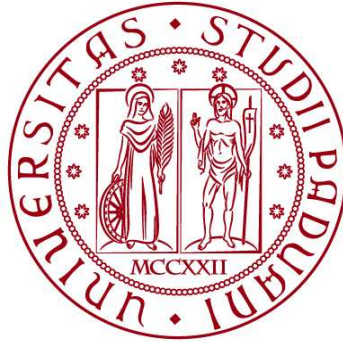


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Sensibilizzazione delle cellule tumorali agli inibitori del checkpoint immunitario attraverso l'*up*-regolazione dei geni HLA di classe I mediata dal microbiota**

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

**Laureanda: Annalisa Paronetto**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## INDICE

### ABSTRACT

<b>1. STATO DELL'ARTE: <i>Introduzione al problema biologico</i></b> .....	1
<b>1.1</b> Azione dei linfociti T citotossici tumore-specifici .....	1
<b>1.2</b> Meccanismo di evasione del tumore basato sulla riduzione dell'espressione delle molecole MHC di classe I .....	2
<b>1.3</b> Immunoterapia basata sugli inibitori del checkpoint immunitario .....	3
<b>1.4</b> Postbiotici prodotti dal microbiota intestinale .....	4
<b>2. APPROCCIO SPERIMENTALE: <i>Materiali e metodi</i></b> .....	5
<b>2.1</b> Produzione di postbiotici e trattamento con postbiotici <i>in vitro</i> .....	5
<b>2.2</b> Quantificazione delle molecole MHC-I e delle diverse sottopopolazioni leucocitarie .....	5
<b>2.3</b> Generazione di cellule T MART-1-specifiche .....	6
<b>2.4</b> Saggio di degranolazione e saggio di citotossicità Delfia .....	7
<b>2.5</b> Trattamento con postbiotici <i>in vivo</i> e controllo della crescita tumorale .....	8
<b>2.6</b> Saggio di attivazione degli splenociti .....	8
<b>2.7</b> Immunofluorescenza .....	8
<b>2.8</b> Purificazione dei biotensioattivi e analisi metabolomica .....	9
<b>2.9</b> Analisi sul trascrittoma delle cellule tumorali .....	10
<b>3. RISULTATI: <i>Analisi critica e discussione dell'approccio sperimentale</i></b> ....	11
<b>3.1</b> Trattamenti con postbiotici <i>in vitro</i> <i>up</i> -regolano l'espressione delle molecole MHC di classe I nelle linee cellulari tumorali di uomo e topo .....	11
<b>3.2</b> Le cellule tumorali trattate con postbiotici incrementano le risposte da parte dei linfociti T citotossici tumore-specifici .....	12
<b>3.3</b> I postbiotici influenzano la crescita tumorale e <i>up</i> -regolano l'esposizione degli antigeni tumorali in MHC di classe I quando combinati con l'immunoterapia <i>in vivo</i> .....	13
<b>3.4</b> I <i>pathways</i> dell'infiammazione innata guidano l' <i>up</i> -regolazione dell'espressione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici nelle cellule tumorali .....	15
<b>3.5</b> L' <i>up</i> -regolazione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici è indipendente dalla possibile contaminazione di LTA .....	17
<b>3.6</b> L' <i>up</i> -regolazione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici è mediata da metaboliti di origine organica .....	18
<b>3.7</b> Discussione e conclusioni .....	19
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	21

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

## ABSTRACT

Diversi studi hanno dimostrato che un microbiota intestinale equilibrato influisce in modo positivo sull'aumento dell'efficacia dell'immunoterapia basata sugli inibitori del checkpoint immunitario (ICIs) nella cura dei tumori solidi. Tuttavia, il meccanismo con cui il microbiota comunica con il sistema immunitario dell'ospite non è stato ancora completamente chiarito.

L'articolo presentato dimostra come i metaboliti rilasciati dai batteri del microbiota, in particolare la fitosfingosina, siano capaci di contrastare il meccanismo di evasione della risposta immunitaria attuato dalle cellule tumorali, che si basa sulla riduzione dell'espressione delle molecole MHC di classe I sulla loro superficie e sulla conseguente inibizione dell'azione antitumorale dei linfociti T citotossici (CTLs) specifici per gli antigeni tumorali presentati in MHC-I.

I risultati ottenuti *in vitro* e *in vivo* mostrano che i postbiotici possono aumentare l'espressione delle molecole MHC-I, potenziando la risposta immunitaria mediata dai CTL, e suggeriscono una nuova combinazione di trattamenti per combattere il tumore: l'associazione dell'immunoterapia basata su ICI con la somministrazione di postbiotici permette di ottenere un maggior controllo della crescita tumorale, anche in pazienti non responsivi alla sola immunoterapia, e una maggiore probabilità di sopravvivenza.

Inoltre, il meccanismo molecolare alla base dell'effetto dei postbiotici risulta essere l'incremento di espressione di NLRC5 indotto dall'attivazione a monte della via di segnalazione MYD88-NF- $\kappa$ B.

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

### 1.1 Azione dei linfociti T citotossici tumore-specifici

I linfociti T citotossici (CTL) sono un sottogruppo di cellule T contraddistinto dal ruolo immunitario di riconoscere ed eliminare cellule che esprimono fenotipi di superficie anomali, che possono essere causati da una trasformazione neoplastica oppure da un'infezione virale o di altri patogeni intracellulari. Esse assumono il ruolo di cellule bersaglio dei CTL poiché espongono sulla loro superficie antigeni endogeni tumorali o virali, necessariamente tramite glicoproteine di presentazione antigenica, le molecole MHC (*Major Histocompatibility Complex*) di classe I, in modo da formare complessi antigenici riconosciuti dai recettori dei CTL [1]. In particolare, le cellule tumorali iniziano a sintetizzare proteine *non-self* a partire o da geni endogeni ospitanti mutazioni o da sequenze provenienti da oncovirus [2]. Appartenendo alla categoria di linfociti T, come i linfociti T helper, i CTL esprimono il recettore TCR (*T-cell receptor*) antigene-specifico e la molecola CD3 per formare il cosiddetto "complesso del TCR". Quest'ultimo poi interagisce con le molecole MHC-I presentanti l'antigene verso cui è specifico. Tuttavia, i CTL hanno la peculiarità di esprimere anche il co-recettore CD8 interagente anch'esso con l'MHC-I. In generale, il complesso del TCR riconosce e lega piccoli frammenti peptidici alloggiati nelle molecole MHC, che sono derivati dal processamento di più grandi antigeni proteici, e di questi riconosce un epitopo sequenziale (o lineare), cioè amminoacidi successivi nella sequenza primaria della proteina [1].

Nel contesto dei tumori, una volta attivato tramite *cross*-presentazione presso l'organo linfoide secondario, il CTL effetttore tumore-specifico può migrare nel tessuto tumorale, laddove le cellule neoplastiche, qualsiasi sia il loro tipo cellulare, esprimono i complessi MHC-I con i frammenti peptidici degli antigeni tumorali. In tale sede, il CTL effetttore riconosce la cellula tumorale che espone il complesso MHC-I presentante l'antigene verso cui il suo TCR è specifico [1].

Il meccanismo d'azione principale con cui i CTL uccidono le cellule tumorali corrisponde al rilascio calcio-dipendente di granuli citotossici, culminante con un evento apoptotico all'interno della cellula bersaglio. Tali granuli citotossici sono lisosomi modificati contenenti almeno tre classi distinte di proteine citotossiche effettrici, ovvero perforine, granzimi e granulisine, tenute insieme dal proteoglicano serglycina. Al riconoscimento della cellula bersaglio da parte del CTL effetttore, il centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) e il Golgi subiscono un riorientamento, polarizzando la cellula e focalizzando l'esocitosi dei granuli preformati presso l'area della membrana in contatto con la cellula bersaglio. Ciò garantisce la selettività d'azione con cui i CTL uccidono una ad una le cellule tumorali riconosciute, senza creare un danno tissutale esteso. A questo punto, le perforine formano dei pori sulla membrana plasmatica della cellula tumorale attraverso i quali i granzimi sono immessi nel suo citosol. Tuttavia, il potenziale litico delle perforine è immediatamente contrastato da un meccanismo di riparo della membrana plasmatica, il quale è capace di impedire la lisi osmotica che invece innescherebbe un processo infiammatorio [1].

I granzimi sono un gruppo di serin-proteasi in grado di stimolare il processo apoptotico attraverso 2 possibili meccanismi, entrambi mediati da proteasi specializzate nell'apoptosi chiamate caspasi. Nel primo, il granzima taglia inizialmente il fattore citoplasmatico BID generandone la forma tronca tBID, la quale induce l'oligomerizzazione di Bak e Bax nella membrana mitocondriale per

consentire la fuoriuscita del citocromo c dallo spazio intermembrana al citosol. I citocromi c si legano alle proteine Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) stimolandone l'oligomerizzazione al fine di formare l'apoptosoma. Quest'ultimo può successivamente reclutare più unità della caspasi iniziatrice, la pro-caspasi 9, la cui aggregazione sull'apoptosoma promuove prima la sua autoproteolisi e poi la proteolisi delle caspasi effettrici, tra cui la caspasi 3. Si tratta del *pathway* intrinseco (o mitocondriale) di apoptosi. In alternativa, il granzima può direttamente tagliare e attivare la pro-caspasi 3. In entrambi i casi la caspasi 3 taglia l'inibitore della DNasi CAD (iCAD) liberando la proteina attiva CAD (*Caspase-Activated Deoxyribonuclease*), capace poi di migrare nel nucleo e degradare il DNA della cellula tumorale [1].

Similmente, la granulicina è una proteina ad attività antimicrobica che ad alte concentrazioni possiede la capacità di indurre apoptosi nelle cellule bersaglio.

Tuttavia, esiste anche un *pathway* estrinseco di apoptosi che viene indotto dall'attivazione dei cosiddetti recettori di morte Fas presenti sulla cellula tumorale dopo esser stati legati da ligandi (FasL) espressi sul CTL [1].

Inoltre, i CTL effettori contribuiscono alla difesa dell'ospite anche rilasciando nel microambiente tumorale delle citochine, come l'interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), il quale aumenta la probabilità che le cellule tumorali vengano riconosciute dai CTL stessi incrementando l'espressione del macchinario di presentazione antigenica (APM) attraverso il *pathway* JAK-STAT, ma funge anche da anti-angiogenico e attivatore dei macrofagi [1, 3].

## **1.2 Meccanismo di evasione del tumore basato sulla riduzione dell'espressione delle molecole MHC di classe I**

Il sistema immunitario ha la capacità di riconoscere ed eliminare molti tumori ancor prima che essi diventino clinicamente evidenti, tuttavia, le cellule tumorali, essendo geneticamente instabili, spesso evolvono sotto la pressione selettiva esercitata dai CTL compiendo il fenomeno dell'*immunoediting*, che promuove la progressione tumorale. Di fatto, esse impediscono il proprio riconoscimento e la propria eliminazione da parte del sistema immunitario poiché diventano meno immunogeniche e meno visibili ai CTL attraverso un meccanismo che inibisce la presentazione degli antigeni tumorali nelle molecole MHC-I. In particolare, le cellule tumorali possono ridurre, anche fino ad abolire, l'espressione di molecole non essenziali per la vita o la crescita cellulare, come gli antigeni tumorali stessi, le molecole MHC-I o altre molecole dell'APM, senza però compromettere la capacità del tumore di crescere e metastatizzare. Infatti, in molti tipi di tumori umani è stata riscontrata una perdita di entità variabile dell'espressione delle molecole MHC-I, a causa di meccanismi che agiscono a vari livelli [2].

Il locus MHC prende il nome di HLA (*Human Leukocyte Antigen*) in uomo (cromosoma 6) e di H-2 in topo (cromosoma 17), ed entrambi contengono geni codificanti le molecole MHC di classe I e altri componenti dell'APM. La catena pesante delle MHC-I viene codificata dai geni HLA-I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) in uomo e dai geni H-2K, H-2D, H-2L in topo, per cui mutazioni o delezioni cromosomiche che li riguardano inattivano l'espressione delle loro proteine in superficie. Inoltre, sul piano trascrizionale, può verificarsi la perdita di fattori di trascrizione chiave per i geni HLA-I, tra cui NLRC5 che è un transattivatore essenziale per la loro espressione basale e/o indotta dall'IFN- $\gamma$ , oppure può essere introdotto un silenziamento epigenetico basato su trimetilazioni istoniche (es.

H3K27me3) o ipermetilazioni nei promotori dei geni HLA-I [2, 3]. La sotto-regolazione delle molecole MHC-I può verificarsi anche dopo la trascrizione dei loro geni, grazie a RNA non codificanti (ncRNA) capaci di indurre la degradazione dei loro mRNA, oppure dopo la traduzione in proteine, conducendole ad un meccanismo di degradazione associato al reticolo endoplasmatico, dal quale vengono dislocate. Questi eventi sotto-regolativi possono anche riguardare l'espressione di altre componenti dell'APM risultando ugualmente nella perdita di espressione delle MHC-I [2].

L'intero meccanismo di evasione non compromette solamente la risposta immunitaria fisiologica ma riduce anche l'efficacia delle immunoterapie mirate al rin vigorimento dei CTL tumore-specifici, come l'immunoterapia basata sul blocco del checkpoint immunitario. Di conseguenza, conoscere le modalità con cui i tumori eludono il controllo immunitario consente di comprendere la patogenesi tumorale ed escogitare strategie volte al miglioramento degli esiti delle immunoterapie [2].

### **1.3 Immunoterapia basata sugli inibitori del checkpoint immunitario**

L'immunoterapia corrisponde ad un trattamento biologico contro i tumori, finalizzato a rafforzare le cellule del sistema immunitario adattativo nella loro attività antitumorale intrinseca. Esistono diverse tipologie di immunoterapia; tra queste, quella basata sugli inibitori del checkpoint immunitario (ICIs, *Immune Checkpoint Inhibitors*) ha rivoluzionato la cura del cancro grazie alla sua bassa tossicità e ai risultati duraturi. Essa prevede che ai pazienti vengano somministrati anticorpi monoclonali specifici contro le molecole del checkpoint immunitario; così chiamate in quanto si tratta di recettori e ligandi, di membrana o solubili, che normalmente mantengono in condizioni omeostatiche le risposte immunitarie inibendo le cellule T precedentemente attivate e prevenendo fenomeni di autoimmunità. Negli ultimi decenni sono stati identificati numerosi recettori inibitori espressi dai linfociti T, come CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, i quali, una volta preso contatto con il proprio ligando esposto su una cellula vicina, danno il via ad una cascata di segnali inibitori all'interno del linfocita T stesso [4]. In condizioni fisiologiche, il recettore CTLA-4 (*CTL-associated Antigen-4*), espresso sulle cellule T subito dopo l'attivazione, compete con il recettore co-stimolatorio CD28, anch'esso sul linfocita T, per il legame alle molecole co-stimolatorie CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) delle APC. Poiché CTLA-4 ha maggior affinità per tali ligandi, esso limita la risposta delle cellule T durante lo stadio iniziale della loro attivazione nel linfonodo. Invece, il recettore PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), espresso sulle cellule T effettrici che hanno raggiunto il microambiente tumorale, lega i ligandi PD-L1 e PD-L2 presenti sulle APC o sulle cellule tumorali, con lo scopo di ridurre la secrezione di citochine pro-infiammatorie, ridurre la proliferazione del linfocita e indurre l'apoptosi. Infatti, le cellule neoplastiche, se da una parte riducono l'espressione delle molecole MHC-I, parallelamente possono anche sovra-esprimere i ligandi PD-L1 e PD-L2, facendo così prevalere i segnali inibitori innescati dall'attivazione di PD-1 nel CTL con cui interagiscono e impedendo l'eliminazione tumorale [4].

Tuttavia, essendo proteine di superficie, possono essere bloccate in modo sterico utilizzando anticorpi monoclonali anti-CTLA-4 (Ipilimumab, Tremelimumab), anti-PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab), anti-PD-L1 (Durvalumab, Atezolizumab, Avelumab), che sono farmaci ormai approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*) perché capaci di impedire l'immunosoppressione che si

verificherebbe nel caso in cui i recettori inibitori interagissero con i loro ligandi sulle cellule tumorali. Si consente quindi di riavviare le funzioni citotossiche dei CTL tumore-specifici e favorire la regressione tumorale.

Ciononostante, gran parte dei pazienti trattati con la terapia basata su ICI, in seguito ad un'iniziale risposta promettente, riscontra un peggioramento della propria malattia; dunque, per aumentare l'efficacia degli ICI e contrastare i tumori solidi aggressivi risultano necessarie delle nuove combinazioni di trattamenti [4].

#### **1.4 Postbiotici prodotti dal microbiota intestinale**

Il microbiota intestinale, cioè la comunità di microrganismi simbiotici che colonizzano l'intestino, gioca un ruolo importante nell'omeostasi del sistema immunitario mucosale e sistemico. Tali batteri che forniscono effetti benefici sulla salute dell'ospite quando assunti in quantità sufficienti sono definiti probiotici. Alcuni studi scientifici *in vitro* hanno riscontrato un'attività antitumorale associata ad estratti delle specie di *Lactobacillus* e di *Bifidobacterium*, dimostrando come la comunicazione tra microbiota e sistema immunitario sia in parte mediata dai metaboliti solubili rilasciati dai probiotici vivi o da componenti microbiche non vitali rilasciate con la loro lisi cellulare [5]. Queste molecole a basso peso molecolare prendono il nome di postbiotici e sono caratterizzate dall'aver attività biologica nell'ospite, come qualità funzionali antimicrobiche, antiossidanti, antinfiammatorie, immunomodulatorie e antiproliferative [5]. Di conseguenza, il microbiota emerge come un modulatore del microambiente tumorale, e, se alterato a causa di trattamenti antibiotici (disbiosi microbica) in pazienti affetti da tumore, può contribuire alla progressione della patologia.

I postbiotici secreti nell'intestino da parte della microflora vivente derivano dal processo di fermentazione anaerobica dei prebiotici, cioè nutrienti organici provenienti dalla dieta il cui prodotto di degradazione sono proprio i postbiotici. Successivamente essi possono superare la barriera vascolare ed entrare nel circolo sanguigno andando ad influenzare anche gli organi distanti [5].

I batteri intestinali possono produrre come postbiotici diverse molecole: corte catene di acidi grassi (SCFAs, *Short-Chain Fatty Acids*), vitamine, frammenti di parete cellulare, polisaccaridi extracellulari, lisati cellulari e acidi teicoici. In particolare, gli SCFA (1-6 C) derivano dalla fermentazione di polisaccaridi vegetali non digeribili dall'ospite, come cellulosa, frutto-oligosaccaridi e inulina, e i principali SCFA sono l'acetato, il propionato e il butirato, presenti rispettivamente in rapporto 60:20:20 nel colon. Il butirato è una delle più importanti risorse trofiche per gli enterociti dato che sostiene la rigenerazione dell'epitelio intestinale, ma ha anche attività antinfiammatoria poiché riduce l'espressione delle citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$  [4]. Proprio gli SCFA hanno mostrato del potenziale nella sensibilizzazione delle cellule tumorali al trattamento con ICI durante test clinici *in vitro* su diversi tipi di cancro, aprendo così la strada a studi più approfonditi sui meccanismi molecolari che stanno alla base dell'influenza dei postbiotici sulla risposta immunitaria contro il cancro [5].

Inoltre, in questo studio sull'effetto dei postbiotici, viene preso in considerazione lo sfingolipide fitosfingosina (PS), uno dei principali componenti delle membrane cellulari di lievito e piante ma che si ritrova anche nella cute e nell'intestino tenue dei mammiferi ed è noto per avere una potente attività antinfiammatoria.



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

### 2.1 Produzione di postbiotici e trattamento con postbiotici *in vitro*

Ottenere una miscela di postbiotici richiede che venga preparata una soluzione definita “*cell-free supernatant*” (CFS), corrispondente alla matrice liquida di una coltura batterica priva di cellule batteriche ma arricchita di prodotti del metabolismo microbico e molecole di batteri non vitali [5].

I ricercatori hanno scelto di estrarre i metaboliti sia da due specie ritrovate abbondantemente nel microbiota intestinale di pazienti responsivi all’immunoterapia con ICI, ovvero *Akkermansia muciniphila* e *Bifidobacterium longum*, sia dal ceppo di *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5220, scoperto capace di proteggere i topi dall’insorgenza della colite tramite loro esperimenti precedenti. I loro postbiotici sono stati generati da un processo di fermentazione naturale, in modo altamente controllato attraverso la tecnologia innovativa PBTech. Ad esempio, a partire dalla crescita del ceppo *L. paracasei* CNCM I-5220, avvenuta in un mezzo di fermentazione a 37°C, è stato necessario precipitare la biomassa batterica, risospenderla in un altro mezzo di fermentazione definito, contenente corte catene di frutto-oligosaccaridi (scFOS, *short-chain Fructooligosaccharides*) come prebiotici, e proseguire l’incubazione per altre 24 ore. Le cellule batteriche sono state poi separate mediante centrifugazione dal terreno di coltura, che contiene i postbiotici (PB), ottenendo così un precipitato di cellule e un surnatante ricco di metaboliti, il CFS. Per garantire l’assenza di batteri vivi residui il surnatante è stato pastorizzato a 90°C per 10 minuti, e poi arricchito con maltodestrina, un carboidrato rapidamente assorbibile da considerarsi il mezzo di controllo in tutti gli esperimenti di quest’articolo che utilizzano PB. Infine, il processo di *spray drying* trasforma la sospensione liquida di PB in polvere per la conservazione.

A questo punto, diverse linee cellulari tumorali, sia umane (SK-BR-3, K562, HCC1954, HCC1569, HsMel13, HsMel12, 624.38, Thp1) che murine (4T1, CT26, B16-F10), sono state sottoposte al trattamento con postbiotici per studiarne gli effetti:  $2-3 \times 10^4$  cellule tumorali di ciascuna linea cellulare vengono seminate in piastre da 96 pozzetti e poi trattate per 24-48 ore con concentrazioni tra 0.62-10 mg/mL di PB oppure di mezzo di controllo, all’interno di un terreno R10. I campioni di cellule appena trattate sono stati lavati con la soluzione tampone PBS (*Phosphate Buffered Saline*) per poi essere marcati con specifici anticorpi fluorescenti a seconda degli esperimenti.

