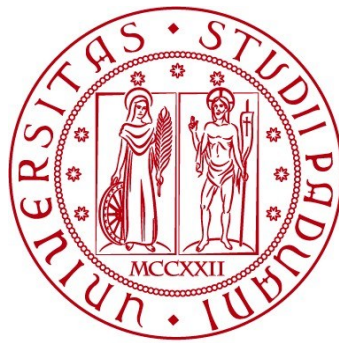


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Il microbioma tumorale umano è costituito da batteri  
intracellulari specifici per ogni tipo di tumore.**

**Tutor: Dr.ssa Gaia Codolo  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Ilaria Zaramella**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



## INDICE

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                               | <b>5</b>  |
| <b>1. STATO DELL'ARTE: Introduzione al problema biologico.....</b>                                                                                                  | <b>7</b>  |
| 1.1. Microbiota umano.....                                                                                                                                          | 7         |
| 1.2. Microbiota intestinale .....                                                                                                                                   | 7         |
| 1.3. Disbiosi e cancro .....                                                                                                                                        | 8         |
| 1.4. Batteri intratumorali.....                                                                                                                                     | 9         |
| <b>2. APPROCCIO SPERIMENTALE: Descrizione delle metodologie .....</b>                                                                                               | <b>10</b> |
| 2.1. Raccolta campioni biologici .....                                                                                                                              | 10        |
| 2.2. Estrazione del DNA batterico .....                                                                                                                             | 10        |
| 2.3. 16S real-time PCR .....                                                                                                                                        | 10        |
| 2.4. Immunoistochimica.....                                                                                                                                         | 11        |
| 2.5. Immunofluorescenza.....                                                                                                                                        | 11        |
| 2.6. 16S RNA FISH .....                                                                                                                                             | 11        |
| 2.7. CLEM: Microscopia correlativa ottica ed elettronica.....                                                                                                       | 12        |
| 2.8. Tassonomia GG .....                                                                                                                                            | 12        |
| 2.9. Amplificazione e sequenziamento 16S rRNA .....                                                                                                                 | 12        |
| 2.10. Culturomica.....                                                                                                                                              | 13        |
| 2.11. Marcatura in situ con D-alanina fluorescente .....                                                                                                            | 13        |
| 2.12. PICRUST2.....                                                                                                                                                 | 14        |
| <b>3. RISULTATI: Analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale... 15</b>                                                                                | <b>15</b> |
| 3.1. Componenti batteriche sono state rilevate in molti tumori solidi umani                                                                                         | 15        |
| 3.2. I batteri che costituiscono il microbiota tumorale sono presenti a livello intracellulare nelle cellule cancerose e nelle cellule del sistema immunitario..... | 16        |
| 3.3. Il microbioma del tumore mammario è più ricco e diversificato rispetto agli altri tipi tumorali .....                                                          | 17        |
| 3.4. Diversi tumori sono caratterizzati da differenti composizioni microbiche... 19                                                                                 | 19        |
| 3.5. Batteri intratumorali e funzioni metaboliche .....                                                                                                             | 20        |
| 3.6. Discussione e conclusione .....                                                                                                                                | 22        |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                                                                                                                            | <b>23</b> |
| <b>APPENDICE : Articolo discusso nell'elaborato.....</b>                                                                                                            | <b>23</b> |



## **ABSTRACT**

I batteri sono stati scoperti nei tumori più di 100 anni fa, ma la loro caratterizzazione è risultata difficile a causa della bassa biomassa del microbiota tumorale. Nell'articolo analizzato in questo elaborato, sono stati studiati 1526 tessuti tumorali che includono 7 diversi tipi di cancro. Sperimentalmente è stato evidenziato che i batteri all'interno dei tumori sono nella maggior parte dei casi intracellulari, essi si trovano nelle cellule tumorali ma anche nelle cellule del sistema immunitario e la loro composizione varia in base al tipo di tumore.

Nejman et al. hanno scoperto che il carcinoma mammario presenta un microbioma particolarmente ricco e diversificato. Inoltre, i batteri tumorali sono stati correlati alle loro funzioni predittive nei vari tipi di tumore.



## **1. STATO DELL'ARTE: *Introduzione al problema biologico***

### **1.1. Microbiota umano**

Il microbiota umano è costituito da circa  $10^{12}$  microorganismi, la maggior parte dei quali instaurano una relazione mutualistica con il nostro organismo. L'insieme delle informazioni genetiche di tutti questi microorganismi, che codificano per una serie di proteine ed enzimi funzionalmente implicati nell'interazione tra microbiota ed ospite, prende il nome di microbioma. L'abbondanza e la diversità del microbiota sono fondamentali nella formazione e nel mantenimento di un equilibrio importante per l'omeostasi dell'intero organismo. La sua composizione è caratteristica di ciascun individuo.[1] Ogni distretto anatomico costituisce una nicchia specifica per determinati microorganismi; perciò, la composizione del microbiota umano è eterogenea anche all'interno del nostro organismo. Dipende da una serie di fattori come l'organo in cui ci troviamo, l'età, il sesso, la dieta, lo stile di vita, dalla presenza di eventuali malattie, dall'uso di antibiotici, probiotici e prebiotici.[2]

Lo studio del microbiota umano si concentra sui batteri, ma tra i microorganismi costituenti il microbiota troviamo anche molti virus, funghi ed archaea. Inizialmente i batteri commensali venivano studiati tramite metodologie microbiologiche classiche che prevedevano la coltivazione in coltura. Queste tecniche però non permettevano l'identificazione di molte specie microbiche anaerobiche o che richiedevano condizioni di crescita difficili da ricreare in laboratorio. L'avvento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione è stato cruciale per la caratterizzazione della tassonomia microbica. Queste specie possono infatti essere identificate mediante tecniche molecolari: tramite il sequenziamento del DNA i batteri possono essere classificati in base al loro contenuto genomico, oppure grazie alla FISH (ibridazione fluorescente in situ) essi vengono analizzati in seguito alla marcatura fluorescente del gene codificante l'RNA ribosomale 16S. Recentemente con lo sviluppo della metagenomica, è stato possibile analizzare le comunità batteriche nel proprio ambiente di crescita naturale e l'approccio di analisi del microbiota si è focalizzato non solamente sulla composizione ma anche sul potenziale funzionale delle varie specie batteriche. [3]

### **1.2. Microbiota intestinale**

L'intestino umano contiene circa mille specie diverse di batteri, la maggior parte delle quali appartengono a quattro phyla principali: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, e Actinobacteria. Il microbiota del tratto gastrointestinale umano condiziona il nostro stato di salute in svariati modi. Tra i composti necessari per la fisiologia del nostro organismo sintetizzati dai batteri commensali intestinali troviamo le vitamine K e B12, alcuni amminoacidi e molte altre piccole molecole segnale tra le quali anche il GABA, il principale neurotrasmettitore inibitorio del SNC, e la serotonina. Il microbiota intestinale sintetizza acidi biliari secondari a

partire dal colesterolo, i quali sono importanti detergenti che coadiuvano l'assorbimento degli acidi grassi ed agiscono da molecole segnale. Il microbioma del colon, inoltre, codifica per una serie di enzimi in grado di sintetizzare acidi grassi a catena corta a partire da carboidrati non digeribili come le fibre. Questi acidi grassi a catena corta (SCFAs) sono un'importante fonte energetica per i colonociti. Essi sono dei metaboliti ad azione anti-infiammatoria ed anti-cancerogena in quanto attraverso la sintesi di mucine rafforzano la barriera epiteliale dell'intestino impedendo la traslocazione di patogeni all'interno dell'organismo, ed inibiscono la produzione di citochine infiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\eta$ . [2]

