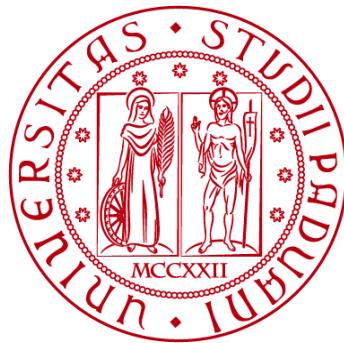


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**La reuterina in un microbioma intestinale sano
sopprime lo sviluppo del cancro al colon-retto
attraverso l'alterazione del bilancio redox**

Tutor: Prof.ssa Gaia Codolo

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Gioia Isma

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

0. ABSTRACT

1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO	1
1.1 Il cancro al colon retto (CRC)	1
1.2 Ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi e concetto di disbiosi.....	2
1.3 <i>Lactobacillus reuteri</i> e il suo metabolita reuterina.....	3
2. APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI	4
2.1 Modelli murini.....	4
2.2 Linee cellulari.....	4
2.3 Soggetti umani.....	4
2.4 Ceppi batterici	4
2.5 Metodi per la valutazione della citotossicità <i>in vitro</i>	5
2.5.1 <i>Saggio di crescita cellulare</i>	5
2.5.2 <i>Saggio della lattato deidrogenasi (LDH)</i>	5
2.5.3 <i>Colony forming assay</i>	5
2.6 Saggio di identificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)	6
2.7 Real Time PCR (RT-PCR).....	6
2.8 Sequenziamento rRNA 16S e analisi delle comunità microbiche.....	7
2.9 Saggio della puromicina (SUnSET).....	7
2.10 Western Blot (WB).....	7
2.11 Istologia e immunoistochimica	8
2.12 Immunofluorescenza	8
3. RISULTATI.....	9
3.1 I metaboliti fecali isolati dal modello murino wild-type inibiscono la crescita delle cellule di tumore al colon.....	9
3.2 I livelli di reuterina sono ridotti in uomo e modelli murini affetti da CRC	10
3.3 La reuterina è un inibitore citotossico per la crescita delle cellule di tumore al colon	13
3.4 La reuterina induce stress ossidativo nelle cellule di tumore al colon	15
3.5 La reuterina agisce attraverso la sottrazione del glutatione (GSH).....	16
3.6 La reuterina induce ossidazione proteica e inibisce selettivamente la biogenesi dei ribosomi.....	17
3.7 La reuterina inibisce la crescita del cancro al colon retto <i>in vivo</i>	19
4. DISCUSSIONE.....	21
5. APPROFONDIMENTO	22
5.1 Introduzione agli organoidi	22
5.2 Applicazioni degli organoidi	23
6. BIBLIOGRAFIA.....	24

ABSTRACT

La disbiosi è una condizione di mancato equilibrio della flora microbica che contribuisce all'insorgenza di stati infiammatori, cancro al colon-retto (CRC), e può anche interferire con la risposta alle terapie. Se la correlazione tra insorgenza del tumore al colon retto e stato alterato della microflora intestinale è nota, rimangono ancora da chiarire i meccanismi attraverso cui i metaboliti prodotti dal microbiota stesso agiscano. Il presente lavoro dimostra che i metaboliti fecali isolati da soggetti umani e murini sani inibiscono la crescita tumorale, mentre quelli estratti da soggetti affetti da CRC presentano questa azione in maniera molto ridotta. In particolare, un ruolo fondamentale è svolto dal batterio intestinale *Lactobacillus reuteri* che, grazie alla produzione di reuterina, altera il bilancio redox e riduce la proliferazione delle cellule tumorali. È stato constatato che soggetti sani presentino quantità più elevate di *L. reuteri* rispetto a pazienti affetti da CRC e che in quest'ultimi i livelli ridotti del microrganismo, e di conseguenza della reuterina, limitano una sua efficace azione anti-tumorale.

Da queste osservazioni lo studio in analisi ha confermato che la presenza di *L. reuteri* in un microbiota sano rappresenta un fattore protettivo nei confronti dello sviluppo del CRC, mentre una sua riduzione contribuisca alla progressione della patologia.

1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO

1.1 Il cancro al colon retto (CRC)

Il cancro al colon retto è la terza tipologia di cancro più frequente nell'uomo e la quarta causa di morte tra i tumori. Il CRC fa parte dei tumori solidi e come questi è caratterizzato da una rapida proliferazione cellulare e da una condizione di ipossia, determinata da un'inadeguata vascolarizzazione. L'ipossia gioca un ruolo fondamentale nella progressione della patologia, dal momento che conduce a un aumento dell'angiogenesi, della glicolisi e delle capacità invasive e metastatiche delle cellule tumorali, nonché instabilità genomica e resistenza ai meccanismi di apoptosi. Il microambiente tumorale (TME) inoltre determina una soppressione della risposta immunitaria dei linfociti T, in quanto l'ambiente ostile rende difficile l'adattamento delle cellule immunitarie che necessitano di un metabolismo elevato per esercitare un'azione anti-tumorale efficace [1]. Si distinguono diverse tipologie di CRC sulla base della localizzazione della massa tumorale che è influenzata a sua volta dal sesso e dall'età. In particolare, si osserva nel 41% dei casi un cancro al colon prossimale, nel 22% un cancro al colon distale e nel restante 28% un cancro al retto [2]. Si tratta di una patologia multifattoriale in cui entrano in gioco diversi fattori che possono predisporre o meno all'insorgenza della malattia. I fattori di rischio noti del cancro al colon retto sono collegati alla dieta, alla componente genetica e ad altre cause di tipo non ereditario [2]. La familiarità in particolar modo gioca un ruolo importante in quanto aumenta la probabilità di insorgenza del tumore di circa 2 volte nel 20% dei casi in cui i pazienti presentano parenti di I grado colpiti da questa patologia. L'importanza dell'alimentazione è stata indagata con studi recenti che hanno evidenziato come uno stile di vita sano e una dieta equilibrata concorrano al benessere dell'organismo e quindi alla prevenzione di stati patologici. Una dieta ad alto contenuto di grassi e povera di fibre è associata a un aumento dei tumori intestinali in quanto favorisce le trasformazioni maligne di polipi del colon pre-esistenti. Al contrario le fibre alimentari non digeribili stimolano la produzione, da parte del microbiota, di acidi grassi a corta catena (SCFAs) come il butirrato [3], i quali presentano un'azione anti-infiammatoria e anti-tumorale, rafforzano la barriera epiteliale dell'intestino e inibiscono la produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 β , IL-6 e TNF- α . L'alcool presenta un'associazione positiva con il cancro al colon in quanto l'acetaldeide, un metabolita dell'etanolo, risulta essere carcinogena e interferisce con la sintesi e la riparazione del DNA, altera la struttura e la funzione del glutatione e incrementa la proliferazione della mucosa del colon. L'incidenza del cancro al colon retto varia molto nei diversi Paesi a causa di vari fattori, tra i quali si riscontrano le condizioni socio-economiche che, se basse, aumentano il rischio di insorgenza della patologia. Nonostante l'incidenza e il tasso di mortalità del CRC negli

ultimi anni si siano ridotte notevolmente, grazie all'elaborazione di sistemi di screening più accurati e di trattamenti più efficaci, si è osservato un aumento del 2% di casi di comparsa di questa patologia in età giovanile (al di sotto dei 50 anni di età); le cause di questo fenomeno ad oggi non sono ancora state del tutto chiarite. Si è stimato che dal 2030 il tasso di incidenza del cancro al colon e al retto sarà aumentato rispettivamente del 90,0% e del 124,2% nei pazienti di età compresa tra 20 e 34 anni [2].

1.2 Ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi e concetto di disbiosi

Con il termine microbiota si intendono i diversi miliardi di microrganismi che colonizzano il nostro organismo e che si trovano in vari distretti anatomici, ognuno dei quali presenta un peculiare microbiota. Complessivamente i microrganismi sono presenti in quantità molto elevata, tanto che si stima che il loro numero sia pari a 10 volte il numero di cellule costituenti l'intero organismo. Il microbiota intestinale è coinvolto in diversi processi che influenzano la salute umana, in quanto i suoi componenti sintetizzano un ampio range di composti necessari al benessere dell'organismo tra i quali si riscontrano vitamine, amminoacidi e altre piccole molecole che possono influenzare processi cellulari quali espressione genica, proliferazione e apoptosi. Altra attività molto importante che i batteri commensali ricoprono riguarda l'attivazione del sistema immunitario (SI) mucosale e sistemico [3,4]. Il sistema immunitario del colon, in una condizione non patologica, è mantenuto da un bilancio tra cellule pro-infiammatorie che rispondono a patogeni e antigeni non self e cellule anti-infiammatorie che sopprimono delle risposte potenzialmente dannose nei confronti di batteri commensali e loro metaboliti. La composizione del microbiota è dinamica e con il tempo può subire delle alterazioni determinate da fattori quali stress, alimentazione, età e assunzione di probiotici e prebiotici [3]. Si parla di disbiosi quando vi è un'alterazione della normale microflora intestinale che vede un aumento della popolazione di batteri intestinali che presentano dei tratti patogenici e che occasionalmente possono causare la comparsa di malattie. Queste variazioni, infatti, possono alterare l'equilibrio tra la risposta immunitaria pro-infiammatoria e quella anti-infiammatoria e l'effetto finale che si osserva è la comparsa di patologie. È stato dimostrato sperimentalmente che alcune specie di batteri commensali possono promuovere stati infiammatori e sviluppo del cancro [5]; di questi fa parte *Fusobacterium nucleatum*, un batterio commensale che può diventare patogeno in condizioni di disbiosi [4,6]. In questo contesto, *F. nucleatum* è in grado di prendere il sopravvento nella microflora, stimolare una risposta infiammatoria locale e sopprimere il SI. È un microrganismo che si trova particolarmente abbondante nel microbiota del colon di pazienti affetti da CRC, se

comparato con i livelli presenti in soggetti sani e questa sua presenza consistente è associata a una prognosi peggiore e a resistenze alla chemioterapia. Numerosi esperimenti in vivo condotti sia in modelli murini che sviluppano spontaneamente il tumore al colon sia in modelli in cui il tumore viene indotto chimicamente dimostrano una riduzione della diversità nel microbiota intestinale. Non è ancora chiaro il meccanismo con cui ciò avvenga, ma dai risultati ottenuti da diversi studi si può confermare che il microbiota può alterare la crescita tumorale, cambiando i metaboliti prodotti. Nello studio in analisi è stato indagato il ruolo ricoperto dal microrganismo *Lactobacillus reuteri* che, grazie alla produzione di reuterina, può potenzialmente ridurre la progressione del cancro al colon.

1.3 *Lactobacillus reuteri* e il suo metabolita reuterina

Lactobacillus reuteri è un batterio Gram positivo della famiglia *Lactobacillaceae* e appartenente al phylum dei *Firmicutes* che si trova nel tratto gastro-intestinale, nella mucosa vaginale e orale. Viene considerato un ceppo probiotico in quanto studi clinici hanno dimostrato che una sua adeguata somministrazione può apportare dei benefici all'uomo. Un'importante funzione di questo microrganismo è la sua capacità di ridurre l'espressione di mediatori pro-infiammatori quali IL-1 β , IL-8 e TNF- α e aumentare l'espressione di citochine anti-infiammatorie. Tra i metaboliti di *L. reuteri* si riscontra la reuterina (β -idrossipropionaldeide), un intermedio del metabolismo anaerobico del glicerolo che porta quest'ultimo a essere convertito in 1,3-propandiololo. Studi condotti hanno confermato che la reuterina presenta una funzione antimicrobica ad ampio spettro che esplica in condizioni di aerobiosi e anaerobiosi ed è in grado quindi di proteggere da batteri potenzialmente patogeni Gram positivi e Gram negativi oltre che lieviti, muffe e anche protozoi [7]. Questa attività della reuterina è attribuita alla riduzione dei gruppi tiolici liberi presenti a livello di enzimi e proteine, causando così uno squilibrio dello stato redox della cellula che conduce la stessa alla morte. Un meccanismo d'azione molto importante della reuterina coinvolge il glutatione, un tripeptide costituito dagli amminoacidi Glu-Cys-Gly che viene legato dal metabolita microbico con conseguente riduzione dei suoi livelli. Lo studio in analisi inoltre ha evidenziato che la reuterina è in grado di indurre apoptosi nelle cellule tumorali attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno e intorno al tessuto tumorale e inibire processi cellulari chiave come la biogenesi dei ribosomi e la sintesi proteica.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: materiali e metodi

2.1 Modelli murini

Gli esperimenti sono stati condotti su modelli murini KO condizionali (epitelio intestinale) tamoxifen inducibili, provenienti dal Jackson Labs, mantenuti in un ambiente privo di patogeni, a temperatura controllata e con un ciclo di 12 ore luce/buio. Per gli esperimenti sono stati usati topi di 4-6 settimane di vita e sono stati nutriti con una dieta standard. I ceppi murini sono il wild-type C56BI/6J (controllo negativo), il singolo mutante CDX2-ER^{T2}Cre; Apc^{fl/fl}, il doppio mutante CDX2-ER^{T2}Cre; Apc^{fl/fl}, Trp53^{fl/fl} e il triplo mutante Apc^{fl/fl}, Trp53^{fl/fl}, Kras^{LSLG12D}; in essi si osserva uno sviluppo tumorale sempre più grave, a partire dal SingleMut fino ad arrivare al TripleMut, che riflette il livello di mutazione genetica che il modello murino presenta. Dopo una decina di giorni dall'induzione con tamoxifen i topi sono stati sacrificati e sono stati prelevati dei campioni fecali e tissutali sui quali sono state effettuate analisi del microbiota, analisi di metabolomica e proteomica.

2.2 Linee cellulari

Per gli esperimenti condotti *in vitro* sono state utilizzate quattro linee cellulari intestinali tumorali umane: HCT116, SW480, DLD1 e RKO e la linea cellulare intestinale non tumorale NCM460. Inoltre, sono state utilizzate anche le cellule HeLa, una linea di cellule tumorali della cervice uterina. Tutte le cellule sono mantenute in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con il 10% di siero fetale bovino e 1% di agente antibiotico/antimicotico, a 37°C con il 5% CO₂ e il 21% O₂.

2.3 Soggetti umani

Nello studio sono stati coinvolti soggetti sani (control) e malati (cancer) di entrambi i sessi e di età compresa tra i 18 e i 55 anni, dopo che sono stati sottoposti a controlli fisici ed è stata analizzata la loro precedente storia clinica. Sono stati prelevati dei campioni di tessuto durante interventi chirurgici oppure colonscopia da entrambi i tessuti (sani e tumorali) e dei campioni fecali, al fine di quantificare la presenza di *L. reuteri* nei diversi soggetti in analisi. Appena prelevati i campioni biologici sono stati congelati fino all'utilizzo.

2.4 Ceppi batterici

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati utilizzati il ceppo di *L. reuteri* wild-type ATCC PTA6475, isolato dal latte materno umano e il ceppo mutante PRB94. I batteri sono stati cresciuti in MRS (*de Man, Rogosa e Sharpe broth con composizione: peptone, estratto di carne ed estratto di lievito, glucosio, potassio fosfato, sodio acetato, diammonio citrato, magnesio solfato, manganese solfato, Tween 80*) oppure LB (*Luria Bertani con composizione: triptone, estratto di lievito, NaCl*) a 37°C in una fiala di vetro, alla concentrazione di ossigeno atmosferico. I batteri isolati dall'omogenato di feci prelevate dai modelli murini e dai soggetti umani coinvolti nello studio sono stati coltivati a 37°C in MRS.

2.5 Metodi per la valutazione della citotossicità *in vitro*

Nell'articolo in analisi per valutare l'azione citotossica mediata dai metaboliti fecali e da altri composti testati quali reuterina, N-acetilcisteina (NAC) e butionina sulfoximina (BSO) i ricercatori si sono avvalsi di diverse metodiche con le quali è stato possibile indagare la vitalità cellulare a seguito del trattamento *in vitro*.

2.5.1 Saggio di crescita cellulare

Il saggio di crescita è stato effettuato con due modalità differenti. La prima basandosi sulla riduzione del blu di tiazolile (MTT) a cristalli viola di formazano insolubili, grazie all'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, attivo solo nelle cellule vive. Per eseguire il saggio le cellule sono state piastrate e dopo 24 ore è stata eseguita una prima lettura dell'assorbanza (Day 0). Sono stati effettuati poi i trattamenti con le concentrazioni indicate di metaboliti per 24 ore a seguito delle quali è stata allestita l'incubazione con la soluzione di MTT (5mg/mL in PBS 1X, pH 7,4) per 45 minuti. Il terreno di coltura e la soluzione di MTT sono state poi aspirate ed è stata eseguita una solubilizzazione con dimetil-solfossido dei cristalli formati. La reazione è valutata mediante la lettura spettrofotometrica del campione alla lunghezza d'onda di 570 nm. Il secondo metodo prevede l'utilizzo di una tecnica di microscopia e imaging che consente di eseguire una conta cellulare (ogni 24 ore) a seguito del trattamento delle cellule precedentemente piastrate.

2.5.2 Saggio della lattato deidrogenasi (LDH)

Il saggio di vitalità e citotossicità LDH è un saggio che viene utilizzato per valutare la morte cellulare. Si basa sul rilascio dell'enzima LDH da parte delle cellule danneggiate o morte, in quanto tale enzima è normalmente presente a livello citoplasmatico di tutte le cellule, ma viene rilasciato solo in seguito alla perdita di integrità della membrana plasmatica. Nell'esperimento in analisi 10.000 cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti e lasciate crescere overnight. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con 100 μ M di reuterina e il surnatante è stato raccolto 24 ore dopo il trattamento e incubato per 30 minuti con un reagente che rileva la presenza di LDH. L'assorbanza dei campioni è stata misurata a 490 nm.

2.5.3 Colony forming assay

È un saggio di sopravvivenza cellulare che si basa sulla capacità di una singola cellula di proliferare in una colonia. Per eseguire questo saggio le cellule sono state piastrate in triplicato biologico in una piastra a 6 pozzetti (seminate 600 cellule/pozzetto in 2 mL di terreno). Dopo 48 ore le cellule sono state trattate con concentrazioni 5 μ M, 25 μ M e 100 μ M di reuterina per 14 giorni. Trascorso questo tempo il saggio si è concluso, fissando in formalina fredda 10% per 10 minuti e colorando con cristalvioletto 0,5% e metanolo 20% per 30 minuti. Le colonie sono state contate manualmente.

2.6 Saggio di identificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le cellule sono state trattate con una concentrazione 100 μM o 200 μM di reuterina per 24 ore, a seguito delle quali sono state incubate con 10 μM di carbossi-H2DCFDA (un dye permeante le cellule) in PBS a 37°C per 45 minuti. Il carbossi-H2DCFDA è una forma ridotta e acetilata della fluoescina che non risulta essere fluorescente fino a quando i suoi gruppi acetato non vengono rimossi per azione delle ROS. A seguito di questa conversione, il dye assume una colorazione verde fluorescente rilevabile. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate e risospese in PBS ed è stata effettuata una lettura dell'intensità media di fluorescenza (MFI). Per la misurazione dei lipid ROS è stato utilizzato il dye BODIPY 581/591; le cellule tumorali sono state seminate e trattate con 100 μM di reuterina per 12 ore, successivamente sono state raccolte nel buffer HBSS, lavate e colorate con 5 μM di dye a 37°C per 30 minuti. È stata eseguita la lettura della MFI, rilevata mediante analisi di citofluorimetria a flusso, una tecnica che permette di rilevare la presenza di specifiche molecole presenti in una sospensione fluida, sulla base dei segnali generati da marcatori fluorescenti.

2.7 Real Time PCR (RT-PCR)

La RT-PCR, o PCR quantitativa (qPCR) è una metodica che permette di rilevare e quantificare RNA presente in un campione; è un metodo di analisi dell'espressione genica. La procedura prevede la retrotrascrizione ad opera della trascrittasi inversa (RT) del RNA a cDNA, il quale funge poi da template per la reazione di amplificazione. Il prodotto della qPCR viene misurato in itinere, dal ciclo 0 fino alla fine della reazione, grazie alla valutazione del livello di fluorescenza. Nell'articolo in esame è stato estratto 1 μg di RNA totale servendosi del Trizol, a partire dal tessuto epiteliale intestinale di topo, linee cellulari intestinali di uomo e feci murine. Sono stati utilizzati la retrotrascrittasi SuperScript™ III per la reazione di retrotrascrizione, dei primer specifici per il gene del cDNA (Tabella 1) e il SYBR green, un fluoroforo in grado di legarsi selettivamente al DNA a doppia elica. L'analisi è stata eseguita con il sistema *QuantStudio 5* e il fold-change dei geni è stato calcolato con il metodo del $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizzando come gene housekeeping la β -actina. La procedura per la qPCR batterica prevede l'estrazione del DNA ribosomale e l'utilizzo di primer progettati per amplificare specificatamente i geni di batteri di interesse. Nel caso di *L. reuteri* i primer specifici e quelli universali per il gene 16S, utilizzati per la normalizzazione dei risultati, sono consultabili in Tabella 2.

Gene	Sequenza primer
HMOX1	AGGTACACATCCAAGCCGAGA (F) CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT (R)
NQO1	GGACTGCACCAGAGCCAT (F) GCCTCCTTCATGGCATAGTT (R)
GCLM	GGAGGAAACCAAGCGCCAT (F) CTTGACGGCGTGGTAGATGT (R)
LTV1	GAAAGCTGTGTCTTTCACTTGG (F) GCACTGAAGGTACTTGAGGA (R)
RIOK2	CCAAGTTGCGTTACATGAGCC (F) CATTGTCAACCGATAGCCCT (R)
YEATS2	CCATCAAAGAAACCGACCCTG (F) CTTCAATCAGTCGCTGGTCAAT (R)

Tabella 1: Sequenze forward e reverse dei primer utilizzati per l'analisi RT-PCR.

<i>Lactobacillus reuteri</i>	ACCGAGAACACCGCGTTATTT (F) CATAACTTAACCTAAACAATCAAAGATTGTCT (R)
Primer universali	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG (F) ATTACCGCGGCTGCTGG (R)

Tabella 2: Sequenze forward e reverse dei primer utilizzati per l'analisi del DNA batterico.

2.8 Sequenziamento rRNA 16S e analisi delle comunità microbiche

Il rRNA 16S è una componente della subunità 30S dei ribosomi procariotici che si lega alla sequenza Shine Dalgarno. È codificato dai geni identificati come geni 16S rRNA, dei geni che evolvono molto lentamente e per questo motivo vengono analizzati per fare filogenesi. Il sequenziamento 16S è una tecnica che permette di determinare le specie microbiche in un campione. Per la caratterizzazione del microbiota è stato prelevato materiale fecale e campioni mucosali attraverso raschiamento ed è stata eseguita un'amplificazione della regione ipervariabile V4 del gene 16S, utilizzando la strategia di sequenziamento a doppia indicizzazione. Il sequenziamento è stato eseguito sulla piattaforma *Illumina MiSeq* e le reads sono state analizzate con il software Mothur, utilizzando il database di RNA ribosomale SILVA.

2.9 Saggio della puromicina (SUnSET)

Al fine di valutare i livelli di traduzione attiva osservati negli esperimenti condotti *in vitro* su linee cellulari oppure su campioni di colon prelevati dai modelli murini, i ricercatori hanno utilizzato il saggio della puromicina accoppiato alla metodica di western blot. Il principio alla base di questo saggio è il legame dell'antibiotico puromicina al sito A del ribosoma, facendo sì che la catena polipeptidica nascente venga trasferita sulla puromicina e non sul complesso aa-tRNA. Per gli esperimenti *in vitro* le cellule sono state trattate per 24 ore con dosi crescenti di reuterina (da 1 a 150 μ M) e in seguito sono state incubate per 10 minuti con 1mg/mL di puromicina. Per le analisi condotte *in vivo* i campioni tissutali prelevati dai modelli murini sono stati omogenati e incubati con 1 mg/mL di puromicina per 30 minuti, a seguito dei quali si è ottenuto un lisato servendosi di beads magnetiche. Il lisato è stato congelato e utilizzato in seguito per le analisi di western blot con l'anticorpo anti-puromicina.

2.10 Western Blot (WB)

È una tecnica che permette il trasferimento di proteine da un gel di poliacrilammide in cui è stata svolta una corsa elettroforetica a una membrana di nitrocellulosa, senza che le macromolecole cambino la forma o il livello di diffusione acquisiti alla fine della separazione elettroforetica. Una volta eseguito il trasferimento le proteine di interesse sono visualizzate tramite un anticorpo primario specifico, a cui segue l'incubazione con un anticorpo secondario coniugato a un enzima o a un fluoroforo. Nell'articolo in analisi le cellule trattate sono state lisate con il buffer RIPA (0,5M Tris-HCl, pH 7,4; 1,5M NaCl; 2,5% acido desossicolico; 10% NP-40; 10 mM EDTA) e centrifugate a 13.000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato caricato su gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE) aggiungendo ad ogni campione il buffer di

caricamento *Laemmli 5X* (composizione: blu di bromofenolo, SDS, glicerolo e Tris-HCl). Gli anticorpi utilizzati sono rappresentati dagli anticorpi primari anti-puromicina e anti-actina (1:1000), incubati overnight a 4°C e i rispettivi anticorpi secondari specifici coniugati con l'enzima perossidasi di rafano (HRP) (1:2000).

2.11 Istologia e immunoistochimica

Questa tecnica permette di rilevare la presenza di una molecola antigenica servendosi di anticorpi specifici coniugati con un tracciante enzimatico, il quale permette una reazione di precipitazione con un substrato cromogeno, evidenziando così la zona adiacente all'antigene. Nell'articolo in esame i tessuti tumorali prelevati sono stati fissati in formalina per 24 ore, in seguito inclusi in paraffina e sezionati per ricavare delle fettine di 5 µm. È stato eseguito lo smascheramento antigenico facendo bollire le sezioni per 10 minuti in buffer citrato e in seguito le slides sono state incubate con siero di capra al 5% in PBS con lo scopo di prevenire la formazione di legami aspecifici. Nell'analisi condotta sono stati utilizzati degli anticorpi primari specifici anti-Ki67, anti-4HNE e anti-cCaspase 3 (1:250); in seguito sono stati effettuati due lavaggi con PBST (soluzione di PBS contenente Triton-X, un detergente non ionico). I campioni sono stati poi incubati con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio coniugato con HRP (1:500) per 1 ora. È stato effettuato un secondo lavaggio, a seguito del quale è stata allestita l'incubazione con 3,3-diamminobenzidina (DAB), un substrato cromogeno dell'enzima HRP che forma un prodotto finale di colore marrone non solubile in alcol che aumenta la colorazione del campione ed è visibile al microscopio ottico. Dopo che il campione ha assunto la colorazione marrone la reazione è stata bloccata con acqua distillata e sono state eseguite delle fasi di disidratazione. Infine, i vetrini sono stati montati con Permount Mounting Medium e osservati al microscopio.

2.12 Immunofluorescenza

È una tecnica di immunoistochimica in cui la molecola coniugata all'anticorpo è un fluoroforo; nell'articolo in esame è stata utilizzata per l'analisi del marcatore gamma-H2AX. Le cellule sono state trattate per 24 ore con concentrazioni 50 µM e 100 µM di reuterina e il controllo positivo è stato ottenuto trattando le cellule con 2 Gy di radiazioni per 2 minuti. Le cellule sono state poi fissate in formaldeide 10% e permeabilizzate con 0,01% di Triton 100X. È stata eseguita la reazione di binding overnight con l'anticorpo primario anti-p-histone H2A e in seguito è stata allestita la reazione con anticorpo secondario anti-topo, specifico per l'anticorpo primario utilizzato, per un'ora al buio in 0,01% Triton 100X e 3% BSA. I nuclei delle cellule sono stati visualizzati utilizzando il colorante fluorescente DAPI e i risultati sono stati analizzati al microscopio confocale.

3. RISULTATI

Lo studio del coinvolgimento dei metaboliti microbici nell'ambito dello sviluppo e della progressione del CRC è un ambito ancora giovane e in evoluzione. Tra i diversi risultati ottenuti con gli studi condotti fino ad ora si è osservato che alcuni sotto-prodotti microbici possono essere coinvolti nel processo patologico di inizio e progressione del CRC, ma non si sa ancora bene come questi agiscano. In questo articolo si è indagato come la reuterina, metabolita prodotto dal microrganismo *L. reuteri*, eserciti la sua azione inibente nei confronti della progressione del CRC.