### 2.2 Quantificazione delle molecole MHC-I e delle diverse sottopopolazioni leucocitarie

Per valutare l’espressione media delle molecole MHC-I sulla superficie delle cellule tumorali pretrattate in modo diverso tra loro, il campione deve essere incubato con anticorpi monoclonali anti-HLA-ABC (1:200, clone W6/32), se il campione è di cellule umane, oppure con anticorpi monoclonali anti-H-2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> (1:200), se il campione è di cellule murine. Nel caso particolare dei monociti tumorali Thp1 è stato utilizzato l’anticorpo monoclonale anti-HLA-A2 (1:200), specifico contro il sierotipo HLA-A2 delle molecole MHC-I. Tutti questi anticorpi primari antigene-specifici sono marcati con i fluorofori in modalità diretta.

In più, i campioni sono stati trattati con il colorante *Fixable Live/Dead Viability Dye BV510* (1:1000) per 15 minuti a 2-8°C, il quale non riesce a penetrare

all'interno delle cellule vitali e quindi in esse reagisce solo con le ammine di superficie, producendo così una fluorescenza a bassa intensità, mentre nelle cellule con membrane compromesse reagisce anche con le ammine intracellulari restituendo una fluorescenza intensa. In questo modo è possibile discriminare le cellule vive da quelle morte sulla base dell'intensità di fluorescenza di questo colorante nel corso della successiva analisi [6].

Una volta lavate, le cellule sono state risospese in un buffer da citometria a flusso prima di farle correre nell'analizzatore FACSCanto II. La citometria a flusso (o citofluorimetria) è una tecnica d'analisi multiparametrica che permette di ottenere contemporaneamente informazioni su numerose caratteristiche delle cellule di una sospensione cellulare, tra cui il livello di espressione di antigeni di superficie o intracellulari. Il citofluorimetro è uno strumento capace di aspirare il campione di cellule marcate grazie a pompe e valvole, e disporle ordinatamente in fila una ad una sulla base della differenza di pressione tra le cellule e il liquido circostante, seguendo il principio della "focalizzazione idrodinamica". Le singole cellule poi raggiungono la camera di conta dello strumento dove vengono colpite, una alla volta, da uno o più fasci di luce laser, capaci sia di causare la dispersione della luce sia di eccitare i fluorofori. Un rilevatore posto frontalmente raccoglie la luce dispersa entro piccoli angoli dalla direzione del fascio incidente, dando informazioni sulla grandezza cellulare, mentre un rilevatore posto ortogonalmente raccoglie insieme la luce dispersa e quella riemessa dalla fluorescenza dei fluorofori. Quest'ultima viene poi separata nelle varie componenti a lunghezza d'onda diversa grazie a specchi diecrici che precedono dei fotomoltiplicatori, in modo che venga selezionata, misurata e amplificata l'intensità di fluorescenza tipica del fluoroforo coniugato all'anticorpo che ha riconosciuto le molecole MHC-I. Infine essa viene convertita in un segnale elettrico rappresentativo della quantità di molecole MHC-I esposte sulla superficie della cellula [6].

Similmente, per quantificare la percentuale con cui un particolare tipo di leucocita si ritrova in un campione di tessuto pretrattato *in vivo*, il tessuto, dopo esser stato processato in una sospensione cellulare, viene incubato con anticorpi anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD107a, a seconda delle necessità, che sono i marcatori di sottopopolazioni cellulari sempre più ristrette, e viene sottoposto al medesimo protocollo di citometria a flusso.

### **2.3 Generazione di cellule T MART-1-specifiche**

L'attivazione di cellule T con TCR specifico verso l'antigene tumorale MART-1 è un evento necessario per valutare, nelle fasi successive, l'attività citotossica dei CTL contro le cellule di melanoma. I ricercatori hanno isolato i CTL (CD8<sup>+</sup>) e i monociti (CD14<sup>+</sup>) da un campione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) di un donatore sano, utilizzando delle *beads* magnetiche e delle colonne di estrazione della tecnologia MACS.

Grazie alla somministrazione della citochina istruttoria IL-4 e del fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) per 5-6 giorni, hanno indotto il differenziamento dei monociti in cellule dendritiche (moDCs, *monocytes-derived Dendritic Cells*) e poi le hanno incubate con il peptide MART-1 10 µM per 2 ore, affinché esso venisse fagocitato ed esposto dalle moDC presso le molecole HLA-A2, divenendo così APC mature. A questo punto, i CTL autologhi e specifici nel riconoscimento degli epitopi di MART-1 sono stati attivati co-coltivandoli in rapporto 1:10 con le moDC all'interno di una piastra da

24 pozzetti e, dopo 10-12 giorni, sono stati stimolati nuovamente con la medesima procedura. Inoltre, le citochine IL-2 e IL-15 vengono somministrate ogni 3 giorni per supportare il differenziamento, l'espansione e la sopravvivenza dei CTL MART-1-specifici.

#### 2.4 Saggio di degranolazione e saggio di citotossicità Delfia

Il saggio di degranolazione è finalizzato a misurare il livello di attività potenzialmente citotossica dei CTL esaminando l'espressione in superficie dell'antigene CD107a, una proteina tipica della membrana dei granuli citotossici che è normalmente nascosta a livello intracellulare ma che, in seguito alla fusione della membrana dei granuli con quella citoplasmatica prevista dalla degranolazione, diventa un marcatore di superficie dei CTL effettori [7].

Lo studio ha previsto l'incubazione per 5 ore dei CTL MART-1-specifici appena attivati con cellule di melanoma (HsMel13, HsMel12), pretrattate alternativamente con PB o mezzo di controllo, in 200  $\mu$ L di terreno R-10. Questo è avvenuto in presenza dell'anticorpo anti-CD107a (1:200) coniugato con un fluoroforo, ma anche di brefeldina A (10  $\mu$ g/mL) e di *GolgiStop* (1:1000) contenente monensina, i quali sono inibitori del trasporto proteico all'interno dei linfociti attivati. Inoltre, l'anticorpo monoclonale murino W6/32 è stato aggiunto in alcuni campioni per bloccare specificatamente le molecole HLA-I esponenti l'antigene e quantificare i CTL effettori anche in condizioni di inibizione del riconoscimento tumorale. Infine, le cellule T sono state incubate sia con anticorpi anti-CD3 e anti-CD8, per distinguere la fluorescenza specifica dei CTL, sia con il colorante di vitalità in modo da rendere possibile la quantificazione percentuale delle cellule T CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> tramite citometria a flusso.

Affinché si approfondisca il meccanismo indotto da PB, questo saggio deve essere accompagnato dal saggio di citotossicità Delfia, che misura la percentuale di cellule tumorali lisate dai CTL effettori e quindi l'attività citotossica già svolta. Le cellule di melanoma 624.38 sono state pretrattate con PB o mezzo di controllo e poi raccolte, lavate e risospese prima di essere incubate per 30 minuti a 37°C con 3  $\mu$ L del reagente Delfia-BATDA. Si tratta di un estere acetossimetilico che penetra rapidamente attraverso la membrana delle cellule tumorali vitali e al loro interno viene idrolizzato dalle esterasi intracellulari a TDA, che non può più fuoriuscire liberamente. Dopo alcuni lavaggi con il terreno RPMI-1640, le cellule tumorali sono state incubate in rapporto 1:10 con i CTL MART-1-specifici per 90 minuti a 37°C, in modo che la quantità di TDA rilasciato nel mezzo dalle cellule tumorali grazie all'azione delle perforine sia indicativo della quantità di cellule lisate dall'attività citotossica dei CTL. Aggiungendo al surnatante una soluzione di europio (Eu<sup>3+</sup>) si forma un chelato fluorescente (EuTDA), il cui segnale viene misurato da un lettore di micropiastre VICTOR. Tuttavia, alcune cellule di melanoma marcate con BATDA sono state risospese in un terreno privo di CTL, permettendo di misurare il rilascio spontaneo di TDA, e altre in un tampone di Triton X-100, permettendo di misurare invece il rilascio massimo [8]. La percentuale di TDA rilasciato specificatamente dalle cellule tumorali uccise dai CTL si ottiene con la seguente formula:

$$\% \text{ lisi cellulare} = 100 \times \frac{\text{rilascio sperimentale} - \text{rilascio spontaneo}}{\text{rilascio massimo} - \text{rilascio spontaneo}}$$

## 2.5 Trattamento con postbiotici *in vivo* e controllo della crescita tumorale

I ricercatori hanno eseguito l'iniezione ortotopica di  $1.5 \times 10^5$  cellule di cancro del seno triplo negativo (TNBC) 4T1 in alcune femmine di topo BALB/c di 6-8 settimane, mentre in altre hanno iniettato al fianco destro a livello sottocutaneo  $5 \times 10^5$  cellule di carcinoma colon-rettale (CRC) CT26. Una volta introdotta la patologia tumorale *in vivo*, dopo 3 o 7 giorni dall'iniezione, rispettivamente per il modello 4T1 e CT26, i topi sono stati trattati per via intraperitoneale oppure per via orale con 250  $\mu$ g di PB o mezzo di controllo in combinazione con 200  $\mu$ g del farmaco immunoterapico anti-PD-1, ripetendo il trattamento fino ad un totale di 4 somministrazioni.

Quotidianamente i ricercatori hanno effettuato le misurazioni di lunghezza e spessore della massa tumorale al fine di monitorare l'andamento temporale del volume tumorale in  $\text{cm}^3$ :

$$\text{Volume del tumore} = \frac{\text{lunghezza} \times \text{spessore}^2}{2}$$

Dopo 18 giorni dall'iniezione è stata raccolta la massa tumorale da ciascun topo, oltre alla milza nel caso dei topi portatori di 4T1, per compiere successive analisi di espressione antigenica su tali cellule tramite la citometria a flusso.

## 2.6 Saggio di attivazione degli splenociti

La milza raccolta dai topi portatori del tumore 4T1 è stata processata per creare una sospensione di singoli splenociti (linfociti T e B, DCs, macrofagi della milza) tramite un filtro, mentre gli eritrociti sono stati lisati con il buffer di lisi (cloruro di ammonio). Poi gli splenociti sono stati messi in co-coltura con cellule tumorali 4T1 (1:1) e, dopo 24 ore, incubati con anticorpi anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-41BB coniugati a fluorofori. L'antigene 41BB è un recettore co-stimolatorio espresso sulla superficie delle cellule T effettrici, il quale legandosi al suo ligando 41BBL provoca la loro proliferazione. Quindi le cellule sono state analizzate tramite la citometria a flusso per misurare la percentuale di linfociti  $\text{CD8}^+41\text{BB}^+$ , corrispondente a quella di CTL effettrici infiltranti la milza.

## 2.7 Immunofluorescenza

In questo articolo, l'espressione di NLRC5 nelle cellule tumorali SK-BR-3 è stata quantificata utilizzando l'immunofluorescenza, una tecnica immunochimica altamente specifica per rilevare e localizzare un'ampia gamma di antigeni in campioni di tessuto o cellule. Essa si basa sul rilevamento dell'intensità di segnale fluorescente generato da interazioni stabili tra proteine bersaglio e anticorpi specifici coniugati con molecole fluorescenti. Si parla di immunofluorescenza diretta se si usa solo l'anticorpo primario coniugato al fluoroforo, mentre si parla di immunofluorescenza indiretta se si usa un anticorpo secondario coniugato al fluoroforo che è diretto contro quello primario non marcato [9].

Prima della semina delle cellule tumorali in piastre da coltura tissutale, esse sono state trattate con 10  $\text{mg/mL}$  di PB o mezzo di controllo per un tempo variabile, consentendo la stimolazione dell'espressione di HLA-I ed eventualmente anche di NLRC5, qualora esso sia coinvolto nel pathway di *up*-regolazione del precedente locus. In seguito, le cellule sono state fissate attraverso paraformaldeide al 4% e le membrane, citoplasmatica e nucleare, sono state permeabilizzate con il detergente Triton X-100 al 0.3%, per consentire agli anticorpi libero accesso agli antigeni intracellulari. Inoltre, per ridurre il rumore

di fondo, i siti reattivi non bersaglio sono stati bloccati con albumina di siero bovino (BSA). A questo punto i campioni sono stati incubati con gli anticorpi primari anti-NLRC5 (1:100) di topo, con o senza quelli anti-NF $\kappa$ Bp65 (1:500) di coniglio, in modo che si verifichi la reazione immunitaria antigene-anticorpo rispettivamente con NLRC5 e p65 della famiglia NF- $\kappa$ B e si possa indagare il loro coinvolgimento nel medesimo *pathway*. L'immunofluorescenza indiretta di questo esperimento ha richiesto l'incubazione anche con anticorpi secondari di asino coniugati a fluorofori ottenendo così un'amplificazione del segnale: l'anticorpo contro epitopi murini coniugato con AF647, che emette luce nel rosso lontano, e l'anticorpo contro epitopi di coniglio coniugato con AF555, che emette luce nel giallo. La contro-colorazione dei nuclei è stata svolta inserendo nel reagente montante il colorante fluorescente DAPI. Infine, si compie l'osservazione delle cellule tumorali con immersione in olio tramite il microscopio confocale a scansione laser. L'intensità del segnale luminoso ad una specifica lunghezza d'onda è indicativa del livello di espressione delle proteine legate dall'anticorpo che emana tale fluorescenza all'interno delle cellule del campione. Le immagini sono state analizzate con il *software* Fiji per la scelta dei colori con cui visualizzare il segnale fluorescente.

## **2.8 Purificazione dei biotensioattivi e analisi metabolomica**

L'identificazione dei metaboliti di origine microbica contenuti nella miscela di PB, responsabili dell'effetto sulle cellule tumorali, corrisponde all'analisi del metaboloma, che include carboidrati, amminoacidi, nucleotidi e lipidi. I ricercatori, dopo un'iniziale acidificazione della miscela di PB con una soluzione di HCl 6N, ne hanno purificato la componente organica aggiungendo del cloroformio-metanolo (2:1 v/v), che permette di ottenere un sistema bifasico in seguito ad uno step di centrifugazione: come surnatante si ha la fase acquosa con il metanolo solubile, mentre come pellet la fase organica di interesse composta da metaboliti e cloroformio. A livello dell'interfaccia tra le due fasi si stabiliscono i tensioattivi biologici, composti anfifilici capaci di ridurre le forze intermolecolari esponendo i propri gruppi idrofili verso il surnatante e i propri gruppi lipofili verso il pellet. In seguito, il pellet è stato lavato in PBS, risospeso in solvente dimetilsolfossido (DMSO) e privato della componente proteica tramite l'estrazione con metanolo. L'estratto è stato poi suddiviso in 5 frazioni, di cui una funge da riserva mentre le altre 4 vengono sottoposte alla cromatografia liquida *ultra-performance* (UPLC) tramite colonnine ACQUITY (Waters). Alcuni campioni sono stati separati con UPLC a fase inversa (RP-UPLC), altri con UPLC basata su interazioni idrofiliche (HILIC-UPLC). La UPLC è una tecnica che garantisce una netta separazione delle specie organiche del campione in base alle loro interazioni con la fase stazionaria del supporto e la fase eluente, cioè in base al loro tempo di ritenzione (RT) [10].

L'identità dei composti eluiti in modo dilazionato nel tempo viene determinata tramite l'accoppiamento della UPLC con la spettrometria di massa (MS), che prevede la ionizzazione elettrospray riscaldabile (HESI-II) in modalità ionica positiva o negativa dei composti, e la separazione in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli ioni tramite il triplo quadrupolo (MS/MS) Orbitrap. Si ottiene uno spettro di massa con l'abbondanza relativa degli ioni molecolari in funzione del loro rapporto  $m/z$  [10]. I dati grezzi dei campioni sperimentali sono stati sottoposti all'identificazione dei picchi e al controllo di qualità utilizzando il *software*

Metabolon. Successivamente, per la profilazione dei composti, i dati vengono confrontati con una libreria di valori di RT, m/z e spettri di massa appartenenti a molecole standard. Infine, per ciascun metabolita all'interno di ogni lotto di strumenti, i dati quantitativi dei vari campioni vengono divisi per la mediana di tali campioni all'interno del lotto, risultando così normalizzati per i *bias* sperimentali e esprimibili come valori di intensità scalare.

## 2.9 Analisi sul trascrittoma delle cellule tumorali

Al fine di individuare il processo biologico che sottende all'*up*-regolazione delle molecole MHC-I, i ricercatori hanno estratto il trascrittoma da campioni di cellule SK-BR-3 nelle due diverse condizioni di pretrattamento, ed è stata controllata la qualità dell'RNA totale estratto tramite il sistema Agilent 4200 TapeStation affinché vengano utilizzati solo i trascritti con RIN>8 nella generazione della libreria per il sequenziamento. Per prima cosa, mediante il kit *SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA*, contenente una trascrittasi inversa e diversi primer, gli RNA sono stati retrotrascritti a doppie eliche di cDNA a lunghezza piena. Esse poi sono state sia processate, tramite l'aggiunta di adattatori che includono indici e regioni complementari ai primer da PCR e da sequenziamento (*Nextera XT DNA Library Preparation Kit*), sia controllate in termini di qualità con lo stesso sistema precedente. Il successivo sequenziamento dei campioni è stato eseguito con la tecnologia Illumina NextSeq 550 per ottenere delle sequenze di basi *single-end*, ovvero generate a partire da un'unica estremità per ciascun frammento. I dati grezzi vengono poi sottoposti al controllo di qualità con FastQC e all'eliminazione sia di specifiche regioni di sequenza, come gli adattatori, sia di intere sequenze con lunghezza e qualità insufficienti tramite Trimmomatic. Solo le sequenze che hanno superato questi passaggi subiscono l'allineamento sul genoma umano di riferimento (GRCh38) da parte del programma STAR (*Spliced Transcripts Alignment to a Reference*) e, in seguito, il numero di sequenze mappate su ciascun gene viene contato dal programma featureCounts.

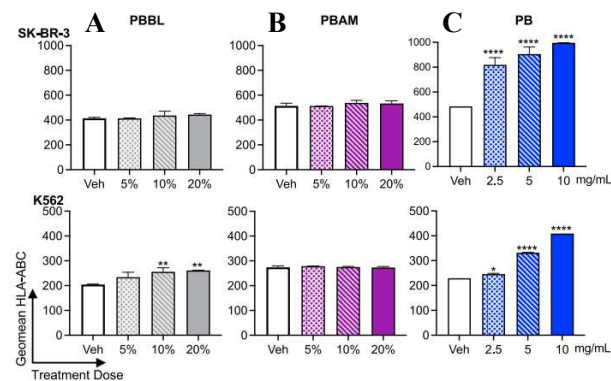
A questo punto, attraverso il pacchetto R DESeq2 sono state eseguite delle analisi statistiche per verificare la significatività delle variazioni riscontrate tra le conte sui geni nei diversi campioni. Una volta normalizzati i dati del livello di espressione genica, si calcola per ciascun gene il  $\log_2$  del rapporto di tali dati nelle due condizioni di trattamento e, infine, viene eseguita l'analisi GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) sull'elenco di geni pre-classificato in modo da individuare i processi biologici che cambiano a seconda del tipo di trattamento sulle cellule.

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

#### 3.1 Trattamenti con postbiotici *in vitro* up-regolano l'espressione delle molecole MHC di classe I nelle linee cellulari tumorali di uomo e topo

Poiché si è osservato che i postbiotici sono responsabili della sensibilizzazione del tumore all'immunoterapia basata su ICI *in vitro*, i ricercatori hanno voluto verificare se l'effetto dei postbiotici rilasciati da *B. longum* (PBBL), *A. muciniphila* (PBAM) e *L. paracasei* CNCM I-5220 (PB) si sarebbe tradotto in una stimolazione dell'espressione delle molecole MHC di classe I nelle cellule tumorali. Testando PBBL, PBAM e PB su cellule tumorali umane delle linee SK-BR-3 (tumore al seno) e K562 (tumore mieloide), esprimenti entrambe bassi livelli iniziali di MHC-I, i risultati della citometria a flusso hanno mostrato un aumento significativo e dose-dipendente dell'espressione delle HLA-I nel caso della somministrazione di PB, mentre PBAM non ha indotto effetti in nessuna linea cellulare e PBBL ha provocato un'up-regolazione minimale solo nelle cellule K562 (fig. 1).

**Figura 1.** Il trattamento con PB causa un effetto dose-dipendente sulle cellule tumorali SK-BR-3 e K562, al contrario di PBAM e PBBL. Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-ABC calcolata sui dati ottenuti tramite citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC contro le cellule SK-BR-3 e K562, pretrattate per 48h o con mezzo di controllo, o con PBBL/PBAM concentrati al 5%, 10% e 20% (A, B) o con PB concentrato a 2.5, 5, 10 mg/mL (C). Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *one-way* ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

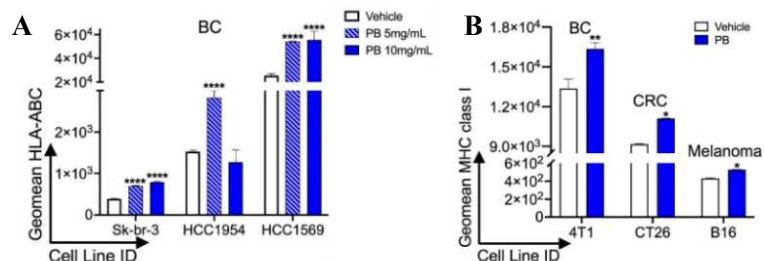


A questi esperimenti ne sono seguiti altri finalizzati a screenare l'attività di PB in molteplici tipologie di cancro sia umano che murino (fig. 2) ed è risultato che complessivamente la massima dose di PB (10 mg/mL) è capace di indurre l'up-regolazione delle molecole HLA-I nel 70% delle linee cellulari testate.