Il tratto digestivo è l'interfaccia maggiormente favorevole per la colonizzazione da parte dei microorganismi. Essi, attraverso il rilascio di tutti questi metaboliti a livello intestinale modulano lo sviluppo del sistema immunitario. La composizione del microbiota intestinale, perciò, influenza l'omeostasi non solo a livello locale ma anche a livello sistemico in quanto l'integrità della barriera epiteliale ha un ruolo cardine nella fisiologia del sistema immunitario. [4]

### **1.3. Disbiosi e cancro**

Il continuo *crosstalk* tra microbiota e sistema immunitario è alla base dell'omeostasi del nostro organismo. Quando la composizione del microbiota viene alterata questa interazione viene modificata e subentra uno stato patologico per l'organismo. La disbiosi è definita come una condizione di alterato equilibrio tra batteri simbiotici, commensali e patobionti. La disbiosi gastrointestinale stimola l'avanzamento di molte malattie, tra queste il cancro. In condizioni disbiotiche, infatti, abbiamo una proporzione maggiore di microorganismi patogeni che attraverso la produzione di alcune tossine aumentano l'infiammazione, le infezioni e la progressione tumorale. La correlazione tra una composizione alterata del microbiota intestinale e la carcinogenesi è stata dimostrata da studi di metagenomica che hanno confrontato il profilo microbiotico fecale di pazienti affetti da cancro al colon-retto e di persone in salute.

Dato che i microorganismi sono in grado di modulare il sistema immunitario, la disbiosi ha conseguenze a livello sistemico, perciò non influenza solamente la carcinogenesi del cancro colon-rettale o dei tumori dell'apparato digerente, ma anche i tipi di cancro di organi distanti dall'intestino. [2,4,5]

La disbiosi del tratto GI consegue principalmente a tre fattori: una dieta ricca in zuccheri e grassi saturi (dieta occidentale), l'assunzione di antibiotici ed uno stile di vita non sano. Una tipica dieta occidentale prevede il consumo di una grande quantità di alimenti ricchi in zuccheri e grassi, è associata a condizioni quali infiammazione cronica ad uno stato basale, obesità e sindrome metabolica. Contrariamente ad essa, una dieta che prevede alla base il consumo di alimenti ricchi in fibre e poveri di grassi è principalmente vantaggiosa in quanto le fibre sono fondamentali per la produzione di SCFAs, i quali agiscono riducendo lo stato infiammatorio. I meccanismi attraverso cui un alterato microbiota intestinale ha

effetti sulla carcinogenesi e sull'avanzamento tumorale, sono svariati. La disbiosi influisce sulla carcinogenesi in quanto induce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e porta ad uno stato infiammatorio cronico conseguente alla secrezione di molte citochine pro-infiammatorie. Inoltre, il microambiente pro-tumorale è indotto dall'aumento di ROS e di genotossine, prodotte dai batteri patogeni, che danneggiano il DNA. Anche l'aumento della permeabilità dell'epitelio intestinale, causato dall'azione delle citochine proinfiammatorie, è cruciale per la progressione tumorale in quanto un epitelio gastrointestinale la cui integrità è compromessa, privo dello strato di muco protettivo, favorisce l'entrata di batteri patogeni nel circolo sanguigno e di conseguenza anche i metaboliti di questi batteri sono distribuiti a livello sistemico. [1] I batteri patogeni agiscono anche sopprimendo l'azione anti-tumorale del sistema immunitario: il lipopolisaccaride (LPS), un componente della membrana esterna dei Gram negativi, ed altri prodotti microbici possono infatti agire aumentando l'espressione dei recettori Toll-like (TLRs). Questa up-regolazione dell'espressione dei TLRs causa l'attivazione di alcune vie di segnalazione che influenzano il ciclo cellulare e l'immunosoppressione, tra queste viene attivata la via anti-apoptotica Jak1/Akt/Stat3. [4,5]

#### **1.4. Batteri intratumorali**

Il microbioma intestinale ha un effetto sistemico nella regolazione dei tumori; tuttavia, anche il microbiota localizzato nella sede anatomica della neoplasia ha un ruolo fondamentale nella carcinogenesi. I microorganismi intratumorali influenzano lo sviluppo del tumore in quanto: aumentano la mutagenesi, regolano gli oncogeni e modulano l'attività del sistema immunitario. Perciò anche la disbiosi locale a livello del tessuto tumorale causa una risposta pro-infiammatoria cronica e la soppressione della risposta immunitaria anti-tumorale.

Il Cancer Genome Atlas, un progetto genomico basato sull'analisi di dati di sequenziamento whole-genome, comprova la presenza di comunità microbiche in vari tipi di tumore, compresi i tessuti tumorali che precedentemente erano ritenuti sterili per la crescita di microorganismi. Recenti studi condotti sia sull'uomo che sul topo hanno associato la disbiosi batterica polmonare con il tumore ai polmoni. Queste evidenze suggeriscono il fatto che il microbiota locale possa essere un potenziale bersaglio delle future terapie contro il cancro. [6,7,8]

## **2. APPROCCIO SPERIMENTALE: *Descrizione delle metodologie***

### **2.1. Raccolta campioni biologici**

Il materiale biologico di partenza comprende alcuni campioni congelati freschi ed altri inclusi in paraffina e fissati in formalina (FFPE) raccolti da tessuti tumorali asportati chirurgicamente. I tessuti analizzati sono 1526 ed includono sette diversi tipi di cancro: cancro al seno, al polmone, all'ovaio, al pancreas, melanoma, tumore alle ossa e al cervello. Sono stati utilizzati molti campioni di controllo: per l'estrazione del DNA, per l'amplificazione, per le corse di sequenziamento e per l'inclusione in paraffina. Questi controlli permettono di risalire alle diverse fonti di contaminazione degli ambienti ospedalieri e di laboratorio ed inoltre permettono di individuare la fase di lavoro durante la quale c'è stata un'eventuale contaminazione del materiale biologico.

### **2.2. Estrazione del DNA batterico**

L'estrazione del DNA batterico è fondamentale per ottenere DNA privo di contaminanti, da utilizzare poi per metodologie molecolari come ad esempio il sequenziamento. Le cellule devono essere lisate, successivamente, dal lisato cellulare, si separano gli acidi nucleici e si procede alla purificazione, quantificazione ed analisi della relativa purezza del DNA. Nell'esperimento, a partire dai tessuti congelati e dai blocchi di tessuto fissati in paraffina, il DNA batterico è stato estratto con un kit commerciale. Le cellule sono state lisate meccanicamente tramite omogenizzatore contenente delle biglie di zirconia/silice. Le proteine sono state rimosse dal lisato cellulare tramite digestione enzimatica con la proteinasi K, un'endopeptidasi di origine fungina in grado di idrolizzare la cheratina. Il DNA è stato concentrato aggiungendo etanolo, che modifica strutturalmente gli acidi nucleici e causa la loro precipitazione. La miscela totale, costituita da lisato cellulare, etanolo e biglie, è stata poi caricata in colonnine con supporti solidi che trattengono legati gli acidi nucleici, per poi procedere agli step finali di lavaggio ed eluizione.

