

NGF e immunità

Il fattore di crescita nervoso non è prodotto solo dai neuroni, ma viene sintetizzato anche dalle cellule del sistema endocrino e immunitario, svolgendo un ruolo essenziale nella regolazione della memoria immunitaria e nell'emopoiesi

di Luigi Aloe e Luisa Bracci-Laudiero

L'isolamento del fattore di crescita nervoso, agli inizi degli anni cinquanta, può essere considerato una pietra miliare per le neuroscienze perché ha contribuito alla conoscenza dei meccanismi che regolano il differenziamento di popolazioni neuronali durante l'embriogenesi e il mantenimento del loro fenotipo nello stadio adulto.

L'NGF è stato il primo fattore neurotrofico a essere isolato: inizialmente fu identificato nel sarcoma 180 - un tessuto tumorale connettivale del topo - poi nel veleno di serpente e suc-

cessivamente localizzato e purificato in grandi quantità dalla ghiandola salivare di topo adulto, che rappresenta ancora oggi la maggiore sorgente di estrazione e purificazione dell'NGF. Il motivo per cui in questo tessuto sia presente una sintesi così elevata di NGF non è stato ancora del tutto chiarito. La rimozione delle ghiandole salivari nei topi non porta a una diminuzione sostanziale dei livelli di NGF nel sangue, indicando così che anche altri tessuti sono in grado di produrre quantità fisiologicamente rilevanti di NGF. Di recente è stato dimostrato

che l'NGF è sintetizzato non solo dalle cellule del sistema nervoso ma anche dalle cellule appartenenti ai sistemi endocrino e immunitario. Una possibile funzione dell'NGF salivare è stata suggerita da ricerche condotte in collaborazione con Enrico Alleva dell'Istituto superiore di Sanità che indicano un ruolo funzionale dell'NGF durante specifici comportamenti aggressivi.

L'NGF è un dimero costituito da due subunità identiche tenute insieme da legami non covalenti e ha un peso molecolare complessivo di 26 000 dalton circa. L'analisi della sequenza am-

A una protagonista della ricerca scientifica

Circa un anno fa ci siamo chiesti come festeggiare il novantesimo compleanno della professoressa Rita Levi-Montalcini nel modo più semplice e piacevole possibile. Abbiamo scartato l'idea di organizzare un simposio invitando studiosi italiani e stranieri di chiara fama per non ripetere cose che in passato sono state fatte da altri, e si è invece deciso di chiedere alla rivista «Le Scienze» di pubblicare una breve raccolta di testimonianze scientifiche di ricercatori italiani che sono stati negli anni a stretto contatto con Rita Levi-Montalcini e hanno vissuto sia da un punto di vista scientifico sia da un punto di vista umano l'esperienza della crescita di una «scuola italiana dell'NGF» attorno al suo prestigio.

Il fattore di crescita delle cellule nervose (NGF) è stato individuato quasi 50 anni or sono da Rita Levi-Montalcini per le sue proprietà di promuovere la crescita e la differenziazione di alcune specifiche popolazioni di cellule neuronali. Una larga parte della ricerca in neurobiologia e in neuroscienze vive degli echi di quella scoperta, e l'aneddotica di quella straordinaria vicenda scientifica e umana fa parte della storia della scienza.

Come racconta Rita Levi-Montalcini nella prefazione al libro che raccoglie i suoi lavori fondamentali, *The Saga of the Nerve Growth Factor* (World Scientific, Singapore, 1997), quella sull'NGF assomiglia più a un'indagine poliziesca che a una classica ricerca scientifica, e ciascun capitolo della storia apre nuove prospettive scientifiche. Forte del suo rigore sperimentale e della sua libertà di pensiero, la Levi-

-Montalcini osserva, e non esita a descrivere e interpretare nel corso degli anni, una serie di fenomeni in aperto contrasto con «l'opinione scientifica corrente». Con i suoi primi studi, rivoluziona l'idea del tempo sui processi fondamentali dell'embriogenesi del sistema nervoso. Riconosce la morte di una grande percentuale di neuroni motori e sensitivi nel corso dello sviluppo embrionale come parte integrante della differenziazione del sistema nervoso, legata alla privazione del bersaglio di questi neuroni, anticipando il significato biologico dell'apoptosi, e descrive mirabilmente il processo di migrazione dallo strato germinale dei ventricoli cerebrali, fenomeno al tempo sconosciuto. E l'ipotesi, prima che la scoperta, dell'esistenza dell'NGF viene formulata perché la Levi-Montalcini supera una teoria scientifica da lei stessa proposta: l'impressionante crescita di fibre nervose da un espianto di ganglio simpatico in presenza di tumore non è legata alle aumentate dimensioni del bersaglio, ma a un «fattore» rilasciato dal tumore stesso.

