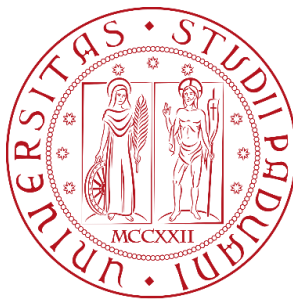


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea

**La delezione del recettore TREM2 induce la
riprogrammazione dei macrofagi intestinali e del
microbiota, potenziando l'efficacia
dell'immunoterapia antitumorale con anti-PD-1**

Tutor: Prof.ssa Gaia Codolo
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Francesca de Rensis

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

0. ABSTRACT

1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO..... 1

- 1.1 Inibitori dei checkpoint immunitari e immunoterapia1
- 1.2 Macrofagi associati al tumore e ruolo nella resistenza agli ICP2
- 1.3 Ruolo del microbiota nella risposta terapeutica3

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI 4

- 2.1 Protocollo sperimentale4
- 2.2 Modelli murini.....5
- 2.3 Modelli tumorali.....5
- 2.4 Citometria a flusso.....6
 - 2.4.1 Preparazione delle sospensioni di cellule immunitarie6
 - 2.4.2 Colorazione immunofenotipica e anticorpi.....6
 - 2.4.3 Acquisizione e analisi dei dati.....7
- 2.5 Trattamenti *in vivo*.....7
- 2.6 Stimolazione delle cellule T7
- 2.7 Real-time PCR (RT-PCR)8
- 2.8 Sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) e analisi.....9
- 2.9 Sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-seq) e analisi10
- 2.10 Fotoconversione *in situ*11
- 2.11 Trattamento antibiotico11
- 2.12 Trasferimento del microbiota12
- 2.13 Sequenziamento degli ampliconi V4-16S rRNA12
- 2.14 Trattamento *in vivo* con specie batteriche selezionate13
- 2.15 Analisi statistica13

3. RISULTATI..... 14

- 3.1 La carenza di TREM2 potenzia l'efficacia della terapia anti-PD-1 attraverso la modulazione del microbiota intestinale.....14
- 3.2 Identificazione di *R. gnavus* come mediatore della risposta antitumorale indotta dalla carenza di TREM2.....16
- 3.3 Effetto di TREM2 e di anti-PD-1 sul microambiente infiammatorio intestinale.....19
- 3.4 Il rimodellamento del microbiota intestinale stimola il reclutamento delle cellule T nel microambiente tumorale.....20
- 3.5 Effetto della somministrazione di *R. gnavus* sulla risposta tumorale all'anti-PD-123

4. DISCUSSIONE 25

5. BIBLIOGRAFIA..... 27

ABSTRACT

Le patologie neoplastiche rappresentano una sfida cruciale per l'immunoterapia, la cui efficacia è spesso limitata dal microambiente tumorale (TME) immunosoppressivo e dalla complessa interazione tra sistema immunitario e microbiota. In questo contesto, la carenza di TREM2 influenza profondamente l'assetto del microambiente tumorale, contribuendo alla riprogrammazione della risposta immunitaria e modulando la sensibilità alle terapie con inibitori dei checkpoint. Se la correlazione tra sistema immunitario e progressione delle neoplasie è nota, rimangono da chiarire i meccanismi attraverso cui il recettore TREM2 agisca sull'asse sistema immunitario-microbiota. Il presente lavoro dimostra che la deficienza di TREM2 in modelli sperimentali induce una trasformazione dei macrofagi associati al tumore (TAM) verso un fenotipo pro-infiammatorio, potenziando significativamente l'azione dei trattamenti anti-PD-1. In particolare, questa carenza recettoriale svolge un ruolo fondamentale nell'alterare la composizione del microbiota intestinale portando a un'espansione della specie *Ruminococcus gnavus* e favorendo un ambiente che supporta l'attivazione dei linfociti T citotossici e riduce la proliferazione delle cellule tumorali. È stato, infatti, constatato che l'assenza di TREM2 correla con un incremento dell'efficacia terapeutica rispetto ai controlli wild-type, e che tale sinergia limita in maniera marcata la crescita tumorale.

Da queste osservazioni lo studio in analisi ha confermato che il targeting di TREM2 in un contesto di immunoterapia rappresenta un fattore protettivo nei confronti della progressione delle patologie neoplastiche, mentre la sua espressione contribuisce attivamente all'evasione immunitaria del tumore.

1. INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO

1.1 Inibitori dei checkpoint immunitari e immunoterapia

I checkpoint immunitari sono un insieme di recettori espressi sulla superficie delle cellule del sistema immunitario, in particolare sui linfociti T, deputate alla regolazione dell'ampiezza e della durata delle risposte immunitarie. La loro funzione fisiologica è duplice: da una parte mantengono la tolleranza al "self", evitando attacchi autoreattivi, e dall'altra limitano i danni collaterali, attenuando la risposta infiammatoria dopo la risoluzione dell'evento infettivo.

L'attivazione dei linfociti T richiede tipicamente due segnali: il segnale 1, derivante dal legame del recettore dei linfociti T (TCR) con il complesso antigene-MHC sulla cellula presentante l'antigene (APC), e il segnale 2, costituito dall'interazione del recettore costimolatorio CD28, sul linfocita T, con le molecole costimolatorie CD80 o CD86, sull'APC. In seguito a tale attivazione, i linfociti T producono delle citochine che up-regolano i checkpoint stessi portando ad un'attenuazione dell'attivazione delle cellule T.

Tra i numerosi checkpoint si distinguono CTLA-4 e PD-1 che, pur condividendo la funzione inibitoria, mostrano meccanismi d'azione differenti e portano a diverse risposte immunitarie.

CTLA-4 è una molecola espressa successivamente all'ingaggio del TCR e presenta un'elevata omologia strutturale con il recettore costimolatorio CD28. Rispetto ad esso, è in grado di legare con maggiore affinità i ligandi CD80 o CD86, inibendo il segnale di costimolazione e impedendo la corretta attivazione dei linfociti T.

PD-1, invece, agisce principalmente nel mantenimento della tolleranza periferica, impedendo l'attivazione incontrollata delle cellule T nei tessuti. Attraverso il legame con i suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, PD-1 recluta la tirosina fosfatasi SHP2, che defosforila le molecole di segnalazione a valle del TCR, bloccando in maniera efficace il segnale 1, necessario per l'attivazione dei linfociti T. Tale inibizione porta ad una riduzione della produzione di IL-2 e al conseguente calo della proliferazione cellulare.

Le cellule tumorali spesso sfruttano i checkpoint immunitari per eludere la sorveglianza immunitaria. La scoperta degli inibitori di tali molecole ha rivoluzionato la terapia antitumorale offrendo risposte cliniche a lungo termine anche in contesti di malattia metastatica. Gli inibitori dei checkpoint immunitari (ICP) sono farmaci immunoterapici costituiti da anticorpi monoclonali che legano ad alta affinità tali molecole, permettendo alle cellule T di recuperare la loro funzione effettrice. L'obiettivo principale di questi farmaci non è attaccare direttamente il tumore, ma ripristinare la capacità citotossica del sistema immunitario.

L'anti-CTLA-4 favorisce la migrazione dei linfociti T nei tessuti tumorali e ne espande la diversità clonale. Questo farmaco agisce soprattutto sui linfociti T CD4, aumentando la frequenza del fenotipo Th1, con funzioni pro-infiammatorie e antitumorali.

L'anti-PD-1, invece, coinvolge principalmente i linfociti T CD8 esausti e non sembra espandere la diversità clonale né promuovere la migrazione delle di tali cellule nei tessuti neoplastici.

Studi preclinici hanno mostrato che l'utilizzo combinato di anti-CTLA-4 e anti-PD-1 migliora l'efficacia terapeutica rispetto all'impiego dei due farmaci in monoterapia.

Gli ICP possono essere combinati anche con altri farmaci antitumorali consolidati, come la chemioterapia. Evidenze cliniche hanno dimostrato che l'integrazione della chemioterapia con inibitori dei checkpoint immunitari, in modalità concomitante o sequenziale, ha migliorato la sopravvivenza globale e quella libera da progressione in pazienti affetti da diverse neoplasie, tra cui il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), il microcitoma polmonare e il carcinoma mammario triplo negativo [1].

1.2 Macrofagi associati al tumore e ruolo nella resistenza agli ICP

I macrofagi sono cellule del sistema immunitario innato caratterizzate da un'elevata plasticità funzionale, che consente loro di modulare sia l'esordio che la risoluzione dei processi infiammatori. La loro polarizzazione dipende dal microambiente circostante e varia tra il fenotipo pro-infiammatorio, detto M1, e quello antinfiammatorio, definito M2, deputato allo spegnimento della risposta immunitaria.

