



Ricordo di Rita Levi–Montalcini

PIETRO CALISSANO

Devo dire che sono commosso dalle parole che avete pronunciato per Rita. Mi permetto di ricordarla per nome perché così mi aveva chiesto di chiamarla pochi mesi dopo il nostro incontro che ormai, tra l'altro, data di più di quaranta anni.

Ritengo che il modo migliore per ricordarla sia di riassumere brevemente i suoi studi. Naturalmente, non si può nel poco tempo concesso, sintetizzare il lavoro ed i contributi scientifici di una vita quasi interamente dedicata alla ricerca. Ho quindi pensato di ricordare le tre tappe che ritengo fondamentali nel percorso scientifico di Rita.

Siamo nel 1940. Da due anni le leggi razziali hanno impedito agli ebrei di lavorare in istituzioni pubbliche. Rita trascorre alcuni mesi in Belgio e ritorna di nuovo in Italia allestendo un piccolo laboratorio a casa dove continua a lavorare anche con il suo maestro Giuseppe Levi. Questo periodo della sua vita, viene rievocato in modo toccante nel suo *Elogio dell'imperfezione* e anche in altre memorie di quel periodo che potremo anche definire eroico.

In quegli anni gli embriologi lavoravano su un problema che era oggetto di accesi dibattiti: in che modo il territorio periferico, — un organo o un tessuto — regola la sopravvivenza delle cellule e delle fibre nervose che sono in fase di crescita in direzione di quegli organi? Era stato dimostrato, soprattutto lavorando sugli embrioni di pollo che allora rappresentavano un modello sperimentale di elezione, che esisteva una relazione precisa fra organi periferici da innervare e dimensione del sistema nervoso periferico: quanto più grande era il territorio, tanto maggiore era la sopravvivenza delle cellule nervose e la loro innervazione. Si tratta di un rapporto che potremmo definire di tipo quasi stechiometrico.

Questo problema fu investigato da Rita in collaborazione con Giuseppe Levi; i due studiosi confermarono l'esistenza di questa relazione

in una pubblicazione che Rita gentilmente mi donò in originale diversi anni fa, pubblicata dall'Accademia delle Scienze Pontificia. Il riassunto della pubblicazione è scritto in latino (Fig. 1).

Symmarivm. — Extirpato, ex pulli gallinacei fetu, tertio incubationis die, cruris nondum nervati primordio, Auctores scrutati sunt quomodo se habeat relativa spinalis medullae nervea regio, quamdiu fetus habeatur: itaque perspexerunt cellulas quidem in neurones differi incipere, sed mox regredi, quoniam nerveae fibrae, quae ex iis oriuntur, deficiente artu adolescere non possint; eas vero nerveorum centrorum cellulas, quae non discriminantur, nihil directe pati ex artus defectu. Nerveorum igitur centrorum evolutionem a suis cuiusque periphericis campis dirigi, non confrmatur his explorationibus

Naturalmente non è il latino di Cicerone, ma il linguaggio della scienza, forse un po' più arido; certamente Cicerone non si occupava di embrioni di pollo. Ho pensato di mostrarlo non solo per il suo significato scientifico, ma anche perché erano tempi davvero differenti da quelli odierni. Questa pubblicazione alla fine della guerra fu letta, così mi raccontava Rita, da Viktor Hamburger (Fig. 2), embriologo tedesco che era emigrato negli Stati Uniti negli anni trenta e studiava il problema del rapporto fra organi periferici e crescita delle fibre nervose.

L'ipotesi che avanzava Rita con Giuseppe Levi era che la relazione fra sistema nervoso ed organi periferici non era programmata nel patrimonio ereditario o frutto di qualche azione aspecifica del territorio periferico, ma al fatto che questo elaborava e rilasciava qualche sostanza, di natura da identificare, che faceva sopravvivere le cellule nervose e induceva la crescita delle loro fibre verso gli organi bersaglio. Viktor Hamburger invitò Rita ad andare per qualche tempo alla Washington University di Saint Louis per confrontarsi su questa ipotesi. Nel 1947 Rita si imbarcò su una nave *Liberty* diretta negli Stati Uniti (Fig.3) con l'intenzione di trascorrervi qualche mese ma, come accenna nella sua autobiografia, rimase negli USA per 20 anni. Su quella nave viaggiava anche Renato Dulbecco, che Rita conosceva già dai tempi del loro lavoro sotto la guida di Giuseppe Levi. Con loro, in quegli anni, lavorava un terzo ricercatore, Salvador Luria, che nel 1940 fuggì dalla Francia, invasa dalle truppe tedesche, e si imbarcò per gli USA. Così, nel dopoguerra, si ricostituiva un trio che io non esito a de-