Grazie al suo straordinario carisma scientifico e umano, Rita Levi-Montalcini convince il biochimico Stanley Cohen a occuparsi di quello che oggi verrebbe indicato come un «progetto ad alto rischio»: in altri termini, quasi una follia. Ma la strada è quella giusta: l'NGF viene isolato, caratterizzato, vengono prodotti gli anticorpi. Il tessuto nervoso sia periferico sia centrale è riconosciuto capace di fenomeni plastici e riparativi, si muove, cambia forma, esistono molecole che controllano tutto questo. La sopravvivenza non solo



Un ganglio nervoso simpatico, isolato da un embrione di pollo, emette un alone di fibre nervose quando viene incubato per 12 ore in presenza di fattore di crescita nervoso (NGF). La scoperta di questo fenomeno, fatta nel 1953 da Rita Levi-Montalcini, ha consentito l'isolamento e la determinazione della struttura chimica dell'NGF e ha aperto la strada a un'ampia gamma di ricerche di base e applicate. La foto è tratta dall'articolo che Rita Levi-Montalcini e Pietro Calissano pubblicarono sul n. 132, agosto 1979, di «Le Scienze». (Fonte della figura: J. S. Chen / Laboratorio di biologia cellulare del CNR, Roma.)

minoacidica dell'NGF ha rivelato un elevato grado di omologia tra specie differenti, e la struttura di questa proteina risulta ben conservata durante l'evoluzione. La caratterizzazione dell'NGF ha successivamente facilitato l'identificazione e l'isolamento negli anni ottanta di molecole con struttura e funzioni molto simili a quelle dell'NGF, quali il *brain derived neurotrophic factor* e le neurotrofine 3 e 5. Questi fattori neurotrofici, ormai ben caratterizzati da un punto di vista biochimico e molecolare, costituiscono una vera e propria famiglia di moleco-

dei neuroni simpatici e sensitivi, ma anche dei neuroni colinergici coinvolti nelle funzioni cognitive superiori, dipende dalla disponibilità di NGF. Si scoprono altri fattori di crescita simili a esso: sono ormai una famiglia, quella delle neurotrofine, alle quali si affianca un'intera altra famiglia di recettori a bassa e ad alta affinità per l'NGF e per le altre neurotrofine, straordinaria per complessità strutturale e funzionale. Si cominciano a comprendere i meccanismi intracellulari regolati dall'NGF, ormai riconosciuto come un fattore di trascrizione; si immagina di poter controllare per via molecolare l'attivazione e la disattivazione dei programmi genici che controllano la sopravvivenza e la morte della cellula. Attraverso l'NGF si arriva ad altre scoperte insignite del Nobel, quali quella degli *early-activated gene*.

Se, per circa mezzo secolo, la scoperta dell'NGF ha rappresentato una pietra miliare per lo studio del sistema nervoso periferico e centrale dei mammiferi, si sa oggi che questo fattore svolge la propria attività anche su cellule del sistema endocrino e immunitario. Studi più recenti condotti nell'ambito di questa scuola hanno messo in evidenza che il fattore è coinvolto in patologie di natura immunitaria, autoimmunitaria ed endocrina oltre che nervosa. La disponibilità di adeguate quantità di NGF purificato ha offerto uno strumento estremamente valido per studiare lo spettro di azione e i meccanismi che regolano molti importanti processi fisiopatologici in diversi tipi cellulari. La sua produzione con tecnologie di ingegneria genetica ha consentito di iniziare a verificare la possibilità di un uso preclinico e clinico per patologie umane. L'NGF è già stato utilizzato con risultati sorprendenti in patologie della cornea umana e presto potrebbe essere impiegato per curare anche alcune forme di neuropatie periferiche e centrali.

Oggi la ricerca scientifica cerca modelli sperimentali sempre più sofisticati. Di questa «scienza diversa» tante volte parliamo con Rita Levi-Montalcini, commentando un nuovo modello di animale transgenico o i risvolti etici di una nuova clonazione, discutendo un passaggio in un protocollo sperimentale o l'interpretazione di un dato.

Gli autori di questi brevi articoli, pur utilizzando tutti i più moderni approcci offerti dalla biologia molecolare, rimangono fedeli all'impostazione naturalistica e olistica di Rita Levi-Montalcini, e qui raccontano alcuni dei risultati raggiunti, sia nella ricerca di base sia nella clinica. Questi risultati sono la dimostrazione della competenza e della tenacia di ciascun ricercatore e sono il risultato di strette collaborazioni con altri gruppi e realtà scientifiche italiane e straniere. I temi sperimentali affrontati esplorano le nuove frontiere dell'NGF: il suo ruolo nelle patologie di natura immunitaria, autoimmunitaria e nelle neuropatie associate a disturbi di natura cognitiva, i meccanismi molecolari che regolano la sintesi endogena della molecola NGF.

Noi tutti ci auguriamo che vi siano, oltre alla nostra, molte e diverse iniziative per festeggiare il novantesimo compleanno di Rita Levi-Montalcini, definita da un noto neurobiologo - A. D. Smith su «Neuroscience», 1986 - «uno dei maggiori protagonisti dei più gloriosi episodi della storia moderna delle neuroscienze».

Da noi un grazie sincero per averci dato il privilegio di lavorare con lei, di apprendere da lei il valore del libero pensiero e del coraggio delle proprie idee. Tantissimi auguri non solo per la passata e presente, ma anche per la sua futura attività scientifica che ci auguriamo voglia continuare a dividere con noi.

