

Nerve Growth Factor: Dalla Scoperta alla Farmacologia

Un viaggio attraverso la storia, la biologia molecolare e le frontiere cliniche di una molecola che ha rivoluzionato le neuroscienze.

Dott. Luigi Manni
Consiglio Nazionale delle Ricerche



C'era una volta

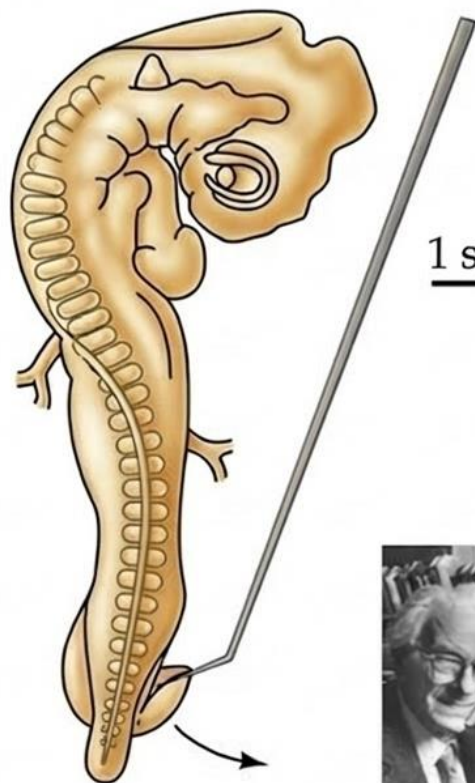
Il Paradosso della Connettività Neuronale: Meccanismi di Orientamento e Formazione dei Circuiti

L'Interrogativo Centrale della Neurobiologia
degli Anni '40: Quali sono i processi molecolari
e cellulari che governano la sinaptogenesi
specificata e l'omeostasi numerica neuronale?

C'era una volta

(A)

Ablazione dell'abbozzo dell'arto



(B)

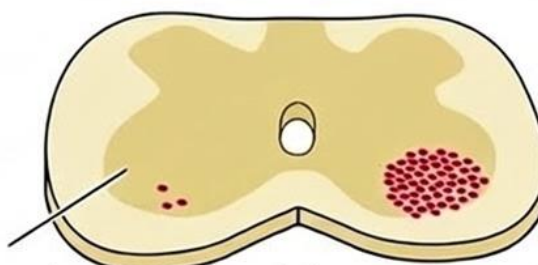
Sezione del midollo spinale

1 settimana dopo

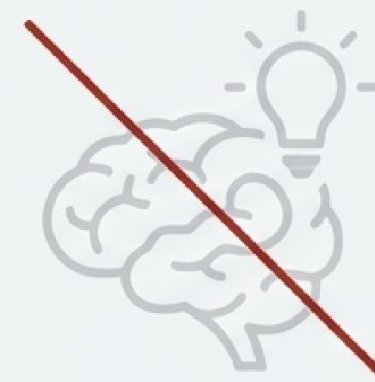
Corno
ventrale

Arto
mancante

Normale



1934: Victor Hamburger scoprì che la rimozione di un abbozzo dell'arto comportava una riduzione del numero di neuroni sensoriali e motori nel midollo spinale.



**L'ipotesi Iniziale
(Hamburger)**

I tessuti bersaglio (es. gemma dell'arto) inviano segnali che *inducono* la differenziazione delle cellule spinali in neuroni.

C'era una volta



1942: Giuseppe Levi e Rita Levi-Montalcini propongono che il segnale fornito dal target di innervazione promuova la sopravvivenza di neuroni in differenziamento.

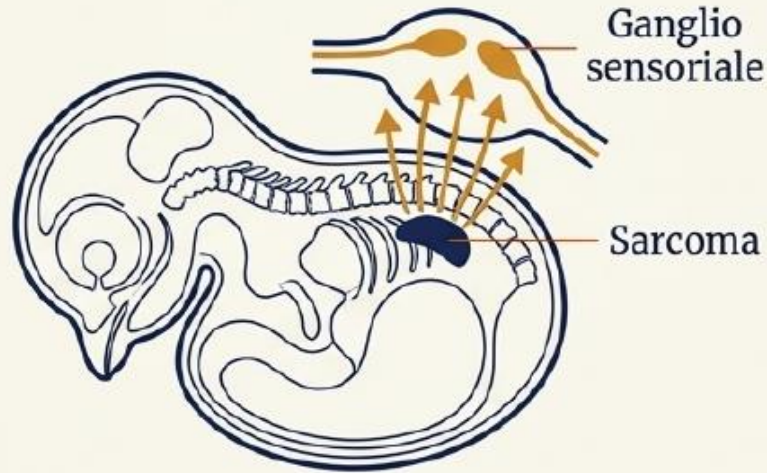


1949: Levi-Montalcini e Hamburger ripetono l'esperimento dell'ablazione dell'arto e producono dati a supporto della cosiddetta "Ipotesi Neurotrofica".

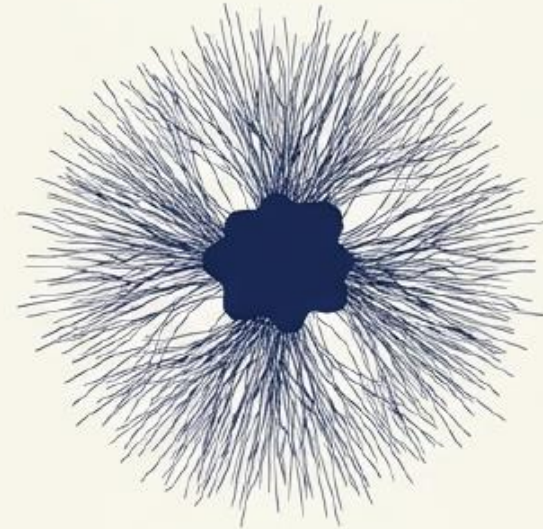
LEVI-MONTALCINI R, HAMBURGER V. *J Exp Zool.* 1951 Mar;116(2):321-61.
COHEN S, LEVI-MONTALCINI R. *Cancer Res.* 1957 Jan;17(1):15-2.
LEVI-MONTALCINI R, COHEN S. *Ann N Y Acad Sci.* 1960 Mar 29;85:324-41.

THE NOBEL EXPERIMENTS

Esperimento 1 (Sarcoma di topo)

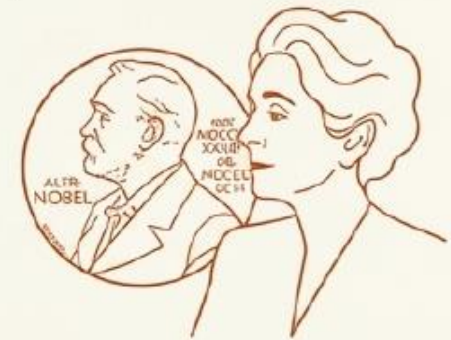


Esperimento 2 (In vitro)



Frammenti di sarcoma trapiantati in embrioni di pollo causano una **crescita ipertrofica dei gangli sensoriali e simpatici.**

Un ganglio sensoriale in coltura mostra una crescita massiccia di **assoni ('effetto alone')** quando posto vicino a un frammento di tumore. Questo dimostra l'esistenza di un **fattore umorale solubile.**



Levi-Montalcini R, Hamburger V. *J Exp Zool.* 1951

Cohen S, Levi-Montalcini R. *Cancer Res.* 1957

THE NOBEL EXPERIMENTS

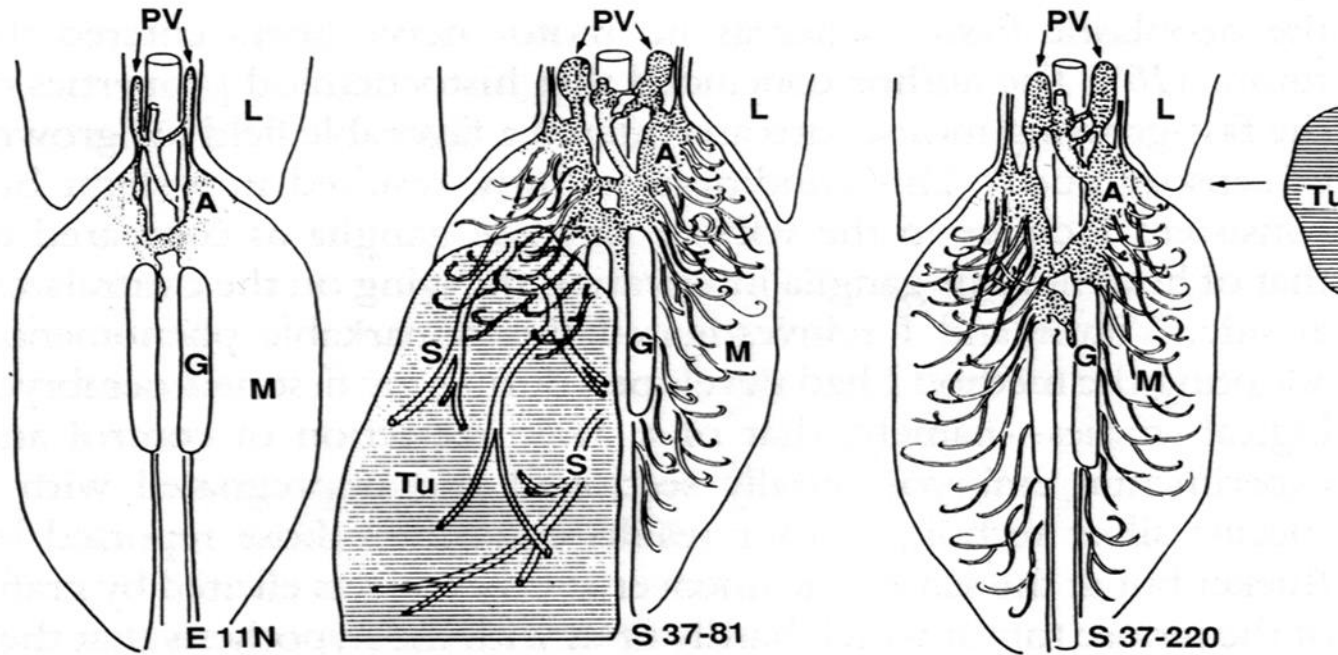


Fig. 2. Semidiagrammatic reconstruction of a normal 11-day chick embryo (E 11N), of an 11-day embryo carrying an intra-embryonic transplant of mouse sarcoma (S 37-81), and of an 11-day embryo with a transplant of sarcoma 37 on the chorioallantoic membrane (S 37-220). Note the hyperplastic growth of the prevertebral ganglia in embryos carrying tumor transplants. Visceral nerve fibers from these ganglia invade the nearby mesonephroi. The abbreviations are A, adrenal; G, gonad; L, lung; M, mesonephros; PV, prevertebral ganglia; S, sensory nerves; and Tu, tumor [from (12)].

