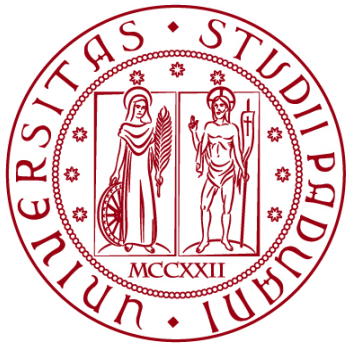
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Il cross-talk tra il microbiota intestinale e le MDSCs alimenta lo sviluppo del cancro associato alla colite

Tutor: Prof.ssa Gaia Codolo
Dipartimento di Biologia

Laureando: Alfonso Penna

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

INDICE

ABSTRACT

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

1.1 Il cancro associato alla colite (CAC) e le malattie infiammatorie intestinali (IBD).....1

1.2 Il microbiota intestinale: ruolo nella patogenesi del CAC e concetto di disbiosi.....2

1.3 Le cellule mieloidi soppressive (MDSCs).....3

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: ***Materiali e metodi*****.....5**

2.1 Modelli murini.....5

2.2 Induzione del CAC.....5

2.3 Citometria a flusso.....5

2.4 Isolamento e purificazione delle P-MDSCs e delle M-MDSCs.....6

2.5 Saggio ex vivo sulla down-regolazione del CD247.....6

2.6 Saggio ex vivo sull'inibizione della proliferazione dei Linfociti T.....6

2.7 Prelievo tissutale e generazione di sospensioni monocellulari.....7

2.8 Analisi della sequenza del gene 16S rRNA.....7

2.9 Trapianto di microbiota fecale (FMT) e raccolta dei campioni.....8

2.10 Isolamento dei batteri da campioni fecali.....8

2.11 Co-coltura delle MDSCs con i batteri..... 9

2.12 Analisi con ImageStream.....9

2.13 Rilevamento della produzione di ROS nelle PMN-MDSCs.....9

2.14 Rilevamento del NO e attività dell'arginasi.....10

2.15 Saggio di differenziamento delle MDSC.....10

3. RISULTATI: ***Analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale*****.....11**

3.1 L'infiammazione intestinale e periferica in topi affetti da CAC è associata ad un aumento dei livelli di MDSC e immunosoppressione.....11

3.2 Topi affetti da CAC mostrano alterazioni nella diversità e nella composizione del microbiota.....13

3.3 FMT da topi affetti da CAC favorisce lo sviluppo tumorale.....14

3.4 La deplezione del microbiota riduce l'infiammazione periferica e del colon, con una conseguente bassa incidenza tumorale.....15

3.5 Il trattamento antibiotico dei topi affetti da CAC risulta in ridotti livelli di MDSC e delle loro funzioni soppressorie nel colon e in periferia....15

3.6 Il cross-talk tra le MDSCs e il microbiota associato al CAC ne incrementa le caratteristiche e le funzioni soppressive.....17

3.7 Discussione e conclusioni.....19

BIBLIOGRAFIA E APPENDICE..... 21

ABSTRACT

L'infiammazione cronica intestinale è strettamente correlata alla disbiosi del microbiota intestinale e all'accumulo di cellule mieloidi soppressive (MDSC), due fattori che favoriscono lo sviluppo del cancro colorettale associato alla colite (CAC). Questo studio, condotto su un modello murino di CAC, ha rivelato un'interazione diretta tra i batteri intestinali alterati e le MDSC, meccanismo alla base della tumorigenesi. I batteri disbiotici modulano profondamente le MDSC, amplificandone le capacità immunosoppressive e bloccandone la differenziazione in cellule mieloidi mature, favorendo uno stato infiammatorio persistente. L'uso di antibiotici ha ridotto questo cross-talk, attenuando l'infiammazione intestinale, la carica tumorale e l'attività immunosoppressiva delle MDSC. In aggiunta, la composizione microbica iniziale si è dimostrata predittiva per la futura insorgenza tumorale, aprendo nuove prospettive per l'uso del microbiota come biomarcatore tumorale precoce. Questo articolo evidenzia un'interazione patogenica tra il sistema immunitario e il microbiota disbiotico intestinale, suggerendo nuove strategie terapeutiche per contrastare il CAC.

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

1.1 Il cancro associato alla colite (CAC) e le malattie infiammatorie intestinali (IBD)

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) sono un gruppo eterogeneo di disturbi caratterizzati da infiammazione cronica a livello dell'intestino. I due tipi principali di IBD sono il morbo di Crohn, che può colpire l'intero spessore della parete del tratto gastrointestinale, e la colite ulcerosa, limitata invece alla mucosa del colon [1]. Le cause che si celano dietro l'insorgenza di questi disturbi sono poco conosciute; tuttavia, si pensa che siano molteplici i fattori responsabili delle infiammazioni persistenti: principalmente esse sono il risultato di difetti nella regolazione delle risposte immunitarie nei confronti degli organismi commensali dell'intestino, in concomitanza con predisposizioni genetiche dell'individuo [1]. Occasionalmente, difetti nella barriera intestinale possono favorire il passaggio di componenti batteriche dal lume intestinale alla lamina propria, dove inducono risposte infiammatorie responsabili della creazione di un ambiente favorevole allo sviluppo del cancro. Il cancro del colon-retto (CRC) 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, di conseguenza è caratterizzato da una rapida proliferazione cellulare e da una condizione di ipossia, condizione fondamentale per lo sviluppo della patologia. Il cancro associato alla colite (CAC) è un tipo particolare di CRC che insorge in presenza di infiammazione cronica intestinale (colite ulcerosa). A differenza del CRC, che è tendenzialmente sporadico e limitato all'epitelio intestinale, il CAC presenta uno sviluppo più imprevedibile e un'insorgenza multifocale [2]. L'infiammazione promuove il CAC inducendo alterazioni genetiche e molecolari trasmissibili alla progenie delle cellule epiteliali intestinali, sia direttamente mediante stress ossidativo e danni al DNA, e sia indirettamente attraverso la produzione e il rilascio di citochine. I meccanismi genetici alla base della tumorigenesi del CAC sono simili a quelli relativi al CRC, e includono l'instabilità cromosomica, l'aneuploidia, l'instabilità dei microsatelliti e le mutazioni di geni oncosoppressori; queste alterazioni sono principalmente causate da radicali liberi (ROS e RNS) in grado di indurre mutazioni a livello del DNA. Inoltre, l'infiammazione favorisce lo sviluppo tumorale anche inducendo disbiosi intestinale e promuovendo modificazioni epigenetiche per alterazioni dell'attività di enzimi che risentono dello stress ossidativo [2]. A sua volta, il tumore può condizionare la risposta immunitaria influenzando l'attività leucocitaria (ad esempio la stimolazione del differenziamento dei linfociti T CD4 verso il fenotipo TH2 antinfiammatorio, e molti altri), alimentando una spirale di deterioramento progressivo [1]. Le nuove strategie terapeutiche dovrebbero puntare all'interferenza dell'oncogenesi agendo sulla riduzione dell'infiammazione, oltre che sui meccanismi direttamente coinvolti nella tumorigenesi.

1.2 Il microbiota intestinale: ruolo nella patogenesi del CAC e concetto di disbiosi

Il termine microbiota fa riferimento ai miliardi di microorganismi, tra cui batteri, virus, funghi e protozoi, che normalmente risiedono in vari distretti corporei; invece, il termine microbioma fa riferimento all'insieme del patrimonio genetico di questi microorganismi. La composizione del microbiota varia da distretto a distretto, e dipende da numerosi fattori come fattori prenatali (microbi presenti nella placenta, nel sangue del cordone ombelicale, ecc.), tipo di parto (naturale o cesareo), età, dieta, uso di antibiotici e molti altri [3]. Il microbiota intestinale racchiude tutti i batteri che risiedono nel tratto gastro-intestinale (GI). Esso è composto principalmente da due gruppi di batteri che differiscono per la relazione biologica che instaurano con l'organismo ospite: i batteri simbiontici vivono in simbiosi mutualistica con l'ospite (quindi entrambi traggono beneficio dalla relazione), invece i batteri commensali instaurano una relazione di commensalismo che prevede vantaggi per i batteri senza danneggiare o favorire l'ospite [3]. L'uomo e il relativo microbiota intestinale hanno sviluppato meccanismi evolutivi comuni tesi al reciproco beneficio. In particolare, i microrganismi intestinali sono coinvolti in numerosi processi che influenzano e beneficiano la salute dell'uomo [1,3]. Primo fra tutti, il microbiota contribuisce alla formazione della barriera intestinale, collaborando alla protezione dai microrganismi patogeni, mediante competizione con essi e stimolazione del sistema immunitario. Inoltre, il microbiota residente nel cieco e nel colon umano è in grado di produrre enzimi attivi, i quali fermentano carboidrati non digeribili come gli xilani e l'inulina, generando acidi grassi a catena corta (SCFA). Molti batteri sono anche in grado di sintetizzare e rilasciare neurotrasmettitori e neuropeptidi.

L'intestino umano ospita approssimativamente più di cinquanta phyla batterici, di cui i quattro predominanti risultano essere Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria [3]. Tuttavia, la composizione del microbiota è dinamica e con il tempo può subire delle alterazioni: si parla di disbiosi come l'aumento della popolazione di batteri intestinali con caratteristiche patogene, che occasionalmente possono essere causa di malattie. La variazione della composizione del microbiota può essere in grado di alterare l'equilibrio tra la risposta immunitaria pro-infiammatoria e quella antiinfiammatoria, favorendo la creazione del microambiente tumorale necessario allo sviluppo, crescita, invasione e protezione dei tumori [1,3]. In particolare, l'ambiente infiammatorio cronico favorisce la sostituzione dei batteri commensali benefici con batteri pro-infiammatori e potenzialmente patogeni, determinando una disbiosi intestinale. I batteri disbiotici possono contribuire alla carcinogenesi del CAC sia modulando le risposte immunitarie sia mediante il rilascio di metaboliti tossici. Un esempio significativo riguarda l'arricchimento di batteri Gram-negativi, condizione frequentemente associata al CAC. Tra questi, spicca *Fusobacterium nucleatum*, un microrganismo che contribuisce alla progressione tumorale danneggiando la barriera intestinale, in quanto induce una down-

regolazione delle molecole di adesione nelle cellule epiteliali intestinali, compromettendo l'integrità della mucosa e facilitando la penetrazione di agenti patogeni e sostanze pro-infiammatorie [4].