3.1 I metaboliti fecali isolati dal modello murino wild-type inibiscono la crescita delle cellule di tumore al colon

Al fine di dimostrare il contributo dei metaboliti fecali nello sviluppo del CRC, i modelli murini ingegnerizzati SingleMut, DoubleMut e TripleMut sono stati sottoposti a trattamenti con tamoxifen per indurre la tumorigenesi a livello del colon-retto. Dopo una decina di giorni dal trattamento sono stati isolati i loro metaboliti fecali e quelli derivanti dal modello murino wild-type, con i quali sono state trattate *in vitro* le linee cellulari tumorali SW480, DLD1, RKO e HCT116. Dall'analisi si è evinto che solo i metaboliti isolati dal modello murino wild-type sono inibitori della proliferazione cellulare. L'azione inibente dei metaboliti fecali isolati dai modelli SingleMut e DoubleMut è ancora presente, ma in maniera inferiore rispetto a quella derivante dal trattamento con i metaboliti fecali del modello WT, mentre i metaboliti estratti dai campioni biologici di modelli murini TripleMut non presentano un'azione repressiva efficace nei confronti della proliferazione delle cellule tumorali (Fig. 1).

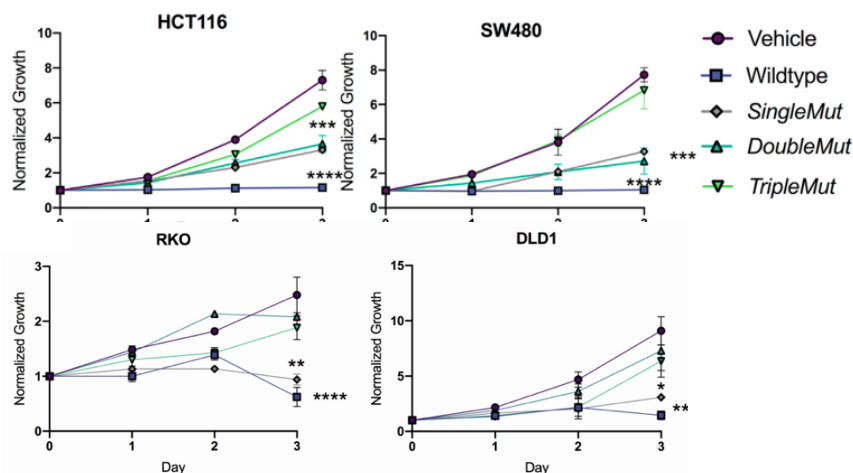


Figura 1: La crescita delle linee cellulari tumorali è fortemente inibita dai metaboliti fecali isolati dal modello murino wild-type. Le linee cellulari tumorali sono state trattate con una concentrazione 100X di metaboliti fecali risospesi in DMSO (n=9). A seguito del trattamento è stata valutata la crescita cellulare; il dato è mostrato come crescita normalizzata nel tempo. Il controllo negativo è stato ottenuto trattando le cellule con DMSO (vehicle). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

Questi dati hanno dimostrato che i metaboliti fecali esercitano un'azione inibente sulle cellule tumorali, inducendone l'apoptosi e in particolare quest'azione è molto marcata nei metaboliti fecali isolati dal modello murino wild-type.

Gli stessi risultati sono stati confermati anche da esperimenti condotti incubando le cellule tumorali HCT116 e SW480 con metaboliti fecali isolati da soggetti umani sani e affetti da CRC. Nell'analisi è stata utilizzata anche una linea di controllo rappresentata da NCM460, una linea cellulare non tumorale di cellule intestinali umane che si è visto essere resistente all'azione repressiva mediata dai metaboliti (Fig. 2).

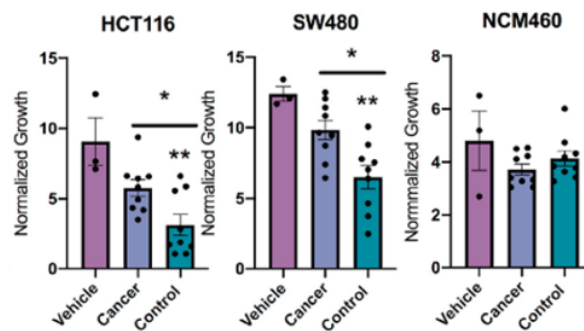


Figura 2: Saggio di crescita cellulare. Le linee cellulari di tumore al colon umano (HCT116 e SW480) e la linea di epitelio intestinale umano sano (NCM460) sono state trattate con i metaboliti isolati da pazienti affetti da CRC (Cancer) e da soggetti sani (Control) o con un pari volume di buffer (vehicle). Il risultato dell'analisi è mostrato nel grafico in cui si osserva la crescita normalizzata delle tre linee cellulari; ciascun campione è stato analizzato in triplicato (n=9). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (*p < 0.05, **p < 0.01).

Constatata l'azione inibente dei metaboliti fecali, sono state condotte delle analisi di metabolomica e spettrometria al fine di identificare i composti più abbondanti nel materiale fecale del modello murino wild-type. I risultati ottenuti vedono la reuterina e il 1,3-diamminopropano (DAP) come i metaboliti maggiormente presenti a livello del colon sano, di cui la reuterina è stata identificata come principale composto inibitore della proliferazione delle cellule del cancro, *in vitro* (dato non mostrato).

3.2 I livelli di reuterina sono ridotti in uomo e modelli murini affetti da CRC

Identificata la differente azione inibitoria mediata dai metaboliti fecali isolati dai diversi modelli murini, si è indagato se ci fossero variazioni nella normale composizione della microflora in soggetti affetti da CRC. A tale scopo è stato eseguito un sequenziamento di rRNA 16S dai campioni biologici di feci provenienti dalla cucciolata wild-type e dai mutanti DoubleMut e TripleMut. Dall'analisi è emerso che nei tre modelli analizzati sono presenti delle significative differenze nel microbiota (Fig. 3A), in particolare le più rilevanti sono state riscontrate a livello di batteri del genere *Lactobacillus*, soprattutto *L. reuteri*, seguiti poi da *Lachnospiraceae* e *Muribaculaceae* (Fig. 3B); quest'ultimi presentano una correlazione negativa con stati infiammatori e CRC. Questi tre generi risultano essere meno abbondanti nel materiale fecale

proveniente da soggetti affetti da cancro al colon retto rispetto a quello proveniente dai relativi controlli sani.

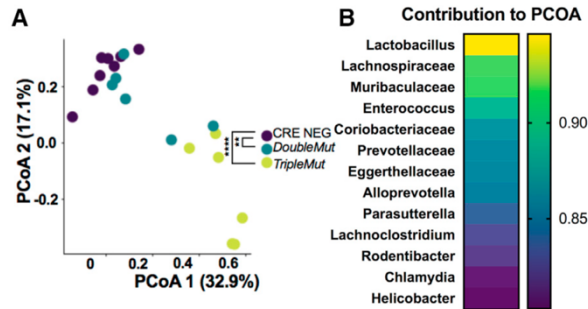


Figura 3: La composizione del microbiota nei diversi modelli murini mostra significative differenze. (A) Analisi delle coordinate principali (PCoA) dei dati derivanti dall'analisi di sequenziamento del rRNA 16S a partire dal DNA fecale isolato dai diversi modelli murini indotti (n=6-8). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**p < 0.01, ***p < 0.0001) comparando i valori con quelli del modello murino Cre Neg (B) Lunghezza dei vettori del PCoA plot delle specie microbiche indicate (n=6-8). Una minore distanza che collega i campioni indica una somiglianza tra gli stessi.

La riduzione di *L. reuteri* si osserva sia negli stadi precoci sia negli stadi tardivi del tumore al colon retto e in particolare risulta essere sempre più marcata mano a mano che la patologia progredisce (Fig. 4A). Dal momento che *L. reuteri* è il maggiore produttore di reuterina, questa osservazione spiega il motivo per il quale i metaboliti fecali isolati dai modelli murini ingegnerizzati presentano un'azione inibitoria nei confronti delle cellule tumorali meno marcata rispetto a quella dei metaboliti isolati dal modello murino WT.

Come conferma di questi dati sono stati allestiti degli studi di coorte coinvolgendo pazienti affetti da un cancro a diversi stadi e sono stati confrontati i livelli di *L. reuteri* quantificati in campioni prelevati da tessuti tumorali e tessuti sani adiacenti. Dall'analisi di qPCR condotta sui diversi campioni è stato constatato che i livelli del microorganismo, e quindi di reuterina, sono significativamente ridotti nei campioni tumorali se confrontati con i tessuti sani adiacenti, in tutti gli stadi del tumore (Fig. 4B).

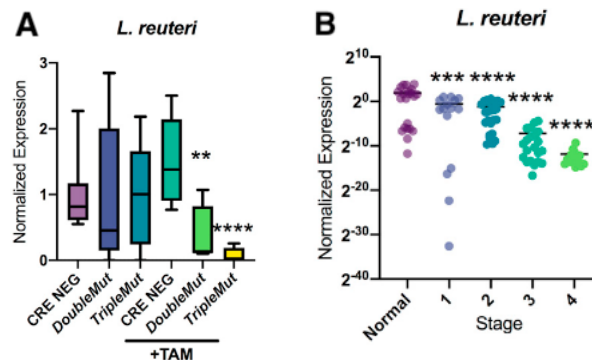


Figura 4: La presenza di *L. reuteri* è ridotta nei campioni fecali e tissutali provenienti da soggetti affetti da CRC. Il dato mostra l'espressione di *L. reuteri* a seguito di analisi di qPCR condotte (A) a partire dal DNA fecale dei modelli murini indicati, prima e dopo l'inizio del trattamento con 50 mg/kg di tamoxifen (n=6-8) (B) a livello del tessuto tumorale ottenuto da campioni tissutali di soggetti umani con un cancro a diversi stadi (n=96). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

Dal momento che le analisi condotte su pazienti hanno dimostrato una maggiore riduzione dei livelli di reuterina nei tessuti tumorali, i ricercatori hanno ipotizzato che il tessuto epiteliale tumorale potesse influenzare localmente la presenza di *L. reuteri* e del suo metabolita. Per indagare la causa della disbiosi, *L. reuteri* è stato trattato *in vitro* con i metaboliti fecali provenienti dal TripleMut e dal controllo negativo e dagli esperimenti si è evinto che solo i metaboliti del triplo mutante inibiscono la crescita del microrganismo (Fig. 5A e 5B).

Per indagare se il composto inibitore fosse di derivazione microbica o epiteliale è stato effettuato un esperimento che prevedeva la somministrazione di un cocktail di antibiotici ad ampio spettro al triplo mutante, una settimana prima dell'inizio del trattamento con tamoxifen, con lo scopo di eliminare il suo microbiota intestinale. Sono stati isolati poi i metaboliti fecali del modello murino ed è stato constatato che, anche a seguito del trattamento antibiotico, i metaboliti sono ancora in grado di inibire fortemente la crescita di *L. reuteri* (Fig. 5C), suggerendo quindi che la sorgente del composto inibitore non sia di natura microbica. La conferma della derivazione epiteliale del composto è stata ottenuta osservando che il terreno di coltura condizionale proveniente dalle linee cellulari SW480, HCT116 e RKO inibisce la crescita del batterio, anche dopo essere stato scaldato (Fig. 5D).

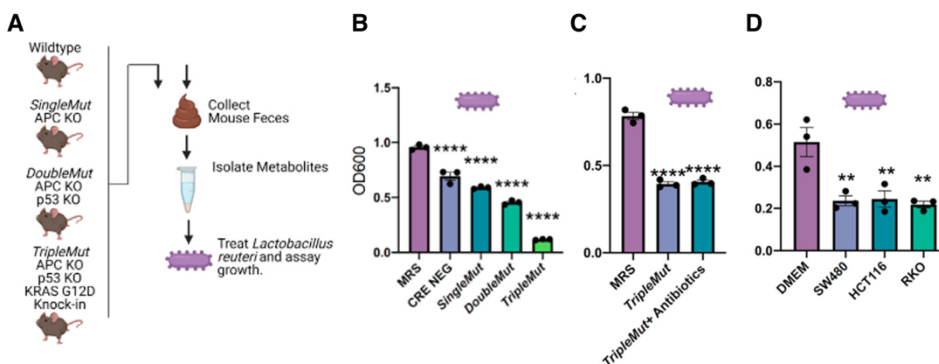


Figura 5: Saggio di crescita di *L. reuteri*. (A) Rappresentazione schematica della procedura sperimentale (B) Le colture di *L. reuteri* sono state trattate con metaboliti fecali estratti dai modelli murini indicati, a una concentrazione 100X per 24 ore (n=3) (C) Le colture di *L. reuteri* sono state trattate con metaboliti fecali estratti dal modello murino TripleMut sottoposto e non al trattamento antibiotico ad ampio spettro (n=3) (D) Le tre linee cellulari tumorali indicate sono state fatte crescere in DMEM con il 10% FBS per 48 ore, in seguito il terreno è stato arricchito con il 20% MRS prima di incubarlo con *L. reuteri* (n=3). In seguito ai vari trattamenti è stata valutata la crescita batterica. Il controllo è stato fatto crescere in solo MRS (n=3) e il dato è mostrato come densità ottica misurata alla lunghezza d'onda di 600nm (OD600). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**p < 0.01, ****p < 0.0001).

Alla luce dei dati ottenuti, i ricercatori hanno analizzato i pathway arricchiti a livello del triplo mutante e dall'analisi è emerso che la degradazione delle omocisteine e il bilancio redox risultano essere alterati. Per indagare da quale pathway è specificatamente inibito il microrganismo, *L. reuteri* è stato trattato *in vitro* con l'estere etilico del

glutazione per indagare il bilancio redox e, a seguito del trattamento, non si è osservata inibizione di crescita. Contrariamente, trattando *L. reuteri* con dosi crescenti di metaboliti provenienti dalla via degradativa delle omocisteine è stata confermata l'azione inibente, identificando l'idrogeno solforato (H₂S) e la cistationina come principali responsabili dell'inibizione (*dato non mostrato*). Con questi risultati i ricercatori hanno evidenziato che esiste un'interazione tra i metaboliti batterici e quelli dell'ospite e che tale interazione contribuisce alla disbiosi.

3.3 La reuterina è un inibitore citotossico per la crescita delle cellule di tumore al colon

Constatata l'azione citotossica della reuterina *in vitro* si è andati ad indagare in che concentrazioni essa sia in grado di esplicare la sua azione. Si è visto che in concentrazioni 25 µM la reuterina inibisce la crescita delle linee cellulari HCT116, SW480, DLD1 e RKO e la sua tossicità *in vitro* è stata calcolata a concentrazioni pari a 50 µM (*Fig. 6*).

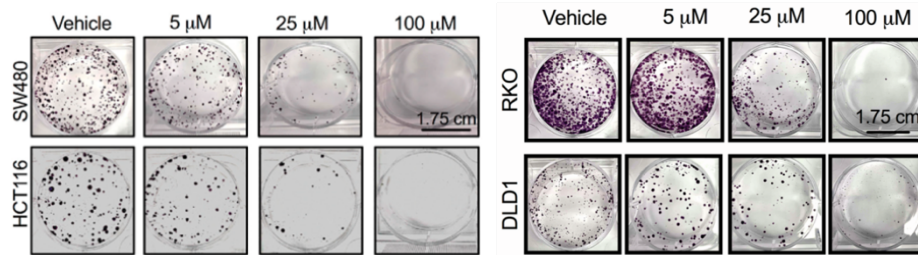


Figura 6: La reuterina è un inibitore della crescita delle linee cellulari tumorali SW480, HCT116, RKO, DLD1 *in vitro*. Le cellule sono state piastrate e dopo 48 ore trattate con concentrazioni crescenti di reuterina (5 µM, 25 µM, 100 µM) per 14 giorni. L'immagine mostra il risultato dell'analisi "colony forming assay" dopo la colorazione con cristalvioletto (n=3).

Come dimostrato precedentemente con esperimenti *in vitro*, è stato constatato che le cellule sane non vengono danneggiate dalla reuterina (*dato non mostrato*) e per confermare ulteriormente questo risultato sono state allestite delle colture di enteroidi ottenute partendo da campioni di colon prelevati dai modelli murini CRE negative (sano) e TripleMut (tumorale), dieci giorni dopo l'induzione con tamoxifen. Trattando gli organoidi con reuterina è stato osservato un aumento dell'apoptosi solo nelle cellule epiteliali del colon del triplo mutante, a conferma del fatto che la reuterina esplica la sua azione in maniera preferenziale sulle cellule tumorali (*Fig. 7A*). L'attività citotossica nei confronti delle cellule tumorali è stata ulteriormente confermata con il saggio LDH effettuato su linee cellulari tumorali trattate con reuterina (*Fig. 7B*).

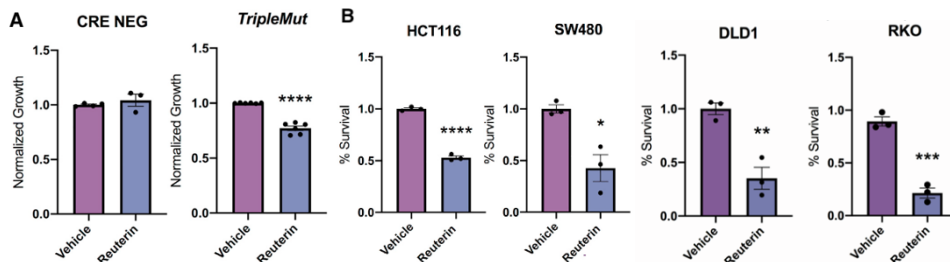


Figura 7: La sopravvivenza delle linee cellulari tumorali è ridotta notevolmente a seguito del trattamento con reuterina. (A) Crescita normalizzata delle cellule epiteliali degli enteroidi ottenuti dai modelli murini Cre neg (n=3) e TripleMut (n=6), a seguito del trattamento con 100 μ M di reuterina (B) Grafico che mostra la % di sopravvivenza cellulare delle linee cellulari tumorali indicate trattate con una concentrazione pari a 100 μ M di reuterina per 24 h (n=3). Il p-value è stato calcolato mediante t-test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

Dai risultati ottenuti è stato possibile confermare che le linee cellulari intestinali sane sono meno sensibili all'azione della reuterina rispetto alle cellule tumorali; il motivo alla base di questo fenomeno però non è stato ulteriormente indagato.

Confermata l'azione citotossica della reuterina, i ricercatori hanno iniziato ad indagare il suo meccanismo d'azione partendo da un'osservazione portata alla luce da studi precedenti, ovvero il fatto che la reuterina altera l'attività del fattore attivato da ipossia HIF-2 α . Si tratta di un fattore di trascrizione correlato positivamente con il tumore maligno al colon retto e coinvolto nel processo di import del ferro, un micronutriente fondamentale per la vita degli organismi, ma che sembra essere anche coinvolto nel processo di patogenesi [9,10]. Degli studi hanno scoperto che il microbiota intestinale, in condizioni normali, produce reuterina e DAP che inibiscono l'azione di HIF-2 α , prevenendo la sua dimerizzazione e incrementano la concentrazione della proteina ferritina, coinvolta invece nello stoccaggio del micronutriente. Queste azioni convergono in una riduzione dell'assorbimento del ferro da parte dell'ospite [8]. Dato che soggetti affetti da CRC sono caratterizzati da una condizione di disbiosi e constatato che a livello delle cellule tumorali vi è una sovraespressione, grazie a HIF-2 α , del trasportatore del ferro DMT1 [9], la cui inibizione ostacola la proliferazione cellulare, i ricercatori hanno indagato se la reuterina agisce con un meccanismo HIF-2 α dipendente. A tale scopo è stata generata una linea cellulare HCT116 knockout in cui viene rimosso HIF-2 α e, a seguito del trattamento con reuterina, non è stato osservato nessun cambiamento di sensibilità al metabolita (Fig. 8A). È stato fatto inoltre un co-trattamento di reuterina e ferro, ma non è stato osservato nessun potenziamento della sua azione (Fig. 8B), suggerendo che HIF-2 α non sia coinvolto.

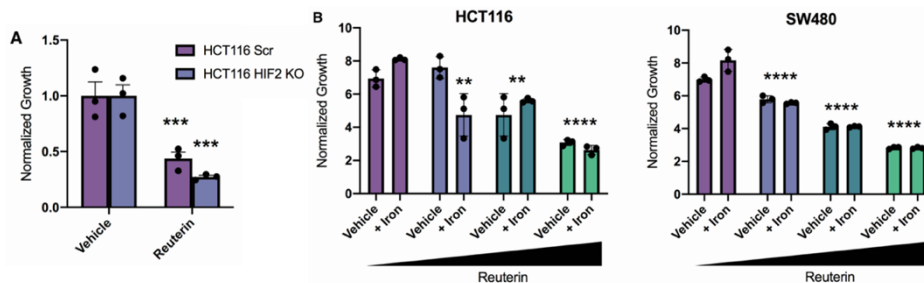


Figura 8: La reuterina non necessita del fattore HIF-2 α o di alti livelli di ferro per esercitare la sua azione citotossica. (A) Le linee cellulari HCT116 e HCT116 HIF-2 α KO sono state trattate con 100 μ M di reuterina per 72 ore. Al termine di questo tempo è stato eseguito un saggio di crescita e il dato ottenuto è mostrato come crescita normalizzata (n=3). Il p-value è stato calcolato mediante t-test (***p < 0.001) (B) Le linee cellulari HCT116 e SW480 sono state trattate con dosi crescenti di reuterina (5-100 μ M) e 100 μ M di citrato ferrico di ammonio (+Iron) per 3 giorni. È stato eseguito un saggio di crescita e il dato è mostrato come crescita cellulare normalizzata. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**p < 0.01, ****p < 0.0001).

3.4 La reuterina induce stress ossidativo nelle cellule di tumore al colon

Sono stati eseguiti degli studi di sequenziamento del RNA su linee cellulari intestinali trattate con 100 μM di reuterina per 24 ore ed è stato osservato che vi sono dei cambiamenti permanenti a livello trascrizionale. In particolare, risultano essere sovraespressi i geni essenziali nella risposta allo stress ossidativo, insieme a geni che agiscono a valle del fattore di trascrizione nucleare eritroide (NRF2) e che codificano enzimi antiossidanti e detossificanti. Questi risultati suggeriscono un coinvolgimento della reuterina nel bilancio redox cellulare, ipotesi che i ricercatori hanno confermato trattando le linee cellulari tumorali con N-acetilcisteina (NAC), un agente riducente, ed evidenziando un'inibizione dell'induzione dei geni dello stress ossidativo dipendenti da NRF2 (Fig. 9). La NAC è un derivato modificato dall'amminoacido L-cisteina che, una volta ingerito, viene convertito in cisteina e in seguito in glutazione. Quest'ultimo è un potente antiossidante che ha un ruolo cruciale nella protezione delle cellule da stress ossidativo.

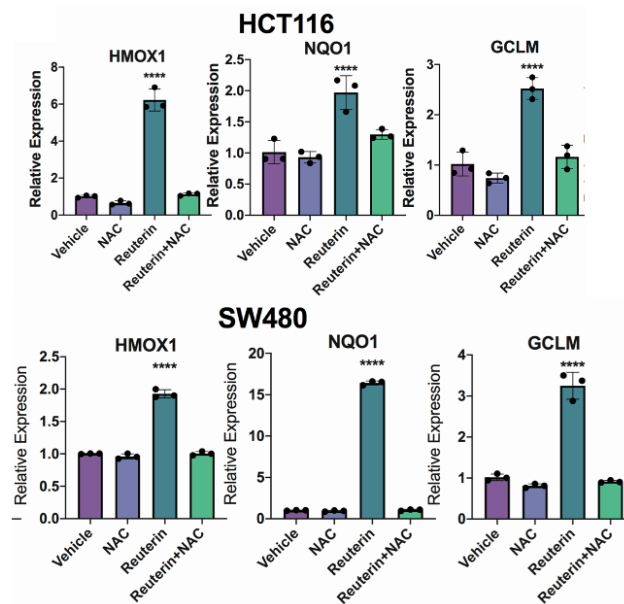


Figura 9: L'espressione relativa dei geni dipendenti da NRF2 nelle linee cellulari indicate è elevata a seguito del trattamento con reuterina; tale incremento è contrastato dal trattamento con NAC. Le cellule sono state pre-trattate con 10 mM di NAC per 24 ore e in seguito trattate con 50 μM di reuterina per 3 giorni. Con il sequenziamento del RNA è stata valutata l'espressione relativa dei geni HMOX1, NQO1 e GCLM dipendenti da NRF2. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**** $p < 0.0001$).

Il ruolo della reuterina nel controllo del bilancio redox cellulare è stato indagato ulteriormente misurando le specie reattive dell'ossigeno (ROS), in seguito al trattamento delle cellule con reuterina. La misurazione è stata condotta a livello delle linee cellulari tumorali SW480, HCT116, RKO e DLD1 e delle linee cellulari HeLa e NCM460 (reuterina-resistenti), osservando che le ROS aumentano solo nelle cellule sensibili al metabolita (Fig. 10).

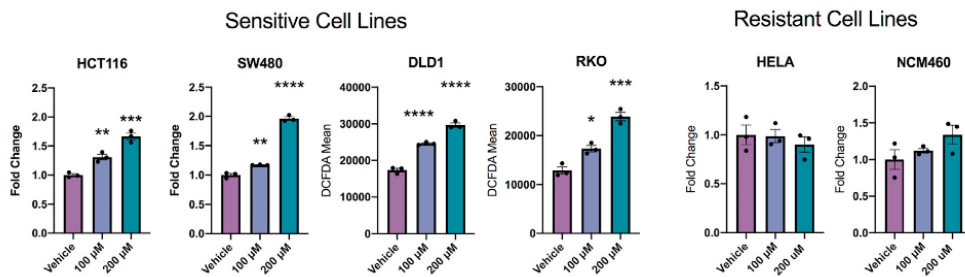


Figura 10: Le ROS aumentano nelle cellule sensibili alla reuterina. Le linee cellulari HCT116, SW480, DLD1 e RKO e le linee cellulari reuterina resistenti HeLa e NCM460 sono state trattate per 24 ore con le concentrazioni indicate di reuterina e analizzate mediante citofluorimetria a flusso (n=3). Il dato è mostrato come Fold Change e MFI rilevato. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

3.5 La reuterina agisce attraverso la sottrazione del glutathione (GSH)

È stato constatato, con esperimenti di sequenziamento del RNA, che nelle linee cellulari trattate con reuterina un pathway particolarmente arricchito è il metabolismo del glutathione, incrementato di 6 volte rispetto alla condizione normale, con conseguente incremento del marcatore redox L-glutathione ossidato (*dato non mostrato*). Considerando che un incremento di glutathione a livello cellulare protegge notevolmente dall'azione della reuterina, i ricercatori hanno ipotizzato che un meccanismo d'azione chiave del metabolita coinvolga questo tripeptide. Per confermare questa ipotesi sono stati condotti degli esperimenti con le linee cellulari SW480 e HCT116, le quali sono state trattate con reuterina e butionina sulfoximina (BSO). La BSO è un inibitore della sintesi di glutathione che si è visto agire in sinergia con la reuterina (*Fig. 11*), a conferma del fatto che un bersaglio del metabolita microbico risulta essere proprio il glutathione.

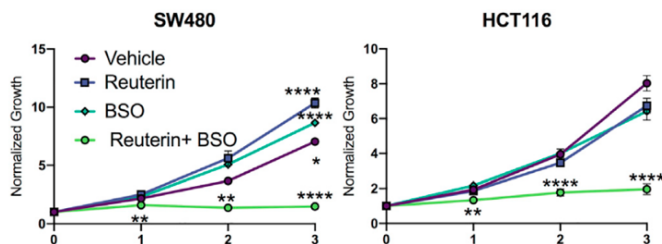


Figura 11: Reuterina e BSO agiscono in sinergia, determinando una drastica riduzione della proliferazione cellulare *in vitro*. È stato effettuato un co-trattamento delle linee cellulari SW480 e HCT116 con 10 µM di reuterina e 100 µM di BSO per 3 giorni. È stata valutata poi la vitalità cellulare e il dato è mostrato come crescita cellulare normalizzata nel tempo. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001).

Considerando che i composti elettrofili possono targettare selettivamente delle macromolecole per determinare un danno tissutale e che la reuterina è in grado di legare in maniera specifica delle proteine, i ricercatori hanno indagato se il metabolita microbico bersagli anche lipidi e acidi nucleici. Servendosi di BODIPY 581/591 sono stati misurati i lipid ROS a livello di linee cellulari trattate con reuterina e non è stato osservato un loro incremento (*Fig. 12A*); a sostegno di ciò la ferrostatina e la lipoxatrina,

due inibitori dei lipid ROS, non hanno alcun effetto nel contrastare la citotossicità della reuterina (*dato non mostrato*).

Esclusa l'azione della reuterina nei confronti dei lipidi, è stato analizzato il marcatore di danno al DNA γ -H2AX con esperimenti di immunofluorescenza ed è stato constatato che non aumenta in seguito al trattamento con reuterina (*Fig. 12B*), indicando che essa non agisce direttamente recando danno agli acidi nucleici.