I ricercatori hanno osservato che ulteriori linee cellulari umane di tumore al seno (HCC1954, HCC1569) possiedono una sensibilità diversa tra loro alle medesime concentrazioni di PB e la citometria a flusso su linee cellulari murine, quali 4T1, CT26 e B16-F10 (melanoma), ha confermato la capacità di PB di up-regolare le molecole MHC-I anche sulla loro superficie.

**Figura 2.** Il trattamento con PB sulle linee cellulari di tumore al seno umano e di tumori murini induce l'aumento di espressione delle molecole HLA di classe I. (A) Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-ABC calcolata sui dati della citometria a flusso in

seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC contro le cellule umane SK-BR-3, HCC1954 e HCC1569, pretrattate per 48h alternativamente con mezzo di controllo, PB 5 mg/mL o PB 10 mg/mL. (B) Media geometrica dell'espressione delle molecole H-2K<sup>b</sup> e H-2K<sup>d</sup> calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-H-2K<sup>b</sup> e anti-H-2K<sup>d</sup> contro le cellule murine 4T1, CT26 e B16 pretrattate per 48h



alternativamente con PB 10 mg/mL o mezzo di controllo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *two-way* ANOVA (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

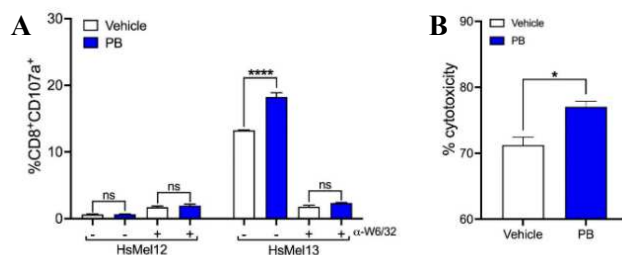
Viene poi indagato se questo effetto *up*-regolativo delle MHC-I mediato da PB possa riguardare anche le cellule del sistema immunitario, quali i linfociti T CD8<sup>+</sup> e le APC (monociti CD14<sup>+</sup> e moDC); tuttavia è stato osservato solo un bassissimo effetto di PB su di esse, e persino una leggera riduzione della già elevata espressione delle proteine HLA-I sulle moDC (dato non mostrato).

### 3.2 Le cellule tumorali trattate con postbiotici incrementano le risposte da parte dei linfociti T citotossici tumore-specifici

Una volta dimostrato l'incremento di espressione delle molecole MHC-I nelle cellule tumorali grazie ai postbiotici, lo step successivo dello studio ha interessato l'analisi dell'effetto di PB sull'attività dei linfociti T specifici verso gli antigeni tumorali alloggiati proprio nelle MHC-I. Pretrattando con PB due linee cellulari di melanoma primario umano, ovvero la HsMel13 esprime l'antigene tumorale MART-1 e la HsMel12 priva del precedente antigene, è stata effettuata la citometria a flusso mirata verso le molecole MHC-I, la quale ha nuovamente confermato una loro significativa *up*-regolazione in entrambe le linee cellulari (dato non mostrato). A questo punto, tramite il saggio di degranolazione, è stata misurata la percentuale di CTL MART-1-specifici effettori che hanno riconosciuto le cellule tumorali dei due modelli: la mancata risposta dei CTL MART-1-specifici verso le cellule HsMel12 dopo qualsiasi tipo di trattamento è dovuta all'assenza dell'antigene MART-1 sulla loro superficie, mentre il significativo incremento della loro azione citotossica contro le cellule HsMel13 in seguito al trattamento con PB è dovuto al fatto che esse esprimono MART-1 nelle molecole HLA-A2 e queste ultime sono oltretutto sovra-esprese grazie a PB (*fig. 3A*). Quindi si ottiene un generale aumento del riconoscimento delle cellule tumorali da parte dei CTL *in vitro*. Inoltre, la scelta di aggiungere in alcuni campioni l'anticorpo murino anti-W6/32, che funge da blocco delle proteine HLA-I espresse sulle cellule di melanoma, ha permesso di dimostrare come cala la risposta dei CTL MART-1-specifici nonostante tali cellule siano state pretrattate con PB, dato che viene impedito il riconoscimento del complesso di presentazione antigenica da parte del TCR. Ciò è stato fatto per rafforzare la veridicità dell'ipotesi che l'effetto dei postbiotici si espliciti nel rafforzamento della risposta effettrice dei CTL tumore-specifici come conseguenza diretta dell'aumento di espressione delle molecole MHC-I.

In più, l'attività citotossica dei CTL MART-1-specifici attivati contro il tumore viene valutata mediante il saggio di citotossicità Delfia, svolto su ulteriori cellule di melanoma umano 624.38 pretrattate con PB o mezzo di controllo; viene confermato così l'aumento della percentuale di cellule tumorali che subiscono lisi per mezzo dell'azione dei CTL effettori in seguito al trattamento con PB rispetto al controllo (*fig. 3B*).

**Figura 3.** Il trattamento con PB sulle cellule di melanoma primario umano provoca un aumento della degranolazione e dell'attività citotossica dei CTL MART-1-specifici. (A) Percentuale di cellule CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> (CTL MART-1-specifici effettori) misurata tramite citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-CD8

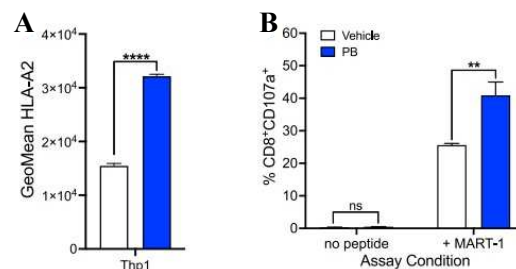




e anti-CD107a (saggio di degranulazione), dopo 5h di co-coltura delle cellule CD8<sup>+</sup> MART-1-specifiche con le cellule tumorali HsMel12 e HsMel13 pretrattate con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo, in presenza (+) o assenza (-) dell'inibitore anti-W6/32. **(B)** Percentuale del rilascio specifico di TDA misurato tramite il saggio di citotossicità Delfia, dopo aver piastrato i CTL MART-1-specifici con cellule di melanoma umano 624.38 pretrattate per 48h con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *two-way* ANOVA **(A)** o il t-test **(B)** (\*, p<0.05; \*\*\*, p<0.0001; ns = non significativo).

In seguito, i ricercatori hanno voluto dimostrare direttamente la necessità di avere un antigene tumorale esposto sulle molecole MHC-I per scatenare l'azione effettrice delle cellule T. Quindi, attraverso le tecniche della citometria a flusso e del saggio di degranulazione è stata testata l'abilità delle cellule della linea murina Thp1 (leucemia monocitica acuta), precedentemente incubate con il peptide immunogeno MART-1 e pretrattate con PB o mezzo di controllo, di incrementare rispettivamente le MHC-I e il loro riconoscimento da parte dei CTL MART-1-specifici. Il pretrattamento con PB delle cellule Thp1 ha in primis aumentato l'espressione di HLA-A2 rispetto al campione di controllo (*fig. 4A*). Conseguentemente, soltanto qualora sia stato somministrato MART-1 i CTL hanno agito in quantità superiore grazie a PB, invece, laddove il peptide non è stato aggiunto, venendo meno la presentazione dell'antigene tumorale, nessun tipo di pretrattamento è riuscito ad incrementare la quantità di CTL che compiono degranulazione (*fig. 4B*). Da questo si evince che il complesso MHC-I associato all'antigene tumorale è fondamentale e che esiste una robusta relazione causa-effetto tra l'aumento della presentazione antigenica in MHC-I, indotta dai postbiotici, e il potenziamento dell'attività immunitaria dei CTL tumore-specifici.

**Figura 4.** Il trattamento con PB sui monociti tumorali umani della linea Thp1 provoca un aumento dell'espressione delle molecole HLA-A2 e dell'attivazione dei CTL MART-1-specifici solo in presenza del peptide MART-1. **(A)** Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-A2 calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-A2 contro i monociti umani Thp1, pretrattati per 48h alternativamente con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo. **(B)**

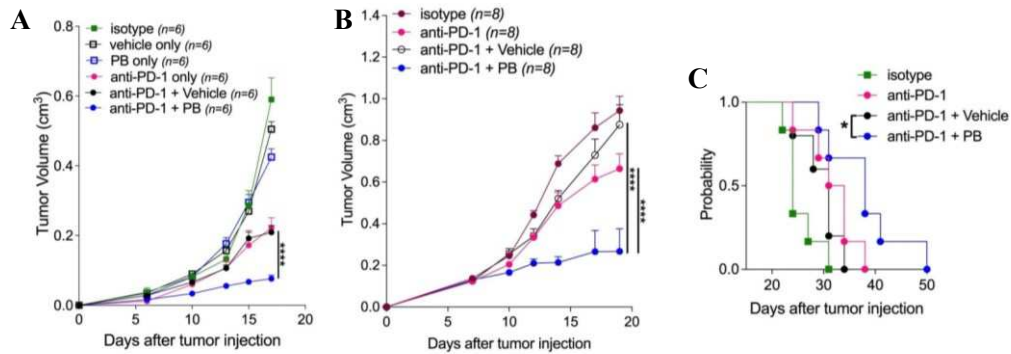


Percentuale di cellule CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> (CTL MART-1-specifici effettori) misurata tramite citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-CD8 e anti-CD107a (saggio di degranulazione), dopo 5h di co-coltura delle cellule CD8<sup>+</sup> MART-1-specifiche con i monociti Thp1 pretrattati con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo, in assenza (*no peptide*) o presenza (*+ MART-1*) del peptide MART-1. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La significatività dei risultati viene verificata mediante il t-test **(A)** o il test *two-way* ANOVA **(B)** (\*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.0001; ns = non significativo).

### 3.3 I postbiotici influenzano la crescita tumorale e *up*-regolano l'esposizione degli antigeni tumorali in MHC di classe I quando combinati con l'immunoterapia *in vivo*

Dato che i precedenti studi *in vitro* hanno dimostrato una chiara correlazione tra l'utilizzo dei postbiotici e l'aumento della risposta antitumorale dei CTL, i ricercatori hanno replicato *in vivo* l'analisi su topi BALB/c portatori del tumore murino appartenente al modello 4T1 o CT26. In particolare, hanno testato su alcuni topi inoculati con il tumore il pretrattamento con PB associato all'immunoterapia con anti-PD-1 e su altri topi la sola immunoterapia. I risultati sperimentali hanno rivelato una significativa attenuazione della crescita volumetrica di entrambi i modelli di tumore murino nel tempo grazie al trattamento combinato (*fig. 5A-B*) e un prolungamento della sopravvivenza, fino a quasi 50 giorni dopo l'iniezione

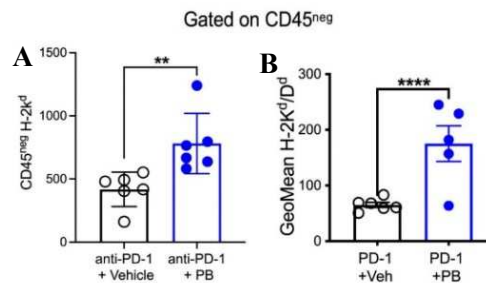
tumorale, nei topi portatori di 4T1 sottoposti a doppio trattamento, a differenza di quelli trattati esclusivamente con l'immunoterapia (*fig. 5C*). Il confronto dei risultati ottenuti con i due modelli tumorali mostra una più spiccata efficacia del trattamento combinato nel caso del tumore murino CT26 rispetto al 4T1, segnalando nuovamente una sensibilità variabile tra le diverse tipologie di tumore.



**Figura 5.** Grazie al trattamento combinato con anti-PD-1 e PB *in vivo*, il volume tumorale ( $\text{cm}^3$ ) di 4T1 e CT26 cresce lentamente e aumenta la probabilità di sopravvivenza dei topi portatori di 4T1. (A, B) Confronto dell'andamento temporale del volume tumorale di 4T1 (A) e CT26 (B), in funzione dei giorni trascorsi dal momento dell'iniezione del tumore (giorno 0), tra le varie combinazioni di trattamenti possibili: nessun trattamento (*isotype*), trattamento solo con mezzo di controllo (*vehicle only*), solo con PB (*PB only*), solo con anti-PD-1 (*anti-PD-1 only*), con anti-PD-1 associato al mezzo di controllo (*anti-PD-1 + Vehicle*) o con anti-PD-1 associato a PB (*anti-PD-1 + PB*). (C) Diagramma di Kaplan-Meier rappresentativo della probabilità di sopravvivenza dei topi BALB/c in funzione dei giorni trascorsi dal momento dell'iniezione del tumore 4T1 (giorno 0). Ogni campione 4T1 ha  $n=6$  ed è stato analizzato in triplicato (A, C), mentre ogni campione CT26 ha  $n=8$  ed è stato analizzato in duplicato (B). La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *two-way* ANOVA (\*,  $p<0.05$ ; \*\*\*\*,  $p<0.0001$ ).

Analizzando poi tramite la citometria a flusso le masse tumorali 4T1 e CT26 estratte da tali topi, è stato dimostrato che le cellule non leucocitarie, cioè prive del marcatore generico dei leucociti CD45 ( $\text{CD45}^{\text{neg}}$ ), e quindi le cellule tumorali vere e proprie, quando vengono trattate sia con anti-PD-1 che con PB incrementano l'espressione delle molecole H-2K<sup>d</sup>/H-2D<sup>d</sup> sulla loro superficie rispetto al controllo negativo (*fig. 6*). Viene così confermato che i postbiotici possono avere un effetto *up*-regolativo dei geni codificanti le molecole MHC-I nelle cellule tumorali anche durante la cura del tumore *in vivo*.

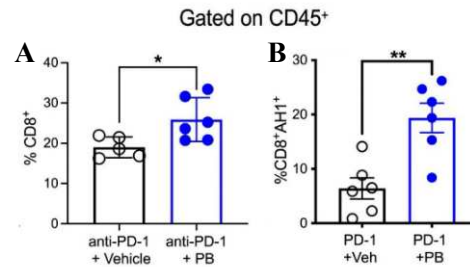
**Figura 6.** Il trattamento combinato con anti-PD-1 e PB *in vivo* aumenta l'espressione delle molecole MHC-I sulle cellule tumorali T41 e CT26 rispetto alla sola immunoterapia. Media geometrica dell'espressione delle molecole H-2K<sup>d</sup>/H-2D<sup>d</sup> all'interno del *gate* di cellule  $\text{CD45}^{\text{neg}}$  (non leucocitarie) calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-H-2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> e anti-CD45 contro le cellule *ex vivo* dei tumori 4T1 (A) e CT26 (B), dopo averle trattate *in vivo* con l'immunoterapia anti-PD-1 associata a PB (*anti-PD-1 + PB*) o al mezzo di controllo (*anti-PD-1 + vehicle*). Ogni campione 4T1 è stato analizzato in triplicato (A), mentre ogni campione CT26 è stato analizzato in duplicato (B). La significatività dei risultati viene verificata mediante il t-test (\*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*\*,  $p<0.0001$ ).



A questo punto, dato che *in vitro* l'aumento delle molecole MHC-I nella sede tumorale si era tradotto in una maggiore attività dei CTL, i ricercatori hanno voluto controllare se ciò si verificava anche *in vivo* andando a testare il livello dei CTL effettori presenti nella sede tumorale dei modelli precedenti (*fig. 7*). Quando un linfocita viene attivato presso l'organo linfoide secondario, esso migra nel tessuto

tumorale per esplicitare la propria funzione contro la cellula presentante l'antigene che riconosce, entrando a far parte dei linfociti infiltranti il tumore (TILs, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*). Dalla citometria a flusso focalizzata sulla conta delle cellule leucocitarie CD45<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, cioè i CTL effettori infiltrati nei tumori estratti, è stata riscontrata una loro maggiore concentrazione nel campione ricavato da topi doppiamente trattati rispetto al controllo. Nel caso del modello CT26, vengono selezionati i CTL AH1-specifici, dato che la molecola AH1 è un antigene associato a questo modello di CRC. Dunque, i postbiotici associati all'immunoterapia con anti-PD-1 arricchiscono il tessuto tumorale di CTL attivati specificatamente contro gli antigeni tumorali.

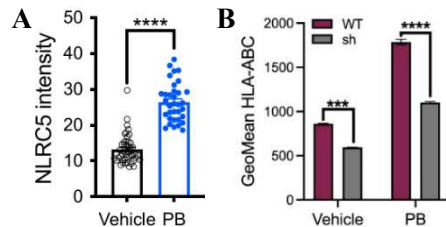
**Figura 7.** Il trattamento combinato con anti-PD-1 e PB *in vivo* richiama un maggior numero di CTL effettori nella sede tumorale rispetto alla sola immunoterapia nei modelli 4T1 e CT26. Percentuale di cellule CD8<sup>+</sup> (CTL) infiltrate nel microambiente tumorale 4T1 (A) e di cellule CD8<sup>+</sup>AH1<sup>+</sup> (CTL AH1-specifici) infiltrate nel microambiente tumorale CT26 (B), misurate all'interno del gate di cellule CD45<sup>+</sup> (leucociti) tramite citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-CD45, anti-CD8 (A, B) e anti-TCR AH1-specifico (B) contro le cellule raccolte dall'organo tumorale, dopo averle trattate *in vivo* con l'immunoterapia anti-PD-1 associata a PB (*anti-PD-1+PB*) o al mezzo di controllo (*anti-PD-1+vehicle*). Ogni campione 4T1 è stato analizzato in triplicato (A), mentre ogni campione CT26 è stato analizzato in duplicato (B). La significatività dei risultati viene verificata mediante il t-test (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01).



### 3.4 I pathways dell'infiammazione innata guidano l'up-regolazione dell'espressione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici nelle cellule tumorali

Il meccanismo molecolare alla base dell'aumento dell'espressione delle molecole MHC di classe I viene inizialmente esplorato tramite il sequenziamento dell'RNA di cellule tumorali SK-BR-3 pretrattate con PB o mezzo di controllo, al fine di confrontare il profilo trascrizionale delle due condizioni. Rispetto al controllo, nel campione pretrattato con PB è risultata una maggiore trascrizione dei geni HLA-I e dei geni codificanti le componenti dell'APM, ma lo stesso si è osservato anche del gene codificante il recettore di tipo NOD NLRC5, un noto transattivatore trascrizionale dei geni HLA-I. I ricercatori hanno ottenuto una conferma dell'up-regolazione di NLRC5 indotta dai postbiotici analizzandolo a livello proteico tramite immunofluorescenza (fig. 8A). A questo punto hanno indagato il possibile collegamento della modulazione di NLRC5 con quella dei geni HLA-I aggiungendo alle cellule SK-BR-3 pretrattate con PB l'antimicotico leptomicina B, che inibisce il trasferimento di NLRC5 dal nucleo al citoplasma bersagliando la principale proteina per l'esportazione nucleare (CRM1), ed è stato riscontrato che l'effetto di PB sulle cellule tumorali veniva completamente abolito da tale antimicotico (dato non mostrato). Ciò suggerisce che NLRC5 potrebbe essere coinvolto nella up-regolazione dei geni HLA-I mediata da PB. Tuttavia, essendo CRM1 capace di esportare un'ampia gamma di proteine dotate della sequenza di esportazione

nucleare, l'azione inibitoria della leptomicina B non è mai specifica nei confronti di NLRC5, per cui la prova che sia stato proprio l'accumulo nucleare di NLRC5 ad impedire l'*up*-regolazione dei geni HLA-I è stata ottenuta silenziando parzialmente il gene codificante NLRC5 nelle cellule SK-BR-3, cioè provocando un *knock-down* di oltre la metà della sua espressione (*fig. 8B*). Infatti, la citometria a flusso ha mostrato che il trattamento con PB induce livelli di HLA-I molto più bassi nelle cellule con silenziamento genico rispetto a quelle *wild-type*, così come l'incremento dell'espressione di HLA-I tra le cellule di controllo e quelle trattate è minore nelle cellule silenziate rispetto alle *wild-type*.



**Figura 8.** Il trattamento con PB sulle cellule SK-BR-3 aumenta l'espressione di NLRC5 mentre silenziando NLRC5 l'aumento di espressione dei geni HLA-I viene abolito. (A) Intensità di fluorescenza di NLRC5 misurata tramite immunofluorescenza in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-NLRC5 e anti-mouse-AF674-conjugate sulle cellule SK-BR-3, dopo il trattamento per 48h alternativamente con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo. (B) Media geometrica dell'espressione delle

molecole HLA-ABC calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC sulle cellule SK-BR-3, dopo il trattamento per 48h alternativamente con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo su cellule *wild-type* (WT) o silenziate (sh). La significatività dei risultati viene verificata mediante il t-test (A) o il test *two-way* ANOVA (B) (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

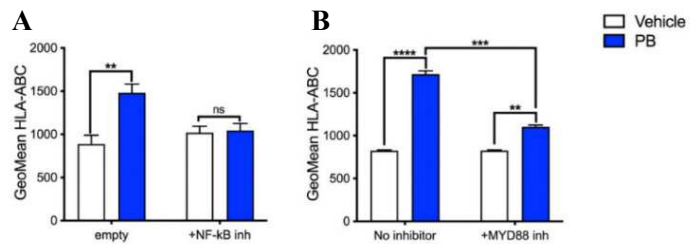
Successivamente, dopo aver escluso la partecipazione della via di segnale JAK-STAT nell'attivazione trascrizionale dei geni HLA-I mediata da PB, nonostante essa sia coinvolta nell'*up*-regolazione di NLRC5 e dei geni HLA-I indotta da IFN- $\gamma$ , i ricercatori hanno eseguito il *software* GSEA per individuare i processi biologici che subiscono un cambiamento di attività tra campioni pretrattati diversamente. È risultato dall'analisi computazionale il coinvolgimento di *pathways* della risposta immunitaria innata che includono la cascata di segnale intracellulare avviata dai recettori di tipo TOLL (TLRs) e l'attivazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.