1.3 Le cellule mieloidi soppressive (MDSCs)

Le cellule mieloidi soppressive sono un gruppo eterogeneo di cellule appartenenti alla linea mieloide derivate dagli stessi precursori che danno origine a neutrofili e monociti, che presentano tuttavia proprietà antinfiammatorie e immunosoppressive. Esse sono quindi neutrofili o monociti immaturi, diversi da quelli fisiologici, in quanto dotati di una potente attività immunosoppressoria, con conseguente ruolo patologico [2,5]. Le MDSC si dividono in due gruppi principali a seconda della sottopopolazione cellulare d'origine: le MDSC polimorfonucleate/ granulocitiche (PMN-MDSC), originate dalla linea mieloide dei neutrofili, e le MDSC monocitiche (M-MDSC), originate dalla linea mieloide dei monociti. In particolare, i leucociti hanno origine nel midollo osseo (BM) a partire dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC) in un processo detto ematopoiesi. A partire da queste cellule staminali multipotenti, si originano due tipi diversi di precursori immaturi: uno costituisce il progenitore della linea mieloide, mentre l'altro della linea linfoide, e a loro volta, sulla base di diversi fattori di crescita presenti, questi ultimi daranno origine a sottopopolazioni di precursori immaturi ancora più specifici per i diversi tipi cellulari [1]. La proliferazione e la maturazione dei precursori sono mediate dall'azione di citochine proinfiammatorie (ad esempio IL-6 e IL-1β) e citochine particolari dette ''fattori di stimolazione della formazione delle colonie'' (CSF), prodotte dalle cellule stromali del midollo osseo, dai macrofagi o da linfociti T attivati; tra questi fattori ricordiamo il GM-CSF per il differenziamento verso granulociti e macrofagi, e l'M-CSF verso i monociti e macrofagi [1]. In condizioni fisiologiche, in seguito a infezioni o danno tissutale captati da numerose vie recettoriali del sistema immunitario, avviene la stimolazione emopoietica appena descritta, il normale e completo differenziamento dei progenitori in neutrofili e monociti, e il loro pronto reclutamento nella zona interessata per dar luogo a numerose risposte atte a proteggere l'individuo. Anche le MDSC originano dagli stessi precursori per la linea mieloide e il loro sviluppo è supportato dagli stessi fattori di crescita appena descritti, tuttavia ciò avviene in presenza di una prolungata stimolazione ematopoietica legata ad una continua presenza di fattori di crescita e citochine in condizioni patologiche come tumori, infiammazioni croniche o malattie autoimmuni. Le cellule mieloidi prodotte in queste condizioni non riescono a differenziare efficacemente in cellule mature, infatti mostrano ridotta fagocitosi, eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e produzione di citochine antinfiammatorie piuttosto che proinfiammatorie, questo spiega l'attività patologica e immunosoppressiva delle MDSC [5]. In generale, il differenziamento di queste cellule procede attraverso due fasi parzialmente sovrapposte: una prima fase prevede l'espansione delle cellule mieloidi immature, e la seconda fase prevede la loro attivazione patologica.

Ognuna delle due fasi richiede sia segnali specifici che comuni alle due, e comporta l'attivazione di specifici fattori trascrizionali che promuovono l'acquisizione del fenotipo patologico delle MDSC. Tra questi troviamo il fattore di trascrizione STAT3, che in assenza di stimoli cellulari risiede inattivo nel citoplasma, mentre la stimolazione della cellula da vari fattori, (come l'IL-6, GM-CSF e M-CSF), porta alla fosforilazione e conseguente migrazione nel nucleo di STAT3, il quale regola a sua volta la trascrizione di numerosi geni correlati alle attività immunosoppressive, (ad esempio l'espressione della NADPH ossidasi NOX2 che porta alla produzione di ROS responsabile dell'immunosoppressione mediata dalle MDSC) [5].
Oltre alla peculiare capacità immunosoppressiva, le MDSC differiscono da monociti e macrofagi anche per un metabolismo alterato: specialmente in condizioni patologiche, le MDSC percepiscono il microambiente tumorale e rispondono selezionando le vie metaboliche più efficienti per sostenere le loro funzioni soppressive e pro-tumorali [5]. In particolare, il loro metabolismo prevede un maggiore uptake di lipidi, incrementata glicolisi, via del pentoso fosfato e ciclo di Krebs durante il loro differenziamento e maturazione [5]. Le MDSC promuovono lo sviluppo e la progressione tumorale principalmente attraverso la soppressione delle risposte immunitarie. In particolare, la privazione di metaboliti essenziali dal microambiente è uno dei meccanismi utilizzati dalle MDSC per espletare le funzioni immunosoppressive nei confronti delle cellule T. La riduzione dell'arginina, (amminoacido essenziale oltre che per il ciclo cellulare, anche per il corretto funzionamento del CD3ζ, un peptide del complesso CD3 dei linfociti T), viene realizzata attraverso un'upregolazione dell'enzima arginasi 1, che converte l'arginina in urea e ornitina, e mediante un aumento dell'attività dell'enzima ossido nitrico sintasi 2 (NOS2), che porta alla produzione di ossido nitrico (NO) a partire dall'arginina e NADPH. Nel caso dei linfociti T CD8, garanti dell'immunità tumorale, la nitrazione dei residui di tirosina del complesso recettoriale TCR-CD8 ne compromette la flessibilità conformazionale. In questo modo, il complesso danneggiato non è più in grado di interagire con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I) caricato con l'antigene, determinando così una mancata risposta delle cellule T $CD8^+$ alla stimolazione antigenica tumorale. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato come le MDSC rilascino proteine pro-metastatiche, come Bv8, MMP9 e TGF-β, le quali favoriscono la formazione di una nicchia pre-metastatica (PMN) aumentando la permeabilità vascolare e la degradazione delle proteine delle giunzioni strette [6]. Ad oggi, in topo, non sono ancora stati identificati dei marker cellulari di superficie che permettano di identificare univocamente le MDSC. Di conseguenza per la loro identificazione si usano gli stessi marker utilizzati per i monociti (quindi per le M-MDSC), che sono presenza dell'integrina CD11b, assenza della proteina Ly6G ed elevati livelli della proteina Ly6C ($CD11b^+$ $Ly6G^-$ $Ly6C^{hi}$), e per i neutrofili (quindi per le PMN-MDSC), che invece risultano essere $CD11b^+$, $LY6G^+$ e $Ly6C^{low}$. Successivamente, le MDSC si possono distinguere dagli altri leucociti saggiando la loro attività immunosoppressiva [5].

2 APPROCCIO SPERIMENTALE: *Materiali e metodi*

2.1 Modelli murini

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su un modello murino di femmine della linea C57BL/6J all'età di 8-10 settimane. I topi sono stati allevati in un ambiente privo di patogeni, e mantenuti con un ciclo di 12 ore luce/buio, con cibo e acqua a volontà. Tutti i topi sono stati nutriti con la dieta Teklad Rodent Diet, e acclimatati per 14 giorni prima dell'induzione del CAC. Solo per l'esperimento di trapianto di microbiota fecale (FMT), sono stati usati topi germ-free (GF) del ceppo Swiss Webster, sottoposti alle stesse condizioni dei precedenti. I topi di controllo non hanno ricevuto alcun trattamento e sono stati mantenuti nelle stesse condizioni degli altri.

2.2 Induzione del CAC

Inizialmente ad ogni topo sono stati somministrati per via intraperitoneale 10 μg di Azossimetano (AOM), agente cancerogeno e mutageno. Sette giorni dopo, i topi hanno ricevuto per 5 giorni una soluzione al 2% di destrano sodio solfato (DSS) disciolto in acqua autoclavata, seguiti da 16 giorni di sola acqua autoclavata. Il DSS è una sostanza altamente tossica per le cellule epiteliali dell'intestino. Danneggiando quindi la barriera intestinale, esso favorisce la penetrazione dei batteri nella parete del colon, scatenando una forte infiammazione. Il ciclo di DSS è stato ripetuto per tre volte. Due o tre settimane dopo l'ultimo ciclo, i topi sono stati sacrificati e vari tessuti (colon, sangue, milza e midollo osseo) sono stati prelevati e analizzati. Quando richiesto, ai topi è stato somministrato un cocktail di tre antibiotici dissolti in acqua autoclavata, dopo l'ultimo ciclo di DSS. I tre antibiotici sono: 0.5 g/L di Imipenem, 1 g/L di Metronidazolo e 0.5 g/L di Vanomicina. Il cocktail è stato cambiato ogni tre giorni, e la somministrazione è terminata con la fine dell'esperimento. Per i vari scopi, sono stati raccolti campioni fecali a diversi timepoints.