Sebbene i macrofagi del tipo M1 conservino il potenziale per eliminare le cellule neoplastiche tramite fagocitosi e citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC), nel microambiente tumorale (TME) essi evolvono in macrofagi associati al tumore (TAM) con fenotipo immunosoppressivo, permettendo al tumore di eludere i meccanismi di controllo dell'ospite.

Nella fase precoce della malattia i TAM rilasciano ossido nitrico (NO) e intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) che contribuiscono all'instabilità genomica delle cellule tumorali. Successivamente, ne supportano l'espansione secernendo il fattore di crescita epidermico (EGF) e mediatori infiammatori come IL-6, favorendo contemporaneamente la diffusione metastatica attraverso il rilascio del fattore di crescita trasformante β (TGF β). Inoltre, i TAM svolgono un ruolo cruciale nell'angiogenesi, in quanto rappresentano la fonte primaria del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e di chemochine pro-angiogeniche. Parallelamente, tale sottopopolazione cellulare è la principale responsabile dell'immunosoppressione nel microambiente tumorale, mediata dalla secrezione di molecole quali IL-10, TGF β e prostaglandine, che inducono il mantenimento delle cellule dendritiche in uno stato immaturo e promuovono l'espansione delle cellule T regolatorie (Treg).

Data la loro rilevanza biologica, i macrofagi influenzano l'efficacia delle principali strategie antitumorali, tra cui la chemioterapia, la radioterapia, le terapie antiangiogeniche, quelle ormonali e l'immunoterapia basata sul blocco dei checkpoint immunitari (ICP). Se da un lato possono contribuire all'eliminazione delle cellule neoplastiche indotta dai trattamenti, attivando risposte immunitarie adattative, dall'altro i TAM possono limitare l'efficacia di alcuni agenti terapeutici riprogrammandosi rapidamente verso un profilo pro-rimodellamento in risposta al danno tissutale.

In questo contesto, le cellule mielomonocitarie rappresentano un determinante critico della risposta agli ICP, essendo profondamente coinvolte nei fenomeni di resistenza o di mancata idoneità a tali trattamenti.

Queste cellule contribuiscono ai percorsi di resistenza primaria e adattativa grazie all'espressione di diverse molecole immunosoppressive, quali PD-L1, PD-L2, le molecole costimolatorie CD80/CD86 e il recettore del poliovirus (PVR, o CD155).

Studi preclinici indicano che l'espressione di PD-L1 sulle cellule immunitarie infiltranti il tumore correla con una migliore risposta agli anticorpi anti-PD-1 e che l'espressione di PD-1 sui macrofagi inibisce la loro attività fagocitica.

L'attività dei macrofagi è rigorosamente regolata da una serie di modulatori negativi che ne inibiscono o ne deviano le funzioni effettrici e che le cellule neoplastiche sfruttano per eludere l'immunità. Tra questi spiccano PD-1 e TREM2. L'espressione di PD-1 da parte dei TAM induce l'inibizione della fagocitosi e della risposta immunitaria antitumorale, permettendo al tumore di eludere i meccanismi dell'immunità antitumorale. Il blocco dell'asse PD-1/PD-L1 può, tuttavia, ripristinare l'attività immunitaria antitumorale attraverso il coinvolgimento di meccanismi innati e adattativi.

TREM2 è un recettore espresso dai macrofagi in diversi tessuti deputato all'eliminazione di grandi molecole, quali fosfolipidi, lipoproteine e detriti cellulari apoptotici. Tale recettore risulta essere sovraregolato nei TAM, sia nei tumori umani che in quelli murini, ed è stato dimostrato che il suo targeting limita la progressione neoplastica e sensibilizza la risposta alla terapia con anti-PD-1 [2].

1.3 Ruolo del microbiota nella risposta terapeutica

Il microbiota è costituito da un insieme di batteri e altri microrganismi che popolano le superfici epiteliali del corpo, influenzandone il metabolismo, le funzioni neurologiche e cognitive, l'ematopoiesi, l'infiammazione e l'immunità. Grazie ai suoi effetti sul metabolismo, il microbiota è in grado di influenzare l'oncogenesi, dalle condizioni predisponenti fino alla risposta terapeutica. Esso influenza, inoltre, il metabolismo dei farmaci, condizionandone la farmacocinetica, l'efficacia antitumorale e la tossicità, poiché la disponibilità di molti composti dipende dall'interazione nell'intestino con gli enzimi sia dell'ospite sia della flora batterica.

Il microbiota intestinale modula l'infiammazione e l'immunità adattativa, influenzando così l'efficacia della terapia oncologiche, quali il blocco dei checkpoint immunitari mediante anti-CTLA-4 e anti-PD-1. La sua identificazione come bersaglio terapeutico permette di potenziare l'azione di alcuni farmaci riducendone, al contempo, la tossicità.

Sebbene l'efficacia dell'immunoterapia sia spesso condizionata dall'eterogeneità della risposta immunitaria individuale e dalla specifica sensibilità dei diversi tipi tumorali, l'intervento diretto sulla flora batterica ne favorisce significativamente il successo clinico.

Nella terapia intratumorale con CpG-oligonucleotidi (CpG-ODN), queste molecole inducono la secrezione di citochine pro-infiammatorie, come TNF e IL-12, da parte delle cellule mieloidi, determinando una massiccia necrosi emorragica. Tale processo riprogramma i TAM e le cellule dendritiche verso un fenotipo pro-infiammatorio, stimolando l'immunità antitumorale adattativa delle cellule T antigene-specifiche, che favorisce l'eliminazione

del tumore. In modelli murini con deplezione del microbiota, tuttavia, le cellule mieloidi infiltranti il tumore perdono la capacità di produrre citochine pro-infiammatorie in risposta ai CpG-ODN e, conseguentemente, né la necrosi emorragica né l'immunità adattativa antitumorale vengono indotte efficacemente. La produzione di TNF in risposta a CpG-ODN correla con la presenza di specifici generi batterici nel microbiota fecale: il trattamento con CpG-ODN incrementa, infatti, la frequenza di Gram-negativi *Alistipes* e Gram-positivi *Ruminococcus*, a fronte di una riduzione dei *Lactibacillus*. Tali variazioni nella composizione del microbiota o l'alterazione di singole specie, possono essere sfruttate per modulare la risposta alle immunoterapie.

Nel contesto dei trattamenti con inibitori dei checkpoint immunitari, l'obiettivo è riattivare l'immunità antitumorale silente o soppressa. I due principali agenti impiegati sono gli anticorpi anti-CTLA-4 e anti-PD-1. Il primo, in particolare, può indurre lesioni alla mucosa, alterando la composizione del microbiota intestinale e fecale. In modelli murini affetti da neoplasia, il trattamento con anti-CTLA-4 riduce la frequenza degli ordini batterici *Bacteroidales* e *Burkholderiales*, incrementando contestualmente quella dei *Clostridiales*. Inoltre, è stato osservato che, in topi con deplezione del microbiota, la somministrazione orale di *Bacteroides* è in grado di ripristinare la risposta terapeutica all'anti-CTLA-4. A differenza del precedente, l'anti-PD-1 non provoca lesioni intestinali, tuttavia la risposta terapeutica è strettamente correlata alla presenza nel microbiota del genere *Bifidobacterium*. La somministrazione di un cocktail probiotico, sia in monoterapia sia in combinazione con anti-PD-1, ha potenziato l'attività antitumorale mediata dai linfociti T CD8. Effetto che scompare in caso di deplezione cellulare.

In sintesi, il microbiota modula la cancerogenesi e l'efficacia dei trattamenti sia a livello intestinale sia in distretti extraintestinali, rappresentando un bersaglio terapeutico cruciale per potenziare i farmaci attuali [3].

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI

2.1 Protocollo sperimentale

In questo studio è stato valutato il legame tra il microbiota intestinale e l'effetto antitumorale della delezione del recettore TREM2 in seguito al trattamento con anti-PD-1.

A topi B6 *Trem2*^{+/+} (wild-type) e *Trem2*^{-/-} è stata iniettata sottocute la linea cellulare di sarcoma singenico (MCA/1956) e, per valutare l'effetto del microbiota sulla risposta all'anti-PD-1, sono state impiegate diverse condizioni di stabulazione. Inoltre, per confermare l'impatto del genotipo *Trem2*^{-/-} sulla sensibilità al farmaco, sono stati eseguiti esperimenti di trapianto del microbiota fecale (FMT) e trattamenti con diverse combinazioni antibiotiche.

Le popolazioni batteriche associate alla carenza del recettore TREM2 sono state identificate tramite sequenziamento dell'rRNA 16S, nella regione V4, rilevando un arricchimento della specie *Ruminococcus gnavus* nei gruppi

responsivi al trattamento.