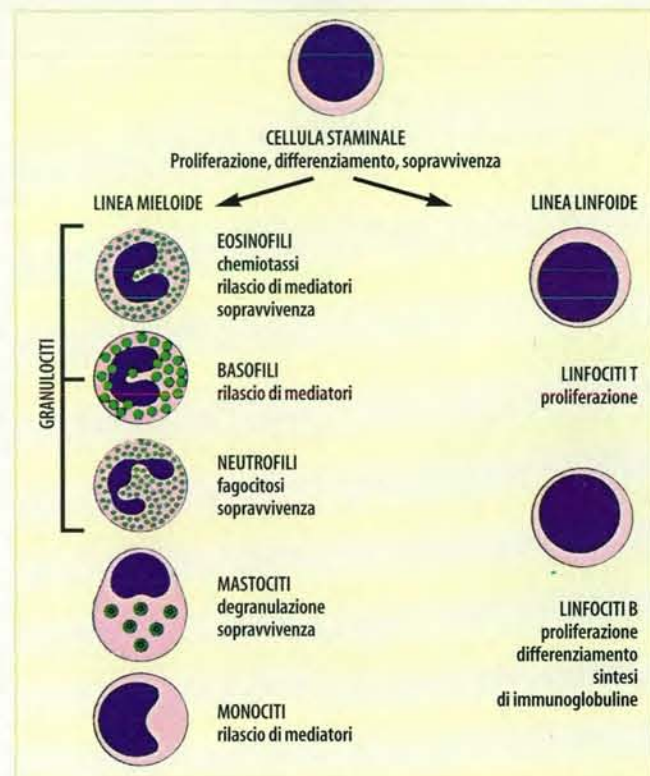
LUIGI ALOE E LAURA CALZA

le denominate neurotrofine.

L'azione biologica dell'NGF è mediata dal suo legame a due classi di recettori localizzati sulla membrana plasmatica: p75, conosciuto come recettore a bassa affinità, che si lega anche alle altre neurotrofine, e TrkA, una glicoproteina di membrana di 140 chilodalton con attività di tirosinasi. Il modo in cui i due recettori dell'NGF interagiscono tra loro e come la loro associazione possa regolare l'attività biologica dell'NGF nelle cellule che rispondono alla sua azione è al momento al centro di numerosi studi.

Le applicazioni cliniche dell'NGF

In questi ultimi anni l'interesse per l'NGF sia nella ricerca clinica sia in quella di base è ulteriormente aumentato poiché numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'importanza dell'NGF nel prevenire il danno neuronale di natura chirurgica, chimica, meccanica e ischemica. Questi risultati rendono l'NGF un probabile



In questa tabella sono state rappresentate in modo schematico le cellule del sistema immunitario che sono sensibili all'azione dell'NGF e alcune delle ipotesi che possono spiegare l'attività dell'NGF su queste cellule.

candidato per la terapia di numerose patologie del sistema nervoso centrale e periferico. Già da qualche anno sono state effettuate sperimentazioni cliniche su pazienti affetti da morbo di Parkinson e di Alzheimer. In un recente simposio sull'NGF è stato annunciato l'inizio di uno studio multicentrico per la sua utilizzazione terapeutica nelle neuropatie periferiche indotte da diabete, lebbra, traumi chirurgici e AIDS.

Inoltre studi condotti nel nostro Istituto, in collaborazione con la Divisione di oftalmologia dell'Ospedale SS. Giovanni e Paolo di Venezia, hanno messo in luce l'importanza clinica dell'NGF in una patologia oculare, l'ulcera corneale neurotrofica. Si è osservato che l'applicazione topica di NGF è in grado di migliorare rapidamente la lesione, fino ad arrivare alla completa guarigione della cornea.

Negli ultimi 20 anni un gran numero di dati sperimentali ha dimostrato come l'NGF agisca non solo su cellule del sistema nervoso, ma anche su cellule del sistema immunitario,

svolgendo un'azione nei processi differenziali e nella sopravvivenza di specifiche popolazioni cellulari. Lo scopo di questa breve rassegna è quello di descrivere gli studi recenti, condotti nel nostro e in altri laboratori, sul ruolo dell'NGF nel sistema immunitario.

Azione dell'NGF su cellule del sistema immunitario

I primi dati che indicano un'azione dell'NGF su cellule del sistema immunitario risalgono al 1977, quando si è osservato che la somministrazione di NGF in ratti neonati determina, in diversi tessuti, un aumento notevole del numero di mastociti, cellule che hanno grande rilevanza nei fenomeni di natura allergica e infiammatoria. I mastociti, localizzati nelle mucose e nel connettivo e presenti in modo ubiquitario nell'organismo, in risposta a specifici stimoli degranulano, rilasciando così all'esterno le sostanze preformate contenute in granuli nel loro citoplasma. Entrambi i recettori per l'NGF sono stati localizzati sulla membrana plasmatica di mastociti di topo e umani, e studi *in vitro* hanno evidenziato come l'aggiunta di NGF alle colture induca la degranolazione di queste cellule e stimoli la sintesi e il rilascio di mediatori chimici.

I mastociti non sono le uniche cellule responsabili della risposta immunitaria

innata a esprimere i recettori per l'NGF: questi sono stati osservati anche su monociti/macrofagi, eosinofili, basofili e neutrofili. Da molti studi *in vitro* è emerso che l'NGF ha un'azione chemiotattica su granulociti e monociti, stimolando sia i processi di fagocitosi sia il rilascio di mediatori chimici, tutte fasi fondamentali della risposta innata. Anche i linfociti T e B esprimono recettori per l'NGF, e l'aggiunta di NGF a colture di linfociti induce la proliferazione e stimola il differenziamento dei linfociti B in plasmacelle, cioè in cellule che sintetizzano e rilasciano attivamente immunoglobuline.

Una conferma dell'importanza dell'NGF nella regolazione della risposta immune viene dalla scoperta che alcune cellule immunitarie, come mastociti, eosinofili e linfociti, non solo utilizzano l'NGF, ma sono esse stesse in grado di produrlo.

Studi *in vitro* e *in vivo* condotti nel nostro Istituto, in collaborazione con il gruppo di Enrico Garaci dell'Università di Roma «Tor Vergata», hanno inoltre dimostrato che la sintesi endogena di NGF è essenziale per la sopravvivenza dei linfociti B, e in particolare per le cellule coinvolte nel mantenimento della memoria immunitaria.