2.3 Citometria a flusso

Il citometro a flusso è un particolare strumento in grado di rilevare la fluorescenza emessa da una singola cellula in sospensione. Marcando le cellule con anticorpi specifici per le molecole di indagine coniugati con fluorocromi, è possibile analizzare la quantità di fluorescenza emessa dalle varie cellule per inferire sia il numero di cellule che esprimono la molecola di interesse, sia i suoi livelli di espressione. Le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali specifici contro il CD11b (clone M1/70), Ly6C (HK1.4), Ly6G (1A8), CD3ε (145-2C11), Thy1.2 (30-H12), MHCII (M5/ 114.15.2), CD86 (PO3), CD11c (N418), F4/80 (BM8), CD206 (C068C2) e CD45.2 (104), in combinazione con un anticorpo non marcato anti CD16/32, per il blocco dei recettori Fc. La marcatura della superficie cellulare è stata effettuata in buffer FACS (costituito da PBS contenente 1.5% di Siero Fetale Bovino (FBS) e lo 0.05% di Azide Sodica), in ghiaccio per 30 minuti, seguita da lavaggi con lo stesso buffer. Invece, per la marcatura intracellulare contro il CD247, le

cellule sono state fissate in Paraformaldeide (PFA) all'1% in PBS per 20 minuti in ghiaccio, poi permeabilizzate con Saponina allo 0.1% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente, infine marcate con anticorpi anti-CD3ε e anti-CD247 (H146), in presenza di anticorpi anti-CD16/32, in buffer FACS contenete lo 0.1% di saponina, per 30 minuti in ghiaccio. I dati sono stati acquisiti con un citofluorimetro a flusso CytoFLEX, e analizzati con il software FCS Express v8.

2.4 Isolamento e purificazione delle P-MDSCs e delle M-MDSCs

Per isolare e purificare le MDSC da un campione di partenza di cellule della milza e del midollo osseo, prima di tutto sono state arricchite le PMN-MDSC attraverso un sistema di separazione su colonnina magnetica: per fare ciò, le cellule sono prima state marcate con anticorpi anti-Ly6G per 30 minuti a 4°C, poi lavate e marcate con microsfere magnetiche ricoperte da streptavidina, poi lavate nuovamente e caricate sulle colonnine immerse in un campo magnetico. Le cellule positive alla marcatura (quindi le PMN-MDSC) sono state isolate, e le M-MDSC sono state arricchite dalla popolazione di cellule negative usando il kit EasySep Monocyte Isolation Kit. Per ottenere sospensioni monocellulari delle due sottopopolazioni, le cellule sono state marcate contro i vari marcatori delle MDSC in PBS contenete l'1.5% di FCS e 2mmol/L di EDTA. Le cellule $Ly6G^{-}Ly6C^{hi}CD11b^{+}$(cioè le M-MDSCs) e $Ly6G^{+}Ly6C^{low}CD11b^{+}$ (le PMN-MDSCs) sono state smistate mediante il citofluorimetro a cell sorting FACS ARIA III (BD). Le cellule sono state contate usando un contatore automatizzato.

2.5 Saggio ex vivo sulla down-regolazione del CD247

Per verificare l'effetto delle MDSC sui livelli di espressione del CD247 nei linfociti T, un totale di 1×10^5 cellule T sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti, e le M-MDSC o le PMN-MDSC sono state aggiunte a diversi rapporti T:MDSC. Questa co-cultura è stata mantenuta in incubatore per 18 ore a 37°C. Successivamente, le cellule sono state raccolte in PBS freddo e marcate per il CD247 come descritto precedentemente. I livelli di espressione di CD247 sono stati misurati come intensità media di fluorescenza (MFI) al citofluorimetro.

2.6 Saggio ex vivo sull'inibizione della proliferazione dei Linfociti T

Per saggiare l'effetto delle MDSC sulla proliferazione dei linfociti T, piastre da 96 pozzetti sono state pre-rivestite con 100 µL di un Buffer Borato (0.1 mol/L, pH = 8.5), contenente 3 µg/mL di anticorpi anti-CD3ε e 3 µg/mL di anticorpi anti-CD28 per 24 ore a 4°C. I pozzetti sono poi stati lavati con un terreno completo contenente l'8% di FBS, 50 µmol/L di β-2-mercaptoetanolo, 2 mmol/L di L-glutamina e 1% di soluzione pen-strep (penicillina-stremptomicina). Le cellule T saggiate sono state isolate da una milza sana utilizzando il kit EasySep Mouse T Cell Isolation Kit, e poi marcate con l'estere succinimmidico della carbossifluoresceina diacetata (CFSE), un colorante fluorescente. Un totale di 1×10^5 di queste cellule T marcate è

stato risospeso in un terreno completo, poi piastrate in ogni pozzetto. Le M-MDSC o le PMN-MDSC sono state aggiunte a diversi rapporti T:MDSC, e queste colture sono state mantenute in incubatore a 37°C per 72 ore. In alcuni esperimenti, le M-MDSC sono state pre-incubate con i batteri prima di aggiungerle ai pozzetti. I campioni sono stati raccolti in un buffer FACT freddo e marcati con anticorpi anti-Thy.2. L'indice di proliferazione è stato determinato mediante il FCS-Express V6 proliferation analyzer.

2.7 Prelievo tissutale e generazione di sospensioni monocellulari

Milza, sangue periferico, colon e midollo osseo sono stati prelevati sia da topi CAC che di controllo. In seguito, le milze sono state schiacciate in PBS e risospese in un buffer per la lisi degli eritrociti (ELB, composto da 150 mmol/L di NH 4 Cl, 10 mmol/L di KHCO 3 e 0.1 mmol/L di EDTA), poi lavate in PBS e infine filtrate con un filtro da 70 µm. Le cellule del midollo osseo sono state espulse con una siringa, per poi seguire lo stesso protocollo della milza. I vari colon sono stati lavati per rimuovere residui fecali, per poi essere tagliati longitudinalmente in pezzi da 0,5 cm. I pezzi sono stati risospesi in 20 mL di buffer HBSS, contenente 10 mmol/L di HEPES, 2 mmol/L di EDTA e 1 mmol/L di ditiotreitolo (DTT) e posti in agitazione per 20 minuti a 37°C, e poi vortexati. A seguire, è stato raccolto il surnatante e filtrato con un filtro da 70 µm per poi essere mantenuto in ghiaccio. Il processo è stato ripetuto di nuovo. I pezzi rimanenti sono stati digeriti in 5 mL di buffer HBSS arricchito con $Ca2^{+}$ e $Mg2^{+}$ (contenente 10 mmol/L di HEPES, 5% di FCS, 1% di pen-strep, 1 mg/mL di collagenasi e 0.1 mg/mL di DNasi I), per 30 minuti in agitazione a 37°C. Il surnatante di questa digestione è stato raccolto, filtrato attraverso un filtro da 70 µm e mantenuto in ghiaccio. Il tessuto residuo è stato disgregato sopra un filtro da 70 µm e lavato per raccogliere eventuali cellule staccate. Tutte le frazioni cellulari sono state unite e centrifugate a 500g per 10 minuti a 4°C per poi raccogliere le cellule isolate. Esse sono state infine lavate due volte in PBS freddo, filtrate attraverso un filtro da 40 µm e risospese in PBS contenente 1,5% di FCS per gli utilizzi successivi.

2.8 Analisi della sequenza del gene 16S rRNA

Per identificare e classificare i batteri, o studiare la diversità di una comunità microbica, si ricorre all'analisi della sequenza del gene per l'rRNA 16S (subunità minore del ribosoma). Questo gene funge da marcatore filogenetico e tassonomico in quanto composto sia da regioni conservate in tutti i microorganismi, sia da regioni variabili che permettono una robusta identificazione dei vari generi batterici [7]. Campioni fecali per l'analisi del microbiota sono stati raccolti dai topi a diversi timepoints dell'esperimento e mantenuti a -20°C. Il DNA è stato estratto da essi mediante il kit Power Soil DNA Isolation Kit, dopo un passaggio di omogeneizzazione meccanica. Successivamente, il DNA estratto è stato utilizzato per l'amplificazione della regione variabile V4 del gene batterico 16S rRNA. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando sfere magnetiche AMPure e quantificati tramite il kit Picogreen. Le sequenze relative al gene 16S rRNA sono state ottenute

mediante sequenziamento Illumina, e i dati in formato FASTQ sono stati processati e analizzati usando la pipeline QIIME2. Le sequenze single-end sono state separate in base al campione d'origine mediante il plugin q2, e per migliorare la risoluzione, è stato rimosso il rumore di fondo mediante q2-DADA2. Dalle sequenze così ottenute, sono stati usati i programmi MAFFT e FastTree2 per l'allineamento e la ricostruzione filogenetica. La classificazione tassonomica è stata effettuata mediante un plugin q2 apposito, e le sequenze finali sono state allineate con un database di riferimento Greengenes, con un livello di confidenza del 99%. Per evitare qualsiasi possibile contaminazione, la tabella di riferimento è stata filtrata tramite il plugin q2-feature-table. Innanzitutto, sono state eliminate le feature annotate come mitocondri e cloroplasti; successivamente, sono state rimosse quelle presenti in meno di tre campioni. Per l'esperimento con i topi germ-free (GF), sono state tagliate anche le feature a bassa abbondanza (<0,0005%). L'analisi è stata effettuata su una tabella rarefatta con più di 10.000 letture per campione. La α-diversity è stata calcolata utilizzando la misura Faith's Phylogenetic Diversity (PD), che riflette la ricchezza batterica all'interno del campione, invece la β-diversity è stata analizzata secondo le distanze UniFrac pesate (quantitative) e non pesate (qualitative), per confrontare le differenze tra le comunità batteriche intestinali dei gruppi [8]. Le differenze significative nell'abbondanza batterica tra i gruppi CAC e di controllo sono state esaminate a livello di genere usando il test discrete-FDR sui campioni microbiotici raccolti l'ultimo giorno dell'esperimento.

2.9 Trapianto di microbiota fecale (FMT) e raccolta dei campioni.

Per l'FMT, campioni fecali provenienti da topi affetti da CAC e di controllo sono stati raccolti all'ultimo timepoint dell'esperimento e mantenuti a -20°C. Per ottenere tre pool di donatori per ciascun gruppo sperimentale, campioni fecali da topi con CAC e da topi di controllo sono stati raccolti (nove campioni da topi diversi) e suddivisi casualmente in tre pool. In seguito, ogni pool è stato risospeso in 3mL di PBS sterile e disciolto vortexando. Infine, sono stati somministrati oralmente 200 µL di questa sospensione a topi GF Swiss Webster di 8-10 settimane.