Viktor Hamburger

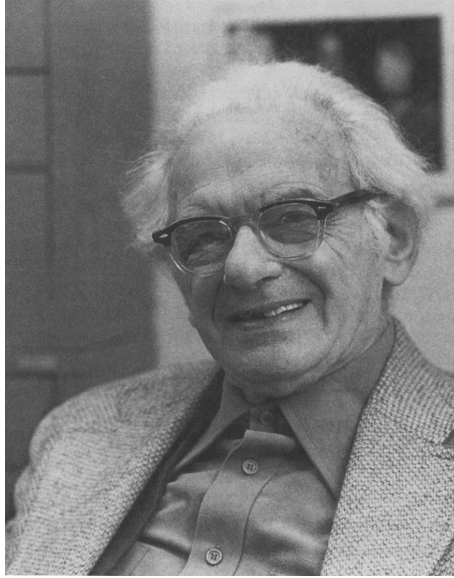


Figura 1

finire formidabile, perché tutti e tre questi scienziati furono in seguito insigniti del Premio Nobel. (Ho avuto il piacere e l'onore di scrivere questa avventura umana e scientifica per la casa editrice Codice in occasione dei 150 anni dell'Unità d'Italia. In quell'articolo sottolineavo l'interesse culturale di questa coesistenza di tre futuri vincitori del massimo premio scientifico, avviati e seguiti nella loro attività sperimentale da un solo maestro ed in un contesto universitario piuttosto ristretto). Giunta alla Washington University, Rita iniziò a lavorare con Viktor Hamburger sulla relazione neuroni/organismi periferici e in qualche anno giunse alla prima delle 3 sperimentazioni che ritengo fondamentali nel suo percorso scientifico. Era stato osservato da un giovane dottorando che lavorava sotto la guida di Hamburger, che se si impiantava un tumore nella cavità addominale di un embrione di pollo si verificava una massiccia crescita di fibre nervose (Fig. 4, immagine centrale).

Questo fenomeno fu interpretato dallo scienziato tedesco come evidenza che la crescita delle fibre nervose era dovuta semplicemente alla massa del territorio; infatti, anche una massa amorfa come quella di

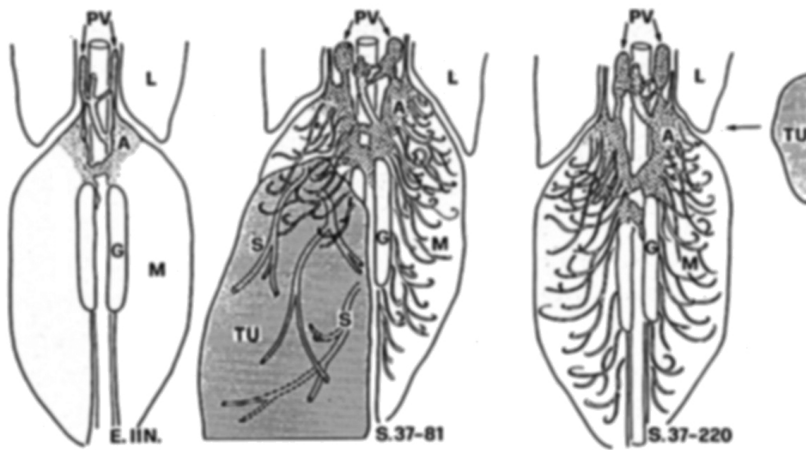


Figure 2. Semi-diagrammatic reconstruction of a normal 11-day chick embryo (E. 11N), of an 11-day embryo carrying an intra-embryonic transplant of mouse sarcoma (S. 37-81), and of an 11-day embryo with transplant of sarcoma 37 on the chorio-allantoic membrane (S- 37-220). Note the hyperplastic growth of the pre vertebral chain ganglia in embryos carrying tumor transplants. Visceral nerve fibers from these ganglia invade the nearby mesonephroi. A, adrenal; G, gonad; L, lung; M, mesonephros; PV, pre vertebral ganglia; S, sensory nerves; TU, tumor (from Ref. [12]).