THE NOBEL EXPERIMENTS

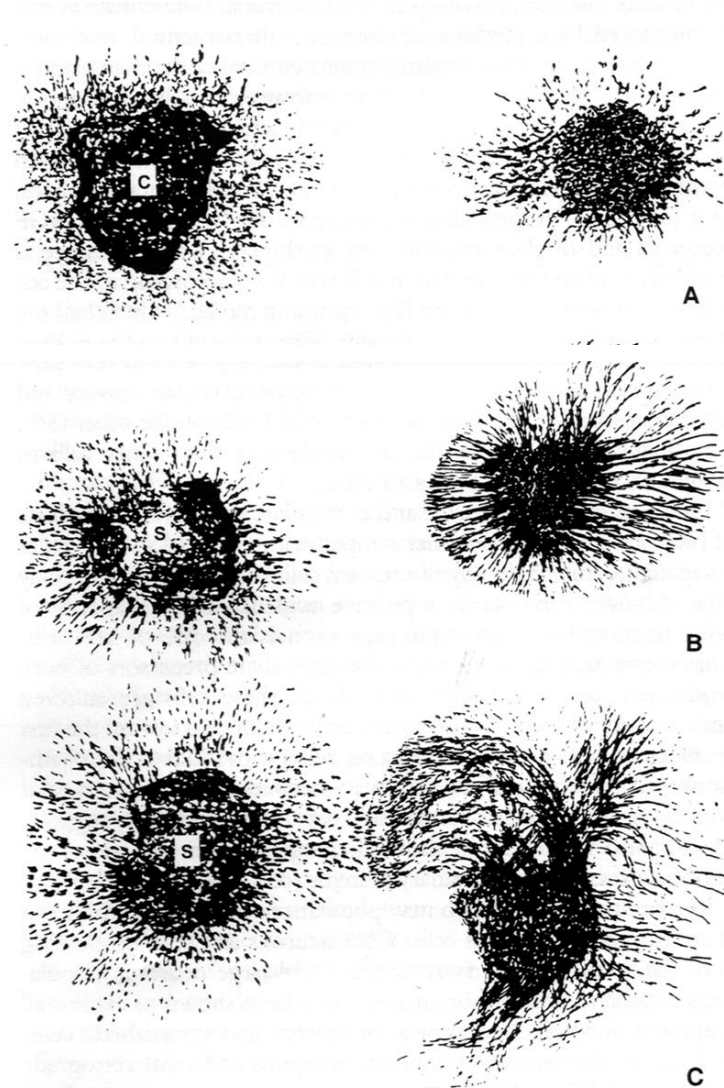
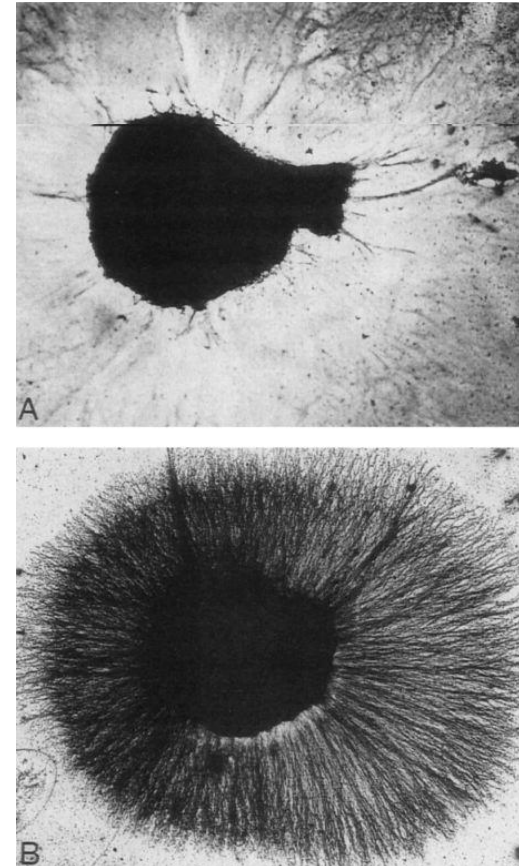
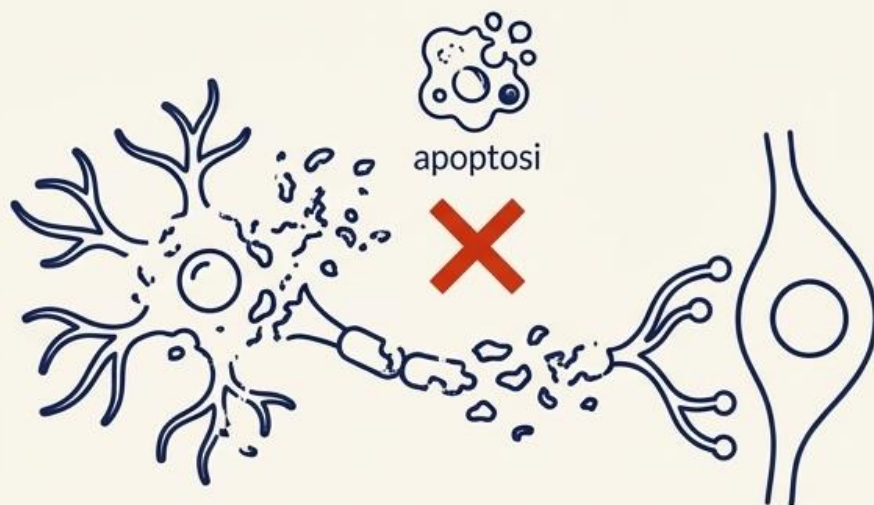


Fig. 3. Drawings illustrating the in vitro “halo” effect on 8-day chick embryo sensory ganglia cultured in the presence of fragments of mouse sarcoma 180 for 24 hours (**B**) or 48 hours (**C**). In (**A**), the ganglion, which faces a fragment of chick embryonic tissue (**c**) shows fibroblasts but few nerve fibers. In (**B**) and (**C**), the ganglia, facing fragments of sarcoma 180 (**s**) show the typical “halo” effect elicited by the growth factor released from the sarcoma. Note in (**C**) the first evidence of a neurotropic effect of the growth factor.



Ipotesi Neurotrofica

La Nascita dell'Ipotesi Neurotrofica.

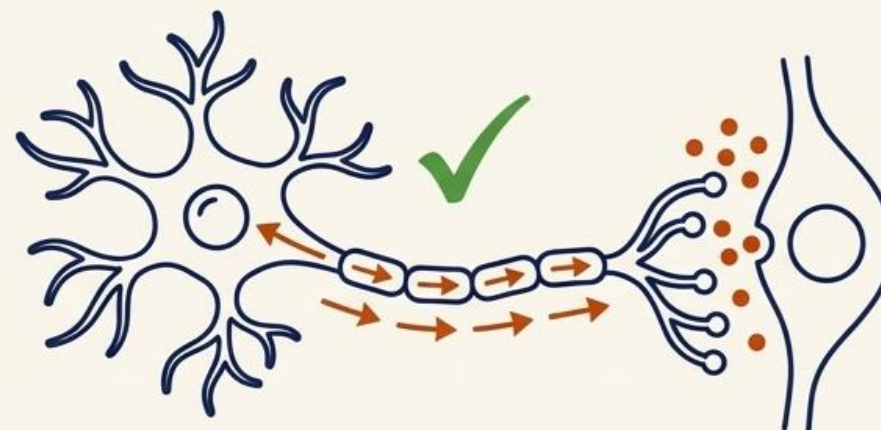


ASSENZA DI FATTORE

Principio centrale: La sopravvivenza neuronale dipende da fattori trofici rilasciati in quantità limitate dai tessuti bersaglio.

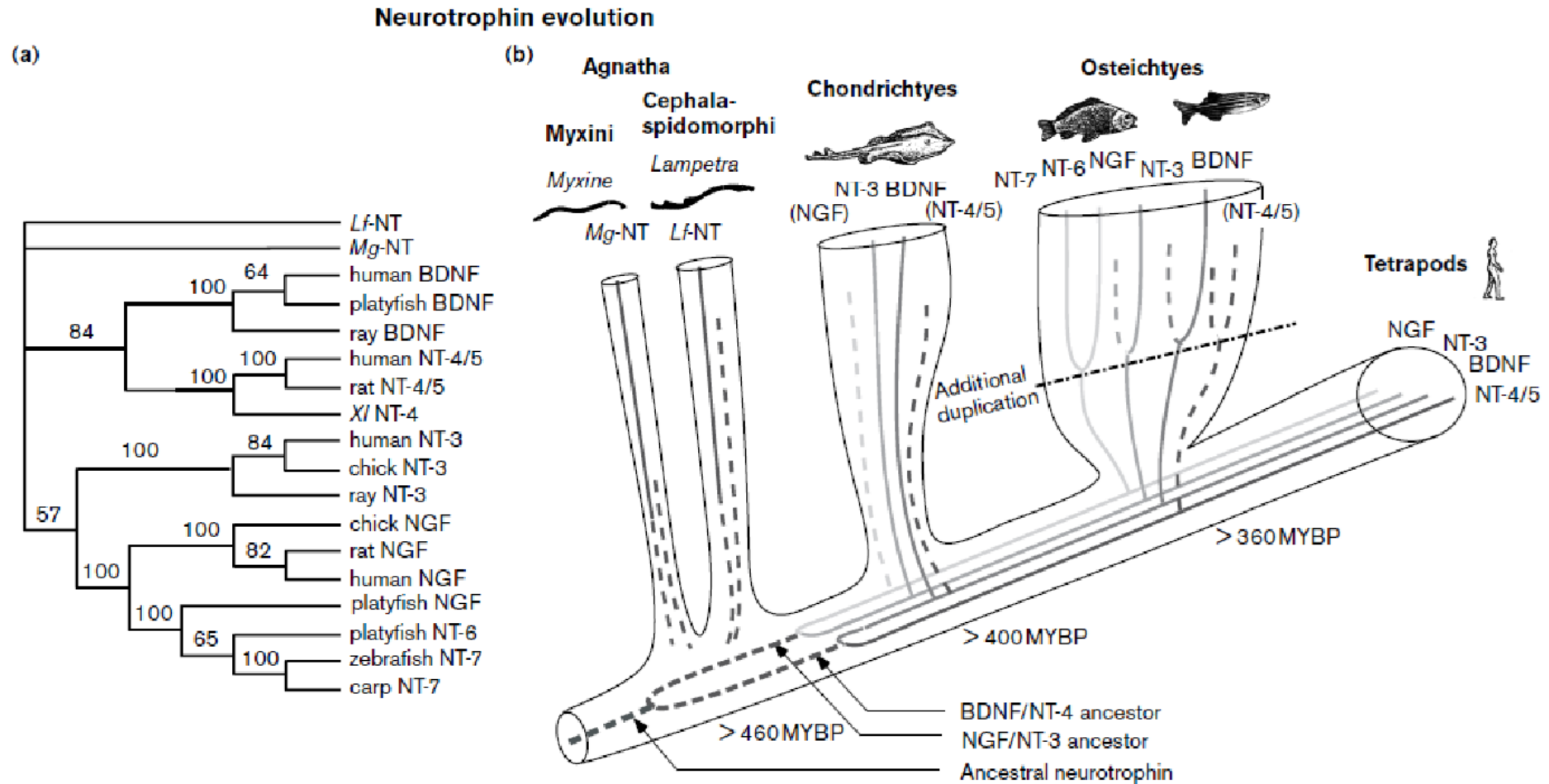
Dogmi fondamentali:

1. I neuroni competono per il fattore trofico.
2. Solo i neuroni che ottengono abbastanza fattore sopravvivono; gli altri vanno in apoptosi.
3. Il segnale di sopravvivenza viene trasportato retrogradamente dall'assone al corpo cellulare.



PRESENZA DI FATTORE

Le Neurotrofine



Hallbook, F., *Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families*. *Curr Opin Neurobiol*, 1999. **9(5)**: p. 616-21.

BIOLOGIA DEL NGF

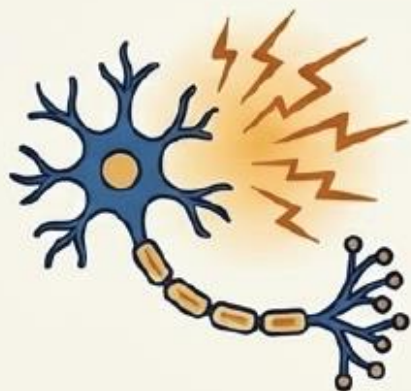
Sviluppo

- proliferazione dei precursori neuronali
- sopravvivenza
- differenziamento

Vita adulta

- biosintesi dei neurotrasmettitori e neuropeptidi
- plasticità sinaptica
- innervazione organi bersaglio
- organizzazione strutturale del neurone

NGF un regolatore pleiotropico nell'adulto



Sistema Sensoriale (Dolore)

Regola la sintesi di neuropeptidi (Sostanza P, CGRP) e canali ionici (TRPV1), modulando la sensibilità al dolore.



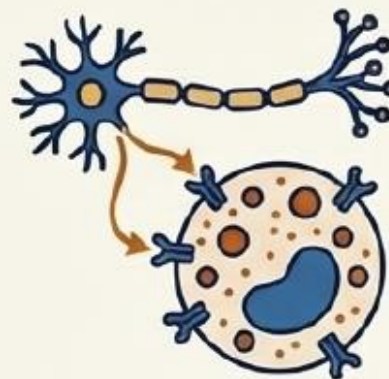
Sistema Simpatico

Essenziale per la sopravvivenza e la sintesi di noradrenalina e neuropeptide Y (NPY).