2.10 Isolamento dei batteri da campioni fecali

La comunità microbica presente nei campioni fecali è rappresentativa del microbiota intestinale dei topi. Al fine di isolare i batteri per una co-coltura con le MDSC, campioni fecali di 3-5 topi affetti da CAC o controllo sono stati omogenizzati in 10 mL di PBS sterile e prima setacciati attraverso filtri da 100 µm per rimuovere i detriti di grandi dimensioni, poi centrifugati per 3 minuti a 500g per rimuovere anche i detriti di piccole dimensioni. I batteri sono stati pellettati mediante centrifugazione a 3000g per 10 minuti, aliquotati e mantenuti a -20°C. Il giorno dell'esperimento, le cellule batteriche sono state risospese in RPMI (contenente 8% di FCS e 2 mmol/L di L-glutammina). La quantificazione delle cellule è stata effettuata mediante lettura della densità

ottica (a 600 nm), considerando che una densità ottica (OD600) pari a 1 equivale a 1×10^9 cellule batteriche.

2.11 Co-coltura delle MDSCs con i batteri

Per approfondire gli effetti sulle MDSC della loro interazione con i batteri, 2.5×10^5 precursori immaturi isolati dal BM sono stati risospesi in RPMI contenente l'8% di FBS, 2 mmol/L di L-glutamina e 10 mmol/L di HEPES, e poi seminati in piastre da 96 pozzetti. I batteri isolati dai campioni fecali sono stati aggiunti alle cellule con un rapporto M-MDSC:batteri di 1:100, tranne quando indicato diversamente. Dopo due ore, è stata aggiunta una soluzione di pen-strep a una concentrazione finale dell'1%, e le colture sono state mantenute nell'incubatore per 18 ore. Successivamente, le piastre sono state centrifugate, i surnatanti raccolti e congelati a −20°C, mentre le cellule sono state lavate con PBS, pellettate e conservate anch'esse a −20°C.

2.12 Analisi con ImageStream

L'imagestream è uno strumento di citometria a immagini che combina le capacità della citometria a flusso con la microscopia avanzata, consentendo quindi di ottenere gli stessi dati di una normale citometria e in contemporanea l'acquisizione di immagini ad alta risoluzione delle singole cellule. Per ottenere ulteriori dettagli sull'interazione tra le MDSC e i batteri, sono state ottenute sospensioni di MDSC dal midollo osseo e di batteri derivanti da campioni fecali di topi affetti da CAC o di controllo con i protocolli già discussi. Le cellule sono state marcate con anticorpi contro Ly6C e Ly6G, mentre i batteri sono stati marcati con CSFE alla concentrazione di 0.625 µmol/L. Successivamente, le MDSC e i batteri sono stati co-coltivati per 45 minuti a 37°C per poi essere fissati con paraformaldeide (PFA) all'1%. Infine, tutte cellule sono state lavate con PBS, permeabilizzate con saponina allo 0,1% e colorate con il 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), un colorante fluorescente che si lega preferenzialmente al DNA, in particolare alle regioni ricche di adenina-timina (A-T). L'acquisizione delle immagini è stata effettuata con ImageStream, mentre l'analisi dei dati è stata condotta utilizzando il software IDEAS.

2.13 Rilevamento della produzione di ROS nelle PMN-MDSCs

Per quantificare i livelli di ROS prodotti in presenza di batteri, un totale di $2,5 \times 10^5$ PMN-MDSC immature è stato risospeso in terreno RPMI contenente l'8% di FCS, 10 mmol/L di HEPES, 2 mmol/L di L-glutammina, per poi essere seminate in piastre da 96 pozzetti. In seguito, sono stati aggiunti i batteri provenienti da campioni fecali ad un rapporto PMN-MDSC:batteri di 1:50. Successivamente, è stato aggiunto DCFDA (2',7'-Diclorofluorescina diacetato), disciolto in RPMI, fino a una concentrazione finale di 10 µmol/L. Questa è una molecola lipofila, in grado di attraversare facilmente le membrane cellulari. In presenza di ROS intracellulari, essa viene ossidata a DCF, una molecola fluorescente, permettendo quindi una rilevazione del segnale proporzionale alla quantità di specie reattive dell'ossigeno. Le co-

culture sono state incubate per 4 ore a 37°C. Senza lavaggio, la produzione di ROS è stata misurata mediante citometria a flusso delle cellule (CytoFLEX), attraverso l'intensità di fluorescenza media (MFI) del laser a 488 nm.

2.14 Rilevamento del NO e attività dell'arginasi

Per investigare i livelli di NO nelle cellule, sono stati prelevati i surnatanti derivanti dalla co-cultura M-MDSC:batteri e mescolati con 1 mg/mL di reattivo di Griess disciolto in acido fosforico al 5%, in rapporto 1:1. La reazione di Griess è una reazione chimica utilizzata per rilevare la presenza di nitriti e misurarne la concentrazione mediante uno spettrofotometro. 100 µL di questa miscela sono stato caricati su piastre ELISA per la misurazione dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm utilizzando lo strumento Spark 20M (Tecan). Similmente, per indagare sull'attività dell'arginasi nelle MDSC, i pellet di M-MDSC provenienti dalla co-coltura M-MDSC:batteri sono stati lisati utilizzando 50 µL di Triton-X-100 allo 0,1% contenente 1 ng/mL di un inibitore delle proteasi, per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito, sono stati aggiunti 50 µL di Tris-HCl 25 mmol/L (a pH 7,5) e 5 µL di $MnCl_2$ 10 mmol/L, per poi incubare il lisato a 56°C per 10 minuti (questo per attivare l'arginasi). Successivamente, sono stati aggiunti 100 µL di L-arginina (il substrato dell'enzima) 0,5 mol/L (pH 9,7), e la miscela è stata incubata per 2 ore a 37°C. La reazione è stata interrotta aggiungendo 900 µL di una miscela acida (9% di acido solforico e 27% di acido fosforico). Poi sono stati aggiunti 40 µL di una soluzione di ISPF al 9% disciolta in etanolo (sostanza che permette la rilevazione dell'urea, uno dei prodotti dell'arginasi). Questa miscela è stata riscaldata per 30 minuti a 95°C per poi caricare 100 µL di ciascun campione su una piastra ELISA e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm utilizzando lo strumento Spark 20M (Tecan).

2.15 Saggio di differenziamento delle MDSC

Per valutare gli effetti dei batteri sul differenziamento e sulla maturazione delle MDSC, sono stati isolati dei monociti immaturi dal midollo osseo di topi sani. Un totale di 1×10^5 monociti è stato risospeso in terreno RPMI contenente l'8% di FCS, 10 mmol/L di HEPES e 2 mmol/L di L-glutammina e poi seminato in piastre da 96 pozzetti. I batteri isolati da campioni fecali sono stati aggiunti alle cellule con un rapporto di 1:100. Dopo due ore, sono stati aggiunti l'1% di pen-strep e 20 ng/mL del fattore di stimolazione GM-CSF (o di M-CSF), e le co-culture sono state riposte in incubatore a 37°C per 72 ore. Le cellule sono state raccolte utilizzando la soluzione Accutase (in quanto più delicata rispetto alla tripsina), lavate e marcate con anticorpi anti-MHC-II, anti-CD86, anti-F4/80 e anti-CD206 in tampone FACS.

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

In questo studio, i ricercatori hanno indagato sulla relazione tra l'immunosoppressione mediata dalle MDSC, il microbiota disbiotico e il CAC. L'ipotesi iniziale proponeva un cross-talk tra il microbiota e le MDCS capace di accentuare l'infiammazione e l'immunosoppressione, contribuendo quindi alla progressione e allo sviluppo del tumore.

3.1 L'infiammazione intestinale e periferica in topi affetti da CAC è associata ad un aumento dei livelli di MDSC e immunosoppressione

Inizialmente è stato utilizzato il modello AOM/DSS per indurre ai topi un CAC con le stesse caratteristiche istopatologiche dell'analoga malattia umana (*Fig. 1A*). Durante il trattamento, i topi hanno esibito sintomi tipici dell'infiammazione intestinale, come perdita di peso e diarrea, a dimostrazione dell'efficacia del protocollo. Alla fine del trattamento, tre settimane dopo l'ultimo ciclo di DSS, i topi sono stati sacrificati e analizzati. Gli organi oggetto di studio sono stati il colon, in quanto sede primaria del CAC, e la milza, in quanto indice dello stato immunitario periferico. I colon provenienti da topi affetti da CAC sono risultati più corti rispetto a quelli dei topi di controllo della stessa età. L'analisi macroscopica ne ha rivelato e confermato la presenza di tumori (*Fig. 1B*). I topi affetti da tumore presentavano una milza ingrossata e con morfologia alterata (*Fig. 1C*).

Queste osservazioni evidenziano una grave infiammazione sito-specifica (colon) e periferica nei topi affetti da CAC, condizione ulteriormente confermata dall'aumento dei livelli di citochine pro-infiammatorie nel colon. A questi risultati, i ricercatori hanno affiancato la rilevazione dei livelli di MDSC, mediante citometria a flusso, nel sangue, nella milza, nel midollo osseo (BM) e nel colon: i risultati evidenziano un aumento dei livelli di entrambe le sottopopolazioni di MDSC nei topi CAC rispetto ai topi di controllo in tutti e quattro i siti d'indagine (*Fig. 1D e 1E*).

