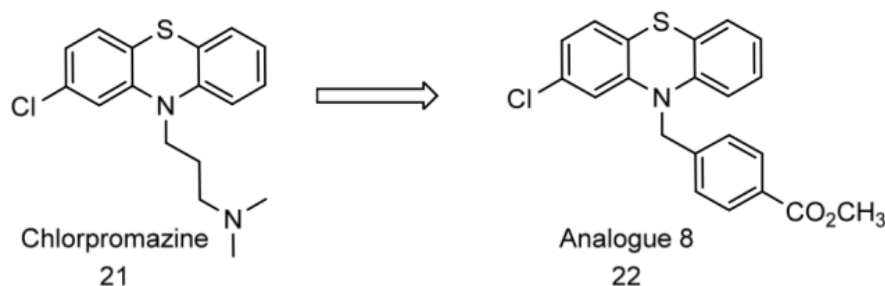


Figura 7. Struttura della clorpromazina e dell'analogo 8 della clorpromazina. (George et al., 2021)

Un composto strettamente correlato è il *blu di metilene*, analogo strutturale della clorpromazina, anch'esso in grado di modulare l'attività del proteasoma 20S. In particolare, il blu di metilene aumenta sia l'attività *chymotrypsin-like* (CT-L) sia quella *trypsin-like* (T-L) del complesso proteasomico. Oltre agli effetti sul proteasoma, è stato osservato che il composto riduce i livelli di β -amiloide e migliora l'apprendimento e la memoria in modelli murini, pur non modificando in vivo la fosforilazione della proteina tau. Studi più recenti hanno inoltre evidenziato che il blu di metilene è in grado di inibire la neurodegenerazione indotta dalla caspasi-6, ridurre la neuroinfiammazione e prevenire il deficit cognitivo nei modelli animali, suggerendone un potenziale interesse nel trattamento delle patologie neurodegenerative. (George et al., 2021; Zhou et al., 2019)

3.7 Derivati 3,4-diidrochinazolinici

Le 3,4-diidrochinazoline rappresentano una classe di composti sia naturali che sintetici, caratterizzati da un ampio spettro di attività biologiche, tra cui proprietà antifungine, antiparassitarie, antitumorali e antivirali.

Recenti evidenze scientifiche suggeriscono che questi composti e alcuni loro derivati siano in grado di modulare positivamente l'attività del proteasoma 20S, con particolare riferimento ai tre siti catalitici del complesso.

Inoltre, è stato riportato un incremento della degradazione di α -sinucleina, una proteina coinvolta in processi neurodegenerativi. (Fiolek et al., 2021; George et al., 2021)

Nel complesso, tali risultati indicano che le 3,4-diidrochinazoline possano costituire un valido punto di partenza per lo sviluppo di nuovi modulatori dell'attività proteasomica.

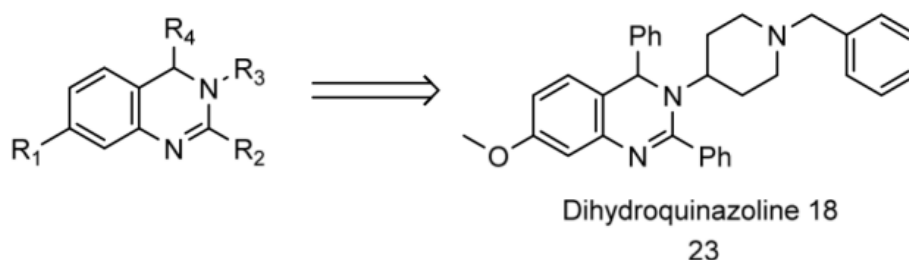


Figura 8. Strutture chimiche dello *scaffold* diidrochinolinico e della diidrochinolina 18. (George et al., 2021)

3.8 Fluspirilene e acilfluspirilene

Il *fluspirilene*, un farmaco antipsicotico appartenente alla classe dei difenilbutilpiperidini, e il suo derivato amidico, l'*acilfluspirilene*, sono stati recentemente identificati come attivatori del proteasoma 20S. Entrambi i composti sono in grado di potenziare le tre attività catalitiche del complesso proteasomico, ovvero le attività *chymotrypsin-like* (CT-L), *trypsin-like* (T-L) e *caspase-like* (C-L), promuovendo al contempo la degradazione delle proteine intrinsecamente disordinate (IDPs) e prevenendone l'aggregazione e l'oligomerizzazione.

Studi di *molecular docking* hanno inoltre evidenziato che fluspirilene e acilfluspirilene si legano alla tasca intersubunità $\alpha 2$ – $\alpha 3$ della particella centrale 20S. Tale sito di legame risulta differente da quello identificato per altri attivatori del proteasoma 20S, tra cui TCH-165, le diidrochinoline e la clorpromazina, che interagiscono invece con la tasca $\alpha 1$ – $\alpha 2$ del complesso proteasomico.

Studi di relazione struttura–attività (SAR) hanno evidenziato l'importanza delle interazioni di legame all'interno del sito di *binding* (*in-pocket*) di queste molecole con il proteasoma 20S. Questo gruppo di composti non determina un aumento dell'attività proteolitica del proteasoma 26S e potrebbe pertanto essere impiegato per prevenire selettivamente l'accumulo di proteine intrinsecamente disordinate (IDPs), senza interferire con la normale degradazione proteica dipendente dall'ubiquitina. (Fiolek et al., 2021; George et al., 2021)

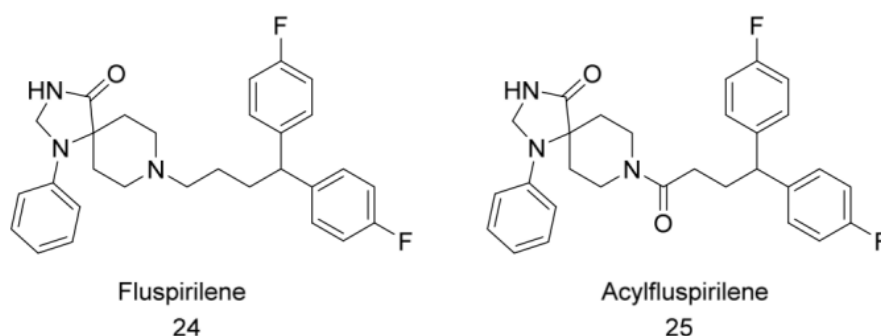


Figura 9. Strutture chimiche del fluspirilene e dell'acilfluspirilene. (George et al., 2021)

3.9 Derivati pirazolonici

I *pirazoloni* rappresentano una rara classe di composti in grado di potenziare l'attività del proteasoma. Questa classe di molecole è stata identificata per la prima volta come attivatore del proteasoma nel 2014 dal gruppo di Silverman, che ne ha inoltre proposto il possibile impiego come potenziali agenti terapeutici nel trattamento della sclerosi laterale amiotrofica (SLA). (Trippier et al., 2014)

Tra i composti studiati, *CMB-087229* è stato oggetto di alcune indagini che hanno suggerito la capacità di queste molecole di interagire con subunità regolatorie del proteasoma 26S; tuttavia, il loro meccanismo d'azione non è ancora stato completamente chiarito.

All'interno della stessa classe strutturale rientrano anche l'*aminofenazone* e il *nifenazone*, caratterizzati da uno scheletro di tipo pirazolonico. Questi composti sono in grado di incrementare fino a circa due volte l'attività del proteasoma 26S.

Inoltre, è stato riportato che l'aminofenazone può aumentare anche l'attività del proteasoma 20S, verosimilmente attraverso il legame con l'anello α del complesso proteasomico.

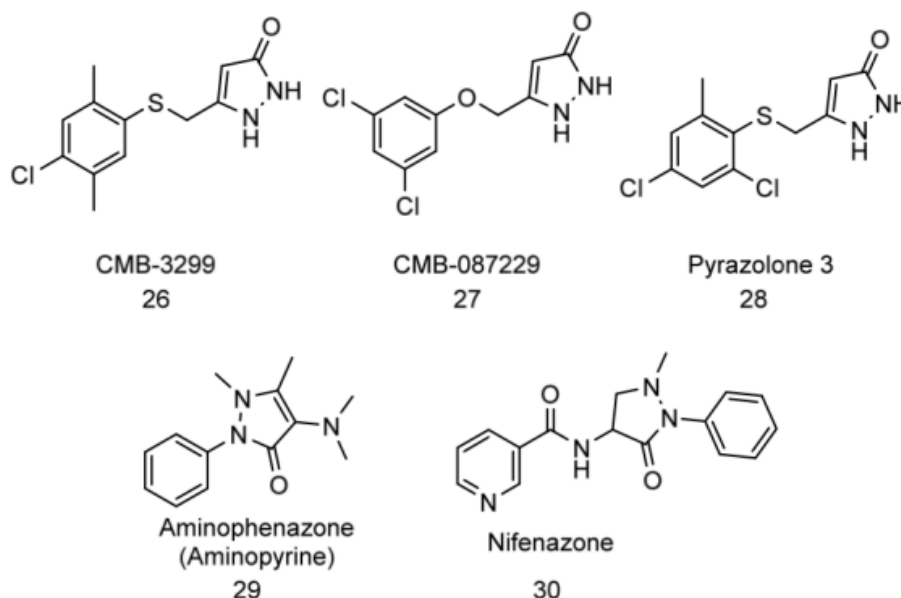


Figura 10. Strutture chimiche dei derivati pirazolonici in grado di incrementare l'attività proteasomiale. (George et al., 2021)

Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che i derivati pirazolonici possano agire come modulatori dell'attività proteasomica, sebbene siano ancora necessari ulteriori studi per chiarirne in modo definitivo i meccanismi molecolari coinvolti. (George et al., 2021)

3.10 Considerazioni comparative sugli attivatori del proteasoma 20S

Le diverse classi di attivatori del proteasoma 20S differiscono significativamente per meccanismo d'azione, selettività biologica e potenziale traslazionale.

Alcuni attivatori, come *SDS* e determinati lipidi o acidi grassi, hanno avuto un ruolo storico importante nell'identificazione sperimentale dei meccanismi di apertura del gate, ma presentano evidenti limitazioni in termini di specificità e applicabilità biologica. Altri composti, come i peptidi derivati da regolatori endogeni, hanno fornito indicazioni preziose sul funzionamento molecolare del complesso proteasomiale, pur risultando meno promettenti come candidati

farmacologici a causa di problemi di stabilità, biodisponibilità e permeabilità cellulare. (Tanaka et al., 1988; Tanaka et al., 1989; Njomen et al., 2019)

Diverso è il caso delle piccole molecole identificate più recentemente, quali *AM-404*, *MK-886*, *TCH-165*, le *fenotiazine*, i derivati *diidrochinazolinici*, il *fluspirilene* e i *derivati pirazolonici*. Questi composti presentano il vantaggio di poter essere studiati in sistemi cellulari più complessi e, in diversi casi, di promuovere la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate rilevanti dal punto di vista patogenetico, come α -sinucleina e tau. Tuttavia, il loro sviluppo è ancora limitato dalla non completa caratterizzazione dei siti di legame, dalla difficoltà di distinguere tra veri attivatori del proteasoma 20S e modulatori indiretti, nonché dalla scarsità di dati comparativi ottenuti mediante saggi standardizzati. (George et al., 2021; Trader et al., 2017)

Nonostante tali limitazioni, la capacità di alcune di queste molecole di favorire la degradazione di substrati patologici in modelli cellulari ha rafforzato l'interesse verso l'attivazione farmacologica del proteasoma 20S come potenziale strategia terapeutica.

Da un punto di vista farmacologico, un aspetto particolarmente rilevante è rappresentato dalla possibilità di ottenere composti capaci di aumentare selettivamente la degradazione delle proteine patologiche senza alterare in modo significativo la normale omeostasi proteica. In questo senso, le molecole che sembrano agire preferenzialmente sul proteasoma 20S e sulla degradazione di questi substrati proteici risultano particolarmente interessanti, poiché potrebbero consentire un intervento più mirato rispetto a una modulazione indiscriminata dell'intero sistema ubiquitina-proteasoma. (Njomen et al., 2019; George et al., 2021)

Nonostante i risultati promettenti ottenuti finora, la traduzione di questi approcci in applicazioni cliniche richiederà una migliore caratterizzazione dei meccanismi di attivazione e degli effetti biologici a lungo termine.