Ma che cos'è la memoria immunitaria? Quando l'organismo entra in contatto con un agente patogeno e si amala, i linfociti B producono anticorpi

contro quello specifico agente patogeno. Una volta scomparsa l'infezione, solo alcuni tra i linfociti B che hanno riconosciuto l'antigene estraneo sopravvivono e questi linfociti, definiti della memoria, sono pronti a produrre di nuovo anticorpi contro quel particolare agente patogeno nel caso rientrasse nell'organismo. Attraverso questo meccanismo, l'organismo produce gli anticorpi specifici ed è in grado di ridurre o impedire una nuova infezione: sviluppa così quella che viene definita memoria immunitaria.

Anche se l'esistenza della memoria immunitaria è nota dai tempi di Pasteur e Jenner, e su questo principio si basano i vaccini, molti dei meccanismi molecolari e i mediatori biologici che ne sono alla base non sono stati ancora completamente identificati. Con i nostri studi siamo riusciti a dimostrare che l'NGF è coinvolto nei meccanismi di sopravvivenza delle cellule B e concorre a mantenere in vita le cellule della memoria immunitaria. Abbiamo infatti evidenziato che la necessaria quantità di NGF è prodotta dagli stessi linfociti B e che, inibendone l'utilizzo con anticorpi anti-NGF, i linfociti B della memoria vanno incontro a morte, provocando così la scomparsa della memoria immunitaria.

La nostra ricerca ha dimostrato che la somministrazione, tra la prima e la seconda stimolazione antigenica, di

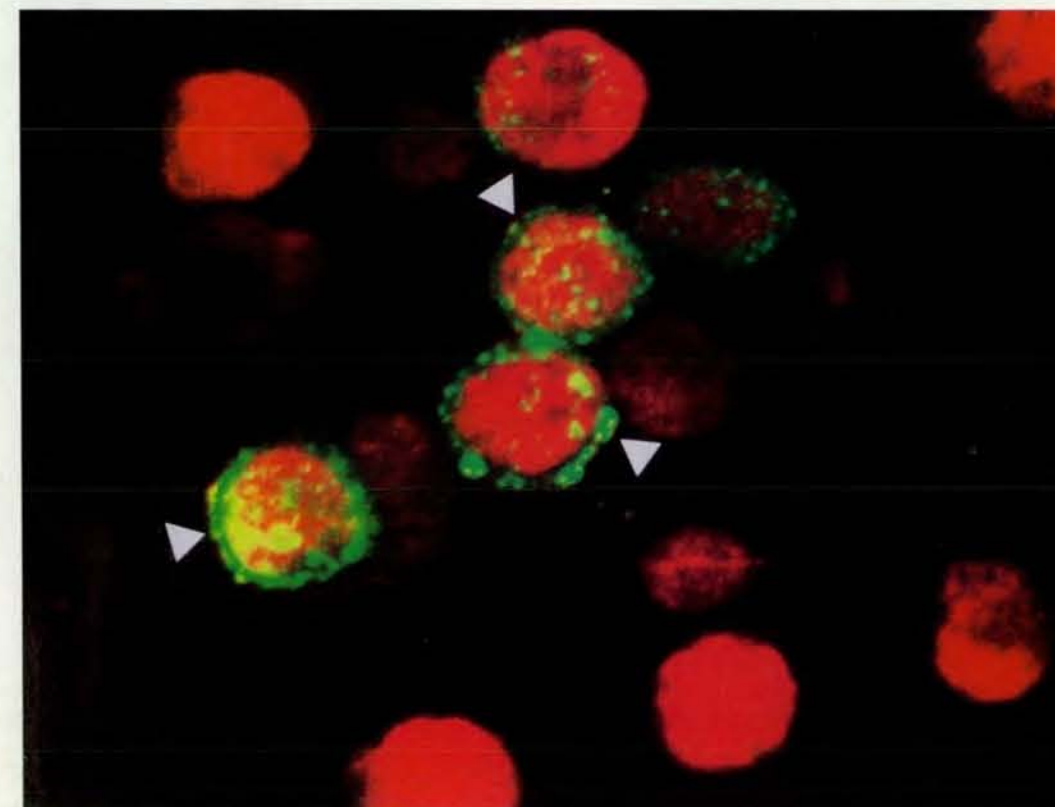
Ritratto di Rita Levi-Montalcini

Nata il 22 aprile 1909 a Torino, si laurea in medicina e chirurgia nell'Università di quella città nel 1936. Dopo una breve esperienza come assistente presso la Clinica neuropsichiatrica e il trasferimento in Belgio a seguito della promulgazione delle leggi razziali contro gli ebrei, si trasferisce negli Stati Uniti presso la Washington University, a Saint Louis. Nei primi anni cinquanta individua e poi caratterizza la molecola NGF, scoperta che le vale il conferimento del premio Nobel per la fisiologia o la medicina nel 1987. Nel 1969 crea e dirige l'Istituto di biologia cellulare del CNR a Roma.

Prestigiose università italiane e straniere le hanno conferito la laurea *honoris causa*; è stata presidente della Enciclopedia Treccani. Da alcuni anni ha creato e finanziato la Fondazione Rita e Paola Levi-Montalcini, con lo scopo di aiutare i giovani nell'orientamento professionale.