tesi della scienziata torinese, al contrario, era che il tumore rilasciasse una qualche sostanza che induceva la crescita delle fibre nervose. Ragionò, inoltre, che se la spiegazione era corretta, la crescita avrebbe dovuto avvenire anche se il tumore era fisicamente separato, dal resto degli organi periferici innervati, tramite la membrana corioallantoidea che avvolge l'embrione come un involucro. Trapiantò il tumore sopra la membrana e dopo i tempi soliti dello sviluppo osservò i preparati istologici. Immagino lo stupore e la felicità di Rita quando osservò che anche se il tumore era trapiantato sopra la membrana, quindi era separato fisicamente dagli organi periferici, si verificava una crescita di fibre nervose che invadeva organi e tessuti (Fig. 4 immagine a destra).

Era la prova evidente della correttezza della sua ipotesi secondo la quale il tumore rilasciava una qualche sostanza che, diffondendo a distanza dal tumore, egualmente induceva la crescita delle fibre nervose. La sostanza, di natura diffusibile, responsabile della crescita delle fibre nervose fu denominata *nerve growth promoting factor* poi abbreviata in NGF. Si poneva, a questo punto, il problema di identificare la

natura chimico-fisica del NGF. Gli esperimenti sull'embrione di pollo erano molto lunghi e non permettevano una valutazione quantitativa della presenza di NGF, necessaria per tentare di isolarlo in forma pura. Quelli erano i tempi scientifici del più rigoroso riduzionismo, riassumibile nella affermazione attribuita a Jacques Monod seconda la quale «quello che vale per un batterio vale anche per un elefante» e, quindi, era più semplice analizzare il primo ed estrapolare i dati ottenuti all'animale. Del resto, colleghi ed amici di Rita quali Salvador Luria e Renato Dulbecco avevano adottato, per il loro studi, modelli semplici come il fago o le colture cellulari. Oggi sappiamo che le leggi generali della genetica, della biochimica e della biologia molecolare valgono per tutti gli organismi, ma quelli pluricellulari, per esempio, sono sottoposti ad un insieme consistente di fattori detti *epigenetici* che possono cambiare molto le regole fondamentali estrapolate dallo studio dei procarioti o di cellule coltivate in vitro, lontane dal loro contesto organismico.

In sostanza, Rita cercava un test semplice, tale da permettere di studiare e caratterizzare meglio il NGF. Ai tempi del lavoro sotto la guida di Giuseppe Levi, Rita aveva conosciuto Herta Meyer, che aveva imparato a crescere le cellule *in vitro* e si era trasferita a Rio De Janeiro nel dipartimento di Biofisica. Rita si imbarcò in aereo per Rio, portando nella sua borsa — così mi raccontò una volta ricostruendo il suo viaggio — alcuni dei topolini portatori del sarcoma 180 ricco dell'attività NGF che aveva testato negli esperimenti sull'embrione di pollo. (Questa annotazione di natura turistica ci ricorda come fossero differenti quelle modalità di viaggio rispetto a quelle di oggi). Dopo un paio di mesi di lavoro molto duro ed a tratti scoraggiante, intervallati da qualche svago turistico nella città, raccontati in lettere toccanti alla mamma ed alla sorella Paola, un test per la valutazione della presenza di NGF vide la luce (spostare qui la figura Fig. 5).

Si può osservare che i gangli sensoriali dell'embrione di pollo, espianati in vitro in vicinanza di un frammento di sarcoma, mostrano una impressionante crescita di fibre nervose, che formano un vero e proprio alone. Da notare che le fibre che crescono si dirigono verso il sarcoma, come i rami di una pianta verso i raggi del sole. Questo fenomeno di *tropismo* verso la sorgente di NGF è stata in seguito confermata da esperimenti *in vivo* ed è alla base di un processo fondamentale nello sviluppo del sistema nervoso, quando le fibre nervose