SNC (Neuroni Colinergici)

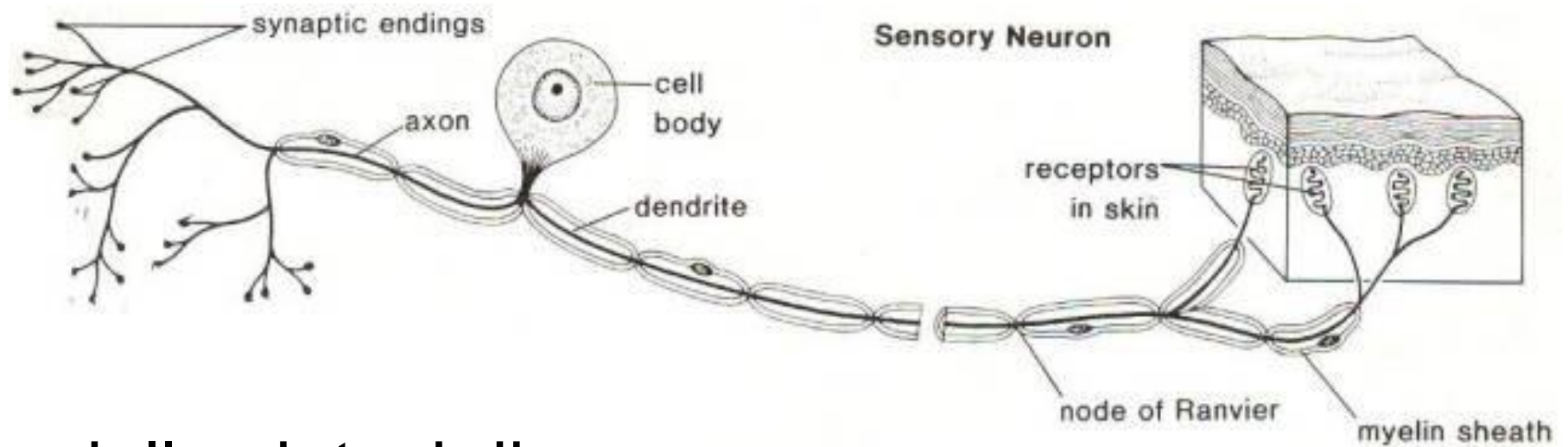
Promuove la sintesi di Acetilcolina (ACh) e la plasticità sinaptica. Cruciale per l'ipotesi colinergica dell'Alzheimer.



Sistema Immunitario e Asse dello Stress

Media l'infiammazione neurogenica e l'"inflammatory reflex", collegando il sistema nervoso e quello immunitario.

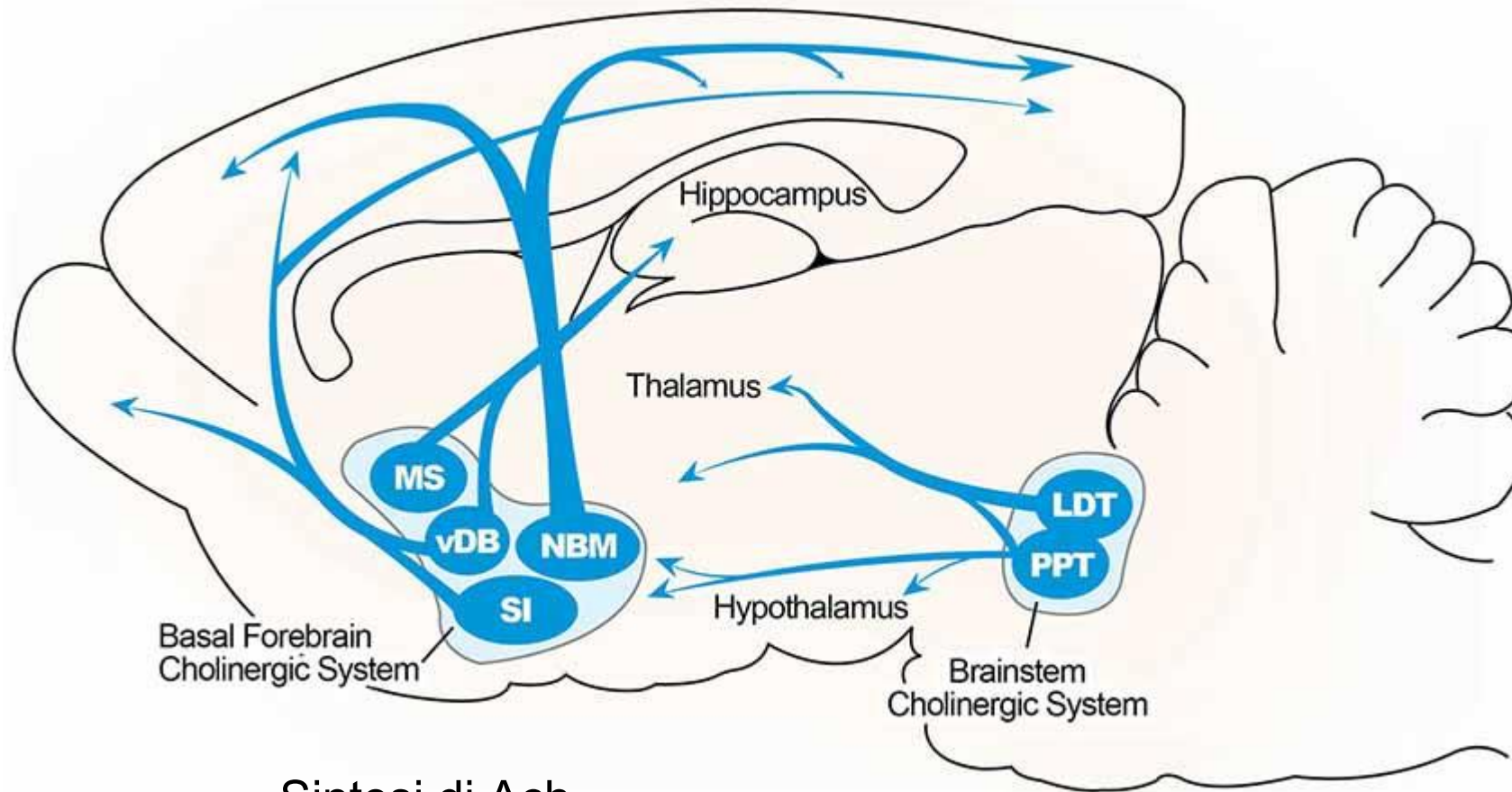
Sistema Sensoriale



Regolazione della sintesi di:

- ✓ Neuropeptidi: SP, CGRP, NPY
- ✓ Canali ionici: TRPV1

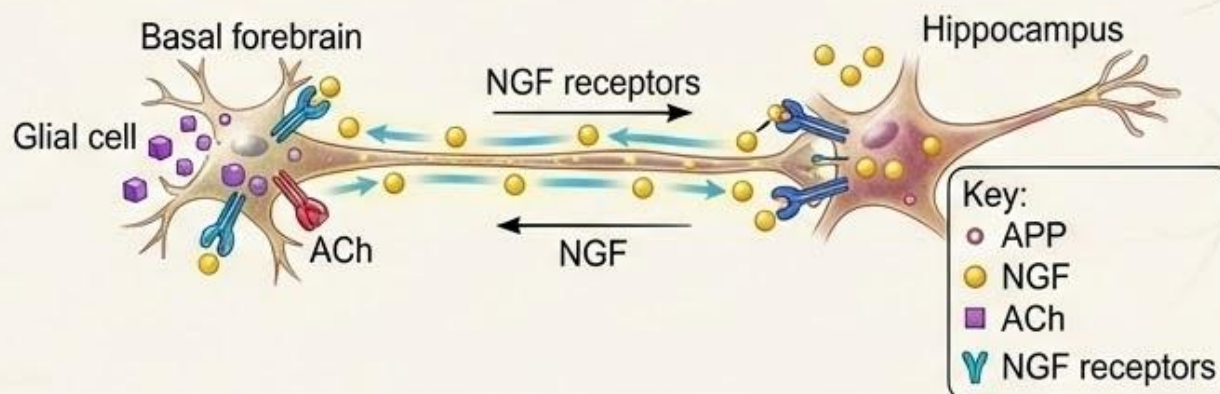
NEURONI COLINERGICI DEL CERVELLO



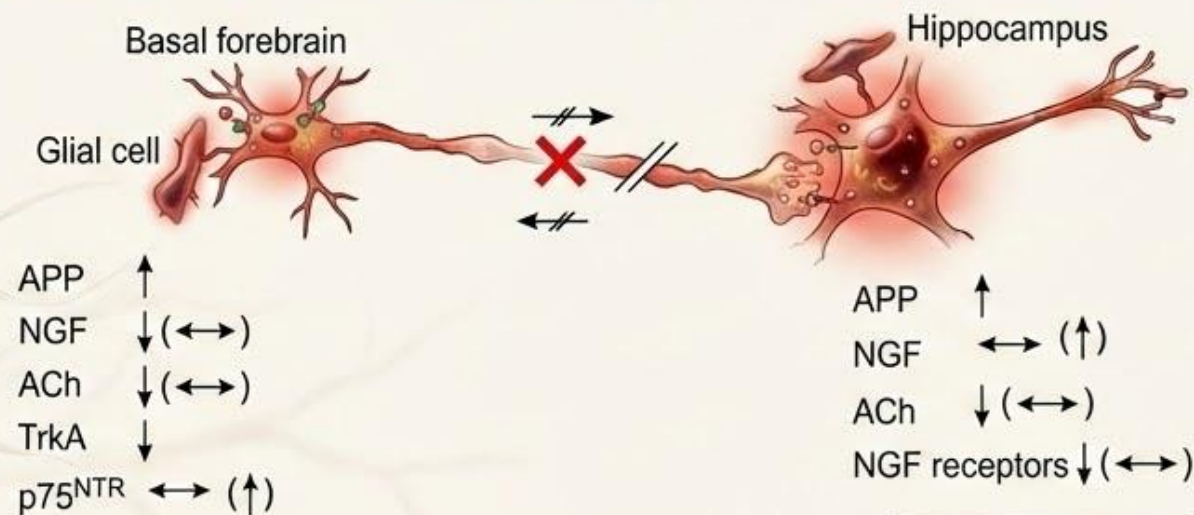
Sintesi di Ach
Plasticità
sinaptica
Neurogenesi

