

Titolo: Un'analogia tra l'evoluzione della resistenza ai farmaci nelle comunità batteriche e nei tessuti maligni - An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tissues

Codice: MUT013

Autore: Lambert et al.

Data: 2013

Rivista: Nature Reviews Cancer **11**, 375–382

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3039>

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3488437/>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2022/09/10/mut013-lambert-et-al-2011/>

Parole chiave: cancro, batteri, adattamento, resistenza, mutazione

Tumore: n/a.

Traduzione: tradotto l'intero articolo con qualche taglio e semplificazione di alcune parti perché troppo tecniche.

Punti di interesse: Il ruolo dei processi evolutivi nella creazione della resistenza ai farmaci nelle comunità cellulari è noto ma poco compreso. I processi evolutivi sono importanti perché con la chemioterapia i tessuti maligni acquisiscono rapidamente fenotipi adattivi e resistenza. Ma come avviene questo processo? La visione tradizionale è quella secondo la quale questa evoluzione inizia casualmente. Inizia per caso in una cellula aberrante, le cui successive mutazioni casuali attivano capacità distintive come l'invasività e l'evasione della morte cellulare programmata. Ulteriori mutazioni casuali generano cellule che acquisiscono capacità di autosufficienza. Queste cellule rinunciano alle interazioni comunitarie benefiche dell'intero organismo, viene meno il controllo cellulare e si sviluppano fenotipi che interferiscono con la sopravvivenza dell'organismo ospite.

Gli autori di questo lavoro propongono una visione contrastante a quella tradizionale secondo la quale le mutazioni genetiche casuali da sole non sono sufficienti a spiegare la progressione della malignità. Invece, il cancro, e la sua progressione, deriverebbe da una risposta allo stress programmata, deterministica e collettiva, che viene eseguita da cellule interagenti che hanno anche una comunicazione complessa tra di loro e con il microambiente circostante.

L'interazione tra le cellule che cercano di sopravvivere sotto stress attiva un programma di sopravvivenza che facilita l'evoluzione e l'adattamento delle cellule maligne e premaligne. Le strategie evolutive utilizzate da batteri che favoriscono la generazione di eterogeneità genetica e fenotipica sotto stress esterno e quelle dei tumori sono incredibilmente simili. L'evoluzione della resistenza ai farmaci all'interno dei tessuti tumorali può essere più facilmente modellato e studiato in batteri in rapida evoluzione sotto stress.

Analogie di strategie di cellule/colonie batteriche e cellule/colonie tumorali sotto stress

Sia le cellule batteriche che quelle tumorali possono eludere la morte indotta dall'esposizione a tossicità attraverso vari meccanismi.

Movimento

La strategia più semplice è quella di spostarsi in un ambiente meno tossico. Ciò si ottiene attraverso il nuoto delle cellule batteriche e attraverso la metastasi delle cellule tumorali.

Protezione fisica dalla tossicità

In alternativa, la popolazione cellulare può creare un ambiente in cui il farmaco ha un accesso limitato alle cellule, creando una barriera fisica alla penetrazione del farmaco nella colonia. Questa è la funzione dei biofilm in una colonia batterica e la funzione del microambiente tumorale alterato (compreso il sistema vascolare) per le cellule tumorali.

La barriera fisica alla tossicità, da un lato limita l'esposizione delle cellule, ma crea limiti di approvvigionamento di risorse (ossigeno, nutrienti) e accumulo di metaboliti. Le cellule batteriche attivano l'espressione di vie fermentative in assenza di ossigeno, e questa via metabolica crea stress ossidativo endogeno all'interno del biofilm che a sua volta aumenta il tasso di mutazione delle cellule (vedi sezione Evolvibilità). Nei tumori, l'aumento del deposito di matrice non solo riduce l'efficacia dei farmaci chemioterapici per penetrare un tumore, ma riduce anche la quantità di ossigeno e sostanze nutritive che raggiungono il centro del tumore. Anche le cellule tumorali possono passare a una via fermentativa quando l'ossigeno non è disponibile, ma porta all'acidificazione del microambiente tumorale attraverso il rilascio e la fermentazione del lattato. Le cellule tumorali, tuttavia, sono in grado di sopravvivere ad ambienti stressanti attraverso forti interazioni reciproche con le cellule stromali. I tumori reclutano cellule nel loro microambiente, creano una comunità di cellule altamente specializzate che le proteggono dall'afflusso di farmaci e in grado di sostenere gli elevati bisogni metabolici delle cellule tumorali. Il cancro non è un insieme di cellule che si replicano in modo non organizzato e si evolvono in modo incontrollato; è un ecosistema altamente organizzato, dove le cellule tumorali reclutano cellule non tumorali per il funzionamento dell'ecosistema stesso.