Per verificare la migrazione delle cellule T con imprinting intestinale verso il letto tumorale, è stato eseguito il saggio di Competitive Mapping/Trapping (CMT) in topi KikGR. Tali modelli sono stati sottoposti a fotoconversione e, dopo il sacrificio, sono stati analizzati i linfonodi mesenterici (mLN), i linfonodi drenanti (dLN), i tumori e le milze.

È stato, inoltre, esaminato l'effetto a valle di *R. gnavus* sulla risposta immunitaria antitumorale. A topi wild-type (WT) è stato somministrato, tramite gavage orale, il ceppo di *R. gnavus* della American Type Culture Collection (ATCC). In tutti gli esperimenti è stata monitorata la crescita tumorale e sono state analizzate le percentuali e le funzioni delle cellule immunitarie a livello dei tumori, dei dLN, dei mLN e del colon, utilizzando tecniche di citometria a flusso e sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-seq).

La dimensione del campione è stata definita sulla base di esperimenti preliminari e, inoltre, i gruppi sono stati randomizzati prima del trattamento per gli esperimenti di analisi del 16S e di gavage con *R. gnavus*. Gli animali che non hanno sviluppato tumori sono stati esclusi dall'analisi.

2.2 Modelli murini

I modelli murini impiegati in questo studio includono animali WT di ceppo C57BL/6J, oltre a ceppi *Trem2^{-/-}* e KikGR, forniti dalla Washington University School of Medicine. Tutti gli animali sono stati allevati in condizioni specifiche prive di patogeni (SPF) presso lo stabulario della medesima istituzione.

I topi utilizzati negli esperimenti sono stati bilanciati per età e sesso e sono stati inclusi soggetti di entrambi i sessi.

Per minimizzare l'influenza del microbiota materno, le madri gravide di diversi genotipi sono state co-stabulate e le cucciolate sono state scambiate tra le madri (cross-fostering).

Tutti gli animali sono stati stabulati nella medesima stanza (SRF-E-228) e successivamente trasferiti in un'unica stanza adibita alle procedure sperimentali (CSRB-742D). I topi hanno avuto accesso *ad libitum* ad una dieta standard ricca in polisaccaridi e sono stati mantenuti in condizioni standard di ciclo luce-buio 12:12, con luce accesa dalle 6:00 alle 18:00.

Durante il corso degli esperimenti, topi di genotipi differenti sono stati co-stabulati e mantenuti insieme, oppure separati al momento dell'inoculo tumorale, avvenuto a un'età di 8-10 settimane.

Prima delle procedure descritte, gli animali non erano stati sottoposti ad alcun protocollo sperimentale pregresso. Tutti gli studi sono stati eseguiti in conformità alle linee guida dell'Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) della Washington University di St. Louis, che ha approvato i protocolli sperimentali utilizzati in questo studio.

2.3 Modelli tumorali

Per la valutazione dei modelli tumorali, gli autori hanno utilizzato la linea cellulare di sarcoma MCA/1956, generata in topi femmina C57BL/6 WT.

Le cellule, conservate in lotti congelati a basso numero di passaggi, sono

state inoculate sottocute (10^6 cellule in 100 μ L di soluzione salina tamponata con fosfato) dopo un massimo di tre passaggi sul fianco degli animali preventivamente rasati.

Il monitoraggio è avvenuto in maniera quotidiana, con misurazioni del volume tumorale tramite il calibro a giorni alterni.

Lo studio ha previsto la soppressione degli animali ai tempi prefissati o al raggiungimento di un diametro tumorale di 1,5 cm, come criterio di endpoint etico.

2.4 Citometria a flusso

La citometria a flusso è una tecnologia biofisica basata sull'utilizzo di una sorgente laser, impiegata per il conteggio, l'esame e la tipizzazione di particelle e cellule in sospensione.

All'interno dello studio in analisi, tale tecnica è stata impiegata per esaminare l'infiltrazione delle cellule immunitarie nei tumori. Attraverso l'impiego di anticorpi specifici coniugati a fluorocromi, la citometria ha permesso l'identificazione delle diverse sottopopolazioni immunitarie presenti nei tessuti analizzati.

2.4.1 Preparazione delle sospensioni di cellule immunitarie

Al momento del sacrificio, i tessuti di interesse sono stati prelevati e processati per ottenere delle sospensioni a singola cellula. In particolare, i tumori sono stati sottoposti a digestione enzimatica con collagenasi IV (Sigma) per 30 minuti e le cellule ottenute sono state filtrate attraverso un filtro da 70 μ m, lavate con PBS e, in ultima istanza, marcate per l'analisi citofluorimetrica. I linfonodi sono stati prelevati e dissociati meccanicamente su un filtro da 70 μ m. Per quanto riguarda il tratto gastroenterico, l'intestino tenue e il colon sono stati raccolti e lavati con HBSS, per rimuovere il contenuto luminale, quindi aperti longitudinalmente per rimuovere le placche di Peyer. Il tessuto è stato sciacquato e agitato per un secondo ciclo e, successivamente, digerito con collagenasi IV (Sigma) in RPMI completo (Gibco). Il digerito tissutale è stato, infine, filtrato attraverso un filtro da 100 μ m, raccolto in una provetta da 50 mL e lavato.

2.4.2 Colorazione immunofenotipica e anticorpi

La procedura di colorazione ha previsto, inizialmente, la valutazione della vitalità cellulare mediante l'utilizzo del colorante Aqua LIVE/Dead-405 nm (Invitrogen) e sono state considerate vitali esclusivamente le cellule che risultavano essere negative alla colorazione.

Per minimizzare i legami aspecifici degli anticorpi ai recettori per il frammento cristallizzabile, le sospensioni sono state pre-incubate con Fc-block.

Successivamente è stata eseguita la marcatura di superficie per l'identificazione di diverse popolazioni immunitarie e per la valutazione dell'espressione dei checkpoint immunitari.

Per gli esperimenti di "cell hashing" sono stati impiegati gli anticorpi hashtag Total-Seq (B0301, B0302, B0303, B0304), coniugati ai cloni

M1/42 e 30-F11.

L'analisi dei profili intracellulari, con particolare riferimento al fattore di trascrizione FoxP3, è stata resa possibile grazie all'impiego del kit di fissazione e permeabilizzazione FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience).

Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono elencati di seguito:

Target	Fluorocromo	Clone
CD45	AlexaFluor700 o BUV563	30-F11
CD11b	PerCP-Cy5.5, APC o BV421	M1/70
I-A/I-E	BV650 o BUV805	M5/114.15.2
Ly6C	BV421, APC, PerCP-Cy5.5 o PE	HK1.4
Ly6G	AlexaFluor700 o APC	1A8
CD64	APC o BV605	X54-5/7.1
TCR β	PE	H57-597
CD8	BV785	53-6.7
CD4	PECF594	RM4-5
PD-1	FITC o APC	J43
IFN- γ	APC	XMG1.2
TNF α	eFluor 450	MP6-XT22
XCR1	BV605	ZET
LAG3	PE-Cy7	C9B7W
TCR $\gamma\delta$	BV421	GL3
CD11c	APC/Cy7	N418
FoxP3	AF647	150D

2.4.3 Acquisizione e analisi dei dati

L'acquisizione dei campioni è stata effettuata utilizzando il sistema BD FACSsymphony (BD Biosciences). Per le procedure di separazione cellulare fisica è stato impiegato un sorter Aria II (BD Biosciences) e i dati grezzi sono stati, successivamente, analizzati mediante il software FlowJo (Treestar).

La strategia di analisi è stata impostata per identificare le popolazioni cellulari di interesse previa esclusione dei detriti cellulari e dei doppietti. La definizione delle popolazioni positive è stata supportata dall'utilizzo di controlli appropriati per garantire la massima accuratezza nella discriminazione dei segnali di fluorescenza.

2.5 Trattamenti *in vivo*

Per i trattamenti *in vivo* sono stati utilizzati due diversi anticorpi, anti-PD-1 e anti-TREM2, somministrati allo stesso dosaggio (200 μ g per topo) ma con tempistiche differenti.

L'anticorpo anti-PD-1 (clone RMP1-14, Leinco P372) è stato somministrato per via intraperitoneale ogni tre giorni, a partire dal nono giorno successivo all'inoculo del tumore.

L'anticorpo anti-TREM 2 e il relativo controllo sono stati invece

somministrati per via intraperitoneale, ogni cinque giorni a partire dal secondo giorno dopo l'iniezione delle cellule tumorali.

2.6 Stimolazione delle cellule T

La stimolazione delle cellule T è un processo fondamentale sia nella ricerca immunologica di base sia nelle terapie oncologiche. Il suo obiettivo è quello di attivare i linfociti T, favorendo la loro proliferazione e l'acquisizione delle funzioni effettrici.

Tra le diverse tecniche di stimolazione, che possono essere utilizzate sia *in vivo* sia *in vitro*, spiccano la stimolazione tramite segnale TCR (antigene-specifica), la stimolazione policlonale (antigene-indipendente), l'utilizzo di agenti chimici e farmacologici e la stimolazione tramite citochine.