3.11 Nuove strategie di attivazione del proteasoma (2022–2026)

Negli ultimi anni la ricerca sugli attivatori del proteasoma ha conosciuto una significativa evoluzione, passando dall'identificazione di molecole in grado di aumentare l'attività proteolitica del complesso 20S a strategie basate sulla comprensione dei meccanismi strutturali che regolano l'apertura del *gate* proteasomiale. Parallelamente, sono stati identificati nuovi meccanismi indiretti di attivazione che ampliano le possibili applicazioni terapeutiche nelle malattie caratterizzate da alterazioni della proteostasi. (Osman et al., 2026)

3.11.1 Peptidomimetici Hb-Y-X e derivati da Blm10

Come visto alla fine del capitolo 3.1.1, una novità promettente riguarda lo sviluppo di peptidomimetici ispirati ai regolatori fisiologici del proteasoma. In particolare, l'attenzione si è concentrata sul motivo C-terminale *Hb-Y-X* (*Hydrophobic-Tyrosine-any amino acid*), utilizzato dalle ATPasi del complesso 19S per promuovere l'apertura del canale di accesso al core 20S. Studi recenti hanno dimostrato che peptidi sintetici contenenti tale motivo sono in grado di mimare il meccanismo fisiologico di apertura del *gate* attraverso interazioni allosteriche con le subunità α del proteasoma. In questo processo, il gruppo carbossilico terminale, il residuo tirosinico e la componente idrofobica cooperano nel favorire il riarrangiamento conformazionale delle subunità α e la stabilizzazione dello stato aperto del complesso proteasomiale. (Osman et al., 2026)

Un importante avanzamento è rappresentato quindi dalla progettazione di peptidomimetici derivati proprio dal motivo Hb-Y-X. Tali composti hanno mostrato la capacità di incrementare la degradazione di proteine non correttamente ripiegate e di contrastare l'inibizione del proteasoma indotta da oligomeri proteici associati a patologie neurodegenerative, suggerendo un potenziale impiego nel trattamento delle proteinopatie caratterizzate da accumulo di aggregati tossici. (Chuah et al., 2023)

Parallelamente, sono stati sviluppati peptidi ispirati alla proteina regolatrice Blm10 (PA200), un attivatore endogeno del proteasoma che presenta un motivo *Hb-Y-X-like*. Questi derivati sono stati ideati a partire dalla regione C-terminale coinvolta nell'interazione con il proteasoma e hanno dimostrato la capacità di aumentare sia la degradazione di substrati fluorogenici sia la degradazione proteica in sistemi biologici complessi, con i composti più promettenti attivi anche nei lisati cellulari. Sebbene tali molecole siano ancora in una fase iniziale di sviluppo, questi risultati dimostrano come la progettazione di peptidomimetici basata su regolatori fisiologici rappresenti una strategia promettente per ottenere nuovi attivatori selettivi del proteasoma. (Witkowska et al., 2025)

Nel complesso, questi studi evidenziano come il settore stia progressivamente abbandonando strategie di screening a favore di approcci guidati dalla relazione struttura-attività (*Structure–Activity Relationship, SAR*), con l'obiettivo di ottenere attivatori più selettivi, potenti e adatti allo sviluppo farmacologico. (Osman et al., 2026)

3.11.2 Antagonisti NMDAR come modulatori indiretti del 20S

Un ulteriore sviluppo recente è rappresentato dall'identificazione degli antagonisti del recettore N-metil-D-aspartato (*NMDAR*⁶) come modulatori indiretti dell'attività proteasomiale. In particolare, *memantina*, *ketamina* e altri antagonisti del recettore NMDA hanno mostrato la capacità di aumentare significativamente l'attività del proteasoma 20S e di promuovere la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate, ossidate o mal ripiegate. Si ritiene che tale meccanismo possa contribuire agli effetti terapeutici osservati nelle malattie neurodegenerative e nei disturbi neuropsichiatrici. (Sahin et al., 2025; Krystal et al., 2023)

⁶*NMDAR*: sottoclasse di recettori ionotropici del glutammato coinvolti nella trasmissione sinaptica eccitatoria, insieme ai recettori AMPA e kainato. Si distinguono dagli altri recettori ionotropici per l'elevata permeabilità agli ioni Ca^{2+} e per la presenza di distinti siti di legame per glutammato, glicina, poliammine, bloccanti del canale ionico (ad es. ketamina, memantina e MK-801) e modulatori allosterici.

Di particolare rilevanza è l'osservazione che l'aumento dell'attività proteasomiale sembra coinvolgere prevalentemente il sistema ubiquitina-indipendente associato al *core* 20S, responsabile soprattutto della degradazione di proteine intrinsecamente disordinate e di proteine danneggiate da stress ossidativo. Questo aspetto risulta di notevole interesse nel contesto delle malattie neurodegenerative, nelle quali il declino dell'attività proteasomiale e l'accumulo di proteine aggregate rappresentano eventi patogenetici centrali. È stato dimostrato che il trattamento con ketamina riduce i livelli di proteine patologicamente associate alla malattia di Alzheimer, tra cui tau fosforilata ed il precursore della β -amiloide, e aumenta l'attività *chymotrypsin-like*, *trypsin-like* e *caspase-like* del proteasoma in diversi modelli cellulari.

Sebbene tali evidenze siano ancora limitate a modelli sperimentali, esse rappresentano prospettive particolarmente interessanti per il riposizionamento farmacologico di molecole già approvate, come la *memantina*, suggerendo che parte dei loro effetti neuroprotettivi potrebbe derivare anche dalla modulazione della degradazione proteica mediata dal proteasoma. (Sahin et al., 2025)

3.11.3 Prospettive di sviluppo e relazione struttura-attività

I progressi più recenti nella caratterizzazione strutturale del proteasoma hanno fornito nuove informazioni sui meccanismi molecolari che regolano l'apertura del gate del complesso 20S e sulle modalità di interazione tra gli attivatori e le subunità α del core proteasomiale. In particolare, le caratteristiche strutturali del motivo *Hb-Y-X* e del regolatore fisiologico Blm10 hanno permesso di identificare elementi chiave per la progettazione di nuovi composti in grado di modulare l'attività del proteasoma mediante interazioni allosteriche con le subunità α . (Chuah et al., 2023; Witkowska et al., 2025)

In tale contesto, gli studi di relazione struttura-attività (*Structure–Activity Relationship, SAR*) rappresentano uno strumento fondamentale per correlare le caratteristiche strutturali dei composti con la loro capacità di modulare l'attività

proteasomiale. Tuttavia, per numerosi attivatori descritti in letteratura i siti di legame sul proteasoma e i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione non sono ancora stati completamente identificati. La definizione di tali aspetti rappresenta un passaggio fondamentale per comprendere le modalità di interazione tra i diversi composti e il complesso proteasomiale e per favorire la progettazione di nuovi attivatori caratterizzati da una maggiore selettività. (Osman et al., 2026)

4. ATTIVATORI A PICCOLA MOLECOLA DEL PROTEASOMA 26S: REGOLAZIONE POST-TRADUZIONALE

4.1 Inibitori delle deubiquitinasi

Come accennato al *paragrafo 1.4*, le deubiquitinasi (DUBs) rappresentano una classe di enzimi coinvolti nella rimozione delle catene di ubiquitina dalle proteine substrato, regolando in modo cruciale il processo di degradazione proteasomiale.

A tal riguardo, USP14 (*ubiquitin-specific protease 14*⁷) riveste un ruolo particolarmente rilevante, in quanto è associata al proteasoma e può rimuovere le catene di ubiquitina dalle proteine destinate alla degradazione, influenzandone così il destino cellulare.

Tra i modulatori più studiati di USP14 si annovera *IU1*, un inibitore selettivo in grado di bloccare l'attività enzimatica della peptidasi specifica. L'inibizione di USP14 favorisce la degradazione di proteine danneggiate, in particolare quelle accumulate in condizioni di stress ossidativo, migliorando l'efficienza del sistema proteasomiale.

A partire da *IU1* sono stati sviluppati diversi analoghi, tra cui *IU1-47*, *IU1-248*, *IB10* e *ID18*, caratterizzati da una maggiore potenza e una migliore permeabilità cellulare rispetto al composto progenitore, rendendoli strumenti più efficaci per la modulazione dell'attività di USP14. (George et al., 2021)

⁷USP14: deubiquitinasi appartenente alla classe delle proteasi a cisteina, rimuove le catene di ubiquitina dalle proteine substrato prima della loro degradazione.

Un ulteriore approccio per il targeting di questa deubiquitinasi è rappresentato dall'impiego di *siRNA* (*small interfering RNA*) diretti contro USP14.

Questa strategia consente un knockdown genico specifico attraverso un meccanismo di silenziamento post-trascrizionale, in cui l'mRNA bersaglio viene degradato o bloccato, determinando una riduzione della sintesi proteica. Il knockdown di USP14 tramite *siRNA* porta all'accumulo di proteine poliubiquitinate e ha mostrato di indurre un aumento dell'apoptosi, in particolare nelle cellule di mieloma multiplo.

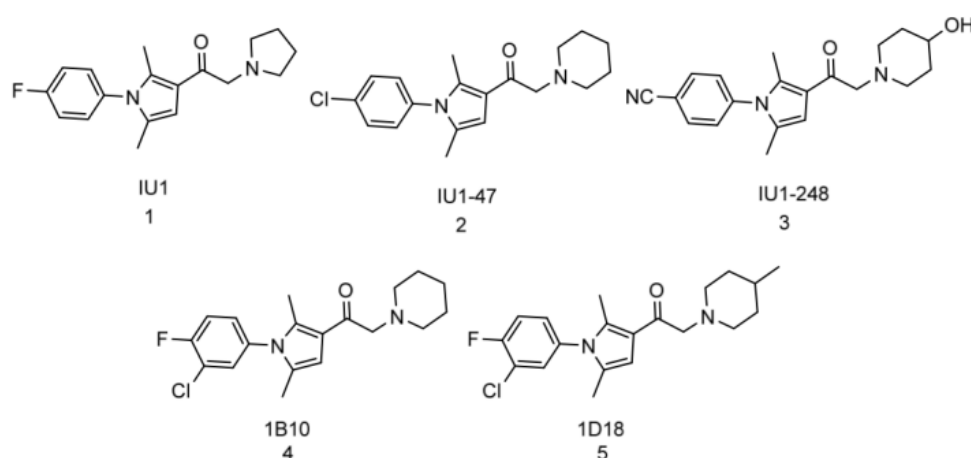


Figura 11. Piccole molecole inibitrici degli enzimi deubiquitinanti (DUBs). (George et al., 2021)

Nel complesso, questi dati evidenziano USP14 come un potenziale target terapeutico per la modulazione del sistema ubiquitina–proteasoma, con possibili applicazioni terapeutiche in ambito oncologico e nelle patologie caratterizzate da alterata degradazione proteica. (Njomen et al., 2019)

4.2 Modulatori delle chinasi (*PKA cAMP-dipendente e PKG cGMP-dipendente*)

Le molecole in grado di aumentare i livelli intracellulari di cAMP rappresentano un'interessante strategia terapeutica, in quanto possono favorire la degradazione di proteine mal ripiegate, come la tau, implicata nella patogenesi della malattia di Alzheimer, sia in colture cellulari sia in modelli murini. In quest'ottica, è stato osservato che gli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE) sono in grado di

incrementare l'attività del proteasoma attraverso meccanismi di fosforilazione mediati dalla via cAMP/PKA.

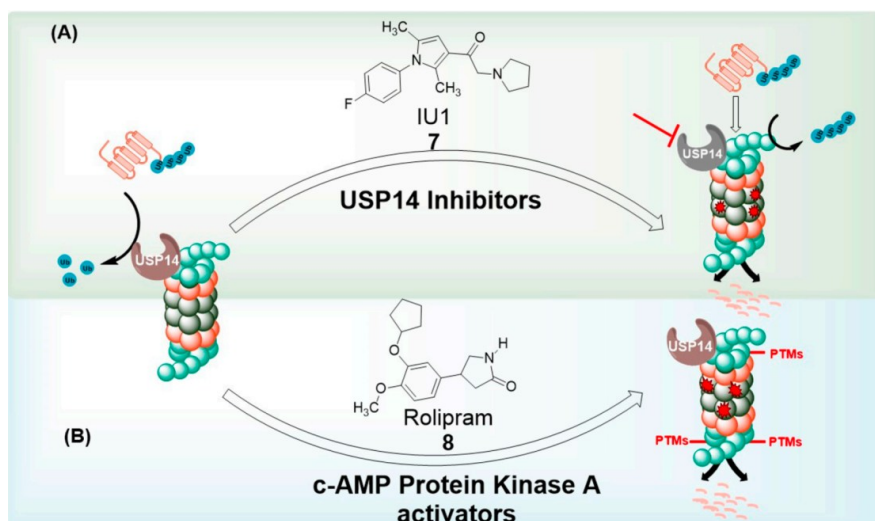


Figura 12. Modulazione del proteasoma attraverso modificazioni post traduzionali (PTM). (A) L'inibizione di USP14 riduce il trimming delle catene di ubiquitina, promuovendo la degradazione mediata dal proteasoma 26S. (B) La fosforilazione della subunità Rpn6 del 19S tramite la via cAMP/PKA potenzia la proteolisi mediata dal proteasoma 26S. (Njomen et al., 2019)

Il proteasoma 26S umano presenta una complessa regolazione post-traduzionale, con oltre 455 siti di fosforilazione identificati, coinvolti nella modulazione dell'assemblaggio, della stabilità e dell'attività del complesso. In particolare, la fosforilazione di specifiche subunità è stata associata a un incremento dell'attività proteasomiale: ad esempio, Rpn6 può essere fosforilata dalla PKA, Rpt3 dalla chinasi DYRK2 e Rpt6 dalla CaMKII oppure dalla PKA stessa. Tuttavia, la regolazione mediata da fosforilazione non è esclusivamente attivatoria, poiché in condizioni specifiche, come lo stress osmotico, la fosforilazione della subunità Rpn2 mediata dalla p38 MAPK può determinare una riduzione dell'attività del proteasoma, evidenziando il carattere contestuale di questo tipo di regolazione, con effetti differenti a seconda delle condizioni cellulari. (Leestemaker et al., 2017)

Tra i modulatori farmacologici di queste vie, il *rolipram*, inibitore selettivo della PDE4, è stato descritto come capace di aumentare l'attività del proteasoma presumibilmente attraverso la fosforilazione della subunità Rpt6 del complesso 19S. Altri inibitori delle fosfodiesterasi includono il *cilostazolo* (PDE3), il *sildenafil* e il *tadalafil* (PDE5), tutti coinvolti nell'incremento dei livelli di secondi messaggeri ciclici e nella conseguente modulazione dell'attività cellulare.

Parallelamente, anche gli attivatori della guanilato ciclasi solubile, come *BAY41-2272* e *cinaciguat*, sono stati studiati per il loro effetto sul sistema proteasomico.