### **2.3. 16S real-time PCR**

La real-time PCR, conosciuta anche come PCR quantitativa, è una tecnica di biologia molecolare che consente di quantificare una specifica molecola di DNA. Il campione di partenza è costituito da RNA, il quale viene retrotrascritto a cDNA in una reazione catalizzata dalla trascrittasi inversa. Il cDNA prodotto è utilizzato come stampo per una reazione di amplificazione. La quantità di amplicone prodotta nella miscela di PCR viene monitorata ciclo per ciclo attraverso la misura della fluorescenza emessa da un fluoroforo, come il SYBR GREEN, che è in grado di legarsi selettivamente al DNA a doppia elica. Si stabilisce una correlazione tra il numero di cicli di amplificazione necessari affinché diventi rilevabile l'intensità del segnale fluorescente e la quantità di template iniziale. Il

ciclo al quale diventa rilevabile il prodotto di PCR si chiama threshold cycle (Ct) o quantification cycle (Cq). Questo ciclo soglia viene raggiunto prima tanto più tempestivo c'è all'inizio della reazione. Nell'articolo sono stati utilizzati come primer per la reazione di PCR sequenze nucleotidiche corrispondenti a specifiche regioni dell'RNA ribosomiale 16S batterico. Il Ct di una curva batterica standard prodotta utilizzando il DNA di *Brevibacterium frigoritolerans* è stato confrontato con il valore di Ct raggiunto dai campioni batterici in analisi. Questa tecnica ha quindi permesso di stimare la quantità di batteri presenti nei vari campioni.

#### **2.4. Immunoistochimica**

Questa tecnica permette di rilevare una molecola antigenica tramite l'utilizzo di anticorpi primari, specifici per il dato antigene, coniugati con un tracciante enzimatico. L'enzima coniugato all'anticorpo è in grado di far precipitare un substrato cromogeno e colorare la zona adiacente all'antigene.

L'immunoistochimica è stata applicata a microarrays di tessuto tumorale umano, che includevano 400 nuclei rappresentativi di 6 tipi di tumore. Questa tecnica è stata utilizzata per individuare LPS e LTA in ogni spot dell'array, sono stati fatti anche dei controlli negativi in cui non era presente nessun anticorpo primario in modo tale da verificare l'assenza di eventuali aspecifici rilevati. LPS è il lipopolisaccaride, o endotossina, ed è presente esternamente alla parete cellulare dei batteri Gram negativi, invece LTA è l'acido lipoteicoico, che si ancora allo spesso strato di peptidoglicano caratterizzando la parete cellulare dei batteri Gram positivi.

#### **2.5. Immunofluorescenza**

L'immunofluorescenza è una tecnica immunoistochimica in cui il marcatore coniugato all'anticorpo è un fluoroforo. Nell'immunofluorescenza diretta il fluoroforo si lega ad un anticorpo primario che riconosce la nostra molecola target. Nell'immunofluorescenza indiretta il fluoroforo si lega agli anticorpi secondari coniugati all'anticorpo primario che si lega specificatamente all'antigene di nostro interesse. Il principale vantaggio di utilizzare il metodo indiretto consiste nel fatto che il segnale è amplificato in quanto numerosi anticorpi secondari possono legarsi all'anticorpo primario coniugato con una sola molecola antigenica.

Sono stati usati anticorpi primari contro i recettori CD-45 e CD-68 per identificare le cellule del sistema immunitario e successivamente rilevare la presenza dei batteri intracellulari tumorali anche in queste cellule. CD-45 è un recettore presente in tutti i leucociti, CD-68 invece è specifico per i macrofagi.

#### **2.6. 16S RNA FISH**

La FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) è una metodologia molto usata in citogenetica per la localizzazione di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi.

Essa si basa sull'ibridazione di una sonda nucleotidica, marcata con un fluoroforo, ad una regione cromosomica complementare ad essa. Nell'esperimento questa tecnica è stata utilizzata per individuare la presenza di batteri nei nuclei cellulari. Le sonde progettate sono complementari a regioni genomiche codificanti l'RNA ribosomale 16S dei batteri, un gene ubiquitario in tutti i procarioti. I vetrini di tessuto FFPE dopo essere stati deparaffinati, reidratati, incubati in etanolo 70%, sono stati lavati ed incubati con proteinasi K per la rimozione delle proteine. Le sonde utilizzate per l'ibridazione sono state coniugate al composto fluorescente Cy5. I nuclei tumorali sono stati classificati positivi o meno per l'rRNA 16S batterico in base all'intensità della fluorescenza rilevata.

### **2.7. CLEM: Microscopia correlativa ottica ed elettronica**

La microscopia CLEM combina la microscopia ottica ad alta risoluzione con un microscopio elettronico. I campioni FFPE sono stati immersi per una notte in saccarosio e congelati rapidamente in azoto liquido. Con il microtomo sono state tagliate delle sezioni ultra-sottili congelate, esse sono state poi raccolte su griglie di nichel, colorate con DAPI (in grado di evidenziare i nuclei cellulari), ed incubate con un anticorpo primario per LPS ed un anticorpo secondario coniugato al fluoroforo AlexaFluor555. L'acquisizione delle immagini a fluorescenza ha permesso l'identificazione dei batteri. Successivamente è stata applicata una colorazione a contrasto e le stesse griglie sono state osservate al microscopio elettronico. L'immagine della fluorescenza e l'immagine acquisita al TEM sono state sovrapposte e ciò ha permesso un imaging ad elevata precisione della regione generale di una cellula nella quale sono presenti i batteri intracellulari.

### **2.8. Tassonomia GG**

I dati di sequenziamento del microbioma sono fondamentali nell'attribuire la tassonomia alle specie batteriche analizzate. GreenGenes (GG) è un database tassonomico che classifica i batteri e gli archaea in base alle reads ottenute dal sequenziamento del gene codificante l'RNA ribosomale 16S. L'articolo analizzato ha contribuito al miglioramento della tassonomia di GG. Sono stati fatti alcuni progressi per curare e rilevare alcune incongruenze generali ed a livello di specie, oltre ad assegnare nomi di genere e specie mancanti nel database.

### **2.9. Amplificazione e sequenziamento 16S rRNA**

Il gene dell'RNA ribosomale 16S è ubiquitario in tutti gli organismi procarioti, esso accumula cambiamenti con estrema lentezza, perciò, è vantaggioso utilizzare questa sequenza genica per studiare microorganismi poco correlati nel tempo. L'RNA 16S, infatti, contiene informazioni sufficienti per un'analisi comparativa tra i microorganismi. Attraverso il metodo del DNA bar coding è possibile identificare le specie microbiche solamente sulla base dell'analisi della variabilità della sequenza genomica codificante per l'rRNA 16S. Alcune sequenze del DNA

per RNA 16S sono così conservate che sono state utilizzate per progettare dei primer universali da PCR. Altre sequenze invece sono più variabili, le cosiddette “signature sequences” definiscono un particolare genere o una specie.