Evolvibilità o instabilità genetica

L'evolubilità è la generazione di meccanismi che facilitano l'evoluzione, componente fondamentale per l'acquisizione della farmacoresistenza. Nei tumori si usa il termine equivalente di instabilità genomica.

Resistenza reversibile e resistenza permanente

Nelle comunità batteriche esistono frazioni di cellule che sono in uno stato che non rispondono alle proprietà citotossiche di un farmaco. Questo è stato definito "un fenotipo persistente" per le comunità batteriche. Nel caso di un tumore è stato recentemente descritto come un meccanismo per cui le cellule tumorali possono sfuggire alla morte causata dall'esposizione a farmaci. Questo meccanismo fornisce una resistenza ai farmaci però reversibile.

I meccanismi di resistenza ai farmaci più permanente ed ereditabile coinvolgono variazioni genetiche pre-esistenti all'interno della popolazione e la determinazione di nuove mutazioni. L'evolubilità nei sistemi batterici è basata sull'attivazione determinata di programmi di

sopravvivenza (programma SOS) espressi dai batteri sotto stress che promuovono mutazioni adattative e necessarie per la sopravvivenza della popolazione (vedi BOX1). Inoltre, lo stress ossidativo esterno può influire sulla fedeltà della trascrizione del DNA, in assenza di replicazione del DNA, creando proteine mutanti (mutagenesi trascrizionale).

Nonostante sia noto quello che accade nei batteri che rispondono ad una tossicità (attivazione del sistema SOS e induzione di instabilità genetica e di resistenza), nei tumori l'interpretazione tradizionale dell'evolubilità, e del motivo per cui appare così spesso causando farmacoresistenza, si basa ancora sul presupposto che tutto avvenga casualmente. Mutazioni casuali causano il fallimento dei processi di protezione del DNA, con l'attivazione casuale di una instabilità genetica. Ma se determinati programmi per generare instabilità genetica esistono fino dai batteri, come possiamo pensare che l'instabilità genetica in cellule eucariotiche sia prettamente casuale?

L'instabilità genetica nei tessuti cancerosi è, esattamente come nei batteri, una strategia organizzata che agisce come un acceleratore di adattamento. L'alto tasso di mutazione e un genotipo plastico necessari per adattarsi ad ambienti ostili e in continua evoluzione rappresentano l'espressione di strategie evolutive molto efficienti utilizzate fin dalle comunità batteriche. Le cellule tumorali non sono aberranti, invece sono "liberate" dai meccanismi di protezione cellulare che sono attivati in risposta a stress che non migliorano la sopravvivenza.

Sono i trattamenti tossici che determinano mutazioni, tumori e farmaco resistenza nei tumori. Non sono i tumori che mutano casualmente acquisendo resistenza. Non sono le mutazioni che causano il tumore. Sono le cellule normali e tumorali a determinare instabilità genica come strategia di difesa da una tossicità, per mettere in atto quei processi evolutivi che consentono plasticità genotipica e fenotipica e quindi resistenza e sopravvivenza.

Traduzione articolo

Riassunto

Le cellule tumorali evolvono rapidamente la resistenza ai farmaci attraverso l'evoluzione somatica e, al fine di continuare la crescita nella fase metastatica, violano il consenso dell'intero organismo sulla crescita regolata e sulle interazioni benefiche comunitarie. Sugeriamo che esista una connessione meccanicistica fondamentale tra la rapida evoluzione della resistenza alla chemioterapia nelle comunità cellulari all'interno dei tessuti maligni e la rapida evoluzione della resistenza agli antibiotici nelle comunità batteriche. Proponiamo che questa evoluzione sia il risultato di una risposta programmata e collettiva allo stress, eseguita dalle cellule interagenti e che, data questa connessione fondamentale, lo studio delle comunità batteriche può fornire approfondimenti sulle dinamiche di adattamento e sull'evoluzione delle cellule all'interno dei tumori.

C'è un accordo generale sul fatto che le varie "Guerre al cancro" che sono state dichiarate non hanno avuto il successo previsto: il tasso complessivo di mortalità per cancro è stato praticamente piatto negli ultimi 40 anni. Uno dei motivi che potrebbe spiegare questo fallimento è la mancanza di comprensione a livello fondamentale di come le cellule si evolvono in risposta ai trattamenti farmacologici e, più in generale, delle regole di base che controllano l'evoluzione sotto stress nel regno biologico. Proponiamo che una comprensione approfondita dei processi alla base

dell'evoluzione della farmacoresistenza nei tessuti maligni possa essere raggiunta considerando il problema dell'evoluzione del cancro da un punto di vista più generalista. Proponiamo che si possa ottenere una comprensione sostanziale delle dinamiche evolutive e di adattamento dei tessuti tumorali studiando le strategie evolutive utilizzate da microrganismi più semplici e in rapida evoluzione (come i batteri) in risposta a trattamenti farmacologici e ambienti stressanti.