Per valutare lo stato immunitario dei topi CAC, i ricercatori hanno esaminato i livelli di espressione della molecola CD247 nei vari tessuti, la quale funge da marcatore per l'integrità del recettore dei linfociti T (TCR). I risultati, espressi come media dell'intensità di fluorescenza (MFI), hanno rivelato una down-regolazione dei livelli di CD247 nei linfociti T a livello della milza, midollo osseo, sangue e colon, rispetto ai topi di controllo (*Fig. 1F*). Al contrario, l'espressione della molecola CD3ε risulta invariata tra i due gruppi di topi (*Fig. 1G*). Il TCR è sempre associato con un altro complesso chiamato CD3 per formare un recettore (complesso del TCR) capace non solo di riconoscere l'antigene, ma anche di dar luogo ad una trasduzione del segnale finalizzata ad una risposta intracellulare. Il CD3 è formato da quattro peptidi non variabili (γ, δ, ε e ζ o CD247), proteine identiche in tutti i linfociti T, in accordo con il loro ruolo di molecole deputate alla trasduzione del segnale e non al riconoscimento antigenico [1]. Di conseguenza, una normale espressione di CD3ε accompagnata ad una down-regolazione del CD247 indica l'integrità del TCR ma uno stato immunosoppresso delle cellule T. Per valutare il ruolo delle due sottopopolazioni di MDSC nell'

immunosoppressione osservata, sia PMN- che M-MDSC sono state isolate dalla milza di topi affetti da CAC e coltivate insieme a cellule T naïve attivate in vitro mediante il TCR e il CD28 (molecola co-stimolatoria fondamentale per l'attivazione dei T). Come riportato in Figura 1H, si è visto che Le M-MDSC sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule T in maniera dipendente dal rapporto tra i due tipi cellulari, mentre le PMN-MDSC non ne influenzano la proliferazione. Inoltre, la co-coltura delle cellule T con le PMN-MDSC ha portato ad una down-regolazione dei livelli di CD247 nei linfociti T, con un effetto sempre maggiore all'aumentare del rapporto tra i due tipi cellulari (*Fig. 1I*), mentre le M-MDSC non hanno influito su questi livelli d'espressione.
In entrambi i casi i livelli di espressione del CD3ε sono rimasti invariati.
Questi risultati hanno rivelato che le due sottopopolazioni di MDSC ricoprono un ruolo diverso nella regolazione della risposta mediata dai linfociti T *in vivo*; inoltre, hanno sottolineato la relazione tra infiammazione cronica, locale e sistemica, con un elevato ambiente immunosoppressivo.

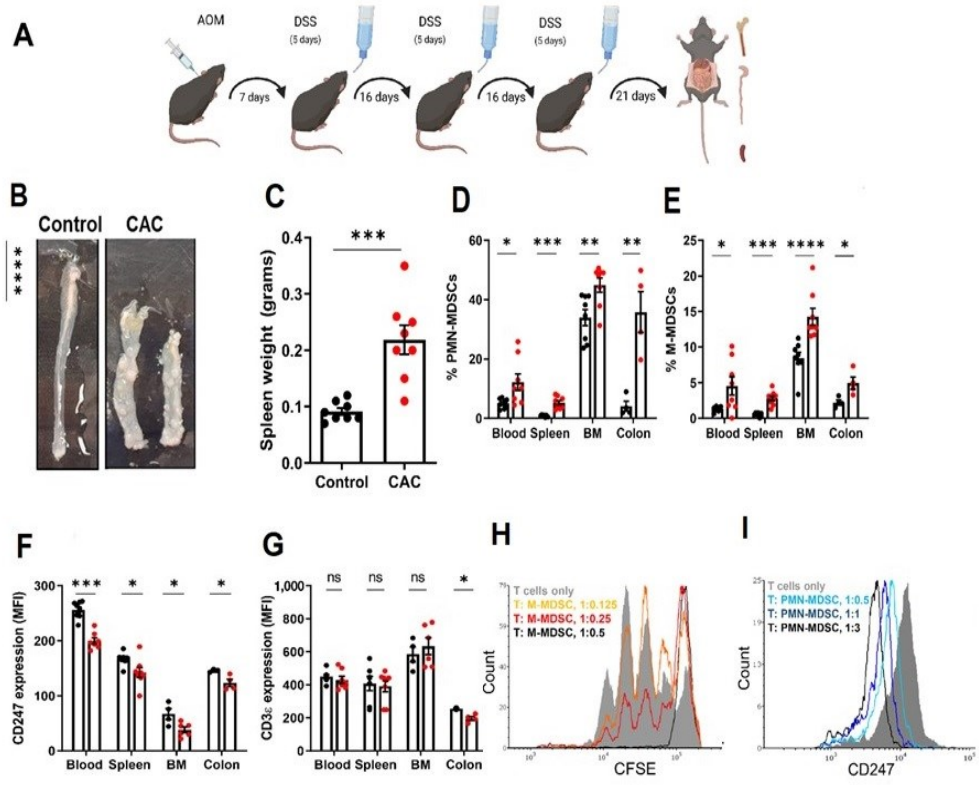


Figura 1: i topi affetti da CAC mostrano infiammazione locale e sistemica. (A) Rappresentazione schematica del trattamento AOM/DSS per indurre il CAC. (**B)** Immagini rappresentative del colon di topi CAC e controllo. **(C)** Pesi delle milze (n = 8). Dati della citometria a flusso che mostrano la % di PMN-MDSCs **(D)** e di M-MDSCs **(E)** nel sangue, milza, midollo osseo e colon, ottenuti dal totale delle popolazioni cellulari. Dati della citometria a flusso relativi ai livelli di espressione del CD247 **(F)** e del CD3ε **(G)** in linfociti T CD3ε⁺ nel sangue, milza, midollo osseo e colon (n = 3-8). I dati sono espressi come MFI. **(H)** Istogramma relativo alla proliferazione di cellule T attivate coltivate in diversi rapporti con M-MDSC isolate dalla milza di topi affetti da CAC. **(I)** Istogramma relativo ai livelli di espressione del CD247 da parte di cellule T attivate coltivate in diversi rapporti con M-MDSC isolate dalla milza di topi affetti da CAC. I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001.

3.2 Topi affetti da CAC mostrano alterazioni nella diversità e nella composizione del microbiota

Numerosi studi hanno dimostrato che una condizione di infiammazione cronica è associata ad un cambiamento nella composizione del microbiota. La tumorigenesi colorettale è accompagnata da rottura e sanguinamento del tessuto tumorale, modificando il microambiente facilitando così il graduale rimpiazzo dei tipici batteri commensali con i batteri associati al CAC [9]. Per verificare se anche in questo caso i topi affetti da CAC mostravano un microbiota alterato rispetto ai topi di controllo, i ricercatori ne hanno collezionato campioni fecali a diversi *timepoints* durante la progressione del trattamento AOM/DSS (*Fig. 2A*). Successivamente hanno determinato la composizione del microbiota relativo ai vari campioni mediante sequenziamento del gene per l'rRNA 16S. I risultati hanno rivelato che il microbiota dei topi affetti da CAC mostra un notevole cambiamento nella sua composizione durante la progressione della malattia, esibendo nelle fasi finali (T3 e T4) una riduzione significativa della ricchezza batterica con conseguente minore diversità batterica, rispetto ai topi di controllo (*Fig. 2B*). Tra i generi predominanti nelle fasi finali sono stati riscontrati *Bacteroides*, *Sutterella* e *Turicibacter*. Successivamente, i ricercatori hanno valutato l'integrità dell'epitelio del colon nei topi CAC. Per fare ciò, hanno misurato l'intensità di fluorescenza del FICT-destrano nel siero ottenuto dal sangue, in seguito alla sua somministrazione per via orale. Il destrano è una molecola grande 4kDa, di conseguenza le sue dimensioni non gli permettono di attraversare l'epitelio intestinale in condizioni fisiologiche, se invece quest'ultimo risulta danneggiato, il destrano riuscirà ad attraversarlo e verrà riscontrato nel sangue. Da quest'analisi è stato constatato che i topi CAC mostrano una maggiore permeabilità intestinale rispetto ai topi di controllo (*Fig. 2C*). Questi risultati suggeriscono che la disbiosi intestinale, accompagnata ad un deterioramento del tessuto del colon, può contribuire allo sviluppo del CAC.

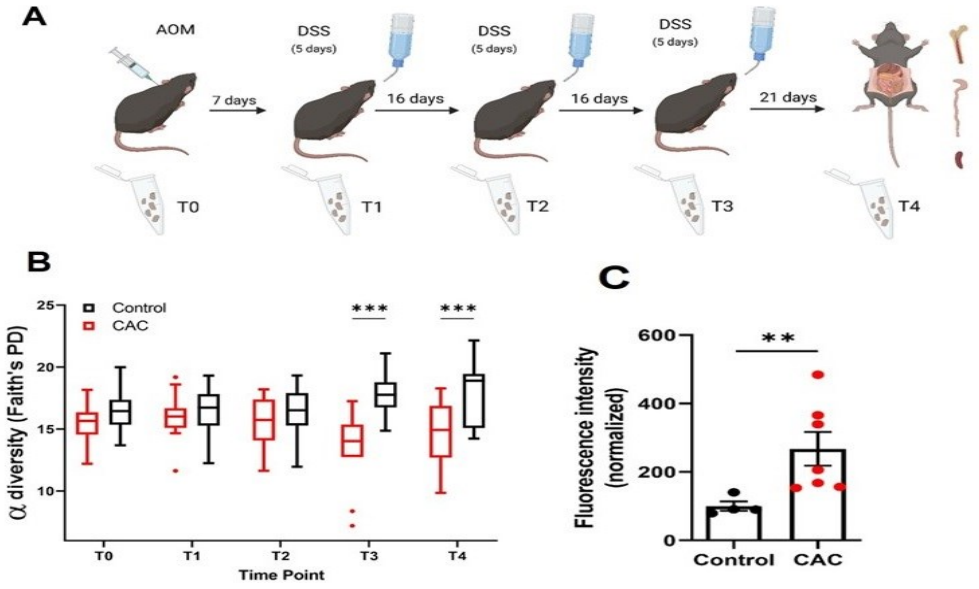


Figura 2: i topi affetti da CAC mostrano un'alterata diversità e composizione del microbiota. (A) Rappresentazione schematica dei differenti timepoints per la raccolta dei campioni fecali. **(B)** indice di diversità α

diversity misurato mediante Faith's PD. **(C)** Intensità di fluorescenza del FITC-destrano nel siero normalizzata rispetto ai topi di controllo (n = 5–6). I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