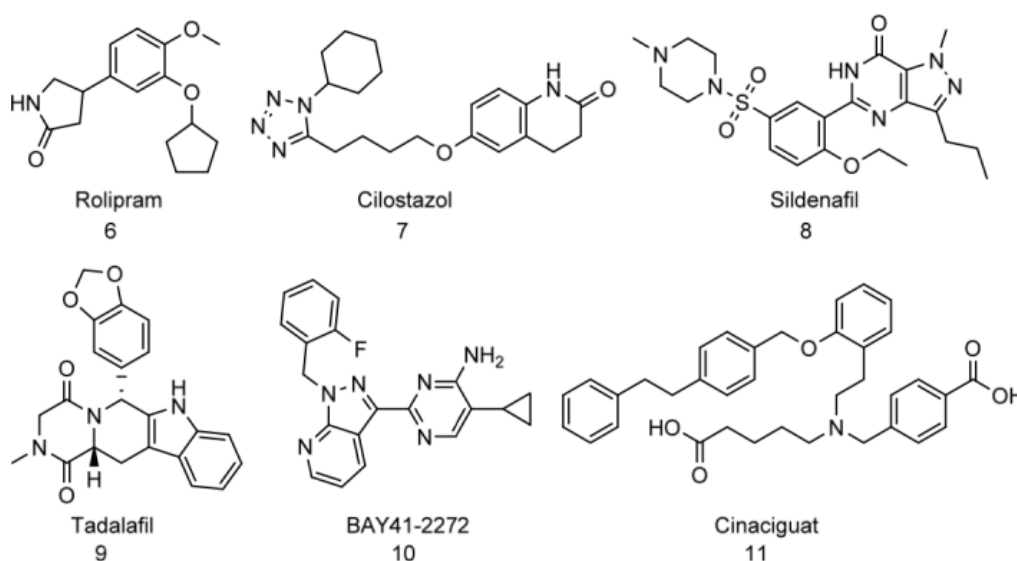


Figura 13. Inibitori della PDE4, come rolipram (6) e cilostazolo (7), aumentano la segnalazione cAMP/PKA promuovendo la degradazione di IDPs e proteine mal ripiegate. Sildenafil (8), tadalafil (9), BAY 41-2272 (10) e cinaciguat (11) incrementano invece i livelli di cGMP e attivano il proteasoma attraverso una via cGMP-dipendente. (George et al., 2021)

Tuttavia, il loro specifico target molecolare all'interno del proteasoma 26S non è ancora stato completamente identificato: è stato infatti escluso il coinvolgimento diretto delle subunità Rpn6, Rpt3 e Rpt6, suggerendo che il loro meccanismo d'azione rimanga ancora in parte da chiarire.

Nel complesso, questi dati evidenziano come la regolazione del proteasoma tramite vie di segnalazione MAPK e secondi messaggeri ciclici rappresenti un sistema complesso e finemente modulato, nel quale la fosforilazione può

determinare effetti sia attivatori sia inibitori a seconda del contesto cellulare. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

4.3 Manipolazione genetica

4.3.1 Attivazione dell'*Nrf2*

Il fattore di trascrizione *Nrf2* (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) è un regolatore chiave della risposta cellulare allo stress ossidativo e controlla l'espressione di numerosi geni citoprotettivi, inclusi enzimi antiossidanti quali la glutatione S-transferasi e la NADPH chinone ossidoreduttasi 1, oltre alle subunità del proteasoma. In virtù di questo ruolo, l'attivazione della via di segnalazione *Nrf2* rappresenta un importante meccanismo attraverso cui è possibile incrementare indirettamente l'attività proteasomica mediante piccole molecole.

Tra i composti in grado di attivare *Nrf2*, il *3H-1,2-dithiolo-3-thione (D3T)* agisce come agente antiossidante indiretto ed è stato descritto come un potente induttore dell'espressione delle subunità proteasomiche, con conseguente aumento dell'attività del complesso 20S e 19S in maniera *Nrf2*-dipendente.

Un ulteriore attivatore è rappresentato dall'*18 α -acido glicirretico (18 α -GA)*, per il quale è stato dimostrato un incremento dell'attività proteolitica del proteasoma compreso tra 1,5 e 1,8 volte nei fibroblasti umani HFL-1 wild-type, con un effetto particolarmente marcato sull'attività *caspase-like* (C-L). Inoltre, tale composto è stato associato a un ritardo della senescenza cellulare attraverso un meccanismo mediato da *Nrf2*. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

Analogamente, l'attivazione di *Nrf2* mediante *tert-butilidrossichinone (t-BHQ)* e *sulforafano* determina un aumento dell'attività proteasomica, accompagnato da effetti funzionali rilevanti quali il ritardo della differenziazione cellulare e l'incremento dell'autorinnovamento e della pluripotenza in cellule staminali embrionali umane (hESCs) e cellule staminali pluripotenti indotte (iPS-IMR90). (Jang et al., 2014)

Inoltre, tali molecole conferiscono protezione contro lo stress ossidativo in cellule di neuroblastoma, evidenziando il ruolo della via Nrf2 nella regolazione coordinata della proteostasi e della sopravvivenza cellulare. (Kwak et al., 2007)

Nel complesso, questi dati indicano che l'attivazione di Nrf2 rappresenta un efficace meccanismo di upregulation del sistema ubiquitina–proteasoma, con potenziali implicazioni terapeutiche in condizioni caratterizzate da stress ossidativo e alterata proteostasi.

4.3.2 *Sovraespressione di subunità proteasomiche*

I primi studi pionieristici sulla modulazione dell'attività del proteasoma mediante manipolazione genetica hanno fornito evidenze sul ruolo delle singole subunità nella regolazione funzionale del complesso proteolitico. In particolare, l'iperespressione della subunità immunoproteasomica $\beta 5i$ (LMP7) in linfoblasti e cellule HeLa ha determinato un aumento delle attività *chymotrypsin-like* (CT-L) e *trypsin-like* (Tryp-L), mentre l'iperespressione della subunità $\beta 1i$ (LMP2) ha incrementato selettivamente la sola attività *trypsin-like*.

Tali risultati evidenziano come la composizione subunitaria del proteasoma moduli in modo specifico le sue attività catalitiche. Inoltre, l'aumento dell'attività dell'immunoproteasoma può influenzare il processamento antigenico, contribuendo potenzialmente al potenziamento della risposta immunitaria. (Njomen et al., 2019)

4.3.3 *Cap-Upregulation e generazione di “open-gate mutants”*

Come descritto al capitolo 1.6, il proteasoma 20S si trova prevalentemente in una conformazione “latente”, nella quale l'accesso al compartimento catalitico è limitato dalle estremità N-terminali convergenti delle subunità α . Di conseguenza, la modulazione genetica dell'attività proteasomiale può essere ottenuta principalmente attraverso due strategie: l'aumento dell'assemblaggio dei complessi proteasomiali mediante la sovraregolazione delle particelle regolatorie (*cap-*

upregulation) e la generazione di mutanti a “gate aperto” (*open-gate mutants*), che incrementano l'accessibilità dei substrati al compartimento catalitico.

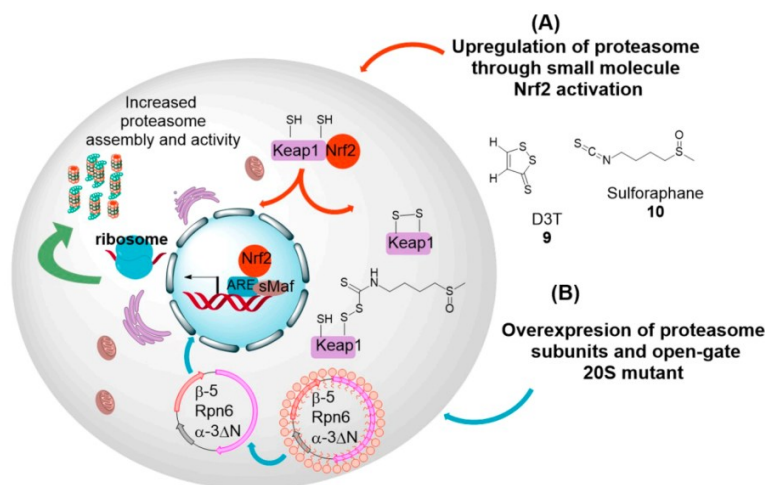


Figura 14. Upregolazione genetica dell’attività del proteasoma. (A) L’attivazione di Nrf2, mediata da modificazioni ossidative e/o della Keap1, induce l’espressione dei componenti del proteasoma. (B) La sovraespressione di β5 e Rpn6 aumenta l’attività del 26S, mentre la forma N-terminale troncata di α3 promuove proteasomi 20S e 26S in configurazione a “gate aperto”. (Nijomen et al., 2019)

Nel primo caso, la sovraespressione di specifiche subunità regolatorie favorisce l'assemblaggio del proteasoma 26S, costituito dal core catalitico 20S associato a una o due particelle regolatorie 19S. Tra queste, la subunità Rpn6 svolge un ruolo particolarmente importante nel promuovere la stabilità e l'assemblaggio del complesso. La sua sovraespressione determina infatti un aumento dei livelli di proteasoma 26S funzionalmente attivo e un conseguente incremento dell'attività proteasomiale complessiva, evidenziando come la disponibilità delle particelle regolatorie rappresenti un elemento cruciale per la modulazione della capacità degradativa cellulare. Analogamente, la sovraespressione dell'attivatore *PA28α* ha mostrato effetti protettivi in modelli murini di proteinopatia e di danno da ischemia-riperfusion, dimostrando come il potenziamento dell'attività proteasomiale possa avere implicazioni terapeutiche che vanno oltre le malattie neurodegenerative e i processi associati all'invecchiamento.

Una seconda strategia consiste nella modifica strutturale del *gate* formato dagli anelli α del core 20S. In particolare, la rimozione dell'estremità N-terminale della subunità $\alpha 3$ genera il mutante $\alpha 3\Delta N$, che viene incorporato nei proteasomi 20S e 26S completamente assemblati inducendo una conformazione costitutivamente aperta del canale di accesso. Tale modifica facilita l'ingresso dei substrati nel compartimento proteolitico e aumenta significativamente l'attività degradativa del proteasoma.

I proteasomi contenenti la mutazione $\alpha 3\Delta N$ mostrano una maggiore capacità di degradare numerosi substrati sia del sistema 20S sia del sistema 26S, comprese proteine associate a patologie neurodegenerative come tau e α -sinucleina. L'aumentata clearance dell' α -sinucleina è stata correlata a un ritardo nella formazione degli aggregati proteici e a una maggiore resistenza cellulare allo stress ossidativo, suggerendo che l'apertura del gate possa rappresentare una strategia valida per il trattamento dei disordini caratterizzati da accumulo di proteine mal ripiegate e aggregate.

Tuttavia, la maggior parte di queste strategie di attivazione genetica è stata finora studiata principalmente in sistemi cellulari in vitro, mentre le evidenze ottenute in modelli animali risultano ancora limitate. In prospettiva, la modulazione dell'attività proteasomiale mediante la sovraespressione di componenti quali la subunità $\beta 5$ e Rpn6, o la generazione di mutanti $\alpha 3\Delta N$ potrebbe costituire una strategia di terapia genica per il trattamento di patologie caratterizzate da alterazioni della proteostasi e accumulo di proteine tossiche. (Njomen et al., 2019)

4.3.4 Inibizione delle p38 MAPK

Le *mitogen-activated protein kinases (MAPK)* costituiscono una famiglia di chinasi ubiquitariamente espresse coinvolte nella regolazione di processi cellulari quali proliferazione e apoptosi mediante fosforilazione di residui di serina e treonina nelle proteine bersaglio. Tra queste, la MAP chinasi p38 è un nodo

centrale della risposta infiammatoria e della produzione di citochine quali IL-1 β e TNF- α .

L'iperattivazione della via p38 MAPK è stata osservata in modelli animali e in campioni cerebrali post-mortem di pazienti affetti da malattia di Alzheimer (AD) e sclerosi laterale amiotrofica (SLA), risultando associata a fosforilazione della proteina tau, neuroinfiammazione, neurotossicità e disfunzione sinaptica. In questo contesto, la modulazione di p38 MAPK è stata correlata a un incremento della degradazione proteasomiale e alla riduzione di proteine aggregate come l' α -sinucleina, suggerendo un coinvolgimento della via nei processi di proteostasi.

Nel 2017 sono stati identificati, mediante screening ad alta processività su oltre 2750 composti e utilizzo di una sonda attività-dipendente del proteasoma, una serie di inibitori di p38 MAPK in grado di aumentare l'attività proteasomiale nelle cellule MelJuSo.

Tra questi, *PD169316* e i suoi analoghi *SB202190* e *SB203580*, inibitori competitivi di tipo I dell'ATP, hanno mostrato un incremento dose-dipendente dell'attività proteolitica del proteasoma, ed analoghi effetti sono stati osservati anche con *Skepinone-L*, inibitore selettivo di p38 α .

L'analisi delle isoforme di p38 MAPK (α , β , γ e δ) ha evidenziato un ruolo predominante di p38 α . Il silenziamento mediante siRNA ha infatti mostrato che solo la deplezione di p38 α determina un marcato aumento dell'attività proteasomiale, mentre p38 β produce un effetto modesto e p38 γ/δ non risultano significative. Coerentemente, i saggi enzimatici hanno evidenziato un incremento delle attività catalitiche β 1/5 e β 2 in seguito alla deplezione di p38 α , senza variazioni dei livelli proteici delle subunità β 5.

Il trattamento con *PD169316* in condizioni di *knockdown* di p38 α non ha ulteriormente incrementato l'attività proteasomiale, confermando la specificità del meccanismo dipendente da p38 MAPK.

Analogamente, il silenziamento di componenti della cascata di segnalazione, tra cui ASK1, MKK6 e la proteina bersaglio MK2 (effettore downstream di p38), ha

determinato un aumento superiore a due volte dell'attività proteasomiale intracellulare.

In tale prospettiva, il ruolo di MK2 è stato ulteriormente caratterizzato mediante l'impiego di *MK2 inhibitor III*, che in condizioni di trattamento singolo determina solo un lieve aumento dell'attività proteasomiale. Tuttavia, la co-somministrazione di MK2 inhibitor III con PD169316 a concentrazioni sub-inibitorie produce un marcato effetto sinergico, con un incremento dell'attività proteasomiale fino a circa quattro volte rispetto al controllo.