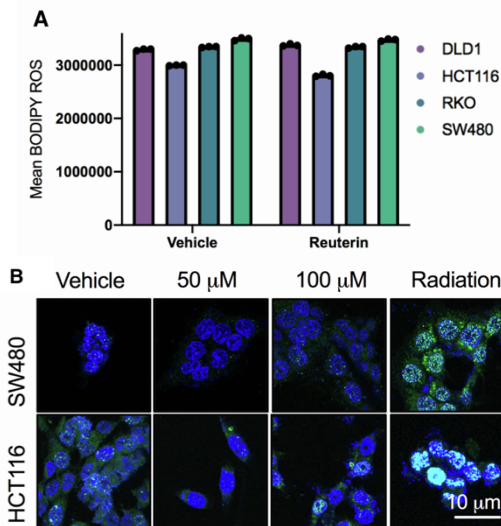


Figura 12: La reuterina non determina l'ossidazione dei lipidi e degli acidi nucleici. (A) Per l'analisi dei lipid ROS le cellule sono state trattate con 100 μ M di reuterina per 12 ore e in seguito analizzate con citofluorimetria a flusso. Il dato è mostrato come livello MFI rilevato dal citofluorimetro ($n=3$). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (B) Analisi di immunofluorescenza condotta su cellule trattate con concentrazioni 50 μ M e 100 μ M di reuterina per 24 ore. Il controllo positivo è stato trattato con 2 Gy di radiazioni per 2 minuti. A seguito della colorazione il livello del marcatore γ -H2AX è stato valutato al microscopio confocale.

Unendo i dati ottenuti attraverso queste analisi si è evinto che la reuterina induce stress ossidativo con un meccanismo dipendente da GSH, senza determinare l'ossidazione di acidi nucleici e lipidi.

3.6 La reuterina induce ossidazione proteica e inibisce selettivamente la biogenesi dei ribosomi

Per confermare che la reuterina si lega alle proteine è stato eseguito un esperimento sulle linee cellulari HCT116 e SW480 servendosi del solfuro di sodio (Na_2S), sostanza in grado di prevenire l'ossidazione proteica legandosi alle cisteine. A seguito del trattamento è stato constatato che Na_2S è in grado di prevenire il blocco della crescita mediato dalla reuterina (*Fig. 13*), suggerendo che essa agisca andando a legare le proteine a livello dei residui di cisteina.

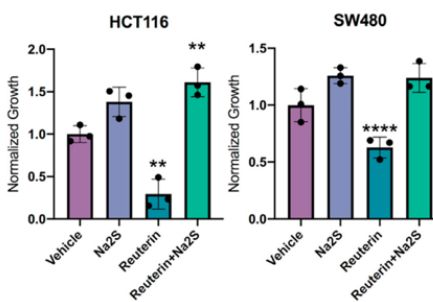


Figura 13: Il solfuro di sodio interferisce con l'inibizione della crescita cellulare mediata dalla reuterina. Le cellule sono state pre-trattate con una concentrazione 50 μ M di reuterina per 12 ore, in seguito è stato rimosso il terreno di coltura e le cellule sono state trattate con 200 μ M di Na_2S per 24 ore. Il dato è mostrato come crescita normalizzata valutata a seguito del saggio LDH ($n=3$). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

Con studi di proteomica sono stati identificati i residui di cisteina con i quali la reuterina interagisce. L'analisi è stata condotta trattando le cellule con reuterina o dimetil-fumarato (DMF) per 24 ore, a seguito delle quali sono stati raccolti i dati. Il DMF viene usato come controllo addizionale dal momento che induce anch'esso morte cellulare, ma con un meccanismo diverso rispetto a quello attuato dalla reuterina [10]. Dalle analisi di proteomica si evince che il profilo proteomico delle cisteine derivante dalle analisi con reuterina identifica come pathway arricchito il legame e la catalisi delle proteine (*dato non mostrato*). Tra le sei proteine essenziali identificate per la reuterina, tre sono coinvolte nella biogenesi dei ribosomi: fattore LTV1, Rio chinasi 2 (RioK2), dominio YEATS contenente la proteina 2 (YEATS2). Con degli esperimenti di qPCR condotti sulla linea cellulare HCT116 è stato constatato che tali proteine non subiscono una down-regolazione trascrizionale a seguito del trattamento con reuterina (*Fig. 14A*), ma risulta ridotta l'espressione del sottoinsieme di geni regolati da YEATS2, che codificano proteine ribosomali (*Fig. 14B*).

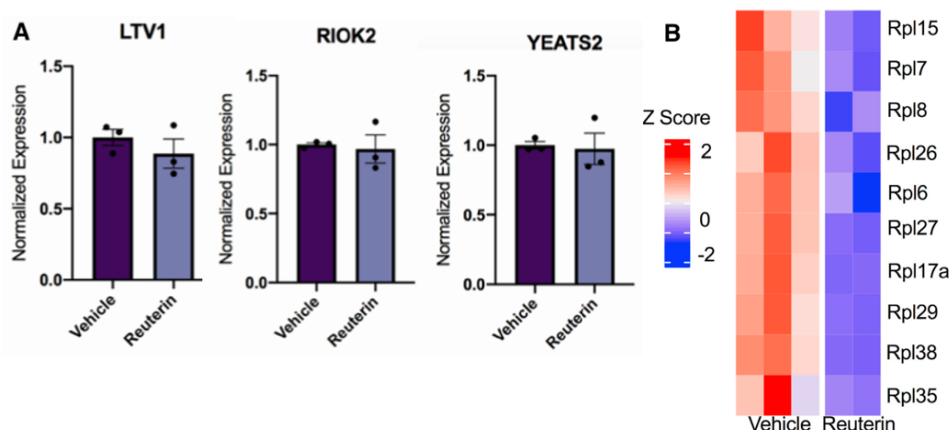


Figura 14: La reuterina non determina una down-regolazione trascrizionale delle proteine LTV1, RIOK2 e YEATS2 nella linea cellulare HCT116. (A) La linea cellulare HCT116 è stata trattata per 24 ore con 100 μ M di reuterina. A seguito del trattamento è stata eseguita un'analisi di qPCR per valutare l'espressione genica, normalizzata con il gene housekeeping β -actina. Il dato è mostrato come espressione normalizzata dei geni indicati (B) Heatmap che mostra il livello di espressione dei geni target di YEATS2 nella linea cellulare trattata con reuterina (n=5). La colorazione blu indica una sottoespressione dei geni in esame.

Questi dati hanno fatto ipotizzare che l'inibizione dell'assemblaggio dei ribosomi fosse un pathway citotossico importante della reuterina. Tale ipotesi è stata confermata osservando che l'inibitore della biogenesi ribosomiale CX-5461, in basse dosi, agisce in sinergia con la reuterina (*Fig. 15A*) e rilevando un ridotto livello di traduzione proteica attiva nelle linee cellulari trattate con il metabolita (*Fig. 15B*), servendosi del saggio della puromicina (SUnSET).

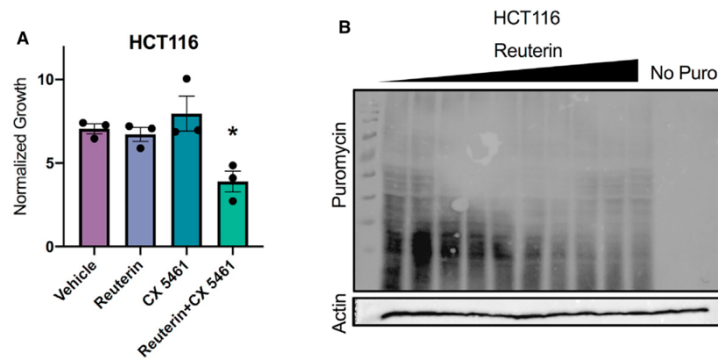


Figura 15: La reuterina determina l'inibizione della biogenesi ribosomale con conseguente riduzione dei livelli di traduzione attiva nella linea cellulare HCT116. (A) È stato eseguito un saggio di crescita a livello della linea cellulare HCT116, co-trattando le cellule con 2 μM di CX-5461 e 10 μM di reuterina per 72 ore (n=3). Il dato è mostrato come crescita cellulare normalizzata. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (* $p < 0.05$) (B) Analisi western blot nella linea cellulare HCT116 trattata con concentrazioni crescenti di reuterina (da 1 a 150 μM). L'actina è stata utilizzata come standard di caricamento.

3.7 La reuterina inibisce la crescita del cancro al colon retto *in vivo*

Al fine di dimostrare le capacità inibenti della reuterina *in vivo* è stato eseguito uno xenotrapianto sottocutaneo delle linee cellulari tumorali SW480 e HCT116 in topi nudi, sottoposti poi a trattamento giornaliero con il ceppo di *L. reuteri* wild-type (ATCC PTA6475) oppure mutante (PRB94); quest'ultimo non produce reuterina. A partire da 2 giorni dopo l'inizio del trattamento si è osservata una riduzione della crescita delle cellule HCT116 e SW480 nei topi trattati con ceppo di *L. reuteri* WT (Fig 16A).

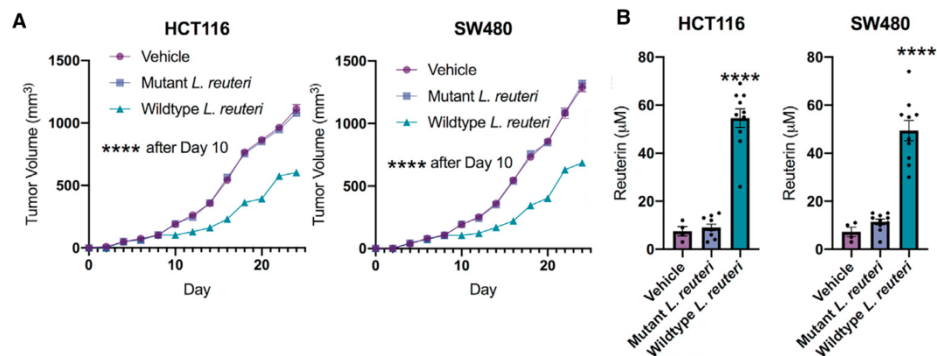


Figura 16: Il trattamento con il ceppo di *L. reuteri* WT promuove la riduzione della crescita tumorale e aumenta i livelli di reuterina *in vivo*. (A) Grafico che mostra la dimensione del tumore nel tempo, in topi nudi trattati giornalmente con *L. reuteri* WT, mutante oppure PBS (vehicle) (n=4-10). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**** $p < 0.0001$) (B) Il dato mostra la quantificazione della reuterina (μM), mediante analisi LC-MS, a livello dei tumori osservati in (A). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (**** $p < 0.0001$).

Per consolidare i risultati ottenuti ed estenderli a un modello genetico di CRC è stata allestita una coorte di topi TripleMut indotti con tamoxifen e trattati con ceppi di *L. reuteri* mutante o WT oppure PBS. I risultati ottenuti hanno confermato che solo il trattamento con *L. reuteri* wild-type

incrementa i livelli di reuterina nei tessuti del colon (Fig. 17A) e determina un significativo aumento della sopravvivenza dei modelli murini (Fig. 17B).

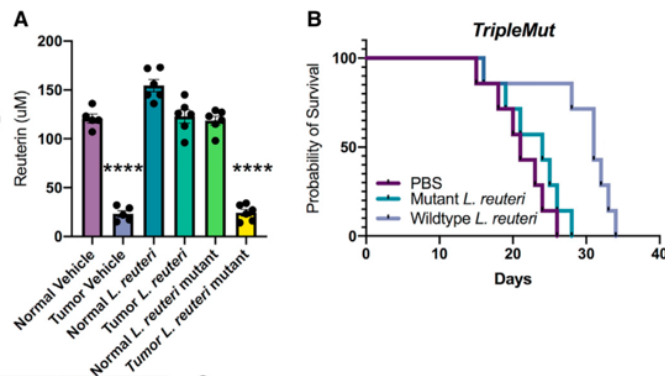


Figura 17: Il trattamento con ceppo di *L. reuteri* WT esercita un'azione protettiva nei modelli murini TripleMut indotti, aumentandone le probabilità di sopravvivenza (A) Quantificazione della reuterina, tramite analisi LC-MS, a livello di intero colon dai gruppi di trattamento indicati (n=4-6). Il dato ottenuto è mostrato come concentrazione di reuterina (µM). Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (****p < 0.0001) (B) Curva di sopravvivenza dei topi trattati giornalmente con PBS, *L. reuteri* WT oppure mutante (n=7). Il grafico mette in relazione la probabilità di sopravvivenza (%) e i giorni trascorsi dall'inizio del trattamento. Il p-value è stato calcolato mediante il test one-way ANOVA (****p < 0.0001).

Dalle analisi condotte al microscopio ottico su campioni mucosali prelevati dai modelli murini TripleMut della coorte (Fig. 18), i ricercatori hanno confermato che anche *in vivo* la reuterina determina un aumento di ROS, verificato indagando il marcatore 4HNE, e una riduzione dei livelli di proliferazione cellulare, quest'ultimi indagati con la colorazione della proteina nucleare Ki67.

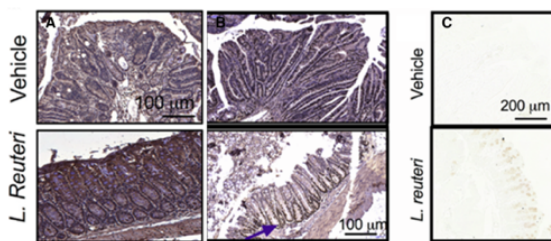
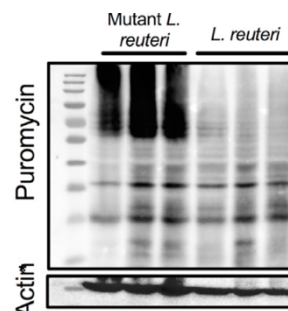


Figura 18: Confronto di immagini istologiche di campioni mucosali provenienti dai modelli murini TripleMut. I campioni mucosali sono stati sottoposti ad analisi immunohistochemica con anticorpi anti-4HNE, anti-Ki67 e anti-cCaspase3 per evidenziare la presenza rispettivamente di (A) marcatore di ROS 4HNE (B) proteina nucleare Ki67 (C) cCaspasi 3 (n=3-6).

Per confermare il risultato ottenuto con esperimenti *in vitro*, è stato quantificato il livello di traduzione attiva anche *in vivo* a livello dei modelli TripleMut trattati con *L. reuteri* WT e mutante. Il risultato del saggio SUnSET ha confermato il dato ottenuto precedentemente in quanto la traduzione attiva è ridotta a livello delle cellule del colon del solo triplo mutante trattato con *L. reuteri* wild-type (Fig. 19).

Figura 19: Il trattamento con *L. reuteri* WT determina una riduzione del livello di traduzione attiva nelle cellule del colon del triplo mutante. Analisi western blot, con anticorpo anti-puromicina, effettuata dalle proteine estratte dalle cellule del colon isolato 10 giorni dopo l'induzione dei modelli murini trattati giornalmente con *L. reuteri* mutante o WT (n=3-6).



4. DISCUSSIONE

Basandosi sugli studi condotti fino ad ora è risaputo che la disbiosi ha un ruolo cruciale nella progressione del cancro al colon retto, ma non è ancora stato chiarito se sia tra le cause scatenanti il CRC oppure se abbia un ruolo consequenziale nello sviluppo del tumore.

L'articolo in esame ha portato alla luce dei risultati interessanti in quanto ha dimostrato che i livelli del microrganismo *Lactobacillus reuteri* in persone e modelli murini affetti da CRC sono minori rispetto ai relativi controlli sani e in particolare anche i suoi livelli all'interno del tessuto tumorale sono inferiori rispetto ai tessuti sani circostanti. Da queste osservazioni si è evinto che il microambiente tumorale abbia delle conseguenze a livello del microbiota, ma non è ancora chiaro come possa effettivamente determinare la disbiosi.

Con gli esperimenti condotti i ricercatori hanno rivelato che c'è una variazione nei metaboliti prodotti da un microbiota sano e da uno alterato, con particolare riferimento alla reuterina. La reuterina è un composto antimicrobico con potenti effetti citotossici specifici esercitati sulle cellule del cancro, incrementando i livelli di ROS e determinando un'alterazione funzionale della biogenesi ribosomale. Dalle analisi condotte rimangono due punti ancora da chiarire che riguardano il motivo alla base della resistenza delle cellule sane all'azione della reuterina e la modalità con cui le cellule tumorali riescono a by-passare la citotossicità della reuterina nelle fasi precoci della patologia e stabilire la crescita.

Constatate le funzioni protettive del microrganismo *Lactobacillus reuteri* e del suo metabolita reuterina con esperimenti *in vitro* e *in vivo*, lo studio analizzato ha sottolineato l'importanza che un approccio probiotico può avere nei confronti della prevenzione e del trattamento del tumore al colon retto.

5. APPROFONDIMENTO

5.1 Introduzione agli organoidi

Gli organoidi sono dei modelli molto utilizzati nella ricerca, dal momento che ricreano la struttura e la funzionalità di organi e tessuti *in vitro*, mostrando le stesse caratteristiche chiave osservabili *in vivo* [11]. Durante l'esperienza di tirocinio che ho svolto presso il laboratorio della Professoressa Codolo mi è stato possibile osservare in particolare gli organoidi intestinali, con i quali si riproducono le strutture presenti nel lume intestinale e sull'epitelio circostante. Gli enteroidi sono costituiti da un monostrato di cellule epiteliali che racchiude una struttura cava che rappresenta il lume dell'organoide. Dall'organizzazione delle cellule nello spazio si possono osservare le cripte intestinali che protrudono all'esterno e i villi che si formano nel lume. Questi organoidi sono stati sviluppati a partire da campioni tumorali di colon murino wild-type. In breve, la procedura sperimentale per la loro creazione prevede di prelevare il colon dal modello murino e isolare il tumore, il quale viene disgregato al fine di ottenere cellule singole. Queste cellule poi sono state messe in coltura e, grazie alla loro capacità proliferativa, hanno potuto dare origine alla struttura finale dell'organoide. Oltre agli organoidi di tipo tumorale, è possibile ricreare *in vitro* anche tessuti sani; in questo caso il materiale di partenza è rappresentato dalle cellule staminali pluripotenti che vengono isolate a partire dalle cripte intestinali. Una volta ottenuto e processato il campione desiderato si prosegue con la semina delle cellule in una matrice artificiale costituita dal Matrigel®, dal momento che le sole cellule epiteliali non sono in grado di generare gli elementi di matrice. Viene poi aggiunto il terreno di coltura che varia da organoide a organoide e che contiene al suo interno diversi fattori di crescita e molecole specifiche che sono fondamentali per il corretto sviluppo della struttura. Le componenti del terreno variano a seconda del fatto che si voglia ricreare un tessuto sano oppure tumorale, a seconda della specie dalla quale è stato prelevato il materiale di partenza e anche dall'organo che si vuole andare a ricreare *in vitro*. Le componenti del terreno di coltura hanno anche lo scopo di mantenere la funzione delle cellule staminali e guidare il loro differenziamento [11]. Nel caso degli organoidi osservati in laboratorio il terreno presentava la seguente composizione: *terreno base*, *GF-*, *NCM* e *RCM* (rispettivamente *noggin conditioned medium* e *r-spondin conditioned medium* fondamentali per il mantenimento delle cellule staminali), *mEGF* (*epidermal growth factor* derivante da topo che permette il differenziamento di tipi cellulari), *Y-27632* e *P/S* (combinazione degli antibiotici benzilpenicillina e diidrostreptomicina, efficaci contro Gram positivi e negativi, con effetto battericida). Il terreno di coltura necessita di essere cambiato 2/3 volte a

settimana, dal momento che le varie componenti presenti al suo interno con il tempo vengono metabolizzate dagli organoidi. Oltre al cambio del terreno di coltura è necessario anche andare ad ampliare la popolazione di organoidi quando questi si sono sviluppati e accresciuti. Questo passaggio consiste nell'aumentare il numero di strutture e separarle in più pozzetti, al fine di evitare che la condizione di sovraffollamento vada a minare il benessere degli organoidi. Questa fase di espansione viene definita "passaggio degli organoidi" e consiste nella degradazione della matrice tramite l'utilizzo di una soluzione di Cell Recovery e nella disgregazione meccanica degli organoidi, eseguita servendosi di una micropipetta e un doppio puntale. Una volta che gli organoidi sono stati disgregati in cellule singole si procede con la loro diluizione e semina in un numero maggiore di pozzetti rispetto a quello di partenza. Tramite il passaggio degli organoidi è possibile aumentare il loro numero e mantenerli *in vitro*.

5.2 Applicazioni degli organoidi

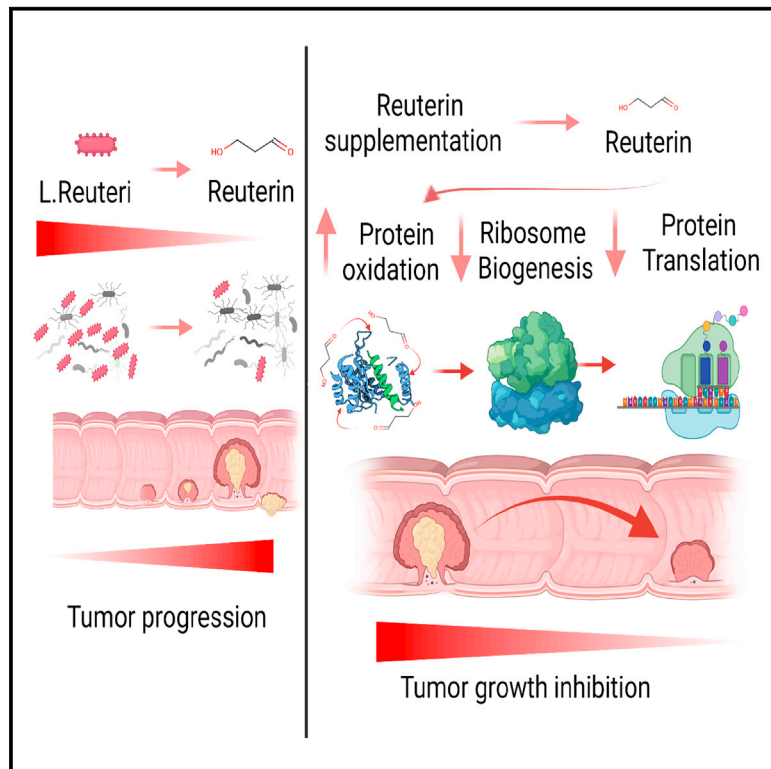
Gli organoidi rappresentano un sistema innovativo di coltura 3D in quanto permettono di ricreare la struttura di uno specifico organo e un ambiente che più si avvicina alla situazione *in vivo* rispetto alle colture monocellulari 2D. Ad oggi presentano molteplici applicazioni e sono il miglior modello *ex vivo* per gli studi oncologici e non solo. Tra i risvolti applicativi si riscontra l'utilizzo di organoidi per testare possibili terapie farmacologiche nei confronti di diverse patologie e il loro utilizzo come modelli per la ricerca nel campo delle malattie intestinali, focalizzando lo studio sul ruolo della disfunzione epiteliale intestinale nella patogenesi [11]. Gli organoidi possono essere utilizzati anche nello studio delle interazioni cellulari, tramite la creazione di un sistema di co-coltura tra gli organoidi e i tipi cellulari di interesse. Questa applicazione è molto importante nell'ambito dello studio dei tumori in quanto consente di ricreare *in vitro* il microambiente tumorale, dal momento che il solo organoide è costituito da un monostrato di cellule epiteliali e aggiungendo altri tipi cellulari, quali cellule del sistema immunitario, è possibile ricreare le dinamiche che avvengono *in vivo*. Nel laboratorio che ho frequentato durante il tirocinio gli organoidi sono utilizzati per studiare l'interazione cellulare allestendo una co-coltura tra organoidi intestinali, macrofagi e batteri con lo scopo di comprendere i meccanismi che coinvolgono le cellule immunitarie e il microbiota nel processo di patogenesi del CRC. Nell'articolo analizzato gli organoidi potevano essere un approccio alternativo alle semplici colture cellulari per indagare le interazioni che avvengono tra tessuto epiteliale tumorale e microbiota, approfondendo così il ruolo che questi ricoprono nel processo di patogenesi.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Nachef, M., Ali, A.K., Almutairi, S.M., and Lee, S.-H. (2021). **Targeting *SLC1A5* and *SLC3A2/SLC7A5* as a potential strategy to strengthen anti-tumor immunity in the tumor microenvironment.** Front Immunol. 12, 624324.
2. Thanikachalam, K., and Khan, G. (2019). **Colorectal cancer and nutrition.** Nutrients 11, 164.
3. Sedzikowska A, Szablewski L. **Human Gut Microbiota in Health and Selected Cancers.** Int J Mol Sci. 2021 Dec 14;22(24):13440
4. Leystra, A.A., and Clapper, M.L. (2019). **Gut microbiota influences experimental outcomes in mouse models of colorectal cancer.** Genes-Basel 10, 900.
5. Lang, M., Baumgartner, M., Rożalska, A., Frick, A., Riva, A., Jarek, M., Berry, D., and Gasche, C. (2020). **Crypt residing bacteria and proximal colonic carcinogenesis in a mouse model of Lynch syndrome.** Int. J. Cancer 147, 2316–2326.
6. Brennan, C.A., Garrett, W.S. **Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium.** Nat Rev Microbiol 17, 156–166 (2019).
7. Asare, P.T., Zurfluh, K., Greppi, A., Lynch, D., Schwab, C., Stephan, R., and Lacroix, C. (2020). **Reuterin demonstrates potent antimicrobial activity against a broad panel of human and poultry meat Campylobacter spp. isolates.** Microorg 8, 78.
8. Das, N.K., Schwartz, A.J., Barthel, G., Inohara, N., Liu, Q., Sankar, A., Hill, D.R., Ma, X., Lamberg, O., Schnizlein, M.K., et al. (2020). **Microbial metabolite signaling is required for systemic iron homeostasis.** Cell Metab. 31, 115–130.e6.
9. Xue, X., Ramakrishnan, S.K., Weisz, K., Triner, D., Xie, L., Attil, D., Pant, A., Gyorffy, B., Zhan, M., Carter-Su, C., et al. (2016). **Iron uptake via DMT1 integrates cell cycle with JAK-STAT3 signaling to promote colorectal tumorigenesis.** Cell Metab 24, 447–461.
10. Singhal, R., Mitta, S.R., Das, N.K., Kerk, S.A., Sajjakulnukit, P., Solanki, S., Andren, A., Kumar, R., Olive, K.P., Banerjee, R., et al. (2021). **HIF-2 α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron.** J. Clin. Invest. 131
11. Liu W, Wang Q, Bai Y, Xiao H, Li Z, Wang Y, Wang Q, Yang J, Sun H. **Potential Application of Intestinal Organoids in Intestinal Diseases.** Stem Cell Rev Rep. 2024 Jan;20(1):124-137. doi: 10.1007/s12015-023-10651-w. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37938407.

Reuterin in the healthy gut microbiome suppresses colorectal cancer growth through altering redox balance

Graphical abstract



Authors

Hannah N. Bell, Ryan J. Rebernick, Joshua Goyert, ..., Steven P. Gygi, Joseph D. Mancias, Yatrik M. Shah

Correspondence

shahy@umich.edu

In brief

Colon cancer has a significantly altered microbiome that promotes tumor growth. Bell et al. identified a decrease in anti-tumor bacteria *Lactobacillus reuteri* in colon cancer. *L. reuteri* inhibits colorectal cancer by inducing oxidative stress and inhibiting protein translation. Recolonization with *L. reuteri* increases survival in multiple colon tumor models.