Nelle sezioni seguenti, per prima cosa riconsideriamo l'attuale visione dell'evoluzione del cancro alla luce delle strategie utilizzate dalle comunità batteriche. Quindi, confrontiamo le risposte allo stress delle comunità batteriche e mostriamo che possono essere utilizzate per studiare l'evoluzione della resistenza ai farmaci nei tumori. Descriviamo quindi gli aspetti comuni dei tessuti cancerosi, la cui comprensione può trarre vantaggio dall'utilizzo di modelli batterici. Infine, proponiamo e rivediamo approcci sperimentali specifici che utilizzano sistemi di modelli batterici che possono approfondire la nostra comprensione dei fondamenti dell'evoluzione e dell'adattamento del cancro.

Una visione alternativa dell'evoluzione del cancro

Il ruolo dell'evoluzione nella determinazione della resistenza ai farmaci nelle comunità cellulari è noto per essere importante ma rimane poco compreso. La domanda, ovviamente, non è se l'evoluzione avvenga, ma come avvenga. I processi evolutivi sono chiaramente importanti perché il problema cruciale nella chemioterapia è che i tessuti maligni acquisiscono rapidamente fenotipi adattivi e quindi evolvono la resistenza ai farmaci attraverso l'evoluzione somatica. Ma come avviene? La visione tradizionale è quella secondo la quale questa evoluzione inizia per caso in una cellula aberrante e le successive mutazioni attivano capacità distintive (1) come l'invasività e l'evasione della morte cellulare programmata. Ulteriori mutazioni casuali generano cellule che hanno acquisito capacità autosufficienti. Queste cellule rinunciano al consenso dell'intero organismo sulle interazioni benefiche comunitarie e sviluppano fenotipi che interferiscono con la sopravvivenza dell'organismo ospite, portando ad un'eventuale rottura nel controllo cellulare. La moderazione dell'effetto negativo dei tratti maligni acquisiti ha guidato la filosofia e la logica di base per lo sviluppo di terapie mirate (2-4). Questo approccio, tuttavia, ha avuto scarso successo negli ultimi decenni (5) perché le cellule all'interno del tumore diventano inesorabilmente resistenti ai farmaci chemioterapici (6).

Proponiamo una visione contrastante in cui le lesioni genetiche casuali da sole non sono sufficienti a spiegare la progressione della malignità. Invece, il cancro deriva da una risposta allo stress programmata, deterministica e collettiva che viene eseguita da cellule interagenti che hanno anche una comunicazione complessa con il microambiente circostante. L'interazione tra le cellule che cercano di sopravvivere sotto stress attiva un programma di sopravvivenza che facilita l'evoluzione e l'adattamento delle cellule maligne e premaligne. Sfortunatamente, questo sviluppo programmatico si verifica in un microambiente altamente complesso e dinamico che è stato difficile da studiare a livello di base nei tessuti tumorali.

Proponiamo che una comprensione più profonda dei processi alla base dell'evoluzione e della metastasi del cancro possa essere raggiunta considerandoli alla luce delle strategie utilizzate da organismi più semplici come i batteri. Come discuteremo di seguito, le strategie evolutive utilizzate dai batteri, come le risposte collettive che favoriscono la generazione di eterogeneità genetica e fenotipica sotto stress esterno, sono parallele a quelle utilizzate dalle cellule tumorali.

Il ruolo dello stress nell'evoluzione

Sia le cellule batteriche che quelle tumorali possono eludere la morte indotta dall'esposizione a farmaci attraverso vari meccanismi. La strategia più semplice è quella di spostarsi in un ambiente che contiene una concentrazione più bassa di un agente citocida. Ciò si ottiene attraverso il nuoto delle cellule batteriche e attraverso la metastasi delle cellule tumorali (7,8). In alternativa, la popolazione cellulare può creare un ambiente in cui il farmaco ha un accesso limitato alle cellule. È stato dimostrato che questa è una funzione dei biofilm in una colonia batterica e la funzione del microambiente tumorale alterato (compreso il sistema vascolare) per le cellule tumorali (9-11). Uno dei metodi più intriganti per eludere la morte in entrambe le popolazioni cellulari dipende da un meccanismo probabilistico di commutazione fenotipica (12-13). In questa situazione, una piccola frazione della popolazione di cellule batteriche o tumorali si trova in uno stato che non risponde alle proprietà citotossiche del farmaco. Questo è stato definito "un fenotipo persistente" per le comunità batteriche (12) ed è stato recentemente descritto come un meccanismo per cui le cellule tumorali possono sfuggire alla morte causata dall'esposizione a farmaci (13). Questo meccanismo fornisce una resistenza ai farmaci altamente reversibile. I meccanismi di resistenza ai farmaci più permanente ed ereditabile nelle cellule tumorali coinvolgono variazioni genetiche preesistenti all'interno della popolazione e la generazione di mutazioni nuove che forniscono mutazioni intrinseche o farmacoresistenza acquisita (14-17). Questi meccanismi possono essere particolarmente importanti per l'evoluzione della resistenza ai farmaci quando si verificano come risposte allo stress.