Nella stimolazione tramite segnale TCR viene mimato l'incontro tra una cellula T e una cellula presentante l'antigene (APC). Si possono utilizzare complessi MHA-peptide, in cui si sfruttano cellule APC caricate con peptidi specifici in modo che il TCR riconosca il complesso MHC-peptide e riceva il segnale 1 per la sua attivazione, oppure possono essere utilizzati tetrameri MHC, strutture sintetiche che legano direttamente i TCR specifici per un dato antigene.

La stimolazione policlonale mira, invece, ad attivare tutte le cellule T presenti in un campione, indipendentemente dalla loro specificità per un antigene. Possono essere utilizzati a questo scopo anticorpi anti-CD3 e anti-CD-28, che mimano i segnali necessari per l'attivazione dei linfociti T e possono essere forniti in forma solubile, legati ad una piastra (coated) o coniugati a delle beads magnetiche. In alternativa possono essere utilizzate delle lamine o beads artificiali che consistono in superfici sintetiche che presentano gli anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 per simulare la membrana di una cellula dendritica.

Per quanto riguarda l'utilizzo di agenti chimici e farmacologici, questi bypassano il recettore di membrana e agiscono direttamente sulle vie di segnalazione intracellulari. Solitamente si utilizzano acetato di forbole miristato (PMA) e ionomicina o fitoemoagglutina (PHA). Il PMA è in grado di attivare la Protein Chinasi C (PKC), mentre la ionomicina permette un aumento della concentrazione di Calcio intracellulare. Insieme, i due agenti, inducono una produzione massiccia di citochine, come l'IFN- γ , in tempi molto brevi (4-6 ore). Invece, la fitoemoagglutina è una lectina in grado di legare i carboidrati presenti sulle glicoproteine di superficie, incluso il TCR, inducendo mitosi e proliferazione.

Infine, nella stimolazione tramite citochine, si sfruttano queste molecole fondamentali per la sopravvivenza a lungo termine e per il differenziamento dei linfociti T. Solitamente si utilizzano l'IL-2, che rappresenta il principale fattore di crescita per le cellule T, e l'IL-17 e l'IL-15, che possono mantenere le cellule T in uno stato di memoria o possono espandere le cellule NK e le cellule T citotossiche senza portarle all'esaurimento funzionale.

All'interno dello studio preso in esame, a partire dai tumori, prelevati al momento del sacrificio, sono state ottenute sospensioni a singola cellula. Le cellule ottenute in questo modo sono state coltivate in RPMI completo, con

o senza PMA 10^{-7} M (Sigma)-ionomicina 500 ng/mL (Sigma), e un cocktail di inibitori del trasposto proteico (eBioscience) alla concentrazione di 500x per quattro ore.

Infine, le cellule sono state raccolte e colorate per l'analisi in citometria a flusso.

2.7 Real-time PCR (RT-PCR)

La RT-PCR, anche detta PCR quantitativa (qPCR), è una metodica che permette di quantificare l'espressione genica misurando la quantità di RNA presente in un campione. In questa procedura l'RNA viene retrotrascritto in cDNA ad opera dell'enzima trascrittasi inversa (RT); il cDNA funge poi da template per la reazione di amplificazione. L'accumulo del prodotto di PCR viene monitorato in tempo reale attraverso la valutazione del livello di fluorescenza ciclo dopo ciclo.

Per lo studio in esame, l'RNA totale è stato estratto dal tessuto di colon (congelato istantaneamente) utilizzando il kit RNeasy Mini (Qiagen Inc.). La sintesi di cDNA è stata effettuata con il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), mentre l'amplificazione è stata eseguita tramite iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Le sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione dei geni target sono riportate nella *Tabella 1*. La normalizzazione dei dati è stata calcolata con il metodo del $\Delta\Delta C_t$, utilizzando il gene *Gapdh* come riferimento.

Questa analisi è stata impiegata per valutare l'espressione di citochine infiammatorie, evidenziando una tendenza all'aumento per TNF, IL-17a e IL-10.

Gene	Sequenza primer
<i>Trem2</i>	CTGGAACCGTCACCATCACTC (F) CGAAACTCGATGACTCCTCGG (R)
<i>Tnf</i>	ACCCTCACACTCACAAACCAC (F) ACCCTCACACTCACAAACCAC (R)
<i>Il17a</i>	AGAGCTGCCCCTTCACTTTC (F) TGGGGGTTTCTTAGGGGTCA (R)
<i>Il10</i>	TGGCCTTG TAGACACCTTGG (F) AGCTGAAGACCCTCAGGATG (R)
<i>Gapdh</i>	GAGCCAAAAGGGTCATCATC (F) CCATCCACAGTCTTCTGGGT (R)

Tabella 1: Sequenze forward (F) e reverse (R) dei primer murini utilizzati per l'analisi RT-PCR

2.8 Sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) e analisi

Per analizzare simultaneamente l'espressione di tutti i geni presenti in un campione, è stata utilizzata la metodica di RNA-seq. Prima di sequenziare, l'RNA estratto deve essere frammentato e convertito in cDNA per la costruzione di una libreria. I frammenti vengono poi amplificati e letti da un sequenziatore, producendo milioni di brevi sequenze denominate *reads*. Infine, su tali sequenze, vengono eseguite analisi bioinformatiche per il controllo qualità, l'allineamento su un genoma di riferimento, la quantificazione e l'analisi dell'espressione differenziale.

Nello studio analizzato, questa metodica è stata impiegata per indagare una potenziale infiammazione subclinica. L'RNA totale è stato estratto dal colon tramite il kit RNeasy Mini (Qiagen Inc.) e la sua qualità è stata valutata mediante Agilent Bioanalyzer o 4200 TapeStation. Per la preparazione della libreria sono stati utilizzati tra i 5 e i 10 µg di RNA totale, selezionando esclusivamente campioni con un punteggio RIN superiore a 8,0. L'RNA ribosomiale (rRNA) è stato rimosso utilizzando il kit mRNA Direct (Life Technologies), che permette la selezione dell'mRNA attraverso l'uso di microsfere coniugate a oligo-dT (selezione poly-A). L'mRNA così isolato è stato frammentato e retrotrascritto in cDNA utilizzando l'enzima SuperScript III RT (Life Technologies) ed esameri casuali. Dopo la sintesi del secondo filamento per ottenere un ds-cDNA, le estremità sono state rese piatte (*blunt-ended*). Successivamente sono state aggiunte una base A alle estremità 3' e gli adattatori per il sequenziamento Illumina. I frammenti sono stati amplificati per 12-15 cicli utilizzando primer che incorporano tag a doppio indice unici. Il sequenziamento è stato eseguito su piattaforma Illumina NovaSeq-6000 utilizzando letture paired-end estese per 150 paia di basi. Le *reads* ottenute sono state allineate e quantificate rispetto all'assemblaggio primario Ensembl release 101 su un server on-premise Illumina DARGEN Bio-IT. I conteggi delle *reads* sono stati normalizzati e analizzati tramite l'algoritmo DESeq2 (1.38.3). I confronti a coppie tra le quattro condizioni sperimentali sono stati effettuati su tutti i geni e i P-value risultanti sono stati corretti utilizzando l'approccio di Benjamini e Hochberg. I geni con un P-value corretto inferiore a 0,05 sono stati classificati come espressi in modo differenziale. Infine, per l'analisi di arricchimento dei pathway, è stata eseguita una Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) utilizzando i "hallmark pathways" dal Molecular Signature Database.

2.9 Sequenziamento dell'RNA a singola cellula (scRNA-seq) e analisi

Il sequenziamento dell'RNA a singola cellula è una tecnica utilizzata per analizzare l'espressione genica a livello di singole cellule, superando il limite dell'analisi della media di un intero tessuto. In questa metodica, il tessuto di interesse viene dissociato meccanicamente per separare le cellule le une dalle altre; queste vengono poi intrappolate in micro-gocce d'olio insieme ad una *bead* che contiene codici a barre molecolari univoci. Infine, l'RNA di ogni cellula viene marcato con il suo specifico codice permettendo così agli strumenti di bioinformatica, a valle del sequenziamento, di risalire alla cellula di origine di ogni filamento di RNA.