Nell'esperimento: sono state amplificate 5 regioni del gene 16S rRNA. Gli ampliconi prodotti sono stati sequenziati e le varie reads ottenute sono state combinate a formare una biblioteca genomica. La biblioteca genomica è stata analizzata utilizzando SMURF (Short Multiple Regions Framework), un metodo computazionale per la profilazione dell'rRNA 16S ad alta risoluzione. SMURF restituisce come output un elenco di gruppi e le relative abbondanze numeriche. Ogni gruppo è un insieme di intere sequenze di rRNA 16S che condividono gli stessi oligonucleotidi nelle regioni amplificate, ad ognuno viene assegnata una tassonomia a livello di specie.

### **2.10.Culturomica**

La culturomica comprende un insieme di tecniche di coltura (caratterizzate ciascuna da terreni e condizioni culturali differenti) utilizzate per identificare i microorganismi che costituiscono il microbiota umano. In laboratorio possiamo coltivare ed identificare solamente una parte di microorganismi che colonizzano il nostro corpo. Nell'esperimento sono stati isolati batteri anaerobi ed aerobi a partire da tessuti raccolti da 5 pazienti affetti da tumore al seno. Le singole colonie cresciute nel terreno di coltura solido sono state raccolte e coltivate in appropriati terreni di crescita liquidi. Successivamente il DNA genomico estratto da colonie specifiche è stato sottoposto a sequenziamento Illumina e le reads ottenute sono state utilizzate per l'assemblaggio del genoma di ciascun campione batterico.

### **2.11.Marcatura in situ con D-alanina fluorescente**

Questa tecnica alternativa alla classica FISH prevede l'utilizzo di D-alanina fluorescente come sostanza tracciante per rilevare la sequenza di DNA di interesse.

I batteri sintetizzano in quantità significativa gli amminoacidi D-ala e D-Glu.

Il peptidoglicano della parete batterica dei Gram positivi è costituito da residui di NAG (N-acetilglucosammina) e NAM (acido N-acetilmuramico) alternati e legati tra loro da legami beta1-6 glucosidici. Ogni unità di NAM è legata nella porzione terminale ad un pentapeptide che termina con due residui amminoacidici di D-alanina. Questi residui di D-ala consentono la formazione dei legami crociati all'interno del peptidoglicano. Perciò la D-alanina fluorescente permette un'efficiente marcatura in situ del peptidoglicano in diverse specie batteriche.

I tessuti tumorali raccolti durante intervento chirurgico di pazienti con tumore al seno sono stati tagliati con il microtomo ed incubati ex-vivo con un terreno di coltura contenente D-ala fluorescente. Dopo alcuni lavaggi in PBS, essi sono stati fissati ed inclusi in paraffina. Sono stati preparati poi dei vetrini istologici per la visualizzazione della marcatura.

## **2.12.PICRUST2**

PICRUST2 è l'acronimo di Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States. Si tratta di un software bioinformatico predittivo del contenuto metagenomico funzionale, il quale è basato sullo studio di marcatori genetici. Un approccio metagenomico si basa sullo studio di comunità microbiche nel loro ambiente naturale. In questo caso: la predittività della funzione di una data comunità microbica nel contesto tumorale è basata su dati di sequenziamento dell'rRNA 16S batterico. Sono state create due mappe che correlano la sequenza di rRNA 16S alla funzione metabolica svolta dalla specie batterica in questione: una mappa MetaCyc e una KEGG.

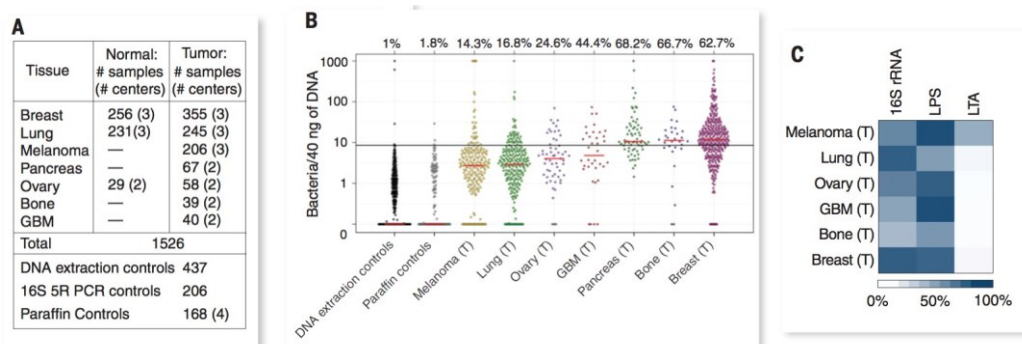
### 3. RISULTATI: *Analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale*

#### 3.1. Componenti batteriche sono state rilevate in molti tumori solidi umani.

Con lo scopo di caratterizzare e visualizzare i batteri intratumorali, i ricercatori hanno combinato una serie di metodi per rilevare gli acidi nucleici batterici (DNA, RNA) e le componenti della membrana esterna e della parete dei batteri. Sono stati analizzati 1526 campioni, 516 dei quali provenienti da tessuti normali e 1010 da tessuti tumorali di 7 differenti tipi di tumore (Figura 1A). Il microbiota tumorale è caratterizzato da una bassa biomassa, la quale ne rende difficile lo studio in quanto bisogna includere una serie di misure che eliminino tutte le possibili fonti di contaminazione batteriche. Sono stati introdotti alcuni controlli negativi (controlli negativi dell'estrazione del DNA e della PCR) per evitare di includere nella caratterizzazione del microbiota tumorale i contaminanti provenienti dal laboratorio. Per escludere la contaminazione potenzialmente avvenuta prima dell'arrivo dei tessuti in laboratorio, sono stati inclusi dei campioni costituiti solamente da paraffina.

I dati ottenuti dalla quantificazione del DNA batterico (escluso il DNA contaminante), successiva alla qPCR effettuata utilizzando i primer universali per il 16S rRNA, sono stati utilizzati per determinare la quantità di batteri nei diversi tipi di tumore. La carica batterica è variabile nei differenti tipi di cancro. Come si può osservare in Figura 1B il tumore al seno è caratterizzato da un microbioma più abbondante. Si nota anche che il DNA batterico è presente anche nei tumori solidi che non sono connessi all'ambiente esterno come per esempio il cancro all'ovario, il glioblastoma multiforme (cervello) e il tumore alle ossa.

In tutti i tipi di tumore viene rilevato LPS e 16S rRNA, invece LTA è presente quasi esclusivamente nei tessuti di melanoma ed è quasi assente in tutti gli altri tipi di tumore. Ciò è evidenziato nella heatmap della Figura 1C, che correla l'intensità del segnale dell'immunoistochimica specifica per LPS e LTA e della FISH specifica per l'RNA ribosomiale 16S con tutti i vari tipi di tumore in analisi.