Essendo noto che NLRC5 può comportarsi da regolatore negativo dell'attivazione di NF- $\kappa$ B, i ricercatori si sono concentrati sul valutare l'espressione dell'isoforma p65 di NF- $\kappa$ B, che da fosforilata è capace di attivarsi e traslocare nel nucleo. Misurando tramite citometria a flusso la quantità di NF- $\kappa$ B fosforilato, a tempi diversi dal trattamento con PB o mezzo di controllo *in vitro*, hanno riscontrato un'attivazione sempre più crescente di questo fattore nei campioni pretrattati con PB (dato non mostrato). In più l'immunofluorescenza sulle medesime cellule ha mostrato un'intensità di segnale intra-nucleare appartenente a p65 maggiore nei campioni pretrattati con PB rispetto a quelli del controllo perché aumenta la traslocazione dal citoplasma al nucleo del fattore attivato (dato non mostrato). Di conseguenza, è stata compresa una relazione tra l'azione dei postbiotici e l'attivazione di NF- $\kappa$ B. Per rafforzare ulteriormente questa considerazione i ricercatori hanno inibito NF- $\kappa$ B ed è infatti risultata una pari espressione delle molecole HLA-I tra le due condizioni di trattamento (*fig. 9A*). Quindi l'effetto di PB non si esplica senza l'attività di NF- $\kappa$ B, dunque scopertasi necessaria.

Inoltre, poiché NF- $\kappa$ B viene attivato quando contattato da molecole adattatrici reclutate a monte da TLR attivati, è stato investigato il ruolo della molecola adattatrice MYD88 aggiungendo a cellule SK-BR-3 pretrattate un inibitore della sua attivazione (ST2825), che ne impedisce la dimerizzazione. Si è così osservato che l'espressione delle MHC-I, laddove è stato anche incluso ST2825, subisce un

aumento poco significativo nelle cellule trattate con PB rispetto al controllo (*fig. 9B*). Quindi anche MYD88 esplica un'azione provocata dai postbiotici diretta all'aumento di espressione dei geni HLA-I. Gli effetti delle inibizioni di NF- $\kappa$ B e di MYD88 sono stati confermati anche nella linea cellulare murina di TNBC 4T1.

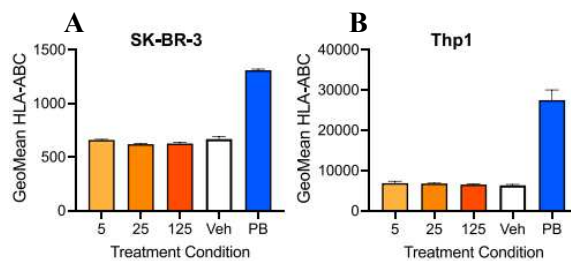
**Figura 9.** L'*up*-regolazione dell'espressione dei geni HLA-I viene abolita inibendo NF- $\kappa$ B e MYD88. Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-ABC calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC contro le cellule del tessuto tumorale umano SK-BR-3, dopo il trattamento per 48h alternativamente con PB 10 mg/mL o con mezzo di controllo, e (A) in presenza (+NF- $\kappa$ B *inh*) o assenza (*empty*) dell'inibitore di NF- $\kappa$ B oppure (B) in presenza (+MYD88 *inh*) o assenza (*no inhibitor*) di ST2825. La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *two-way* ANOVA (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ; ns, non significativo).



### 3.5 L'*up*-regolazione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici è indipendente dalla possibile contaminazione di LTA

Una volta suggerito il coinvolgimento della via MYD88-NF- $\kappa$ B, che viene generalmente attivata dal riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) da parte dei TLR, i ricercatori hanno ritenuto opportuno escludere che l'attività attribuita ai postbiotici fosse in realtà scaturita dalla presenza di acido lipoteicoico (LTA), abbondantemente contenuto nella parete cellulare di *L. paracasei*, che rappresenta un PAMP captato dal TLR2 di membrana. Testando *in vitro* l'utilizzo di LTA purificato sulle cellule tumorali SK-BR-3 e Thp1, si è visto che tale molecola, anche ad alte concentrazioni, non è in grado di aumentare l'espressione delle molecole HLA-I in confronto al mezzo di controllo; al contrario invece di quanto viene indotto da PB sulle medesime linee cellulari (*fig. 10*). Questo dimostra che LTA non è responsabile di alcun evento di sensibilizzazione delle cellule tumorali al riconoscimento da parte del sistema immunitario.

**Figura 10.** Il trattamento con PB aumenta l'espressione delle molecole MHC di classe I nelle linee tumorali SK-BR-3 e Thp1 a differenza di quello con LTA. Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-ABC calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC contro le cellule SK-BR-3 (A) e Thp1 (B), dopo 48h dal trattamento con 3 concentrazioni di LTA (5, 25, 125 pg/mL) o 10 mg/mL di PB o mezzo di controllo.

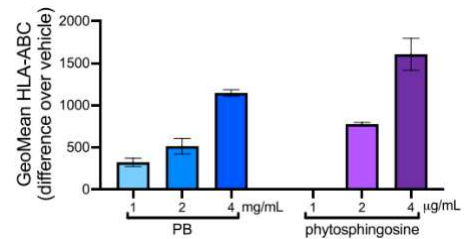


In aggiunta, bloccando il TLR2 tramite l'inibitore C29 i ricercatori hanno riscontrato solo una minima riduzione dell'attività dei postbiotici nei campioni in cui a PB è stato associato C29 (dato non mostrato). Ne risulta che l'azione dei postbiotici non dipende in alcun modo dal riconoscimento di LTA da parte dei TLR2 e che il TLR2 è solo parzialmente coinvolto nel meccanismo molecolare scatenato da PB poiché bloccando la sua funzione non si riesce a provocare una drastica eliminazione dell'*up*-regolazione dei geni HLA-I.

### 3.6 L'up-regolazione dei geni HLA di classe I indotta dai postbiotici è mediata da metaboliti di origine organica

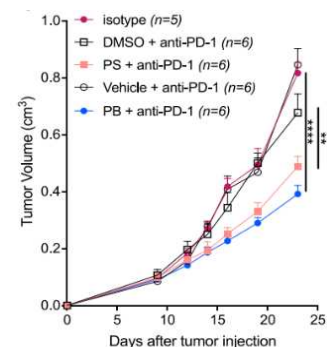
Dopo aver appurato il parziale coinvolgimento del TLR2, gli autori hanno rintracciato la natura dei metaboliti capaci di attivarlo inizialmente separando in fasi la miscela di PB. In primo luogo, dalla citometria a flusso delle cellule Thp1 pretrattate *in vitro* o con fase acquosa o con fase organica, è risultato che il trattamento con la fase organica sia riuscito a raggiungere o addirittura a superare l'incremento di espressione delle molecole HLA-I scatenato dall'intera miscela di PB (dato non mostrato). Ciò suggerisce che il composto attivo abbia natura lipofila. In seguito, un'analisi metabolomica sull'intera miscela di PB ha evidenziato la fitosfingosina (PS) come unico fosfolipide tra i 10 composti più abbondanti in essa. Quindi, dopo averla somministrata singolarmente *in vitro* a cellule umane Thp1 e cellule murine 4T1, la citometria a flusso ha mostrato un'up-regolazione delle molecole MHC-I al pari di quanto provocato dalla miscela di PB stessa (fig. 11).

**Figura 11.** Il trattamento con la fitosfingosina induce l'aumento di espressione delle molecole MHC di classe I nelle cellule tumorali umane Thp1. Media geometrica dell'espressione delle molecole HLA-ABC calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-HLA-ABC contro le cellule Thp1, dopo il trattamento per 48h o con PB a 3 concentrazioni (1, 2, 4 mg/mL) o con PS (*phytosphingosine*) a 3 concentrazioni (1, 2, 4 µg/mL).



Perciò l'interesse è stato rivolto verso la verifica della sua possibile efficacia *in vivo* in associazione con l'immunoterapia basata su anti-PD-1: la crescita del tumore trattato con PS e anti-PD-1 è significativamente controllata nei modelli tumorali 4T1 e CT26 inoculati nei topi viventi, avvicinandosi all'entità del controllo antitumorale garantito dall'intera miscela di PB associata ad anti-PD-1 (fig. 12). Viene così consolidata la capacità della PS di rafforzare i benefici dell'immunoterapia con ICI negli organismi *in vivo*.

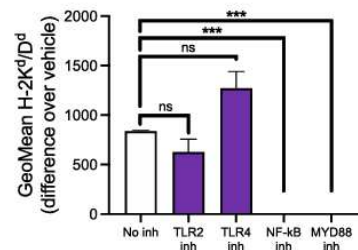
**Figura 12.** Crescita tumorale del modello 4T1 *in vivo* in presenza di trattamento combinato con anti-PD-1 e PS. Confronto dell'andamento della crescita tumorale in funzione dei giorni trascorsi dall'iniezione del tumore (giorno 0), tra le varie combinazioni di trattamenti possibili: nessun trattamento (*isotype*); trattamento con anti-PD-1 associato o al mezzo di controllo di PB (*anti-PD-1+Vehicle*), o a PB (*anti-PD-1+PB*), o a PS (*anti-PD-1+PS*), o al mezzo di controllo di PS (*anti-PD-1+DMSO*). Ogni campione ha n=6, eccetto il controllo doppio negativo (n=5). La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *two-way ANOVA* (\*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.0001).



Infine, i ricercatori si sono addentrati nell'analisi delle molecole coinvolte nella cascata di segnale attivata da PS nelle cellule tumorali, per verificare se essa corrisponde esattamente a quella avviata dalla miscela di PB. Dunque, hanno somministrato a dei campioni di cellule 4T1 pretrattate con PS vari inibitori, alternativamente di TLR2, TLR4, MYD88 e NF-κB, affinché si vagliasse l'effetto provocato da PS sull'espressione delle MHC-I andando a bloccare un passaggio alla volta della via dei TLR. È stata riscontrata l'abolizione dell'up-regolazione delle molecole H-2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> indotta da PS quando vengono inibiti NF-κB o MYD88 nelle cellule tumorali, mentre se ad essere inibiti sono i TLR il livello delle MHC-I non si mostra significativamente diverso da quello indotto da PS in assenza di inibizione (fig. 13). Questo significa che NF-κB e MYD88 hanno un ruolo

fondamentale nell'aumento di espressione dei geni HLA-I indotto dai postbiotici nelle cellule tumorali, mentre i TLR permettono ad essi di esplicare un certo effetto anche se inibiti. Inoltre, dato che l'utilizzo della PS insieme all'inibitore del TLR2 inficia l'espressione delle MHC-I più significativamente rispetto all'inibizione del TLR4, l'azione dei postbiotici può essere mediata solamente, e per di più parzialmente, dal TLR2.

**Figura 13.** L'up-regolazione dell'espressione delle molecole MHC-I indotta da PS viene abolita inibendo NF- $\kappa$ B e MYD88, ma non inibendo TLR2 e TLR4. Media geometrica dell'espressione delle molecole H-2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> calcolata sui dati della citometria a flusso in seguito all'utilizzo di anticorpi anti-H-2K<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> contro le cellule tumorali murine 4T1, dopo il trattamento per 48h con PS 2  $\mu$ g/mL, e alternativamente in assenza (*no inh*) o presenza degli inibitori di TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, MYD88. La significatività dei risultati viene verificata mediante il test *one-way* ANOVA (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns, non significativo).



### 3.7 Discussione e conclusioni

Il lavoro preso in esame rappresenta uno dei primi studi ad aver analizzato l'aumento di espressione delle molecole HLA di classe I sulle cellule tumorali come possibile modalità con cui i metaboliti derivati dal microbiota intestinale agiscono nel miglioramento delle risposte all'immunoterapia basata su ICI contro il cancro. Di fatto, il meccanismo d'azione con cui il microbiota è capace di aumentare la sensibilità del tumore all'immunoterapia con ICI non era stato approfondito prima, per cui i ricercatori hanno ideato il loro studio partendo dal meccanismo di evasione dal sistema immunitario compiuto da molti tipi di cancro. È noto come il CRC sia quasi completamente resistente all'immunoterapia basata su ICI a causa della riduzione d'espressione delle molecole HLA-I da parte delle cellule tumorali, che lo rende poco immunogenico.

Gli autori hanno scoperto che i postbiotici rilasciati da un particolare ceppo di *L. paracasei* (CNCM I-5220) sono in grado di incrementare l'espressione delle molecole HLA-I in 10 delle 14 linee cellulari testate (circa 70%), appartenenti a modelli di BC, CRC, melanoma primario e tumore mieloide. A ciò si aggiunge l'aumento del riconoscimento tumorale e dell'attività dei CTL tumore-specifici *in vitro*. Inoltre, i risultati ottenuti *in vivo* su modelli di tumore TNBC (4T1) e CRC (CT26) hanno mostrato l'aumento del controllo sulla crescita tumorale, della probabilità di sopravvivenza, dell'espressione delle molecole MHC-I e della percentuale di CTL infiltrati nel tumore e nella milza. Di conseguenza, è possibile suggerire una nuova combinazione di trattamenti contro il cancro, quale l'associazione dei postbiotici agli ICI, che può avere un significativo impatto antitumorale nei pazienti che non rispondono al trattamento immunoterapico. Pertanto, l'abbondanza di tale ceppo nell'intestino spesso caratterizza un microbiota in condizioni di eubiosi e dunque quello dei pazienti che rispondono meglio all'immunoterapia grazie all'effetto dei suoi postbiotici.

In particolare, è stata scoperta l'abilità del metabolita fitosfingosina, finora ampiamente utilizzato solo nell'industria cosmetica, nell'aumentare l'espressione delle molecole MHC-I nelle cellule tumorali e nel rallentare la crescita tumorale *in vivo*.

Quindi, più in generale, scoprire trattamenti in grado di stimolare l'espressione delle molecole HLA-I può rappresentare una soluzione per potenziare il successo delle immunoterapie disponibili usandoli in combinazione con esse. In particolare, i

postbiotici sono stati ritenuti più sicuri ed efficaci nella cura dei tumori nell'uomo rispetto all'IFN- $\gamma$ , già utilizzato come adiuvante dell'immunoterapia in diverse sperimentazioni per il suo stesso potere *up*-regolativo dei geni HLA-I. Questo perché i postbiotici, aumentando l'espressione dei geni HLA-I mediante la via di segnalazione MYD88-NF- $\kappa$ B e non quella JAK-STAT dell'IFN- $\gamma$ , possono essere utilizzati nei pazienti refrattari alla terapia con ICI che portano frequentemente mutazioni nel *pathway* JAK-STAT.

Infine, le evidenze ottenute su come l'aumento di espressione di NLRC5 e l'aumento di attivazione di NF- $\kappa$ B siano due conseguenze parallele del trattamento delle cellule tumorali con i postbiotici, portano alla luce una relazione nuova tra queste due molecole, che è ben diversa dalla potenziale azione di NLRC5 come inibitore di NF- $\kappa$ B: i postbiotici nelle cellule tumorali attivano la cascata di segnale MYD88-NF- $\kappa$ B che culmina con l'*up*-regolazione di NLRC5 e questa a sua volta incrementa l'espressione dei geni HLA-I.



## BIBLIOGRAFIA

1. Kenneth Murphy, Casey Weaver. *Janeway's immunobiology*. Ninth Edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2016.
2. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. *Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation*. *Front Immunol*. 2021;12:636568. Published 2021 Mar 9. doi:10.3389/fimmu.2021.636568
3. Burke JD, Young HA. *IFN- $\gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place*. *Semin Immunol*. 2019;43:101280. doi:10.1016/j.smim.2019.05.002
4. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. *Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy*. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1069-1086. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-0367
5. Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, et al. *Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry*. *Foods*. 2022;11(19):3094. Published 2022 Oct 5. doi:10.3390/foods11193094
6. McKinnon KM. *Flow Cytometry: An Overview*. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.1-5.1.11. Published 2018 Feb 21. doi:10.1002/cpim.40
7. Lorenzo-Herrero S, Sordo-Bahamonde C, Gonzalez S, López-Soto A. *CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity*. *Methods Mol Biol*. 2019;1884:119-130. doi:10.1007/978-1-4939-8885-3\_7
8. Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, Mukkala VM, Lindqvist C, Akerman K. *Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand*. *J Immunol Methods*. 1996;193(2):199-206. doi:10.1016/0022-1759(96)00063-4
9. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining*. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299-311. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_26
10. Garg E, Zubair M. *Mass Spectrometer*. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 21, 2023.

## APPENDICE: Articolo discusso nell'elaborato

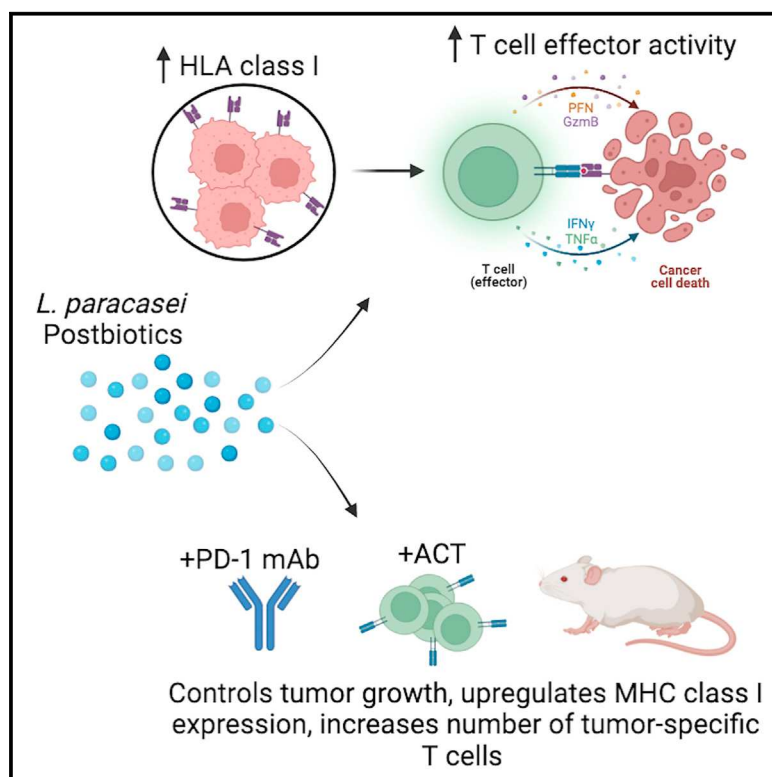
Ferrari et al. *Sensitizing cancer cells to immune checkpoint inhibitors by microbiota-mediated upregulation of HLA class I*. *Cancer Cell* 2023 Oct 9; 41(10): 1717-1730.



# Cancer Cell

## Sensitizing cancer cells to immune checkpoint inhibitors by microbiota-mediated upregulation of HLA class I

### Graphical abstract



### Authors

Valentina Ferrari, Antonino Lo Cascio, Alessia Melacarne, ..., Francesca Algieri, Giuseppe Penna, Maria Rescigno

### Correspondence

maria.rescigno@hunimed.eu

### In brief

Ferrari et al. report *L. paracasei* CNCM I-5220-derived postbiotics upregulate HLA class I expression on cancer cells leading to tumor antigen-specific T cell activation. Postbiotics and immunotherapy combination reduces tumor growth, increases antigen-specific T cell activation and trafficking to the tumor. This is mediated by postbiotic-induced NLRC5 upregulation via MYD88-NF- $\kappa$ B activation.

### Highlights

- The microbiota improves cancer immunotherapy via its metabolic output (postbiotics)
- Postbiotics induce HLA upregulation and boost recognition of cancer cells by T cells
- Combination treatment with postbiotics controls tumor growth in murine models
- NLRC5 is a key player in postbiotic-mediated upregulation of HLA class I expression





## Article

# Sensitizing cancer cells to immune checkpoint inhibitors by microbiota-mediated upregulation of HLA class I

Valentina Ferrari,<sup>1</sup> Antonino Lo Cascio,<sup>2</sup> Alessia Melacarne,<sup>2</sup> Nina Tanasković,<sup>3</sup> Alessandro M. Mozzarelli,<sup>1,2</sup> Luca Tiraboschi,<sup>2</sup> Michela Lizier,<sup>2</sup> Marta Salvi,<sup>1,2</sup> Daniele Braga,<sup>2</sup> Francesca Algieri,<sup>3</sup> Giuseppe Penna,<sup>2,3</sup> and Maria Rescigno<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Via Rita Levi Montalcini 4, 20072 Pieve Emanuele, Milan, Italy

<sup>2</sup>IRCCS Humanitas Research Hospital, via Manzoni 56, 20089 Rozzano, Milan, Italy

<sup>3</sup>Postbiotica S.r.l., Milan 20123, Italy

<sup>4</sup>Lead contact

\*Correspondence: [maria.rescigno@hunimed.eu](mailto:maria.rescigno@hunimed.eu)

<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.08.014>

## SUMMARY

Recent data have shown that gut microbiota has a major impact on the clinical response to immune checkpoint inhibitors (ICIs) in the context of solid tumors. ICI-based therapy acts by unlocking cognate cytotoxic T lymphocyte (CTL) effector responses, and increased sensitivity to ICIs is due to an enhancement of patients' tumor antigen (TA)-specific CTL responses. Cancer clearance by TA-specific CTL requires expression of relevant TAs on cancer cells' HLA class I molecules, and reduced HLA class I expression is a common mechanism used by cancer cells to evade the immune system. Here, we show that metabolites released by bacteria, in particular, phytosphingosine, can upregulate HLA class I expression on cancer cells, sensitizing them to TA-specific CTL lysis *in vitro* and *in vivo*, in combination with immunotherapy. This effect is mediated by postbiotic-induced upregulation of NLRC5 in response to upstream MYD88-NF- $\kappa$ B activation, thus significantly controlling tumor growth.