Nello studio esaminato, il scRNA-seq è stato impiegato per comprendere come la mancanza di TREM2 modifichi il comportamento dei macrofagi intestinali e delle cellule T. A partire dalla lamina propria del colon, le cellule selezionate sono state lavate in PBS e BSA allo 0,04% per raggiungere una concentrazione finale di 1000 cellule/µL. La stessa procedura è stata eseguita anche per le cellule derivanti dai tumori le quali, tuttavia, sono state portate ad una concentrazione finale di 1200 cellule/µL. I campioni sono stati quindi uniti e caricati su un controller 10x Genomics Chromium Single-Cell. Per la generazione della libreria sulla piattaforma

10x Genomics, sono stati impiegati tre diversi kit: il Chromium Next GEM Single Cell Kit (16 reazioni), il Chromium Next GEM Chip G Single Cell Kit (48 reazioni) e il Dual Index Kit TT Set A (96 reazioni). Circa 23000 cellule sono state divise in goccioline di emulsione in gel (GEM) di volume nanolitrico, ciascuna contenente la miscela di reazione per la trascrittasi inversa. In seguito alla retrotrascrizione, il cDNA di ogni singola cellula ha ricevuto un *barcode* univoco di dodici nucleotidi e un identificatore molecolare univoco (UMI). Successivamente, il cDNA delle GEM è stato sottoposto ad undici cicli di amplificazione e a una successiva purificazione mediante microsfere SPRIselect. Sono state generate due librerie: una di espressione genica (GEX) e l'altra degli oligo-hashtag (HTO). La concentrazione di ciascuna libreria è stata determinata tramite qPCR utilizzando il kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems/Roche). Le librerie sono state poi normalizzate e sequenziate su una NovaSeq6000 S4 Flow Cell, adottando il *workflow* XP e un protocollo di sequenziamento 28x10x10x150, come da specifiche Illumina. La profondità di sequenziamento target è stata di 50000 letture per cellula per la libreria GEX, e di 5000 letture per la libreria HTO. Per il confronto dell'espressione genica, è stata eseguita un'analisi *pseudobulk* estraendo i valori dei conteggi trasformati in logaritmo.

Le analisi scRNA-seq sono state effettuate con diversi software. In particolare, la suite software Cell Ranger (v6.0.0) è stata impiegata per il demultiplexing dei campioni, l'elaborazione dei *barcode* e in conteggio delle singole cellule. Le analisi a valle sono state eseguite utilizzando il pacchetto Seurat (v4.1.1) in R. Il controllo qualità ha previsto la rimozione delle cellule con contenuto mitocondriale superiore al 5%, nonché di quelle presentanti meno di 1000 o più di 7000 geni. Gli UMI grezzi sono stati successivamente analizzati tramite l'algoritmo *SCTransform*, al fine di eliminare le fonti di variazione indesiderate derivanti dalla percentuale di geni mitocondriali. Infine, sono stati identificati e selezionati i geni altamente variabili per la riduzione della dimensionalità dei dati tramite l'analisi delle componenti principali (PCA).

2.10 Fotoconversione *in situ*

La fotoconversione *in situ* è una tecnica avanzata di tracciamento cellulare che permette di marcare le cellule in un organo specifico e di monitorarne la migrazione verso altri distretti anatomici in tempo reale. Nello studio in esame, questa metodica è stata impiegata per dimostrare che le cellule T attivate a livello intestinale migrano fino al sito tumorale. Il protocollo prevede l'utilizzo di modelli murini transgenici in grado di esprimere proteine fluorescenti specifiche, come la proteina Kaede o KikGR. In condizioni basali, tutte le cellule del topo emettono una fluorescenza verde; tuttavia, se esposte a luce UV o violetta, le proteine KikGR subiscono un cambiamento conformazionale che ne sposta l'emissione nel canale della fluorescenza rossa.

Nello studio esaminato gli organi sottoposti a fotoconversione *in situ* sono stati il colon e i linfonodi mesenterici (mLN). Per eseguire la procedura, i topi sono stati anestetizzati e gli organi di interesse sono stati esposti tramite

un'incisione della parete addominale. L'irradiazione è stata effettuata utilizzando un laser LED viola a bassa potenza (80 mW, Laserland), applicato in tre cicli composti da 10 secondi di accensione seguiti da 30 secondi di spegnimento, mantenendo la sorgente luminosa ad una distanza di 2 cm dal tessuto. I linfonodi mesenterici sono stati fotoconvertiti in tre punti consecutivi, mentre per il colon l'irradiazione ha interessato sei punti, coprendo una lunghezza di circa 3 cm. Successivamente, i topi sono stati suturati e monitorati fino al risveglio. La presenza di cellule KikR⁺ (rosse) al di fuori dell'area originariamente convertita è stata, infine, quantificata mediante citometria a flusso per identificare e mappare le cellule emigrate.

2.11 Trattamento antibiotico

Nell'articolo in analisi, il trattamento antibiotico è stato uno strumento sperimentale fondamentale per dimostrare il legame causale tra il microbiota intestinale e l'efficacia della terapia antitumorale. In particolare, tale approccio è stato impiegato per tre finalità principali: confermare che il vantaggio terapeutico derivante dalla carenza di TREM2 scomparisse in seguito alla deplezione della flora intestinale; preparare i modelli murini alla procedura di trapianto del microbiota fecale (FMT); identificare le classi batteriche responsabili dell'effetto protettivo. Gli antibiotici sono stati somministrati nell'acqua da bere per un periodo di sei settimane, utilizzando i seguenti composti: ampicillina 1 g/L, vancomicina 0,5 g/L, neomicina 1 g/L e metronidazolo 1 g/L, forniti da Sigma-Aldrich. Tali farmaci sono stati somministrati sia in combinazione (cocktail VNAM) sia singolarmente. Il veicolo utilizzato è stato il Grape Kool-Aid (Kraft Foods, 20 g/L). Per quanto riguarda l'esperimento di trapianto del microbiota, i topi riceventi sono stati trattati per tre settimane con un cocktail VNAM prima di procedere alla ricolonizzazione.

2.12 Trasferimento del microbiota

I topi riceventi del trapianto del microbiota fecale (FMT) sono stati sottoposti a un pre-trattamento antibiotico, come descritto nel paragrafo precedente (2.11). Dopo due giorni dall'interruzione di tale trattamento, ai topi è stato somministrato il microbiota raccolto dai ciechi di diversi donatori tramite *gavage* orale. Per ogni genotipo del donatore (*Trem2*^{+/+} o *Trem2*^{-/-}), sono stati sacrificati tre animali al giorno 0 (prima dell'inoculo delle cellule tumorali), indicati come mbt-d0, o al giorno 12 (48 ore dopo la prima iniezione di anti-PD-1), indicati come mbt-d12. I contenuti cecali isolati da tre animali del medesimo genotipo o gruppo di trattamento sono stati uniti e diluiti 1:10 (peso/volume) con PBS ridotto, all'interno di provette coniche da 50 mL. Dopo una delicata agitazione, il contenuto è stato filtrato attraverso un filtro per cellule in nylon con pori da 100 µL (BD Falcon). Il campione così ottenuto è stato addizionato ad un volume uguale di soluzione composta da PBS, 0,05% l-cisteina-HCl e 30% glicerolo, per poi essere suddiviso in aliquote in fiale di vetro da 1,8 mL (fiale E-Z, Wheaton). Successivamente, le fiale sono state sigillate e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Ogni topo ricevente ha ricevuto 150 µL di contenuto cecale chiarificato in un'unica somministrazione, due giorni

dopo la fine del trattamento antibiotico.

2.13 Sequenziamento di ampliconi V4-16S rRNA

Nello studio analizzato, il sequenziamento degli ampliconi della regione V4 del gene 16S rRNA è la tecnica impiegata per caratterizzare la composizione del microbiota intestinale e identificare le specie batteriche associate alla risposta immunitaria. Il gene 16S rRNA, presente in tutti i batteri, è composto da regioni altamente conservate e da 9 regioni ipervariabili (da V1 a V9). Solitamente, viene esaminata la regione V4, poiché offre un equilibrio ottimale tra risoluzione tassonomica e compatibilità con le attuali tecnologie di sequenziamento. In questa procedura, non viene amplificato tutto il genoma batterico, bensì solo l'amplicone V4, utilizzando primer universali che si legano alle regioni conservate fiancheggianti il frammento di interesse. A ogni campione viene assegnato un *barcode* univoco, permettendo l'analisi simultanea di centinaia di campioni diversi in un'unica corsa di sequenziamento. Le librerie vengono sequenziate e le sequenze grezze sottoposte a un processo di analisi che comprende il *denoising* (o *clustering*), l'assegnazione tassonomica e l'analisi della biodiversità.

Per accedere alla regione V4 del gene 16S rRNA, è stato necessario estrarre il DNA dai campioni fecali murini mediante lisi meccanica con microsfere (*bead beating*) in fenolo:cloroformio, seguita da purificazione su piastre QiaQuick (QIAGEN). È stata quindi effettuata una reazione di amplificazione e gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati utilizzando lo strumento Illumina MiSeq. Le sequenze degli ampliconi sono state orientate, private di adattatori e primer e appaiate utilizzando il pacchetto software *bbtools* (37.02). Per rimuovere le sequenze chimeriche e identificare le *Amplicon Sequence Variants* (ASV) è stato utilizzato DADA2 (1.8.0). Le sequenze rappresentative per ogni ASV sono state, infine, impiegate per il profilo tassonomico mediante un approccio di assegnazione multi-tassonomica (MTA). L'allineamento di ciascuna sequenza rappresentativa è stato eseguito attraverso il toolkit NCBI BLAST versione 2.10.0 sul database di riferimento del gene 16S rRNA, compilato integrando sequenze univoche provenienti dai database Ribosomal Database Project versione (v11.5) e NCBI 16S ribosomal RNA Project.