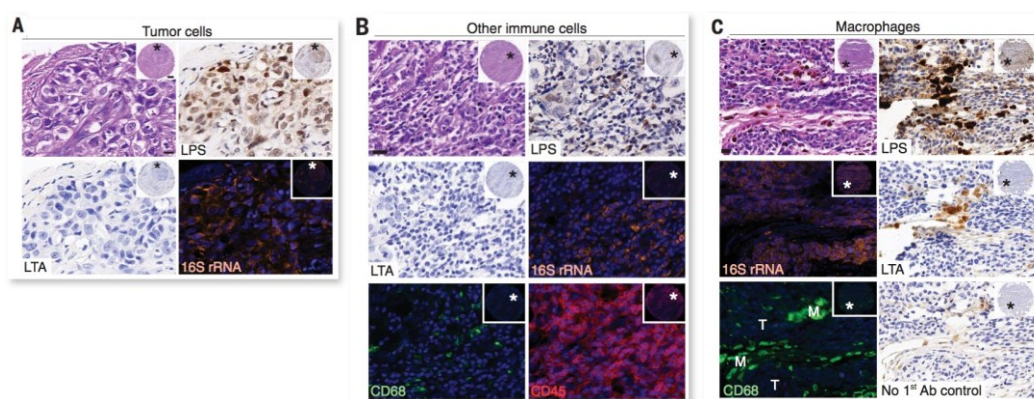
**Figura 1: Componenti batteriche rilevate nei tumori umani. (A)** Numero di campioni umani analizzati nello studio. I campioni normali includono sia i tessuti normali sia i tessuti adiacenti al tessuto tumorale (NAT). **(B)** La presenza di DNA batterico nei tumori umani è stata valutata mediante una PCR quantitativa del gene codificante l'RNA ribosomiale 16S. Per stimare la carica batterica è stata usata una curva di calibrazione, generata aggiungendo il DNA batterico al DNA

umano e in seguito normalizzata rispetto a dei controlli negativi di qPCR. I valori sono stati ridotti a 0,1. Le linee rosse rappresentano la mediana. La proporzione di campioni di ciascun tipo di cancro presentante una quantità di batteri maggiore del 99esimo percentile dei campioni di controllo dell'estrazione di DNA è riportata sopra ogni tipo di cancro. (C) Heatmap, costruita con i risultati dell'IHC e della FISH, rappresentante la proporzione di tumori che presentano una colorazione positiva per 16S rRNA, LPS o LTA.

### 3.2. I batteri che costituiscono il microbiota tumorale sono presenti a livello intracellulare nelle cellule cancerose e nelle cellule del sistema immunitario.

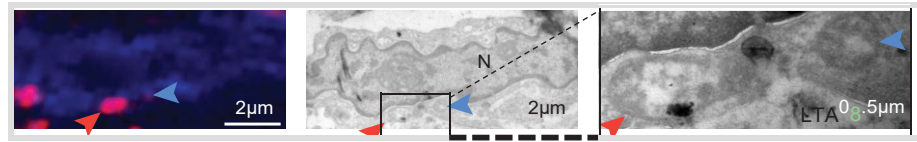
Le diverse colorazioni delle cellule tumorali (ematossilina/eosina, colorazione LPS-specifica, LTA-specifica, ed ibridazione 16S rRNA) hanno permesso di determinare la presenza di lipopolisaccaride e 16S rRNA all'interno delle cellule quindi i batteri intratumorali sono intracellulari. Nelle cellule cancerose il DNA batterico si trova nel citoplasma, mentre il LPS si trova sia nel citoplasma che nelle vicinanze del nucleo (Figura 2A). Nelle cellule del sistema immunitario (leucociti CD45+) l'RNA ribosomiale 16S risulta fortemente presente a livello citoplasmatico, l'acido lipoteicoico è presente quasi esclusivamente all'interno dei macrofagi (cellule CD45+/CD68+) (Figura 2B e C).

Contrariamente alle cellule cancerose e agli altri leucociti, i macrofagi non presentano al loro interno rRNA 16S batterico. I ricercatori ipotizzano che ciò rifletta l'ingestione da parte dei macrofagi solamente di componenti batteriche e non la diretta fagocitosi di batteri vivi. Alternativamente ciò sarebbe ipoteticamente dovuto all'accumulo di LPS e LTA all'interno macrofagi molto tempo dopo la fagocitosi, infatti il LPS si può trovare all'interno dei macrofagi anche mesi dopo l'ingestione e il processamento dei batteri.



**Figura 2: I batteri intratumorali sono stati trovati sia nelle cellule cancerose sia nelle cellule del sistema immunitario. (A, B, C) Immagini rappresentative che dimostrano le differenti colorazioni nei tumori umani. Gli asterischi contrassegnano la regione selezionata per un ingrandimento maggiore. (A) La presenza di LPS batterico e 16S rRNA è rilevata nelle cellule del tumore al seno. (B) La presenza di LPS batterico e 16S rRNA è rilevata anche nelle cellule CD45+/CD68- di un tumore al seno altamente infiammato. (C) Colorazione tipica dei batteri associati ai macrofagi (M) in un melanoma, essi risultano positivi verso LPS e LTA ma non presentano 16S rRNA. Le cellule tumorali vicine (T) mostrano la tipica colorazione positiva per 16S rRNA e LPS e negativa per LTA.**

La presenza dei batteri intratumorali all'interno delle cellule è stata verificata dalle immagini al CLEM come mostrato in Figura 3. La colorazione fluorescente del lipopolisaccaride accoppiata con la microscopia a trasmissione (TEM) dimostra la loro localizzazione intracellulare, in molti casi i batteri si trovano in prossimità dei nuclei cellulari.



**Figura 3: L'analisi CLEM dimostra la presenza di batteri intracellulari nel tumore al seno.** L'immagine all'immunofluorescenza mostra DAPI in blu e LPS in rosso. Le frecce indicano due batteri. Le immagini della stessa cellula al TEM sono mostrate in scala di grigi. La lettera N indica il nucleo cellulare.

Il 16S rRNA, rilevato dalla FISH, costituisce un segnale diffuso all'interno delle cellule, mentre l'acido lipoteicoico non è rilevato nelle cellule cancerose. Queste osservazioni portano all'ipotesi di una possibile modifica morfologica dei batteri nelle cellule cancerose. I batteri assumerebbero la cosiddetta forma L, una forma batterica primordiale priva di parete cellulare esterna. La struttura dei batteri, delimitati solamente dalla membrana plasmatica, diventerebbe meno definita con una dimensione e una forma altamente variabile. Questa morfologia sembrerebbe essere tipica dei batteri che si trovano esclusivamente all'interno delle cellule.

### **3.3. Il microbioma del tumore mammario è più ricco e diversificato rispetto agli altri tipi tumorali.**

Il microbioma tumorale è stato caratterizzato tramite sequenziamento del 16S rDNA. Utilizzando SMURF e GreenGenes, le corse di sequenziamento ottenute sono state combinate a formare lunghi ampliconi, che identificano specie diverse. In totale si è rilevata la presenza di 9190 specie batteriche tra i diversi tumori e i diversi tessuti normali associati al tumore. Le specie che hanno passato tutti i 6 filtri di selezione che escludono le possibili fonti di contaminazione del microbioma, sono state definite specie batteriche tumore specifiche. Il primo filtro di selezione ha permesso di rimuovere le specie batteriche rilevate in più del 7,5% dei campioni di controllo negativi dell'estrazione del DNA, della PCR e di paraffina. I filtri 2,3,4 hanno eliminato le contaminazioni originate dall'estrazione del DNA, dall'amplificazione PCR o dal sequenziamento. Infine i filtri 5 e 6 sono stati introdotti per rimuovere le specie batteriche contaminanti che sono state probabilmente introdotte nei campioni prima del processamento in laboratorio.