IPOSTESI COLINERGICA PER L'ALZHEIMER

(a) Normal conditions

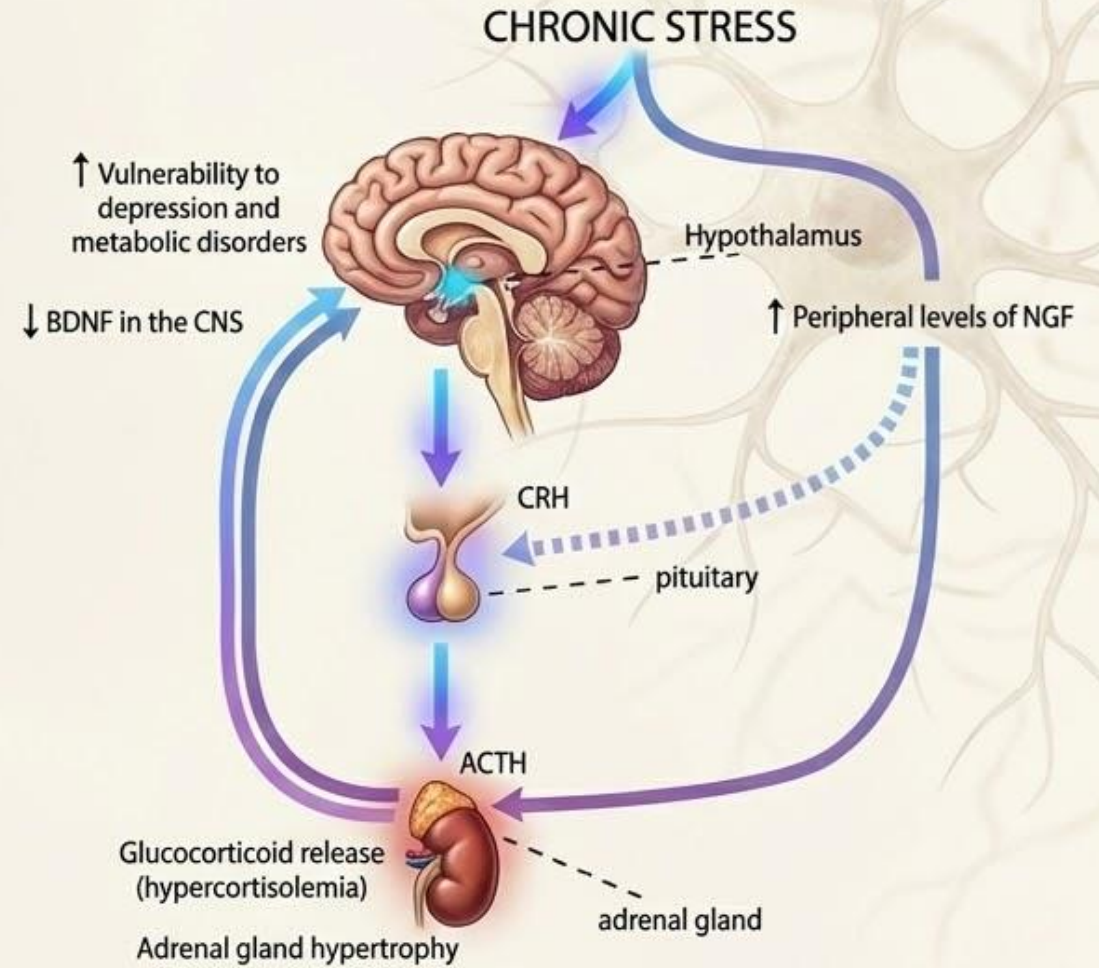
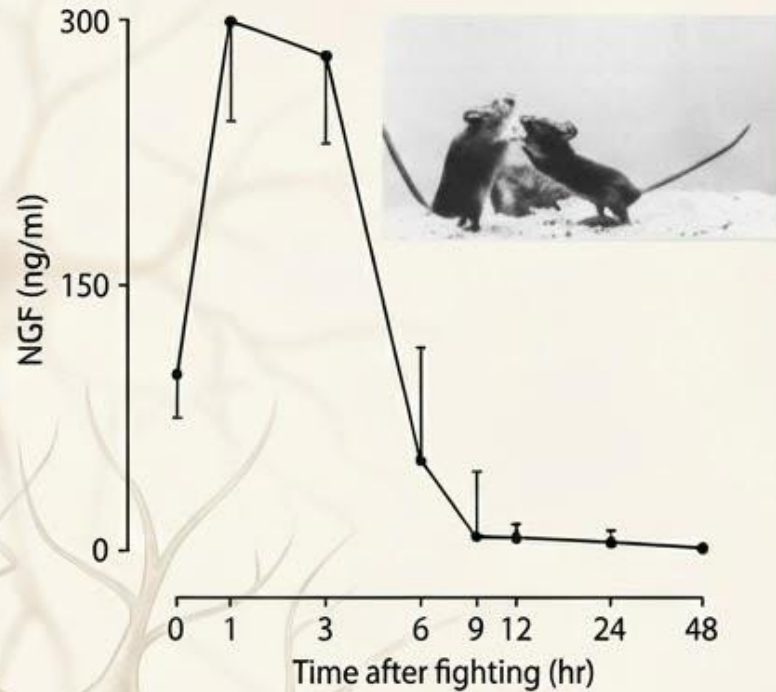


(b) Alzheimer's disease and Down's syndrome



TRENDS in Neurosciences

ASSE DELLO STRESS

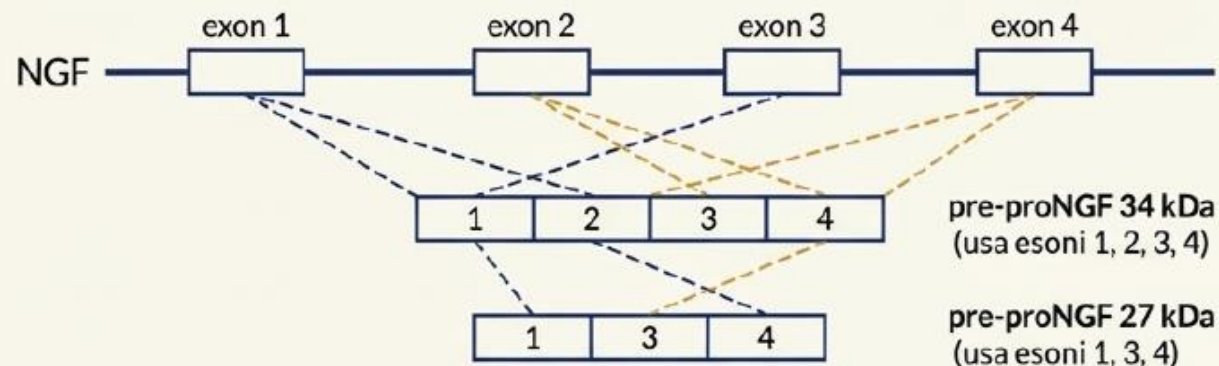


Dal gene alla proteina

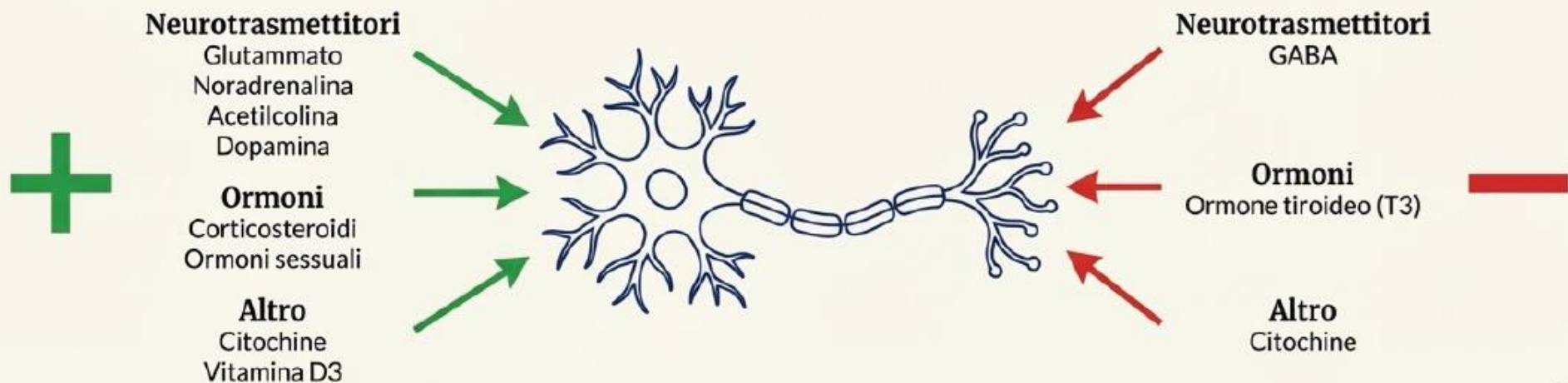
Trascrizione

Due promotori distinti.

Splicing alternativo che genera quattro diversi trascritti di mRNA.

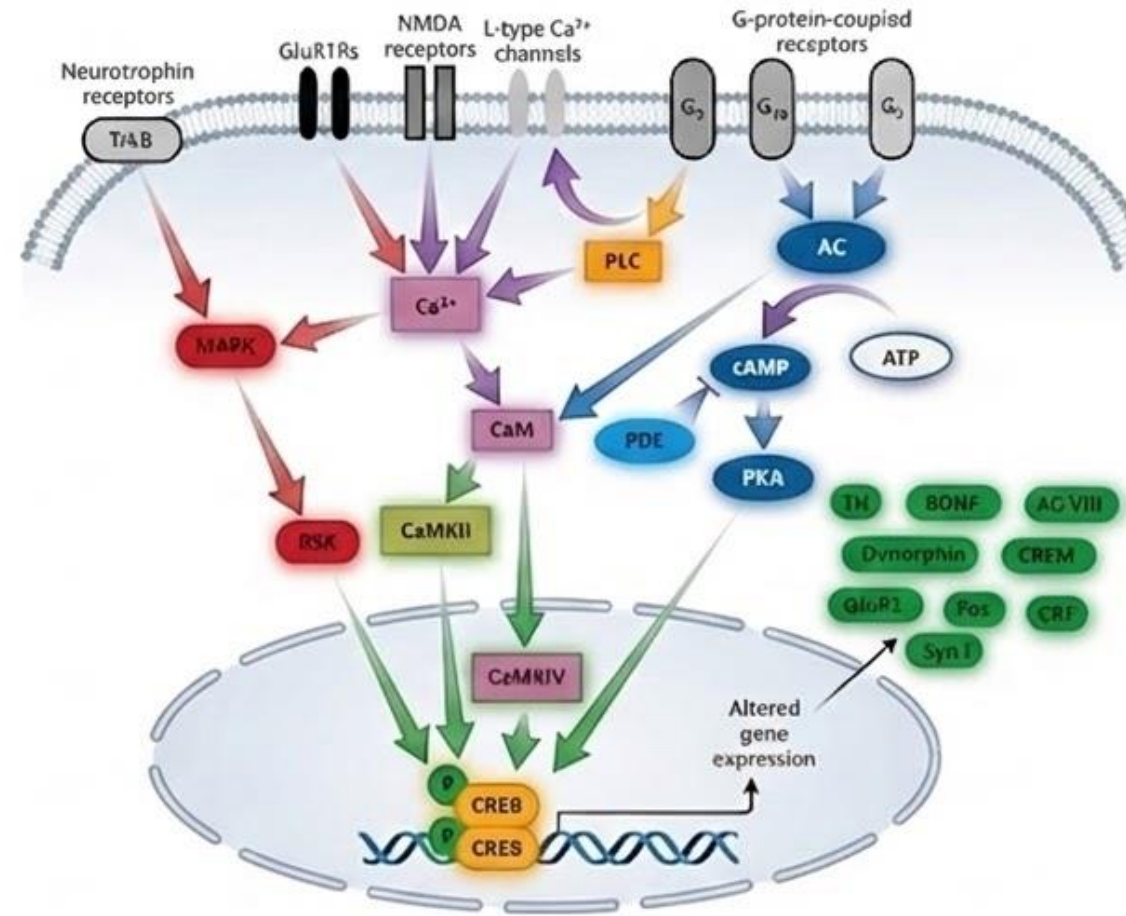


Regolazione dell'Espressione



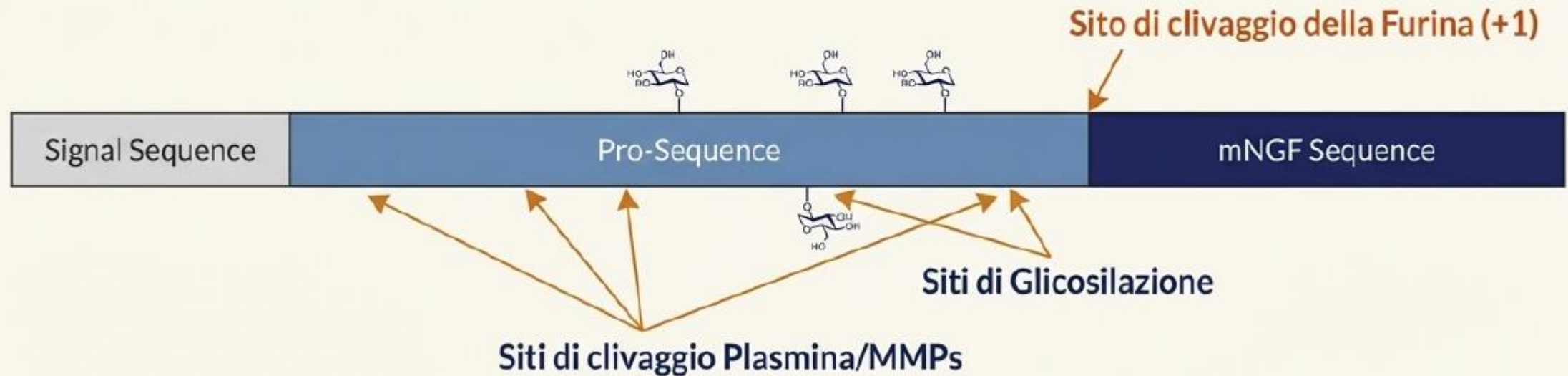
REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

Diverse vie di trasduzione del segnale convergono sull'attivazione degli stessi fattori di trascrizione, portando alla modulazione dell'espressione genica delle neurotrofine.