F. Fiori/Teamy/Grazia Neri



La microfotografia a lato mostra alcuni linfociti di sangue periferico umano marcati con un anticorpo specifico anti-TrkA e analizzati al microscopio confocale. (TrkA è il recettore dell'NGF.) Il nucleo dei linfociti appare rosso per la colorazione con ioduro di propidio, che si lega al DNA, mentre alcuni linfociti mostrano sulla superficie una fluorescenza verde diffusa che indica il legame specifico tra l'anticorpo fluoresceinato e il TrkA espresso sulla membrana plasmatica dei linfociti. Le colorazioni e la microfotografia sono state eseguite da Eliana Vigneti dell'Istituto di biologia cellulare del CNR.

anticorpi anti-NGF, capaci di neutralizzare l'NGF endogeno, induce la morte delle cellule B della memoria, determinando una significativa riduzione nella produzione degli anticorpi specifici per quell'antigene, e quindi una risposta secondaria alterata.

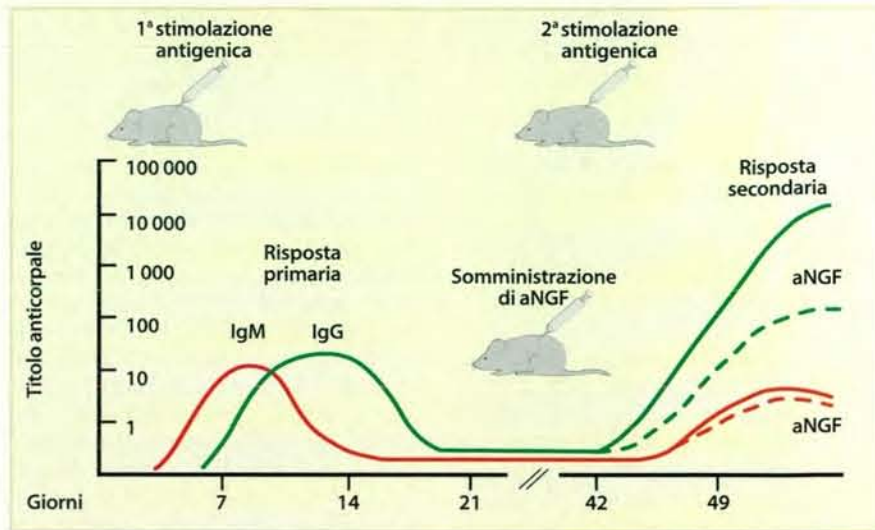
Questo studio suggerisce che l'NGF sia coinvolto nei meccanismi che preservano l'informazione biochimica delle stimolazioni antigeniche precedenti. È sorprendente come in due sistemi completamente diversi, quali il sistema nervoso e quello immunitario, l'NGF possa essere coinvolto nei processi di memoria. Quale correlazione possa esistere tra questi meccanismi che interessano cellule completamente diverse non è noto, ma è certamente importante approfondirla da un punto di vista funzionale e molecolare.

Una delle implicazioni che emergono dall'analisi dei dati ottenuti sull'NGF e le cellule del sistema immunitario è che una più ampia conoscenza del ruolo dell'NGF nella risposta immunitaria in genere, e nella regolazione della memoria immunitaria in particolare, potrebbe essere importante per avere una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici alla base delle malattie immunitarie e autoimmunitarie. Il fatto che i livelli basali di NGF vadano incontro a significative variazioni durante l'evoluzione di alcune patologie autoimmuni avvalorano questa ipotesi.

NGF e sviluppo emopoietico

L'ipotesi di un ruolo funzionale dell'NGF nei processi differenziativi del sistema immunitario nasce dalla scoperta che nei mammiferi (uomo incluso) e negli uccelli esiste un'espressione di NGF e dei suoi recettori nei diversi organi linfopoietici primari (midollo osseo, borsa di Fabrizio, timo) e secondari (milza, tonsille, linfonodi) durante lo sviluppo embrionale e nello stadio adulto. In particolare, possiedono recettori per l'NGF le cellule stromali del midollo osseo, così come le cellule epiteliali del timo, entrambe molto importanti per la creazione del corretto microambiente in cui i precursori e i timociti dovranno differenziarsi.

Recenti studi svolti nel nostro Istituto hanno dimostrato che nel timo l'espressione dei recettori per l'NGF, così come quella dell'NGF, varia durante lo sviluppo pre- e postnatale, ed è massima nei primi giorni di vita per poi diminuire durante l'accrescimento fino a scomparire nell'adulto. Nella borsa di Fabrizio, invece, l'espressione dei recet-



L'NGF è coinvolto nei meccanismi di sopravvivenza dei linfociti B e concorre a mantenere in vita le cellule della memoria immunitaria. In genere, uno stimolo antigenico secondario induce una rapida produzione di anticorpi, principalmente immunoglobuline G (IgG), che si manifesta sotto forma di un titolo ematico elevato. Se però, prima della seconda stimolazione antigenica, si somministrano anticorpi anti-NGF (aNGF), capaci di neutralizzare l'NGF endogeno, si provoca la morte dei linfociti B della memoria e si osserva una riduzione del titolo anticorpale, nonché una specifica diminuzione della concentrazione di IgG.

se del normale. L'aggiunta di NGF a colture di precursori emopoietici ottenuti da midollo osseo umano o da sangue periferico aumenta il numero di colonie che si formano su un substrato di metilcellulosa, inducendo in particolare il differenziamento di eosinofili e basofili. L'NGF agisce anche sulle cellule di milza prelevate durante lo sviluppo embrionale, promuovendone il differenziamento in mastociti.