2.14 Trattamento *in vivo* con specie batteriche selezionate

Al fine di identificare i singoli taxa responsabili del potenziamento della risposta antitumorale, è stata eseguita una ricolonizzazione mirata utilizzando specie batteriche selezionate precedentemente individuate tramite le analisi di sequenziamento degli ampliconi V4-16S rRNA. Nello specifico, l'attenzione si è focalizzata su *Ruminococcus gnavus* (ATCC 29149), la cui abbondanza era risultata significativamente correlata con il fenotipo osservato nei topi *Trem2^{-/-}*.

Il ceppo di *R. gnavus* è stato coltivato in brodo anaerobico Wilkins-Chalgren a 37°C in una camera Coy senza agitazione. Successivamente, la coltura *overnight* è stata miscelata con una soluzione di PBS sterilizzata per filtrazione, contenente il 30% di glicerolo e lo 0,05% di cisteina, in un

rapporto 1:1. Gli stock batterici così preparati sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Prima della somministrazione, il numero di cellule vitali di *R. gnavus* è stato valutato attraverso il metodo del conteggio delle unità formanti colonia (CFU).

Come controllo è stato utilizzato il batterio *Clostridium scindens*, il quale rappresenta il taxon più vicino assegnato alla sequenza V4-16S rRNA associata a *R. gnavus*; esso è stato coltivato e preparato per il *gavage* con le medesime modalità di *R. gnavus*.

Per le analisi di inattivazione termica, *R. gnavus* è stato mantenuto a 100°C per un'ora prima del congelamento. Ai topi sono stati iniettati sottocute i tumori MCA/1956 e sono stati trattati con anti-PD-1. Ogni modello murino è stato trattato tramite *gavage* orale per cinque giorni consecutivi con 150 µL dello stock batterico, a partire dal settimo giorno dopo l'inoculo delle cellule tumorali. I controlli sono stati trattati esclusivamente con il veicolo (terreno di congelamento). L'anti-PD-1 è stato somministrato a partire dal nono giorno e la crescita dei tumori è stata monitorata quotidianamente, come specificato nel paragrafo 2.3.

2.15 Analisi statistica

I dati presentati nello studio sono forniti come media $\pm$ errore standard della media (SEM). Per modellare i dati generati da disegni fattoriali con la combinazione di due variabili, è stata impiegata l'analisi della varianza a due vie (ANOVA a due vie). Nello specifico, per valutare la crescita tumorale longitudinale tra i diversi gruppi di trattamento, è stata utilizzata l'ANOVA a due vie per misure ripetute. Tali analisi sono state seguite da test *post hoc* per il confronto multiplo tra i vari punti temporali, applicando il test Tukey o di Šidák. Per il confronto statistico tra due gruppi indipendenti è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney, applicato anche all'analisi comparativa dell'espressione genica sui conteggi trasformati in logaritmo.

Le analisi relative alla composizione del microbiota sono state condotte mediante l'analisi delle coordinate principali (PCoA), eseguita in ambiente R utilizzando pacchetti “ape” e “vegan”. Per stimare la significatività statistica (valore P) della segregazione dei gruppi nella PCoA, è stata applicata l'analisi PERMANOVA con 1000 permutazioni. L'identificazione delle specie batteriche indicatrici è stata, invece, effettuata tramite il pacchetto “indicspecies”. Tutte le analisi statistiche sono state calcolate utilizzando il software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) o il linguaggio di programmazione R, considerando i risultati statisticamente significativi per valori di $p < 0,05$.

3. RISULTATI

L'interazione tra il sistema immunitario dell'ospite e il microbiota intestinale rappresenta una delle frontiere più promettenti nell'ambito dell'immunoterapia oncologica. Sebbene sia stato ampiamente dimostrato che il recettore TREM2 agisca come regolatore negativo della risposta immunitaria antitumorale, influenzando l'efficacia dei trattamenti con

inibitori dei checkpoint immunitari (ICP), il coinvolgimento della flora batterica intestinale in tale processo non è stato ancora del tutto caratterizzato. In questo studio si è indagato come la carenza di TREM2 sia in grado di rimodellare la composizione del microbiota, promuovendo l'arricchimento del batterio *Ruminococcus gnavus*. Tale microrganismo, attraverso l'induzione di un ambiente pro-infiammatorio e il reclutamento di cellule T citotossiche nel letto tumorale, si è rivelato un elemento chiave nel potenziare l'azione terapeutica dell'anti-PD-1.

3.1 La carenza di TREM2 potenzia l'efficacia della terapia anti-PD-1 attraverso la modulazione del microbiota intestinale

Per determinare se il microbiota intestinale influenzi l'effetto benefico della carenza di TREM2 nel mitigare la crescita tumorale, modelli murini di otto settimane, cresciuti in maniera convenzionale, sia wild-type (*Trem2*^{+/+}) sia con delezione del gene per il recettore in esame (*Trem2*^{-/-}), sono stati inoculati sottocute con la linea cellulare di sarcoma da metilcolantrene (MCA/1956). Tali animali sono stati quindi suddivisi in due gruppi: un gruppo co-stabulato (Coh), in cui i due genotipi sono stati mantenuti insieme per tutta la durata dell'esperimento, e uno separato (Sep), in cui i topi con genotipo *Trem2*^{+/+} e quelli con genotipo *Trem2*^{-/-} sono stati separati dopo l'iniezione delle cellule tumorali (giorno 0). Per evitare un potenziale effetto del microbiota materno, le cucciolate di diversi genotipi, derivanti da madri gravide co-stabulate, sono state sottoposte ad allattamento incrociato (*cross-fostering*). Inoltre, tutti gli animali hanno consumato a piacimento una dieta standard per topi ricca in polisaccaridi. In una fase iniziale di monitoraggio della crescita tumorale, in assenza di trattamento farmacologico, è stato osservato che, in entrambi i gruppi (Coh e Sep), i topi *Trem2*^{-/-} mostrano un carico tumorale lievemente ridotto rispetto ai topi wild-type. Dal momento che i topi sono animali coprofagi, che la carenza di TREM2 potenzia il trattamento con anti-PD-1 e dato il contributo del microbiota intestinale, è stato esaminato l'impatto delle condizioni di stabulazione. I topi con genotipo *Trem2*^{+/+} e quelli con genotipo *Trem2*^{-/-} hanno subito l'iniezione di cellule tumorali MCA/1956, divisi nei gruppi Coh e Sep, e, a partire dal nono giorno dopo l'inoculo del tumore, sono stati trattati con anti-PD-1. I risultati indicano che i topi *Trem2*^{-/-} Sep hanno mostrato una risposta potenziata al trattamento con anti-PD-1 rispetto ai topi *Trem2*^{+/+} Coh. Al contrario, i topi *Trem2*^{-/-} Coh e quelli *Trem2*^{+/+} Coh hanno mostrato una risposta simile all'anti-PD-1 (Fig. 1A). Tali risultati hanno evidenziato come l'effetto della carenza di TREM2 nel potenziare il controllo del tumore, mediato da anti-PD-1, possa essere correlato al microbiota intestinale. Poiché i topi *Trem2*^{-/-} Sep e *Trem2*^{+/+} Sep erano stati separati solo al momento dell'inoculo tumorale, si è voluto determinare se tale beneficio potesse essere ulteriormente amplificato allevando i topi separatamente fin dalla nascita (*Trem2*^{-/-} Sep-b; *Trem2*^{+/+} Sep-b). si è, tuttavia, osservato che l'efficacia del trattamento non è influenzata dal momento della separazione, in quanto in entrambi i casi i topi *Trem2*^{-/-} mostrano un simile e significativo potenziamento della risposta immunitaria (Fig. 1B). Poiché la delezione o il blocco di TREM2, in combinazione con l'anti-PD-1, aumenta l'accumulo

delle cellule T nel modello MCA/1956, si è voluto determinare se anche tale risposta fosse influenzata dalle condizioni di stabulazione. Effettivamente, i topi *Trem2*^{-/-} Sep trattati con anti-PD-1 hanno mostrato un aumento della frequenza dei linfociti T intratumorali rispetto ai topi *Trem2*^{+/+} Sep; al contrario, non sono state osservate differenze significative nei gruppi co-stabulati (Fig. 1C). La proporzione di cellule T CD4⁺/CD8⁺ intratumorali è risultata simile in tutte le condizioni testate. Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che l'anti-PD-1 induca cambiamenti nel microbiota dei topi deleti per il gene *Trem2*, i quali promuovono l'arricchimento di cellule T nel microambiente tumorale, aumentando l'efficacia del farmaco.