Highlights

- Microbial metabolites from the healthy colon inhibit colon tumorigenesis
- *Lactobacillus reuteri* and reuterin levels are reduced in mouse and human colon cancer
- Reuterin induces protein oxidation and inhibits ribosomal biogenesis
- *L. reuteri* and reuterin decrease tumor growth and prolong survival in mice



Article

Reuterin in the healthy gut microbiome suppresses colorectal cancer growth through altering redox balance

Hannah N. Bell,¹ Ryan J. Rebernick,² Joshua Goyert,¹ Rashi Singhal,¹ Miljan Kuljanin,^{3,4} Samuel A. Kerk,¹ Wesley Huang,¹ Nupur K. Das,¹ Anthony Andren,¹ Sumeet Solanki,¹ Shannon L. Miller,^{5,6} Peter K. Todd,^{5,7} Eric R. Fearon,^{8,9,10,11} Costas A. Lyssiotis,^{1,10,11} Steven P. Gygi,³ Joseph D. Mancias,⁴ and Yatrik M. Shah^{1,10,11,12,*}

¹Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

²Department of Computational Medicine and Bioinformatics, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

³Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁴Division of Radiation and Genome Stability, Department of Radiation Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

⁵Department of Neurology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁶Cellular and Molecular Biology Graduate Program, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁷VA Ann Arbor HealthCare System, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁸Department of Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁹Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

¹⁰University of Michigan Rogel Cancer Center, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

¹¹Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

¹²Lead contact

*Correspondence: shahy@umich.edu

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.001>

SUMMARY

Microbial dysbiosis is a colorectal cancer (CRC) hallmark and contributes to inflammation, tumor growth, and therapy response. Gut microbes signal via metabolites, but how the metabolites impact CRC is largely unknown. We interrogated fecal metabolites associated with mouse models of colon tumorigenesis with varying mutational load. We find that microbial metabolites from healthy mice or humans are growth-repressive, and this response is attenuated in mice and patients with CRC. Microbial profiling reveals that *Lactobacillus reuteri* and its metabolite, reuterin, are downregulated in mouse and human CRC. Reuterin alters redox balance, and reduces proliferation and survival in colon cancer cells. Reuterin induces selective protein oxidation and inhibits ribosomal biogenesis and protein translation. Exogenous *Lactobacillus reuteri* restricts colon tumor growth, increases tumor reactive oxygen species, and decreases protein translation *in vivo*. Our findings indicate that a healthy microbiome and specifically, *Lactobacillus reuteri*, is protective against CRC through microbial metabolite exchange.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the fourth most significant cause of cancer mortality (Arnold et al., 2017). In addition to inherited mutations in a subset of patients, a combination of lifestyle, diet, inflammation, and microbiome alteration influences the development of CRC (Thanikachalam and Khan, 2019). Outcomes for CRC patients are often favorable if regional or distant metastases are not present. However, effective treatments for patients with metastatic disease are lacking, and most CRCs are not responsive to immunotherapy (Le et al., 2018; Overman et al., 2018).

Alterations of the intestinal microbiome are common in CRC patients. Germ-free or broad-spectrum antibiotic mouse models have been used to understand the role of commensal bacterial

communities in CRC (Leystra and Clapper, 2019). The data obtained from these studies are not consistent, likely due to differences in the models employed and variations in the intestinal microbiome among different colonies. However, the vast majority of these studies indicate that commensal bacteria promote tumorigenesis (Leystra and Clapper, 2019). Germ-free mice have enhanced colon tumorigenesis in a colitis-associated colon cancer model (Zhan et al., 2013). Cumulatively, the data suggest that microbial species can either promote or inhibit colon tumor growth depending on the context. The complex role of the intestinal microbiome in colon tumorigenesis is also highlighted by work demonstrating that microbial-epithelial interactions maintain gut barrier function, sustain metabolism, and regulate the systemic and mucosal immune response (Kelly et al., 2015; Song et al., 2020). Disturbances in the resident



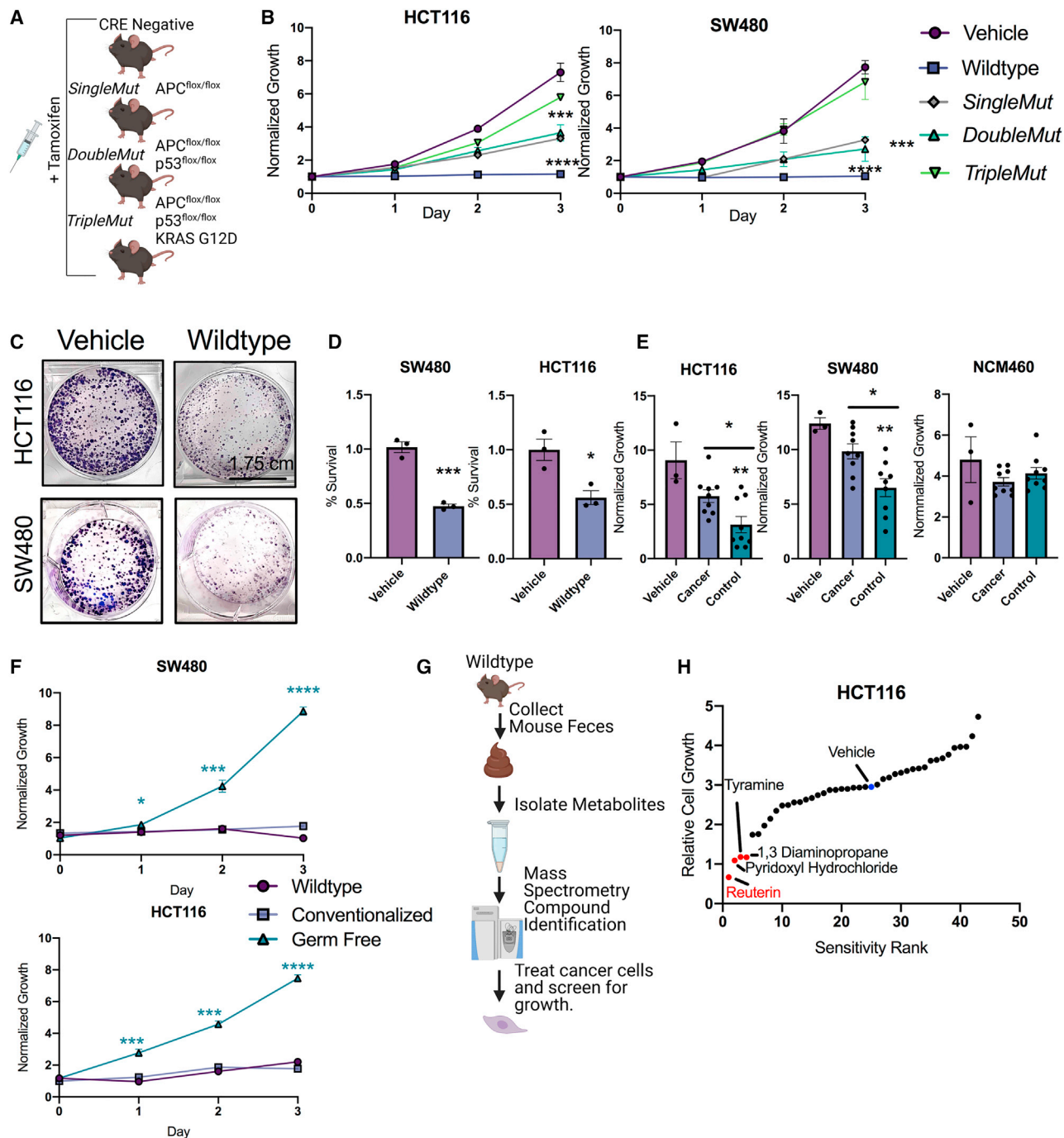


Figure 1. Fecal metabolites from wild-type mice suppress CRC cell growth *in vitro*

(A) Mouse models and treatment strategy employed.

(B) Dried, organic, metabolite pellets were resuspended in DMSO and treated at 100× concentration and growth was assessed by live cell imaging (n = 9). Error bars are standard error of the mean ± the mean.

(C) Colony-forming assay of cells treated with 100× wild-type fecal metabolites for 14 days (n = 3).

(D) LDH assay of cells treated with 100× fecal metabolites at 24 h (n = 3). Mean ± the standard error of the mean.

(E) Growth assays from organic fecal metabolites from age-matched controls and cancer patients. Each human sample was assayed in triplicate. Mean ± the standard error of the mean.

(F) Growth assays from fecal metabolites from wild-type, germ-free mice, and recolonized germ-free (n = 3 per group).

(G) Schematic representation of the screen to identify inhibitory compounds.

(legend continued on next page)

microbial communities during the progression of CRC may lead to pathological dysbiosis that then promotes tumor growth and survival. Recent metagenomic studies have identified stage-specific shifts within the microbiota of patients with polyploid adenomas and intramucosal carcinomas (Yachida et al., 2019). The tumor microbiota is enriched for pathogenic bacteria *Fusobacterium*, *Bacteroides fragilis*, and *Prevotella* (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020; Tilg et al., 2018). Recent studies have advanced insights into the mechanisms by which pathogenic bacteria promote tumor growth and survival, such as by inducing inflammation, generating biofilms, and secreting genotoxins (Dejea et al., 2018; Pleguezuelos-Manzano et al., 2020; Tomkovich et al., 2019; Nougayrede et al., 2021). However, few studies have reported on anti-tumor properties of specific host microbes.

Commensal microbes use host and dietary factors to generate metabolites via cell autonomous biosynthetic pathways. The best-studied commensal microbial factors are short-chain fatty acids (SCFA), such as butyrate, which decrease growth of normal intestinal stem cells and a battery of cancer-derived cell lines (Kaiko et al., 2016). Heterocellular metabolic interactions between microbiota, tumor epithelium, and stromal cells is an emerging concept, and it is not clear how the microbiome alters tumor growth via metabolite exchange. In this work, we found that fecal metabolites from healthy humans and mice potently inhibited colon cancer growth. Mouse colon cancer mouse models with a higher mutational load were linked to dysbiosis and microbial metabolites that were growth permissive in CRC. We identified a commensal microbial species *Lactobacillus reuteri* and its major metabolite, reuterin, that potently reduced colon cancer progression. We found that the microbiome of wild-type mice altered the redox state of colon cancer cells and inhibited ribosomal biogenesis. Together, our findings identify that a healthy microbiome and specifically, *L. reuteri*, is a potential probiotic approach to treat CRC.

RESULTS

Fecal metabolites from healthy mice inhibit the growth of CRC cells

To address the potential contributions of microbial metabolites in the development of CRC, we used genetically engineered mouse models of colon tumorigenesis. We used the tamoxifen-regulated CDX2p-CreERT2 transgene to target both copies of the murine *Apc* allele (*SingleMut*), which leads to the development of noninvasive adenomas in the distal colon and rectum (Hinoi et al., 2007). We generated the *DoubleMut*, where both *Apc* and *Trp53* alleles are concurrently inactivated in colon epithelium, and the *TripleMut* combining the *APC/p53* knockout with a *Kras G12D* knock-in allele (Figure 1A). Ten days following a single treatment of tamoxifen to initiate tumorigenesis, fecal microbial metabolites were isolated and used for the treatment in HCT116, SW480, DLD1, and RKO CRC cell lines (Figures 1B and S1A). Fecal metabolites from wild-type mice were robustly inhibitory to CRC cell line proliferation. Fecal metabolites iso-

lated from *SingleMut* and *DoubleMut* reduced proliferation to a lesser extent, whereas metabolites from the *TripleMut* were not growth suppressive. Fecal metabolites from wild-type mice induced cell death and decreased colony formation in all four cell lines (Figures 1C, 1D, S1B, and S1C). Similarly, normal human fecal metabolites, but not metabolites isolated from CRC patients with active disease repressed the growth of CRC cell lines (Figure 1E). Microbial metabolites did not repress a noncancerous human intestinal cell line NCM460 (Figure 1E). This fecal metabolite-based repression of the CRC cell lines was microbial in origin (Figure 1F).

Untargeted metabolomics identified the most abundant microbial metabolites in wild-type mice. A small molecule library was generated from microbially derived metabolites exclusively (Figure 1G) (Wikoff et al., 2009). The 50 most abundant metabolites were screened based on cell proliferation. We focused on the most inhibitory compounds. A secondary growth screen in a second cell line was performed. This led to the identification of 1,3-diaminopropane and reuterin, both of which are present in high abundance in normal colon (Das et al., 2020) (Figure 1H). Tyramine and pyridoxyl hydrochloride inhibited CRC growth to a lesser extent (Figure 1H). The initial screen used a single dose of 1 mM, the second screen a dose of 500 μ M. Reuterin was confirmed as the most inhibitory compound (Figure S1D).

Reuterin is actively reduced in human and mouse colon cancer

We performed 16S rRNA sequencing on the feces of wild-type littermates (CRE negative), *DoubleMut* and *TripleMut* mice, to determine how microbial communities are altered as tumors progress. The *DoubleMut* and *TripleMut* have comparable proliferative and dysplastic indexes at early time points. There were no changes in microbiome between the uninduced mice, or cage-specific stratification (Figures S2A and S2B). Principal coordinate analysis (PCoA) confirmed that CRE-negative mice, *DoubleMut* and *TripleMut* all had significantly different microbiomes by Analysis of MOlecular Variance (AMOVA), and clustered separately on both PCoA axes (Figure 2A). Interestingly, the PCoA plot identified *Lactobacillus* as the top driver leading to differences between the groups (Figure 2B and Table S1). This was followed by Lachnospiraceae and Muribaculaceae, both of which are associated with altered risk of inflammation and colon cancer (Flemer et al., 2018; Lang et al., 2020)

Reuterin, or 3-hydroxypropionaldehyde, was identified in our microbial metabolite growth screen. Reuterin has predominantly been studied as an antimicrobial (Asare et al., 2020). Reuterin is primarily produced by *L. reuteri*, a natural colonizer of the human gut, and is an intermediate in the metabolism of glycerol to 1,3-propanediol (Martín-Cabrejas et al., 2017; Zhang et al., 2020). *L. reuteri* was significantly decreased in the 16S-seq samples in the *DoubleMut* and *TripleMut* fecal samples (Figure 2C). *Lactobacillus* genus trended downward in the induced *DoubleMut* and *TripleMut* mouse models (Figure S2C). Other *Lactobacillus* species, such as *Lactobacillus acidophilus*, were also downregulated (Figures S2D and S2E). *L. reuteri* was found to

(H) Sensitivity rank graph of cell growth after 72 h of treatment at 1 mM for each indicated compound (n = 3). Statistical significance was measured by a one-way ANOVA (B, E, and F) or t test (D) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean \pm the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicate at least three times.

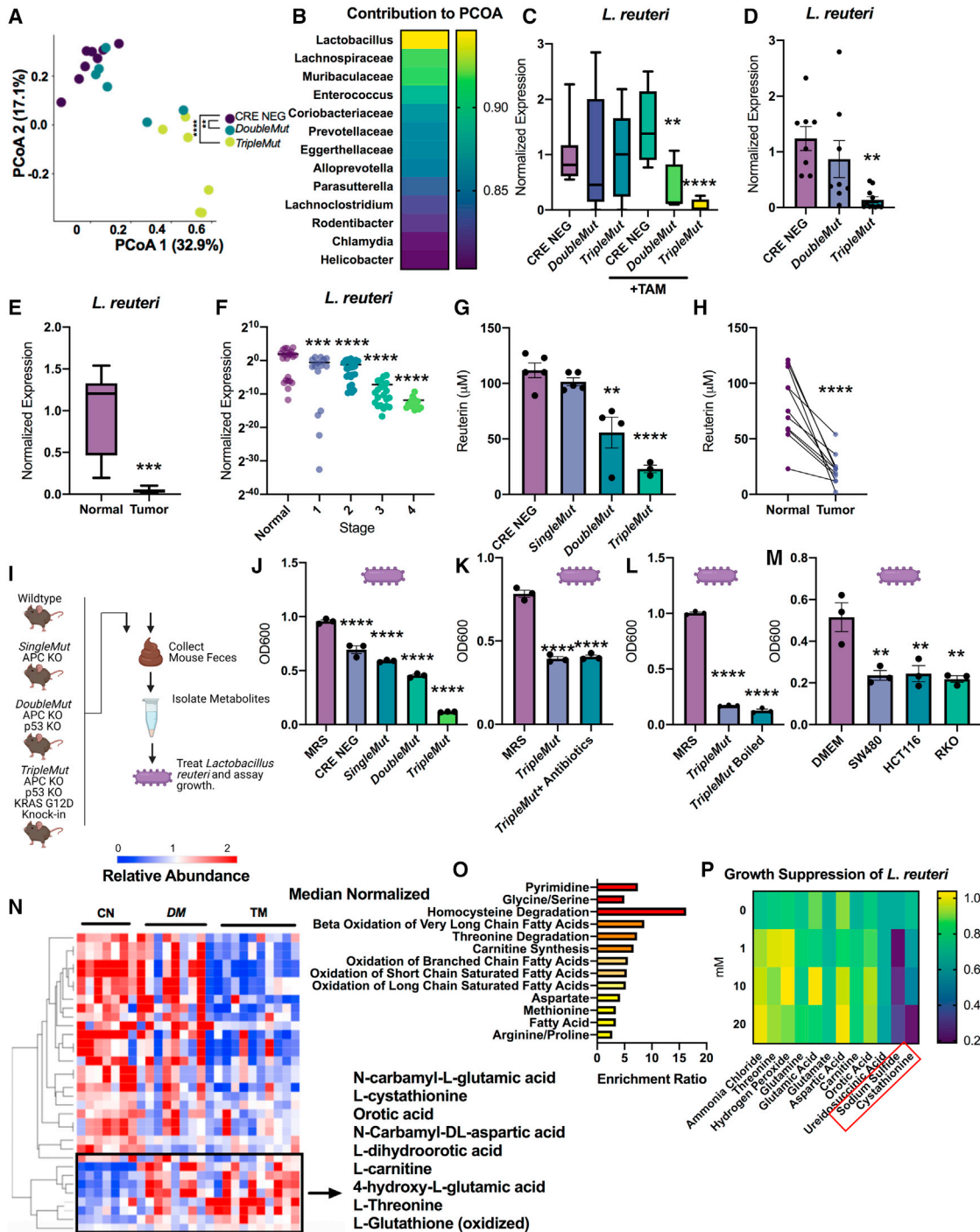


Figure 2. *L. reuteri* abundance and host metabolites are altered in mouse colon tumor models and human CRC

(A) PCoA plots of 16S rRNA sequencing of fecal DNA from the induced (50 mg/kg tamoxifen) mice (n = 6–8). Significance is compared with the Cre-negative control mice.

(B) Length of the vector of the PCoA plot by the indicated species (n = 6–8).

(C) qPCR of *L. reuteri* in fecal DNA of indicated mouse model induced with 50 mg/kg tamoxifen (n = 6–8).

(D) qPCR of indicated mouse strain from colon mucosal scrapes 14 days after induction (same animals as used for tissue 16S sequencing) (n = 6–8).

(E) qPCR of human colon tumor and normal samples. (n = 7–8).

(F) qPCR for *L. reuteri* of human colon tumor tissue isolated from patients with different stages of cancer (n = 96). One-way ANOVA compared with normal human colon tissue.

(G) Reuterin quantification from colon samples by mass spectrometry (n = 3–5).

(legend continued on next page)

be robustly decreased in an additional independent cohort of *TripleMut* mice (Figure S2F). We next performed 16S rRNA sequencing on tumor mucosa samples. The genus *Lactobacillus* was not the main contributor to the PCoA vectors in tumors (Figures S2G and S2H). However, *L. reuteri* is strongly reduced in the *TripleMut* tumor mucosa (Figure 2D). No other *Lactobacillus* species assessed were significantly reduced in the tumor microbiome (Figure S2I). This suggests that although *Lactobacillus* as a genus may be globally downregulated in the feces, *L. reuteri* is specifically downregulated in the tumor mucosa.

We first mined publicly available datasets to assess alterations in *L. reuteri* between the CRC and normal human microbiome. In a metanalysis of eight colon intestinal microbiome studies, *Lactobacillus* was significantly reduced in both early and late-stage CRC (Figure S2J) (Wirbel et al., 2019). Sequenced luminal contents and tumor sections demonstrated a decrease in *Lactobacillus* in carcinomas (Figure S2K). Last, 16S rRNA sequencing on early and invasive colorectal cancers observed lower *Lactobacillus* in invasive compared with early cancer (Figure S2L). We next delved into a small cohort of CRC tissue samples with adjacent normal tissue to quantify *L. reuteri* (Figure 2E). We saw that *L. reuteri* levels were significantly reduced in the tumor samples. We next used a larger cohort of patient tissue samples from age-matched healthy controls, and different stages of CRC. *L. reuteri* was significantly reduced in all stages of CRC compared with healthy controls in this independent cohort (Figure 2F).

We also used an inflammation-based carcinogenesis model, AOM-DSS to induce tumors. *L. reuteri* was reduced in tumors compared with the normal tissue, demonstrating that the reduction of *L. reuteri* in colon tumors was conserved (Figure S2M). Consistent with the decrease of *L. reuteri* in tumors, there was a graded decrease of reuterin in the sporadic and AOM-DSS colon tumor mouse models (Figures 2G and S2N). Reuterin levels were also decreased in human tumor tissue compared with adjacent normal tissue (Figure 2H). This suggests that the cancerous epithelium locally effects *Lactobacillus reuteri* and thus reuterin levels. Diaminopropane was not altered, demonstrating that the decrease in reuterin is specific (Figures S2O–S2Q).

Interestingly, the *TripleMut* mouse fecal metabolites robustly inhibited *L. reuteri* growth *in vitro* (Figures 2I and 2J). In contrast, the CRE NEG extracts prohibited the growth of CRC cells, but have significantly less effect on the growth of *L. reuteri*. This effect is unlikely to be only a result of tumor burden, as the mice have the same percentage of the colon transformed. We verified that the *TripleMut* fecal extracts are not inhibitory to either *E. coli*

or a complex compendium of fecal bacteria (Figures S2R and S2S). We sought to identify whether the potential source of the inhibitory compound was microbial or epithelial. We treated *TripleMut* mice with a cocktail of broad-spectrum antibiotics for 1 week prior to tamoxifen induction. We discontinued the antibiotics at induction and generated fecal extracts at an endpoint of day 10. We observed that the growth inhibition on *L. reuteri* was sustained (Figure 2K). Moreover, our data suggest that the growth inhibition on *L. reuteri* from *TripleMut* mice is metabolite-derived, as the compound remains growth inhibitory following heating (Figure 2L). We investigated whether conditioned media from CRC cell lines inhibits *L. reuteri* (Figure 2M). Conditioned media from SW480, HCT116, and RKO inhibited *L. reuteri* growth. Boiling the media did not alter the growth-repressive functions, suggesting that the inhibitory factor is a metabolite (Figure S2T). We developed a short hairpin RNA knockdown of KRAS in the mouse CRC cell line CT26 (Figure S2U). Decreasing KRAS did not reverse the repression of *L. reuteri* growth (Figure S2V).

Targeted metabolomics were performed on the *DoubleMut*, *TripleMut*, and CRE-negative mouse models; 2D unsupervised clustering showed clear differences between the mouse models (Figure 2N). We focused on metabolites that were upregulated in the *TripleMut*. We analyzed the enriched pathways for increased metabolites, and found that redox balance and homocysteine degradation were the most enriched (Figure 2O). We treated *L. reuteri in vitro* with increasing doses of these metabolites, and found that *L. reuteri* growth was repressed by the homocysteine degradative metabolites hydrogen sulfide and cystathionine (Figure 2P). Supplementation with the antioxidant glutathione ethyl ester did not alter *L. reuteri* growth, indicating that *L. reuteri* is not inhibited specifically by oxidative stress (Figure S2T). Together, the data suggest a bidirectional metabolite exchange between bacterial and host metabolites.

Reuterin is cytotoxic and growth inhibitory to colon cancer cells

Reuterin inhibited the growth of HCT116, SW480, RKO, and DLD1 CRC at a dose of 25 μ M (Figures 3A and S3A). The CRC, PDAC, lymphoma, ovarian, and melanoma cell lines were significantly growth inhibited by reuterin (Figures 3B and S3B). Breast and cervical cancer cell lines were relatively resistant to reuterin. Complementary data showing growth inhibition were also obtained using colony-forming assays (Figures 3C and S3C). We confirmed reuterin-induced cell death with a lactate dehydrogenase (LDH) assay (Figures 3D and S3D). Cytotoxicity of reuterin *in vitro* was

(H) Reuterin quantification from human whole colon normal and tumor paired sections (n = 9).

(I) Schematic representation of studies of metabolite extracts and treatment of *L. reuteri*.

(J) Treatment of *L. reuteri* with fecal extracts isolated from indicated mice for 24 h at a 100 \times concentration. Control is grown in MRS broth (n = 3).

(K) Treatment of *L. reuteri* with fecal extracts isolated from *TripleMut* mice treated with a broad-spectrum antibiotic (n = 3).

(L) Treatment of *L. reuteri* with fecal extracts isolated from *TripleMut* mice which were boiled for 10 min (n = 3).

(M) Cells were grown in DMEM and 10% FBS for 48 h, then media was supplemented with 20% MRS broth before incubation with *L. reuteri* (n = 3).

(N) Unsupervised clustering of metabolite extracts from colon scrapes from induced indicated mouse models (n = 7–8). Metabolites significantly different in the *TripleMut* compared with the CRE negative are shown, and metabolites that are upregulated in the *TripleMut* are boxed.

(O) Metaboanalyst pathway analysis of significantly upregulated metabolites listed by p value.

(P) *L. reuteri* incubated with indicated metabolite for 24 h, then growth assessed by reading at 600 nm. Statistical significance measured by one-way ANOVA (A, C, F, F, G, J, K, L, M) or t test (E, H). Statistical significance was measured by a one-way ANOVA or t test compared with vehicle control at day 3, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean \pm the standard error of the mean. Microbial 16 sequencing experiments, metabolomics, and human tissue analysis were performed once, all other assays were performed in triplicates at least three times.

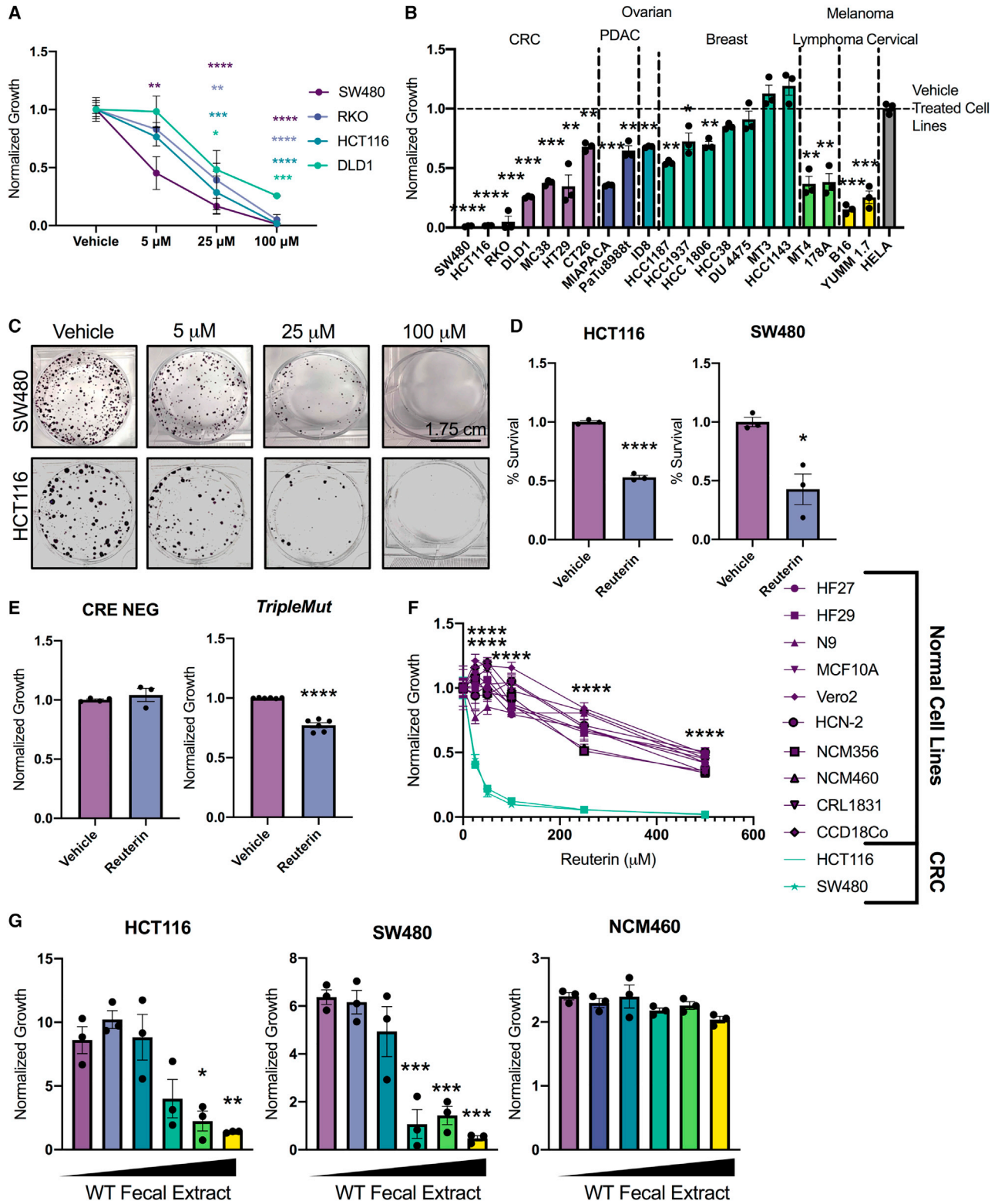


Figure 3. Reuterin preferentially inhibits the growth of CRC cells over normal colon epithelial cells

(A) Dose curve of panel of cell lines treated reuterin for 72 h (n = 3).