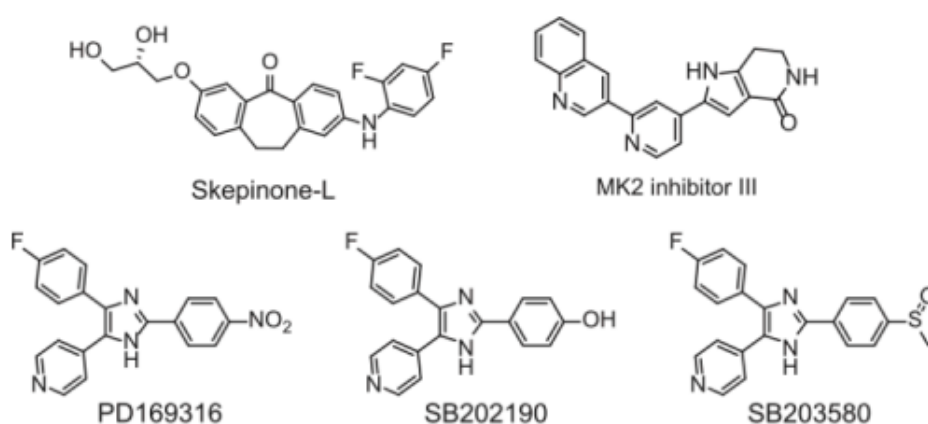


Figura 15. Strutture degli inibitori del sito attivo di p38 MAPK PD169316, SB202190 e SB203580, e dell'inibitore allosterico di p38 MAPK skepinone-L. Struttura dell'inibitore di MK2 III. (George et al., 2021)

Tale effetto è raggiungibile a concentrazioni significativamente inferiori rispetto all'utilizzo dei singoli composti, suggerendo che p38 MAPK e MK2 contribuiscono tramite meccanismi parzialmente distinti ma convergenti nella regolazione dell'attività del proteasoma.

Nel complesso, i risultati indicano che la modulazione della via p38 MAPK rappresenta un possibile meccanismo per influenzare l'attività proteolitica del proteasoma, con un ruolo predominante dell'isoforma p38 α . (George et al., 2021; Leestemaker et al., 2017)

4.3.5 Modulazione del proteasoma mediata da p38 MAPK: meccanismi d'azione differenti

Alcuni studi hanno dimostrato che, in cellule trattate con inibitori della via p38 MAPK, il proteasoma mantiene un'elevata attività anche dopo lisi cellulare e purificazione. Questo suggerisce che l'aumento dell'attività proteasomiale indotto dall'inibizione di p38 MAPK derivi da una modulazione diretta del complesso proteasomiale, verosimilmente attraverso modificazioni post-traduzionali.

È stato precedentemente riportato che sia l'attivazione di p38 MAPK sia quella di ASK1 possono indurre la fosforilazione di subunità della particella regolatoria 19S, in particolare Rpn2 e Rpt5, determinando una riduzione dell'attività del proteasoma.

Tuttavia, analisi proteomiche non hanno evidenziato differenze significative nello stato di fosforilazione del proteasoma tra cellule trattate con *PD169316*, *skepinone-L* o *MK2 inhibitor III* e controlli non trattati, includendo anche il sito Rpn2 Thr-273. Questo indica che, sebbene la fosforilazione possa contribuire all'inibizione del proteasoma, l'aumento della sua attività non sembra essere mediato da una fosforilazione diretta delle sue subunità.

Ulteriori analisi hanno mostrato che l'inibizione della via p38 MAPK non altera né l'espressione trascrizionale delle subunità del core 20S (PSMB5, PSMB6, PSMB7), né i livelli proteici del proteasoma 20S o 19S, suggerendo che l'attivazione non dipende da un aumento della biogenesi del complesso.

Inoltre, non sono state osservate variazioni significative nell'assemblaggio del proteasoma 26S né nella composizione delle subunità regolatorie o dei chaperoni associati, indicando che l'inibizione della via p38 MAPK non agisce attraverso modificazioni dell'assemblaggio o del reclutamento delle subunità accessorie.

Infine, nel paragrafo precedente è stato osservato che *PD169316* e *MK2 inhibitor III* agiscono in modo sinergico: il loro utilizzo combinato a concentrazioni sub-inibitorie determina un incremento dell'attività proteasomiale fino a circa quattro volte rispetto al controllo, suggerendo che i due composti agiscono attraverso

meccanismi almeno parzialmente distinti ma convergenti. (Leestemaker et al., 2017)

In conclusione, l'identificazione di piccole molecole in grado di incrementare l'attività del proteasoma 26S evidenzia il ruolo centrale di questo complesso nel mantenimento dell'omeostasi proteica e nella prevenzione dell'accumulo di proteine tossiche caratteristico delle patologie neurodegenerative. In particolare, il coinvolgimento della via di segnalazione p38 MAPK, insieme a component come MK2, suggerisce che la modulazione di questa cascata possa rappresentare un possibile punto di intervento per la regolazione dell'attività proteasomiale. Nel loro insieme, tali evidenze supportano l'ipotesi che il potenziamento del sistema ubiquitina-proteasoma possa costituire una strategia terapeutica promettente per il trattamento delle malattie caratterizzate da aggregazione proteica.

4.4 Modulazione indiretta dell'UPS attraverso la SUMOilazione

La SUMOilazione è una modificazione post-traduzionale reversibile che consiste nel legame covalente di proteine della famiglia *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) ai residui di lisina delle proteine bersaglio. Sebbene condivida con l'ubiquitinazione una cascata enzimatica simile, la SUMOilazione svolge principalmente una funzione regolatoria, influenzando la stabilità, la localizzazione e l'attività funzionale delle proteine.

Negli ultimi anni è emerso come la SUMOilazione rappresenti un ulteriore meccanismo di regolazione indiretta del sistema ubiquitina-proteasoma. Le modificazioni SUMO e ubiquitina possono infatti interessare gli stessi substrati proteici e, in alcuni contesti, competere per i medesimi residui di lisina, modulandone la degradazione proteasomiale. (Desouky et al., 2024)

Tale relazione risulta particolarmente rilevante nelle malattie neurodegenerative, dove alterazioni della SUMOilazione sono state associate all'accumulo di proteine patologiche. (Chen et al., 2021)

Nella malattia di Alzheimer è stato osservato un aumento dell'espressione di SUMO1 e dell'enzima Ubc9 (SUMO E2), associato a una maggiore stabilità della β -secretasi e a un incremento della produzione di peptide β -amiloide. Analogamente, nella malattia di Parkinson, α -sinucleina rappresenta un importante substrato della SUMOilazione e i corpi di Lewy contengono sia ubiquitina sia proteine SUMO. Tuttavia, il ruolo della SUMOilazione rimane controverso, poiché alcuni studi suggeriscono che essa possa favorire l'accumulo di α -sinucleina, mentre altri ne indicano un possibile effetto protettivo attraverso l'aumento della sua solubilità.

Queste osservazioni hanno portato allo sviluppo di strategie farmacologiche volte a modulare il *pathway* SUMO. Tra queste, l'inibitore dell'enzima SUMO-E1 *Acido Ginkgolico* ha mostrato la capacità di ridurre la SUMOilazione di α -sinucleina e di limitarne l'aggregazione in modelli sperimentali. (Fukuda et al., 2009; Gerstmeier et al., 2019)

Parallelamente, sono stati sviluppati inibitori di Ubc9 (*MLS-0437113*) e delle proteasi SENP⁸ (*WO064887*), sebbene tali composti siano ancora in fase di studio e richiedano ulteriori indagini per definirne il potenziale terapeutico. Anche *TAK-981*, un inibitore della SUMOilazione attualmente in sviluppo principalmente per il trattamento della leucemia mieloide acuta, testimonia il crescente interesse verso la modulazione farmacologica di questo pathway, pur non essendo ancora stato valutato nel contesto delle malattie neurodegenerative. Nel complesso, il ripristino dell'equilibrio dinamico tra SUMOilazione e deSUMOilazione potrebbe rappresentare una promettente strategia indiretta per favorire il mantenimento della proteostasi e la degradazione delle proteine patologiche.

Tuttavia, le evidenze disponibili sono ancora prevalentemente precliniche e richiedono ulteriori conferme. (Desouky et al., 2024)

⁸SENP: *Sentrin-specific protease*, sono proteasi coinvolte sia nella maturazione delle proteine SUMO, mediante l'esposizione del motivo C-terminale diglicina necessario alla loro coniugazione, sia nel successivo processo di deSUMOilazione, che rende reversibile questa modificazione post-traduzionale.

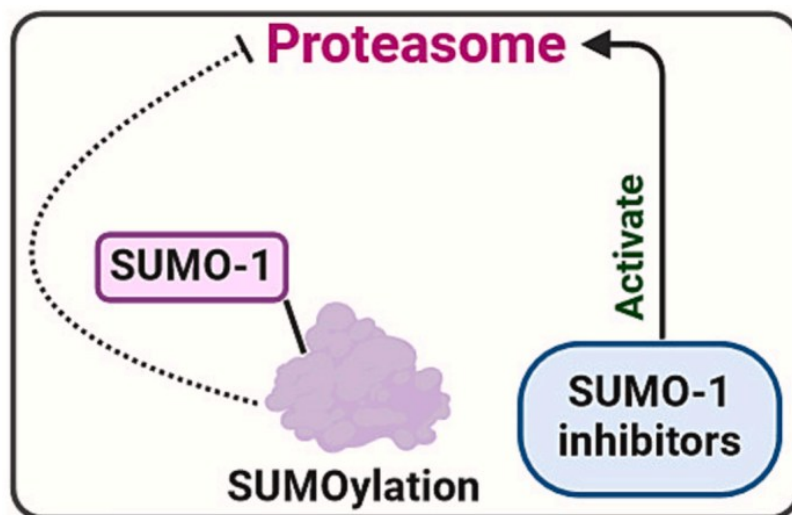


Figura 16. Sfruttamento della via di SUMOilazione per potenziare l'attività del proteasoma: gli inibitori di SUMO-1 potrebbero aumentare la capacità degradativa dei proteasomi. Questo effetto potrebbe derivare dalla possibile competizione tra i processi di ubiquitinazione e SUMOilazione. (Desouky et al., 2024) *SUMO: Small Ub-like modifier*

4.5 Attivazione del proteasoma e tumorigenesi: il ruolo della via KEAP1/NRF2

Le strategie di attivazione del proteasoma descritte nei paragrafi precedenti sono accomunate dall'obiettivo di potenziare la degradazione delle proteine danneggiate e di ripristinare l'omeostasi proteica. Tuttavia, l'incremento dell'attività proteasomiale non risulta necessariamente vantaggioso in tutti i contesti patologici e, in particolare, può contribuire alla progressione tumorale quando associato a un'attivazione persistente della via KEAP1/NRF2. (Best et al., 2018)

Durante la trasformazione neoplastica è stato osservato un aumento dell'espressione di NRF2, associato a un incremento dell'attività proteasomiale e della capacità delle cellule di eliminare le proteine mal ripiegate. Tale effetto è mediato sia dalla maggiore espressione delle subunità del proteasoma sia dall'induzione di proteine appartenenti alla famiglia *TRIM*⁹, in particolare TRIM11, che cooperano nel mantenimento della proteostasi cellulare.

⁹*TRIM: tripartite motif-containing proteins*, selezionano le proteine mal ripiegate per la degradazione proteasomiale.

La riduzione dell'espressione di NRF2 determina una diminuzione dell'attività proteasomiale e dell'espressione di TRIM11, con conseguente accumulo di proteine aberranti e riduzione della capacità proliferativa delle cellule trasformate. Al contrario, il potenziamento dell'attività proteasomiale favorisce la degradazione delle proteine mal ripiegate, riduce lo stress proteotossico e contribuisce al mantenimento del fenotipo neoplastico. È stato inoltre osservato che l'attivazione farmacologica del proteasoma mediante IU1 incrementa la trasformazione cellulare indotta da H-Ras^{V12}, suggerendo che una maggiore efficienza dei sistemi di degradazione proteica possa favorire la crescita delle cellule tumorali. (Chen et al., 2017)

Parallelamente, l'attivazione costitutiva della via KEAP1/NRF2, frequentemente conseguente a mutazioni di *KEAP1*¹⁰, non risulta sufficiente, da sola, a promuovere la tumorigenesi, ma acquisisce un ruolo rilevante quando si associa ad altre alterazioni oncogeniche, quali la perdita di *PTEN*¹¹ e la conseguente attivazione della via PI3K (fosfoinositide 3-chinasi). In tali condizioni, la persistente attivazione di NRF2 conferisce alle cellule tumorali un vantaggio adattativo, favorendone la sopravvivenza attraverso il mantenimento dell'omeostasi proteica e della capacità degradativa del sistema ubiquitina-proteasoma. Nel complesso, tali evidenze suggeriscono che la via KEAP1/NRF2 svolga un ruolo dipendente dal contesto biologico: se da un lato la sua attivazione contribuisce al mantenimento della proteostasi cellulare, dall'altro una sua attivazione persistente, in presenza di specifiche alterazioni oncogeniche, può sostenere la sopravvivenza e la progressione delle cellule tumorali attraverso il potenziamento della capacità degradativa del sistema ubiquitina-proteasoma. (Best et al., 2018)

¹⁰*KEAP1*: Kelch-like ECH-associated protein 1, regolatore negativo di Nrf2.

¹¹*PTEN*: Phosphatase and tensin homolog, uno dei principali geni oncosoppressori del corpo umano.