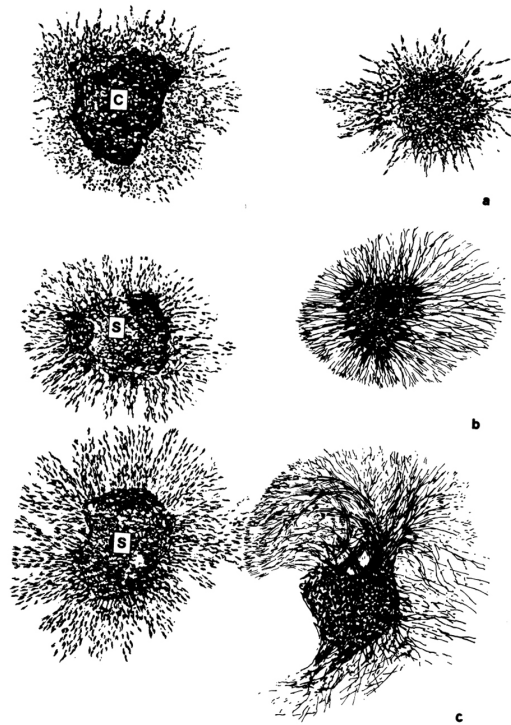


Figure 3. Drawings illustrating the in-vitro «halo» effect on 8-day chick embryo sensory ganglia cultured in the presence of fragments of mouse sarcoma 180 for 24 hours (b) or 48 hours (c). In (a), the ganglion, which faces a fragment of chick embryonic tissue, shows fibroblasts but few nerve fibers. In (b) and (c), the ganglia, facing fragments of sarcoma 180, 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.

in via di crescita debbono optare per la sorgente di NGF o di altre molecole deputate a funzionare come segnapassi. Si può ammirare l'eleganza del disegno, fatto da Rita, con la maestria di un'artista.

Con la messa a punto del test in vitro, che permetteva di identificare l'attività NGF nell'arco di poche ore e di valutarne in modo semiquantitativo la sua presenza, era finalmente disponibile un metodo per tentare l'identificazione e la caratterizzazione del NGF.

Rita e Viktor Hamburger, con il quale discuteva i suoi successi, erano embriologi e conclusero che era necessario un esperto di tecniche biochimiche per tentare di isolare e caratterizzare il NGF. Ricordando

la felice unione creativa che si sviluppò fra Rita e il giovane Stanley Cohen, con il quale iniziò questi tentativi, Rita mi riferì di una frase che Stanley le disse riferendosi alla loro collaborazione: «Rita, you and I are beautiful, but together we are wonderful». Questa collaborazione condusse alla parziale purificazione del NGF ed alla identificazione della sua natura proteica. Furono compiuti molti altri sforzi, proseguiti nel frattempo in Italia, ed in un numero crescente di laboratori, per giungere alla sua sequenza, al clonaggio del gene ed a una serie impressionante di studi che pongono il NGF fra le molecole di maggiore importanza nel panorama delle funzioni cerebrali. Ma questa è una storia scientifica che esula da queste annotazioni che riguardano esclusivamente le tappe fondamentali compiute da Rita nel suo periodo di circa venti anni alla Washington University.

L'indagine sul NGF, tuttavia, richiese una terza fase fondamentale, affinché l'importanza di questo fattore di crescita fosse riconosciuta dalla comunità scientifica internazionale.

Le comunicazioni di Rita sul NGF nei congressi scientifici erano oggetto di un'obiezione di fondo. Grazie al lavoro di Stanley Cohen e a un'osservazione molto fortunata, si era scoperto che esistevano quantità molto abbondanti di NGF non soltanto nel sarcoma e in altri tumori, ma anche nelle ghiandole dei veleni dei serpenti. Stanley Cohen identificò un'altra sorgente di NGF, ancora più ricca e più semplice da usare: la ghiandola sottomandibolare del topo adulto. L'obiezione dei critici — che ora potremmo anche definire un po' pretestuosa — sulla funzione del NGF, era: come si può classificare come "fisiologico", assimilabile in qualche modo ad un ormone, un fattore che è presente nei veleni dei serpenti e nelle ghiandole salivari, cioè in strutture a secrezione esocrina, mentre un ormone o altre sostanze circolanti sono prodotti da ghiandole endocrine? Siamo agli inizi degli anni sessanta, e Cohen e Rita idearono un esperimento che eliminò ogni obiezione di questa natura. Stanley Cohen produsse anticorpi diretti contro il NGF e li iniettò in ratti neonati, quando lo sviluppo del sistema nervoso periferico — che gli esperimenti *in vitro* avevano dimostrato essere particolarmente recettivo all'azione del NGF — è in una fase cruciale di sviluppo. Analizzando la catena dei gangli simpatici poco tempo dopo l'iniezione degli anticorpi anti-NGF, Rita scoprì che erano enormemente ridotti rispetto ai gangli di controllo (Fig. 6).