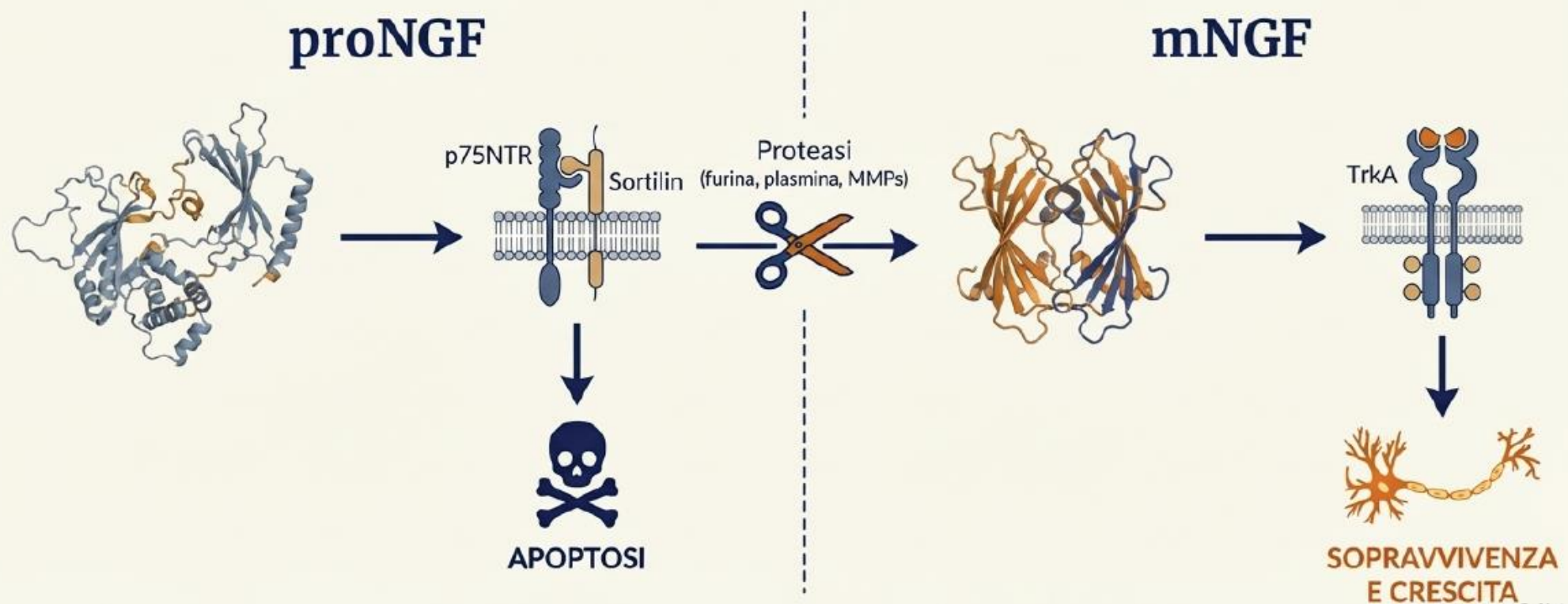
Struttura

La struttura del pre-proNGF contiene domini funzionali distinti: sequenza segnale, **pro-dominio** e NGF maturo. Siti di **glicosilazione post-traduzionale** influenzano la conformazione e il processamento. Siti di **clivaggio** specifici per proteasi determinano il destino della molecola.

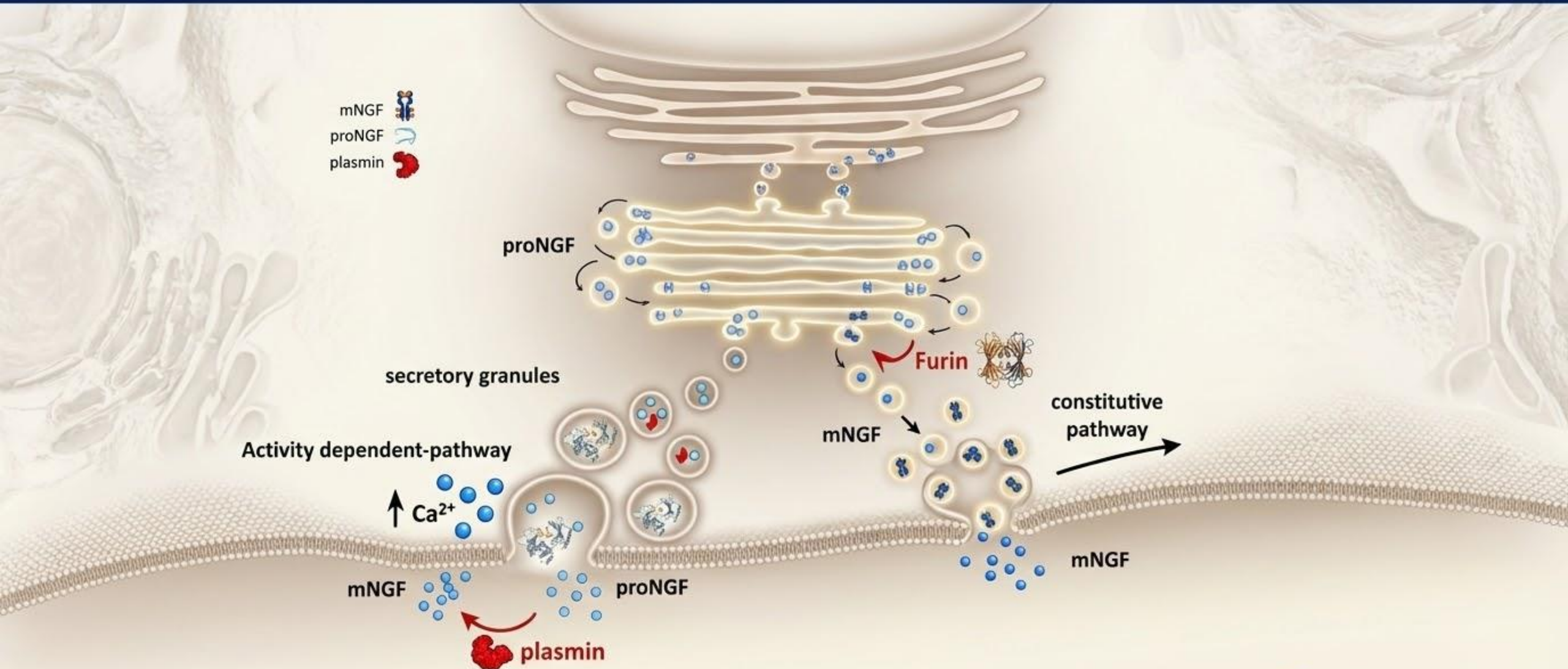


Dualismo tra proNGF e mNGF

- NGF è sintetizzato come un precursore: **pre-proNGF**.
- Dopo il clivaggio del peptide segnale, diventa **proNGF**, una proteina parzialmente non strutturata (intrinsically unstructured).
- Il proNGF può essere clivato da enzimi (furina, plasmina, MMPs) per generare **NGF maturo (mNGF)**.



INTRACELLULAR TRAFFICKING



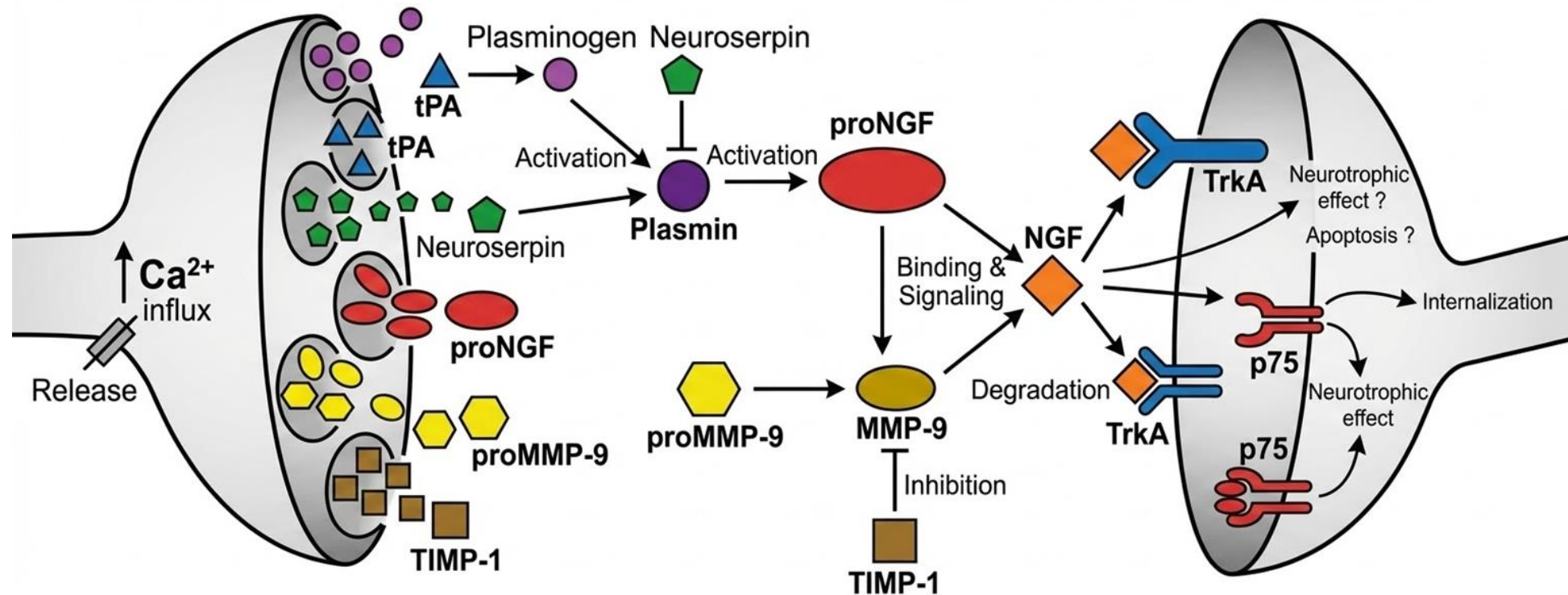
proNGF is released in response to the neuronal activity