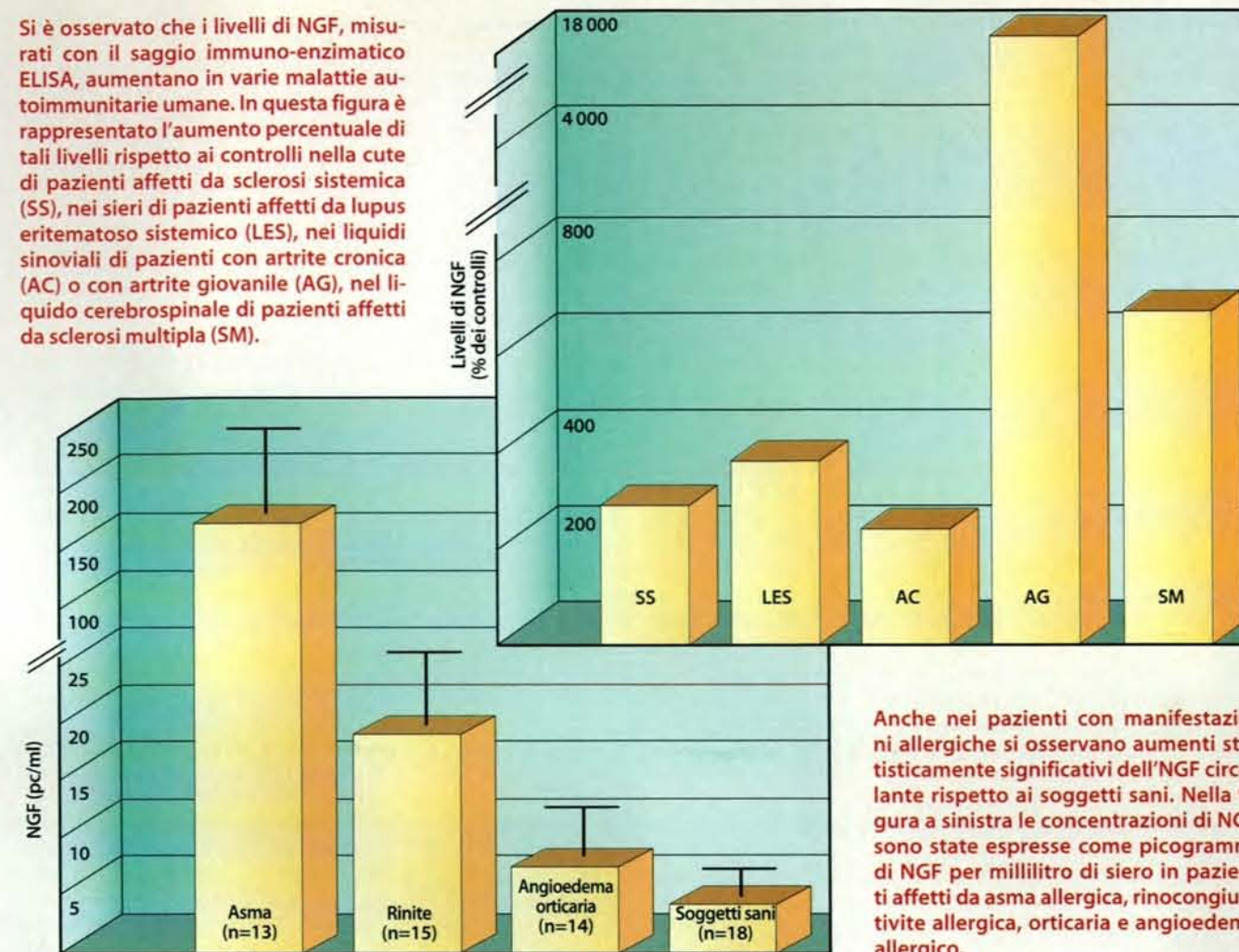
NGF e patologie di natura immune e autoimmune

Normalmente l'infiammazione è una risposta ben localizzata che protegge l'organismo dall'aggressione di agenti patogeni. Questo meccanismo di difesa è caratterizzato dall'accumulo e dall'attivazione dei leucociti e, come è stato evidenziato da studi svolti nel nostro e in altri laboratori, nei tessuti interessati da tale risposta si osserva un aumento di NGF. Responsabili dell'accumulo di NGF sono probabilmente sia mastociti, granulociti e macrofagi attivati sia altri tipi cellulari. Numerosi studi *in vitro* hanno infatti dimostrato come alcune citochine che regolano il processo infiammatorio (IL-1 β , TNF α , IL-6) inducano la sintesi di NGF in cellule non immunitarie, come fibroblasti, cheratinociti e cellule della glia.

Poiché l'NGF è prodotto nel sito di infiammazione, è stato ipotizzato che questa proteina possa specificamente favorire tale risposta dei tessuti. In realtà, i dati fin qui ottenuti non sembrano avvalorare l'ipotesi poiché la somministrazione di elevate quantità di NGF purificato nelle cavità articolari di roditori non induce alcun fenomeno infiammatorio.

I meccanismi che stimolano la sinte-

Si è osservato che i livelli di NGF, misurati con il saggio immuno-enzimatico ELISA, aumentano in varie malattie autoimmunitarie umane. In questa figura è rappresentato l'aumento percentuale di tali livelli rispetto ai controlli nella cute di pazienti affetti da sclerosi sistemica (SS), nei sieri di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES), nei liquidi sinoviali di pazienti con artrite cronica (AC) o con artrite giovanile (AG), nel liquido cerebrospinale di pazienti affetti da sclerosi multipla (SM).