4.6 Considerazioni comparative sulle strategie di attivazione indiretta del proteasoma 26S

A differenza degli attivatori diretti del proteasoma 20S, le strategie di modulazione del proteasoma 26S agiscono prevalentemente attraverso meccanismi indiretti, che coinvolgono deubiquitinasi, chinasi, fattori di trascrizione e alterazioni dell'assemblaggio del complesso. Questo rende il 26S un bersaglio di notevole interesse, ma allo stesso tempo più complesso dal punto di vista farmacologico, poiché l'effetto finale sull'attività proteolitica dipende da reti di regolazione intracellulari articolate e fortemente contesto-dipendenti. (Leestemaker et al., 2017; Njomen et al., 2019; George et al., 2021)

L'inibizione di USP14, l'attivazione di vie cAMP/PKA o cGMP/PKG, la regolazione di Nrf2 e la modulazione della via p38 MAPK mostrano come il potenziamento del 26S possa essere raggiunto senza un legame diretto con il sito catalitico del proteasoma. Tuttavia, proprio questa natura indiretta amplia il rischio di effetti pleiotropici, poiché ciascuna di queste vie controlla anche numerosi altri processi cellulari, inclusi infiammazione, proliferazione, risposta allo stress e metabolismo. (Lee et al., 2011; Leestemaker et al., 2017; George et al., 2021)

In termini traslazionali, la modulazione indiretta del 26S presenta quindi un duplice volto: da un lato offre l'opportunità di sfruttare bersagli farmacologici già noti, anche attraverso strategie di *drug repurposing*; dall'altro richiede una particolare attenzione alla selettività biologica degli effetti osservati. La definizione dei reali siti di intervento e dei meccanismi molecolari responsabili dell'aumento dell'attività proteasomiale rimane pertanto una priorità per il consolidamento di questo approccio terapeutico. (Njomen et al., 2019; George et al., 2021)

4.7 Altre molecole che potenziano l'attività del proteasoma

L'identificazione di piccole molecole in grado di aumentare l'attività del proteasoma 26S è stata frequentemente ottenuta mediante screening ad alto

rendimento (*high-throughput screening*) di librerie contenenti composti farmacologicamente attivi o già approvati per uso clinico. Tale approccio ha evidenziato come numerosi farmaci possano possedere attività biologiche aggiuntive rispetto a quelle per cui sono stati originariamente sviluppati, aprendo la strada a strategie di riposizionamento farmacologico (*drug repurposing*).

Tra i composti identificati mediante queste procedure figurano molecole strutturalmente e farmacologicamente eterogenee, tra cui *proflavina*, *pimozide*, *ciclosporina A*, *DPCPX*, *mifepristone*, *metilbenzetonio*, *loperamide* e *dipiridamolo*. Anche verapamil è stato individuato come modulatore dell'attività proteasomiale; in particolare, il suo R-enantiomero ha mostrato una maggiore capacità di attivazione del proteasoma rispetto alla forma S. Analogamente, il già citato PD169316 è stato identificato tra i composti in grado di aumentare l'attività proteolitica del proteasoma.

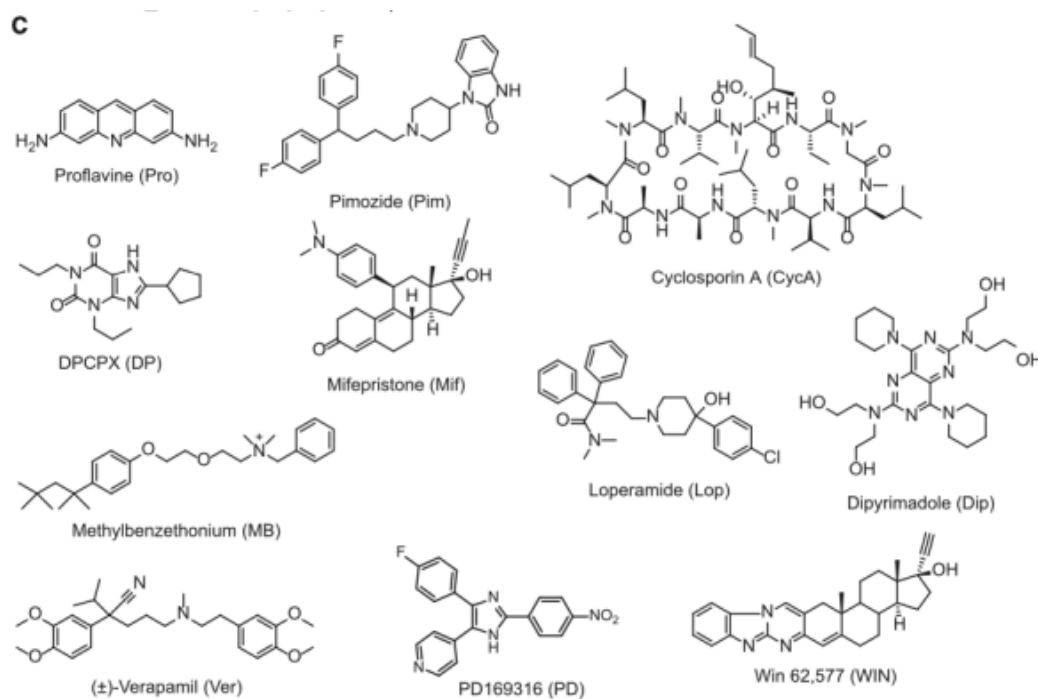


Figura 17. Strutture di composti a piccola molecola in grado di aumentare l'attività del proteasoma. (Leestemaker et al., 2017)

Nonostante il crescente numero di molecole individuate attraverso questi approcci, i meccanismi molecolari responsabili delle loro proprietà attivatrici rimangono,

nella maggior parte dei casi, ancora poco definiti. Una delle principali limitazioni è rappresentata dalla mancanza di conoscenza dettagliata dei siti di legame coinvolti nell'attivazione del proteasoma 20S/26S. L'identificazione dei reali siti di interazione dei cosiddetti “agonisti del 20S” mediante approcci proteomici e strutturali potrebbe consentire lo sviluppo di strategie di drug design assistito da struttura, potenzialmente in grado di superare tali limitazioni. Tuttavia, la complessità strutturale e funzionale del proteasoma rende questo obiettivo particolarmente impegnativo, sebbene altamente rilevante per il progresso del settore. (Leestemaker et al., 2017)

5. SFIDE E CONSIDERAZIONI SULLO SVILUPPO DI NUOVI MODULATORI

5.1 Crosstalk tra proteasoma e autofagia

Come già accennato nei capitoli precedenti, il mantenimento dell'omeostasi proteica dipende dall'azione coordinata della *proteostasis network*, una complessa rete di sistemi deputati al controllo della qualità proteica. Tra questi, il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e l'autofagia rappresentano i principali meccanismi degradativi, strettamente interconnessi e capaci di compensarsi reciprocamente in risposta a differenti condizioni di stress cellulare. L'autofagia viene generalmente attivata come meccanismo compensatorio in risposta a stress cellulari che non possono essere completamente gestiti dal sistema proteasomico. Numerosi studi hanno dimostrato che l'inibizione del proteasoma induce l'attivazione dell'autofagia, mentre, in senso opposto, l'inibizione acuta dell'autofagia può stimolare l'attività proteasomica, sebbene un'inibizione cronica di quest'ultima ne comprometta l'efficienza degradativa.

L'attivazione del proteasoma, a sua volta, può ridurre la necessità di ricorrere alla degradazione autofagica delle proteine, come osservato in modelli sperimentali con proteasomi 20S iperattivi o in seguito a potenziamento dell'attività proteasomica mediante specifiche modulazioni enzimatiche. Tuttavia, la natura di

questa interazione appare altamente dipendente dal tipo di stimolo, dal meccanismo di attivazione del proteasoma e dal contesto cellulare, rendendo l'esito del crosstalk tra i due sistemi difficile da prevedere. Nel complesso, le evidenze disponibili indicano che la modulazione del proteasoma 26S, sia mediante approcci genetici sia farmacologici (come nel caso di USP14), può determinare effetti divergenti sul flusso autofagico, sottolineando la natura complessa e finemente regolata del crosstalk tra i due sistemi degradativi. (Kim et al., 2018; Njomen et al., 2019)

Negli ultimi anni è emerso, tuttavia, che il *crosstalk* tra sistema ubiquitina-proteasoma e autofagia rappresenta soltanto uno degli aspetti della più ampia rete di regolazione della proteostasi cellulare. L'attività del proteasoma è infatti modulata anche da numerose vie di segnalazione intracellulari, tra cui i *pathway* cAMP/PKA, cGMP/PKG, MAPK, la SUMOilazione e il fattore di trascrizione Nrf2, che ne regolano l'assemblaggio, l'espressione delle subunità e l'attività catalitica in risposta a differenti condizioni di stress. L'integrazione tra questi meccanismi consente alla cellula di coordinare in modo dinamico la degradazione proteica e di adattare la risposta proteostatica alle diverse condizioni fisiologiche e patologiche, evidenziando come il proteasoma non operi in maniera isolata, ma costituisca un nodo centrale della *proteostasis network*, in stretta comunicazione con l'autofagia, i sistemi chaperonici e le principali vie di risposta allo stress cellulare. (Desouky et al., 2024)

5.2 Drug repurposing

L'identificazione di attivatori del proteasoma mediante lo screening di librerie di farmaci clinici ha evidenziato il potenziale del *drug repurposing*, o riposizionamento farmaceutico, come strategia per lo sviluppo di nuove applicazioni terapeutiche. Tale approccio si basa sulla rivalutazione di molecole già caratterizzate dal punto di vista farmacologico per impieghi diversi rispetto a quelli originariamente previsti.

Nel contesto della ricerca di agonisti del proteasoma, i composti identificati come *hit* vengono generalmente sottoposti a successive fasi di ottimizzazione strutturale, finalizzate a ridurre o eliminare l'attività sui bersagli farmacologici originari mantenendo la capacità di modulare il proteasoma. Sebbene questa strategia consenta di sfruttare molecole già note per le loro proprietà farmacologiche, il processo di riposizionamento risulta complesso e ha contribuito, almeno in parte, al lento avanzamento nello sviluppo di agonisti del proteasoma efficaci. (Wang et al., 2015; Zhu et al., 2010)

Una delle principali criticità riguarda l'identificazione dei composti attivi attraverso screening di librerie di farmaci clinici, seguita dalla necessità di comprenderne e ottimizzarne l'attività sul nuovo target. Questo processo è ulteriormente complicato dalla presenza di molteplici meccanismi di interazione e dalla complessità strutturale del proteasoma, che rende difficile la caratterizzazione precisa dei siti di legame degli agonisti.

In considerazione di ciò, l'identificazione dei reali siti di interazione mediante approcci proteomici, strutturali e cristallografici potrebbe rappresentare un importante avanzamento, quindi una migliore comprensione delle interazioni tra ligandi e proteasoma consentirebbe l'applicazione di strategie di *structure-based drug design*, favorendo lo sviluppo razionale di nuove molecole con maggiore selettività e potenza.

Nonostante il potenziale di questo approccio, la complessità del sistema e la necessità di bilanciare l'attività sul nuovo target con la perdita o modulazione degli effetti sui bersagli originari ne rallentano significativamente lo sviluppo, rendendo la transizione dai composti *hit* a candidati terapeutici efficaci un processo lungo e non lineare. (Njomen et al., 2019)

5.3 Assenza di saggi standard per la valutazione dell'efficacia

Una rilevante limitazione nello studio degli attivatori del proteasoma riguarda l'assenza di saggi standardizzati e pienamente affidabili per la loro valutazione.

Gli *assay* convenzionali si basano sull'impiego di substrati peptidici specifici per i diversi siti catalitici del proteasoma, coniugati a fluorofori attivati dal taglio proteolitico. Tuttavia, le ridotte dimensioni di tali substrati ne facilitano l'accesso al core catalitico del proteasoma 20S, determinando elevati livelli basali di attività e talvolta variabili.

Questi sistemi presentano inoltre una marcata eterogeneità tra laboratori, dovuta a differenze nei rapporti enzima/substrato, nelle condizioni tampone e nei protocolli sperimentali, compromettendo la riproducibilità e il confronto tra studi indipendenti. Un'ulteriore criticità è rappresentata dall'interferenza di molecole con proprietà simil-detergenti, in grado di aumentare artificialmente l'accessibilità del substrato al core catalitico e generare falsi positivi nei saggi fluorimetrici, senza necessariamente tradursi in attività nei sistemi basati su substrati proteici più complessi e fisiologicamente rilevanti.

Un limite strutturale aggiuntivo deriva dall'impiego di proteasoma purificato e di substrati peptidici riferiti a singoli siti catalitici, che non consente di considerare le interazioni allosteriche tra i diversi siti attivi coinvolti nella degradazione proteica. Ne consegue una possibile mancata identificazione di molecole attive su meccanismi regolatori a monte del proteasoma o su modalità di attivazione non direttamente riconducibili alla singola attività catalitica. (Njomen et al., 2019)

In questo contesto, è stato evidenziato come la natura del reporter influisca in modo determinante sull'identificazione dei veri attivatori del proteasoma 20S. L'utilizzo di piccoli substrati peptidici fluorogenici, sebbene diffuso per sensibilità e semplicità, non riflette pienamente la complessità del processo di degradazione proteica e può contribuire a una sottostima o a una lettura distorta dell'attività di specifiche molecole. Per superare tali limiti, sono stati sviluppati sistemi basati su reporter più complessi e strutturalmente rappresentativi, inclusi saggi FRET, con l'obiettivo di migliorare la capacità discriminante tra veri attivatori del proteasoma e composti che determinano soltanto una modulazione apparente dell'attività proteolitica. (Coleman et al., 2018)

Parallelamente, sono stati proposti approcci alternativi, tra cui saggi biochimici basati su proteine intrinsecamente disordinate, metodi di spettrometria di massa per la riduzione dei falsi positivi e sonde di attività proteasomica per applicazioni cellulari ad alto rendimento. Tuttavia, tali strategie presentano ancora limitazioni legate all'impiego di substrati non pienamente fisiologici, alla ridotta compatibilità con screening ad alto rendimento (*high-throughput screening*) o alla misurazione dell'attività globale del proteasoma piuttosto che della degradazione di specifici substrati patologici. Permane pertanto la necessità di sviluppare saggi più fisiologici, standardizzati e adatti a screening su larga scala. (Njomen et al., 2019)

5.4 Potenziale tossicità degli attivatori del proteasoma

Il potenziamento dell'attività del proteasoma contribuisce a ridurre il carico proteotossico associato all'invecchiamento, migliorando la capacità cellulare di mantenere la proteostasi. Studi condotti in diversi modelli sperimentali, inclusi sistemi cellulari, roditori e cellule umane, hanno evidenziato che un aumento dell'attività proteasomica è associato a un rallentamento dei processi di invecchiamento e a un prolungamento della durata della vita, grazie alla riduzione dell'accumulo di proteine danneggiate e aggregate. Coerentemente, cellule provenienti da individui centenari mostrano livelli più elevati di attività proteasomica rispetto a soggetti adulti. (Chondrogianni et al., 2000; Njomen et al., 2019)

Studi in vitro con esposizioni a breve termine ad agonisti del proteasoma non hanno evidenziato tossicità significativa, mentre gli effetti a lungo termine non sono ancora stati completamente caratterizzati. (Gizynska et al., 2019)

La mancanza di tossicità iniziale potrebbe essere legata ai sistemi cellulari di controllo della qualità proteica, come le chaperonine, che regolano l'accesso dei substrati al proteasoma e ne influenzano la selettività. Inoltre, la degradazione proteasomica dipende anche dalle caratteristiche delle sequenze di inizio delle proteine, suggerendo effetti differenziali tra diversi substrati.