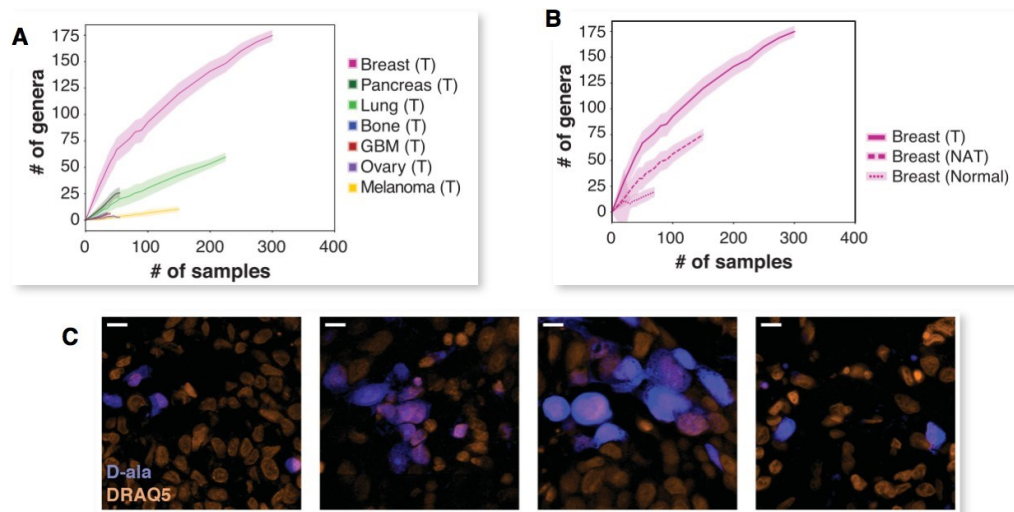
La Figura 4A consiste in un grafico di rarefazione che ci consente di quantificare in maniera rappresentativa la diversità dei microbiomi specifici di ogni tumore. Solitamente i grafici di rarefazione vengono creati ricampionando casualmente un pool di campioni più volte e tracciando poi il numero medio di specie trovate in ciascun campione. Il numero di specie viene campionato per prevedere il numero di generi in una particolare comunità microbica. Questo grafico è una curva di arricchimento in termini di generi batterici, in ascissa sono riportati il numero di

campioni analizzati mentre in ordinata il numero di generi batterici trovati. Il cancro al seno presenta il microbioma più ricco e diversificato in relazione a tutti gli altri tipi di tumore studiati, in ogni singolo tumore al seno sono state rilevate in media 16.4 specie batteriche.

Come si può notare nel grafico di rarefazione in Figura 4B, la quantità e la ricchezza batterica è maggiore nei tessuti tumorali rispetto ai campioni normali non affetti dalla malattia. I tessuti normali adiacenti alla neoplasia mammaria presentano una carica batterica ed una diversità intermedia.

Per determinare la presenza di batteri vivi nei tumori umani, i ricercatori hanno lavorato con tessuti freschi di tumore al seno asportati chirurgicamente da 5 donne affette da cancro alla mammella. I tessuti tumorali sono stati dissociati in condizioni sterili e successivamente piastrati in mezzi di coltura contenente agar ed incubati sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Il sequenziamento su larga scala di 474 colonie batteriche rappresentative cresciute su queste piastre, ha dimostrato che queste colonie rappresentano 37 diverse specie batteriche specifiche del tumore al seno, appartenenti a 3 phyla tassonomici - Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria.

Le immagini ottenute in seguito alla marcatura in situ con D-alanina fluorescente (Figura 4C) di 4 diversi tessuti mammari tumorali confermano la presenza di batteri vivi e metabolicamente attivi all'interno delle cellule nei tumori umani.



**Figura 4: Il microbioma del tumore al seno è più ricco e diversificato. (A)** Grafico di rarefazione che mostra il numero di generi batterici tumore-specifici che hanno superato tutti i filtri (filtri per eliminare tutte le possibili fonti di contaminazione) nei diversi tipi di tumore per il numero di campioni di tumore selezionati per l'analisi. L'ombreggiatura del colore chiaro rappresenta gli intervalli di confidenza basati su 100 sottocampionamenti casuali per ogni numero di campioni di tumore analizzati. **(B)** Grafico di rarefazione che mostra il numero di generi batterici, che hanno superato tutti i filtri, nei campioni di tumore mammario, NAT mammario e seno normale. **(C)** Immagini fluorescenti da quattro tumori al seno umani coltivati ex vivo con D-alanina fluorescente per 2 ore (blu). I nuclei sono stati colorati in arancione con DRAQ5. In scala: 10  $\mu$ m.

### **3.4. Diversi tumori sono caratterizzati da differenti composizioni microbiche.**

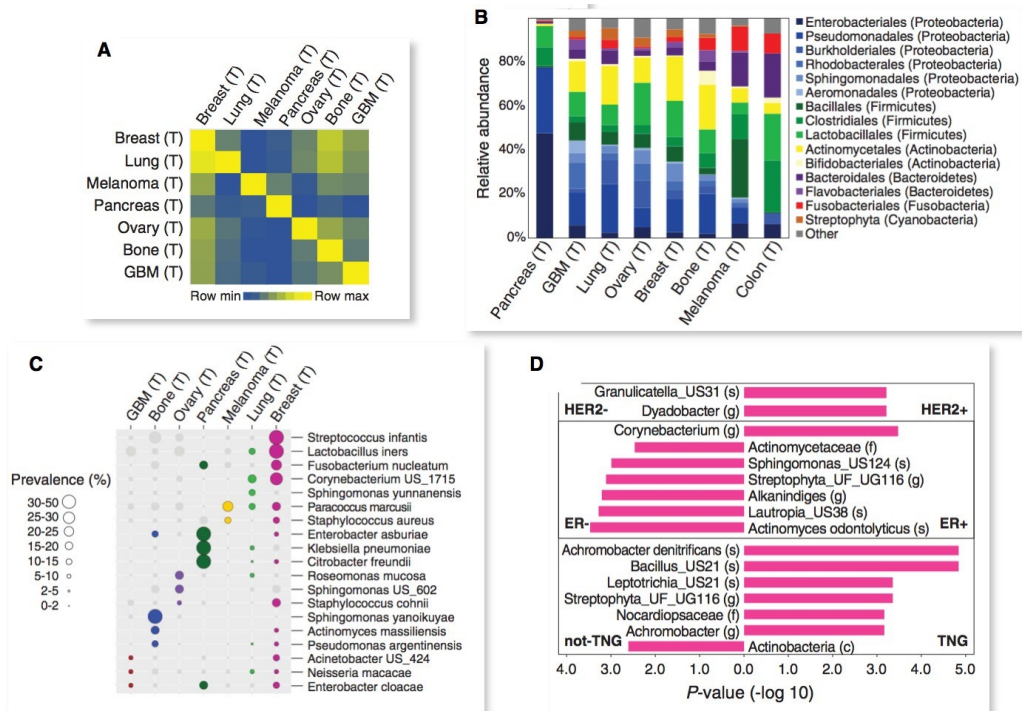
L'utilizzo di una singola metodologia di sequenziamento ha permesso di confrontare le diverse composizioni del microbioma in differenti tumori.