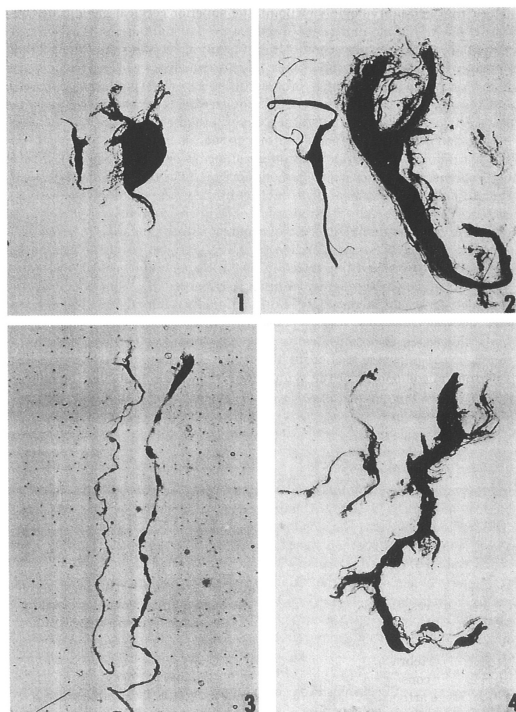


Figure 4. Whole mounts of superior cervical ganglia of control mice and mice treated with the antiserum to nerve growth factor (fig. 1); or superior cervical ganglia of control and treated rats (fig. 2); of stellate and thoracic chain ganglia of control and treated mice (fig. 3); and of celiac ganglia of control and treated mice (fig. 4). In all figures, the atrophic ganglia of the immunosympathectomized animals are the left and the control ganglia to the right.

In realtà tutta la catena simpatica è enormemente ridotta ed un esame istologico rivela la morte quasi totale delle cellule nervose che la compongono. L'effetto fu denominato *immunosympatectomia*, cioè distruzione del sistema simpatico tramite una metodologia immunologica. Era uno di quegli esperimenti che tanto piacevano a Rita, fornendo risposte *yes or no*, senza necessità di complesse analisi statistiche. In sostanza, la somministrazione di anticorpi diretti contro l'NGF sottraeva e neutralizzava il NGF circolante e distruggeva quasi totalmente il sistema nervoso simpatico, prova evidente della funzione "fisiologica" di questo fattore di crescita. A mio avviso, questa fu la prova più convincente contro le critiche mosse in precedenza. Siamo,

come accennato, agli inizi degli anni sessanta. Nel 1963 Vincenzo Caglioti, allora Presidente del CNR, invitò Rita a costituire un piccolo centro di Neurobiologia ospitato in alcuni laboratori dell'Istituto Superiore di Sanità. Nel 1965 conobbi Rita, la quale mi offrì una generosa borsa di studio per continuare gli studi sul NGF e sulle sue proprietà biologiche, ma non è questa l'occasione e la sede per descrivere il mio inserimento nel Centro di Neurobiologia. Nel 1986 Rita insieme a Stanley Cohen fu insignita del premio Nobel per la scoperta dei fattori di crescita ed io e la mia famiglia fummo invitati ad accompagnarla a Stoccolma in una sorta di generoso viaggio premio.

Vorrei terminare ricordando l'ultima opera di Rita, l'ultima fatica, che è stata quella di creare la Fondazione a cui hanno fatto cenno i miei amici e colleghi, denominata European Brain Research Institute (EBRI). Con questa fondazione Rita ci lascia una duplice eredità. A noi ricercatori di continuare gli studi sul NGF, estendendo le ricerche sulle crescenti possibilità di impieghi terapeutici e di incentivare il ritorno in Italia di giovani ricercatori residenti all'estero. Ma il messaggio, l'eredità di Rita, riguarda anche il nostro Paese ed il mondo della politica. Affinché il suo messaggio di vita e di lavoro non scompaia con la sua morte, è indispensabile che i semi scientifici che ha lasciato non vadano perduti ma, al contrario, perpetuati e allargati alle future generazioni di giovani neurobiologi.

Pietro Calissano

Uno dei XL
European Brain Research Institute – Rita Levi Montalcini (EBRI)
calissano@inmm.cnr.it