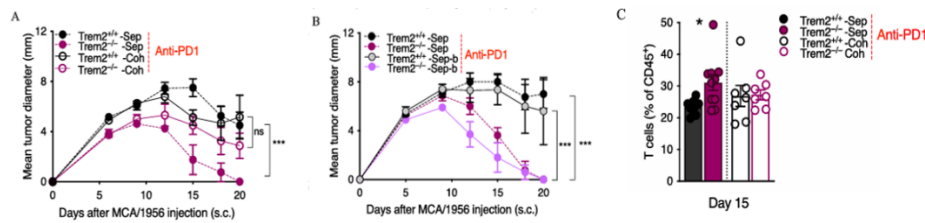


Figura 1: La risposta immunitaria all'anti-PD-1 è modulata dalla stabulazione e dalla carenza di TREM2. (A) Monitoraggio del diametro tumorale medio in topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-} trattati con anti-PD-1 e stabulati in condizioni Coh (co-stabulati) o Sep (separati al giorno 0). Si osserva che la co-stabulazione annulla il vantaggio terapeutico indotto dall'assenza di TREM2. (B) Analisi della crescita tumorale in topi separati fin dalla nascita (Sep-b), a conferma che l'effetto protettivo è legato alla mancata condivisione del microbiota durante lo sviluppo. (C) Frequenza delle cellule T (esprese come % di CD45⁺) infiltrate nel tumore al giorno 15; i topi *Trem2*^{-/-} Sep mostrano un reclutamento linfocitario significativamente maggiore rispetto alle controparti Coh. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Per confermare tale effetto, sono stati eseguiti esperimenti di trapianto del microbiota fecale (FMT): il contenuto cecale è stato raccolto sia al momento dell'inoculo tumorale (mbt-d0) sia tre giorni dopo l'inizio del trattamento con anti-PD-1 (mbt-d12). I topi riceventi, preventivamente trattati per tre settimane con un cocktail VNAME (Vancomicina, Neomicina, Ampicillina, Metronidazolo), sono stati colonizzati con il contenuto cecale tramite sonda gastrica. I topi che hanno ricevuto il microbiota mbt-d12 proveniente da donatori *Trem2*^{-/-} hanno mostrato un controllo significativamente migliore della crescita tumorale rispetto a quelli che hanno ricevuto il microbiota mbt-d0. Al contrario, la ricostituzione di topi *Trem2*^{-/-} con il microbiota proveniente da donatori wild-type ha ritardato o annullato la loro capacità di controllare la progressione del tumore (Fig. 2A).

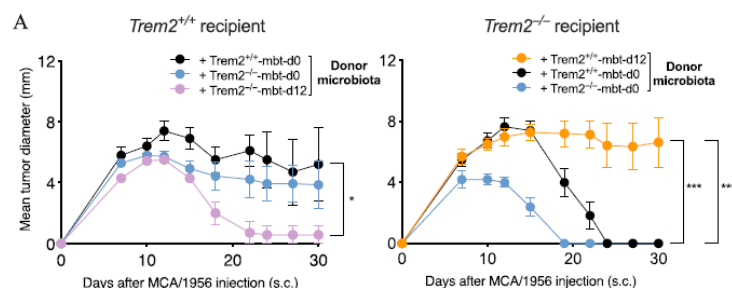


Figura 2A: Effetto del trapianto di microbiota (FMT) sulla crescita tumorale. Monitoraggio della crescita del tumore MCA/1956 in topi *Trem2*^{+/+} (sinistra) e in topi *Trem2*^{-/-} (destra) sottoposti a FMT. I donatori del microbiota sono stati selezionati in base al genotipo e al momento del prelievo

rispetto al trattamento con anti-PD-1: al giorno 0 (mbt-d0, microbiota basale) o al giorno 12 (mbt-d12, microbiota post-trattamento). Si osserva che il microbiota mbt-d12 proveniente da donatori *Trem2*^{-/-} è sufficiente ad indurre un controllo tumorale superiore in entrambi i gruppi di riceventi. Al contrario, il microbiota proveniente da donatori wild-type (mbt-d0) attenua l'efficacia del controllo tumorale nei riceventi *Trem2*^{-/-}. Tutti i topi sono stati trattati con anti-PD-1 ($n = 5$ a 7). I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Complessivamente, questi risultati indicano che il trattamento con anti-PD-1, in assenza di TREM2, induce cambiamenti nel microbiota intestinale che sono capaci di supportare il rigetto del tumore.

3.2 Identificazione di *R. gnavus* come mediatore della risposta antitumorale della carenza di TREM2

Per individuare le caratteristiche fondamentali del microbiota indotte dalla somministrazione di anti-PD-1, i topi sono stati trattati con diversi antibiotici. L'ampicillina e la vancomicina, somministrate in monoterapia, hanno compromesso la capacità dei topi *Trem2*^{-/-} di controllare la crescita tumorale; in maniera opposta, il veicolo, il metronidazolo e la neomicina non hanno influenzato il controllo del tumore (Fig. 2B). L'impiego del cocktail VNAM ha permesso di confermare che il microbiota è necessario per il successo della terapia con ICP (Inibitori dei Checkpoint Immunitari), in quanto la sua deplezione ha annullato completamente la risposta all'anti-PD-1 in entrambi i genotipi.

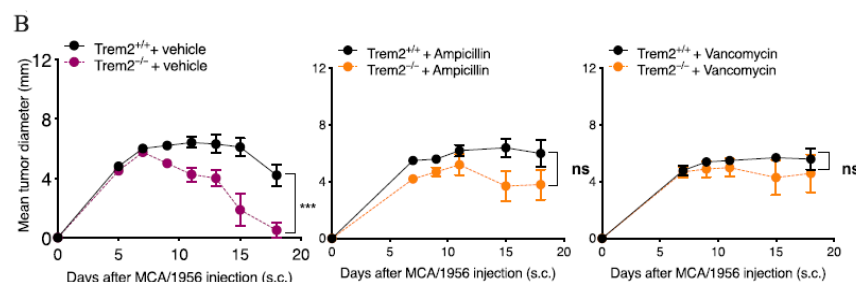


Figura 2B: Curve di crescita tumorale di topi *Trem2*^{+/+} o *Trem2*^{-/-} trattati con veicolo, ampicillina o vancomicina. Analisi della crescita tumorale (MCA/1956) in topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-} trattati con anti-PD-1 in combinazione con diversi antibiotici in monoterapia. Il grafico a sinistra mostra il controllo (veicolo), dove i topi *Trem2*^{-/-} presentano una risposta potenziata. I grafici centrale e a destra mostrano come il trattamento con ampicillina o vancomicina elimini la differenza significativa tra i due genotipi, compromettendo l'efficacia superiore della terapia nei topi con delezione per il gene *Trem2*. Tutti i topi sono stati trattati con anti-PD-1 ($n = 4$ o 5). I dati sono rappresentati come media del diametro tumorale (mm) $\pm$ SEM. ns = non significativo, *** $p < 0,001$.

Per una migliore caratterizzazione delle variazioni del microbiota indotte dalla carenza di TREM2 e dal trattamento con anti-PD-1, sono stati analizzati il microbiota basale (mbt-d0) e quello al dodicesimo giorno (mbt-d12) nei topi portatori di tumore appartenenti ai gruppi *Trem2*^{+/+}-Sep, *Trem2*^{-/-}-Sep, *Trem2*^{+/+}-Coh e *Trem2*^{-/-}-Coh. L'analisi è stata condotta tramite sequenziando la regione variabile 4 (V4) dell'rRNA 16S. Dall'analisi delle coordinate principali (PCoA) emerge chiaramente come la composizione del microbiota dei topi con genotipo *Trem2*^{-/-}-Sep sia significativamente differente rispetto a quella di tutti gli altri gruppi (Fig. 3A). Le comunità microbiche mbt-d0 e mbt-d12 dei topi co-stabulati (*Trem2*^{+/+}-Coh e *Trem2*^{-/-}-Coh) hanno mostrato differenze rilevanti in risposta al trattamento con anti-PD-1, indipendentemente dal genotipo. Al

contrario, le variazioni osservate tra mbt-d0 e mbt-d12 nei gruppi stabulati separatamente (*Trem2*^{+/+}-Sep e *Trem2*^{-/-}-Sep, *Trem2*^{+/+}-Sep-b e *Trem2*^{-/-}-Sep-b) sono state influenzate sia dalla carenza di TREM2, sia dal trattamento con anti-PD-1.