3.3 FMT da topi affetti da CAC favorisce lo sviluppo tumorale

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti, i ricercatori erano interessati a definire qualora il microbiota disbiotico associato al CAC potesse favorire lo sviluppo del tumore influenzando i livelli e l'attività soppressiva delle MDSC. A tal fine, topi germ-free (GF) sono stati sottoposti a trapianto del microbiota fecale (FMT) o da topi affetti da CAC (CAC-FMT) o da topi di controllo sani (control-FMT) (*Fig. 3A*). Ovviamente, i due gruppi di donatori mostravano differenze nella composizione del loro microbiota, coerentemente con quanto riportato in precedenza. Dopo la colonizzazione del microbiota (circa 15 giorni), alcuni topi sottoposti al trapianto (quindi sia topi CAC-FMT che control-FMT) sono stati ulteriormente sottoposti al protocollo di induzione del CAC, oppure lasciati non trattati (*Fig. 3A*). È stato osservato che i topi CAC-FMT, al termine del trattamento AOM/DSS, mostravano una condizione patologica molto più grave rispetto ai topi control-FMT, come dimostrato da una maggiore perdita di peso, e da una maggiore carica tumorale (*Fig. 3B*). Inoltre, nonostante le dimensioni della milza tra i due gruppi risultavano invariate (*Fig. 3C*), i topi CAC-FMT affetti da CAC presentavano maggiori livelli di entrambe le sottopopolazioni di MDSC nella milza rispetto ai topi control-FMT affetti da CAC (*Fig. 1D e 1E*). Questi risultati dimostrano che lo sviluppo tumorale non dipende solo da una condizione di infiammazione cronica, ma anche dalla composizione iniziale del microbiota, accentuando la relazione tra tutti questi fattori nella patogenesi.

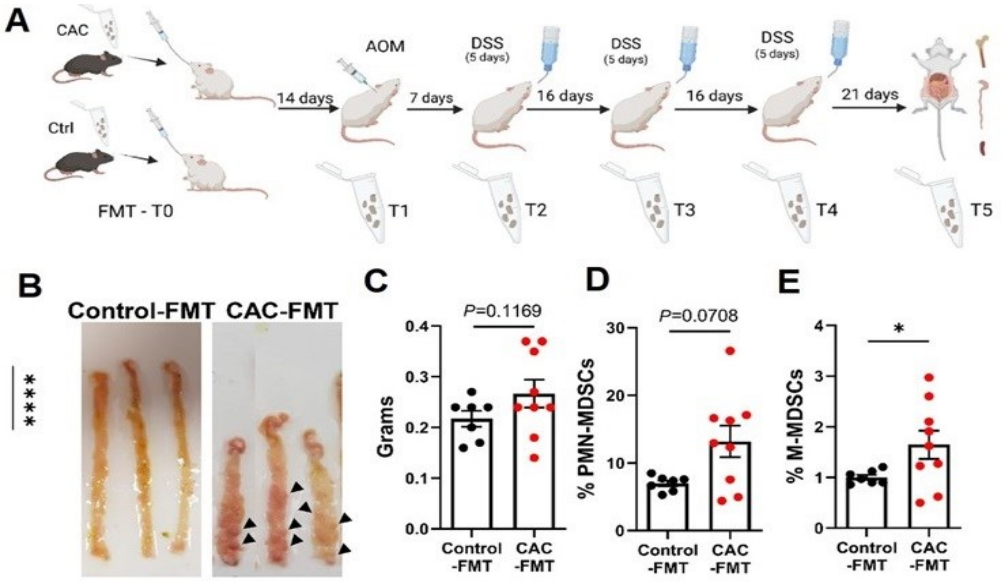


Figura 3: il microbiota associato al CAC promuove lo sviluppo tumorale. (A) Rappresentazione schematica del protocollo di induzione del CAC a seguito di FMT. **(B)** Immagini rappresentative dei colon. Le frecce nere rappresentano i tumori macroscopici. **(C)** Pesi delle milze espressi in grammi. Dati della citometria a flusso relativi alla percentuale di PMN-MDSCs **(D)** e M-MDSCs **(E)** nella milza (n = 7-9). I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). *, P < 0.05; ****, P < 0.0001.

3.4 La deplezione del microbiota riduce l'infiammazione periferica e del colon, con una conseguente bassa incidenza tumorale

Avendo constatato l'esistenza di una correlazione tra la disbiosi intestinale e l'accumulo di MDSC, l'indagine è stata estesa per determinare qualora la deplezione del microbiota potesse in qualche modo condizionare l'attività delle MDSC, rallentando lo sviluppo della patologia. Per questo scopo, i topi affetti da CAC sono stati trattati con un cocktail di tre antibiotici (ABX) alla fine del terzo ciclo di DSS, finalizzato ad una profonda deplezione della comunità microbica intestinale (*Fig. 4A*). L'analisi del microbiota successiva al trattamento con ABX ha evidenziato una drastica riduzione del genere *Sutterella, Bacteroides e Turicibacter*. La somministrazione ha comportato numerosi benefici nei topi affetti da CAC rispetto ai topi non trattati: è stato osservato un ripristino del peso corporeo, una ripresa macroscopica del colon con una ridotta carica tumorale (*Fig. 4B*), una riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie e una ristorazione dell'integrità dell'epitelio del colon, come indicato dalla riduzione della permeabilità intestinale (*Fig. 4C*). Inoltre, i topi CAC trattati con ABX hanno esibito una riduzione delle dimensioni della milza (*Fig. 4D*), ad indicare un'attenuazione dell'infiammazione non solo nel colon, ma anche in periferia. Tutti questi risultati indicano chiaramente che la deplezione del microbiota porta ad una riduzione dell'infiammazione e alla regressione del tumore.

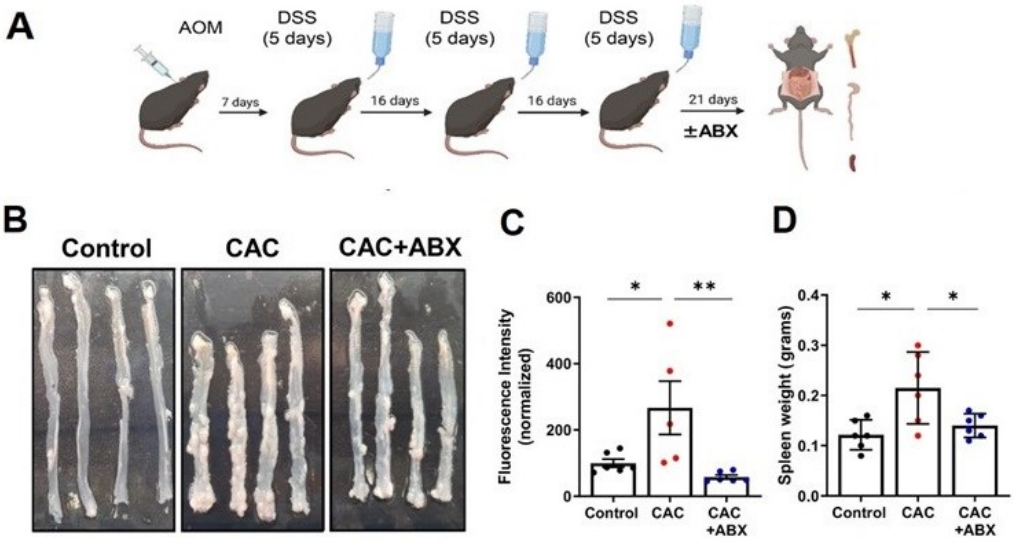


Figura 4: La deplezione del microbiota in topi affetti da CAC riduce l'infiammazione e la carica tumorale. (A) Rappresentazione schematica del trattamento CAC in associazione con ABX. **(B)** Immagini rappresentative dei colon. **(C)** Intensità di fluorescenza del FITC-destrano nel siero normalizzata rispetto ai topi di controllo (n = 5–6). **(D)** Pesi della milza espressi in grammi (n = 6). I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

3.5 Il trattamento antibiotico dei topi affetti da CAC risulta in ridotti livelli di MDSC e delle loro funzioni soppressorie nel colon e in periferia

Dopo aver stabilito l'effetto del trattamento ABX sul microbiota e sull'infiammazione, i ricercatori hanno proseguito investigandone l'effetto

sulle MDSC e sulla loro attività soppressoria, sia nell'intestino che in periferia. È stata osservata una notevole riduzione dei livelli sia di PMN-MDSC (*Fig. 5A*) che di M-MDSC (*Fig. 5B*) nel sangue, milza, colon e midollo osseo dei topi affetti da CAC trattati con ABX rispetto ai non trattati. In contemporanea, è stata verificata una ripresa dei livelli di espressione del CD247 nelle cellule T (*Fig. 5C*). Inoltre, è stato sorprendentemente osservato che le M-MDSC isolate da topi CAC trattati con ABX esibiscono una ridotta attività soppressoria rispetto alle stesse isolate da topi non trattati, come evidenziato dal loro effetto sulla proliferazione dei linfociti T (*Fig. 5D*), che riprende notevolmente. Allo stesso modo, è emerso come le PMN-MDSC provenienti da topi CAC trattati con ABX inducano una minor down-regolazione del CD247 rispetto alle stesse provenienti da topi CAC non trattati (*Fig. 5E*), coerentemente con quanto osservato in Figura 5C. Questi risultati mostrano come il trattamento con ABX non solo porta ad una riduzione dell'infiammazione, ma anche ad una diminuzione dei livelli di MDSC e della loro attività soppressiva. Di conseguenza, i dati dimostrano che il microbiota alterato supporta un perpetuo stato infiammatorio e un ambiente immunosoppressivo, che sostengono lo sviluppo della patologia.