## INTRODUCTION

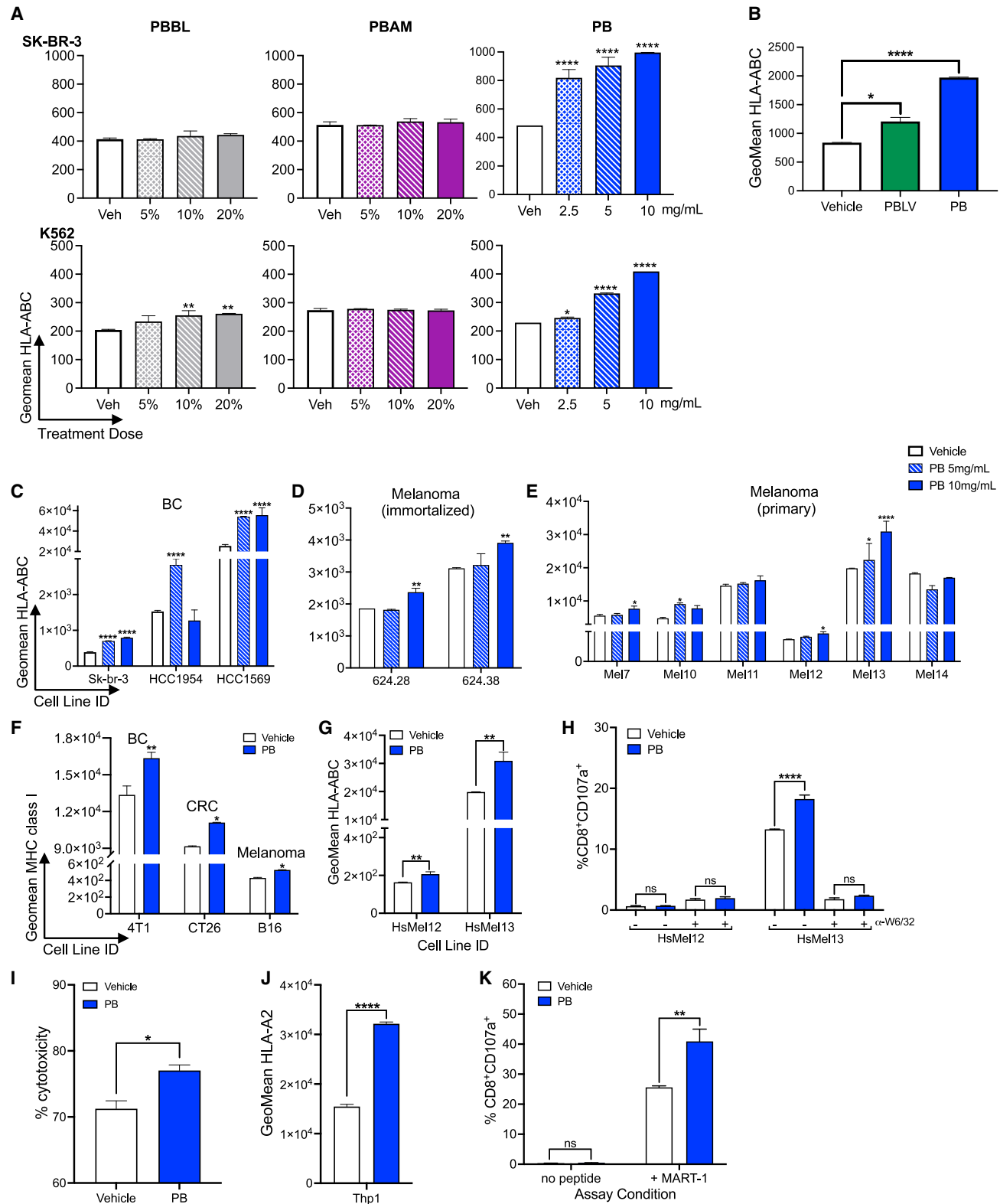
Over the past decade, the link between microorganisms and cancer has been well-established,<sup>1</sup> and the microbiota has been shown to play a role in the pathogenesis and course of malignant diseases. However, new evidence has highlighted the complex relationship between cancer and the microbiota. For example, in breast cancer, treatment with antibiotics has been associated with development of the disease<sup>2</sup> and microbial dysbiosis in breast cancer tissue can be associated with the disease stage.<sup>3</sup> Recently, bacteria have been shown to play a role not only in the pathogenesis but also in the clinical response to therapeutic strategies,<sup>4,5</sup> as an enrichment of specific strains of bacteria has been described in responders versus non-responders to immune checkpoint inhibitor (ICI)-based therapy in melanoma and other tumors of epithelial origin.<sup>6–8</sup> Efforts are now being made to understand how microbiota can be harnessed to augment immunotherapy response rates. The most striking clinical results achieved thus far are in advanced melanoma, where ICI-responders' fecal microbiota transplanted to non-responders was able to sensitize non-responders to treatment with ICIs, overcoming primary resistance to therapy.<sup>9,10</sup> Reports have shown that the microbiota can improve ICI efficacy via an IL-12-mediated

mechanism,<sup>7</sup> but the exact mechanism through which the microbiota acts is unknown.

The cross-talk between the gut microbiota and the immune system is partially dependent on the metabolites released by bacteria during the fermentation process.<sup>11</sup> Microbial metabolites, commonly referred to as postbiotics,<sup>12,13</sup> have been studied in detail at the local level (i.e., the gut); however, metabolites can cross the gut vascular barrier<sup>14</sup> and have thus been found in circulation.<sup>15</sup> For example, short-chain fatty acids (SCFAs), which are commonly secreted by bacteria, have been found in the blood stream<sup>16</sup> and have been extensively characterized as influencing inflammatory signaling pathways, such as NF- $\kappa$ B and TNF $\alpha$ .<sup>15</sup> In addition, SCFAs have shown potential in sensitizing tumor cells to ICIs *in vitro*<sup>17</sup> and are currently being explored in clinical trials in patients with various cancer types.<sup>18</sup> These results suggest that gut microbiota and their byproducts can influence immune responses to cancer; however, the molecular mechanism(s) underlying this response has(ve) yet to be elucidated.

Convincing evidence indicates that clinical responses to ICI-based therapy reflect the elimination of cancer cells by cognate cytotoxic T lymphocyte (CTL).<sup>19–21</sup> CTL recognition of cancer cells is mediated by tumor antigen (TA)-derived peptides which are presented by HLA class I antigens. Abnormalities in HLA





**Figure 1. In vitro postbiotic treatment upregulates HLA class I expression and increases TA-specific CTL activation**

(A) SK-BR-3 breast cancer and K562 myeloid leukemia cell lines were incubated with three concentrations of postbiotics released by three different bacterial strains. PBAM: *Akkermansia muciniphila*, PBBL: *Bifidobacterium longum*, PB: *Lactobacillus paracasei*.

(B) SK-BR-3 cells were treated with 10 mg/mL PB, postbiotics derived from *L. vaginalis* (PBLV), or vehicle control.

(legend continued on next page)

class I expression and/or function, which have been described with high frequency in all cancer types tested,<sup>22,23</sup> provide cancer cells with an immune escape mechanism because of the defective presentation of tumor-derived peptides to TA-specific CTLs. As a result, TA-specific CTLs are not able to recognize and eliminate cancer cells.<sup>24,25</sup> This escape mechanism has been suggested to underlie the association between HLA class I downregulation and poor clinical course of the disease in many cancer types<sup>26</sup> and to play a role in the lack of clinical response to ICI-based immunotherapy.<sup>27,28</sup>

Here, we show that *in vitro* treatment with postbiotics increases expression of HLA class I on the surface of cancer cells, which subsequently enhances TA-specific CTL responses. Furthermore, postbiotics combined with different immunotherapy treatments *in vivo* upregulated cancer cell HLA class I expression, increased TA-specific CTL responses, and subsequently abrogated tumor growth in both melanoma and breast cancer models. These data show that postbiotics can sensitize cancer cells to treatment with cancer immunotherapy by upregulating surface HLA class I expression, providing a mechanism by which the microbiota could influence immunotherapy responses.

## RESULTS

### *In vitro* postbiotic treatment upregulates HLA class I expression on human and murine cancer cell lines

Cancer cell downregulation of HLA class I expression is an immune escape mechanism that has been well described in multiple cancer types, such as melanoma,<sup>27</sup> breast cancer,<sup>29</sup> colorectal cancer,<sup>30</sup> lung cancer,<sup>31</sup> bladder cancer,<sup>32</sup> as well as myeloid malignancies, such as acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome, after stem cell transplant.<sup>33</sup>

To investigate if postbiotics released by bacteria could influence HLA expression on cancer cells, we generated postbiotics from two bacterial strains identified by Matson et al. and Routy et al. (*B. longum* and *A. muciniphila*, respectively) as enriched in anti-PD-1 responding patients, as well as a selected strain of *L. paracasei* previously identified in our lab<sup>34,35</sup> (Figure 1A). We first tested these postbiotics on a breast cancer cell line, SK-BR-3, and a myeloid cell line, K562, both of which express low-baseline levels of HLA class I, and observed that postbiotics released by *L. paracasei* (PB) can induce a significant, dose-dependent increase in surface HLA class I expression, while postbiotics derived from *A. muciniphila* (PBAM) and *B. longum* (PBBL) have no effect on the SK-BR-3 cells and PBBL had a minimal effect on K562 HLA class I. We then included an additional

strain of *Lactobacillus*, *L. vaginalis*, as recent data show a positive correlation between *L. vaginalis* and progression-free survival (PFS).<sup>36</sup> As shown in Figure 1B, postbiotics from *L. vaginalis* (PBLV) upregulated HLA class I expression, albeit not to the extent of the postbiotics from *L. paracasei* (PB). As PB exerted the strongest effect on HLA class I upregulation, we focused on this postbiotic and performed a titration of the PB. We evaluated its kinetics and observed that the highest dose (10 mg/mL) at 48 h induced a significant increase in HLA class I expression, while the vehicle control did not influence HLA class I expression (Figure S1A). We next screened the effect of PB on additional breast cancer cell lines (Figure 1C), as well as melanoma immortalized (Figure 1D) and primary (Figure 1E) cells. In addition, treatment of murine melanoma (B16F10), breast cancer (4T1), and colorectal cancer (CT26) cell lines with PB upregulated surface MHC class I antigen expression (Figure 1F). Interestingly, the HCC1954 breast cancer cell line was more sensitive to the lower dose of PB; therefore, we performed an extended dose titration and found that the peak sensitivity of this cell line was at 2.5 mg/mL (Figure S1B). Overall, the highest dose of postbiotic treatment upregulated HLA class I expression in 10 of 14 cell lines tested (~70%).

We additionally sought to understand if PB could upregulate HLA class I expression also on immune cells, such as CD8<sup>+</sup> T cells and antigen-presenting cells (CD14<sup>+</sup> monocytes and monocyte-derived dendritic cells [moDC]). As shown in Figure S1C, PB has little to no effect on HLA class I expression on T cells and monocytes and slightly reduces the very high expression of HLA class I on moDC.

### Postbiotic-treated cancer cells enhance TA-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses

To test if postbiotic-induced HLA class I expression translated to increased TA-specific T cell activation, we selected two primary melanoma cell lines, one of which expresses the MART-1 antigen (HsMel13) while the other does not (HsMel12), and pre-treated them with postbiotics for 48 h. After pre-treatment, melanoma cells were stained for HLA class I surface expression and tested for their ability to induce effector responses by a polyclonal MART-1-specific CTL (generated as described in the STAR methods). Both cell lines significantly upregulated the expression of HLA class I molecules (Figure 1G) and, as expected, the melanoma primary cells that do not express the MART-1 antigen (HsMel12) did not stimulate a CTL response regardless of postbiotic treatment. The HLA-A2<sup>+</sup> melanoma primary cell line that expresses MART-1 (HsMel13) elicited a moderate response from the MART-1-specific CTL, which was

(C) breast, (D) melanoma immortalized, (E) primary melanoma cells, and (F) murine melanoma, colorectal cancer (CRC), and breast cancer (BC) cell lines were treated with 5 mg/mL (stripped bars), 10 mg/mL (filled bars) postbiotics, or vehicle control (empty bars). After 48 h, geomean HLA class I (A-E), H-2k<sup>b</sup> and H-2k<sup>d</sup> (F) surface expression was measured by flow cytometry.

(G) Human primary melanoma cells were pre-treated for 48 h with postbiotics or vehicle control, geomean HLA-ABC measured by flow cytometry.

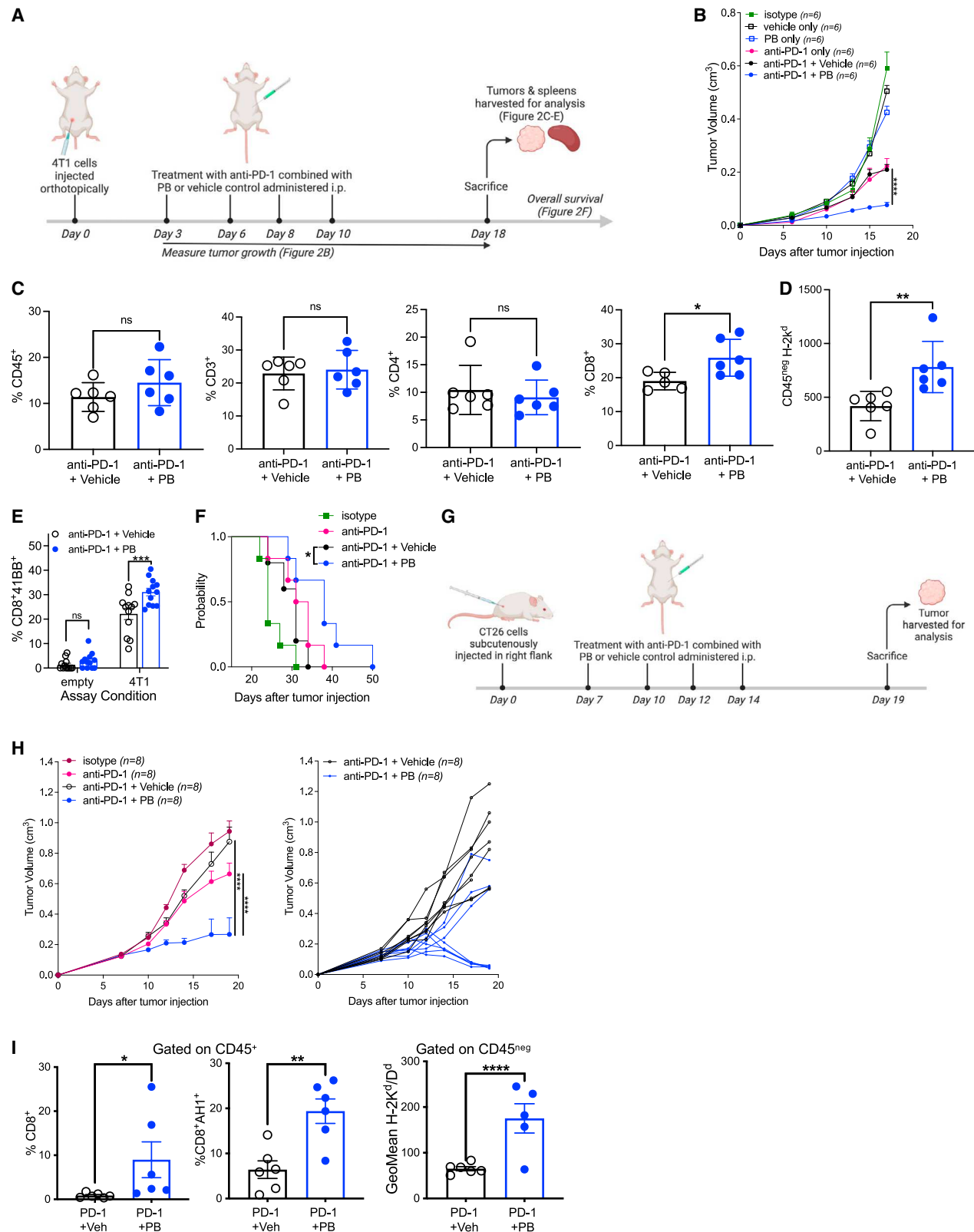
(H) Pre-treated melanoma cells from (G) were co-cultured for 5 h with MART-1-specific CTL with or without the pan-HLA class I blocker W6/32, percent CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> cells measured by flow cytometry.

(I) 624.38 melanoma cell line was pretreated for 48 h with vehicle or postbiotics prior to plating in a Delfia cytotoxicity assay with MART-1-specific CTL.

(J) Thp1 cell line was pretreated with postbiotics or vehicle control for 48 h prior to measuring HLA-A\*02 expression by flow cytometry.

(K) Pre-treated Thp1 cells from (J) were co-cultured for 5 h with MART-1-specific CTL in the presence of MART-1 peptide, percent CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> cells measured by flow cytometry. Experiments repeated in triplicate, representative experiment shown.

Data represented as mean ± SEM. Statistical analysis: (A and B) one-way ANOVA; (C-H and K) two-way ANOVA; (I and J) t test; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, p values refer to comparison with vehicle (veh). Also see Figures S1 and S2.



**Figure 2. Postbiotic treatment combined with anti-PD-1 *in vivo* controls tumor growth and prolongs survival**

(A–F) 4T1 TNBC model. (A) Experimental scheme. (B) Tumor volume. (C and D) Tumors were processed into a single cell suspension and stained with anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, and H-2K<sup>d</sup>, geomean and percentages were measured by flow cytometry. (E) 2 × 10<sup>5</sup> splenocytes were co-cultured 1:1 with 4T1

(legend continued on next page)

significantly increased after postbiotic treatment, as measured by percent CD8<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> (Figure 1H). Addition of a pan-HLA class I blocker (anti-W6/32) abrogated the activation of MART-1-specific CTL (Figure 1H), indicating that the increased T cell response is HLA dependent. While the measurement of degranulation by CD107a is a common technique to assess T cell activation, we additionally saw that postbiotic treatment of the 624.38 melanoma cell line leads to increased lysis by MART-1-specific CTL (Figure 1I) by utilizing a standard cytotoxicity assay (see Methods-Delfia).

To directly validate that the upregulation of HLA class I expression is the main contributor to increased TA-specific T cell recognition, we utilized the Thp1 cell line (which is monocytic in origin) and immunogenic MART-1 peptide (ELAGILTV) model.<sup>37</sup> To do so, the MART-1 peptide was added exogenously to Thp1 cells that were pre-treated with either the vehicle or postbiotics and tested for their ability to increase recognition by MART-1-specific polyclonal CTL. The exogenously added MART-1 peptide binds to the Thp1's HLA class I molecules; therefore, postbiotic-induced upregulation of surface HLA class I expression will lead to increased presentation of the peptide resulting in a higher number of activated MART-1-specific CTLs. As expected, postbiotic treatment upregulated HLA-A2 surface expression on the Thp1 cells (Figure 1J), which subsequently boosted recognition by antigen-specific CTL (Figure 1K, +MART-1 peptide). Importantly, postbiotic-treated Thp1 cells did not induce non-specific background activation of the CTL (Figure 1K, no peptide), indicating that the HLA + peptide complex was required for T cell activation. Collectively, these data show that upregulation of cancer cell HLA class I surface expression is a mechanism by which postbiotics can increase cancer cell recognition by TA-specific CTL.

To assess the duration of the postbiotic-induced upregulation of HLA expression, we incubated the Thp1 monocytic tumor cell line with postbiotics for 48 h prior to washing out and continuing the culture in postbiotic-free medium (Figure S2A). Figure S2B shows that Thp1 HLA class I expression remains elevated for five days after removing the postbiotics, before starting to decline between days 5 and 7. These results highlight the long-lasting but transient nature of the HLA class I upregulation.

#### Postbiotics affect tumor growth and upregulate tumor MHC class I antigen expression when combined with immunotherapy treatments *in vivo*

Published studies have highlighted a link between cancer cell immune evasion after treatment with ICIs and HLA class I downregulation and/or loss.<sup>38</sup> As the aforementioned data show postbiotics' ability to upregulate HLA class I expression and subsequently increase TA-specific T cell responses *in vitro*, we sought to understand if this could be recapitulated in an *in vivo* system. To evaluate if postbiotics can increase TA-specific im-

mune responses when combined with ICIs, female BALB/c mice were orthotopically grafted with 4T1 murine TNBC cells and treated with anti-PD-1 monoclonal antibody (mAb) combined with either postbiotics or the vehicle control (Figure 2A). As shown in Figure 2B, postbiotic treatment (in association with anti-PD-1) significantly reduced primary 4T1 tumor growth compared to the group treated with the vehicle control. Tumors harvested from mice treated with postbiotics had increased CD8<sup>+</sup> T cell trafficking (Figure 2C) and upregulated surface MHC class I antigen expression (Figure 2D) compared to tumors isolated from mice treated with the vehicle control, which resembles the *in vitro* findings. To assess if postbiotic treatment induced TA-specific T cell responses, splenocytes were isolated from postbiotic- and vehicle-treated mice and re-challenged *in vitro* with 4T1 cancer cells. As shown in Figure 2E, mice treated with postbiotics had an increased percentage of TA-specific CD8<sup>+</sup> splenocytes (shown as CD8<sup>+</sup>41BB<sup>+</sup>), an effect which could be due to *in vivo* postbiotic-induced upregulation of MHC class I expression. Furthermore, postbiotics combined with anti-PD-1 mAb prolonged mouse survival (Figure 2F) compared to the vehicle control cohort. To assess a more translation route, we also treated 4T1-bearing mice with postbiotics administered via oral gavage instead of by intraperitoneal (i.p.) injection. Following the same experimental scheme as in Figure 2A, postbiotic treatment by oral gavage resulted in controlled tumor growth (Figure S3A), recapitulating the aforementioned results. While there was a trend of increase of CD8<sup>+</sup> T cell infiltrate in the tumor, CD8<sup>+</sup> T cells displayed a more activated phenotype and tumor cells upregulated MHC class I expression in postbiotic-treated mice (Figure S3B).