Per sottolineare ciò, proponiamo di considerare l'evolubilità, che è definita come la generazione di meccanismi che facilitano l'evoluzione (18), come una componente fondamentale della farmacoresistenza. In particolare, l'esistenza di individui con tassi di mutazione relativamente elevati (un fenotipo mutatore) in una comunità di cellule è un fenomeno ampiamente noto sia per il cancro (19) che per i batteri (20). Questo fenotipo mutatore può essere selezionato (21) ed è stato dimostrato che aumenta il tasso di adattamento di un organismo allo stress (22).

Quando si verifica solo in una sottopopolazione di batteri, la mutagenesi indotta da stress non è considerata una responsabilità; piuttosto, è benefico per la popolazione nel suo insieme (23,24). L'evolubilità nei sistemi batterici non deriva necessariamente da mutazioni o alterazioni dei meccanismi di protezione del DNA: i programmi di sopravvivenza espressi dai batteri sotto stress promuovono mutazioni adattative e sono spesso necessari per la sopravvivenza di una popolazione (15). Nel caso di stress da fame in *Escherichia coli*, le mutazioni adattative sono effettuate mediante l'attivazione di un sistema di riparazione del DNA a doppia elica (DSB) soggetto a errori (25,26) (vedi BOX 1 per una descrizione delle analogie tra meccanismi di riparazioni del DNA nei batteri e nell'uomo). Allo stesso modo, la rapida evoluzione della resistenza a un agente genotossico come la ciprofloxacina, della famiglia degli antibiotici dei chinoloni, ha origine da mutazioni puntiformi causate dalla ricombinazione del DNA indotta dalla risposta SOS (27). Inoltre, lo stress ossidativo esterno spesso influisce sulla fedeltà della trascrizione del DNA (lettura del DNA per la formazione delle proteine), in assenza di replicazione del DNA. Questo a sua volta porta alla produzione di proteine mutanti senza alterazioni (o mutazioni) permanenti nel modello del DNA, un processo noto come mutagenesi trascrizionale (28).

Al contrario, l'interpretazione tradizionale dell'evolubilità e del motivo per cui appare così spesso

nei tessuti tumorali - dove viene solitamente definita instabilità genetica (29) - spesso si basa sul presupposto che mutazioni casuali causino il fallimento dei processi di protezione del DNA. Invece, proponiamo che l'instabilità genetica nei tessuti cancerosi sia una strategia organizzata che agisce come un acceleratore di adattamento, simile al ruolo dei fenotipi mutatori nelle popolazioni batteriche.

Da questo punto di vista, un alto tasso di mutazione e un genotipo plastico sono una strategia batterica collaudata, necessaria per adattarsi ad ambienti ostili e in continua evoluzione.

Interpretiamo il tasso di mutazione potenziato e l'instabilità genetica di una popolazione tumorale come l'espressione di strategie evolutive molto efficienti utilizzate dalle comunità batteriche; le cellule tumorali non sono aberranti, invece sono "liberate" dai meccanismi di protezione cellulare che sono attivati in risposta a stress che non migliorano la sopravvivenza. In questo senso, gli attuali approcci terapeutici che mirano a cellule che si replicano rapidamente sono destinati a fallire, perché i collettivi cellulari sono spesso in grado di eludere l'eradicazione completa esprimendo un fenotipo mutevole per riprogrammarsi. Inoltre, anche le cellule in uno stato inattivo di replicazione del DNA, uno stato che di solito non è preso di mira dalla chemioterapia, possono contribuire alla sopravvivenza sotto stress attraverso la mutagenesi trascrizionale (mutazioni a livello della formazione di proteine) e la retromutagenesi (30). Proponiamo che la capacità di resistere a un trattamento chemioterapico o di sopravvivere in ambienti stressanti debba essere vista come una dimostrazione che le cellule si sono collettivamente adattate con successo ad ambienti nuovi e più ostili.

Biofilm e stroma tumorale

Una delle risposte fisiologiche dei batteri allo stress esterno è l'assemblaggio in un biofilm (vedi BOX 2 per maggiori dettagli riguardanti i biofilm e lo sviluppo del biofilm). *Pseudomonas aeruginosa* è spesso usato come modello di sviluppo del biofilm (31); in coltura, producono una matrice di esopolimero che protegge le cellule dagli stress ambientali circostanti. La formazione di un biofilm aumenta notevolmente la resistenza di una popolazione a un ambiente ostile proteggendo le cellule, ad esempio, dagli antibiotici. I biofilm, tuttavia, limitano l'afflusso di nutrienti e ossigeno a causa della maggiore diffusione di sostanze chimiche attraverso la matrice del biofilm (32). Sebbene le cellule batteriche attivino l'espressione di vie fermentative in assenza di ossigeno (33), questa via metabolica crea stress ossidativo endogeno all'interno della matrice esopolimerica, che a sua volta aumenta il tasso di mutazione delle cellule (34).