Dal confronto della beta-diversità (un indice di misura dell'eterogeneità compositiva a livello di specie batteriche) tra coppie di campioni dello stesso tipo di tumore e di tumori diversi, risulta che il microbioma di diversi campioni derivanti della stessa tipologia di tumore (es. mammella) è più simile rispetto al microbioma rilevato in tumori di diverso tipo. Ciò può essere osservato nel grafico della Figura 5A, che correla i diversi campioni appartenenti a diversi tumori in base agli indici di similarità di Jaccard, i quali consentono di confrontare a livello statistico la similarità e la diversità di insiemi campionari.

In Figura 5B si può notare che la diversa distribuzione degli ordini tassonomici del microbiota tumorale determina una diversa composizione batterica nei vari tipi di tumore. Le relative abbondanze delle diverse specie sono state calcolate sommando tutte le corse di sequenziamento nei vari tumori appartenenti alle specie della stessa famiglia tassonomica. In tutti i tumori sono state rilevate sequenze batteriche caratteristiche dei *phyla* Protobacteria e Firmicutes. Come si osserva in Figura 5B, il rapporto P/F (rapporto tra Protobacteria e Firmicutes) varia nei differenti tipi di cancro. I batteri appartenenti al *phylum* Actinobacteria sono presenti maggiormente nei tumori non gastrointestinali.

A livello specie-specifico, ogni tumore è caratterizzato da una maggiore presenza di certe specie batteriche. Il grafico della Figura 5C rappresenta la prevalenza nei diversi tumori di 19 specie batteriche tra le 137 maggiormente presenti nel microbiota tumorale. Alcune specie batteriche sono infatti arricchite in certi tipi di cancro piuttosto che in altri. Ad esempio *Fusobacterium nucleatum*, che si sapeva già essere specifico del microbioma dei tumori colonrettali, risulta arricchito anche nei tumori al seno e al pancreas.

Il microbioma si differenzia anche tra i vari sottotipi dello stesso tumore. Confrontando ed analizzando i dati di sequenziamento provenienti da campioni di diversi sottotipi di tumori al seno distinti in base a tre differenti fattori, il recettore per gli estrogeni (ER), il recettore per il progesterone (PR) e lo stato HER2 (questo stato può essere positivo o negativo a seconda che sia espresso o meno il fattore di crescita epidermico umano HER2), i ricercatori sono riusciti ad individuare in quali sottotipi tumorali sono presenti i diversi taxa batterici. Nel grafico a barre della Figura 5D si osserva la prevalenza dei vari taxa batterici nei vari campioni.



**Figura 5: Diversi tipi di tumore presentano diverse composizioni microbiche.** (A) Heatmap presentante la media di tutti gli indici di Jaccard tra le coppie di campioni di due tipi di cancro qualsiasi. Gli indici di similarità di Jaccard sono stati calcolati sulla base dei profili delle specie batteriche che hanno passato tutti i filtri nei tumori ( $n=528$ ) tra tutte le possibili coppie di campioni. (B) Distribuzione dei filotipi (a livello di ordine tassonomico) tra diversi tipi di tumore. Le abbondanze relative sono state calcolate sommando le reads delle specie che hanno passato tutti i filtri nei diversi tipi di tumore e che appartengono allo stesso ordine. Gli ordini sono colorati in associazione con il loro phylum associato. (C) Grafico rappresentante la prevalenza nei diversi tipi di tumore di 19 specie batteriche tra le 137 specie di batteri maggiormente presenti nei tumori. I cerchi colorati rappresentano una determinata specie batterica prevalente nello specifico tipo di tumore. La dimensione del cerchio indica il livello di prevalenza nei campioni. US: specie sconosciuta. (D) Grafico a barre rappresentante i taxa batterici, che hanno una prevalenza differenziale significativa nei diversi sottotipi di cancro al seno. La direzione delle barre indica in quale campione la quantità dello specifico taxa batterico è maggiore.

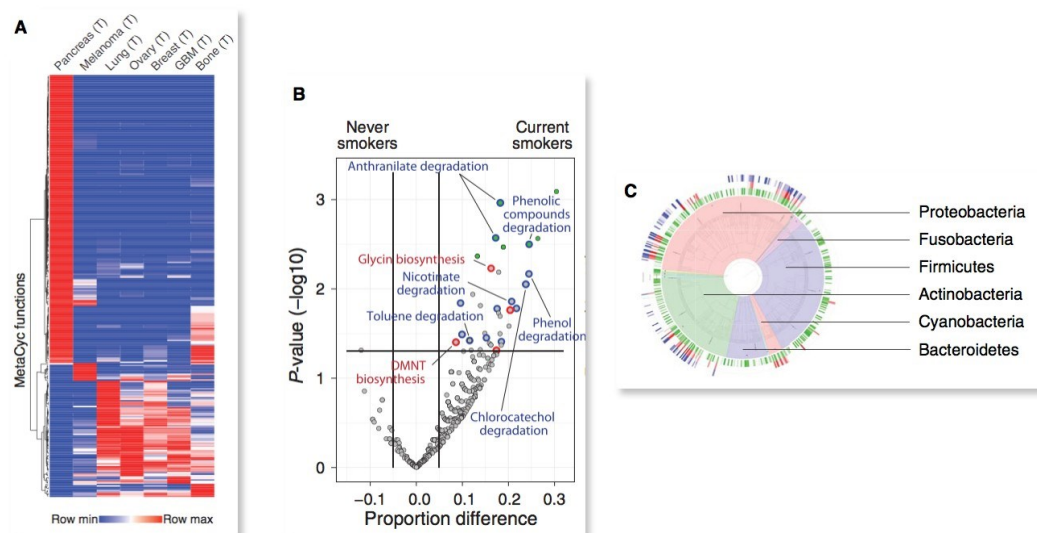
### 3.5. Batteri intratumorali e funzioni metaboliche

I risultati ottenuti analizzando le sequenze batteriche 16S rDNA e i diversi pathways metabolici tramite l'utilizzo di PICRUSt2 comprovano la specificità di alcune vie metaboliche del microbioma tumorale in certi tipi di tumore. Esiste una forte correlazione tra le funzioni dei batteri presenti a livello del microbiota tumorale e il microambiente tumorale. In certi tipi di tumore sono particolarmente attivi i *pathways* batterici per la degradazione dei metaboliti specifici caratterizzanti il microbioma del tumore stesso.

PICRUSt2 ha consentito di associare le sequenze batteriche 16S trovate nei campioni analizzati ad un elenco di funzioni previste per queste sequenze geniche. I ricercatori hanno considerato 287 vie metaboliche MetaCyc predittive delle funzioni dei batteri intratumorali. La Figura 6A rappresenta una heatmap in cui si rilevano le funzioni predittive prevalenti nei vari tipi di tumore. Confrontando le frequenze dei diversi pathways nei vari tipi di tumore è evidente che certe vie

metaboliche del microbioma risultano specifiche per determinati tipi di tumore. Il confronto tra le funzioni metaboliche del microbioma di fumatori e dei non-fumatori è stato statisticamente effettuato mediante un test z a due proporzioni, sono state infatti confrontate le proporzioni di campioni positive per una data funzione metabolica in una coorte clinica e in una seconda coorte. I pathways MetaCyc dei campioni dei fumatori e dei non-fumatori sono stati considerati prevalenti se la loro presenza era maggiore del 10% in almeno uno studio clinico analizzato, ma minore del 90% in entrambi gli studi. I valori dei logaritmi negativi dei P-value calcolati in questo test statistico sono stati utilizzati per costruire un grafico a vulcano (Figura 6B). Le vie MetaCyc che si sono rivelate significativamente arricchite (attraverso un test statistico) nei tumori polmonari dei fumatori rispetto ai non fumatori, sono state classificate in due categorie di funzioni. La prima classe è costituita da pathways responsabili della degradazione di sostanze presenti nel fumo di sigaretta, come toluene, acrilnitrile e aminobenzoati, invece la seconda classe da funzioni di biosintesi dei metaboliti vegetali.