We then evaluated whether the synergistic effect of postbiotics and anti-PD-1 treatment was recapitulated in another tumor model system, i.e., the CT26 murine model of CRC (Figure 2G). Similarly to the 4T1 model, postbiotic treatment combined with anti-PD-1 significantly attenuated tumor growth (Figure 2H) compared to the vehicle control. Additionally, we observed that the combined treatment was even more effective in the CT26 model than in the 4T1, as tumors regressed in 5 of 8 mice, 2 of which resulted in a complete tumor regression. The flow cytometric analysis of tumors processed at the end of the experiment showed a slight increase in CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment, with a significant increase in AH1-dextramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2I). As AH1 is a known antigen of the CT26 model,<sup>39,40</sup> this indicates that postbiotic treatment is enriching for tumor-specific T cells at the tumor site. Moreover, postbiotic treatment upregulated MHC class I expression on the tumor cells, recapitulating what we have seen both *in vitro* and *in vivo* thus far.

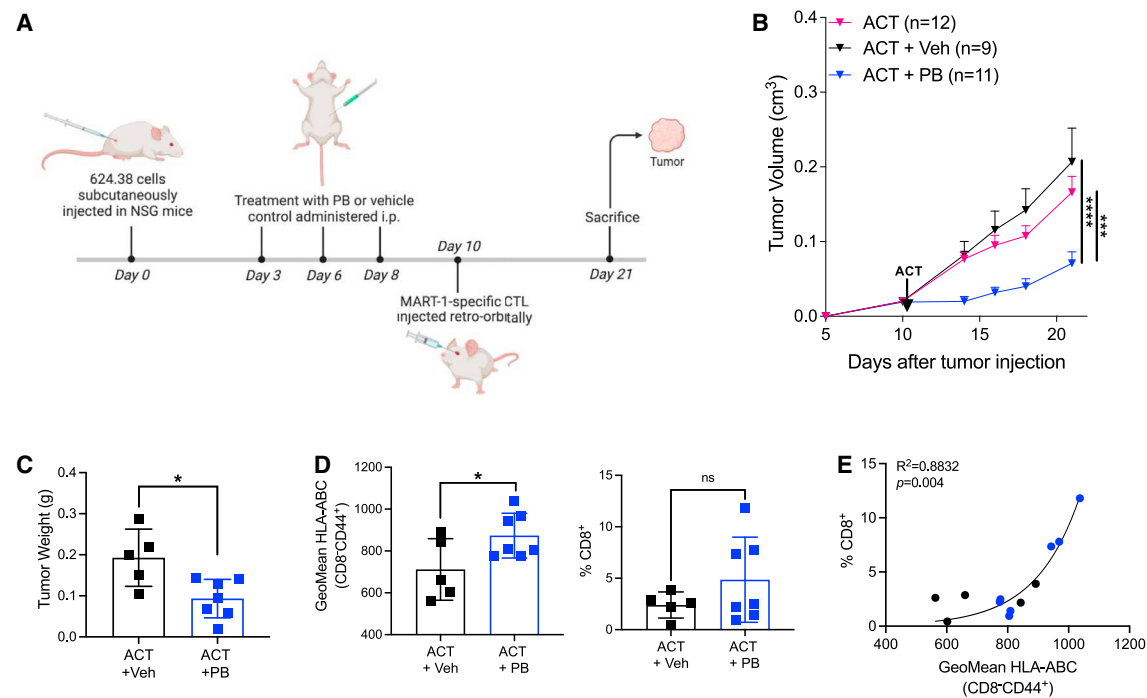
Taken together, these results suggest that a postbiotic treatment given systemically, either by oral gavage or i.p., can control tumor growth, upregulate tumor surface MHC class I antigen expression, increase the number of tumor-specific CD8<sup>+</sup>

cells *ex vivo* and T cell activation (percent CD8<sup>+</sup>41BB<sup>+</sup>) was measured by flow cytometry. (F) Kaplan-Meier of murine survival. Experiment repeated three times, representative experiment shown. Data represented as mean ± SEM.

(G–I) CT26 CRC model. (G) Experimental scheme. (H) Tumor growth curve for all mice combined (left panel) and single mice in vehicle and postbiotic (PB) treated groups (right panel). (I) Flow cytometric analysis of tumor cell suspension at the end of experiment (day 19).

Experiment repeated twice, representative experiment shown. Statistical analysis: (B, E, and H) two-way ANOVA; (C, D, and I) t test; \*p < 0.05, \*\*, p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. Also see Figure S3.





**Figure 3. Postbiotics combined with ACT of MART-1-specific T cells controls tumor growth**

(A) Experimental scheme.

(B) Tumor measurements.

(C) Tumor weight at time of sacrifice.

(D) Tumors were processed into a single cell suspension and stained with anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD39, and HLA-ABC, geomean and percentages were measured by flow cytometry. Experiment repeated twice, representative experiment shown. Data represented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: (B) two-way ANOVA; (C and D) t test. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

(E) Correlation of HLA-ABC expression on tumor cells ( $CD8^-CD44^+$ ) with %  $CD8^+$  cells in the tumor.

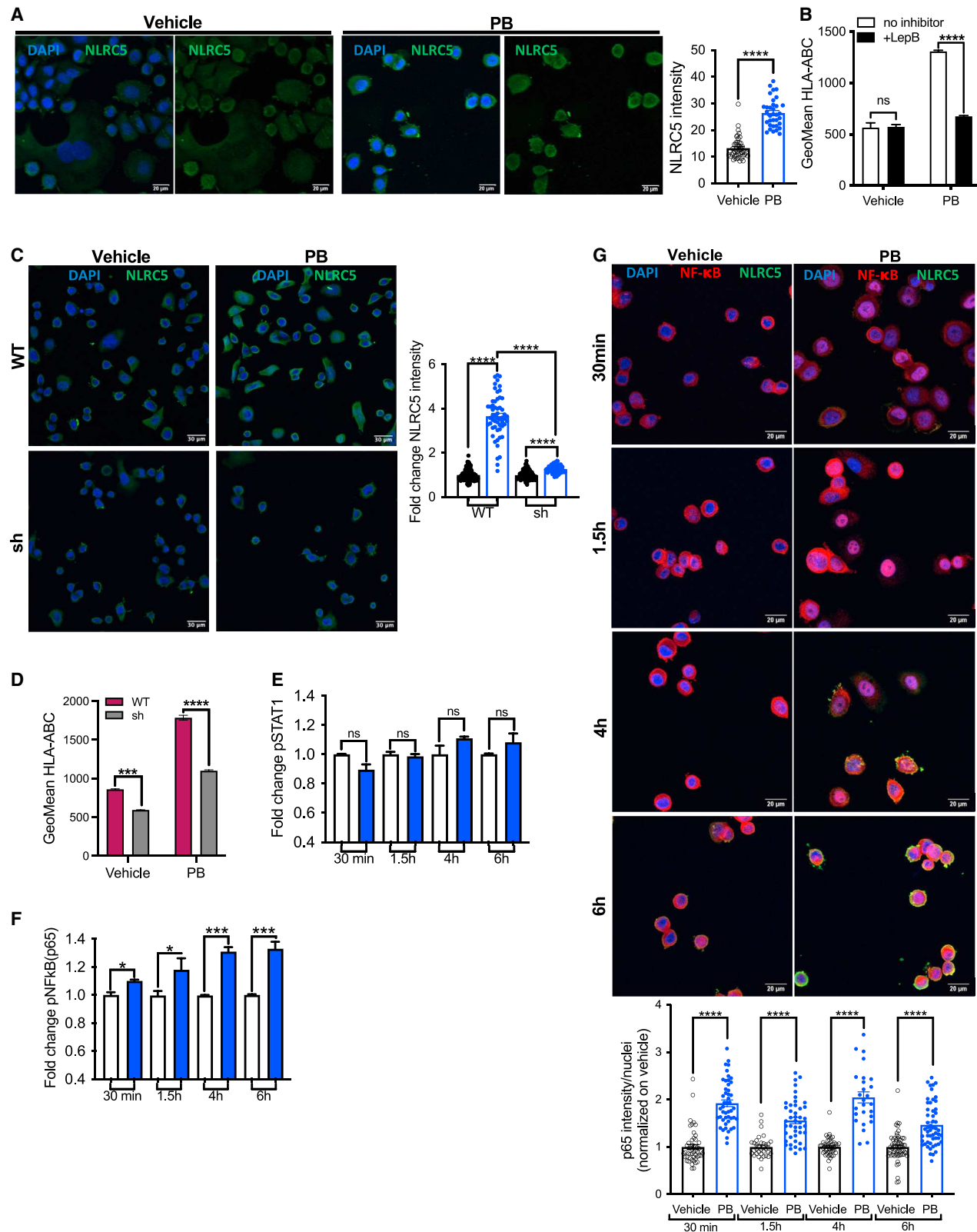
T cells (both in the tumor microenvironment as well as the spleen), and prolong mouse survival, highlighting their potential use as a combination therapy with ICIs.

In addition to treatment with ICIs, immunotherapy with adoptive cell transfer (ACT) of TA-specific T cells is being increasingly used as a treatment option for patients with melanoma.<sup>41,42</sup> HLA class I expression on cancer cells is fundamental for the efficacy of ACT, therefore, we sought to understand if postbiotics could help control tumor growth also in this system. To do so, NOD scid gamma (NSG) mice were subcutaneously injected with 624.38 human melanoma cells prior to treatment with postbiotics or the vehicle control (Figure 3A). Once tumors were palpable, mice were infused with MART-1-specific polyclonal CTL (as used in Figure 1). Superior control of tumor growth was seen when mice were pre-treated with postbiotics compared to the group receiving the vehicle control (Figure 3B), and tumors weighed significantly less at the end of the experiment (Figure 3C). Importantly, tumor growth was similar between all treatment conditions prior to ACT, indicating that postbiotics do not act directly on tumor growth. Similar to the results seen *in vitro* and in the 4T1 TNBC model *in vivo*, postbiotic treatment upregulated HLA class I expression on the tumor cells when compared to the vehicle control group (Figure 3D). While there was also a trend toward increased  $CD8^+$  T cells in the tumor microenvironment, this was not statistically significant (Figure 3D); however, there was a significant correlation between the percentage of

infiltrating  $CD8^+$  T cells and cancer cell HLA class I expression (Figure 3E).

#### Innate inflammatory pathways drive postbiotic-mediated upregulation of HLA class I expression in cancer cells

Since HLA class I expression is an essential function, its modulation could be due to multiple mechanisms. To investigate the mechanism by which postbiotics can upregulate HLA class I expression, we first evaluated gene modulation by RNA sequencing of the SK-BR-3 breast cancer cell line after treatment with postbiotics or the vehicle control. As shown in Figure S4A, the sequencing results confirmed the upregulation of the entire locus of HLA class I molecules (A, B, and C) and the antigen-processing machinery (APM) (proteasome subunits and transporter associated with antigen-processing [TAP] molecules) at the RNA level. We also observed an upregulation of NLR5, which is known as MHC class I transactivator (CITA) and subsequently critical for baseline and  $IFN\gamma$ -induced expression of HLA class I.<sup>43–45</sup> To confirm that NLR5 was induced by postbiotic treatment, we incubated breast cancer cell lines with postbiotics for 4 h and found a marked increase in NLR5 expression by immunofluorescence (Figures 4A and S5A). To confirm that NLR5 was necessary for the postbiotic-mediated HLA class I upregulation, we next incubated SK-BR-3 cells with postbiotics or vehicle control in the presence of leptomycin B,



**Figure 4. Involvement of NLRC5 in postbiotic-mediated upregulation of HLA class I in the SK-BR-3 breast cancer cell line**

(A) SK-BR-3 cells were treated with 10 mg/mL postbiotics or vehicle control prior to analysis of NLRC5 by immunofluorescence. Quantification of NLRC5 shown to the right.

(legend continued on next page)

which prevents the transfer of NLRC5 between the nucleus and the cytoplasm via CRM1 and is commonly used to study NLRC5 function.<sup>43</sup> The addition of leptomycin B completely abrogated postbiotics' effect (Figure 4B and S5B), indicating that NLRC5 might play a key role in the postbiotic-induced upregulation of HLA class I expression. Since leptomycin B is not specific to NLRC5, we silenced NLRC5 in the SK-BR-3 cell line, which resulted in a >~50% knock down of NLRC5 expression at the mRNA level (Figure S5C). While not a complete knock out of basal RNA expression, the inhibition of further NLRC5 expression abrogated the postbiotics effect on both NLRC5 protein expression (Figure 4C) and HLA class I upregulation (Figure 4D).

Analysis of the differentially expressed genes in the SK-BR-3 cell line after postbiotic treatment suggested the association of the JAK-STAT pathway at the RNA level (Figure S4B). As the JAK-STAT pathway is heavily involved in the modulation of HLA class I<sup>46</sup> and has been implicated in the regulation of NLRC5,<sup>44</sup> we sought to understand if the upregulation of HLA class I was mediated by this pathway. However, when the SK-BR-3 cell line was treated with postbiotics *in vitro*, we did not detect increased phosphorylation of STAT1 (Figure 4E), which is fundamental for JAK-STAT involvement in HLA class I expression.<sup>47</sup>

After excluding JAK-STAT as one potential mechanism of action, we took a closer look at the differentially expressed genes using gene set enrichment analysis (GSEA) software.<sup>48,49</sup> This analysis highlighted the involvement of innate inflammatory pathways, including toll-like receptor (TLR) signaling cascade and NF- $\kappa$ B (Figure S4C). As NF- $\kappa$ B was the top modulated pathway, and NLRC5 has been implicated in the negative-feedback loop regulating NF- $\kappa$ B activation,<sup>50</sup> we first investigated the involvement of NF- $\kappa$ B. We observed that the p65 isoform is phosphorylated (Figure 4F) and translocates to the nucleus (Figures 4G and S5D) after *in vitro* treatment with postbiotics.

To better understand the pathway that regulates postbiotic-induced upregulation of HLA class I, we next inhibited NF- $\kappa$ B function using the NF- $\kappa$ B activation inhibitor IV, which acts by preventing the dissociation of NF- $\kappa$ B from I $\kappa$ B.<sup>51</sup> Blocking NF- $\kappa$ B activation completely abrogated the postbiotic-mediated upregulation of HLA class I (Figure 5A) and NLRC5 (Figure 5C), validating NF- $\kappa$ B as a fundamental part of this system. Next, we investigated the role of MYD88 as it is a known upstream mediator of NF- $\kappa$ B<sup>52-54</sup> and its activation was also identified by our pathway analysis (Figure S4). To elucidate the role of MYD88, we treated the SK-BR-3 breast cancer cell line with postbiotics or the vehicle control in the presence of the ST2825 MYD88-activation inhibitor, which led to a significant reduction in HLA class I (Figure 5B) and NLRC5 (Figure 5C) upregulation in the SK-BR-3 cell line. This effect was recapitulated in the 4T1 TNBC cell line, both at the MHC class I (Figure 5D) and NLRC5 (Figure 5E) level.

### Postbiotic-induced upregulation of HLA class I is not dependent on possible contaminating LTA

*L. paracasei* is a gram-positive bacterium and contains in its cell wall lipoteichoic acid (LTA) that is sensed by TLR2, which is upstream of MYD88. We showed a role for MYD88 in controlling HLA class I upregulation, thus we wanted to exclude that postbiotic activity was simply the result of the presence of LTA. Therefore, we measured the amount of LTA in the postbiotic and found that 1 mL of postbiotic (when diluted at 10 mg/mL, the concentration used for the experiments) contains approximately 5 pg LTA (Figure 6A). Next, we directly assessed the effect of LTA on two different cell lines and saw that there was no effect on HLA class I expression, even when using a 5-fold higher concentration of LTA (Figure 6B), suggesting that the observed effect was not mediated by LTA. Consistently, we observed that blocking TLR2, which significantly controlled HLA class I upregulation (Figure 6C) only moderately affected postbiotic activity. These results show that postbiotics work at least partially through TLR2 in an LTA-independent way.

### Postbiotic-induced upregulation of HLA class I is mediated by metabolites of organic origin (phytosphingosine)

Postbiotics are comprised of all substances released by bacteria during the fermentation process; therefore, we sought to distinguish which molecule(s) could exert an effect on HLA class I expression. Given the partial involvement of TLR2 and in the attempt to identify the nature of the metabolite involved in HLA class I upregulation, we first separated the aqueous from the organic phase of postbiotics. When tested *in vitro*, we saw that the organic surfactant fraction alone could recapitulate the HLA class I upregulation observed when using the whole postbiotic (Figure 6D), suggesting a lipophilic nature of the active compound. After performing a metabolomic analysis of the postbiotic mixture, we saw that phytosphingosine was the only phospholipid among the top 10 more abundant metabolites in the whole postbiotic (Table S1). Therefore, we compared phytosphingosine alone to the whole postbiotic *in vitro* and saw that it could upregulate HLA class I expression (Figure 6E), and it also induced NF- $\kappa$ B activation (Figure 6F). Similarly, in murine cancer cell lines, we found an increase in MHC class I expression (Figures 6G and S6A), which was abrogated in the presence of NF- $\kappa$ B and MYD88 inhibitors but not TLR2 and TLR4 inhibitors (Figure 6H), as well as an upregulation in NLRC5 expression upon phytosphingosine treatment (Figure 6I). As phytosphingosine seemed to mimic the effect of the whole postbiotic *in vitro*, we next assessed its effect *in vivo* in combination with anti-PD-1 and saw that it could

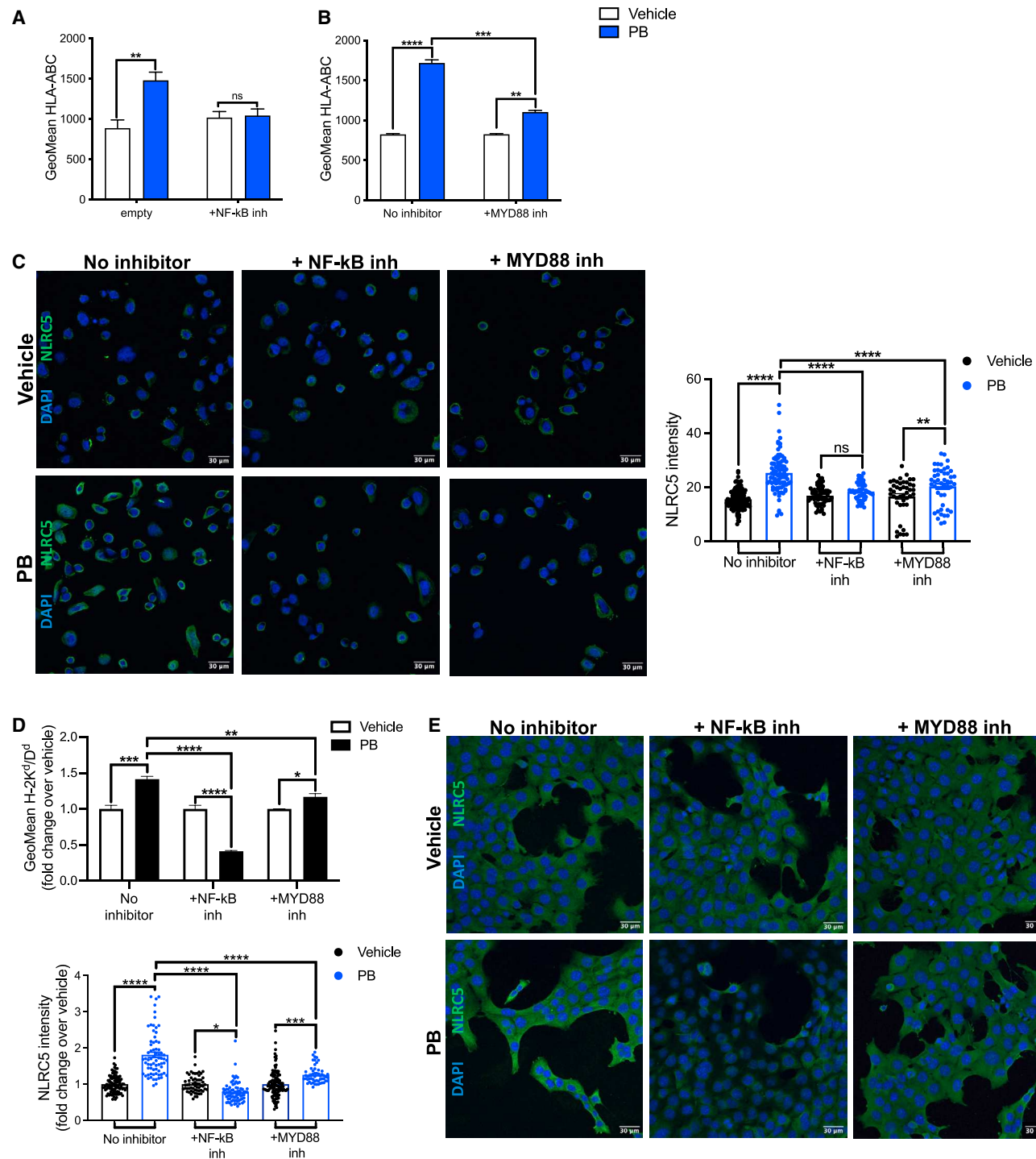
(B) Cells were treated with 10 mg/mL postbiotics or vehicle control in the presence of 100 ng/mL Leptomycin B for 48 h prior to analysis of HLA-ABC by flow cytometry.

(C and D) Wild-type (WT) or NLRC5-silenced (sh) SK-BR-3 cells were treated with 10 mg/mL postbiotics (blue) or vehicle control (black) prior to analysis of NLRC5 by immunofluorescence after 4 h (C) and HLA class I expression after 48 h (D). Quantification shown on right.

(E and F) Kinetics of STAT1 (E) and NF- $\kappa$ B p65 (F) phosphorylation after vehicle (clear bars) or postbiotic treatment (blue bars) as measured by flow cytometry.

(G) Immunofluorescence analysis of NLRC5 (green) and NF- $\kappa$ B (red) after postbiotic treatment. Quantification of p65 intensity within nuclei (performed on entire image and normalized on vehicle control) shown below.

Experiments repeated in triplicate, representative experiment shown. Data represented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: (A) t test; (B–G) two-way ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Also see Figure S4 and S5.