Un aspetto critico riguarda il potenziale ruolo degli attivatori del proteasoma nella tumorigenesi. Sebbene l'inibizione del proteasoma sia una strategia terapeutica consolidata in alcune neoplasie ematologiche, come il mieloma multiplo, un aumento della sua attività potrebbe, in specifici contesti, favorire la progressione tumorale, anche attraverso la modulazione della via Nrf2. Alterazioni di regolatori di questa via, come Keap1 e Pten, sono infatti associate allo sviluppo di tumori polmonari non a piccole cellule. Poiché Nrf2 controlla anche geni coinvolti nella proliferazione cellulare, gli effetti della modulazione del proteasoma sulla cancerogenesi risultano fortemente dipendenti dal contesto biologico e devono essere valutati caso per caso. (Njomen et al., 2019; George et al., 2021)

5.5 Considerazioni conclusive sulle prospettive terapeutiche

Il proteasoma 20S rappresenta un complesso dinamicamente regolato attraverso meccanismi che includono il disassemblaggio del proteasoma 26S, l'associazione con regolatori alternativi, modificazioni post-traduzionali e variazioni della localizzazione subcellulare. Tale plasticità funzionale costituisce una risorsa biologica rilevante, ma anche una sfida per lo sviluppo di strategie farmacologiche selettive. (Ben-Nissan et al., 2014)

Il sistema ubiquitina-proteasoma deve essere considerato come una rete integrata di controllo della proteostasi, in stretta interazione con l'autofagia e le vie di risposta allo stress. Ne deriva che la modulazione del proteasoma produce effetti dipendenti dal contesto cellulare, dallo stato metabolico e dal tipo di tessuto coinvolto. (George et al., 2021; Njomen et al., 2019)

In una prospettiva più ampia, le strategie terapeutiche non si limitano all'attivazione diretta o indiretta del proteasoma, ma includono la modulazione dell'ubiquitinazione e di altre modificazioni post-traduzionali che regolano il destino degradativo dei substrati. Il targeting del proteasoma si configura quindi come parte di una strategia integrata di regolazione della proteostasi cellulare.

Un ulteriore elemento critico riguarda la dimensione temporale del danno neurodegenerativo. L'aggregazione proteica rappresenta verosimilmente l'esito terminale di una cascata che comprende stress ossidativo, alterazioni del folding proteico e progressiva compromissione dei sistemi degradativi. In questo scenario, la modulazione del proteasoma potrebbe risultare più efficace se applicata nelle fasi precoci del processo patologico, prima dell'instaurarsi di danni irreversibili. (Huang et al., 2010)

Di conseguenza, lo sviluppo di modulatori selettivi, la definizione di saggi sperimentali affidabili e la comprensione dell'interazione tra proteasoma, ubiquitinazione, autofagia e risposta infiammatoria rappresentano passaggi fondamentali per la traduzione clinica. Rimane inoltre cruciale stabilire se l'intervento debba essere globale o mirato a specifici sottotipi di proteasoma, substrati o contesti patologici. (López-Otín et al., 2013; George et al., 2021)

Nel complesso, la modulazione del proteasoma non può essere intesa come semplice potenziamento di un sistema degradativo, ma come intervento regolato su un asse centrale della proteostasi. Il suo sviluppo terapeutico richiede un equilibrio tra efficacia, selettività e mantenimento della fisiologia cellulare.

5.5.1 Aspetti farmacocinetici e prospettive di sviluppo clinico

Lo sviluppo di modulatori del proteasoma come potenziali agenti terapeutici richiede che l'efficacia osservata nei modelli sperimentali sia accompagnata da caratteristiche farmacocinetiche e di sicurezza favorevoli. Sebbene numerosi composti abbiano dimostrato la capacità di incrementare l'attività del proteasoma in vitro e, in alcuni casi, in modelli animali, per la maggior parte di essi sono ancora disponibili dati limitati riguardo ad assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione (ADME), nonché alla tossicità a lungo termine. Nel contesto delle malattie neurodegenerative, la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (BBB) rappresenta un requisito essenziale per garantire un'efficace azione terapeutica. Tra i composti descritti, farmaci già approvati come clorpromazina e

fluspirilene presentano il vantaggio di possedere una documentata penetrazione nel sistema nervoso centrale e un profilo farmacocinetico e di sicurezza già consolidato. (George et al., 2021)

Per AM-404 sono invece disponibili dati preclinici che ne descrivono la formazione nel cervello e il profilo farmacocinetico cerebrale, sebbene limitatamente a modelli animali. (Muramatsu et al., 2016)

Al contrario, per molecole sperimentali quali TCH-165, MK-886 e altri attivatori di recente sviluppo le informazioni relative alla distribuzione cerebrale, alle proprietà farmacocinetiche e alla sicurezza risultano ancora limitate. (George et al., 2021)

Anche dal punto di vista della *drug-likeness*, le piccole molecole appaiono generalmente più promettenti rispetto agli agonisti peptidici, grazie a una maggiore stabilità metabolica, a una migliore biodisponibilità e, potenzialmente, a una più favorevole permeabilità cellulare. Tuttavia, per molti dei nuovi modulatori rimangono ancora da definire aspetti fondamentali quali la clearance, le possibili interazioni farmacologiche e gli effetti di una somministrazione cronica, particolarmente rilevanti nel trattamento delle malattie neurodegenerative. Nel complesso, lo stato attuale della ricerca suggerisce che il principale limite allo sviluppo clinico degli attivatori del proteasoma non sia più rappresentato dall'identificazione di nuove molecole attive, bensì dalla loro caratterizzazione farmacologica. I composti ottenuti mediante strategie di drug repurposing presentano il vantaggio di disporre di informazioni consolidate riguardanti farmacocinetica e sicurezza, rendendoli candidati potenzialmente più facilmente trasferibili alla sperimentazione clinica. Al contrario, le nuove molecole progettate specificamente per modulare il proteasoma appaiono spesso più selettive e promettenti dal punto di vista meccanicistico, ma richiedono ancora un'approfondita caratterizzazione preclinica, in particolare per quanto riguarda farmacocinetica, permeabilità della BBB e sicurezza a lungo termine, prima di

poter essere considerate reali candidati terapeutici. (Njomen et al., 2019; Desouky et al., 2024)

5.6 Tabella sinottica comparativa dei modulatori descritti

<i>Composto/ Classe chimica</i>	<i>Target (20S / 26S) & Meccanismo d'Azione</i>	<i>Potenza ed Effetti Catalitici Principali</i>	<i>Selettività del Substrato / Effetti in Modelli Cellulari e Animali</i>	<i>Limiti, Criticità e Problematiche Farmacologic- he</i>
<i>TCH-165 (Imidazoline)</i>	Proteasoma 20S; legame diretto con l'anello α favorendo lo stato <i>open gated</i> . Impedisce l'associazione del 19S RP spostando l'equilibrio verso il 20S libero.	Potente enhancer; attivo a basse concentrazioni (1,5 μ M). Unica piccola molecola con evidenze biofisiche dirette a supporto della sue proprietà di <i>gate-opener</i> .	Promuove la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate (IDPs): α sinucleina, tau, ornitina decarbossilasi, c-Fos. Non influenza proteine strutturate (es. GAPDH).	Rappresenta un attivatore a piccola molecola recente, studiato per superare le limitazioni biologiche dei vecchi attivatori storici.
<i>Clorpromazina</i>	Proteasoma 20S; interagisce con la tasca intersubunitaria $\alpha 1-\alpha 2$ del complesso.	Modula positivamente l'attività. Nativamente agisce come neurolettico antagonista D2, serotoninergico e istaminergico.	Incrementa selettivamente la clearance di IDPs senza modificare in modo significativo il turnover di proteine strutturate.	Presenta limitazioni d'uso clinico per il trattamento neurodegenerativo a causa della sua attività primaria antipsicotica/neurolettica.

<i>Blu di metilene</i>	Proteasoma 20S.	Aumenta sia l'attività <i>chymotrypsin-like</i> (CT-L) che quella <i>trypsin-like</i> (T-L).	Riduce i livelli di β amiloide, riduce la neuroinfiammazione, inibisce la neurodegenerazione da caspasi-6 e migliora apprendimento/memoria in modelli murini. Non modifica in vivo la fosforilazione di tau.	Pur mostrando potenziale nelle patologie neurodegenerative, condivide la necessità di calibrare la selettività biologica.
<i>Acido betullinico</i>	Proteasoma 20S; composto naturale isolato dalla corteccia della betulla (<i>Betula pubescens</i>).	Aumenta selettivamente e l'attività <i>chymotrypsin-like</i> (CT-L) del complesso. Noto storicamente per proprietà antitumorali, antiossidanti e antinfiammatorie.	Induce morte cellulare programmata (apoptosi) in cellule di melanoma umano, neuroblastoma e tumori neuroectodermici.	Fa parte degli attivatori storici naturali che presentano evidenti limitazioni in termini di specificità e applicabilità biologica rispetto alle piccole molecole sintetiche.
<i>Acido ursolico</i>	Proteasoma 20S; condivide la somiglianza strutturale con l'acido betulinico.	Incrementa l'attività CT-L. Agisce mediante un meccanismo d'attivazione differente rispetto all'acido betulinico.	Studiato nell'ambito dei composti naturali capaci di contrastare l'accumulo di proteine aberranti.	Mostra la complessità di modulazione all'interno della stessa classe chimica e le medesime limitazioni biologiche dei triterpeni.

<i>Oleuropeina</i>	Proteasoma 20S; polifenolo estratto dalle foglie e dai frutti dell'olivo (<i>Olea europaea</i>).	Potente induttore dell'attività proteasomiale in vitro.	Stimola le tre attività catalitiche del core 20S; riduce i livelli di ROS, ritarda la senescenza cellulare e prolunga la vita media in fibroblasti umani.	Come per gli altri composti naturali, presenta restrizioni nell'applicazione e farmaceutica rispetto alle molecole sintetiche di recente identificazione.
<i>Cardiolipina</i>	Proteasoma 20S; fosfolipide essenziale della membrana mitocondriale interna.	Potente attivatore; induce un incremento fino a 60 volte dell'attività <i>chymotrypsin-like</i> (CT-L) e fino a 30 volte dell'attività <i>caspase-like</i> (C-L) in cellule di fegato di ratto.	Determina un aumento della Vmax e una diminuzione della Km dell'enzima, mostrando effetto additivo se combinato con l'SDS.	Ha un ruolo storico importante per comprendere i meccanismi di apertura del <i>gate</i> , ma presenta evidenti limiti di specificità e applicabilità biologica reale.
<i>SDS</i>	Proteasoma 20S; modulatore lipidico/ tensioattivo artificiale.	Favorisce l'apertura del <i>gate</i> del complesso e l'accesso dei substrati al <i>core</i> catalitico modificando Vmax e Km.	Utilizzato storicamente nei saggi acellulari in vitro per saggiare la responsività del <i>core</i> latente.	Totalmente ristretto all'ambito sperimentale/ storico; privo di applicabilità terapeutica o specificità biologica.

<i>AM-404 e MK-886</i>	Proteasoma 20S; piccole molecole biologiche identificate recentemente.	Funzionano come stimolatori/attivatori diretti del <i>core</i> enzimatico.	Promuovono la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate (IDPs) in sistemi cellulari complessi.	Richiedono un attento screening per definire l'esatta relazione struttura-attività e i siti precisi di <i>binding</i> .
<i>Derivati 3,4 Diidrochinazolinici</i>	Proteasoma 20S; classe sia naturale che sintetica. Interagiscono con la tasca intersubunitaria $\alpha 1-\alpha 2$.	Modulano positivamente l'attività con particolare riferimento a tutti e tre i siti catalitici del complesso.	Riportato un incremento significativo della degradazione dell' α -sinucleina (proteina chiave nei processi neurodegenerativi).	Rappresentano un valido punto di partenza per lo sviluppo strutturale (SAR), ma non aumentano l'attività del proteasoma 26S.
<i>Fluspirilene</i>	Proteasoma 20S; si lega specificamente alla tasca intersubunitaria $\alpha 2-\alpha 3$ della particella centrale 20S.	Potenzia tutte e tre le attività catalitiche del <i>core</i> (CT-L, T-L e C-L).	Promuove la degradazione delle IDPs, prevenendone l'aggregazione e l'oligomerizzazione.	Identificato tramite <i>drug repurposing</i> come antipsicotico, possiede intrinseche attività terapeutiche collaterali <i>off target</i> .

<i>Acilfluspirilene</i>	Proteasoma 20S; condivide lo stesso sito di legame nella tasca $\alpha 2-\alpha 3$.	Potenzia l'intero set catalitico (CT-L, T-L, C-L). Meccanismo indipendente dal 26S (non altera il <i>turnover</i> delle proteine ubiquitinate).	Accelera la clearance delle IDPs impedendone l'accumulo tossico, isolando l'effetto dal sistema dell'ubiquitina.	Sviluppato per ottimizzare l'azione del fluspirilene riducendo l'impatto antipsicotico, richiede tuttora studi di ottimizzazione farmacocinetica .
<i>Derivati Pirazolonici</i>	Proteasoma 26S e 20S; identificati dal gruppo di Silverman nel 2014.	L'aminofenazione e il nifenazone incrementano fino a circa due volte l'attività del 26S. L'aminofenazione attiva anche il 20S legandosi all'anello α .	Proposti originariamente come agenti terapeutici per il trattamento della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA).	Il meccanismo d'azione molecolare esatto sulle subunità regolatorie del 26S non è ancora stato chiarito del tutto.
<i>PAP1 & Peptidi Hb-Y-X</i>	Proteasoma 20S; mimano il motivo C terminale idrofobico tirosina qualsiasi amminoacido delle subunità ATPasiche del 19S o di PA200.	Si inseriscono nelle tasche intersubunità α inducendo la conformazione aperta (<i>open-gated</i>) in modo indipendente da ATP.	Incrementano la degradazione di proteine mal ripiegate e contrastano l'inibizione del proteasoma indotta da oligomeri proteici tossici nelle proteinopatie.	Notevoli limitazioni come candidati farmaceutici stabili a causa di problemi intrinseci di stabilità metabolica, biodisponibilità e permeabilità cellulare.