Anche nei pazienti con manifestazioni allergiche si osservano aumenti statisticamente significativi dell'NGF circolante rispetto ai soggetti sani. Nella figura a sinistra le concentrazioni di NGF sono state espresse come picogrammi di NGF per millilitro di siero in pazienti affetti da asma allergica, rinocongiuntivite allergica, orticaria e angioedema allergico.

si di NGF e il modo in cui questa proteina interviene nella modulazione del processo infiammatorio sono oggi oggetto di vari studi. Recentemente Rita Levi-Montalcini ha ipotizzato un ruolo di «molecola sentinella» per l'NGF: in condizioni fisiologiche la sintesi di NGF determina un'attivazione delle cellule immunitarie che si preparano a rispondere più tempestivamente alle aggressioni provenienti dall'esterno.

È noto che l'alterazione dei meccanismi di regolazione della risposta immunitaria compromette il normale funzionamento dell'organismo e può portare a lesioni tissutali. Nelle patologie autoimmuni questa regolazione è compromessa e l'organismo addirittura non riconosce più alcuni antigeni endogeni come propri ma come estranei, inducendo così una elevata sintesi di auto-anticorpi. Per alcune di queste malattie abbiamo dimostrato che nel siero dei pazienti e nei tessuti lesi esiste un aumento dei livelli di NGF che sembra essere correlato all'intensità del fenomeno infiammatorio.

Lo studio dei livelli di NGF nel liqui-

do cerebrospinale di pazienti affetti da sclerosi multipla ha evidenziato che, durante la fase acuta della malattia, nel liquor è presente una concentrazione elevata di NGF, che diminuisce poi nella fase di remissione. La sclerosi multipla è una patologia neurodegenerativa del sistema nervoso centrale su base autoimmune, caratterizzata dalla distruzione degli oligodendrociti, le cellule che formano il rivestimento protettivo dell'assone e consentono la trasmissione ottimale dell'impulso lungo le fibre nervose. Nei modelli animali di questa patologia abbiamo osservato una sintesi aumentata di NGF durante la fase acuta della malattia. Poiché numerosi dati *in vitro* hanno dimostrato che l'NGF promuove la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza degli oligodendrociti, si può ipotizzare che l'aumento locale di NGF riduca la degenerazione degli oligodendrociti e il danno alle cellule neuronali. È possibile quindi che l'aumento di NGF nel sito di infiammazione non sia importante solo per la regolazione della risposta immunitaria, ma

possa avere un ruolo protettivo nei confronti di alcuni tipi cellulari.

Un'ulteriore conferma a questa ipotesi ci viene da studi sul danno assonale nel nervo sciatico. Negli esperimenti in cui il nervo è lesionato o trapiantato è stato dimostrato che il rilascio di IL-1 β da parte dei macrofagi presenti nel sito di infiammazione, che induce la sintesi di NGF nelle cellule di Schwann, contribuisce a far sopravvivere il neurone e induce l'emissione di nuovi prolungamenti, favorendo la rigenerazione. Dati sperimentali ottenuti nel nostro laboratorio da studi sull'ipertensione oculare, e più recentemente sull'infiammazione della cornea, suggeriscono ulteriormente come l'aumento transitorio dell'NGF nel sito di lesione possa contribuire a proteggere le cellule dal danno.

Studi condotti *in vivo* e *in vitro* in diversi centri di ricerca, tra cui il nostro, hanno dimostrato come i mastociti, le cellule coinvolte nella risposta allergica, producano e rilascino quantità rilevanti di NGF. Per diversi anni la funzione dell'NGF prodotto dai ma-

stociti e il meccanismo che ne modula il rilascio sono rimasti in gran parte sconosciuti. Recentemente nel nostro Istituto si è osservato che l'NGF si accumula nel derma di pazienti affetti da sclerodermia sistemica e aumenta nel plasma di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico e nei tessuti di pazienti affetti da cheratocongiuntiviti di natura allergica. Queste e altre osservazioni ci hanno spinto a indagare se durante le crisi allergiche o asmatiche di pazienti atopici la quantità basale di NGF potesse variare. I risultati di questi studi, condotti in collaborazione con Sergio Bonini del Dipartimento di allergologia e di immunologia clinica della II Università di Napoli, hanno chiaramente indicato come l'NGF aumenti in soggetti affetti da allergia. In particolare abbiamo osservato che, nell'asma e nella rinocongiuntivite allergica, la quantità di NGF rilasciata è associata a una maggiore quantità di immunoglobuline di tipo IgE in circolo. La degranolazione dei mastociti mediata dall'IgE può essere responsabile dell'aumento dei livelli basali di NGF nel siero. Chiarire i meccanismi che regolano la sintesi di NGF in questo tipo di risposta immunitaria è estremamente importante. Indipendentemente dal suo ruolo patogenetico, l'aumento serico di questa proteina può avere un potenziale significato clinico nel valutare la gravità del fenomeno allergico. Infatti mentre il dosaggio di altri mediatori chimici rilasciati dai mastociti (istamina) presenta difficoltà tecniche, la presenza di NGF nel siero può essere utilizzata come marcatore dello stato allergico.