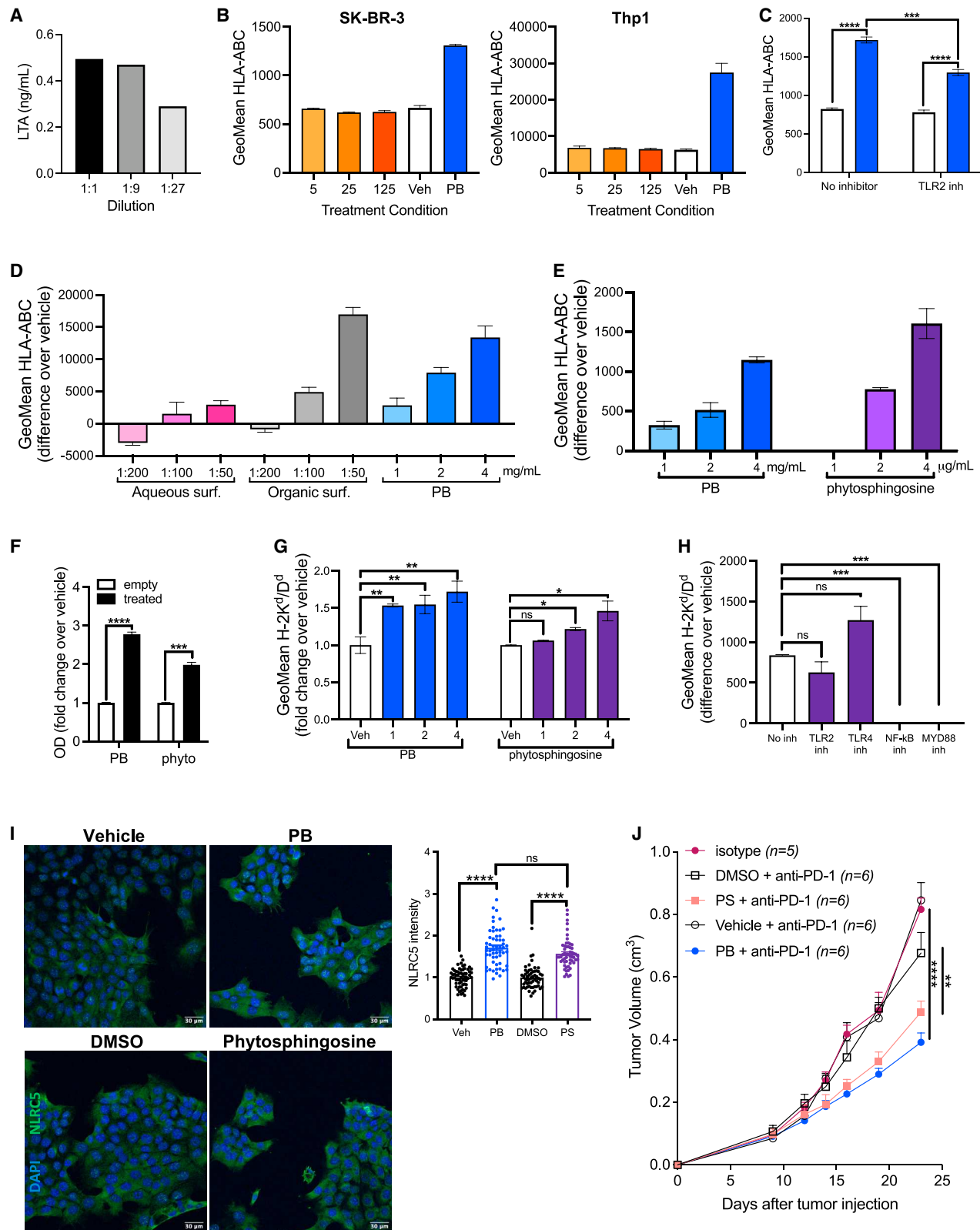


**Figure 5. Postbiotic-mediated pathway analysis**

SK-BR-3 (A–C) and 4T1 (D and E) cell lines were treated with postbiotics or vehicle control in the presence of an NF- $\kappa$ B or MYD88 inhibitor for 48 h prior to measuring HLA/MHC class I expression by flow cytometry (A, B, and D) and NLRC5 expression by immunofluorescence (C and E). All experiments repeated three times, representative experiment shown. Statistical analysis by two-way ANOVA, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

significantly control tumor growth in both the 4T1 (Figure 6J) and CT26 (Figure S6B) models, similarly to the whole postbiotic.

Taken together, these results show that postbiotic-mediated upregulation of HLA class I expression on cancer cells is driven by the increase of NLRC5 in response to upstream



(legend on next page)

MYD88-NF- $\kappa$ B activation (Figure S7). This pathway is partially mediated by TLR2 and is recapitulated by the phospholipid phytosphingosine that is enriched in the postbiotic mix.

## DISCUSSION

In this study, we show that postbiotics released by a strain of *L. paracasei* can upregulate HLA class I expression on a breast cancer cell line. These findings extended to multiple melanoma and breast cancer cell lines, whereby postbiotics mediated upregulation of HLA class I expression in 70% of cells tested. The upregulation of HLA class I in both primary and immortalized melanoma cells subsequently led to increased MART-1-specific T cell activation and cytotoxicity *in vitro*. This effect was then recapitulated *in vivo* as the ACT of MART-1-specific T cells combined with postbiotic treatment upregulated HLA class I expression and controlled growth of the 624.38 melanoma cell line. When postbiotics were combined with anti-PD-1 ICI in *in vivo* murine models of TNBC and CRC, postbiotic treatment significantly improved tumor growth control, increased the percentage of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment and in the spleen, upregulated MHC class I expression, and prolonged mouse survival.

We observed that, unlike the postbiotic derived from *L. paracasei*, postbiotics released by *B. longum* or *A. muciniphila* did not upregulate HLA class I expression. This result was surprising, as we had chosen *B. longum* and *A. muciniphila* because they had been previously described as enriched in patients responding to anti-PD-1 therapy.<sup>7,8</sup> However, a recent publication shows that *A. muciniphila* by itself does not in fact aid in response to anti-PD-1. The authors postulate that the abundance of *A. muciniphila* acts as a marker of healthy gut microbiota, and patients with a normal distribution of gut bacteria are those that respond well to immunotherapy.<sup>55,56</sup>

A healthy microbiota is often associated with a higher abundance of *Lactobacilli*.<sup>57</sup> As the *L. paracasei* genome is not included in commonly used databases for metagenomic analyses,<sup>36</sup> we are not surprised that it was not pointed out as correlating with ICI efficacy. By contrast, in a recent publication, Lee et al. found a correlation of ICI response (progression-free survival, PFS) with another *Lactobacillus*, (*L. vaginalis*), found in 7/7 cohorts of melanoma patients.<sup>36</sup> However, a manuscript published by McCulloch et al. in the same issue showed that *L. vaginalis* is associated with decreased PFS in one of the cohorts analyzed and was not conclusive on *L. paracasei*.<sup>58</sup> Because of this, we sought to understand if postbiotics derived from *L. vaginalis* could influence HLA class I expression.

*L. vaginalis* also significantly increased HLA class I expression, albeit not to the same extent as the postbiotics derived from *L. paracasei*. Taken together, these data highlight that this field is still in its infancy and there are multiple variables that need to be taken into consideration, including the metabolomic output of the microbiota.<sup>59</sup> In addition, it has also been shown that fecal microbiota transplantation from healthy individuals confers sensitivity to anti-PD1 treatment in MC38 (intestinal tumor)-bearing mice.<sup>60</sup> They correlated the response with *Lactobacillus* genera and isolated a novel *Lacticaseibacillus* strain, named *L. paracasei sh2020*, which when administered to mice, conferred sensitivity to anti-PD1 without a major impact on the gut microbiota. The response was dependent on the recruitment of CD8<sup>+</sup> T cells within the tumor, but they did not underpin the mechanism of action nor MHC class I expression. We now fill this gap by showing that *Lactobacilli* upregulate HLA class I molecules on tumor cells rendering them more visible to the immune system.

To our knowledge, this is the first study that analyzed the effect of the microbiota and its derived metabolites in improving cancer immunotherapy through the upregulation of HLA class I expression on tumor cells. HLA downregulation by cancer cells has been extensively described in multiple cancer types, including TNBC and CRC, starting as early as the 1980s,<sup>25,61–63</sup> yet there is still no clear answer for how to overcome this obstacle.<sup>64</sup> The results we obtained in the *in vivo* models of TNBC and CRC (4T1 and CT26, respectively) suggest a novel combination treatment to augment response rates, which could have a significant impact on patients who do not respond to immunotherapy treatment due to the downregulation of HLA class I expression. In fact, in TNBC, chemotherapy combined with pembrolizumab (anti-PD-1) has shown promising results, with a 3-fold increase in survival (20%–60%) in locally advanced cases<sup>65</sup>; however, in metastatic TNBC, the pathological complete response increased modestly from 51.2% to 64.8%.<sup>66</sup> While these results are encouraging, the PFS for metastatic patients is still low. In CRC patients, treatment with ICIs has been largely ineffective. Patients with mismatch repair proficient (pMMR) tumors represent approximately 85% of all CRC patients; unfortunately, this tumor is characterized by low immunogenicity and is almost completely resistant to immunotherapy regimens, such as anti-PD-1.<sup>67</sup> Our results suggest that discovering treatments that increase HLA class I expression could improve anti-cancer immune responses by enabling CD8<sup>+</sup> tumor-specific T cells to recognize and eliminate malignant cells. Postbiotics have the potential to boost the efficacy and overall success of immunotherapies

### Figure 6. Postbiotic characterization

(A) Concentration of LTA in postbiotic as measured by LTA-specific competitive ELISA. (B) SK-BR-3 and Thp1 cancer cell lines were incubated with 5–125 pg/mL LTA and 10 mg/mL vehicle or postbiotics for 48 h prior to measuring HLA class I expression. (C) SK-BR-3 cells were treated with 10 mg/mL postbiotics or vehicle control in the presence of 50  $\mu$ g/mL of the TLR2 inhibitor C29. GeoMean HLA class I expression measured by flow cytometry. Thp1 cells were incubated for 48 h with postbiotics and either (D) aqueous or organic surfactants or (E) phytosphingosine prior to measuring HLA class I expression by flow cytometry. (F) Thp1-Blue NF- $\kappa$ B cells were incubated for 4 h with 4 mg/mL postbiotics and 4  $\mu$ g/mL phytosphingosine (phyto) prior to assessing NF- $\kappa$ B activation using QUANTI-Blue detection reagent read on a spectrophotometer. 4T1 cells were incubated with 2  $\mu$ g/mL phytosphingosine for (G and H) 48 h to measure MHC class I expression with or without TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, or MYD88 inhibitors, and (I) 4 h to measure NLRC5 expression by immunofluorescence (quantification on right). (J) *In vivo* tumor growth of 4T1 TNBC model following the experimental design utilized in Figure 2. Mice were randomized on day 8 and treated with 200  $\mu$ g anti-PD-1 combined with either 250  $\mu$ g of postbiotics or their vehicle control, or 5  $\mu$ g phytosphingosine or its vehicle control (DMSO). Statistical analysis: (C, G, H, and I) one-way ANOVA; F) t test; (J) two-way ANOVA. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001. Also see Figures S6 and S7.

when used in combination. In addition, we found that the metabolite phytosphingosine had a similar NF- $\kappa$ B and MYD88-dependent effect on HLA class I expression *in vitro* and tumor growth *in vivo*. While phytosphingosine has been well studied in the cosmetic industry, there was no report on its ability to upregulate HLA class I expression on tumor cells.

One of the major regulators of HLA class I expression is NLRC5, as it acts as a transactivator of the HLA class I promoter through the formation of the NLRC5 enhanceosome.<sup>43</sup> While the effect of NLRC5 on HLA class I expression has been extensively researched,<sup>44,68</sup> the upstream mediators have mainly been focused on the IFN $\gamma$  pathway. To date, published research has identified a potential role for NLRC5 in the inhibition of NF- $\kappa$ B; by contrast, we connect NF- $\kappa$ B activation with both the increase in NLRC5 and its downstream effect on HLA class I upregulation. IFN $\gamma$  is known to induce strong increases in HLA expression through activation of the JAK-STAT pathway and has been used in clinical trials as an immunotherapy adjuvant. However, besides the toxicity often associated to this cytokine, mutations in the IFN $\gamma$  pathway are commonly seen in patients who relapse or are refractory to ICI therapy,<sup>69</sup> limiting the use of IFN $\gamma$  in these patients. We show that postbiotics upregulate HLA class I expression through MYD88-NF- $\kappa$ B instead of the JAK-STAT pathway, suggesting that they could be used in patients whose tumors are resistant to IFN $\gamma$ . Better therapies are sorely needed for patients with cancer, and as postbiotics have already been determined as safe for use in humans, and differently from IFN $\gamma$  are not toxic, they can be quickly translated into the clinic in combination with currently available immunotherapies.

## 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 DETAILS**
  - Mice
  - Cell lines
- **METHOD DETAILS**
  - Postbiotic production
  - Postbiotic treatment *in vitro* and MHC quantification
  - Generation of MART-1-specific T cells
  - Degranulation assay
  - Delfia cytotoxicity assay
  - Tumor growth and treatment *in vivo*
  - Splenocyte activation assay
  - Immunofluorescence
  - LTA quantification
  - Biosurfactant purification
  - Metabolomics analysis
  - RNA QC, library preparation and sequencing
  - RNA-seq data analysis

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.08.014>.

## ACKNOWLEDGMENTS

V.F. is supported by an Alan Ghitis Foundation fellowship (2019). M.R., A.M., and L.T. are supported by an Italian Foundation for Cancer Research grant (AIRC 5x1000(2019) “UniCanVax” No.22757; AIRC IG 22026, 2018). LT is a recipient of AIRC pre-doc fellowship. We would like to thank Dr. Soldano Ferrone for his support and helpful discussions on HLA class I expression in cancer. We also thank Dr. Sara Carloni for her help and guidance with the *A. muciniphila* and *B. longum* experiments, Dr. Marta Pandini for her help with *in vivo* experiments, as well as Dr. Silvia Pimazzoni for her help with *in vivo* experiments, moral support, and careful review of the manuscript.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.R. and V.F. designed the project, analyzed the data, and wrote the manuscript. V.F., A.M., A.L., A.M.M., L.T., M.S., M.L., and N.T., performed experiments and collected data. D.B. performed RNA analysis. N.T. and F.A. generated all postbiotics. All authors reviewed the final manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

M.R. is co-founder and CSO of Postbiotica S.r.l, consultant for Millbo and research collaborator for Gelesis and Alfa Sigma. G.P. is co-founder and scientific advisor of Postbiotica S.r.l. F.A. and N.T. are employees of Postbiotica S.r.l.

## INCLUSION AND DIVERSITY

We support inclusive, diverse, and equitable conduct of research.

Received: August 13, 2022

Revised: April 7, 2023

Accepted: August 31, 2023

Published: September 21, 2023

## REFERENCES

1. Pevsner-Fischer, M., Tuganbaev, T., Meijer, M., Zhang, S.H., Zeng, Z.R., Chen, M.H., and Elinav, E. (2016). Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. *World J. Clin. Oncol.* 7, 200–213.
2. Rossini, A., Rumio, C., Sfondrini, L., Tagliabue, E., Morelli, D., Miceli, R., Mariani, L., Palazzo, M., Ménard, S., and Balsari, A. (2006). Influence of antibiotic treatment on breast carcinoma development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res.* 66, 6219–6224.
3. Xuan, C., Shamonki, J.M., Chung, A., Dinome, M.L., Chung, M., Sieling, P.A., and Lee, D.J. (2014). Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* 9, e83744.
4. Pitt, J.M., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Kroemer, G., Chamailard, M., Boneca, I.G., and Zitvogel, L. (2016). Fine-Tuning Cancer Immunotherapy: Optimizing the Gut Microbiome. *Cancer Res.* 76, 4602–4607.
5. Zitvogel, L., Ayyoub, M., Routy, B., and Kroemer, G. (2016). Microbiome and Anticancer Immunosurveillance. *Cell* 165, 276–287.
6. Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinet, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., et al. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 359, 97–103.
7. Routy, B., Le Chatelier, E., Derosa, L., Duong, C.P.M., Alou, M.T., Daillère, R., Fluckiger, A., Messaoudene, M., Rauber, C., Roberti, M.P., et al. (2018). Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 359, 91–97.

8. Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.L., Luke, J.J., and Gajewski, T.F. (2018). The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 359, 104–108.
9. Davar, D., Dzutsev, A.K., McCulloch, J.A., Rodrigues, R.R., Chauvin, J.M., Morrison, R.M., Deblasio, R.N., Menna, C., Ding, Q., Pagliano, O., et al. (2021). Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science* 371, 595–602.
10. Baruch, E.N., Youngster, I., Ben-Betzalel, G., Ortenberg, R., Lahat, A., Katz, L., Adler, K., Dick-Necula, D., Raskin, S., Bloch, N., et al. (2021). Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science* 371, 602–609.
11. Yang, W., and Cong, Y. (2021). Gut microbiota-derived metabolites in the regulation of host immune responses and immune-related inflammatory diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 866–877.
12. Tsilingiri, K., and Rescigno, M. (2013). Postbiotics: what else? *Benef. Microbes* 4, 101–107.
13. Aguilar-Toalá, J.E., Arioli, S., Behare, P., Belzer, C., Berni Canani, R., Chatel, J.M., D'Auria, E., de Freitas, M.Q., Elinav, E., Esmerino, E.A., et al. (2021). Postbiotics - when simplification fails to clarify. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 825–826.
14. Spadoni, I., Zagato, E., Bertocchi, A., Paolinelli, R., Hot, E., Di Sabatino, A., Caprioli, F., Bottiglieri, L., Oldani, A., Viale, G., et al. (2015). A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science* 350, 830–834.
15. Rooks, M.G., and Garrett, W.S. (2016). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 341–352.
16. Castillo, D.J., Rifkin, R.F., Cowan, D.A., and Potgieter, M. (2019). The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 148.
17. Terranova-Barberio, M., Thomas, S., Ali, N., Pawlowska, N., Park, J., Krings, G., Rosenblum, M.D., Budillon, A., and Munster, P.N. (2017). HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 8, 114156–114172.
18. Jenke, R., Reßing, N., Hansen, F.K., Aigner, A., and Büch, T. (2021). Anticancer Therapy with HDAC Inhibitors: Mechanism-Based Combination Strategies and Future Perspectives. *Cancers* 13, 634.
19. Wei, S.C., Duffy, C.R., and Allison, J.P. (2018). Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 8, 1069–1086.
20. Granier, C., De Guillebon, E., Blanc, C., Roussel, H., Badoual, C., Colin, E., Saldmann, A., Gey, A., Oudard, S., and Tartour, E. (2017). Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. *ESMO Open* 2, e000213.
21. Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.
22. Seliger, B., and Ferrone, S. (2020). HLA Class I Antigen Processing Machinery Defects in Cancer Cells-Frequency, Functional Significance, and Clinical Relevance with Special Emphasis on Their Role in T Cell-Based Immunotherapy of Malignant Disease. *Methods Mol. Biol.* 2055, 325–350.
23. Cai, L., Michelakos, T., Yamada, T., Fan, S., Wang, X., Schwab, J.H., Ferrone, C.R., and Ferrone, S. (2018). Defective HLA class I antigen processing machinery in cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 67, 999–1009.
24. Campoli, M., Chang, C.C., and Ferrone, S. (2002). HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 (Suppl 4), A40–A45.
25. Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., and Huber, C. (2000). Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56, 327–336.
26. Maggs, L., Sadagopan, A., Moghaddam, A.S., and Ferrone, S. (2021). HLA class I antigen processing machinery defects in antitumor immunity and immunotherapy. *Trends Cancer* 7, 1089–1101.
27. Lee, J.H., Shklovskaya, E., Lim, S.Y., Carlino, M.S., Menzies, A.M., Stewart, A., Pedersen, B., Irvine, M., Alavi, S., Yang, J.Y.H., et al. (2020). Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de-differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nat. Commun.* 11, 1897.
28. Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J.D., and Rock, K.L. (2021). Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 12, 636568.
29. Pedersen, M.H., Hood, B.L., Beck, H.C., Conrads, T.P., Ditzel, H.J., and Leth-Larsen, R. (2017). Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncolimmunology* 6, e1305531.
30. Anderson, P., Aptsiauri, N., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2021). HLA class I loss in colorectal cancer: implications for immune escape and immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 18, 556–565.
31. Perea, F., Bernal, M., Sánchez-Palencia, A., Carretero, J., Torres, C., Bayarri, C., Gómez-Morales, M., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2017). The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int. J. Cancer* 140, 888–899.
32. Gil-Julio, H., Perea, F., Rodríguez-Nicolas, A., Cozar, J.M., González-Ramírez, A.R., Concha, A., Garrido, F., Aptsiauri, N., and Ruiz-Cabello, F. (2021). Tumor Escape Phenotype in Bladder Cancer Is Associated with Loss of HLA Class I Expression, T-Cell Exclusion and Stromal Changes. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7248.
33. Vago, L., Perna, S.K., Zanussi, M., Mazzi, B., Barlassina, C., Stanghellini, M.T.L., Perrelli, N.F., Cosentino, C., Torri, F., Angius, A., et al. (2009). Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 361, 478–488.
34. Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., and Rescigno, M. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61, 1007–1015.
35. Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I.D., and Rescigno, M. (2009). Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* 4, e7056.
36. Lee, K.A., Thomas, A.M., Bolte, L.A., Björk, J.R., de Ruijter, L.K., Armanini, F., Asnicar, F., Blanco-Miguez, A., Board, R., Calbet-Llopert, N., et al. (2022). Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. *Nat. Med.* 28, 535–544.
37. Christensen, O., Lupu, A., Schmidt, S., Condomines, M., Belle, S., Maier, A., Hose, D., Neuber, B., Moos, M., Kleist, C., et al. (2009). Melan-A/MART1 analog peptide triggers anti-melanoma T-cells through cross-reactivity with HM1.24. *J. Immunother.* 32, 613–621.
38. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723.
39. Stringhini, M., Probst, P., and Neri, D. (2020). Immunotherapy of CT26 murine tumors is characterized by an oligoclonal response of tissue-resident memory T cells against the AH1 rejection antigen. *Eur. J. Immunol.* 50, 1591–1597.
40. Jordan, K.R., McMahan, R.H., Kemmler, C.B., Kappler, J.W., and Slansky, J.E. (2010). Peptide vaccines prevent tumor growth by activating T cells that respond to native tumor antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 4652–4657.
41. Ott, P.A., Dotti, G., Yee, C., and Goff, S.L. (2019). An Update on Adoptive T-Cell Therapy and Neoantigen Vaccines. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 39, e70–e78.
42. Betof-Warner, A., Sullivan, R.J., and Sarnaik, A. (2022). Adoptive Cell Transfer and Vaccines in Melanoma: The Horizon Comes Into View. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 42, 1–8.
43. Neerincx, A., Rodriguez, G.M., Steimle, V., and Kufer, T.A. (2012). NLRC5 controls basal MHC class I gene expression in an MHC enhanceosome-dependent manner. *J. Immunol.* 188, 4940–4950.