<i>Peptidi derivati da Blm10</i>	Proteasoma 20S; ispirati alla regione C-terminale dell'attivatore endogeno Blm10 che possiede un motivo Hb-Y-X-like.	Stabilizzano lo stato aperto del complesso proteasomiale.	Target selettivo per la degradazione indipendente da ubiquitina di proteine non correttamente ripiegate.	Presentano le medesime criticità biologiche dei farmaci peptidici (rapida degradazione/scarsa farmacocinetica).
<i>Rolipram</i>	Proteasoma 26S (Modulazione indiretta); aumenta la via di segnalazione cAMP/PKA.	Promuove la fosforilazione della subunità Rpt6 del complesso regolatorio 19S.	Potenzia la proteolisi mediata dal proteasoma 26S favorendo la degradazione di IDPs e proteine mal ripiegate.	Trattandosi di un'attivazione indiretta, può influenzare anche altri processi cellulari regolati dalla via cAMP/PKA (infiammazione, metabolismo e risposta allo stress).
<i>Cilostazolo</i>	Proteasoma 26S (Via indiretta); incrementa i secondi messaggeri ciclici (cAMP/PKA).	Potenzia l'attività degradativa globale dell'UPS.	Promuove la clearance di proteine strutturate aberranti e IDPs in contesti cellulari complessi.	Condivide il rischio di scarse selettività biologiche sistemiche a causa dell'azione diffusa dei nucleotidi ciclici.

<i>Sildenafil & Tadalafil</i>	Proteasoma 26S (Via indiretta); incrementano i livelli di cGMP attivando la proteina chinasi PKG.	Attivano il sistema proteasomico per via cGMP dipendente.	Studiati come strategie di <i>drug repurposing</i> per potenziare la clearance proteica globale.	I target molecolari precisi nel 26S non includono Rpn6, Rpt3 o Rpt6; il meccanismo esatto rimane in parte da chiarire.
<i>BAY41-2272 & Cinaciguat</i>	Proteasoma 26S (Via indiretta); aumentano la sintesi di cGMP attivando la cascata cGMP/PKG.	Inducono la modulazione positiva dell'attività del complesso proteasomiale.	Valutati per il potenziamento indiretto del turnover proteico cellulare.	Escluso il coinvolgimento diretto di Rpn6, Rpt3 e Rpt6; il loro bersaglio strutturale specifico nell'UPS è ancora sconosciuto.
<i>D3T</i>	Proteasoma 26S e 20S (Manipolazione genetica indiretta); agisce come attivatore della via antiossidante e Nrf2.	Potente induttore dell'espressione genica delle subunità proteasomiche sia del <i>core</i> 20S che del regolatore 19S.	Agisce come antiossidante indiretto, aumentando la sintesi de novo dei complessi proteasomiale Nrf2 dipendenti.	L'attivazione genetica coordinata amplia il rischio di risposte cellulari aspecifiche e di effetti che coinvolgono processi biologici diversi, non limitati all'UPS.

<i>Screening Fenotipico (Hits)</i>	Modulazione del Proteasoma (Identificate tramite screening fenotipico ad alto rendimento)	Strutturalmente e farmacologicamente eterogenee, capaci di potenziare l'attività proteolitica.	Evidenziate come hit capaci di aumentare la clearance proteasomiale in saggi cellulari.	Poiché si tratta di composti sviluppati per altre indicazioni terapeutiche, è necessario chiarire il loro meccanismo d'azione nell'ambito del sistema ubiquitina proteasoma (UPS).
<i>Verapamil</i>	Modulazione dell'attività proteasomiale.	Mostra una forte stereoselettività: il suo R enantiomero possiede una capacità di attivazione nettamente maggiore rispetto all'S enantiomero.	Utilizzato come modello per dimostrare l'importanza della configurazione e tridimensionale nell'interazione con l'UPS.	Richiede la separazione degli effetti cardiaci <i>off target</i> prima di un possibile utilizzo terapeutico mirato alla proteostasi.
<i>PD169316</i>	Proteasoma 26S / 20S; interferisce con la via di segnalazione della p38 MAPK.	Identificato tra i composti in grado di aumentare l'attività proteolitica del proteasoma.	Sfrutta la complessa rete post traduzionale mediata dalle chinasi responsabili della risposta allo stress.	Gli effetti della via MAPK sono altamente contestuali e variabili: a seconda dello stress (es. osmotico), la modulazione può tradursi in attivazione o inibizione.

6. CONCLUSIONI

Il proteasoma rappresenta uno dei principali sistemi deputati al mantenimento dell'omeostasi proteica cellulare e svolge un ruolo essenziale nella rimozione di proteine danneggiate, mal ripiegate o non più necessarie. La sua attività si colloca al centro di una rete complessa di processi che regolano la proteostasi, la risposta allo stress e l'adattamento cellulare all'invecchiamento. Con l'avanzare dell'età, il progressivo declino dell'efficienza proteasomiale contribuisce all'accumulo di proteine aberranti e alla comparsa di stress proteotossico, favorendo la disfunzione cellulare e la comparsa di patologie neurodegenerative. (López-Otín et al., 2013; Saez et al., 2014; Njomen et al., 2019)

Complessivamente, le evidenze analizzate suggeriscono che la modulazione dell'attività proteasomiale rappresenti un ambito di ricerca particolarmente interessante per le patologie caratterizzate da accumulo proteico. In particolare, gli attivatori del proteasoma 20S sembrano offrire la possibilità di favorire la degradazione di proteine intrinsecamente disordinate e specie ossidate senza dipendere necessariamente dall'ubiquitinazione del substrato, mentre i modulatori indiretti del proteasoma 26S consentono di intervenire su vie di regolazione più ampie, che coinvolgono deubiquitinasi, chinasi e fattori di trascrizione. (George et al., 2021; Leestemaker et al., 2017; Njomen et al., 2019)

Negli ultimi anni, e in particolare nel periodo 2022–2026, la ricerca sull'attivazione farmacologica del proteasoma ha compiuto ulteriori progressi grazie all'identificazione di nuovi peptidomimetici ispirati al motivo *Hb-Y-X* e al regolatore *Blm10*, alla scoperta di nuovi meccanismi indiretti di attivazione e allo sviluppo di approcci di progettazione razionale basati sugli studi di relazione struttura-attività (*Structure–Activity Relationship, SAR*). Tali sviluppi hanno contribuito ad ampliare le strategie disponibili per modulare l'attività del proteasoma e confermano il rapido avanzamento della ricerca in questo settore. (Osman et al., 2026; Sahin et al., 2025)

Il crescente interesse nei confronti di questa strategia terapeutica trova riscontro anche nel settore biotecnologico. Nel 2024 è stata fondata *Booster Therapeutics*, azienda dedicata allo sviluppo di una nuova classe di piccole molecole attivatrici del proteasoma 20S per il trattamento di patologie caratterizzate da alterazioni della proteostasi, con particolare attenzione alle malattie neurodegenerative. Contestualmente al lancio dell'azienda è stato annunciato un finanziamento iniziale di 15 milioni di dollari destinato allo sviluppo della piattaforma proprietaria e dell'insieme di candidati terapeutici. Tale iniziativa rappresenta un esempio concreto del crescente interesse del settore biotech verso la modulazione farmacologica del proteasoma e del potenziale traslazionale di questo approccio terapeutico¹².

Tuttavia, il passaggio dal razionale biologico all'applicazione terapeutica resta ancora complesso. L'eterogeneità dei saggi sperimentali, la difficoltà di distinguere tra attivazione diretta e indiretta del proteasoma, il crosstalk con l'autofagia e il rischio di effetti contestuali indesiderati, inclusa una possibile interferenza con processi proliferativi o oncogenici, rappresentano limiti rilevanti allo sviluppo clinico di questi approcci. Ciò rende evidente la necessità di modelli sperimentali più fisiologici, di biomarcatori affidabili e di una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti.

In conclusione, il potenziamento del proteasoma non può ancora essere considerato una strategia terapeutica consolidata, ma rappresenta una prospettiva promettente nel contesto delle malattie proteotossiche. La possibilità di intervenire selettivamente sui meccanismi di degradazione proteica apre prospettive di grande interesse per il trattamento delle proteinopatie neurodegenerative e, più in generale, per il contrasto delle alterazioni della proteostasi associate all'invecchiamento.

¹²*Booster Therapeutics, Booster Therapeutics launches to pioneer new class of proteasome activator medicines for the treatment of a range of complex diseases*, disponibile all'indirizzo: <https://www.boostertx.com/press-releases/booster-therapeutics-launches-to-pioneer-new-class-of-proteasome-activator-medicines-for-the-treatment-of-a-range-of-complex-diseases> (ultimo accesso: 03/07/2026).

Particolarmente rilevante appare la possibilità di sfruttare selettivamente il proteasoma 20S per favorire la rimozione di proteine intrinsecamente disordinate coinvolte nelle proteinopatie neurodegenerative.

In questa prospettiva, ulteriori studi volti a chiarire i meccanismi molecolari dell'attivazione proteasomiale e a validarne l'efficacia nei modelli preclinici saranno determinanti per tradurre tali evidenze sperimentali in future applicazioni terapeutiche. (George et al., 2021; Leestemaker et al., 2017; Njomen et al., 2019)

BIBLIOGRAFIA

1. Alzheimer's Association. 2026 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dement.* 2026;22. <https://doi.org/10.1002/alz.71345>.
2. Baugh, J. M.; Viktorova, E. G.; Pilipenko, E. V. Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination. *J. Mol. Biol.* 2009, 386, 814–827.
3. Bedford, L.; Hay, D.; Devoy, A.; Paine, S.; Powe, D. G.; Seth, R.; Gray, T.; Topham, I.; Fone, K.; Rezvani, N.; Mee, M.; Soane, T.; Layfield, R.; Sheppard, P. W.; Ebendal, T.; Usoskin, D.; Lowe, J.; Mayer, R. J. Depletion of 26S Proteasomes in Mouse Brain Neurons Causes Neurodegeneration and Lewy-like Inclusions Resembling Human Pale Bodies. *J. Neurosci.* 2008, 28, 8189–8198.
4. Best, S. A.; De Souza, D. P.; Kersbergen, A.; Policheni, A. N.; Dayalan, S.; Tull, D.; Rathi, V.; Gray, D. H.; Ritchie, M. E.; McConville, M. J.; Sutherland, K. D. Synergy between the KEAP1/ NRF2 and PI3K Pathways Drives Non-Small-Cell Lung Cancer with an Altered Immune Microenvironment. *Cell Metab.* 2018, 27, 935–943.
5. Ben-Nissan, G.; Sharon, M. Regulating the 20S Proteasome Ubiquitin-Independent Degradation Pathway. *Biomolecules* 2014, 4, 862–884.
6. Booster Therapeutics, *Booster Therapeutics launches to pioneer new class of proteasome activator medicines for the treatment of a range of complex diseases*, disponibile all'indirizzo: <https://www.boostertx.com/press-releases/booster-therapeutics-launches-to-pioneer-new-class-of-proteasome-activator-medicines-for-the-treatment-of-a-range-of-complex-diseases> (ultimo accesso: 03/07/2026).
7. Chen, L.; Brewer, M. D.; Guo, L.; Wang, R.; Jiang, P.; Yang, X. Enhanced Degradation of Misfolded Proteins Promotes Tumorigenesis. *Cell Rep.* 2017, 18, 3143–3154.

8. Chen, X.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Qin, Y.; Yang, X.; Xing, Z.; Shen, Y.; Wu, H.; Qi, Y.; The function of SUMOylation and its crucial roles in the development of neurological diseases, *FASEB J.* 35 (4) (2021) e21510
9. Chondrogianni, N.; Petropoulos, I.; Franceschi, C.; Friguet, B.; Gonos, E. S. Fibroblast Cultures from Healthy Centenarians Have an Active Proteasome. *Exp. Gerontol.* 2000, 35, 721–728.
10. Chuah J.J.Y; Thibaut T.A.; Smith D.M. Minimal mechanistic component of HbYX- dependent proteasome activation that reverses impairment by neurodegenerative- associated oligomers. *Commun Biol.* 2023;6:725.
11. Coleman, R. A.; Trader, D. J. Development and Application of a Sensitive Peptide Reporter to Discover 20S Proteasome Stimulators. *ACS Comb. Sci.* 2018, 20, 269–276.
12. Dal Vechio, F. H.; Cerqueira, F.; Augusto, O.; Lopes, R.; Demasi, M. Peptides That Activate the 20S Proteasome by Gate Opening Increased Oxidized Protein Removal and Reduced Protein Aggregation. *Free Radical Biol. Med.* 2014, 67, 304–313.
13. Desouky, M.A.; Michel, H.E.; Elsherbiny, D.A.; George M.Y. Recent pharmacological insights on abating toxic protein species burden in neurological disorders: Emphasis on 26S proteasome activation. *Life Sciences* 359 (2024) 123206
14. Elsasser, S.; Chandler-Militello, D.; Müller, B.; Hanna, J.; Finley, D. Rad23 and Rpn10 Serve as Alternative Ubiquitin Receptors for the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 26817–26822.
15. Eralles, J.; Coffino, P. Ubiquitin-Independent Proteasomal Degradation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 2014, 1843, 216–221.
16. Etlinger, J. D.; Goldberg, A. L. A Soluble ATP-Dependent Proteolytic System Responsible for the Degradation of Abnormal Proteins in Reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977, 74, 54–58.