(B) Cell growth following 100 μ M reuterin treatment (n = 3).

(C) Colony-forming assay of cells treated with indicated concentration of reuterin (n = 3, representative shown).

(D) LDH assay of cells treated with 100 μ M reuterin for 24 h (n = 3).

(legend continued on next page)

seen around 50 μM , which is below the reuterin concentration of the normal colon (around 100 μM). We hypothesized that growth-suppressive effects of reuterin are preferentially affecting cancer cells. Enteroid cultures were generated from Cre-negative control mice or induced *TripleMut* mice 10 days after Cre-mediated gene targeting *in vivo*. *TripleMut* enteroids and wild-type enteroids were incubated with 100 μM of reuterin and cell death was assessed. Reuterin increased cell death in *TripleMut* colon epithelial cells, but not the control epithelial cells (Figure 3E). Moreover, we found that a panel of normal cell lines is significantly less sensitive to reuterin than colon cancer cell lines (Figure 3F). Wild-type mouse fecal metabolites inhibited CRC cell lines HCT116 and SW480 in a dose-dependent manner, whereas no change in growth was observed in a noncancerous human colon cell line NCM460 (Figure 3G).

We had previously found that reuterin altered the activity of hypoxia-inducible factor (HIF)2 α (Das et al., 2020). HIF2 α is an important transcription factor for CRC growth (Xue et al., 2016). We generated a HIF2 α -knockout HCT116 cell line (Figure S3E), but no change in sensitivity to reuterin was observed (Figure S3F). We have also previously shown that iron is central in potentiating electrophile-induced cell death (Singhal et al., 2021). We co-treated cells with reuterin and iron but observed no potentiation (Figure S3G). Taken together, these findings imply that reuterin is acting through a previously undescribed mechanism.

Reuterin induces oxidative stress in colorectal cancer cells

In our efforts to generate molecular and mechanistic insights into the growth-inhibitory effects of reuterin in intestinal cells, we used metabolomics, transcriptomics, and proteomics. RNA-sequencing studies in an intestinal cell line treated with 100 μM reuterin for 24 h demonstrated definitive transcriptional changes (Figure 4A and Table S2). Using principal-component analysis (PCA), gene expression in cells treated with reuterin were significantly altered (Figure S4A). We observed upregulation in genes essential for oxidative stress response, along with genes acting downstream of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) (Figures 4B and S4B). The most significantly enriched pathways include ribosomal subunit, translation initiation, and intramolecular transferase (Figure 4C). Targeted metabolomics identified glutathione metabolism as a significantly enriched pathway, with a 6-fold enrichment (Figure 4D and Table S3). Subsequently, we created a network that integrates the transcriptomic and metabolomic data. This network shows enrichment of glutathione and glutamate metabolism, suggesting that oxidative stress is a potential mechanism (Figure S4C). We quantified how transcripts in the metabolic pathways of significantly altered metabolites were modulated. This approach also identified glutathione metabolism (Figure 4E). As a complementary approach, we quantified oxidized L-glutathione, a marker of the redox stress, which confirmed that reuterin induced oxidative stress (Figure 4F). Subsequently, we observed that NAC inhibited the in-

duction of NRF2-dependent oxidative stress genes (Figure S4D). These results provide detailed molecular confirmation that reuterin directly controls the redox balance of a cell.

Reuterin acts through glutathione depletion

To further address the role of reuterin in mediating oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) were measured in SW480, HCT116, RKO, and DLD1 cells. A dose-dependent increase in ROS was observed in all sensitive colon cancer cell lines studied following reuterin treatment (Figure 5A). We measured ROS in the reuterin-resistant cell line HeLa, and the normal colon, reuterin-resistant cell line NCM460. Reuterin did not induce ROS in HeLa or NCM460 cells (Figure 5A). Moreover, growth inhibition following reuterin treatment was completely rescued by NAC (Figures 5B–5D and S5A). Our integrative multiomic approach identified glutathione as a key node in cellular response following reuterin treatment (Figure S4C). Directly increasing glutathione using supplementation of glutathione ethyl ester robustly protected against the cytotoxic effects of reuterin (Figure S5B). Buthionine sulfoxamine (BSO), a compound that inhibits the synthesis of glutathione, potentiated the growth-inhibitory effects of reuterin (Figures 5E and S5C) (Lee et al., 2019). We generated dose response matrices for reuterin and BSO and found that reuterin and BSO synergize (Table S7). NAC rescued cancer cell growth inhibition by the fecal metabolites from wild-type mice (Figures 5F and S5D). This indicates that wild-type microbial metabolites inhibit colon cancer cell growth through oxidative stress similar to reuterin.

Electrophilic compounds such as reuterin can target selective macromolecules for cellular damage. We measured lipid ROS using BODIPY 581/591 and observed no increase in lipid oxidation following treatment (Figure S5E). Moreover, liproxstatin and ferrostatin, two inhibitors of lipid ROS, completely failed to rescue reuterin cytotoxicity (Figure 5G) (Angeli et al., 2014; Gaschler et al., 2018). MitoTEMPO, a mitochondrial targeted superoxide dismutase, also did not alter cell growth following reuterin (Figure 5G). However, apoptotic inhibitor ZVAD rescued reuterin-induced inhibition (Figure 5G).

We found that reuterin did not synergize with the double-strand break repair inhibitor olaparib (Figure S5F and Table S7). Moreover, gamma-H2AX, a marker of DNA damage, was not increased following reuterin treatment (Figure S5G). This suggests that reuterin is not functioning primarily through damaging nucleic acids. Interestingly, reuterin did synergize in cell lines with the chemotherapeutic 5-fluorouracil, which is known to increase ROS (Figure S5H). Together, this work suggests that reuterin is inducing oxidative stress in a GSH-dependent manner without oxidizing DNA or lipids.

Reuterin induces protein oxidation and selectively inhibits ribosomal biogenesis

Our work suggests that reuterin is a highly selective electrophile that does not require HIF2 α , high levels of iron, or targets nucleic

(E) Epithelial cell death in indicated mouse models 14 days after induction (n = 3).

(F) Cell growth in normal and cancer cells. Purple: normal cell lines; green: colon cancer cell lines. Data were collected at 72 h (n = 3).

(G) Dose curve of wild-type fecal extracts on indicated cell line. (n = 3). Statistics were calculated with one-way ANOVA (A, B, F, and G) or t test (D and E). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean \pm the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicates at least three times with the exception of (F), which was performed in triplicate a single time.

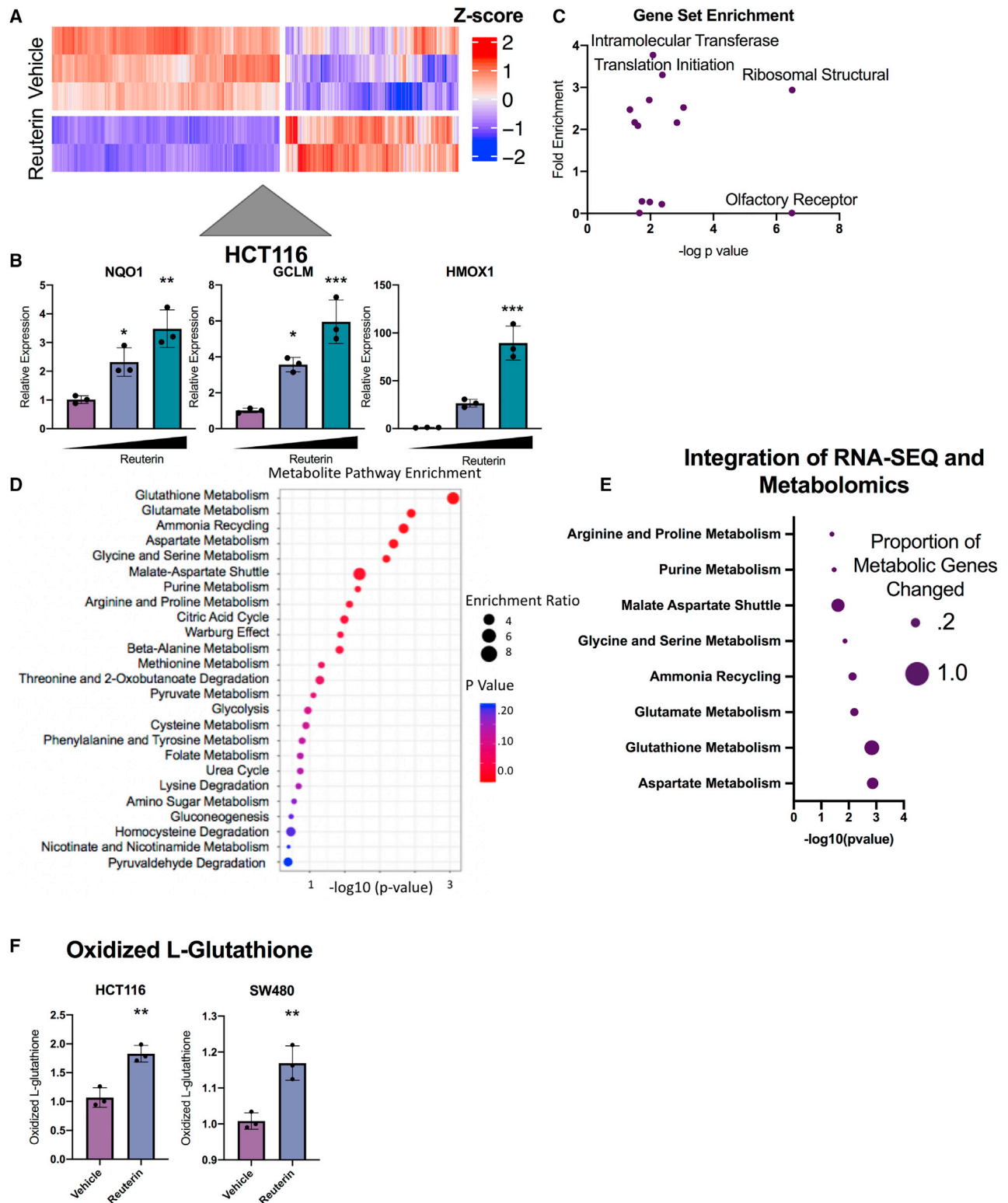


Figure 4. Multi-omics approach reveals reuterin induces oxidative stress

(A) Heat map of altered genes treated with 100 μ M reuterin for 24 h (n = 2–3).
 (B) qPCR of NRF2 target genes with vehicle control, 25 μ M and 100 μ M reuterin treatment for 24 h (n = 3).
 (C) KEGG pathway enrichment for genes differentially expressed between vehicle and reuterin-treated cells.
 (D) Metabolomics pathway enrichment of significantly altered metabolites in SW480 cells.

(legend continued on next page)

acid and lipids. Electrophiles can interact with cysteines, causing irreversible oxidation, loss of protein function, and cell death (Filipovic et al., 2018). Sodium sulfide can prevent protein oxidation by binding to cysteines leading to protective and reversible persulfidation (Figure 6A) (Filipovic et al., 2018). Sodium sulfide protected cells from reuterin-induced growth inhibition (Figure 6B). High-throughput cysteine-activity-based proteomics is a recently developed approach to identify with which cysteines an electrophile interacts (Kuljanin et al., 2021). Cells were treated with reuterin, dimethyl fumarate (DMF), or vehicle for 24 h. DMF was used as an additional control since this electrophile induces cell death mechanistically distinct from reuterin (Singhal et al., 2021) (Figure 6C and Table S4). Cysteine proteomics revealed that reuterin selectively bound to cysteine residues in multiple biological replicates. The data were plotted as a competition ratio, where a high competition ratio indicates a higher proportion of reuterin-bound protein. Several protein hits were significant as assessed by having a competition ratio three times greater than the standard deviation (Figure 6D). Similar analysis was performed with DMF to identify unique targets (Figure S6A).

Consistent with different mechanisms of action, we found that reuterin had a significantly different cysteine proteomics profile than DMF. Pathway analysis showed enrichment for protein binding and catalysis (Figure S6B). The reuterin and DMF proteomic profiles were distinct (Figure S6C). Whole-cell lysate proteomics also revealed significant differences in proteins induced by reuterin and DMF (Figure S6D and Table S5). We used a network approach to integrate the proteomics with the metabolomics and transcriptomics data. We used known links from genes to metabolites to score each of our significantly changed metabolites by the number of linked genes differentially expressed. The metabolic pathway critical in NAD was the most significant hit, indicating an important role of reuterin in redox balance (Figure S6E). The network approach further implicated oxidative stress as primary mechanism of action for reuterin (Figure S6F).

We next assessed the proteins bound by reuterin in a dose-dependent manner. Proteins that were unique to reuterin were further filtered for essentiality using the Cancer Dependency Map project (Tsherniak et al., 2017) (Figure 6E). We identified six proteins. Three of these six proteins, Ltv1 ribosome biogenesis factor (LTV1), Rio Kinase 2 (RIOK2), and YEATS domain containing protein 2 (YEATS2) are involved with ribosomal biogenesis (Cerezo et al., 2021; Collins et al., 2018; Mi et al., 2017). LTV1, CASC5, RIOK2, CHKA, MCM6, and YEATS2 were not downregulated transcriptionally in reuterin-treated HCT116 cell line (Figure S6G). This, combined with our previous enrichment for ribosomal structural proteins in the RNA-sequencing analysis (Figure 4B), led us to hypothesize that inhibiting ribosomal assembly is an important cytotoxic pathway of reuterin. YEATS2 regulates a large subset of ribosomal protein-encoding genes (Mi et al., 2017). YEATS2 target genes were

decreased after reuterin treatment (Figure 6F) (Mi et al., 2017). We used CX-5461, an established inhibitor of the initiation of ribosome biogenesis (Mars et al., 2020). We found that low-dose CX-5461 and reuterin synergized, but CX-5461 and DMF did not (Figures 6G and S6H and Table S7). We used a puromycin incorporation assay (SUnSET) to quantify active protein translation in reuterin-treated cell lines. Reuterin reduced protein translation in HCT116 and SW480 cell lines, but not reuterin-resistant HeLa and NCM460 (Figures 6I, S6H, and S6I). These results demonstrate that reuterin induces protein oxidation, and that this oxidation inhibits ribosomal biogenesis and downstream protein translation, which inhibits cancer growth *in vitro* (Figure 6J).

Reuterin inhibits colorectal cancer growth *in vivo*

We implanted HCT116 and SW480 colon cancer xenograft tumors subcutaneously in nude mice. The mice were gavaged daily with *L. reuteri* (reuterin-producing) or *L. reuteri* genetically engineered to not produce reuterin daily. Treatment with wild-type but not mutant *L. reuteri* reduced HCT116 and SW480 tumor growth significantly beginning 2 days after treatment initiation (Figure 7A). We quantified systemic reuterin in these syngeneic tumors. Reuterin was significantly increased in treated tumors (Figure 7B). Reuterin levels quantified in treated tumors are at a level that is cytotoxic in cell culture. Cleaved caspase 3 (cCaspase3) was increased in wild-type but not mutant *L. reuteri*-treated mice in both HCT116 and SW480 tumors (Figure 7C). We quantified ROS and found that wild-type but not mutant *L. reuteri* significantly increased ROS (Figure 7D). We next verified wild-type *L. reuteri* decreased syngeneic flank tumor growth of the mouse cell line MC38. Again, *L. reuteri* reduced tumor size significantly and reuterin levels were increased almost 3-fold (Figures 7E and 7F). The tumors in mice gavaged with wild-type *L. reuteri* were noticeably smaller (Figure 7G). A marked decrease in Ki67 levels were observed in reuterin-treated tumors compared with vehicle control treatment (Figure S7A). Moreover, we verified mutant and wild-type *L. reuteri* strains have similar colonization and *in vivo* growth by performing QPCR in the colons of wild-type mice gavaged daily for 1 week (Figure S7B). We found a significant increase in ROS species in wild-type *L. reuteri* mice compared with mutant *L. reuteri*-treated mice (Figure 7H).

To extend our results to a genetic model of colon cancer, we induced a cohort of *TripleMut* mice with low-dose tamoxifen, and gavaged daily with wild-type *L. reuteri*, as well as mutant *L. reuteri* strain (Figure 7I) (Schaefer et al., 2010). Daily gavages of wild-type *L. reuteri*, but not the mutant strain, increased reuterin levels in colon tissues to roughly the levels observed in healthy tumor-free mice (Figure 7J). We quantified colonic diamniopropane and saw no changes in any of the treatment groups (Figure S7C). We found a robust protective effect for the wild-type *L. reuteri* (reuterin-producing) treatment, with a significant

(E) Proportion of genes altered in the RNA-Seq of metabolic pathway associated genes. The size of the dot represents the percentage of genes altered transcriptionally in the indicated metabolic pathway. The p value is the significance of the metabolic pathway enrichment.

(F) Quantification of oxidized L-glutathione (n = 3). Statistics were calculated with one-way ANOVA (B) or t test (F). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean ± the standard error of the mean. Metabolomics and RNA-Seq experiments were performed a single time in triplicate, all other experiments were performed at least three times in triplicate.

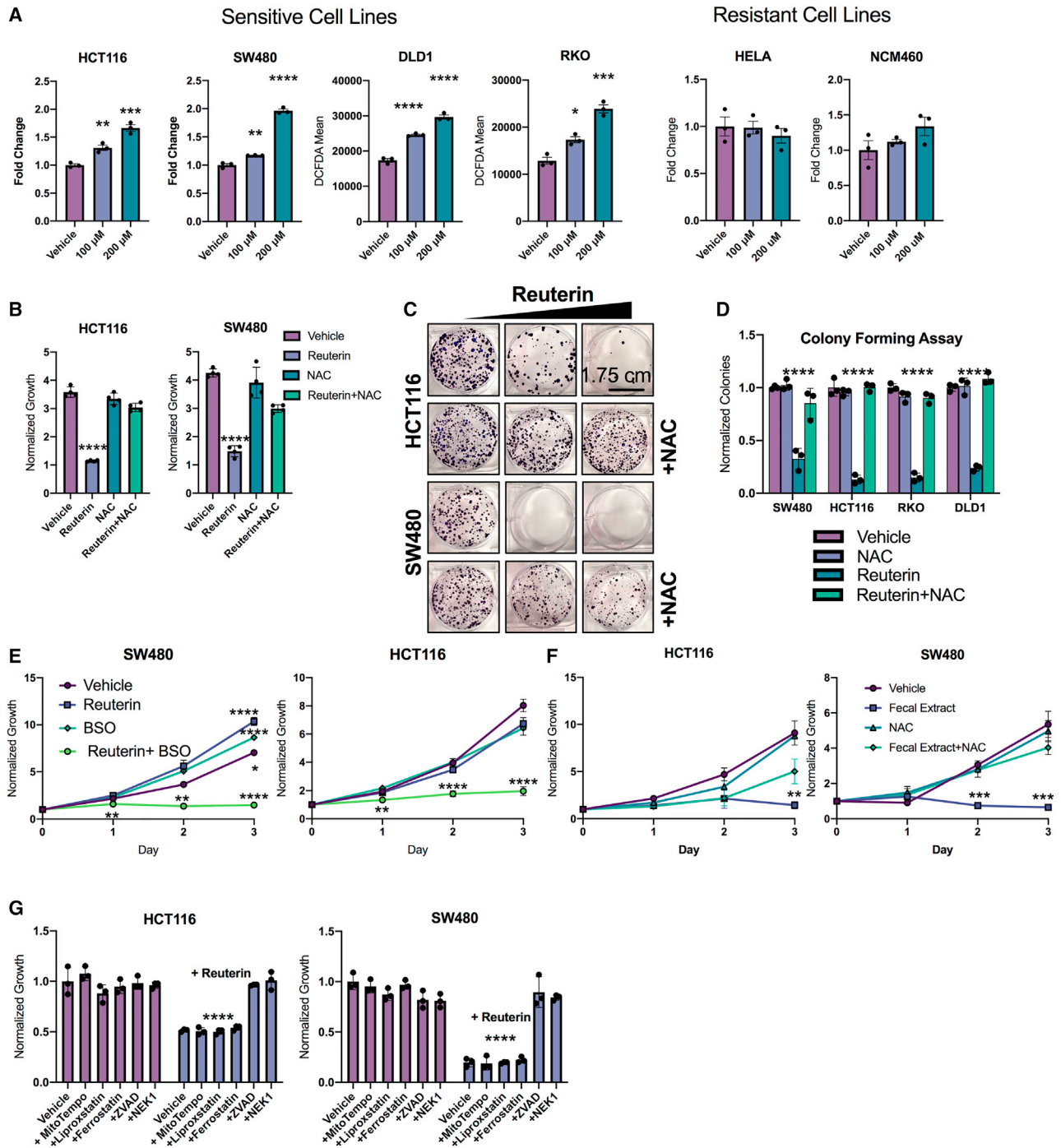


Figure 5. Reuterin induces oxidative stress in a GSH-dependent manner

(A) Cells were treated with indicated reuterin concentration for 24 h, then stained with DCFDA ROS dye and analyzed by flow cytometry. Values are mean fluorescence intensity (MFI) (n = 3).

(B) Cells were pretreated with NAC for 24 h, then treated with reuterin for 72 h, then analyzed by live cell imaging (n = 3).

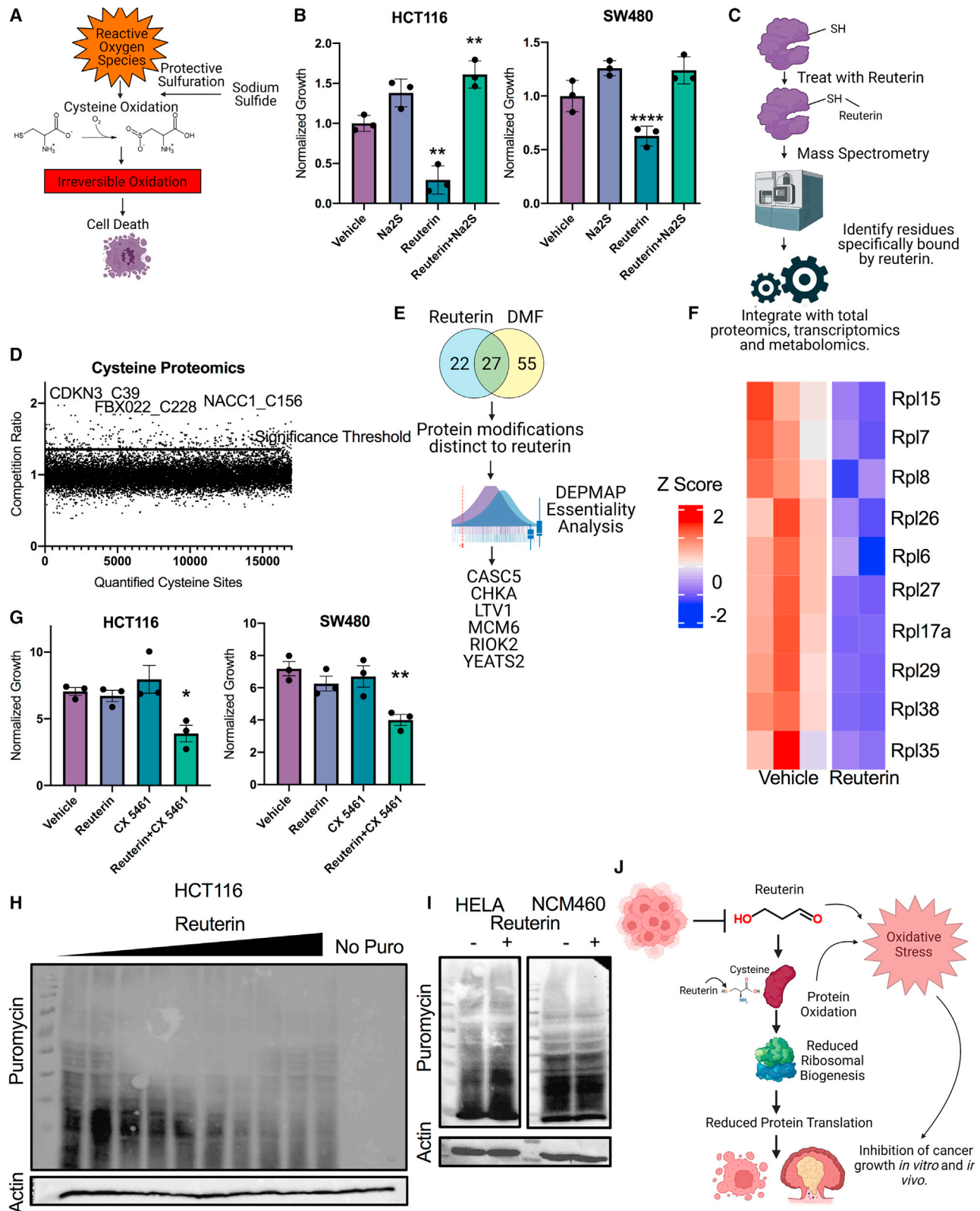
(C) Representative colony-forming assay (CFA) at 14 days for cells pretreated with NAC for 12 h (n = 3, representative shown).

(D) Quantification of CFA of cells treated as in (C) (n = 3).

(E) Cells were co-treated with 10 μ M reuterin and 100 μ M BSO (n = 3).

(F) Cells were pretreated with NAC for 12 h then treated with wild-type organic fecal extract (n = 3).

(G) Cells were pretreated with mitotempo (1 mM), liproxstatin (10 μ M), ferrostatin (10 μ M), ZVAD (50 μ M), or necrostatin-1 (50 μ M) then treated with 100 μ M reuterin for 3 days; growth was assessed via live cell imaging (n = 3). Statistics were calculated with one-way ANOVA (A, B, D, E, F, and G). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean \pm the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicate at least three times.



(legend on next page)

increase in survival compared with mouse cohorts treated with PBS or the mutant *L. reuteri* strain (Figure 7K). *L. reuteri* treatment did not alter normal tissues homeostasis as assessed by alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, body weight, and H&E histological assessments (Figures S7D–S7F). *L. reuteri*-treated mice did not have any changes in immune infiltration and proinflammatory cytokines (Figures S7G and S7H). Moreover, reuterin has previously been shown to activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR) pathway (Cervantes-Barragan et al., 2018). Neither *TripleMut* mice or syngeneic tumors treated with *L. reuteri* have any significant, consistent changes in AHR pathways (Figures S7I and S7J). However, colons of *TripleMut* mice treated with wild-type *L. reuteri* have a more than 3-fold increase in ROS species than mutant *L. reuteri*-treated mice (Figure 7L). We also saw an increase in 4HNE, a marker of ROS in *TripleMut* mice treated with wild-type *L. reuteri* (Figure 7M). A striking decrease in dysplastic transformation was observed in reuterin-treated mouse colons (Figure 7N). Mice treated with *L. reuteri* had lower grade and less invasive lesions (Figure 7O). These data are consistent with a decrease in Ki67 staining and an increase in cCASP3 in wild-type *L. reuteri*-treated *TripleMut* mice (Figures S7K and S7L). Consistent with our *in vitro* analysis, an *ex vivo* puromycin assay in the *TripleMut* mice was performed. Mice gavaged with *L. reuteri* showed reduced translation compared with mice gavaged with mutant *L. reuteri*, supporting our *in vitro* mechanism (Figure 7P). Together, the data demonstrate a critical role of *L. reuteri* and reuterin in modulating CRC redox balance and growth.

DISCUSSION

Cancer metabolism is a rapidly developing field, but insight into how microbial metabolites impact colon cancer initiation and progression is limited. Recent work has highlighted that certain bacterial populations can impair or facilitate cancer growth (Chen et al., 2017; Cullin et al., 2021). Microbial byproducts like butyrate and other SCFAs have been shown to have variable effects on cancer cells. Although some work has shown that butyrate induces cancer cell death at high concentrations, other studies have shown that carbohydrate-derived metabolites such as butyrate induce hyper-proliferation and increased colorectal tumors in colon epithelial cells (Belcheva et al., 2014; Liu et al., 2018; Kaiko et al., 2016; Okumura et al., 2021). Moreover,

other SCFAs have been shown to drive hepatocellular carcinoma (Singh et al., 2018).

Studies examining interactions between the microbiome and metabolic byproducts from the tumor microenvironment (TME) are in their infancy. The TME is notably nutrient poor (Lyssiotis and Kimmelman, 2017). The rapid consumption of nutrients by cancer cells leads to the suppression of the T cell response (Bian et al., 2020; Moir et al., 2020; Nachef et al., 2021). How the TME effects dysbiosis, and how this cycle impacts colon cancer growth is unknown. We clearly show a metabolite exchange where the healthy microbiome produces several metabolites, including reuterin that decreased colon cancer growth. However, since these are endogenous metabolites produced at high levels, it was not clear how tumors bypassed this toxicity to establish growth. Our work suggests that dysbiosis is central for CRC progression through limiting the production of anti-cancer, endogenous, cytotoxic metabolites. Further, our data suggest that homocysteine and cystathionine metabolism are dysregulated in our advanced colon cancer model, and in turn this inhibits colonization of *L. reuteri*. Much more work is needed to understand the mechanistic basis of dysbiosis in colon cancer. Future work is needed to identify what molecular pathways facilitate production of these metabolites. We clearly show that increased mutational burden rapidly changes the microbiome. However, knockdown of KRAS in cell lines did not rescue *L. reuteri* growth *in vitro*. Moreover, cell lines with different mutational landscapes decreased *L. reuteri* growth *in vitro*. This suggests that there is a complex yet undefined interplay with tumor progression, mutations, and microenvironmental stressors that are central to dysbiosis.