Perché i batteri dovrebbero ancora voler vivere in un ambiente così ostile (auto-creato)? In realtà, invece di cercare di combattere questo ambiente mutageno, le cellule di *P. aeruginosa* lo abbracciano. Mantengono una piccola popolazione di fenotipi mutatori (0,5-5%) in cui i geni coinvolti nella protezione contro lo stress ossidativo sono sottoregolati. Questi geni includono quello di un enzima che codifica per una catalasi necessaria per la decomposizione del perossido (34). La sottoregolazione di questo enzima fornisce tassi di mutazione cellulare fino a 100 volte superiori rispetto alle cellule non nel biofilm che nuotano liberamente (34). Campioni di biofilm di *P. aeruginosa* estratti da pazienti affetti da fibrosi cistica contengono quasi sempre cellule che esprimono un fenotipo mutatore, molte delle quali sono resistenti a più antibiotici (35,36). Di conseguenza, le cellule nei biofilm sono in grado di sviluppare resistenza a molteplici agenti

antimicrobici molto più rapidamente (37) e, mantenendo solo una piccola frazione della popolazione in uno stato ipermutativo, non accumulano mutazioni dannose e fatali nel resto della popolazione clonale (38).

Allo stesso modo, il cancro non è solo un insieme di cellule che si replicano e si evolvono in modo incontrollabile; è un ecosistema (39,40). Le cellule che circondano un tumore (come fibroblasti, cellule immunitarie e cellule endoteliali) fanno parte di un tessuto tumorale e coevolvono con le cellule tumorali. Ad esempio, le cellule stromali come i fibroblasti associati ai tessuti cancerosi aumentano la produzione di matrice extracellulare (ECM) (41). Simile ai biofilm batterici, l'aumento del deposito di matrice non solo riduce l'efficacia dei farmaci chemioterapici per penetrare un tumore (42-44), ma riduce anche la quantità di ossigeno e sostanze nutritive che raggiungono il centro del tumore. Analogamente ai biofilm, anche le cellule tumorali possono passare a una via fermentativa quando l'ossigeno non è disponibile: la glicolisi anaerobica consente alle cellule di produrre ATP ma porta inavvertitamente all'acidificazione del microambiente tumorale attraverso il rilascio e la fermentazione del lattato (45).

Le cellule tumorali, tuttavia, sono in grado di sopravvivere ad ambienti stressanti attraverso forti interazioni reciproche con le cellule stromali (46): è stato recentemente dimostrato che i fibroblasti e le cellule endoteliali alterano le loro vie metaboliche per supportare la glicolisi intensiva delle cellule tumorali, di cui è stato presentato un esempio per un carcinoma colorettale (47).

Koukourakis et al. hanno dimostrato che i fibroblasti che circondano un carcinoma del colon-retto hanno un aumento del metabolismo del lattato per far fronte alla glicolisi aerobica delle cellule tumorali (47). Hanno anche dimostrato che le cellule endoteliali che circondano questo particolare tipo di carcinoma hanno un'avversione all'assorbimento del lattato, che impedisce così la produzione di acido vicino ai vasi sanguigni⁴⁷.

Quando i tumori reclutano cellule nel loro microambiente, creano una comunità di cellule altamente specializzate in grado di sostenere gli elevati bisogni metabolici delle cellule tumorali e che le proteggono dall'afflusso di farmaci. Presi come tali, i livelli di specializzazione riscontrati in un collettivo di cellule epiteliali-stromali sono, a un livello fondamentale, strategicamente simili alle comunità di biofilm batterici. La comprensione della complessa interazione simbiotica tra i diversi tipi cellulari all'interno di un tumore può essere facilitata dal confronto analogo con i biofilm batterici.

Studiare l'evoluzione della farmacoresistenza

Questo confronto tra le cellule all'interno di un tessuto maligno e le comunità batteriche, due organismi apparentemente diversi, ha un grande potenziale per andare oltre le interpretazioni filosofiche. Di seguito, delineiamo diversi sistemi sperimentali che possono essere utilizzati per ottenere informazioni sull'evoluzione della resistenza ai farmaci e dello sviluppo del tumore.