44. Meissner, T.B., Li, A., Biswas, A., Lee, K.H., Liu, Y.J., Bayir, E., Iliopoulos, D., van den Elsen, P.J., and Kobayashi, K.S. (2010). NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 13794–13799.
45. Kobayashi, K.S., and van den Elsen, P.J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 813–820.
46. Srivastava, R.M., Trivedi, S., Concha-Benavente, F., Hyun-Bae, J., Wang, L., Seethala, R.R., Branstetter, B.F., 4th, Ferrone, S., and Ferris, R.L. (2015). STAT1-Induced HLA Class I Upregulation Enhances Immunogenicity and Clinical Response to Anti-EGFR mAb Cetuximab Therapy in HNC Patients. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 936–945.
47. Lee, C.K., Gimeno, R., and Levy, D.E. (1999). Differential regulation of constitutive major histocompatibility complex class I expression in T and B lymphocytes. *J. Exp. Med.* *190*, 1451–1464.
48. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 15545–15550.
49. Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J.P., and Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* *1*, 417–425.
50. Cui, J., Zhu, L., Xia, X., Wang, H.Y., Legras, X., Hong, J., Ji, J., Shen, P., Zheng, S., Chen, Z.J., and Wang, R.F. (2010). NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways. *Cell* *141*, 483–496.
51. Heynekamp, J.J., Weber, W.M., Hunsaker, L.A., Gonzales, A.M., Orlando, R.A., Deck, L.M., and Jagt, D.L.V. (2006). Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB. *J. Med. Chem.* *49*, 7182–7189.
52. Kawai, T., and Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* *13*, 460–469.
53. Rahman, M.M., and McFadden, G. (2011). Modulation of NF-kappaB signalling by microbial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 291–306.
54. Taniguchi, K., and Karin, M. (2018). NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* *18*, 309–324.
55. Derosa, L., Routy, B., Thomas, A.M., Iebba, V., Zalcman, G., Friard, S., Mazieres, J., Audigier-Valette, C., Moro-Sibilot, D., Goldwasser, F., et al. (2022). Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nat. Med.* *28*, 315–324.
56. Li, L., and McAllister, F. (2022). Too much water drowned the miller: *Akkermansia* determines immunotherapy responses. *Cell Rep. Med.* *3*, 100642.
57. Dempsey, E., and Corr, S.C. (2022). *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front. Immunol.* *13*, 840245.
58. McCulloch, J.A., Davar, D., Rodrigues, R.R., Badger, J.H., Fang, J.R., Cole, A.M., Balaji, A.K., Vetzou, M., Prescott, S.M., Fernandes, M.R., et al. (2022). Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nat. Med.* *28*, 545–556.
59. Bhutiani, N., and Wargo, J.A. (2022). Gut microbes as biomarkers of ICI response - sharpening the focus. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *19*, 495–496.
60. Zhang, S.L., Han, B., Mao, Y.Q., Zhang, Z.Y., Li, Z.M., Kong, C.Y., Wu, Y., Chen, G.Q., and Wang, L.S. (2022). *Lactocaseibacillus paracasei* sh2020 induced antitumor immunity and synergized with anti-programmed cell death 1 to reduce tumor burden in mice. *Gut Microb.* *14*, 2046246.
61. Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (1991). MHC expression on human tumors—its relevance for local tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *2*, 3–10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1912516>.
62. Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., and Stern, P.L. (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol. Today* *14*, 491–499.
63. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* *74*, 181–273.
64. Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E.M., Garcia Lora, A.M., and van Hall, T. (2016). The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* *39*, 44–51.
65. ASCO. I-SPY Trial (2017). Combination of Pembrolizumab Plus Standard Neoadjuvant Therapy in High-Risk Breast Cancer. <https://ascopost.com/News/55733>.
66. Schmid, P., Salgado, R., Park, Y.H., Muñoz-Couselo, E., Kim, S.B., Sohn, J., Im, S.A., Foukakis, T., Kuemmel, S., Dent, R., et al. (2020). Pembrolizumab plus chemotherapy as neoadjuvant treatment of high-risk, early-stage triple-negative breast cancer: results from the phase 1b open-label, multicohort KEYNOTE-173 study. *Ann. Oncol.* *31*, 569–581.
67. Weng, J., Li, S., Zhu, Z., Liu, Q., Zhang, R., Yang, Y., and Li, X. (2022). Exploring immunotherapy in colorectal cancer. *J. Hematol. Oncol.* *15*, 95.
68. Neerinx, A., Castro, W., Guarda, G., and Kufer, T.A. (2013). NLRC5, at the Heart of Antigen Presentation. *Front. Immunol.* *4*, 397.
69. Respa, A., Bukur, J., Ferrone, S., Pawelec, G., Zhao, Y., Wang, E., Marincola, F.M., and Seliger, B. (2011). Association of IFN-gamma signal transduction defects with impaired HLA class I antigen processing in melanoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* *17*, 2668–2678.
70. Suresh Chander TL, C.R., Mukesh Kumar, D.J., and Kalaichelvan, P.T. (2012). Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative. *Adv. Appl. Sci. Res.* *3*, 1827–1831.



## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
anti-human HLA-ABC	BioLegend	Cat#: 311430; RRID: AB_2561617
anti-human HLA-A2	BioLegend	Cat#: 343306; RRID: AB_1877227
anti-mouse H-2K <sup>d</sup> /D <sup>d</sup>	BioLegend	Cat#: 114706; RRID: AB_313605
Live/Dead Fixable Viability Stain BV510	BD Bioscience	Cat#: 564406; RRID: AB_2869572
IL-4	Peprotech	Cat#: AF-200-04
GM-CSF	Peprotech	Cat#: AF-300-03
IL-2	Proleukin	N/A
IL-15	Peprotech	Cat#: AF-200-15
anti-human CD107a	BioLegend	Cat#: 328618; RRID: AB_11147955
Brefeldin A	eBioscience	Cat #: 00-4506-51
GolgiStop™ (containing monensin)	BD Bioscience	Cat#: 554724
NLRC5	Santa Cruz Biotechnology	Cat#: sc-515668
NF-kBp65	Cell Signaling Technology	Cat#: 8242
Donkey anti-mouse IgG AF647	Thermo Fisher	Cat#: A21202
Donkey anti-rabbit IgG	Thermo Fisher	Cat#: A31572
<b>Bacterial and virus strains</b>		
<i>A. muciniphila</i>	DSMZ-German Collection of Microorganisms and 771 Cell Cultures GmbH	ATCC-BAA-835
<i>L. paracasei</i> CNCM I-5220	Redeposited by Istituto Europeo di Oncologia S.r.l., Via Filodrammatici 10, 20121, Milano, Italy, on July 26, 2017 according 5 to Budapest Treaty with CNCM	
<b>Chemicals, peptides, and recombinant proteins</b>		
MART-1 (ELAGIGILTV)	J.P.T.	SP-MHCI-0006
<b>Deposited data</b>		
Metabolomic and RNAseq Data	Zenodo	10.5281/zenodo.8304577
<b>Experimental models: Cell lines</b>		
SK-BR-3	ATCC	Cat#: HTB-30; RRID: CVCL_0033
HCC1954	ATCC	Cat#: CRL-2338; RRID: CVCL_1259
HCC1569	ATCC	Cat#: CRL-2330; RRID: CVCL_1255
4T1	ATCC	Cat#: CRL-2539; RRID: CVCL_0125
CT26	ATCC	Cat#: CRL-2638; RRID: CVCL_7256
B16-F10	ATCC	Cat#: CRL-6475; RRID: CVCL_0159
<b>Experimental models: Organisms/strains</b>		
BALB/c	Charles River	N/A
<b>Oligonucleotides</b>		
NLRC5 F: GCCTGGAGGAGTTGATGCTT R: CCAGGTTGTTTCCGCAAG	Sigma Aldrich	N/A

### RESOURCE AVAILABILITY

#### Lead contact

All questions regarding reagents and resources cited in this work should be directed to Maria Rescigno ([maria.rescigno@hunimed.eu](mailto:maria.rescigno@hunimed.eu)), who will respond to all specific requests for information.

**Materials availability**

This study did not generate new unique reagents.

**Data and code availability**

Metabolomic data RNA-seq data have been deposited in Zenodo and DOI is listed in the [key resources table](#). The access to the data is restricted due to intellectual property issues, but they are freely available for non-commercial usage in academic research upon request and a Data Transfer Agreement will be signed.

Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the [lead contact](#) upon request.

**EXPERIMENTAL MODEL DETAILS****Mice**

6-8-week-old female BALB/c mice and 8-week-old female NSG (NOD skid gamma) mice were purchased from Charles River (Calco, Italy). All animals were housed at the Humanitas Research Institute under specific pathogen free (SPF) conditions in humidity- and temperature-controlled conditions with a 12h light/12h dark cycle. Experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) and performed in accordance with Italian regulations (D.Lgs. 26/2014) and EU guidelines (2010/63/EU). Animals were monitored closely upon arrival and throughout experiments to minimize distress, discomfort, or pain.

**Cell lines**

All immortalized human and murine cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Hyclone) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids, and 1x penicillin-streptomycin solution (R-10 medium). Cell lines were routinely tested for mycoplasma using the MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection kit (Lonza, Cat #LT07-710).

**METHOD DETAILS****Postbiotic production**

Postbiotics derived from *Akkermansia muciniphila* (PBAM), *Bifidobacterium longum* (PBBL) and *Lactobacillus paracasei* (PB) were produced by Postbiotica S.r.l. utilizing the innovative PBTech technology (described in patent WO 2019/149941). Briefly, as an example, the postbiotic PB was obtained starting from an inoculum of *L. paracasei* CNCM I-5220 which was grown at 37°C in fermentation medium. The collected bacterial biomass is then transferred in a defined fermentation solution containing scFOS, for additional 24 h. After separation from biomass, the recovered supernatant is heated at 90°C for 10 min (to remove any residual live bacteria), then supplemented with maltodextrin and powered by spray drying. Maltodextrin is therefore used as the vehicle control in all PB experiments.

**Postbiotic treatment *in vitro* and MHC quantification**

2–3 × 10<sup>4</sup> tumor cells were plated in 96 well flat bottom plates and treated for 24–48 h with 0.62–10 mg/mL (details for each experiment described in the respective figure legends) postbiotics or vehicle control in R-10 medium. Samples were washed once with PBS and stained with anti-HLA-ABC (1:200, clone W6/32, Biolegend), anti-HLA-A2 (1:200, Biolegend), or anti-H-2k<sup>d</sup>/D<sup>d</sup> (1:200, Biolegend) depending on experiments and fixable Live/Dead Viability Dye BV510 (1:1000, BD Bioscience) for 15 min at 2°C – 8°C. Cells were washed twice and resuspended in flow cytometry buffer (0.1% BSA and 2 mM EDTA in 1x PBS) prior to running on a FACSCanto II.

**Generation of MART-1-specific T cells**

CD8<sup>+</sup> (cytotoxic T lymphocytes, CTL) and CD14<sup>+</sup> (monocytes) cells were isolated from HLA-A\*02 healthy donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using magnetic beads following manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). CD14<sup>+</sup> cells were differentiated into monocyte-derived dendritic cells (moDC) using 800 U/mL IL-4 (Peprotech) and 1,000 U/mL granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF; Peprotech) for 5–6 days moDC were pulsed with 10 μM MART-1 peptide for 2 h, washed, and plated with autologous CD8<sup>+</sup> T cells (10:1 moDC:CD8 ratio) in a 24 well plate. After 10–12 days CTL were restimulated with autologous monocytes pulsed with MART-1 peptide. CTL were fed every 2–3 days with either 50 U/mL IL-2 or 10 ng/mL IL-15, as necessary.

**Degranulation assay**

CTL specific for the MART-1 antigen were incubated with vehicle- or PB-treated cancer cells for 5 h at 37°C in the presence of anti-CD107a (1:200, BioLegend), brefeldin A 10 μg/mL (1:1000, eBioscience), and GolgiStop containing monensin (1:1000, BD Biosciences) in 200 μL R-10 medium. After incubation, cells were washed once in PBS and stained with antibodies against CD3 and CD8 (Biolegend) as well as Fixable Live/Dead Viability Dye BV510 (BD Bioscience). Cells were washed twice and resuspended in flow cytometry buffer prior to running on a FACSCanto II.



#### Delfia cytotoxicity assay

The 624.38 melanoma cell line was treated for 48 h with 10 mg/mL PB or vehicle control. After pre-treatment, cells were collected, washed once and resuspended at a concentration of  $10^6$  cells/ml. Cells were stained with 3  $\mu$ L of Delfia-BATDA (DELFA, PerkinElmer) reagent and incubated at 37°C for 30 min. Following 5 washes with RPMI-1640,  $5 \times 10^3$  cells were seeded in a v-bottom plate and incubated with  $5 \times 10^4$  MART-1-specific CTL for 90 min at 37°C. Fluorescence was quantified on a VICTOR microplate reader and cytotoxicity calculated using the formula: percent cell lysis =  $100 \times ([\text{experimental release} - \text{spontaneous release}] / [\text{maximal release} - \text{spontaneous release}])$ .

#### Tumor growth and treatment *in vivo*

6–8-week-old female BALB/c mice were orthotopically injected with  $1.5 \times 10^5$  murine 4T1 TNBC cells or subcutaneously with  $5 \times 10^5$  CT26 CRC cells. Tumor measurements were taken every other day using a caliper and volume calculated using the formula: tumor volume =  $(\text{length} \times \text{width}^2) \div 2$ . Mice were treated with 250  $\mu$ g postbiotics (PB) or vehicle control in combination with anti-PD-1 (200  $\mu$ g; clone 29F.1A12, BioXCell) starting on day 3–7 (based on individual experiments, as described in the figure legends) and continued every 2–3 days for a total of 4 injections. For survival experiments, mice were euthanized when tumor volume reached 1 cm<sup>3</sup> or mice showed clinical signs of suffering. For adoptive cell transfer (ACT) experiments, 8-week-old female NSG mice were subcutaneously injected with  $1 \times 10^6$  human 624.38 melanoma cells. Mice were treated with 250  $\mu$ g postbiotics (PB) or vehicle control every other day for a total of 3 injections. On day 10 after tumor inoculation, mice were retro-orbitally injected with  $10 \times 10^6$  MART-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells (generated as described above). Tumor growth was monitored every other day and volume calculated using the above formula.

#### Splenocyte activation assay

Spleens were harvested from 4T1-bearing mice 18 days after tumor inoculation and processed into a single cell suspension over a 70  $\mu$ M filter. Red blood cells (RBC) were lysed with RBC lysis buffer (ammonium chloride) for 10 min, then washed twice in PBS.  $2 \times 10^5$  splenocytes were plated 1:1 with 4T1 tumor cells in 96-well u-bottom plates (Falcon) for 24 h. After incubation, cells were washed in PBS and stained with antibodies against CD45, CD3, CD8, 41BB (Biolegend), and Fixable Live/Dead Viability Dye BV510 (BD Bioscience). Cytotoxic T lymphocyte (CTL) activation (percent CD8<sup>+</sup>41BB<sup>+</sup>) was measured on a FACSCanto II.

#### Immunofluorescence

$2\text{--}3 \times 10^5$  tumor cells were plated on sterile slides in 24 well tissue culture plates. After adherence, cells were treated with 10 mg/mL PB or vehicle control for 30 min to 6 h. After stimulation, samples were washed with PBS and fixed in 4% PFA for 10 min. Cells were rehydrated and blocked with 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 2% FBS, and 0.3% Triton X-100. Staining was performed using mouse anti-NLRC5 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) with or without rabbit anti-NF $\kappa$ Bp65 (1:500, Cell Signaling Technology) antibodies overnight. Samples were then washed with 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.5% Tween 20, and stained with donkey anti-mouse-AF647-conjugate (ThermoFisher, Monza, Italy) and donkey anti-rabbit AF555-conjugate (ThermoFisher). Nuclei were counterstained with DAPI (1:45,000, ThermoFisher, 1306). Sections were mounted with Vectashield mounting medium and analyzed with a Leica TCS SP8II Laser scanning confocal microscope 40X/1.30 oil immersion objective (Leica). All images were analyzed with Fiji (ImageJ) software version 2.3.0.

#### LTA quantification

LTA quantification in postbiotic mix was performed using a competitive ELISA. To do so, 100 mg of PB were resuspended in 1 mL sterile water and plated at a 1:1, 1:9, and 1:27 dilution on a pre-coated ELISA plate (MBS288308, MyBioSource). Assay was then carried out following manufacturer's instructions. The final quantity of LTA was 0.5 ng in 100 mg PB; therefore, we calculated that 1 mg PB contains 0.005 ng (or 5 pg) LTA.

#### Biosurfactant purification

Biosurfactants were purified following the protocol described by Chander et al.<sup>70</sup> Briefly, HCl 6N was added to the postbiotics to reach a pH of 2.0. After an overnight incubation at 4°C, the resulting precipitation was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C. Next, 10 mL of chloroform methanol (2:1 v/v) was added to precipitated pellet and incubated in a rotatory shaker at 30°C for 15 min with 250 RPM agitation. The material was then centrifuged at 10,000 rpm for 20 min while cooling. The final pellet was resuspended in PBS and evaporated by air drying prior to resuspending in DMSO.

#### Metabolomics analysis

Global metabolomics profiling was performed by Metabolon Inc. In brief, samples were prepared using an automated MicroLab STAR system (Hamilton Co). Sample preparation was conducted using methanol extractions to remove the protein fraction while allowing maximum recovery of chemically diverse metabolites. The resulting extract was divided into five fractions: two for analysis by two separate reverse phase (RP)/UPLC-MS/MS methods with positive ion mode electrospray ionization (ESI), one for analysis by RP/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, one for analysis by HILIC/UPLC-MS/MS with negative ion mode ESI, and one sample was reserved for backup. Samples were placed briefly on a TurboVap (Zymark) to remove the organic solvent. All methods utilized a Waters ACQUITY ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and a Thermo Scientific Q-Exactive high resolution/accurate

mass spectrometer interfaced with a heated electrospray ionization (HESI-II) source and Orbitrap mass analyzer operated at 35,000 mass resolution. The sample extract was dried then reconstituted in solvents compatible to each of the four methods. Each reconstitution solvent contained a series of standards at fixed concentrations to ensure injection and chromatographic consistency. Raw data were extracted, peak-identified and QC processed using Metabolon's hardware and software. Compounds were identified by comparison to library entries of purified standards or recurrent unknown entities that contains the retention time/index (RI), mass to charge ratio ( $m/z$ ), and chromatographic data (including MS/MS spectral data) for all molecules present in the library. For each metabolite, the raw values in the experimental samples were divided by the median of those samples in each instrument batch, giving each batch and thus the metabolite a median of one. Batch-normalized data, simply reflecting the median-scaled raw data, were divided by the value of the normalizer. Then, each metabolite has been normalized to osmolarity and was rescaled to have median  $\frac{1}{4}$  1 (divide the new values by the overall median for each metabolite). Data were expressed as a scaled intensity value. Welch's 2-sample t-test is used to test whether 2 unknown means are different from 2 independent populations.

#### **RNA QC, library preparation and sequencing**

RNA quality control was performed with the Agilent 4200 Tape Station system using the High Sensitivity RNA ScreenTape analysis kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA), only RNAs having a RIN>8 were used for library preparation. Libraries for mRNA sequencing were prepared using the SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Plus Kit (Clontech-Takara). The full-length cDNA synthesized with this kit was processed with the Nextera XT DNA Library Preparation Kits (Illumina, San Diego, CA, USA). Final libraries were checked using the Agilent TapeStation 4200 using the High Sensitivity DNA ScreenTape analysis kit. All samples were sequenced on an Illumina NextSeq 550 producing on average  $33.33 \pm 3.89$  M 76-bp single-end reads per sample.

#### **RNA-seq data analysis**

Quality control of raw data was performed with fastqc v0.11.8. Quality filtering was performed with trimmomatic v0.39 setting the following parameters: ILLUMINACLIP:Adapter\_Nextera\_custom.fa:2:30:7 MINLEN:50 AVGQUAL:25. High-quality reads were aligned to the human reference genome (GRCh38 primary assembly genome) using STAR (v2.6.1a). Reads were assigned to genes with featureCounts (v1.6.4) using the Homo\_sapiens.GRCh38.100.gtf gene transfer file (GTF) as a reference annotation file for genomic feature boundaries. Processing of raw counts and exploratory data analysis were performed using DESeq2 (v1.28.1) R package. Changes in expression levels were evaluated calculating the  $\log_2$  of the ratio of the normalized counts in the two conditions in analysis. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed to investigate the biological processes changing according to treatment. The files used as input for pre-ranked GSEA analysis were the list of genes of the experiment ranked by  $\log_2$ FoldChange and the reference file c5.all.v7.1.symbols.gmt.