Electrophilic species such as reuterin can bind to thiols and alter or decrease protein function. Therefore, it is entirely possible two parallel, but essential pathways lead to cytotoxicity, 1) by inducing ROS and 2) direct binding and altered function of ribosomal biogenesis (Figure 6J). Future work will understand if key thiols on ribosomal biogenesis proteins are essential to mediate cancer selective cell death. Our findings also demonstrate that distinct electrophiles maintain selectivity and different mechanisms of action. DMF and reuterin are cytotoxic electrophiles that induce death via protein oxidation. However, DMF and reuterin have distinct molecular targets, differential HIF2 α dependency, and only reuterin targets ribosomal biogenesis (Singhal et al., 2021). Our data suggest that microbial metabolites may alter host response through modulating selective cysteine oxidation. This is a promising area for future studies.

Figure 6. Reuterin induces protein oxidation and inhibits ribosomal biogenesis

(A) Schematic of protective persulfidation from protein oxidation.

(B) Cells were pretreated with 50 μ M reuterin for 12 h, then media was washed out, and cells were treated with 200 μ M sodium sulfide for 24 h before LDH assay (n = 3).

(C) Schematic for integrated proteomics, transcriptomics, and metabolomics.

(D) Competition ratio of average of three separate samples for cysteine sites bound by reuterin (n = 3, repeated twice).

(E) Analysis of cysteine proteomics data with DepMap.

(F) Heatmap of YEATS2 target genes in cells treated with reuterin (n = 5).

(G) Growth assays of cells co-treated with 2 μ M of CX5461 and 10 μ M of reuterin for 72 h (n = 3).

(H) Puromycin western blot of cells treated with doses increasing from 1 to 150 μ M reuterin for 24 h.

(I) Puromycin western blot of cells treated with 100 μ M reuterin for 24 h.

(J) Schematic of proposed mechanism of action for reuterin. Statistics were calculated with one-way ANOVA (B and G). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean \pm the standard error of the mean. Cysteine proteomics was performed in triplicate two times, RNA-Seq experiment was performed in triplicate once. All other experiments were performed in triplicate at least three times.

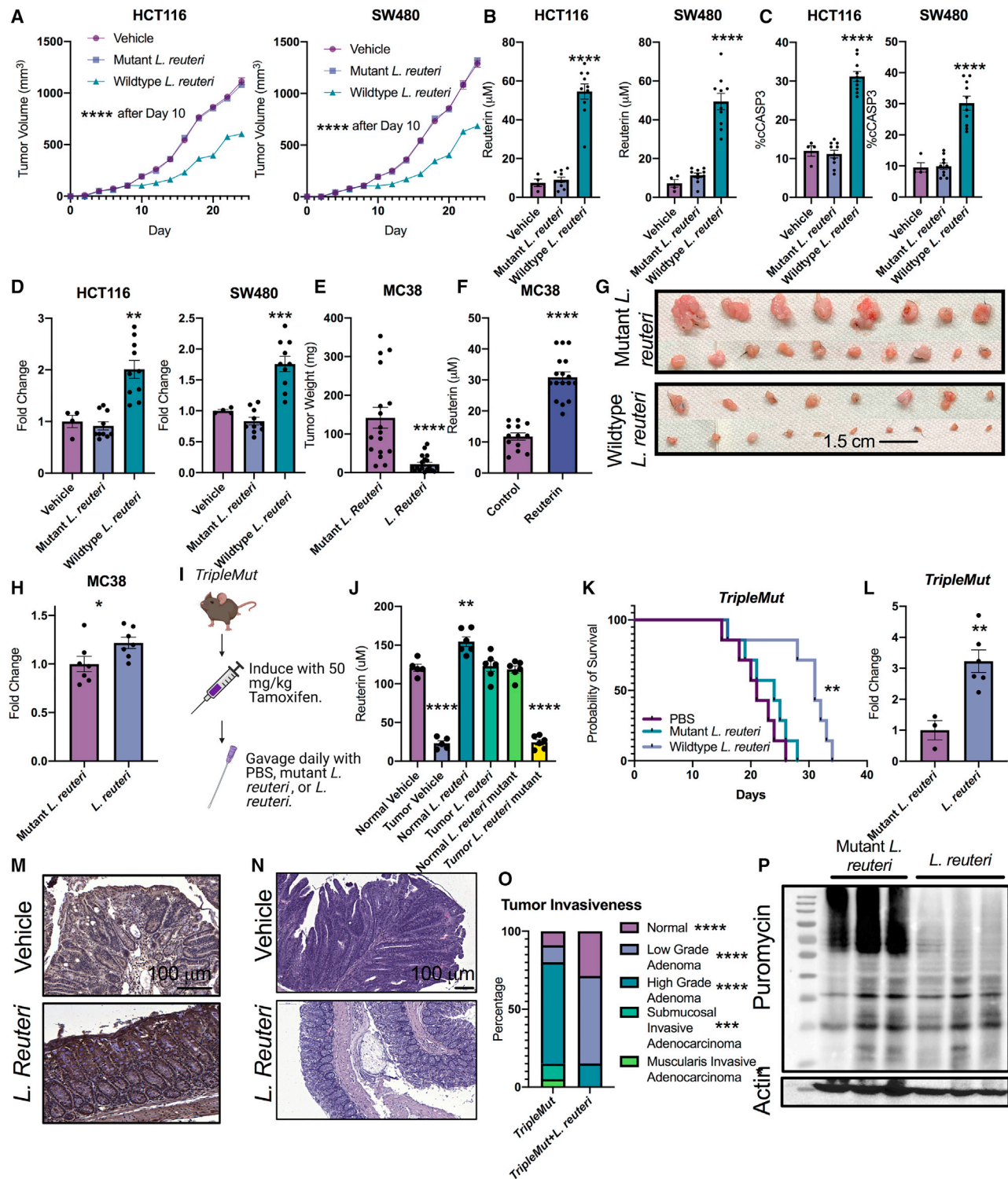


Figure 7. Reuterin inhibits CRC growth in vivo

(A) Quantification of tumor size of implanted HCT116 and SW480 cells in nude mice followed by daily gavage with wild-type or mutant *L. reuteri* or PBS (n = 4–10). (B) Quantification of reuterin in tumor from (A). (C) Percent cleaved caspase 3 cells (cASP3) in tumors from (A). (D) Fold change of DCFDA ROS signal in tumors from (A). (E) Endpoint weight of tumors of MC38 in mice gavaged daily with *L. reuteri* (n = 8–9). (F) Quantification of reuterin in MC38 tumors from (E).

(legend continued on next page)

Reuterin is an antimicrobial compound, and we demonstrate that reuterin has potent cytotoxic effects specific to cancer cells. Reuterin has been shown to be well tolerated *in vivo* at high doses (Asare et al., 2020). It is currently unknown how normal cells preferentially avoid reuterin-induced growth inhibition. We hypothesize that a heightened state of oxidative stress due to altered metabolism in cancer cells contributes to the preferential cytotoxic effects of reuterin (Harris and DeNicola, 2020). Cells under heightened oxidative stress following 5-fluorouracil or BSO treatment are significantly more susceptible to the cytotoxic effects of reuterin. Reuterin does not decrease protein translation or induce ROS in a normal intestinal cell line. It is likely a complex integration of mutational status, proliferation, and microenvironmental stressors and waste products determines reuterin sensitivity.

L. reuteri is currently being studied in several clinical trials for colitis, colic, asthma, and *Helicobacter pylori* infection and has a confirmed safety profile (Dore et al., 2019; Giudice et al., 2016; Oliva et al., 2012; Sung et al., 2017). Reuterin's robust, cancer-specific cytotoxic effect *in vivo* and *in vitro* makes it a promising target for future clinical studies, as an adjunct to traditional therapy or as a preventive approach. Our work further highlights the utility of a precision approach to probiotics.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mice
 - Human subjects
 - Cell lines
- METHOD DETAILS
 - Proliferation assay
 - Bacterial strains
 - Antibiotics treatment
 - Real time quantitative PCR
 - Western blotting
 - Immunostaining
 - Metabolite extraction

- 16S rRNA gene sequencing and bacterial community analysis
- LDH assay
- Colony forming assay
- C11-BODIPY lipid ROS measurement
- ROS detection assay
- Metabolomics
- Histology
- Immune cell isolation
- RNA-seq analysis
- Pathway analysis
- Syngeneic and xenograft studies
- Proteomics and cysteine proteomics
- Puromycin assay
- Epithelial cell isolation
- Dose response matrices

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.001>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.N.B., J.G., and Y.M.S. designed the study. H.N.B., R.R., J.G., R.S., N.K.D., S.A.K., N.K.D., M.J., J.M., W.H., M.J., and Y.M.S. acquired the data. H.N.B., R.S., R.R., M.J., J.M., C.A.L., E.R.H., R.L.B., S.G., and Y.M.S. analyzed the data. H.N.B. and Y.M.S. wrote the manuscript. Y.M.S. supervised the study.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NIH grants R01CA148828, R01CA245546, and R01DK095201 to Y.M.S.; R37CA237421, R01CA248160, R01CA244931, and R01CA215607 to C.A.L.; and R01NS099280 and R01NA086810 to P.K.T. VA grant BLRD BX004842 to P.K.T. The work was also supported by the University of Michigan Comprehensive Cancer Center Core Grant P30CA046592; the GI SPORE Molecular Pathology and Biosample Core (P50CA130810); the Center for Gastrointestinal Research (DK034933); and the Department of Defense (CA171086 to Y.M.S.). H.N.B. was supported by T32 training grant (T32-of Michigan Systems and Integrative Biology grant. S.A.K. was supported by an NIH F31 fellowship (F31CA247457). S.L.M. was supported by CMB Graduate Program T32GM007315. Metabolomics studies were supported by NIH grant DK097153, and the Charles Woodson Research Fund. Proteomics studies were supported by the Hale Family Center for Pancreatic Cancer Research. The authors thank Robert L. Britton for providing the strains of *Lactobacillus reuteri*.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

(G) Picture of representative tumors from (D).

(H) Fold change of DCFDA ROS measurements from MC38 tumors.

(I) Schematic for treatment of the *TripleMut*.

(J) Quantification of reuterin in whole colon from indicated treatment groups (n = 4–6).

(K) Survival curve of mice gavaged daily by either wild-type or mutant *L. reuteri* (n = 7).

(L) DCFDA ROS measurements from the colons of induced *TripleMut* mice treated with either mutant or wild-type *L. reuteri* (n = 3–6).

(M) Representative 4HNE immunohistochemistry in induced *TripleMut* mice (n = 3–6, representative shown).

(N) H&E of PBS-treated or *L. reuteri*-treated *TripleMut* mice (n = 3–6, representative shown).

(O) Pathological score of *TripleMut* mice treated with wild-type or mutant *L. reuteri* (n = 4–5).

(P) Puromycin western blot of induced *TripleMut* mice killed on day 10 and treated with daily gavage of either wild-type or mutant *L. reuteri*. Colons were washed, homogenized, and stained with puromycin *ex vivo* for 30 minutes (n = 3–6, representative shown). Statistics were calculated with one-way ANOVA (A, B, C, D, J, K, and O) or t test (E, F, H, and L). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Data are presented as mean ± the standard error of the mean. Xenograft experiments were performed once. MC38 syngeneic experiments were performed two times with the indicated mouse numbers.

Received: August 5, 2021
 Revised: November 1, 2021
 Accepted: November 30, 2021
 Published: December 23, 2021

REFERENCES

- Anderson, E.R., Taylor, M., Xue, X., Ramakrishnan, S.K., Martin, A., Xie, L., Bredell, B.X., Gardenghi, S., Rivella, S., and Shah, Y.M. (2013). Intestinal HIF2 α promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *110*, E4922–E4930.
- Angeli, J.P.F., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., et al. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat. Cell Biol.* *16*, 1180–1191.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* *66*, 683.
- Asare, P.T., Zurluh, K., Greppi, A., Lynch, D., Schwab, C., Stephan, R., and Lacroix, C. (2020). Reuterin demonstrates potent antimicrobial activity against a broad panel of human and poultry meat *Campylobacter* spp. isolates. *Microorg* *8*, 78.
- Belcheva, A., Irrazabal, T., Robertson, S.J., Streutker, C., Maughan, H., Rubino, S., Moryama, E.H., Copeland, J.K., Surendra, A., Kumar, S., et al. (2014). Gut microbial metabolism drives transformation of MSH2-deficient colon epithelial cells. *Cell* *158*, 288–299.
- Bennett, B.D., Yuan, J., Kimball, E.H., and Rabinowitz, J.D. (2008). Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach. *Nat. Protoc.* *3*, 1299–1311.
- Bian, Y., Li, W., Kremer, D.M., Sajjakulnukit, P., Li, S., Crespo, J., Nwosu, Z.C., Zhang, L., Czerwonka, A., Pawłowska, A., et al. (2020). Cancer SLC43A2 alters T cell methionine metabolism and histone methylation. *Nature* *585*, 277–282.
- Cerezo, E.L., Houles, T., Lié, O., Sarthou, M.-K., Audoynaud, C., Lavoie, G., Halladjian, M., Cantaloube, S., Froment, C., Burlet-Schiltz, O., et al. (2021). RIOK2 phosphorylation by RSK promotes synthesis of the human small ribosomal subunit. *PLoS Genet.* *17*, e1009583.
- Cervantes-Barragan, L., Chai, J.N., Tianero, M.D., Luccia, B.D., Ahem, P.P., Merriman, J., Cortez, V.S., Caparon, M.G., Sonia, M.S., Gilgillan, S., et al. (2018). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4+CD8 α + T cells. *Science* *357*, 806–810.
- Chae, T.U., Kim, W.J., Choi, S., Park, S.J., and Lee, S.Y. (2015). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,3-diaminopropane, a three carbon diamine. *Sci. Rep-UK* *5*, 13040.
- Chen, J., Pitmon, E., and Wang, K. (2017). Microbiome, inflammation and colorectal cancer. *Semin. Immunol.* *32*, 43–53.
- Collins, J.C., Ghalei, H., Doherty, J.R., Huang, H., Culver, R.N., and Karbstein, K. (2018). Ribosome biogenesis factor Ltv1 chaperones the assembly of the small subunit head. *J. Cell Biol.* *217*, 4141–4154.
- Cullin, N., Antunes, C.A., Straussman, R., Stein-Thoeringer, C.K., and Elinav, E. (2021). Microbiome and cancer. *Cancer Cell* *39*, 1317–1341.
- Das, N.K., Schwartz, A.J., Barthel, G., Inohara, N., Liu, Q., Sankar, A., Hill, D.R., Ma, X., Lamberg, O., Schnitzlein, M.K., et al. (2020). Microbial metabolite signaling is required for systemic iron homeostasis. *Cell Metab.* *31*, 115–130.e6.
- Dejea, C.M., Fathi, P., Craig, J.M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A.L., Wu, X., Shields, C.E., Hechenbleikner, E.M., Huso, D.L., et al. (2018). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science* *359*, 592–597.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* *29*, 15–21.
- Dore, M.P., Bibbò, S., Loria, M., Salis, R., Manca, A., Pes, G.M., and Graham, D.Y. (2019). Twice-a-day PPI, tetracycline, metronidazole quadruple therapy with Pylera® or *Lactobacillus reuteri* for treatment naïve or for retreatment of *Helicobacter pylori*. Two randomized pilot studies. *Helicobacter* *24*, e12659.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., and Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* *32*, 3047–3048.
- Filipovic, M.R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018). Chemical biology of H2S signaling through persulfidation. *Chem. Rev.* *118*, 1253–1337.
- Flemer, B., Warren, R.D., Barrett, M.P., Cisek, K., Das, A., Jeffery, I.B., Hurley, E., O’Riordain, M., Shanahan, F., and O’Toole, P.W. (2018). The oral microbiota in colorectal cancer is distinctive and predictive. *Gut* *67*, 1454.
- Frankish, A., Diekhans, M., Ferreira, A.-M., Johnson, R., Jungreis, I., Loveland, J., Mudge, J.M., Sisu, C., Wright, J., Armstrong, J., et al. (2018). GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes. *Nucleic Acids Res.* *47*, gky955.
- Gaschler, M.M., Hu, F., Feng, H., Linkermann, A., Min, W., and Stockwell, B.R. (2018). Determination of the subcellular localization and mechanism of action of ferrostatins in suppressing ferroptosis. *ACS Chem. Biol.* *13*, 1013–1020.
- Giudice, M.M., Maiello, N., Allegorico, A., Iavarazzo, L., Capasso, M., Capristo, C., and Ciprandi, G. (2016). *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 plus vitamin D3 as ancillary treatment in allergic children with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* *117*, 710–712.
- Harris, I.S., and DeNicola, G.M. (2020). The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer. *Trends Cell. Biol.* *30*, 440–451.
- Hinoi, T., Akyol, A., Theisen, B.K., Ferguson, D.O., Greenson, J.K., Williams, B.O., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2007). Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. *Cancer Res.* *67*, 9721–9730.
- Hinshaw, S.J., Lee, A.H.Y., Gill, E.E., and Hancock, R.E.W. (2018). MetaBridge: enabling network-based integrative analysis via direct protein interactors of metabolites. *Bioinformatics* *34*, 3225–3227.
- Kaiko, G.E., Ryu, S.H., Koues, O.I., Collins, P.L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E.J., Pearce, E.L., Oltz, E.M., and Stappenbeck, T.S. (2016). The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell* *167*, 1137.
- Kelly, C.J., Zheng, L., Campbell, E.L., Saeedi, B., Scholz, C.C., Bayless, A.J., Wilson, K.E., Glover, L.E., Kominsky, D.J., Magnuson, A., et al. (2015). Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* *17*, 662–671.
- Kuljanin, M., Mitchell, D.C., Schweppe, D.K., Gikandi, A.S., Nusinow, D.P., Bulloch, N.J., Vinogradova, E.V., Wilson, D.L., Kool, E.T., Mancias, J.D., et al. (2021). Reimagining high-throughput profiling of reactive cysteines for cell-based screening of large electrophile libraries. *Nat. Biotechnol.* *39*, 630–641.
- Lang, M., Baumgartner, M., Rožalska, A., Frick, A., Riva, A., Jarek, M., Berry, D., and Gasche, C. (2020). Crypt residing bacteria and proximal colonic carcinogenesis in a mouse model of Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* *147*, 2316–2326.
- Le, D.T., Kavan, P., Kim, T.W., Burge, M.E., Cutsem, E.V., Hara, H., Boland, P.M., Laethem, J.-L.V., Geva, R., Taniguchi, H., et al. (2018). KEYNOTE-164: pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* *36*, 3514.
- Lee, H.M., Kim, D.H., Lee, H.L., Cha, B., Kang, D.H., and Jeong, Y.-I. (2019). Synergistic effect of buthionine sulfoximine on the chlorin e6-based photodynamic treatment of cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* *42*, 990–999.
- Leystra, A.A., and Clapper, M.L. (2019). Gut microbiota influences experimental outcomes in mouse models of colorectal cancer. *Genes-Basel* *10*, 900.
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* *30*, 923–930.
- Liu, H., Wang, J., He, T., Becker, S., Zhang, G., Li, D., and Ma, X. (2018). Butyrate: a double-edged sword for health? *Adv. Nutr.* *9*, 21–29.
- Lyssiotis, C.A., and Kimmelman, A.C. (2017). Metabolic interactions in the tumor microenvironment. *Trends Cell. Biol.* *27*, 863–875.
- Mars, J.-C., Tremblay, M.G., Valere, M., Sibai, D.S., Sabourin-Felix, M., Lessard, F., and Moss, T. (2020). The chemotherapeutic agent CX-5461 irreversibly blocks RNA polymerase I initiation and promoter release to cause nucleolar disruption, DNA damage and cell inviability. *NAR Cancer* *2*, zcaa032.

- Martín-Cabrejas, I., Langa, S., Gaya, P., Rodríguez, E., Landete, J.M., Medina, M., and Arqués, J.L. (2017). Optimization of reuterin production in cheese by *Lactobacillus reuteri*. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 1346–1349.
- Mi, W., Guan, H., Lyu, J., Zhao, D., Xi, Y., Jiang, S., Andrews, F.H., Wang, X., Gagea, M., Wen, H., et al. (2017). YEATS2 links histone acetylation to tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **8**, 1088.
- Moir, J.A.G., Long, A., Haugk, B., French, J.J., Charnley, R.M., Manas, D.M., Wedge, S.R., Mann, J., Robinson, S.M., and White, S.A. (2020). Therapeutic strategies toward lactate dehydrogenase within the tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Pancreas* **49**, 1364–1371.
- Nachef, M., Ali, A.K., Almutairi, S.M., and Lee, S.-H. (2021). Targeting SLC1A5 and SLC3A2/SLC7A5 as a potential strategy to strengthen anti-tumor immunity in the tumor microenvironment. *Front Immunol.* **12**, 624324.
- Nougayrede, J., Chagneau, C.V., Motta, J., Bossuet-Greif, N., Belloy, M., Taieb, F., Gratadoux, J., Thomas, M., Langella, P., and Oswald, E. (2021). A toxic friend: genotoxic and mutagenic activity of the probiotic strain *Escherichia coli* nissle 1917. *mSphere* **6**, e0062421.
- Okumura, S., Konishi, Y., Narukawa, M., Sugiura, Y., Yoshimoto, S., Arai, Y., Sato, S., Yoshida, Y., Tsuji, S., Uemura, K., et al. (2021). Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumorigenesis via butyrate secretion. *Nat. Commun.* **12**, 5674.
- Oliva, S., Nardo, G.D., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., Cucchiara, S., and Stronati, L. (2012). Randomised clinical trial: the effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharm. Therap* **35**, 327–334.
- Overman, M.J., Lonardi, S., Wong, K.Y.M., Lenz, H.-J., Gelsomino, F., Aglietta, M., Morse, M.A., Cutsem, E.V., McDermott, R., Hill, A., et al. (2018). Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair–deficient/microsatellite instability–high metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **36**. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901>.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D.A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.-É., Li, S., and Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **49**, gkab382.
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., Huber, A.R., van Hoeck, A., Wood, H.M., Nomburg, J., Gurjao, C., Manders, F., Dalmaso, G., Stege, P.B., et al. (2020). Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+E. *coli*. *Nature* **580**, 269–273.
- Ramakrishnan, S.K., Zhang, H., Ma, X., Jung, I., Schwartz, A.J., Triner, D., Devenport, S.N., Das, N.K., Xue, X., Zeng, M.Y., et al. (2019). Intestinal non-canonical NFκB signaling shapes the local and systemic immune response. *Nat. Commun.* **10**, 660.
- Ren, X., and Kuan, P.-F. (2020). Negative binomial additive model for RNA-Seq data analysis. *BMC Bioinformatics* **21**, 171.
- Schaefer, L., Auchtung, T.A., Hermans, K.E., Whitehead, D., Borhan, B., and Britton, R.A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* **156**, 1589–1599.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 7537–7541.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504.
- Singh, V., Yeoh, B.S., Chassaing, B., Xiao, X., Saha, P., Olvera, R.A., Lapek, J.D., Zhang, L., Wang, W., Hao, S., et al. (2018). Dysregulated microbial fermentation of soluble fiber induces cholestatic liver cancer. *Cell* **175**, 679–694.
- Singhal, R., Mitta, S.R., Das, N.K., Kerk, S.A., Sajjakulnukit, P., Solanki, S., Andren, A., Kumar, R., Olive, K.P., Banerjee, R., et al. (2021). HIF-2α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron. *J. Clin. Invest.* **131**. <https://doi.org/10.1172/JCI143691>.
- Song, M., Chan, A.T., and Sun, J. (2020). Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer. *Gastroenterology* **158**, 322–340.
- Sridharan, G.V., Choi, K., Klemashevich, C., Wu, C., Prabakaran, D., Pan, L.B., Steinmeyer, S., Mueller, C., Yousofshahi, M., Alaniz, R.C., et al. (2014). Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut. *Nat. Commun.* **5**, 5492.
- Sung, V., D'Amico, F., Cabana, M.D., Chau, K., Koren, G., Savino, F., Szajewska, H., Deshpande, G., Dupont, C., Indrio, F., et al. (2017). *Lactobacillus reuteri* to treat infant colic: a meta-analysis. *Pediatrics* **141**, e20171811.
- Talarico, T.L., and Dobrogosz, W.J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Ch* **33**, 674–679.
- Tomkovich, S., Dejea, C.M., Winglee, K., Drewes, J.L., Chung, L., Housseau, F., Pope, J.L., Gauthier, J., Sun, X., Muhlbauer, M., et al. (2019). Human colon mucosal biofilms from healthy or colon cancer hosts are carcinogenic. *J. Clin. Invest.* **129**, 1699–1712.
- Thanikachalam, K., and Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients* **11**, 164.
- Tilg, H., Adolph, T.E., Gerner, R.R., and Moschen, A.R. (2018). The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer Cell* **33**, 954–964.
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P.G., Weir, B.A., Kryukov, G., Cowley, G.S., Gill, S., Harrington, W.F., Pantel, S., Krill-Burger, J.M., et al. (2017). Defining a cancer dependency map. *Cell* **170**, 564–576.e16.
- Triner, D., Devenport, S.N., Ramakrishnan, S.K., Ma, X., Frieler, R.A., Greenson, J.K., Inohara, N., Nunez, G., Colacino, J.A., Mortenson, R.M., and Shah, Y.M. (2018). Neutrophils restrict tumor-associated microbiota to reduce growth and invasion of colon tumors in mice. *Gastroenterology* **156**, 1467–1482.
- Winkoff, W.R., Anfora, A.T., Liu, J., Schultz, P.G., Lesley, S.A., Peters, E.C., and Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 3698–3703.
- Wirbel, J., Pyl, P.T., Kartal, E., Zych, K., Kashani, A., Milanese, A., Fleck, J.S., Voigt, A.Y., Palleja, A., Ponnudurai, R., et al. (2019). Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer. *Nat. Med.* **25**, 679–689.
- Xue, X., Ramakrishnan, S.K., Weisz, K., Triner, D., Xie, L., Attil, D., Pant, A., Gyorffy, B., Zhan, M., Carter-Su, C., et al. (2016). Iron uptake via DMT1 integrates cell cycle with JAK-STAT3 signaling to promote colorectal tumorigenesis. *Cell Metab* **24**, 447–461.
- Yachida, S., Mizutani, S., Shiroma, H., Shiba, S., Nakajima, T., Sakamoto, T., Watanabe, H., Masuda, K., Nishimoto, Y., Kubo, M., et al. (2019). Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. *Nat. Med.* **25**, 968–976.
- Zhan, Y., Chen, P.-J., Sadler, W.D., Wang, F., Poe, S., Núñez, G., Eaton, K.A., and Chen, G.Y. (2013). Gut microbiota protects against gastrointestinal tumorigenesis caused by epithelial injury. *Cancer Res.* **73**, 7199–7210.
- Zhang, Z., Wang, K., Oh, J.-H., Zhang, S., van Pijkeren, J.-P., Cheng, C.C., Ren, D., Wei, H., Gänzle, M.G., and Walter, J. (2020). A phylogenetic view on the role of glycerol for growth enhancement and reuterin formation in *Limosilactobacillus reuteri*. *Front Microbiol.* **11**, 601422.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
HIF-2-alpha Antibody	Bethyl Laboratories	Cat# 179483;
Ki67 Antibody	Cell Signaling	Cat#12202T
Actin Antibody	Protein Tech	Cat# 60008-1-Ig; RRID: AB_2883062
Cleaved Caspase 3	Cell Signaling	Cat#9661T
Puromycin Antibody	Developmental Studies Hybridoma Bank	Cat# PMY-2A4
4-HNE Antibody	Bioss Antibodies	Cat# BS-6313R
Anti-p-histone H2A	Sigma	Cat#ZMS05636
Bacterial and virus strains		
Wildtype <i>L. reuteri</i>	Robert L. Britton	N/A
Mutant <i>L. reuteri</i>	Robert L. Britton	N/A
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
FG-4592	Cayman Chemical	Cat#15294
N-acetyl-cysteine	Cayman Chemical	Cat#20261
Sodium Sulfide	Cayman Chemical	Cat#10122555
Cystathionine	Cayman Chemical	Cat# 16061
Olaparib	Cayman Chemical	Cat#10621
CX-5461	Cayman Chemical	Cat#18392
L-Threonine	Sigma	Cat# 72-19-5
Ammonia Chloride	Sigma	Cat#213330
5-Fluorouracil	Sigma	Cat#F6627
L-carnitine	Sigma	Cat#21489
Aspartic Acid	Sigma	Cat#1043819
L-Glutamic Acid	Sigma	Cat#G1251
L-Glutamine	Sigma	Cat#G8540
Hydrogen Peroxide	Sigma	Cat#HX0636
L-Buthionine-Sulfoximine	Cayman Chemical	Cat#14484
Glutathione Ethyl Ester	Cayman Chemical	Cat#14953
Orotic Acid	Sigma	Cat#O2750
Ureidosuccinic Acid	Cayman Chemical	Cat#34126
Deposited data		
16S Sequencing	Yachida et al. (2019)	PMID: 31171880
16S Sequencing	Chen et al., 2017	PMID: 22761885
16S Sequencing	Cheng Tao Pu, 2020	PMID: 31609493
16S Sequencing	GEO	GSE186880
Experimental models: Cell lines		
NCM460	ATCC	N/A
HCT116	ATCC	N/A
MC38	ATCC	N/A
CT26	ATCC	N/A
DLD1	ATCC	N/A
SW480	ATCC	N/A
RKO	ATCC	N/A
HF27	ATCC	N/A
HF29	ATCC	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
MCF10A	ATCC	N/A
Vero2	ATCC	N/A
HCN2	ATCC	N/A
NCM356	ATCC	N/A
CRL1831	ATCC	N/A
CCD18Co	ATCC	N/A
Experimental models: Organisms/strains		
Wildtype: C56Bl/6J	Jackson Labs	N/A
SingleMut: CDX2-ER ^{T2} Cre; <i>Apc</i> ^{fl/fl}	Jackson Labs	N/A
DoubleMut: CDX2-ER ^{T2} Cre; <i>Apc</i> ^{fl/fl} ; <i>Trp53</i> ^{fl/fl}	Jackson Labs	N/A
TripleMut: <i>Apc</i> ^{fl/fl} ; <i>Trp53</i> ^{fl/fl} ; <i>Kras</i> ^{LSLG12D}	Jackson Labs	N/A
Oligonucleotides		
List of primers	Table S6	N/A

RESOURCE AVAILABILITY**Lead contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be responded to by Yatrik Shah, shahy@umich.edu.