Ambiente culturale eterogeneo

In assenza di un trattamento chemioterapico, la fitness delle cellule sulla superficie del tumore, vicino al sistema vascolare, può essere molto superiore alla fitness delle cellule all'interno di un tumore. Durante i trattamenti chemioterapici, la fitness spaziale delle cellule all'interno di un tumore è ancora più complessa: eterogeneità spaziali e scarsa vascolarizzazione possono produrre concentrazioni irregolari di farmaci, nutrienti e/o ossigeno. Inoltre, la suddivisione di un

microambiente tumorale in habitat multipli limita le interazioni cellula-cellula ma consente comunque lo scambio delle cellule tumorali circolanti tra i tumori (50). Questo tipo di configurazione crea microambienti isolati in cui l'evoluzione avviene in parallelo, con scambi limitati. Studiare la dinamica dell'adattamento delle cellule tumorali in tali condizioni è praticamente impossibile utilizzando le tecniche di coltura cellulare convenzionali.

L'uso di tecnologie microfluidiche in grado di creare gradienti chimici su volumi molto piccoli (centinaia di picolitri) rende possibile questo tipo di studio. Esperimenti basati sulla microfluidica, potrebbero non solo fornire informazioni sulla dinamica generale dell'adattamento nei sistemi biologici, ma potrebbe anche fornire informazioni sulla dinamica dell'evoluzione delle cellule tumorali.

Sfruttamento di un modello di biofilm di tumorigenesi

Sebbene la biologia alla base dei biofilm batterici e dei tessuti cancerosi possa essere molto diversa, i biofilm possono ancora essere utilizzati per modellare fisicamente la dinamica della popolazione dei tumori in evoluzione. Infatti, le analisi genetiche spaziali e temporali di un singolo tessuto maligno mostrano che concetti semplici come la deriva genetica e l'espansione clonale svolgono un ruolo importante nell'evoluzione dei tessuti cancerosi (58). Inoltre, la composizione genetica di un tumore è molto più complessa di quella suggerita dall'ipotesi che un tumore sia monoclonale (59, 60). Esperimenti con biofilm su popolazioni batteriche possono essere usati per monitorare la fissazione e l'espansione delle mutazioni all'interno di un biofilm, anche applicando un trattamento antibiotico alle colture di biofilm e misurando il modo in cui le cellule si adattano in risposta. La dinamica di diffusione della resistenza potrebbe essere utilizzata per dedurre come la resistenza ai farmaci si diffonda anche all'interno dei tessuti cancerosi. La potenza dei modelli batterici deriva dalla loro relativa facilità di coltura e dalla capacità di monitorare in modo più accurato l'espressione genica in tempo reale utilizzando reporter di proteine fluorescenti.

Comunicazione cellula-cellula sotto stress

I batteriologi usano spesso concetti presi in prestito dalla teoria dei giochi per spiegare la complessa comunicazione cellula-cellula tra diverse specie batteriche (61). Ad esempio, i risultati presentati da Lee et al. (62) indicano che le comunità batteriche possono adattarsi collettivamente ai trattamenti antibiotici quando l'onere di una pulizia tossica è posto sulle spalle di pochi individui "altruisti" a beneficio di molti.

Una situazione analoga può essere presente in un collettivo tumorale: come discusso in precedenza, le cellule stromali spesso modellano il loro metabolismo per sostenere la proliferazione delle cellule cancerose vicine (47). Altri comportamenti simili e comuni, come una forte interdipendenza dalla produzione e dalla digestione dei metaboliti, si osservano anche nei tessuti cancerosi (63). Inoltre, Hickson et al. (64) hanno anche proposto che le cellule tumorali possano mostrare comportamenti simili al quorum sensing, un meccanismo di regolazione batterica in cui i singoli batteri sondano i loro vicini per decidere se esprimere o meno determinati geni (65).

Le interazioni tra le cellule in un tumore possono anche essere interpretate usando concetti di teoria dei giochi (comprese idee come cooperazione, imbroglio e altruismo (66)), e tali concetti sono spesso usati quando si interpretano le interazioni cellula-cellula simili che si osservano nelle comunità batteriche. I ricercatori possono trarre vantaggio dal considerare la ricchezza dei sistemi di

comunicazione batterica, formulare nuove ipotesi sul comportamento di una cellula cancerosa considerando i tessuti cancerosi come comunità fortemente interagenti piuttosto che come gruppi di organismi unicellulari indipendenti.

I sistemi batterici come modelli predittivi del tumore

Sebbene sarebbe ingenuo credere che i batteri possano sostituire i topi, che condividono molti oncogeni e geni oncosoppressori con l'uomo (67), come organismo modello per lo sviluppo del cancro, la relativa semplicità di un genoma batterico può essere un vantaggio considerevole quando si studia la dinamica multicellulare del cancro evolutivo. Associando percorsi oncogenici noti nel cancro umano con percorsi regolatori simili in un batterio, i ricercatori potrebbero essere in grado di utilizzare i batteri per simulare la risposta allo stress delle cellule tumorali (68-72).