RILASCIO E PROCESSAMENTO EXTRA-CELLULARE

Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade

PNAS | April 25, 2006 | vol. 103 | no. 17 | 6735-6740

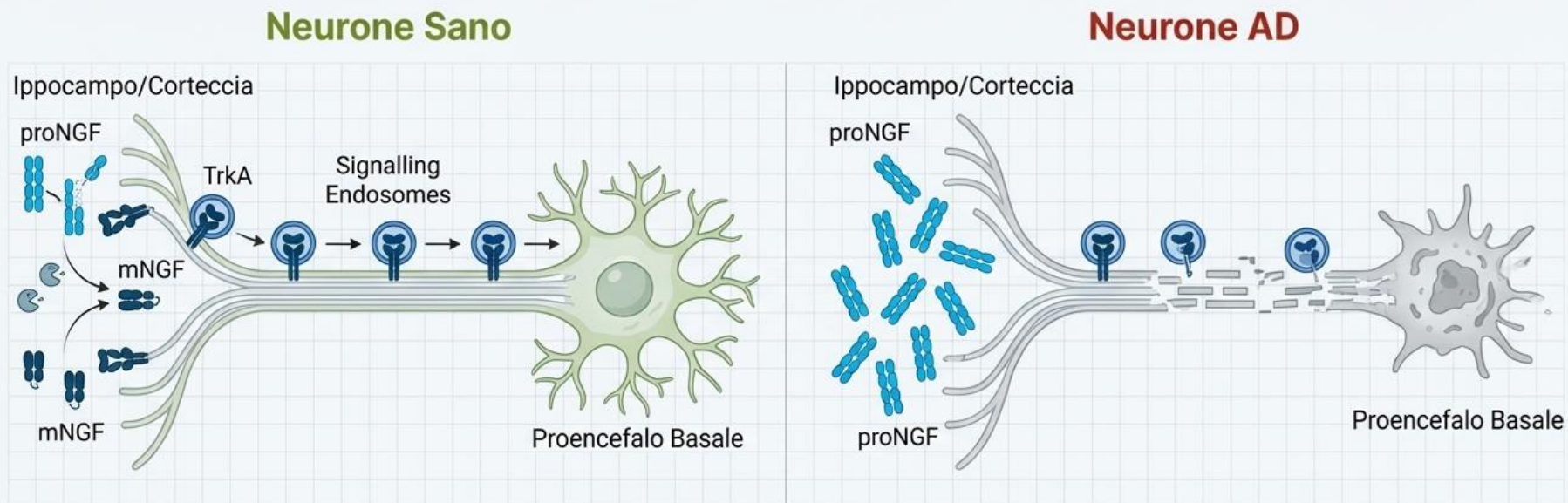
Martin A. Bruno* and A. Claudio Cuello***§



ProNGF e patogenesi di AD

Patologia in Foco: L'Equilibrio dell'NGF nella Malattia di Alzheimer

Nella malattia di Alzheimer (AD) degenerano i neuroni colinergici del proencefalo basale, che dipendono dall'NGF prodotto in corteccia e ippocampo.



L'omeostasi dell'NGF è mantenuta.

L'ipotesi attuale non è la mancanza di produzione di NGF, ma un difetto nel suo processamento e trasporto, con accumulo di proNGF tossico.

Cuello AC, Pentz R, Hall H. The Brain NGF Metabolic Pathway in Health and in Alzheimer's Pathology. Front Neurosci. 2019 12;13:62.

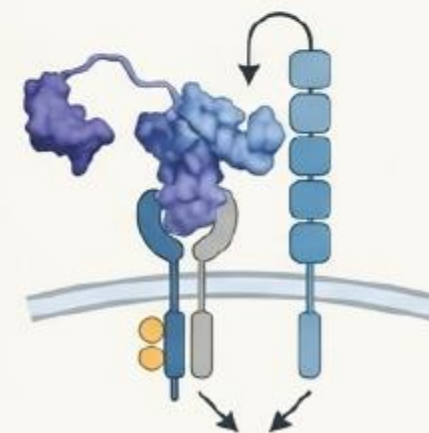
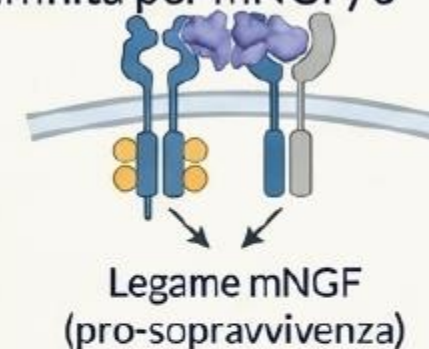
Recettori

TrkA: Recettore ad alta affinità per mNGF. La sua attivazione (dimerizzazione e autofosforilazione) innesca cascate di segnale pro-sopravvivenza.

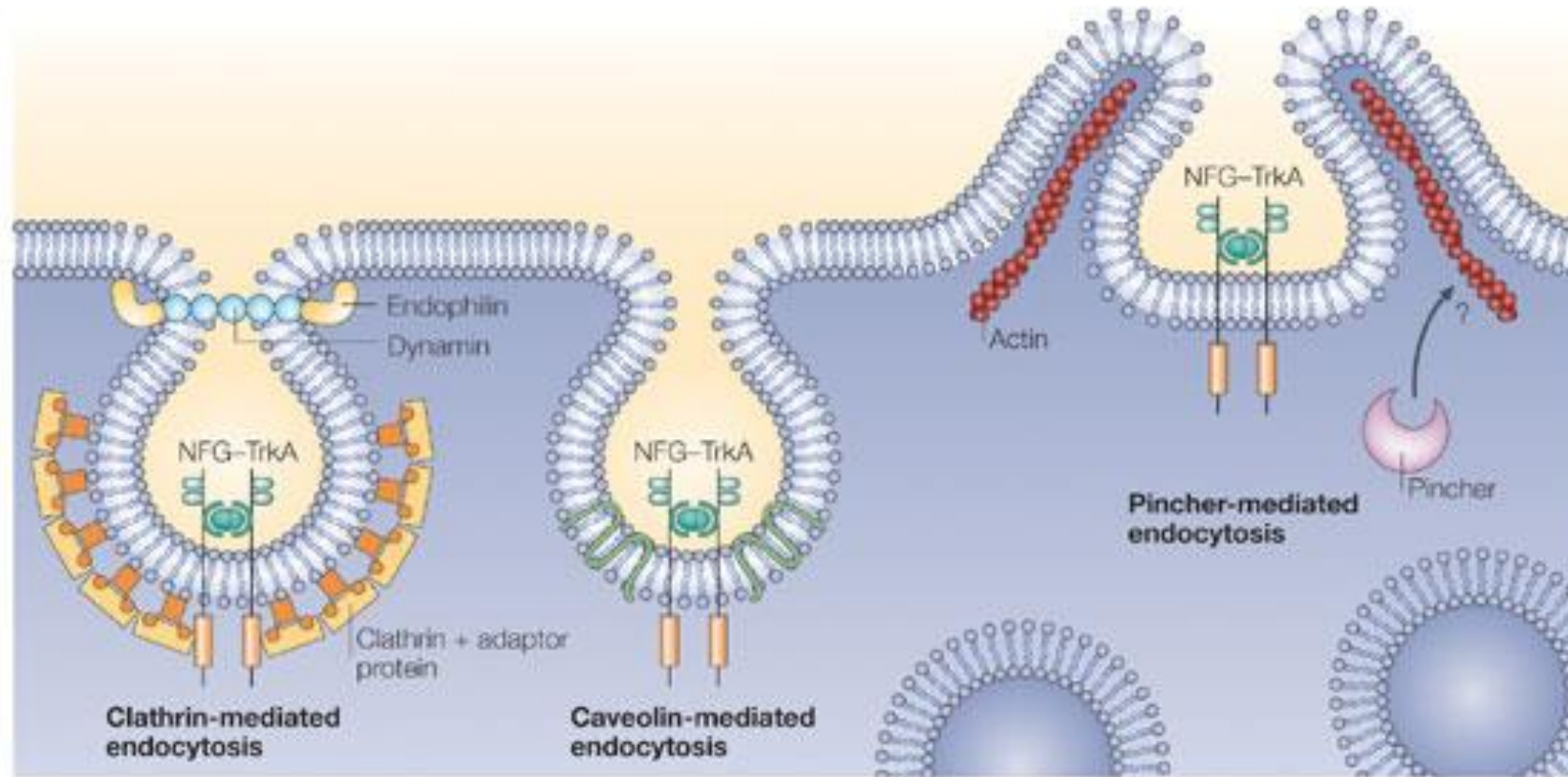
p75NTR: Recettore a bassa affinità. Può formare un complesso con TrkA (aumentando l'affinità per mNGF) o con la Sortilina (creando un recettore ad alta affinità per proNGF che media l'apoptosi).

Affinità di legame (Kd)

	TrkA	p75NTR	TrkA/p75NTR	p75NTR/sortilin
mNGF	1 nM	1 nM	0.03 nM	-----
proNGF	20 nM	15 nM	?	0.16 nM