Materials availability

16s rRNA gene sequencing is deposited at GEO publicly available as identified below. No unique plasmids or mouse lines were developed for this project. Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Data and code availability

16S RNA-seq data has been deposited at GEO and is publicly available at the date of publication. GEO accession number is GSE186880 and is also listed in the [key resources table](#). Microscopy data reported in this paper will be shared by the lead contact upon request. Any additional information required to reanalyzed the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Mice**

All mice used in this paper are in a predominant C57Bl/6J background. Male and female were equally mixed and littermates were randomly assigned to experimental conditions. The mice were housed in a temperature controlled, specific pathogen free environment, with a 12 h light/dark cycle. They were fed ad libitum with standard chow diet. Studied mice were between 4 and 6 weeks old. For reuterin studies, *L. reuteri* was cultured as described below, and after 18 h of culture, bacteria were harvested by centrifugation and diluted in PBS. Serial dilutions were prepared to assess concentration, and then mice were treated with .2 mL by gavage at a dose of 2×10^9 colony forming units per mL. There were no significant gender differences. Mouse lines used were CDX2-ER^{T2}Cre; *Apc*^{fl/fl} mice, CDX2-ER^{T2}Cre; *Apc*^{fl/fl}; *Trp53*^{fl/fl}, and *Apc*^{fl/fl}; *Trp53*^{fl/fl}; *Kras*^{LSLG12D} mice. All animal studies were carried out in accordance with Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International guidelines and approved by the University Committee on the Use and Care of Animals at the University of Michigan.

Human subjects

The study was approved by the institutional review boards at the University of Michigan (IRBMED, protocol number HUM00085066) and the Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (Research Involving Human Subjects Committee/RIHSC, protocol number 14-029D). The study was carried out in accordance with the protocol and applicable local regulatory requirements. All subjects (both male and female, age 18–55 years) provided written informed consents and participated after completion of a physical examination and review of their previous medical history. For *L. reuteri* quantitation, tissue was collected during either an open surgical procedure or a colonoscopy for both normal and tumor tissue. Tissue was immediately flash frozen until time of extraction as described below. All qPCR was normalized to a universal bacteria control and normalized to the average of the normal tissue or cohort. Feces were collected from patients and then flash frozen.

Cell lines

Human intestinal cell lines HCT116, RKO, SW480, and DLD1 were used for most experiments. Other cell lines used are MC38, HT29, CT26, MIAPACA, PaTu8988t, ID8, HCC1187, HCC1937, HCC 1806, HCC 38, DU 4475, MT3, HCC1143, MT4, 178A, B16F10, YUMM 5.1, HELA, HF27, HF29, N9, MCF10A, Vero2, HCN-2, NCM356, NCM460, CRL1831, and CCD18Co. Cell lines have been STR-authenticated. All cells were maintained in complete DMEM medium (supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% anti-biotic/antimycotic agent) at 37°C in 5% CO₂ and 21% O₂.

METHOD DETAILS

Proliferation assay

Growth assays were performed using MTT reagent (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Briefly, cells were plated down and 24-h following plating a Day 0 reading was taken. Cells were incubated for 45 min with MTT solution (5× concentrate stock: 5 mg/mL, in 1XPBS, pH 7.4). Media and MTT solution were then carefully aspirated followed by solubilization with dimethyl sulfoxide. Absorbance was read at 570nm. Following the Day 0 read, the cells were treated with indicated doses and readings were taken after 24-h. Cell growth assays were also measured using the Cytation 5 Imaging Multi-Mode reader. Cells were plated down, treated 24 h later with indicated treatments, and immediately imaged and analyzed for cell number. Images were then taken every 24 h.

Bacterial strains

L. reuteri strain ATCC PTA6475 (originally isolated from human breast milk, gift of Dr. Robert Britton, Baylor College of Medicine) and *L. reuteri* strain PRB94 (deltapduC mutant in ATCC PTA6475 background, gift of Dr. Robert Britton, Baylor College of Medicine) was used as described previously (Das et al., 2020). The bacteria were cultured in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth at 37°C in a sealed tube under atmospheric oxygen concentration. The bacteria were cultured in Luria broth (LB) media at 37°C under atmospheric oxygen concentration. Fecal bacteria were grown from homogenized wild-type mouse feces inoculum, grown at 37°C in MRS broth.

Antibiotics treatment

Antibiotics treatment (Abx) was performed as described previously (Ramakrishnan et al., 2019). Briefly, animals were given water containing antibiotic cocktail (Ampicillin 1 g/L, neomycin 1 g/L, gentamycin 500 mg/L; penicillin 100U/L) in the drinking water, ad libitum. In addition, oral gavage of vancomycin (1 mg/mL) and metronidazole (0.5 mg/mL) was given on alternate days for 1 week. Mice were then induced and metabolite extracts were prepared 10 days after induction and discontinuation of antibiotics.

Real time quantitative PCR

1 µg of total RNA extracted using Trizol reagent from mouse tissues (intestinal epithelial scrapes), human intestinal cell lines, and mouse feces. RNA was reverse transcribed to cDNA using SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Real time PCR reactions were set up in three technical replicates for each sample. cDNA gene specific primers, SYBR green master mix was combined, and then run in QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The fold-change of the genes were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method using β -actin as the housekeeping gene. Primers are listed (Table S6). Bacterial qPCR was performed on extracted ribosomal DNA. Primers were designed to specifically amplify the indicated bacteria and normalized to an all bacteria primer control.

Western blotting

Whole-cell lysate preparations were described previously (Anderson et al., 2013). Whole cell lysates were prepared from cell lines by RIPA buffer. Homogenates were incubated in RIPA buffer for 15 min on ice followed by 13,000 rpm centrifugation for 15 min. Supernatants were transferred to a new tube and mixed with 5× Laemmli buffer and boiled for 5 min. Lysates containing 30–40 µg of protein per well were separated by SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes, and immunoblotted overnight at 4°C with indicated antibodies. All the primary antibodies were used at a dilution of 1:1000. HRP-conjugated secondary antibodies used were anti-rabbit and anti-mouse at a dilution of 1:2000 and immunoblots were developed using Chemidoc imaging system (ChemiDoc, BioRad).

Immunostaining

Tissues were fixed with formalin for 24 h, and then placed in ethanol for 24 h. Paraffin embedded tissues were sectioned (6 µm). Antigen retrieval was performed by boiling slides for 10 min in citrate buffer. Sections were blocked in 5% (vol/vol) normal goat serum in TBST for 30 min at room temperature and probed with polyclonal rabbit anti-Ki67 or 4-HNE primary antibody (1:250) overnight at 4°C. The samples were then incubated with rabbit IgG Alexa Fluor 594 for Ki67 (1:500) or HRP coupled secondary for 1 h in dark at room temperature, followed by mounting and counterstaining by Prolong™ Gold Antifade Mountant with DAPI. For Gamma H2AX attaining positive control was treated with 2 Gy radiation for 2 min. Cells were fixed in 10% formaldehyde and permeabilized in 0.01% Triton X-100. Primary antibody was stained overnight, then secondary for one hour in the dark in 0.01% Triton X-100 and 3% BSA. Confocal microscopy was performed.

Metabolite extraction

Metabolites from feces were extracted by 2:1 methanol: chloroform (v/v) in water as described previously (Sridharan et al., 2014). Pre-weighed freshly collected feces were homogenized in 3 mL of dry ice-cold 80% methanol and incubated on dry ice for

10 min followed by centrifugation at 4,000 rpm for 10 min at 4°C. Supernatant was passed through a 70- μ m cell strainer and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. 0.6 mL of ice-cold water was added per 1.5 mL of supernatant, then the sample tube was vortexed vigorously and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min to obtain phase separation. The upper and lower phases were separately collected into fresh sample tubes without disturbing the interface. Samples were dried in a speed vac (Eppendorf Vacufuge) to and were resuspended in DMSO for *in vitro* experiments.

16S rRNA gene sequencing and bacterial community analysis

Bacterial sequencing analysis was done as described previously at the Microbial Systems Molecular Biology Lab, a part of the University of Michigan Host Microbiome Initiative (Ramakrishnan et al., 2019). Briefly, the V4 region of the 16S rRNA was amplified from freshly collected mouse feces or tumor mucosal scrapes using the Dual-indexing sequencing strategy. Sequencing was done on the Illumina MiSeq platform, using a MiSeq reagent kit V2 500 cycles, according to the manufacturer's instructions. Bacterial community analysis was performed using Mothur (v1.42.3) aligning to the full SILVA reference alignment (release 132) provided by Mothur (Schloss et al., 2009). Sample quality was determined by assuring samples contained more aligned reads than the DNA extraction control and that samples clustered within their genotypes via principal component analysis in PC1/PC2.

LDH assay

Cell death was measured using the LDH Cytotoxicity Assay Kit from Takara Bio. 10,000 cells were seeded in a 96 well plate overnight. The next day, cells were treated with the indicated condition. Supernatants were harvested after 24 h of treatment and a media only control and Triton X-100 control were included. The supernatant was incubated with LDH detection reagent for 30 min per the manufacturer's instructions. Absorbance was taken at 490 nm in technical triplicate. Cytotoxicity was calculated using the manufacturer's protocol.

Colony forming assay

Cells were plated in biological triplicates in a 6 well plate at 600 cells per well in 2 mL of media. After 48 h, cells were treated with different reagents as mentioned in the legends. Assays were concluded at 15 days by fixing in cold 10% buffered formalin for 10 min and staining with 0.5% crystal violet, 20% methanol solution for 30 min. Colonies were manually counted via a study blinded observer.

C11-BODIPY lipid ROS measurement

1 million colorectal cancer cells were seeded in a 12 well plate overnight. Cells were then treated with the indicated concentration of Reuterin and incubated for 12 h. Cells were harvested in HBSS, washed, and stained with 5 μ M C11-BODIPY (ThermoFisher) at 37°C for 30 min. Fluorescent intensity was measured on the FITC channel on the Beckman Coulter MoFlo Astrios. A minimum of 20,000 cells were analyzed per condition, data was analyzed using FlowJo software (Tree Star). Values are MFI.

ROS detection assay

Cell permeable free radical sensor carboxy-H2DCFDA (Invitrogen) was used. Cells were treated with indicated reuterin concentration for 24 h, then incubated with 10 μ M carboxy-H2DCFDA in PBS at 37°C for 45 min. Cells were then washed and resuspended in PBS. Mean fluorescent intensity was obtained from the Cytation 5 Imaging Multimode Reader. For *in vivo* ROS assay, epithelial cells were isolated from either induced *TripleMut* mouse colon or from syngeneic tumors using Collagenase IV incubation. Cells were then strained and then stained as above with 10 μ M carboxy-H2DCFDA. Mean fluorescent intensity and percent ROS positive cells was obtained from flow cytometry.

Metabolomics

Cells were plated at 1 million cells per well in 6 well plates. After 24 h, cells were treated with 100 μ M Reuterin for 24 h. Cells were then washed once with ice-cold PBS, then incubated in dry-ice cold 80% methanol on dry ice for 10 min. Cells were scraped and the polar metabolite supernatant was collected on dry ice. Tissues were bead homogenized in the polar metabolite methanol. Samples were clarified via high speed centrifugation. Protein concentration was determined by processing a parallel well and used for normalization. Cell or tissue solutions were lyophilized using a SpeedVac concentrator. Metabolite pellets were resuspended in 50:50 methanol/water mixture for LC-MS analysis. Data were collected using previously published parameters (Bennett et al., 2008; Chae et al., 2015). QQ data were preprocessed with Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis Software (B0700). Additional analyses were post-processed for further quality control. Each metabolite abundance level in each sample was divided by the median of all abundance levels across samples for comparison and statistics. Statistical significance was determined by a one-way ANOVA with a significance threshold of 0.05. Further pathway analysis took place on Metaboanalyst. For microbial metabolites, identification was performed as described in Das, 2019. Briefly, samples were homogenized, centrifuged, and incubated with 50 mM sodium hydroxide and propanol/pyridine. Propylchloroformate was added on ice and derivatized for 30 min. The samples were extracted with hexane twice and stored for GC-MS analysis. For DAP a headspace sampler was utilized, for Reuterin a standard GC/MS sampling. An HP5 ms 5% phenylmethylpolysiloxane capillary GC column (Agilent) was employed with helium as the carrier gas. The initial temperature was 70°C. increased to 230°C. The total run time was 20 min and the mass spectral data ranges were from 30 to 400 m/z. Reuterin was quantified by peak area of extraction m/z 219 as described previously (Talarico and Dobrogosz, 1989). L-glutathione was measured from lyophilized cell pellets. Pellets were resuspended in 50:50 methanol/water mixture for LC-MS analysis. QQ data was preprocessed with Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis Software (B0700).

Histology

Tumor tissues were rolled and fixed in formalin for 24 h, then embedded in paraffin. Sections of 5 μm were stained for H&E and mounted with Permount Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific). For immunohistochemistry, paraffin tissue sections underwent antigen retrieval, blocking in 5% goat serum in PBS, and probed with Ki67 antibody (Cell Signaling, 1:250). Sections were washed 2 times with PBST and incubated with HRP conjugated anti-rabbit IgG (1:500, catalog 7074S, Cell Signaling Technology) for 1 h. Sections were then washed with PBST and incubated with DAB substrate. After the sample turned brown, the reaction was stopped with distilled water and dehydration steps were completed. The slides were mounted with Permount Mounting Medium. Histological scoring of dysplasia was done by a pathologist as previously described (Triner et al., 2018).

Immune cell isolation

Colons were removed, washed thoroughly in PBS, and then incubated with 10 mM EDTA for 45 min. Supernatant was removed, and then cells were isolated with 1 mg/mL collagenase Type IV for 45 min. Immune compartment was obtained through a Percoll gradient, cells were stained using indicated antibody, and then acquired using flow cytometry.

RNA-seq analysis

IEC6 cells were seeded in triplicate overnight, then treated with 100 μM Reuterin for 16 h. RNA was isolated from culture tissue as described above. Quality of fastq files was assessed using FastQC v0.11.8 and MultiQC v1.7 (Ewels et al., 2016). Reads were then aligned to GENCODE's GRCm38.vM24 assembly using STAR v2.6.1a_08-27 (Dobin et al., 2013; Frankish et al., 2018). Aligned reads were counted using featureCounts v1.6.3 (Liao et al., 2014). PCA-based clustering was used to identify outliers and then differential expression was performed using DESeq2 v1.30.1 (Ren and Kuan, 2020). Genes with an adjusted p value < 0.05 were considered differentially expressed. All analysis was carried out on the University of Michigan Great Lakes HPC cluster.

Pathway analysis

Significant metabolites obtained from metabolomic analysis (see above) were converted to HMDB identifiers using MetaboAnalyst v5.0 (Pang et al., 2021). HMDB identifiers were then mapped to known protein interactors using MetaBridge v1.2 via KEGG and MetaCyc (Hinshaw et al., 2018). These protein-metabolite interactions were then overlaid with differentially expressed genes from RNA-sequencing analysis (see above). Metabolites with links to 3 or more differentially expressed genes were plotted in a network using cytoscape v3.8.0 (Shannon et al., 2003).

Syngeneic and xenograft studies

Wild-type or immunocompromised mice of both sexes were inoculated with 2 million MC38, HCT116, or SW480 cells. Cells were implanted into lower flanks, and treatment began at day 10 after visible tumors as described above. Tumor size was measured with digital calipers. At the endpoint, mice were sacrificed and tumors were excised. Tumor volume and weight was measured and tissues were prepared for histology, IHC, and flow cytometry.

Proteomics and cysteine proteomics

Proteomics analysis was performed as described (Kuljanin et al., 2021). Briefly, cells were treated for 24 h, then washed twice with PBS. Cell pellet was homogenized and sonicated, and total protein was determined. Each sample was treated with DBIA for 1 h, and then proteins were precipitated by chloroform/methanol. Protein pellets were solubilized in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropane-sulfonic acid at pH 8.5 and digested using LysC and trypsin overnight. For whole proteome analysis cells were lysed in 8 M urea and 200 mM EPPS at pH 8.5. Samples were homogenized and reduced. Cysteine peptides were enriched using streptavidin beads as described in Kuljanin, 2021. Mass spectrometry data were acquired using an Orbitrap Fusion Lumos mass spectrometer in line with a Proxeon NanoLC-1200 UPLC system. Intelligent data acquisition was performed using orbiter and the Comet search algorithm. Spectral searches were performed eliminating common contaminants. Cysteine modified peptides were filtered for site localization using the AScore algorithm with a cutoff of 13. A total sum signal to noise of all reporter ions of 100 was required. Cysteine engagement was assessed by the blocking of the labeling of the probe. Peptides showing a 95% reduction were assigned a maximum ratio of 20. Multiple cysteines with confident localization scores were separated. Competition ratios were found by dividing the control channel by the electrophile channel. Replicate measurements were averaged.

Puromycin assay

Cells were treated for 24 h with reuterin, then incubated with 1 mg/ml puromycin for 10 min. Lysates were flash frozen then western blot was performed for puromycin antibody. Small pieces of tumor or colon were homogenized thoroughly for the *in vivo* assay, then incubated with 1 mg/mL puromycin for 30 min. Lysates were then generated using bead homogenization before western blotting for anti-puromycin.

Epithelial cell isolation

Colons were removed and washed into PBS. Colon was incubated at 150 RPM for 30 min in 25 mL of 10 mM EDTA in RPMI. Colons were vortexed twice, and the liquid collected. RPMI was added, tissues were vortexed and liquid collected, repeated twice. Cells were counted, plated, and imaged on the Cyation 5 Imaging MultiMode Reader at 0 and 12 h.

Dose response matrices

Cells were plated in triplicate for each indicated dose. The average percent inhibition was calculated, and then the coefficient of drug interaction (CDI) was calculated from the matrix by dividing the 2-drug combination inhibition by the two single drug concentrations multiplied together. $CDI < 1$ indicates synergism, $CDI = 1$ indicates additivity and $CDI > 1$ indicates antagonism.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

In vitro experiments were validated in 4 cell lines. Each cell line experiment was performed in technical replicates for each condition and repeated at least three times with biological triplicates to ensure reproducibility. Figures show a representative biological replicate unless otherwise indicated. Blinding was performed whenever appropriate. Sample description and identification was unavailable to the core personnel during data collection and analysis. Statistical details of all experiments can be found in the figure legends. The sample numbers are mentioned in each figure legend and denote biological replicates. Statistical details are reported in figure legends. Results are expressed as the mean plus or minus the standard error of the mean for all figures unless otherwise noted. Significance between 2 groups was tested using a 2 tailed unpaired t test. Significance among multiple groups was tested using a one-way ANOVA. GraphPad Prism 7.0 was used for the statistical analysis. Statistical significance is described in the figure legends as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Cancer Cell, Volume 40

Supplemental information

**Reuterin in the healthy gut microbiome
suppresses colorectal cancer growth
through altering redox balance**

Hannah N. Bell, Ryan J. Rebernick, Joshua Goyert, Rashi Singhal, Miljan Kuljanin, Samuel A. Kerk, Wesley Huang, Nupur K. Das, Anthony Andren, Sumeet Solanki, Shannon L. Miller, Peter K. Todd, Eric R. Fearon, Costas A. Lyssiotis, Steven P. Gygi, Joseph D. Mancias, and Yatrik M. Shah

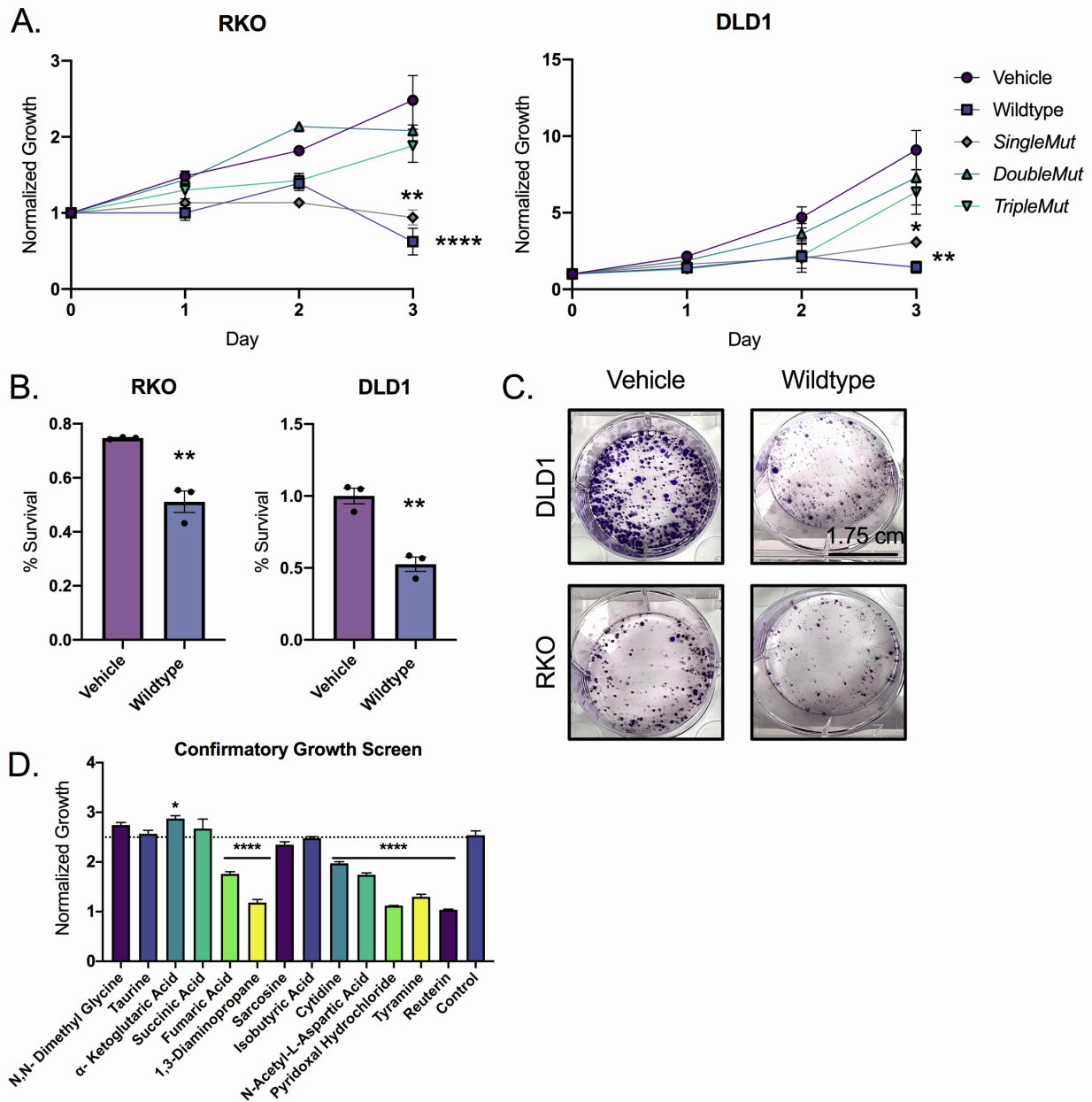


Figure S1: Wild-type fecal metabolites suppress colorectal cancer, related to Figure 1. A) Dried metabolite pellets were resuspended in DMSO by weight and treated at 100X concentration. **B)** LDH assay of cells treated with 100X fecal metabolites. **C)** Colony forming assay of cells treated with 100X wildtype fecal metabolites for 14 days. **D)** Confirmatory growth screen of cells treated with indicated compound at a 500 μ M concentration for 72 hours. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels A and D) or t-test (panel B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ unless otherwise indicated. Data is presented as mean \pm the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicates at least three times.