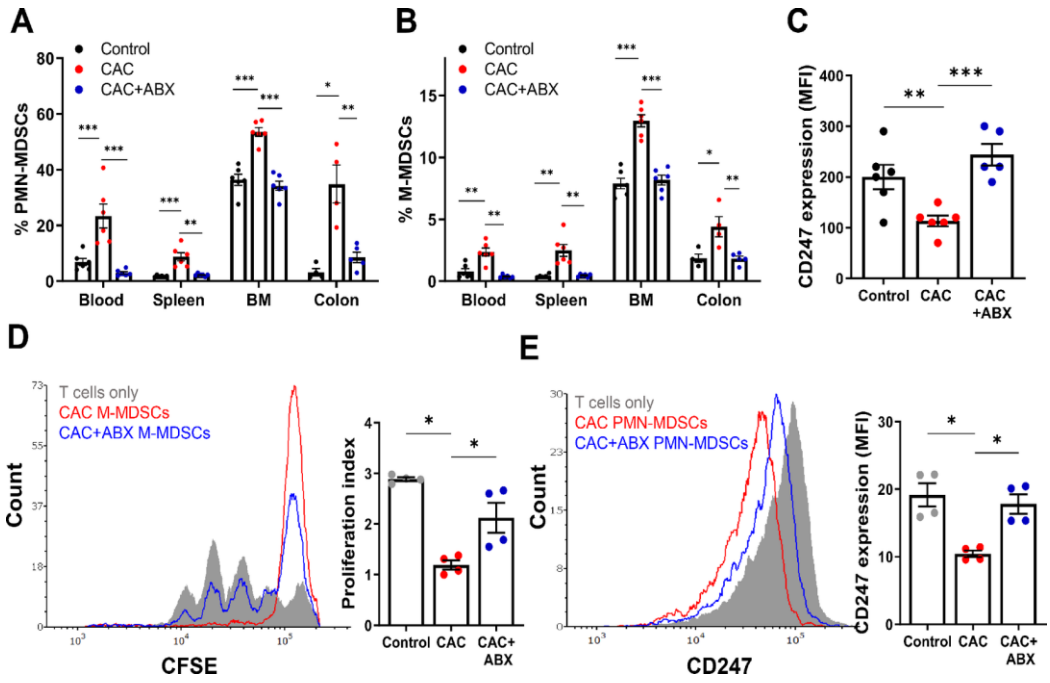


Figura 5: La deplezione del microbiota in topi affetti da CAC riduce i livelli di MDSC e la loro attività immunosoppressiva. Dati della citometria a flusso mostranti la % di PMN-MDSCs **(A)** e di M-MDSCs **(B)** nel sangue, milza, midollo osseo e colon, ottenuti dal totale delle popolazioni cellulari (n = 4-6). **(C)** Dati della citometria a flusso rappresentanti i livelli di espressione del CD247 in cellule T $CD3^+$ della milza. I dati provengono da uno dei tre esperimenti condotti indipendentemente. **(D)** Proliferazione dei linfociti T attivati, coltivati con M-MDSC isolate dalla milza o di topi affetti da CAC trattati con ABX, o di topi non trattati, con un rapporto 1:0,25. A sinistra è presente l'istogramma mentre a destra è mostrato il relativo indice di proliferazione (n = 4). **(E)** Livelli di espressione del CD247 in cellule T naïve coltivate con PMN-MDSC isolate dalla milza o di topi affetti da CAC trattati con ABX, o di topi non trattati, con un rapporto 1:1. A sinistra è presente l'istogramma mentre a destra l'espressione è quantificata come MFI (n = 4). I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

3.6 Il cross-talk tra le MDSCs e il microbiota associato al CAC ne incrementa le caratteristiche e le funzioni soppressive

Sulla base dei risultati fin ora ottenuti, i ricercatori hanno ipotizzato che un'intima interazione tra i batteri disbiotici e le MDSC fosse responsabile di un'accentuata attività immunosoppressoria delle stesse, creando un ambiente favorevole allo sviluppo tumorale. Per stabilire con precisione gli effetti dei batteri sulle due sottopopolazioni di MDSC, i ricercatori hanno isolato un pool di batteri da campioni fecali di topi affetti da CAC, e li hanno incubati *in vitro* con dei precursori delle MDSC isolati da un midollo osseo sano. L'utilizzo di precursori, in alternativa alle MDSC già differenziate, è motivato dalla loro ridotta attività immunosoppressiva, e ciò permette quindi di determinare se l'esposizione ai batteri possa in qualche modo incrementarne l'immunosoppressione. L'analisi ha evidenziato che entrambe le sottopopolazioni di MDSC formano contatti diretti con i batteri, i quali talvolta vengono addirittura inglobati dalle cellule (*Fig. 6A e 6B*). Questo contatto fisico potrebbe influenzare ulteriormente le caratteristiche e le funzioni delle MDSC, rendendole più soppressive. Esplorando più approfonditamente l'influenza dei batteri sui patway cellulari delle MDSC, è stato osservato che le cellule PMN-MDSC derivate dai precursori esposti ai batteri mostrano un'estesa produzione di ROS rispetto a cellule non esposte (*Fig. 6C*), e che le cellule M-MDSC derivate dai precursori esposti ai batteri mostrano un maggior rilascio di NO e maggiore attività dell'arginasi (*Fig. 6D e E*). Tutti questi fattori sono coinvolti nell'azione immunosoppressiva delle MDSC, di conseguenza l'esposizione ai batteri la incrementa. In seguito, i ricercatori hanno indagato sull'eventuale abilità dei batteri di influenzare la soppressione dei linfociti T da parte delle MDSC. A tal proposito, delle M-MDSC sono state incubate con batteri provenienti da campioni fecali di topi affetti da CAC, e successivamente coltivate con cellule T naïve attivate attraverso il TCR e il CD28. Con quest'analisi è emerso che le M-MDSC precedentemente esposte ai batteri esibiscono un maggiore effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule T, rispetto alle M-MDSC non esposte (*Fig. 6F*). È importante notare che i soli batteri non hanno ottenuto alcun effetto sulla proliferazione dei T. A supporto di ciò, è stato constatato che le M-MDSC esposte hanno up-regolato l'espressione della molecola PD-L1 (*Fig. 6G*), una molecola inibitoria. PD-L1 è uno dei due ligandi del recettore PD-1 espresso dai linfociti T attivati dall'antigene. In seguito al legame con il ligando, PD-1 media l'inibizione del TCR e di CD28 bloccando i segnali delle proteine chinasi attivate da questi ultimi [1]. Infine, i ricercatori hanno voluto definire l'effetto dei batteri associati al CAC sul differenziamento delle M-MDSC. Hanno quindi stimolato le M-MDSC coltivate con i batteri con GM-CSF e M-CSF (che in condizioni fisiologiche ne avrebbero indotto il differenziamento in cellule mieloidi mature, come macrofagi e granulociti), e hanno osservato che esse non rispondevano a nessuno dei due fattori. Inoltre, è stato riscontrato che queste cellule coltivate non hanno up-regolato marcatori indicativi del loro differenziamento e della maturazione, come MHC-II e CD86, in risposta ai

fattori di stimolazione (*Fig. 6H*), indicando che l'esposizione ai batteri ne blocca il differenziamento. Diversamente, è stata osservata in queste cellule un'up-regolazione di F4/80, un marcatore di superficie dei macrofagi (*Fig. 6I*). Questo ha sollevato l'ipotesi che i batteri associati al CAC possano alterare la maturazione delle M-MDSC, inducendone il differenziamento verso un fenotipo immunosoppressivo M2 (dei macrofagi antinfiammatori). Infatti, è emerso che le M-MDSC, coltivate insieme ai batteri associati al CAC, up-regolano l'espressione del recettore del mannosio CD206 quando stimolate con M-CSF, il quale è un marcatore del fenotipo M2 dei macrofagi (*Fig. 6L*). In conclusione, l'esposizione delle M-MDSC ai batteri associati al CAC, ne blocca il differenziamento e polarizza la loro maturazione verso un fenotipo immunosoppressivo che ricorda il fenotipo M2 macrofagico.