Dati acquisiti e prospettive

Dalle prime osservazioni fatte nel nostro Istituto sull'azione dell'NGF sui mastociti, moltissimi altri effetti dell'NGF sul sistema immunitario sono stati descritti non solo *in vitro*, ma an-

che *in vivo*, utilizzando numerosi modelli animali. I risultati fin qui ottenuti nel nostro e in altri laboratori sembrano avvalorare l'ipotesi di una funzione essenziale dell'NGF nel promuovere *in vitro* la sopravvivenza sia dei precursori emopoietici sia di cellule differenziate come i granulociti, i mastociti e i linfociti B, ritardando il processo di apoptosi o morte cellulare programmata. In particolare hanno evidenziato come l'NGF sia essenziale per la sopravvivenza dei linfociti B, e in particolare di quelli responsabili del mantenimento della memoria immunitaria.

L'espressione dell'NGF e dei suoi recettori negli organi linfopoietici durante lo sviluppo e nell'adulto fa ritenere che questa neurotrofina abbia un ruolo nei processi di differenziamento dei precursori emopoietici. Il ruolo fisiologico dell'NGF è comunque molto più complesso di quello ipotizzato inizialmente, e probabilmente questa proteina è coinvolta nei meccanismi difensivi dell'organismo, come suggerisce l'aumento della sua sintesi nei siti di infiammazione. Una valida conferma di questa ipotesi viene dallo studio delle patologie autoimmuni, in cui la modulazione della risposta immunitaria è alterata e che sono caratterizzate da una aumentata sintesi di NGF.

Uno dei principali obiettivi da perseguire nell'immediato futuro è verificare se l'NGF sia coinvolto nei meccanismi molecolari della risposta immunitaria e se questa possa essere modulata dalla presenza dell'NGF. Poiché sono state individuate alcune malattie infiammatorie e/o autoimmuni caratterizzate da alterati livelli di NGF, studiare questi aspetti può rivelarsi importante anche per proporre e sviluppare strategie terapeutiche.

Un altro aspetto da approfondire è l'espressione dell'NGF e dei suoi recettori nei precursori emopoietici in condizioni normali e patologiche. Recentemente, utilizzando cellule del

sangue periferico di pazienti affetti da patologie mieloproliferative croniche, abbiamo osservato che sia il livello di NGF sia l'espressione del recettore subiscono significative alterazioni durante la progressione della malattia, e che il trattamento terapeutico con idrossiurea modifica considerevolmente tanto i livelli di NGF quanto l'espressione del recettore nelle cellule leucemiche. In analogia con quanto osservato da scienziati statunitensi e giapponesi nel sistema nervoso di bambini affetti da neuroblastoma, i risultati dei nostri studi fanno ipotizzare che l'espressione dell'NGF o del suo recettore possa essere un utile strumento prognostico per valutare il decorso neoplastico di cellule leucemiche. Infatti nelle cellule di neuroblastoma la presenza del recettore dell'NGF TrkA è associata a un decorso favorevole della neoplasia, mentre la sola presenza di p75 è un indice di maggiore malignità.

Le ricerche svolte in questi ultimi anni hanno enormemente ampliato il campo di azione dell'NGF, che si deve ora considerare una proteina con effetti non esclusivi sul sistema nervoso, bensì dotata di funzioni molteplici nel sistema immunitario. Per quanto sorprendente questo possa apparire a una prima analisi, la doppia azione dell'NGF nei due sistemi è caratteristica anche di altre molecole, come le interleuchine, i neuropeptidi, i neurotrasmettitori, che fino a pochi anni fa erano considerate «esclusive» di un sistema o dell'altro. Ciò dimostra come il sistema nervoso e immunitario parlino lo stesso linguaggio biochimico e siano in grado di comunicare strettamente tra loro, influenzando le rispettive funzioni. Continuare ad approfondire la funzione dell'NGF nel sistema immunitario può aiutare a chiarire come questi sistemi possano integrarsi e insieme mantenere l'equilibrio omeostatico dell'organismo.

LUIGI ALOE, il maggiore collaboratore di Rita Levi-Montalcini nello studio del ruolo biologico dell'NGF nel sistema nervoso, endocrino e immunitario, è attualmente direttore di ricerca presso l'Istituto di neurobiologia del CNR di Roma. Ha lavorato per oltre sei anni alla Washington University di St. Louis, dove fu scoperta e caratterizzata la proteina.

LUISA BRACCI-LAUDIERO è ricercatore all'Istituto di neurobiologia di Roma, dove da 10 anni collabora con Luigi Aloe nello studio dell'azione dell'NGF sul sistema immunitario. Ha lavorato presso il Dipartimento di fisiologia e farmacologia dell'Istituto Karolinska di Stoccolma.

LEVI-MONTALCINI RITA, *The Nerve Growth Factor 35 Years Later* in «Science», 237, pp. 1154-1162, 1987.

BARDE Y. A., *The Nerve Growth Factor Family* in «Progress in Growth Factor Research», 2, pp. 237-248, 1990.

ALOE LUIGI e altri, *Nerve Growth Factor and Autoimmune Diseases* in «Autoimmunity», 19, pp. 141-150, 1994.

CHEVALIER S. e altri, *Expression and Functionality of the TrkA Proto-oncogene Product/ngf Receptor in Undifferentiated Hemopoietic Cells* in «Blood», 83, pp. 1479-1485, 1994.

TORCIA M. e altri, *Nerve Growth Factor is an Autocrine Survival Factor for Memory B Lymphocytes* in «Cell», 85, pp. 345-356, 1996.

ALOE LUIGI e altri, *The Expanding Role of Nerve Growth Factor: From Neurotrophic Activity to Immunologic Diseases* in «Allergy», 52, pp. 883-994, 1997.