Ciò suggerisce che la presenza di alti livelli di metaboliti provenienti dal fumo di sigaretta crei una nicchia specifica per la crescita di batteri che degradano queste sostanze. Questa ipotesi è stata confermata dal confronto tra le funzioni batteriche trovate nelle cellule cancerose del cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLCs) di 100 attuali fumatori e nelle NSCLCs di 43 persone che non hanno mai fumato. Tra i 49 MetaCyc pathways arricchiti nei tumori al polmone di soggetti fumatori: 17 di questi sono vie metaboliche che degradano nicotina, antranilato di metile, toluene e fenolo, 8 tra questi sono invece pathways relativi alla biosintesi di metaboliti che possono essere usati dalle piante, ad esempio alla biosintesi della glicina, che costituisce un intermedio chiave nel processo di fotorespirazione. Alcuni batteri associati alle piante sono presenti nel tabacco delle sigarette e perciò sono presenti nei tessuti polmonari tumorali dei fumatori. I batteri del microbioma del tumore al polmone che esplicano queste funzioni sono stati classificati tassonomicamente, sempre mediante l'utilizzo e l'analisi dei dati del sequenziamento 16S. Nel grafico a ruota della Figura 6C sono indicati i phyla batterici che metabolicamente contribuiscono alla degradazione dei metaboliti del fumo di sigaretta e alla biosintesi di metaboliti vegetali.



**Figura 6: Funzioni metaboliche predittive dei batteri intratumorali.** (A) Heatmap che mostra il raggruppamento gerarchico delle frequenze di 287 percorsi MetaCyc attraverso i diversi tipi di tumore. Sono state incluse solamente le vie abbondanti e variabili (aventi frequenza maggiore del 10% in almeno un tipo di tumore ed una deviazione standard divisa per la media delle frequenze maggiore di 0,4). (B) Grafico a dispersione (Volcano plot) che dimostra le vie metaboliche batteriche MetaCyc arricchite nei tumori polmonari dei fumatori (n=100) rispetto ai non fumatori (n=48). I percorsi di degradazione dei prodotti chimici del fumo sono indicati dai cerchi blu, invece le vie metaboliche legate alle piante sono indicate dai cerchi rossi. (C) Grafico tassonomico a ruota che indica le specie batteriche che contribuiscono alla degradazione dei metaboliti del fumo di sigaretta (anello blu) e alla biosintesi delle funzioni dei metaboliti vegetali (anello rosso), insieme a tutti i batteri che si possono trovare nei tumori polmonari (anello verde).

### 3.6. Discussione e conclusione

Lo studio analizzato in questo elaborato ha permesso la caratterizzazione del microbioma di 1526 campioni da sette differenti tipi di tumore. Ogni tipo tumore è caratterizzato da specifiche specie batteriche. Nejman et al. sono riusciti a confermare sperimentalmente la presenza di batteri intratumorali e dimostrarne la loro localizzazione intracellulare. Estendendo l'analisi a livello funzionale si è scoperto che alcuni microambienti tumorali, arricchiti di particolari metaboliti, favoriscono la crescita di specifiche specie di batteri coinvolte nel metabolismo del tessuto tumorale stesso.

Tuttavia i dati raccolti nello studio analizzato non stabiliscono se i batteri intratumorali giochino un ruolo causale o consequenziale nella carcinogenesi e nella progressione tumorale. Maggiori ricerche potranno investigare sul ruolo di questi batteri tumore-specifici in relazione alla progressione della neoplasia.

Una maggior conoscenza della composizione specifica del microbioma di ogni tipo tumorale sarà necessaria per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici, che potranno potenzialmente essere basati sulla manipolazione del microbioma tumorale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bagheri Z, Moeinzadeh L, Razmkhah M. ***Roles of Microbiota in Cancer: From Tumor Development to Treatment***. J Oncol. 2022 Mar 23;2022:3845104.
2. Sędzikowska A, Szablewski L. ***Human Gut Microbiota in Health and Selected Cancers***. Int J Mol Sci. 2021 Dec 14;22(24):13440.
3. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. ***The healthy human microbiome***. Genome Med. 2016 Apr 27;8(1):51.
4. Gebrayel P, Nicco C, Al Khodor S, Bilinski J, Caselli E, Comelli EM, Egert M, Giaroni C, Karpinski TM, Loniewski I, Mulak A, Reygner J, Samczuk P, Serino M, Sikora M, Terranegra A, Ufnal M, Villeger R, Pichon C, Konturek P, Edeas M. ***Microbiota medicine: towards clinical revolution***. J Transl Med. 2022 Mar 7;20(1):111.
5. Rajagopala SV, Vashee S, Oldfield LM, Suzuki Y, Venter JC, Telenti A, Nelson KE. ***The Human Microbiome and Cancer***. Cancer Prev Res (Phila). 2017 Apr;10(4):226-234.
6. Matson V, Chervin CS, Gajewski TF. ***Cancer and the Microbiome-Influence of the Commensal Microbiota on Cancer, Immune Responses, and Immunotherapy***. Gastroenterology. 2021 Jan;160(2):600-613.
7. Wong-Rolle A, Wei HK, Zhao C, Jin C. ***Unexpected guests in the tumor microenvironment: microbiome in cancer***. Protein Cell. 2021 May;12(5):426-435.
8. Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, Hasty J, Wargo JA, Knight R. ***The microbiome and human cancer***. Science. 2021 Mar 26;371(6536):eabc4552.

## APPENDICE : Articolo discusso nell'elaborato

Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, Rotter-Maskowitz A, Weiser R, Mallel G, Gigi E, Meltser A, Douglas GM, Kamer I, Gopalakrishnan V, Dadosh T, Levin-Zaidman S, Avnet S, Atlan T, Cooper ZA, Arora R, Cogdill AP, Khan MAW, Ologun G, Bussi Y, Weinberger A, Lotan-Pompan M, Golani O, Perry G, Rokah M, Bahar-Shany K, Rozeman EA, Blank CU, Ronai A, Shaoul R, Amit A, Dorfman T, Kremer R, Cohen ZR, Harnof S, Siegal T, Yehuda-Shnaidman E, Gal-Yam EN, Shapira H, Baldini N, Langille MGI, Ben-Nun A, Kaufman B, Nissan A, Golan T, Dadiani M, Levanon K, Bar J, Yust-Katz S, Barshack I, Peeper DS, Raz DJ, Segal E, Wargo JA, Sandbank J, Shental N, Straussman R. ***The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria***. Science. 2020 May 29;368(6494):973-980.