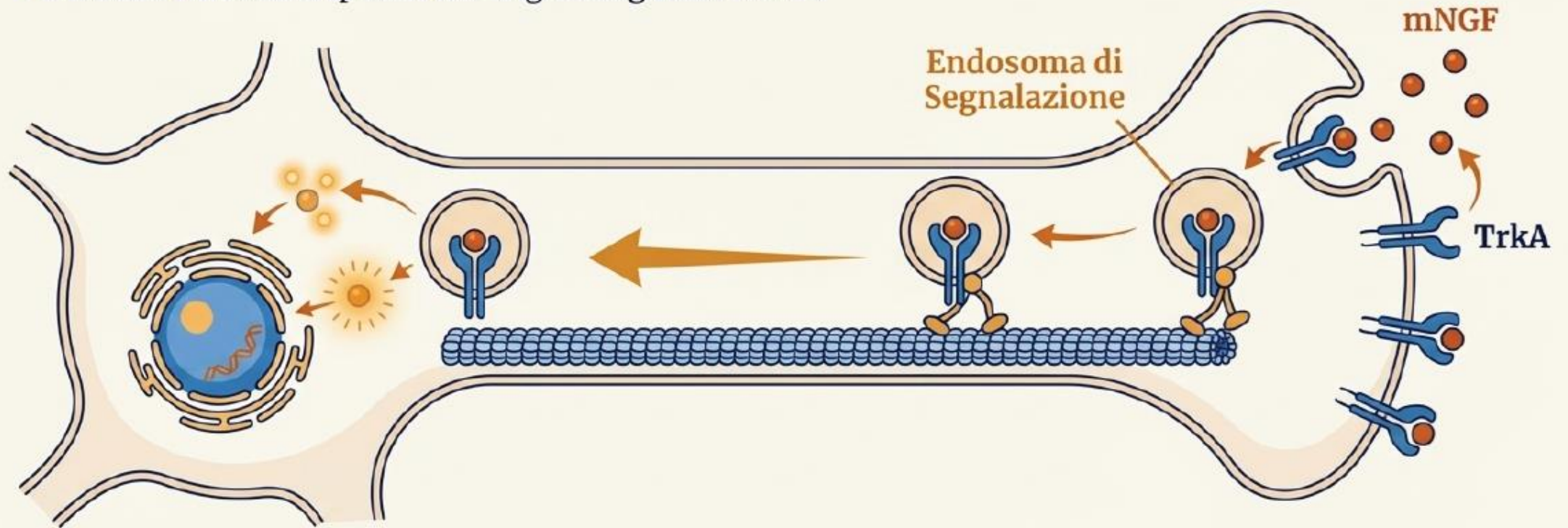


Trasporto Retrogrado

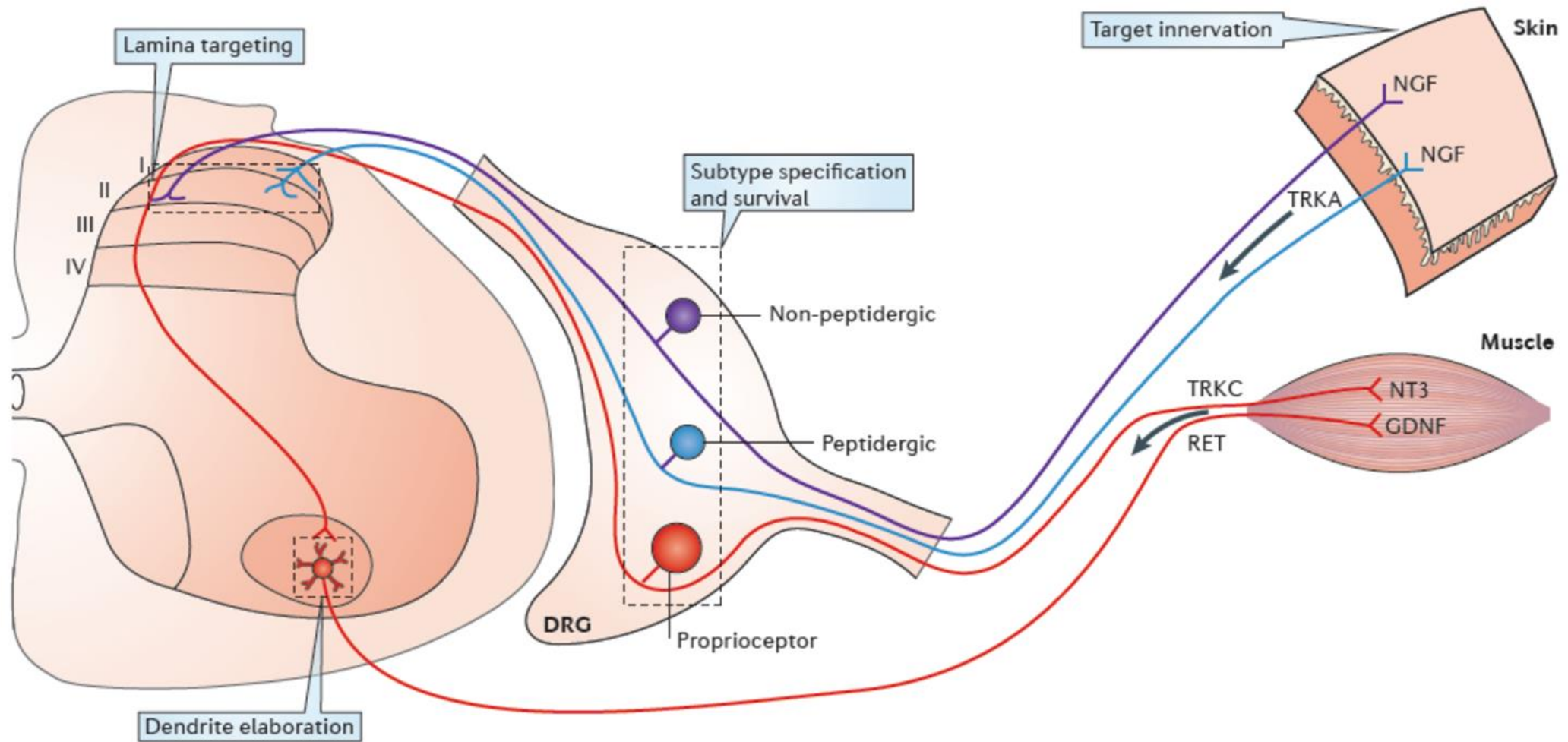


Trasporto Retrogrado

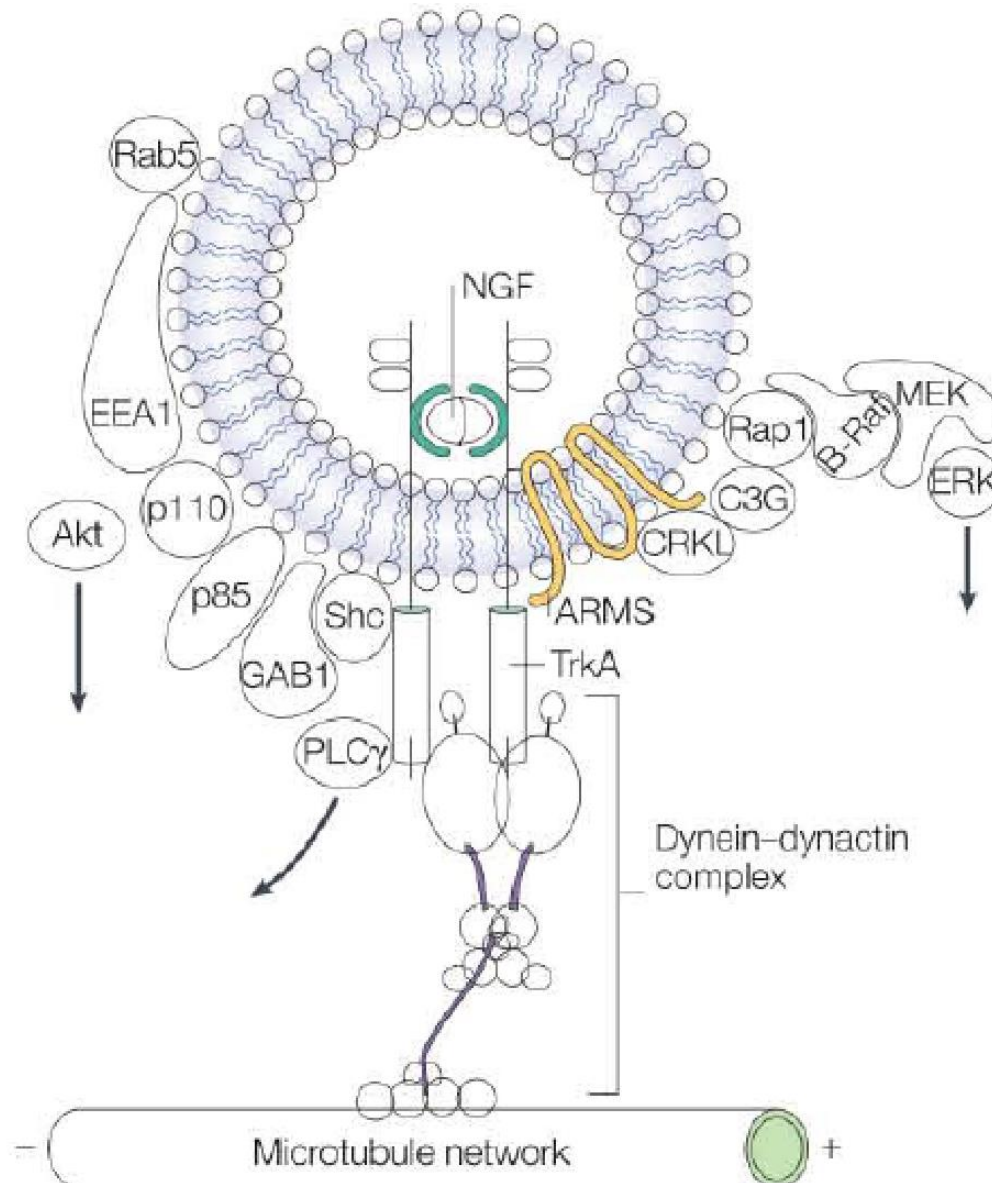
- **La Necessità:** Il segnale di sopravvivenza generato al terminale assonico deve raggiungere il corpo cellulare per regolare l'espressione genica.
- **Evidenze Storiche:** L'assotomia causa la morte neuronale, prevenibile con NGF esogeno. NGF radiomarcato iniettato nel bersaglio viene ritrovato nel ganglio (Hendry *et al*, 1974).
- **Modello Attuale:** L'ipotesi del 'Signalling Endosome'.



Trasporto Retrogrado



TRASPORTO RETROGRADO



Trasporto Retrogrado

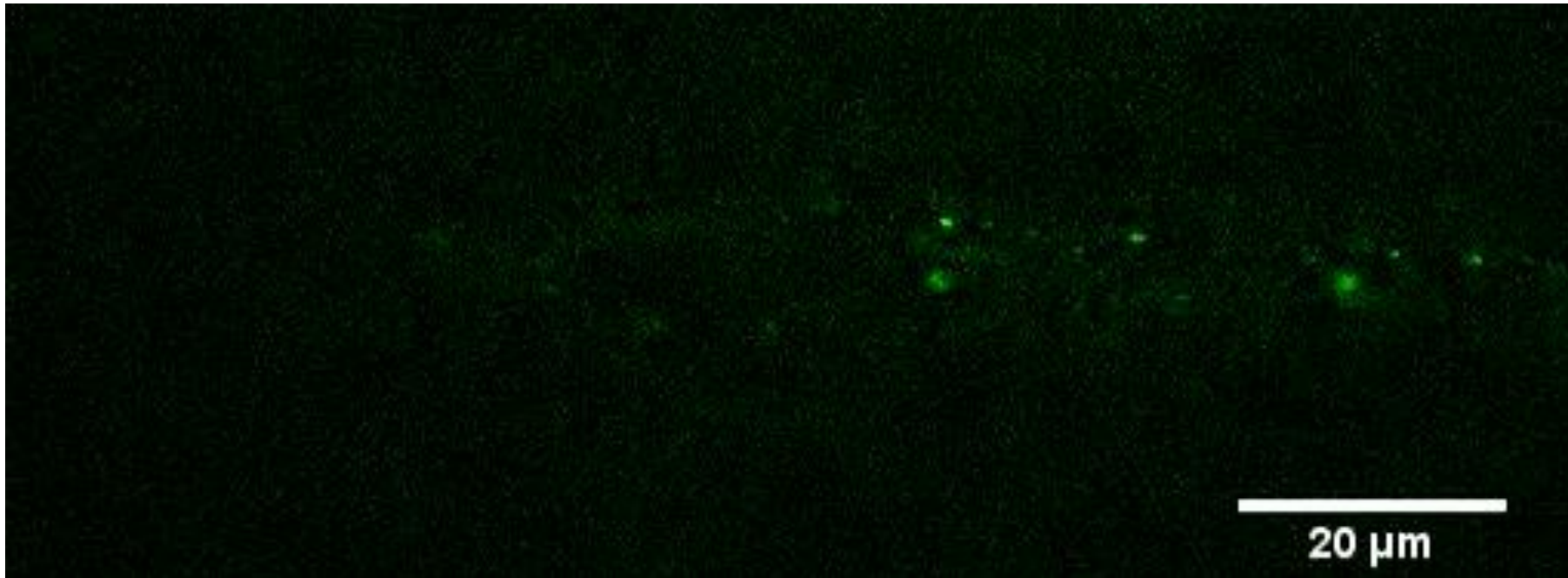
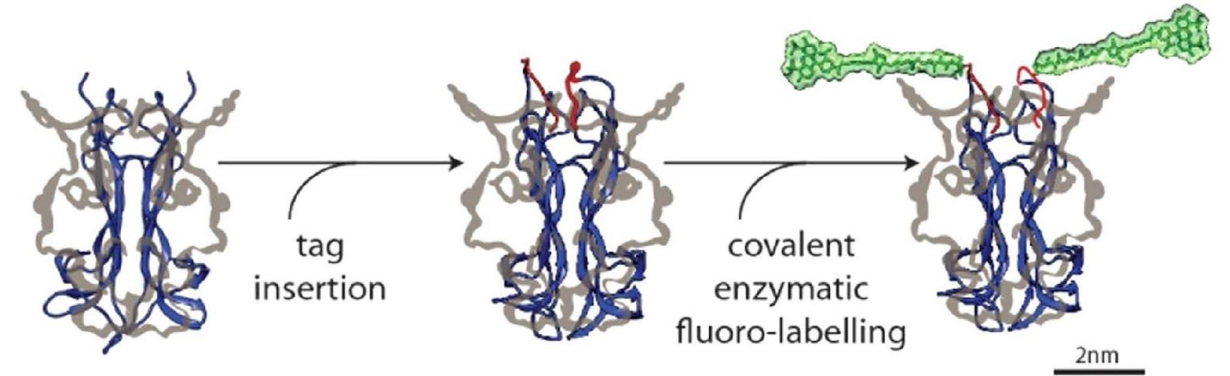
SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Precursor and mature NGF live tracking: one *versus* many at a time in the axons

Received: 25 June 2015
Accepted: 14 October 2015
Published: 01 February 2016

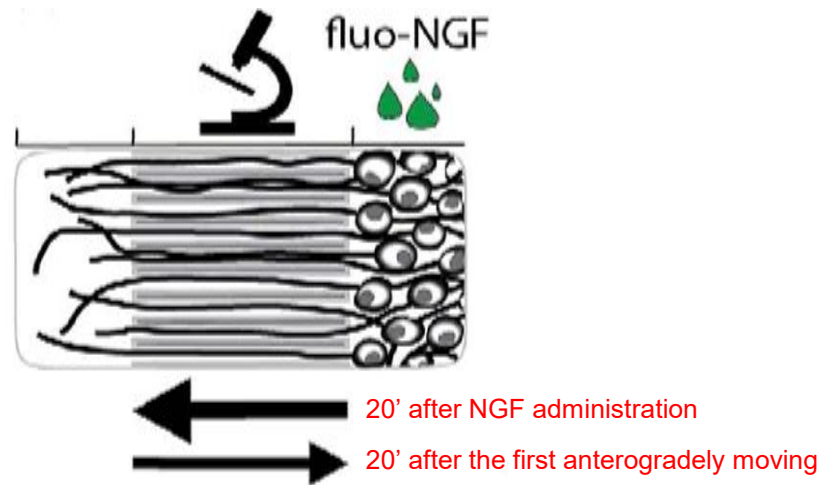
Teresa De Nadai¹, Laura Marchetti^{1,2}, Carmine Di Rienzo^{2,3}, Mariantonietta Calvello¹, Giovanni Signore³, Pierluigi Di Matteo¹, Francesco Gobbo¹, Sabrina Turturro⁴, Sandro Meucci^{2,3}, Alessandro Viegi¹, Fabio Beltram^{2,3}, Stefano Luin² & Antonino Cattaneo¹