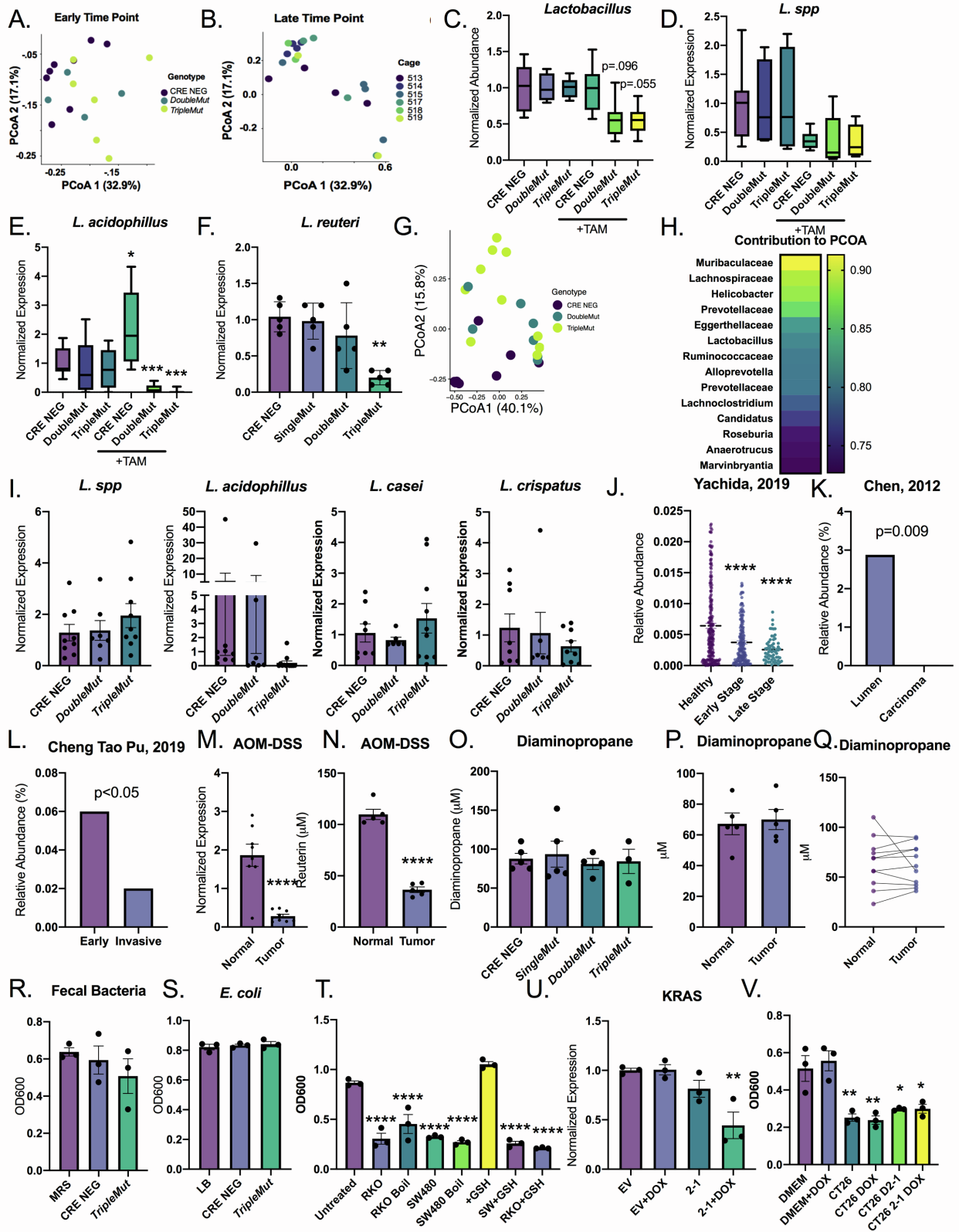


Figure S2: *Lactobacillus reuteri* is specifically downregulated in mouse and human colorectal cancer tumors, related to Figure 2. A) PCoA plot of mice before induction with tamoxifen (N=6-8). B) PCoA of mice cage number 14 days after tamoxifen induction. C) *Lactobacillus* quantification in fecal 16S. Significance is one-way ANOVA. D) qPCR of *L. spp* from fecal 16s DNA. E) qPCR of *L. acidophilus* from fecal 16s DNA. F) Quantification of *L. reuteri* in separate cohort of tumor tissue of indicated mouse model. G) PCoA plot of tumor tissue 16S sequencing. N=(6-8). H) Length of the vector contribution to the PCoA plot by the indicated species. I) Quantification of *Lactobacillus* species by qPCR of 16S tumor tissue DNA. J) Relative abundance of *Lactobacillus* from indicated review of early and late stage tumors. K) Quantification of 16S *Lactobacillus* in the lumen and tumor tissue from indicated paper. L) Quantification of 16S *Lactobacillus* in early and invasive tumors from indicated paper. M)) *L. Reuteri* quantification by qPCR in AOM-DSS mice. N) Reuterin quantification from in AOM-DSS tumors. O) Diaminopropane quantification from tumors in a genetic mouse model. P) Diaminopropane quantification from tumors in an AOM-DSS mouse model. Q) Diaminopropane quantification from paired human normal and tumor tissue. R) Fecal bacterial slurries incubated with indicated fecal extracts. S) *E. coli* incubated with indicated fecal extracts. T) Conditioned media was prepared for 48 hours, then supplemented with 20% MRS broth. Conditioned media was boiled for 10 minutes before MRS addition. 10 mM glutathione methyl ester was added to conditioned media before *L. reuteri* incubation. U) qPCR for KRAS of dox-inducible KRAS knockdown cells V) Conditioned media from Dox inducible KRAS shRNA knockdown cells.. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels C, D, E, F, I, J, O, R, S, T, U and V) or t-test (panels K, L, M, N, P and Q). *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 unless otherwise indicated. Data is presented as mean +/- the standard error of the mean. 16S experiments were performed a single time with the designated n number, the rest of the experiments were performed at least three times in triplicate.

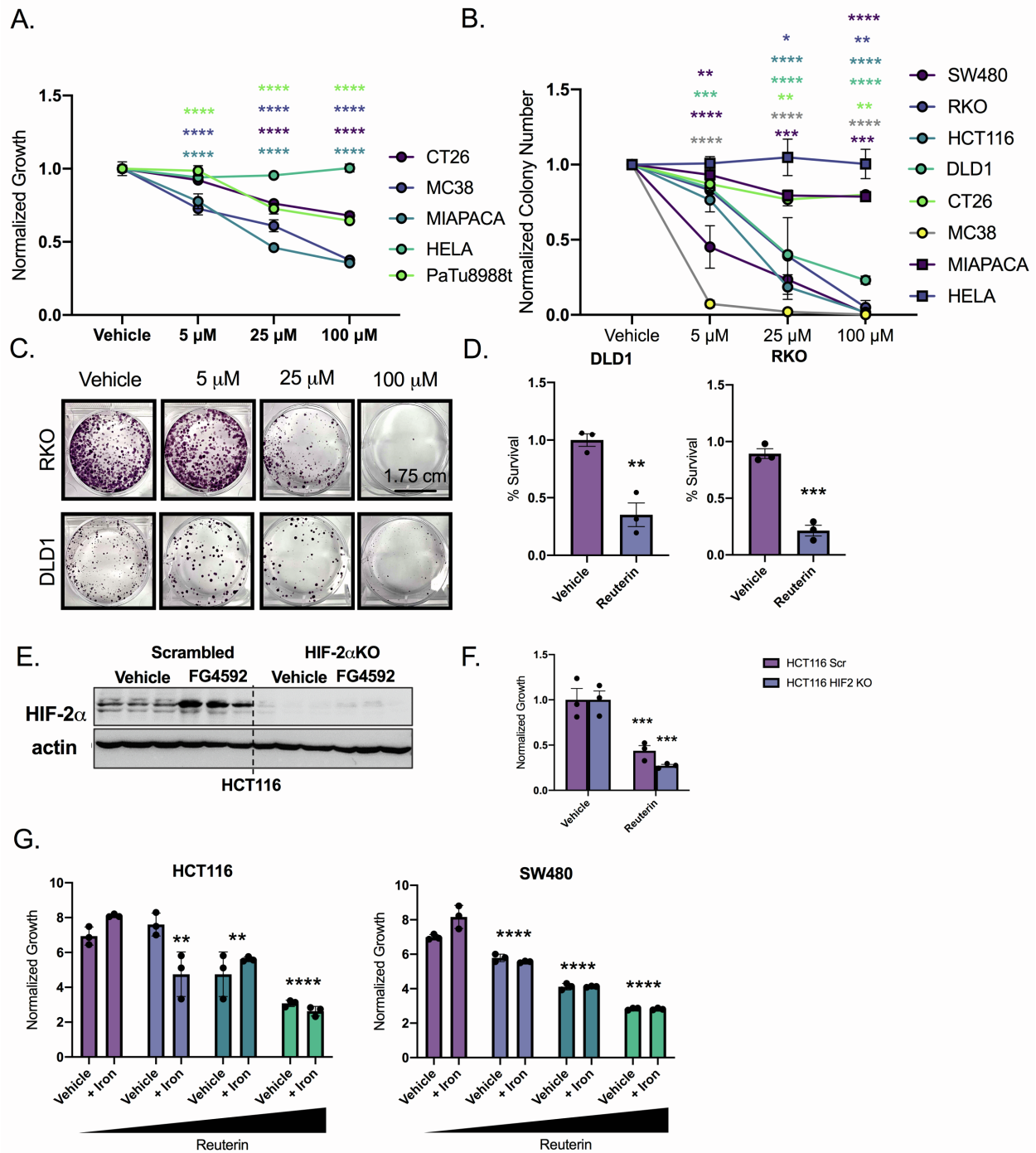


Figure S3: Reuterin growth inhibition is independent of HIF2 α or iron, related to Figure 3.

A) Dose curve of a panel of cell lines treated with reuterin for 72 hours. B) Quantitation of colony forming assays following reuterin treatment. C) Representative colony forming assay image of reuterin treated cells at 14 days. D) LDH assay of cells treated with 100 μ M Reuterin for 24 hours. E) Western blot of HIF2 α knockout HCT116 cells with and without FG4592. F) Growth assay of scrambled and HIF2 α knockout cells treated with 100 μ M Reuterin for 72 hours. G) Growth assay following treatment with increasing concentrations of reuterin (5-100 μ M) and

100 μ M Ferric Ammonium Citrate (+Iron) for 3 days. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels A, B, and G) or t-test (panels D and F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ unless otherwise indicated. Data is presented as mean \pm the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicates at least three times.

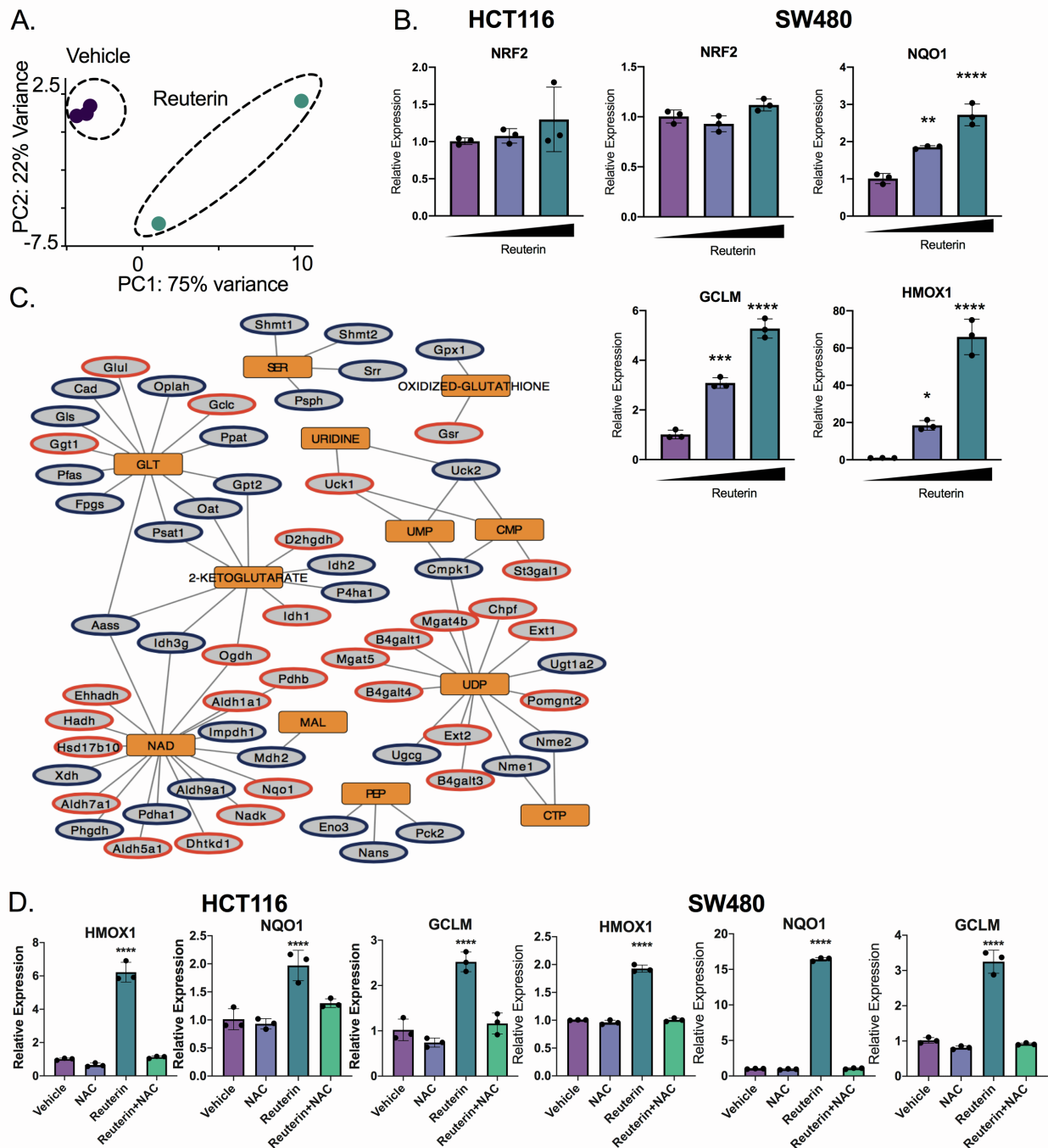


Figure S4: Reuterin potently induces oxidative stress genes, related to Figure 4. A) PCA of Reuterin treated IEC6 cells from RNA-SEQ. B) RT-PCR of Nrf2 target genes after vehicle control, 25 μ m and 100 μ m Reuterin treatment for 24 hours. C) Network of metabolites and connected transcripts that are altered in RNA-SEQ. Blue circle is downregulated and red circle is upregulated. D) Cells were pretreated with N-acetyl cysteine 10mM for 24 hours, then treated with 50 μ m Reuterin for 3 days. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels B and D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ unless otherwise indicated. Data is presented as mean \pm the standard error of the mean. RNA-SEQ was performed in triplicate one time, all other experiments were performed in triplicates at least three times.

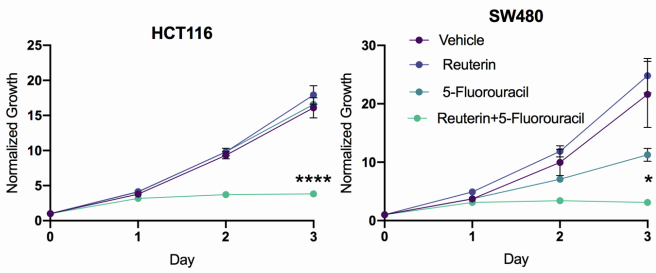
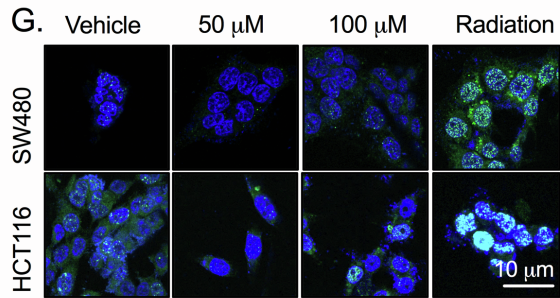
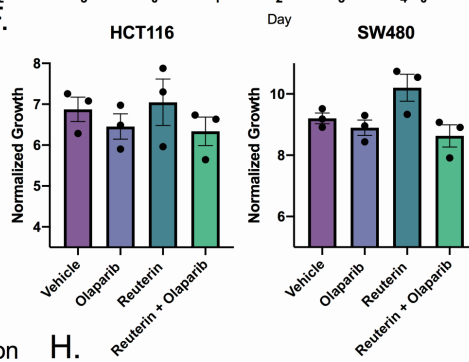
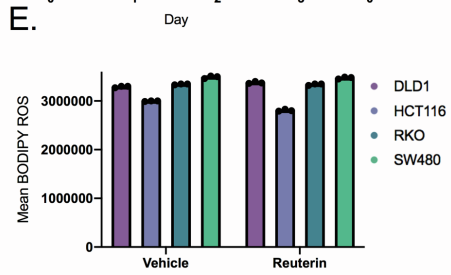
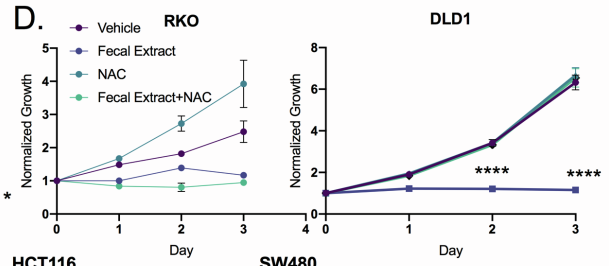
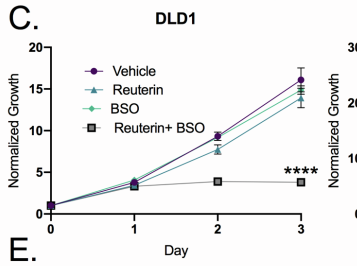
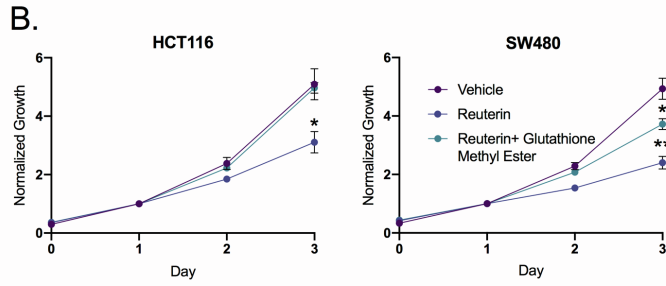
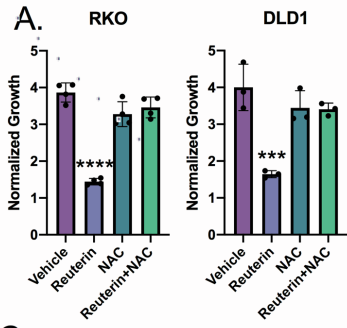


Figure S5: Reuterin does not oxidize lipids or DNA, related to Figure 5. A) Cells were pretreated with NAC for 24 hours, then treated with Reuterin for 72 hours, then analyzed by Cytation imaging software. B) Cells were pretreated with 10 mM Glutathione Methyl Ester for 12 hours, then treated with 50 μ m Reuterin. C) Cells were cotreated with 10 μ m Reuterin and 100 μ m BSO. D) Cells were pretreated with 10mM NAC for 12 hours then treated with 100X Wildtype fecal extract. E) Cells were treated with 100 μ m Reuterin for 12 hours, then stained with BODIPY dye and assayed by flow cytometry F) Cells were treated with 10 μ m Reuterin and 1 μ m Olaparib and growth was assayed by Cytation at 3 days. G) Cells were treated for 24 hours with 100 μ m Reuterin or 2 Gy of radiation and imaged for gamma-H2ax foci. H) Cells were treated with 10 μ m 5-Fluorouracil and 10 μ m Reuterin. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels A, B, C, D, E,F, and H). *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 unless otherwise indicated. Data is presented as mean +/- the standard error of the mean. All experiments were performed in triplicates at least three times.

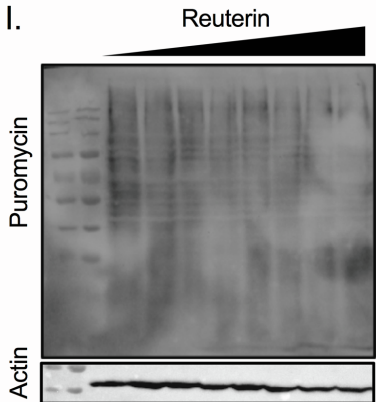
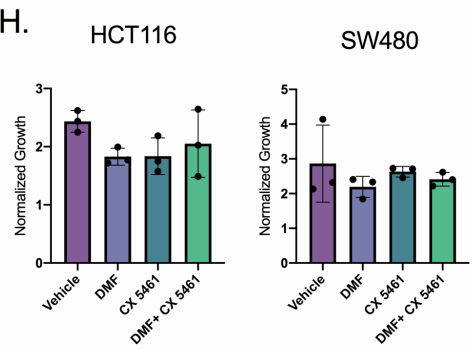
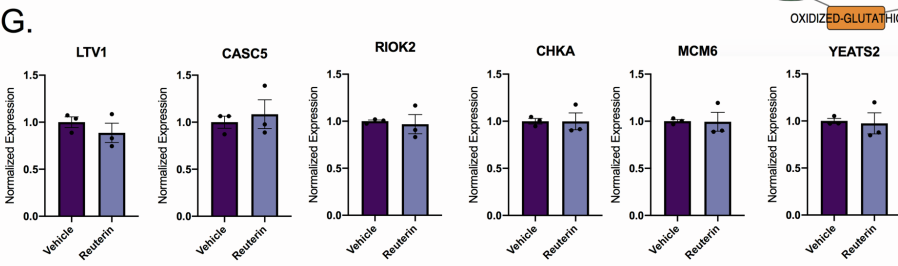
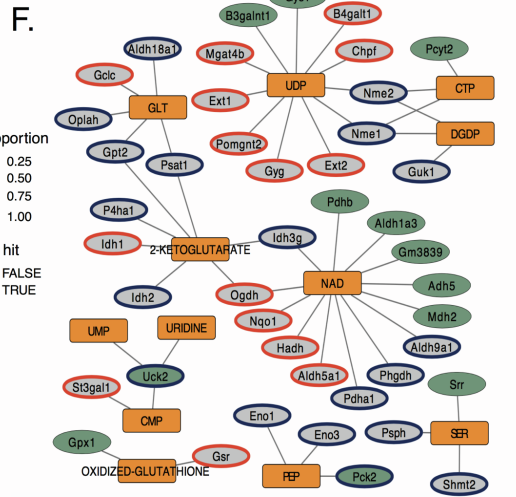
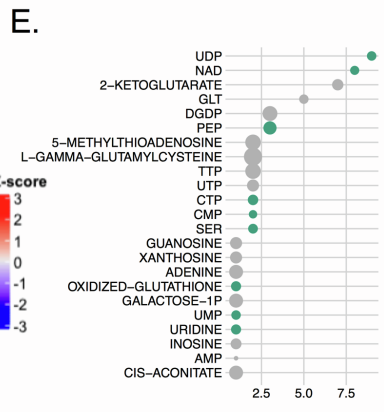
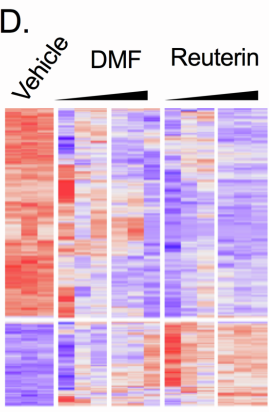
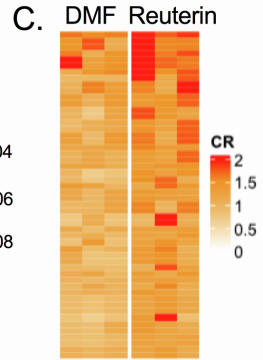
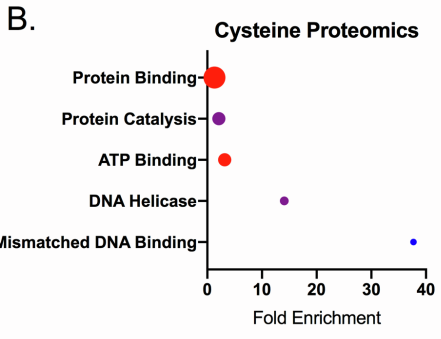
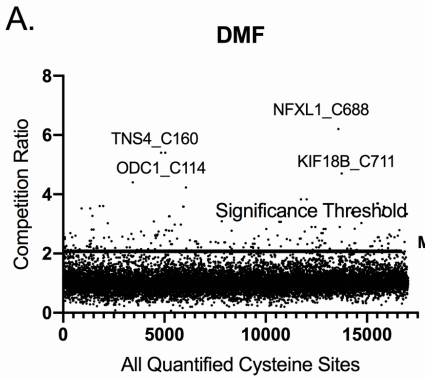


Figure S6: DMF and Reuterin have distinct mechanisms of growth inhibition, related to Figure 6. A) Competition ratio of average of three separate samples for cysteine sites bound by dimethylfumarate (DMF). B) KEGG pathway analysis of proteins significantly bound by reuterin. C) Comparison of top cysteine proteomics sites between DMF and reuterin. D) Heat map of proteomics data in DMF and Reuterin treated cells. E) Number of genes in pathways effecting listed metabolite that are differentially expressed in the RNA-SEQ data set. Size of the dot indicates the proportion of linked genes, while green indicates that the gene set contains significant hits from cysteine proteomics. F) Network of metabolites and associated genes. Blue is significantly upregulated and red is significantly downregulated in our RNA-SEQ dataset. Green indicates genes that are significant cysteine proteomics hits. G) QPCR of DEPMAP significant genes in HCT116 cells after 24 hours of treatment with 100 μm reuterin. H) Quantitation of growth on cytation of cells treated with 100 μm dimethylfumarate and 2 μm CX-5461. I) Puromycin assay as described in 6I in SW480 cells. Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels H) or t-test (panel G). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ unless otherwise indicated. Data is presented as mean +/- the standard error of the mean. Cysteine proteomics experiments were performed in triplicate two times. All other experiments were performed in triplicate at least three times.

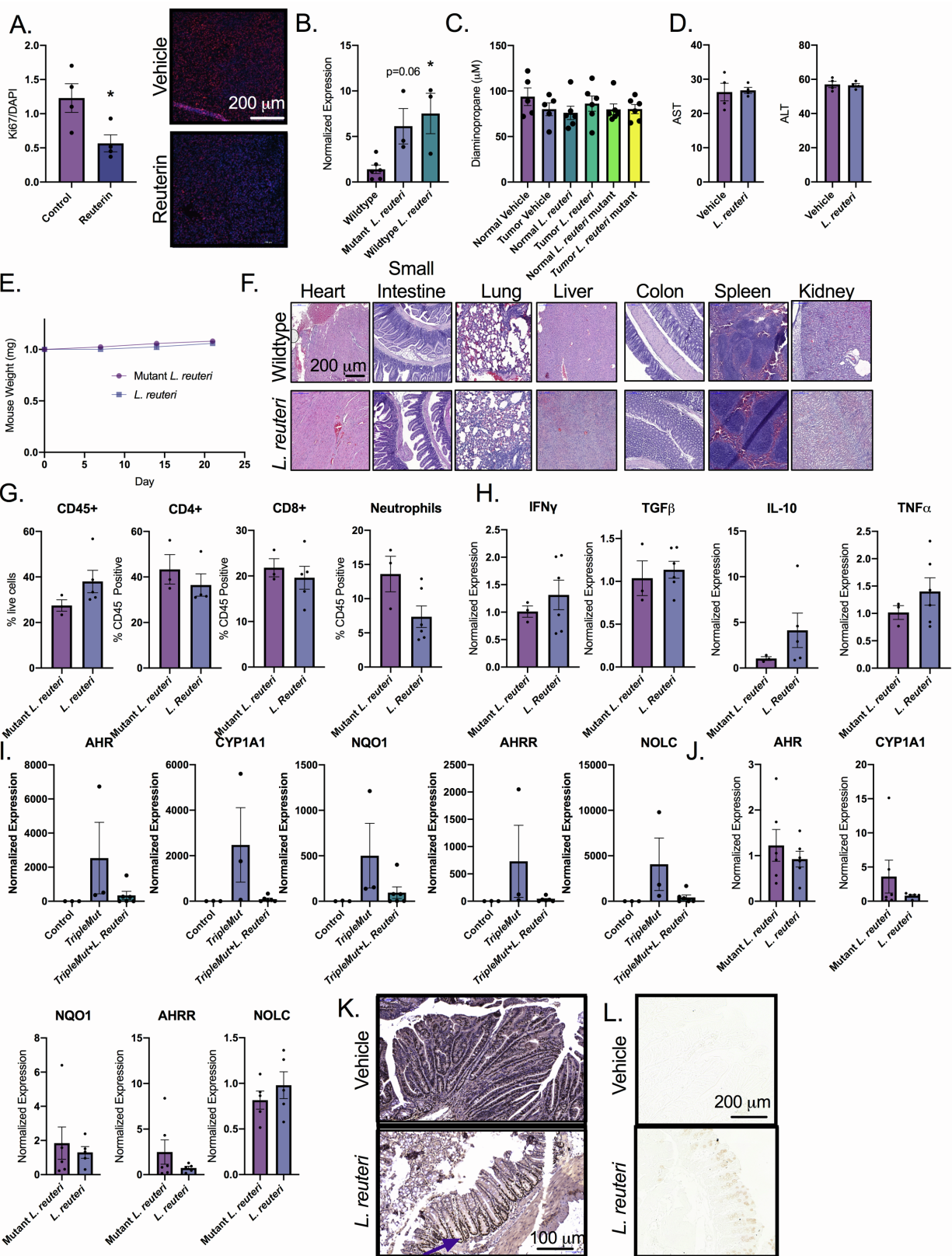


Figure S7: Reuterin reduces proliferation and dysplasia *in vivo*, related to Figure 7. A) Representative Ki67 image and quantification of MC38 reuterin treated syngeneic tumors. (N=3-4). B) qPCR of colons of wildtype mice treated with either mutant or wildtype *L. reuteri* for 7 days. Statistics are one-way ANOVA. C) Quantification of Diaminopropane by mass spectrometry in whole colon from indicated treatment group. D) AST and ALT of wildtype mice treated with *L. reuteri* for 14 days. E) Weight record of mice treated with daily gavage of either wildtype or mutant *L. reuteri*. (N=8) F) Representative H and E of major organs of mice treated with *L. reuteri* for 14 days. (N=6). G) Immune cell flow of induced *TripleMut* mice treated with either mutant or wildtype *L. reuteri* until endpoint. H) qPCR for inflammatory cytokines of the colons of *TripleMut* mice treated with either mutant or wildtype *L. reuteri* until endpoint. I) qPCR of AHR target genes on *TripleMut* mice treated with either mutant or wildtype *L. reuteri* J) qPCR of AHR target genes in MC38 syngeneic tumors gavaged daily with either mutant or wildtype *L. reuteri* daily until end point. K) Representative image of Ki67 staining of PBS treated or *L. reuteri* treated *TripleMut* mice. (N=9). L) Representative image of caspase 3 staining of PBS treated or *L. reuteri* treated *TripleMut* mice. (N=9). Statistics were calculated with one-way ANOVA (Panels B, C, and I) or t-test (panels A, D, G, H, and J). *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 unless otherwise indicated. Data is presented as mean +/- the standard error of the mean. All experiments were performed a single time with the indicated n number.