Limitazioni del modello e osservazioni conclusive

Sebbene ci siano molte somiglianze tra le comunità batteriche e le popolazioni di cellule tumorali nella loro capacità di eludere la morte causata dall'esposizione ai farmaci, esistono indubbiamente anche differenze. Un aspetto è la maggiore diversità dei componenti cellulari che esistono in un tessuto maligno rispetto a una comunità batterica. Le interazioni concertate tra cellule endoteliali, cellule immunitarie, fibroblasti e cellule epiteliali sono tutte necessarie per la formazione di un tumore maligno e lo sviluppo di resistenza o tolleranza ai farmaci. Sebbene le cellule batteriche abbiano funzioni specializzate all'interno di una comunità batterica, la diversità dei componenti cellulari non è così grande come nei tumori. Un secondo aspetto può riguardare la differenza nella complessità dei due genomi. Il genoma dei mammiferi ha sviluppato strati perfezionati di controlli epigenetici che non esistono necessariamente nella regolazione dell'espressione genica batterica. In conclusione, l'obiettivo di questa prospettiva è di ampliare l'ambito della ricerca sul cancro per includere l'uso di popolazioni batteriche come sistemi modello biologici per l'adattamento e l'evoluzione. Le strategie evolutive utilizzate da batteri e tumori sono incredibilmente simili e ipotizziamo che una comprensione significativa delle dinamiche evolutive delle popolazioni tumorali potrebbe essere ottenuta da un confronto informato tra i due sistemi attraverso un'analisi multiscala. L'evoluzione della resistenza ai farmaci all'interno dei tessuti tumorali, un problema importante che ha implicazioni dirette per l'esito clinico, può essere più facilmente modellato e studiato in batteri in rapida evoluzione sotto stress.

BOX 1

Meccanismi di riparazione del DNA

Diversi meccanismi proposti per la riparazione del DNA e la risposta allo stress nelle cellule umane hanno analoghi nel mondo batterico. Sebbene il fallimento dei processi che normalmente salvaguardano le cellule umane sia stato tradizionalmente legato ad una maggiore suscettibilità alla tumorigenesi, nei batteri tali processi sono generalmente associati ad una maggiore adattabilità.

Rotture a doppio filamento (Double strand breaks DSB)

Nelle cellule umane, la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA (DSB) è implementata da varie proteine di risposta al danno del DNA, tra cui BRCA1 (73) e alterazioni in BRCA1 sono associate al cancro. Nei batteri, la risposta ai DSB è svolta dal sistema SOS (74,75). La riparazione

dei DSB può essere essa stessa mutagena sia nei batteri che negli eucarioti: l'attivazione dei meccanismi di riparazione dei DSB è associata a un aumento del tasso di mutazione dovuto all'uso di DNA polimerasi soggette a errori (76,77). Tuttavia, la mutagenesi indotta da DSB è ancora notevolmente aumentata nelle cellule umane carenti di BRCA1 rispetto a quelle con corretti livelli di BRCA1.

Riparazione del disallineamento (Mismatch repair MMR)

La riparazione del disallineamento del DNA (MMR) nelle cellule umane viene eseguita da diverse combinazioni di diverse proteine MLH e MSH. I difetti dell'MMR sono spesso associati a una maggiore instabilità genomica. Allo stesso modo, nei batteri, i difetti nelle proteine MMR MutL o MutS elevano i tassi di mutazione, aumentando così la probabilità di sviluppare resistenza agli antibiotici; i batteri del fenotipo mutatore con sistemi MMR del DNA alterati si trovano spesso nelle infezioni persistenti del biofilm da *Pseudomonas aeruginosa* (78).

Ricombinazione omologa

La famiglia del gene RAD51 codifica per le proteine necessarie per la ricombinazione omologa nelle cellule umane. BRCA2, un gene oncosoppressore, svolge un ruolo importante nella riparazione del DNA mediata dalla ricombinazione omologa (79) e le mutazioni in BRCA2 riducono la stabilità genomica (80). La ricombinazione omologa nei batteri viene effettuata dalla proteina di ricombinazione del DNA RecA, un analogo di RAD51.

Regolazione del ciclo cellulare

p53, il prodotto del gene oncosoppressore TP53, regola l'uscita dal ciclo cellulare in condizioni di stress ed è coinvolto nella regolazione dell'espressione dei geni custodi del DNA (82). Le mutazioni in TP53 si trovano in un'ampia frazione delle lesioni tumorali (83) e sono spesso associate a una proliferazione prolungata nonostante il danno al DNA o lo stress esterno (82). Allo stesso modo, il fattore σ della RNA polimerasi (RpoS) regola l'ingresso nella fase stazionaria (G0) del ciclo cellulare batterico e promuove l'espressione dei geni di riparazione del DNA (68). I ruoli e le funzioni di p53 e RpoS sono simili: entrambi aiutano a mantenere l'integrità genetica in risposta allo stress ambientale. Le alterazioni sia in TP53 che in rpoS (in *Escherichia coli*) spesso forniscono un vantaggio di crescita nonostante lo stress esterno (69).