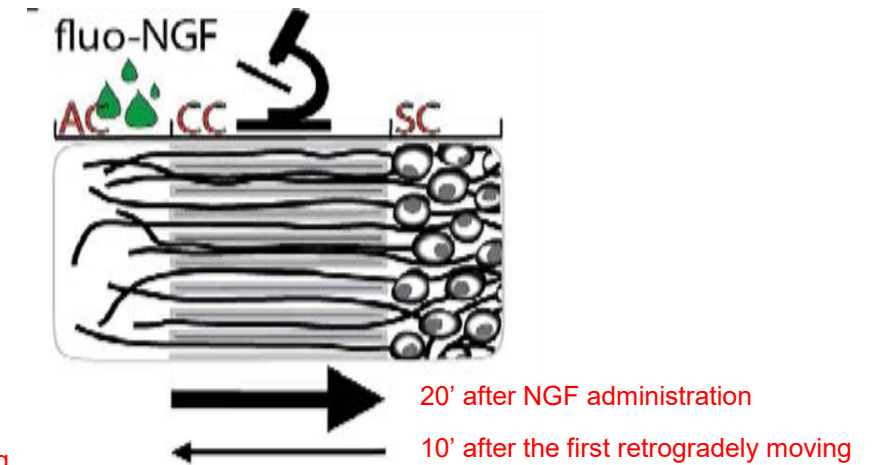
Trasporto

NGF
TrkA mediated

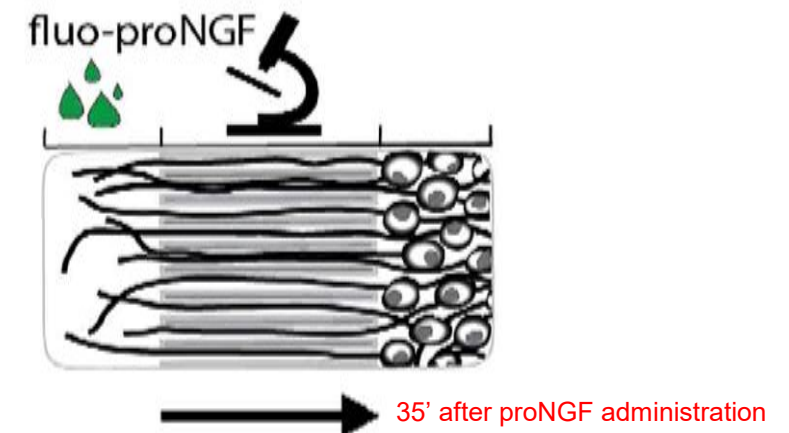
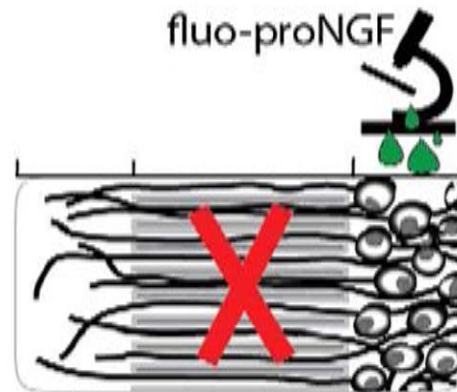
ANTEROGRADE



RETROGRADE

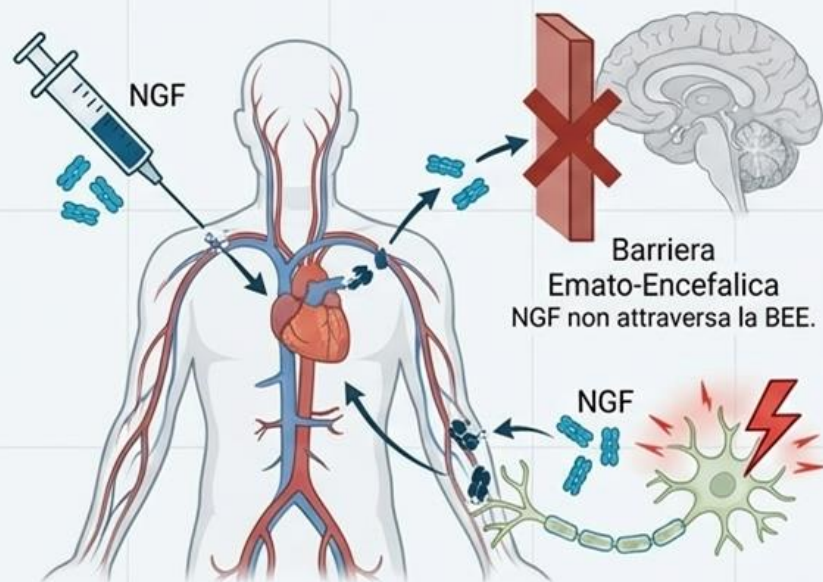


proNGF
TrkA/p75 mediated



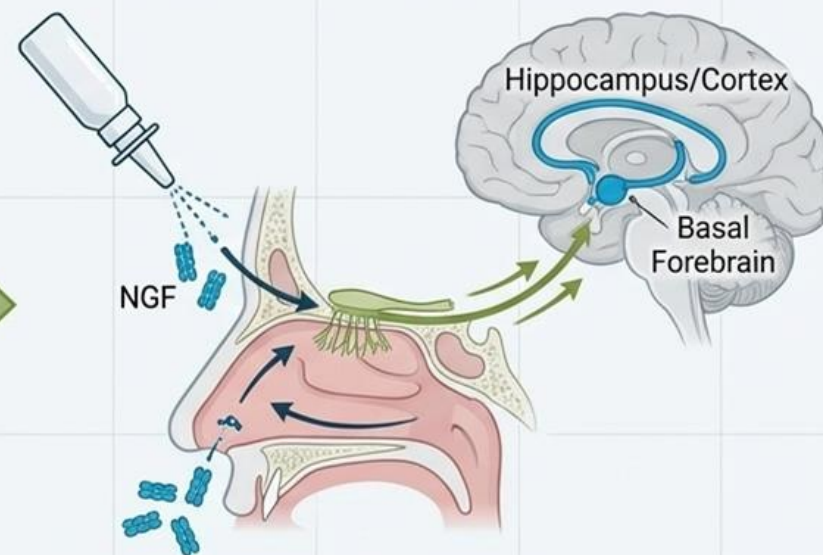
La Sfida Terapeutica: Come Trasformare l'NGF in un Farmaco?

Via Sistemica - Problematico



La somministrazione sistemica causa iperalgesia (dolore) per l'azione sui nocicettori.

Via Intranasale - La Soluzione



✓ Consegna diretta al SNC, minimizzando gli effetti collaterali sistemici.



oxervate
(CENEGERMIN)



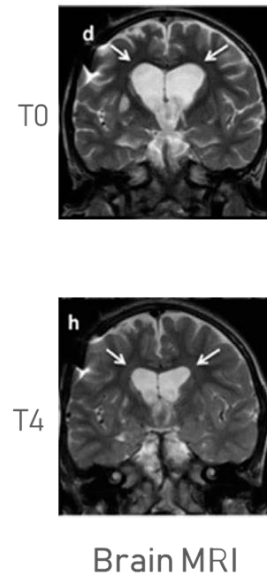
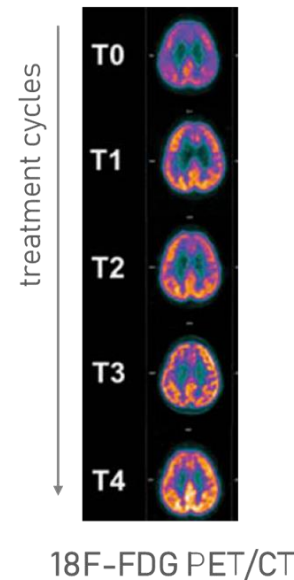
FDA

APPROVED

Intranasal Nerve Growth Factor administration improves cerebral functions in a child with severe traumatic brain injury: A case report

Antonio Chiaretti^a, Giorgio Conti^b, Benedetto Falsini^c, Danilo Buonsenso^a, Matteo Crasti^a, Luigi Manni^d, Marzia Soligo^d, Claudia Fantacci^a, Orazio Genovese^b, Maria Lucia Calcagni^e, Daniela Di Giuda^e, Maria Vittoria Mattoli^e, Fabrizio Cocciolillo^e, Pietro Ferrara^a, Antonio Ruggiero^f, Susanna Staccioli^g, Giovanna Stefania Colafati^h, and Riccardo Riccardi^f

improvement in brain
glucose metabolism



- Reduction in ventriculomegaly and subarachnoid spaces enlargement
- Normal cerebral liquor spaces
- Reduction of parenchymal brain lesions

Approcci Clinici Attuali: Dal laboratorio al paziente

Identificativo: RF-2018-12366594 (EudraCT: 2019-002282-35)

Studio sul Danno Cerebrale Traumatico (TBI)

Intervento

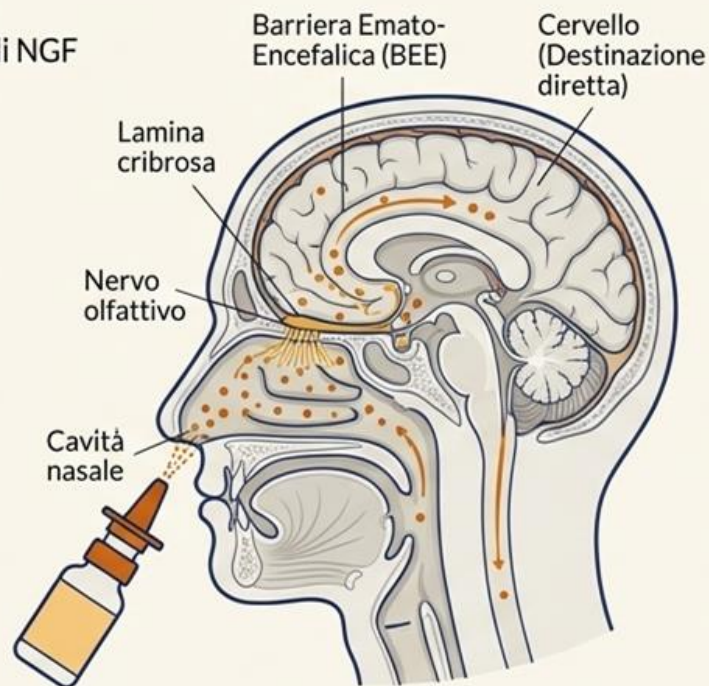
Somministrazione intranasale di NGF ricombinante (Cenegermin).

Indicazione

Danno cerebrale traumatico o ipossico/ischemico.

Razionale

La via intranasale bypassa la barriera emato-encefalica, consentendo al farmaco di raggiungere direttamente il cervello.



Identificativo: RF-2009-1536140 (EudraCT: 2008-001438-29)

Studio Preclinico/Osservazionale

Obiettivo

Comparazione tra NGF ricombinante e proNGF e identificazione di nuovi biomarker.



Identificazione Biomarker

Riepilogo di un Viaggio Scientifico e Orizzonti Futuri



Domande Aperte per il Futuro



- Possiamo modulare selettivamente il signaling di TrkA vs p75NTR con farmaci specifici?
- Quali altre patologie neurologiche potrebbero beneficiare di una terapia basata sull'omeostasi dell'NGF?