17. Fast Stats-Leading Causes of Death. Available online: <https://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm> (accessed on 1st June 2026).
18. Ferreira, S.; Lourenco, M.; Oliveira, M.; DeFelice, F. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 2015, 9, 191.
19. Fiolek, T.J.; Keel, K.L.; Tepe, J.J. Fluspirilene Analogs Activate the 20S Proteasome and Overcome Proteasome Impairment by Intrinsically Disordered Protein Oligomers. *ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 1438–1448.
20. Fiolek, T.J.; Magyar, C.L.; Wall, T.J.; Davies, S.B.; Campbell, M.V.; Savich, C.J.; Tepe, J.J.; Mosey, R.A. Dihydroquinazolines enhance 20S proteasome activity and induce degradation of alpha-synuclein, an intrinsically disordered protein associated with neurodegeneration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021, 36, 127821.
21. Fukuda, I.; Ito, A.; Hirai, G.; Nishimura, S.; Kawasaki, H.; Saitoh, H.; Kimura, K.I.; Sodeoka, M.; Yoshida, M. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate, *Chem. Biol.* 16 (2) (2009) 133–140
22. George, D.E.; Tepe, J.J. Advances in Proteasome Enhancement by Small Molecules. *Biomolecules* 2021, 11, 1789.
23. Gerstmeier, J.; Seegers, J.; Witt, F.; Waltenberger, B.; Temml, V.; Rollinger, J.M.; Stuppner, H.; Koeberle, A.; Schuster, D.; Werz, O. Ginkgolic acid is a multi-target inhibitor of key enzymes in pro-inflammatory lipid mediator biosynthesis, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 797
24. Gizýńska, M.; Witkowska, J.; Karpowicz, P.; Rostankowski, R.; Chocron, E. S.; Pickering, A. M.; Osmulski, P.; Gaczynska, M.; Jankowska, E. Proline- and Arginine-Rich Peptides as Flexible Allosteric Modulators of Human Proteasome Activity. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 359–370.

25. Guo, Q.; Lehmer, C.; Martínez-Sánchez, A.; Rudack, T.; Beck, F.; Hartmann, H.; Pérez-Berlanga, M.; Frottin, F.; Hipp, M.S.; Hartl, F.U.; et al. In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell* 2018, 172, 696–705.e612.
26. Hetz, C.; Glimcher, L. H. Protein Homeostasis Networks in Physiology and Disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011, 23, 123–125.
27. Hong, L.; Huang, H.C.; Jiang, Z.F. Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 2014, 36, 276–282.
28. Huang, L.; Ho, P.; Chen, C.-H. Activation and Inhibition of Proteasomes by Betulinic Acid and Its Derivatives. *FEBS Lett.* 2007, 581, 4955–4959.
29. Huang, Q.; Figueiredo-Pereira, M. E. Ubiquitin/Proteasome Pathway Impairment in Neurodegeneration: Therapeutic Implications. *Apoptosis* 2010, 15, 1292–1311.
30. Husnjak, K.; Elsassner, S.; Zhang, N.; Chen, X.; Randles, L.; Shi, Y.; Hofmann, K.; Walters, K.; Finley, D.; Dikic, I. Proteasome Subunit Rpn13 Is a Novel Ubiquitin Receptor. *Nature* 2008, 453, 481–488.
31. Jang, J.; Wang, Y.; Kim, H.-S.; Lalli, M. A.; Kosik, K. S. Nrf2, a Regulator of the Proteasome, Controls Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2014, 32, 2616–2625.
32. Jones, C. L.; Njomen, E.; Sjögren, B.; Dexheimer, T. S.; Tepe, J. J. Small Molecule Enhancement of 20S Proteasome Activity Targets Intrinsically Disordered Proteins. *ACS Chem. Biol.* 2017, 12, 2240–2247.
33. Kim, E.; Park, S.; Lee, J. H.; Mun, J. Y.; Choi, W. H.; Yun, Y.; Lee, J.; Kim, J. H.; Kang, M.-J.; Lee, M. J. Dual Function of USP14 Deubiquitinase in Cellular Proteasomal Activity and Autophagic Flux. *Cell Rep.* 2018, 24, 732–743.
34. Kraft, C.; Peter, M.; Hofmann, K. Selective Autophagy: Ubiquitin-Mediated Recognition and Beyond. *Nat. Cell Biol.* 2010, 12, 836–841.

35. Krystal, H., Kavalali, E. T. & Monteggia, L. M. Ketamine and rapid antidepressant action: new treatments and novel synaptic signaling mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2023, 49, 41–50.
36. Kwak, M.-K.; Cho, J.-M.; Huang, B.; Shin, S.; Kensler, T. W. Role of Increased Expression of the Proteasome in the Protective Effects of Sulforaphane against Hydrogen Peroxide-Mediated Cytotoxicity in Murine Neuroblastoma Cells. *Free Radical Biol. Med.* 2007, 43, 809–817.
37. Lee, M. J.; Lee, B.-H.; Hanna, J.; King, R. W.; Finley, D. Trimming of Ubiquitin Chains by Proteasome-Associated Deubiquitinating Enzymes. *Mol. Cell. Proteomics* 2011, 10, R110.003871.
38. Leestemaker, Y.; de Jong, A.; Witting, K. F.; Penning, R.; Schuurman, K.; Rodenko, B.; Zaal, E. A.; van de Kooij, B.; Laufer, S.; Heck, A. J. R.; Borst, J.; Scheper, W.; Berkers, C. R.; Ova, H. Proteasome Activation by Small Molecules. *Cell Chem. Biol.* 2017, 24, 725–736.
39. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* 2013, 153, 1194–1217.
40. Lopez Salon, M.; Pasquini, L.; Besio Moreno, M.; Pasquini, J.M.; Soto, E. Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp. Neurol.* 2003, 180, 131–143.
41. Matsuda, N.; Tanaka, K. Does Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System or the Autophagy-Lysosome Pathway Predispose Individuals to Neurodegenerative Disorders such as Parkinson's Disease? *J. Alzheimer's Dis.* 2010, 19, 1–9.
42. McNaught, K.S.P.; Jenner, P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2001, 297, 191–194.
43. McNaught, K.S.P.; Olanow, C.W.; Halliwell, B.; Isacson, O.; Jenner, P. Failure of the ubiquitin–proteasome system in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001, 2, 589–594.

44. Muramatsu, S.; Shiraishi, S.; Miyano, K.; Sudo, Y.; Toda, A.; Mogi, M.; Hara, M.; Yokoyama, A.; Kawasaki, Y.; Taniguchi, M.; Uezono, Y. Metabolism of AM-404 from acetaminophene at human therapeutic dosages in the rat brain. *Anesth Pain Med.* 2016 February; 6(1): e32873.
45. Njomen, E.; Osmulski, P.A.; Jones, C.L.; Gaczynska, M.; Tepe, J.J. Small Molecule Modulation of Proteasome Assembly. *Biochemistry* 2018, 57, 4214–4224.
46. Njomen, E.; Tepe, J.J. Proteasome activation as a new therapeutic approach to target proteotoxic disorders. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 6469–6481.
47. Osman, J.M.; Trader, D.J. Small molecule proteasome activation: comparative structural analysis of known stimulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2026.
48. Parkinson's Disease Foundation, disponibile all'indirizzo: <https://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Statistics> (ultimo accesso: 03/07/2026).
49. Peng, J.; Schwartz, D.; Elias, J.E.; Thoreen, C.C.; Cheng, D.; Marsischky, G.; Roelofs, J.; Finley, D.; Gygi, S.P. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 921–926.
50. Riederer, B.M.; Leuba, G.; Vernay, A.; Riederer, I.M. The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med.* 2011, 236, 268–276.
51. Ruiz de Mena, I.; Mahillo, E.; Arribas, J.; Castaño, J. G. Kinetic Mechanism of Activation by Cardiolipin (Diphosphatidylglycerol) of the Rat Liver Multicatalytic Proteinase. *Biochem. J.* 1993, 296, 93–97.
52. Saez, I.; Vilchez, D. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases. *Curr. Genomics* **2014**, 15, 38–51.
53. Sahin F.; Gunel A.; Atasoy B.T.; Guler U.; Salih B.; Kuzu I.; Taspinar M.; Cinar O.; Kahveci S. Enhancing proteasome activity by NMDAR antagonists

- explains their therapeutic effect in neurodegenerative and mental diseases. *Scientific Reports* 2025, 15:1165
54. Seo, H.; Sonntag, K.C.; Kim, W.; Cattaneo, E.; Isacson, O. Proteasome activator enhances survival of Huntington's disease ^[1]_{SEP}neuronal model cells. *PLoS One* 2007, 2, e238.
 55. Stadtmueller, B. M.; Hill, C. P. Proteasome Activators. *Mol. Cell* 2011, 41, 8–19.
 56. Stewart, M.D.; Ritterhoff, T.; Klevit, R.E.; Brzovic, P.S. E2 enzymes: More than just middle men. *Cell Res.* 2016, 26, 423–440.
 57. Strong, M.J.; Kesavapany, S.; Pant, H.C. The Pathobiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Proteinopathy? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005, 64, 649–664.
 58. Tanaka, K.; Yoshimura, T.; Kumatori, A.; Ichihara, A.; Ikai, A.; Nishigai, M.; Kameyama, K.; Takagi, T. Proteasomes (multi-protease complexes) as 20S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 16209–16217.
 59. Tanaka, K.; Yoshimura, T.; Ichihara, A. Role of substrate in reversible activation of proteasomes (multi-protease complexes) by sodium dodecyl sulfate. *J. Biochem.* 1989, 106, 495–500.
 60. Tiwari, S.; Atluri, V.; Kaushik, A.; Yndart, A.; Nair, M. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 5541–5554.
 61. Trader, D.J.; Simanski, S.; Dickson, P.; Kodadek, T. Establishment of a suite of assays that support the discovery of proteasome stimulators. *Biochim. Biophys. Acta* 2017, 1861, 892–899.
 62. Trippier, P.C.; Zhao, K.T.; Fox, S.G.; Schiefer, I.T.; Benmohamed, R.; Moran, J.; Kirsch, D.R.; Morimoto, R.I.; Silverman, R.B. Proteasome Activation is a Mechanism for Pyrazolone Small Molecules Displaying

- Therapeutic Potential in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *ACS Chem. Neurosci.* 2014, 5, 823–829.
63. Verma, R.; Aravind, L.; Oania, R.; McDonald, W. H.; Yates, J. R.; Koonin, E. V.; Deshaies, R. J. Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science* 2002, 298, 611–615.
 64. Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J. Structure of Ubiquitin Refined at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1987, 194, 531–544.
 65. Vonsattel, J.P.; DiFiglia, M. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998, 57, 369–384.
 66. Wang, C.; Wang, X. The Interplay between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System in Cardiac Proteotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* 2015, 1852, 188–194.
 67. Witkowska, J.; Gizińska, M.; Karpowicz, P.; Sowik, D.; Trepczyk, K.; Hennenberg, F.; Chari, A.; Geldon, A.; Pierzynowska, K.; Gaffke, L.; Wegrzyn, G.; Jankowska, E. Bim10-based compounds add to the knowledge of how allosteric modulators influence human 20S proteasome. *ACS Chem Biol.* 2025; 20:266–280.
 68. Zhou, L.; Flores, J.; Noël, A.; Beauchet, O.; Sjöström, P.J.; Le Blanc, A.C. Methylene blue inhibits Caspase-6 activity, and reverses Caspase-6-induced cognitive impairment and neuroinflammation in aged mice. *Acta Neuropathol. Commun.* 2019, 7, 210.
 69. Zhu, K.; Dunner, K.; McConkey, D. J. Proteasome Inhibitors Activate Autophagy as a Cytoprotective Response in Human Prostate Cancer Cells. *Oncogene* 2010, 29, 451–462. ^[1]_{SEP}

RINGRAZIAMENTI

In primo luogo ringrazio la mia famiglia, per avermi permesso di intraprendere questo percorso, per avermi supportato durante questi anni e soprattutto... per averi sopportato, tutto questo non sarebbe stato possibile senza di voi.

Ringrazio tutti gli amici con cui ho avuto il piacere di condividere questi anni di università, in particolare Fabrizio, Filippo, Oliviero, Eva, Martina e Giorgia.

Fabrizio, a te dedico un ringraziamento speciale, sei sempre stato un amico sincero e leale, praticamente un fratello mancato, sarai sempre nel mio cuore e verrò sicuramente a trovarti nella tua bellissima Alcamo City, promesso.

Ringrazio gli amici che non hanno mai rifiutato uno sdoppio in San Tommy, una Ceres o una Moretti a basso prezzo dal bangladino di fiducia, ovvero Antonio, Gigi, Rafa e Samu.

Ringrazio i miei amici trentini, i miei compagni dei “The Trenteam Skulls” e la Ba, per non avermi mai fatto sentire solo, soprattutto durante i primi anni di università, siete una banda di matti, ma ve voi ben, ricordatevi sempre che “a ciàcere no se ‘n sgionfa done”.

Ringrazio i Sioux dell’A.C. Pavia (quello vero!) per avermi accolto nella loro sede e per avermi fatto sentire uno di loro, ringrazio soprattutto Fabietto (per gli amici: il pelato) per avermi scarrozzato in giro per la lombardia con il pandino blu scassato di sua madre, ogni tanto anche con la sua ford... insieme abbiamo tirato tante frecce (nell’uno triplo...) e bevuto diverse birrette e/o grappini, utilizzando come scusa la nostra passione per le darts.

Infine, ringrazio nuovamente la persona che più mi ha ispirato in questi anni, ovvero mio fratello: sei e sarai sempre un esempio di resilienza e dedizione... però lava la Vulva ogni tanto.

A voi, amici miei, dedico tutto il bene che il mondo vi possa dare e vi auguro il meglio, grazie di cuore e Ad Maiora!

Concludo ringraziando la Prof.ssa Collina, per avermi dato la possibilità di svolgere la tesi con lei e per essere stata una fonte d’ispirazione.