BOX 2

Comunità cellulari batteriche

Una risposta naturale all'aumento dei livelli di stress in molte specie di batteri è la formazione di biofilm, in cui le cellule si assemblano e producono grandi quantità di una matrice esopolimerica a base di polisaccaridi (84). Il programma di sviluppo del biofilm di solito inizia con la produzione collettiva di una matrice esopolimerica densa e chimicamente inerte da parte delle cellule come risposta a stress esterni (come variazioni del pH e dell'osmolarità, fame) (85). La formazione di biofilm è benefica per la popolazione cellulare nel suo insieme, in quanto consente alle cellule di sopravvivere in ambienti altamente stressanti che impediscono la sopravvivenza delle cellule che nuotano liberamente (85). Poiché la diffusione di metaboliti e sostanze chimiche all'interno della matrice è fortemente limitata (32), il microambiente creato dal biofilm è altamente eterogeneo e

fisiologicamente stressante (86). Tuttavia, la produzione di biofilm è accompagnata da un alto livello di specializzazione all'interno della comunità batterica. Ad esempio, sottopopolazioni di batteri all'interno di un biofilm, ciascuna a poche centinaia di micrometri l'una dall'altra, possono alternativamente crescere aerobicamente, elaborare i nutrienti attraverso percorsi di fermentazione, digerire l'acido solfidrico prodotto da altre cellule o resistere alle elevate forze di taglio vicino al bordo del biofilm (33,86). Negli esseri umani con infezioni batteriche, il trattamento antibiotico è spesso inefficace perché la limitata diffusione all'interno del biofilm diminuisce la dose efficace che può raggiungere i batteri. Pertanto, i biofilm sono una fonte riconosciuta di infezioni batteriche ricorrenti e persistenti (87,88). Quando i batteri si assemblano, la morte cellulare e la lisi cellulare contribuiscono alla formazione di cavità all'interno del biofilm (31). La presenza di tali cavità nei biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* consente alle cellule di riguadagnare uno stato di nuoto libero e di spostarsi in un habitat diverso (89), non diversamente da un'espansione metastatica di un tumore umano primario.

Glossario

Altruismo: comportamenti che avvantaggiano un altro individuo mentre comportano un costo per se stessi

Biofilm: un aggregato multicellulare di batteri e la sua matrice proteica associata formata in risposta a stress esterno

Cheating: una strategia in cui gli individui non collaborano ma beneficiano comunque delle interazioni positive con gli individui che cooperano

Espansione clonale: crescita della popolazione svolta principalmente da un singolo genotipo

Cooperazione: azioni o comportamenti utili ad altri individui

Fibrosi cistica: una malattia ereditaria che provoca l'accumulo di muco denso nei polmoni e nel tratto digestivo

Agente citocida: molecola o farmaco che causa la morte cellulare

Matrice di esopolimero: matrice extracellulare a base di polisaccaridi secreta collettivamente dai batteri nei biofilm. La matrice collega le cellule insieme e agisce come un microambiente protettivo

Teoria dei giochi: una teoria matematica che descrive i costi e i benefici associati alle interazioni tra gli individui di un gruppo. Questa teoria è più spesso utilizzata in economia e biologia evolutiva

Deriva genetica: processo attraverso il quale la frequenza dei geni nelle popolazioni oscilla perché la selezione avviene principalmente per caso

Vantaggio di crescita in fase stazionaria: (GASP). Un fenotipo che consente ad alcune cellule batteriche di superare le cellule di tipo selvaggio mantenendo uno stato proliferativo mentre le cellule di tipo selvaggio cessano di crescere ed entrano in fase stazionaria

Commutazione fenotipica: la capacità degli organismi di alternarsi tra due stati distinti per adattarsi ad ambienti fluttuanti

Retromutagenesi: un processo per cui il danno al DNA che provoca cambiamenti nell'accoppiamento delle basi viene incorporato nel genoma. Ciò può verificarsi se una proteina mutante risultante dalla mutagenesi trascrizionale provoca il rapido riavvio della replicazione del DNA, determinando così una lesione genetica che altera l'accoppiamento di basi copiato da una DNA polimerasi prima che la lesione venga riparata e quindi alterando la sequenza del DNA

Risposta SOS: una risposta globale al danno del DNA nei batteri che comporta l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione e ricombinazione del DNA mutageno

Source-sink ecology: un modello teorico utilizzato per descrivere la dinamica di una popolazione all'interno di habitat che promuovono la crescita (sorgente) o inducono la morte (sink)

Mutagenesi trascrizionale: un processo mediante il quale vengono tradotte proteine con funzioni alterate perché le RNA polimerasi trascrivono l'mRNA da uno stampo contenente danni al DNA