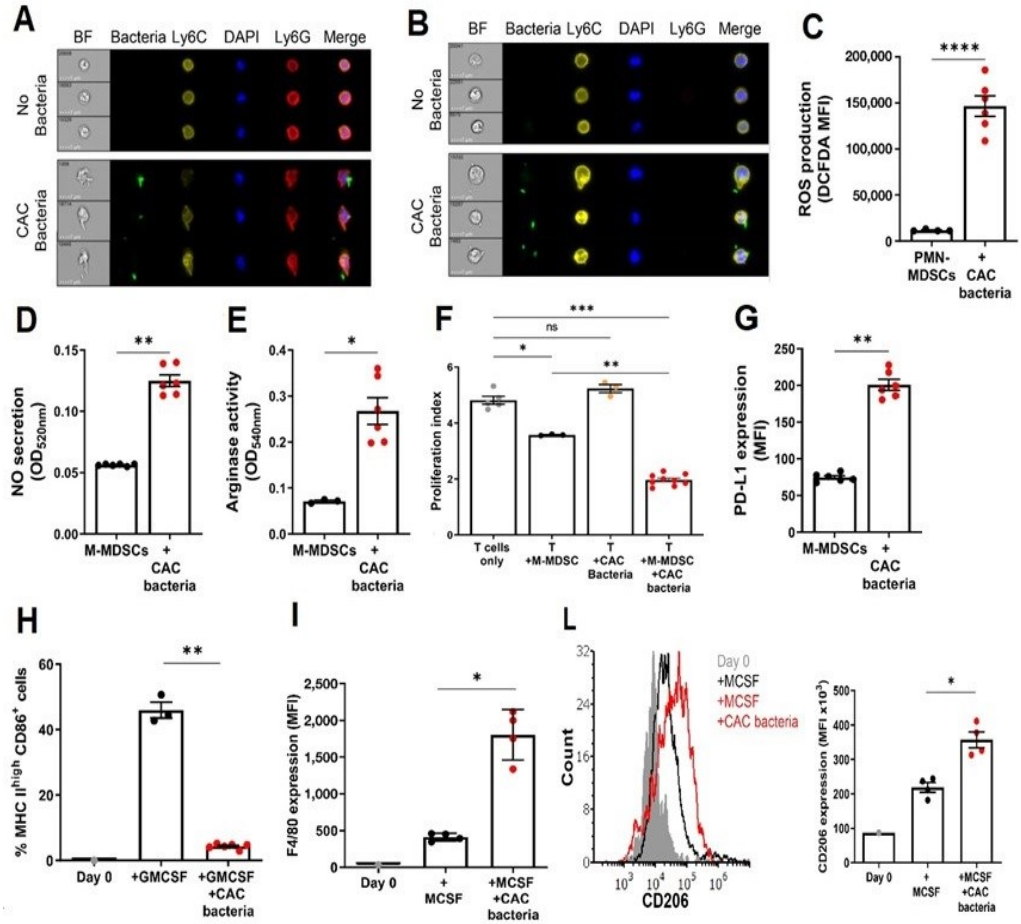


Figura 6: L'interazione delle MDSC con i batteri associati al CAC ne promuove le caratteristiche immunosoppressive; inoltre, l'interazione polarizza le M-MDSC verso un fenotipo M2 immunosoppressivo. Immagini rappresentative dell'analisi ImageStream delle PMN-MDSC **(A)** e M-MDSC **(B)** incubate con o senza batteri provenienti da campioni fecali di topi affetti da CAC, in un rapporto 1:50. **(C)** Produzione intracellulare di ROS da parte di PMN-MDSC in seguito a incubazione con o senza batteri, misurata mediante DCFDA MFI usando la citometria a flusso (n = 4-6). Secrezione di NO, misurata con il reagente di Griess**(D)** e attività dell'arginasi **(E)** di M-MDSC in seguito a incubazione con o senza batteri (n = 3-6). **(F)** Indice di proliferazione di cellule T attivate coltivate con M-MDSC precedentemente incubate con o senza batteri, oppure di cellule T coltivate con i soli batteri. Rapporto 1:100, n = 4-6. **(G)** Livelli di espressione di PD-L1 nelle M-MDSC in seguito a incubazione con o senza i batteri (n = 6). **(H)** Dati della citometria a flusso esprimenti la percentuale di cellule M-MDSC MHCII$^+$/CD86$^+$ (n = 4-6). **(I)** Analisi con citometria a flusso dei livelli di espressione di F4/80 in M-MDSC incubate con o senza batteri ad un rapporto 1:10, con o senza MCSF (n = 4). **(L)** Istogramma dei dati della citometria a flusso rappresentante i livelli di espressione di CD206 nelle M-MDSC incubate con o senza batteri con un rapporto 1:10, in presenza o in assenza di MCSF. A destra i dati sono riassunti ed espressi come MFI (n = 4). I dati sono presentati come ± la media degli errori standard della media (SEM). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***; ****, P < 0.0001.

3.7 Discussione e conclusioni

In questo studio, i ricercatori hanno esaminato a fondo la relazione tra le MDSC e il microbiota intestinale, due fattori chiave nello sviluppo del CAC, in condizioni di infiammazione cronica. Utilizzando un modello murino di CAC che mimasse la patologia umana, è stata osservata nei topi la presenza di una forte risposta infiammatoria locale (colon) e sistemica (sangue, milza e midollo osseo), accompagnata da elevati livelli di MDSC. È stato inoltre appurato che queste MDSC erano in grado di inibire la proliferazione dei linfociti T e portare ad una down-regolazione del CD247, compromettendo la funzione di queste cellule. In aggiunta, i topi affetti da CAC esibivano un'alterata composizione del microbiota rispetto ai topi di controllo: in particolare, essi presentavano una minor diversità del microbiota ed elevati livelli di vari generi batterici associati al CAC, tra cui spicca *Sutterella*, un genere batterico in grado di degradare le IgA. Per definire il ruolo del microbiota alterato e delle MDSC nello sviluppo del CAC, sono stati utilizzati due approcci. Nel primo approccio, topi GF sono stati sottoposti a trapianto di microbiota fecale di topi affetti da CAC o di topi di controllo, prima del protocollo di induzione del CAC. È stato osservato che i topi affetti da CAC FMT-CAC esibivano una patologia più grave rispetto ai topi affetti da CAC control-CAC. Questo suggerisce che la composizione del microbiota di partenza predispone l'individuo allo sviluppo tumorale in condizioni di infiammazione cronica, aprendo la strada per approcci predittivi del CAC utilizzando il microbiota come biomarcatore. Nel secondo approccio, è stata effettuata la deplezione del microbiota di topi affetti da CAC, ed è stato constatato che il trattamento antibiotico ha condotto ad un miglioramento della condizione di salute dei topi, correlata ad una diminuzione dei livelli di MDSC e regressione del tumore. Nel complesso, i risultati ottenuti da due approcci differenti indicano chiaramente l'esistenza di un intimo cross-talk tra le MDSC e il microbiota disbiotico, interazione che sostiene il perpetuo stato infiammatorio alla base della progressione tumorale. Precisamente, l'esposizione delle MDSC ai batteri ne accentua l'attività soppressiva nei confronti dei linfociti T, come dimostrato dall'up-regolazione della molecola PD-L1 nelle M-MDSC esposte. Tra i diversi meccanismi con cui i batteri possono mediare l'up-regolazione di PD-L1, spicca la secrezione da parte di Gram + e Gram – di vescicole membranali extracellulari (MVs). I batteri sono in grado di racchiudere in queste vescicole sferiche la maggior parte del proprio materiale biologico (DNA, RNA, proteine ecc.), proteggendolo. Sembra che la presenza di queste MVs induca la formazione delle MDSC e la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2 antinfiammatorio, in vitro e in vivo, favorendo in esse l'up-regolazione di PD-L1. Oltre ad accentuarne la soppressione nei confronti delle cellule T, l'esposizione delle MDSC ai batteri ne promuove anche il rilascio di fattori associati al CAC, tra cui si distingue la citochina antinfiammatoria IL-10. Recentemente è stato scoperto che l'IL-10 promuove lo sviluppo del tumore, favorendo la sopravvivenza e l'escape immunitario delle cellule tumorali [10]. È probabile che gli elevati livelli di IL-10 riscontrati nei topi affetti da CAC siano dovuti al

reclutamento delle MDSC in seguito alla loro interazione con i batteri disbiotici, che up-regolano l'espressione dell'IL-10, sostenendone l'azione pro-tumorale a discapito di quella antinfiammatoria. Il legame dell'IL-10 con il suo recettore IL-10R presente sulle cellule epiteliali del colon, porta all'attivazione del fattore di trascrizione STAT3 il quale a sua volta up-regola l'espressione dell'enzima DNMT3b. Questa metiltransferasi silenzia l'espressione del soppressore tumorale IRF8 mediante metilazione del suo promotore, favorendo la progressione del tumore a livello del colon [10]. Infine, è stato osservato che l'interazione tra i batteri associati al CAC e le M-MDSC ne altera il differenziamento, bloccandole in uno stato immaturo e immunosoppressivo, polarizzandole verso un fenotipo che ricorda quello M2 antinfiammatorio dei macrofagi. In conclusione, la manipolazione del microbiota per interrompere il cross-talk tra i batteri e le MDSC potrebbe rappresentare una modalità per ostacolare lo sviluppo tumorale allievando l'immunosoppressione della risposta immunitaria. Tuttavia, la complessità del quadro patogenico richiede l'integrazione di ulteriori conoscenze per poter comprendere più a fondo la relazione fra tutti i fattori protagonisti e sviluppare di conseguenza una terapia più efficace. A tale scopo, risulta essenziale una maggiore ricerca sulla composizione del microbiota associato al CAC, sul ruolo duale dell'IL-10 e su tutte le altre incognite attuali.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas et al. ***Immunologia cellulare e molecolare***. Decima edizione.
2. Fantini et al. ***From inflammation to colitis-associated colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Pathogenesis and impact of current therapies***. Dig Liver Dis. 2021 May;53(5):558-565.
3. Sędzikowska et al. ***Human Gut Microbiota in Health and Selected Cancers***. Int J Mol Sci. 2021 Dec 14;22(24):13440.
4. Dan W et al. ***Gut microbiota as a mediator of cancer development and management: From colitis to colitis-associated dysplasia and carcinoma***. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2025 Sep;1880(4):189381.
5. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. ***Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity*.** Nat Rev Immunol 2021;21: 485-98.
6. Wang Y et al. ***Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer***. J Immunother Cancer. 2020 Oct;8(2):e000609.
7. Regueira-Iglesias et al. ***Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: From primer selection to advanced data analysis***. *Molecular Oral Microbiology*, 38, 347–399.
8. Armstrong et al. ***Efficient computation of Faith's phylogenetic diversity with applications in characterizing microbiomes***. Genome Res. 2021 Nov;31(11):2131-2137.
9. Park et. al. ***Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer***. Intest Res. 2018 Jul;16(3):338-345.
10. Ibrahim et al. ***Myeloid-Derived Suppressor Cells Produce IL-10 to Elicit DNMT3b-Dependent IRF8 Silencing to Promote Colitis-Associated Colon Tumorigenesis***. Cell Rep. 2018 Dec 11;25(11):3036-3046.e6.

APPENDICE: ***Articolo discusso nell'elaborato***

Ashkenazi-Preiser et al. ***The Cross-talk Between Intestinal Microbiota and MDSCs Fuels Colitis-associated Cancer Development.*** Cancer Research Communications 2 April 2024; 4 (4): 1063–1081.