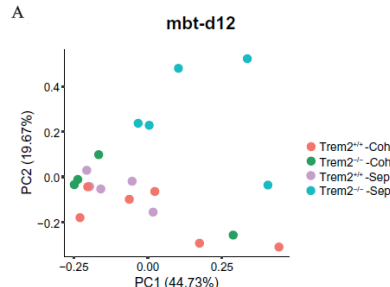


Figura 3A: Grafico PCoA che mostra le analisi di β -diversity condotte sul microbiota dei topi *Trem2*^{+/+}-Sep, *Trem2*^{-/-}-Sep, *Trem2*^{+/+}-Coh e *Trem2*^{-/-}-Coh al giorno 12 (mbt-d12). Il grafico evidenzia una netta segregazione del cluster relativo ai topi *Trem2*^{-/-}-Sep (punti azzurri) rispetto agli altri gruppi sperimentali. Ciò indica che la mancanza del gene *Trem2*, in condizioni di stabulazione separata, induce un'alterazione significativa nella composizione del microbiota che viene invece normalizzata dalla co-stabulazione (Coh).

Tali risultati mostrano che i topi *Trem2*^{-/-} trattati con anti-PD-1 manifestano una variazione del microbiota intestinale che scompare in seguito alla co-stabulazione (co-housing) con il genotipo wild-type.

Successivamente, è stata eseguita un'analisi delle specie batteriche indicatrici sui campioni mbt-d12, raccolti da tutti i gruppi sperimentali, al fine di identificare i taxa discriminanti per genotipo e trattamento. Un iniziale confronto tra il microbiota dei gruppi stabulati separatamente ha evidenziato 39 varianti di sequenza amplicone (ASV) significativamente associate ai topi *Trem2*^{+/+}-Sep e 23 ASV significativamente associate ai topi *Trem2*^{-/-}-Sep. Nei gruppi co-stabulati, il numero di ASV identificate nel microbiota fecale è risultato sensibilmente inferiore: rispettivamente una per i topi *Trem2*^{+/+}-Coh e cinque per i topi *Trem2*^{-/-}-Coh. Al fine di isolare le ASV potenzialmente coinvolte nel potenziamento della risposta all'anti-PD-1 osservata nei topi *Trem2*^{-/-}-Sep, sono state confrontate le sequenze di questi ultimi con quelle degli animali *Trem2*^{-/-}-Coh, nei quali tale risposta potenziata viene annullata. Attraverso questo filtro analitico, sono state identificate 18 ASV selettivamente associate ai topi *Trem2*^{-/-}-Sep; tra queste, 10 risultavano significativamente arricchite rispetto ai controlli *Trem2*^{+/+}-Sep e rappresentavano taxa appartenenti a due *phyla* distinti (Fig. 3B). La stessa analisi è stata condotta anche su campioni di mbt-d12 raccolti da topi *Trem2*^{-/-}-Sep che erano stati precedentemente trattati con metronidazolo, il quale non inibisce la risposta potenziata all'anti-PD-1. Delle 10 ASV che risultano essere arricchite in topi *Trem2*^{-/-}-Sep rispetto agli altri gruppi, solo una risulta significativamente presente anche nei campioni degli animali dello stesso genotipo trattati con metronidazolo; tale sequenza è stata assegnata al batterio anaerobio Gram-positivo *Ruminococcus gnavus*.

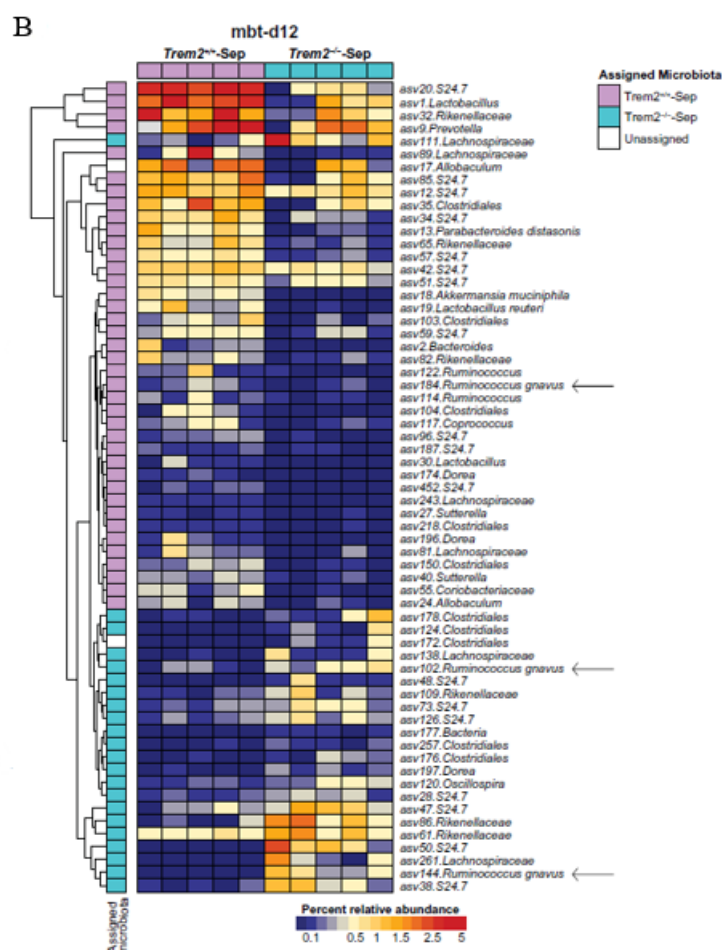


Figura 3B: Heatmap che mostra l'analisi delle specie indicatrici condotta per confrontare la composizione del microbiota fecale dei topi Trem2^{+/+}-Sep e Trem2^{-/-}-Sep, dopo il trattamento con anti-PD-1. ogni colonna rappresenta un singolo animale, mentre ogni riga indica una variante di sequenza amplicone (ASV) significativamente associata a uno dei due genotipi. La scala cromatica indica l'abbondanza relativa percentuale (log10), dal blu (bassa abbondanza) al rosso (alta abbondanza).

È opportuno notare che, sebbene il microbiota dei topi Trem2^{+/+}-Sep contenga la specie *R. gnavus*, la sua abbondanza relativa è significativamente inferiore rispetto alle controparti. Tale evidenza supporta l'ipotesi che la semplice presenza di *R. gnavus* non sia sufficiente a promuovere il controllo della crescita tumorale; è necessario, invece, considerarne l'abbondanza relativa all'interno della comunità microbica nel suo complesso.

Successivamente, si è indagato se il trattamento combinato con un anticorpo monoclonale (mAb) l'anti-PD-1, somministrato a topi wild-type sani, producesse un effetto analogo alla carenza genetica di TREM2 nella modulazione del microbiota. Sebbene tale trattamento sia stato associato a variazioni della composizione microbica in diversi intervalli temporali, non è stato osservato un arricchimento di *R. gnavus* in nessuno dei momenti analizzati. Questi risultati suggeriscono che il contributo del microbiota all'effetto sinergico del blocco di anti-TREM2 e PD-1 non dipenda dal batterio *R. gnavus*, ma possa basarsi su specie diverse che agiscono in modo simile.

3.3 Effetto di TREM2 e di anti-PD-1 sul microambiente infiammatorio intestinale

Nelle fasi attive delle malattie infiammatorie intestinali si osserva tipicamente un'espansione intestinale del batterio *R. gnavus*. Poiché il blocco di PD-1 determina un aumento dell'abbondanza relativa di questa specie nel microbiota intestinale, è stato indagato tale trattamento potesse associarsi all'insorgenza di infiammazione colica nel modello murino *Trem2*^{-/-}. Inizialmente, la valutazione della perdita di peso e dei livelli di lipocalina fecale non ha mostrato differenze significative tra topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-}, indipendentemente dal trattamento, suggerendo l'assenza di colite conclamata. Si è quindi proceduto a indagare una potenziale infiammazione subclinica mediante il sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) del tessuto colonico e la real-time PCR (RT-PCR) per citochine selezionate. L'analisi trascrizionale ha rivelato che i campioni con delezione per il gene *Trem2* trattati con anti-PD-1 segregano separatamente rispetto alla controparte wild-type, mostrando un arricchimento dei *pathway* associati all'attivazione cellulare, all'adesione immunitaria, all'attivazione delle cellule T e alla presentazione dell'antigene. Parallelamente, l'analisi dell'espressione genica ha evidenziato una tendenza all'aumento di TNF e IL-17a a fronte di una riduzione di IL-10. Tali dati confermano la presenza di un microambiente pro-infiammato nei topi *Trem2*^{-/-} trattati con anti-PD-1, associando il trattamento a un'infiammazione intestinale subclinica. Per determinare il contributo dei macrofagi residenti nel colon a tale fenotipo, è stata condotta un'analisi in citometria a flusso sulle cellule mieloidi isolate dopo il dodicesimo giorno da topi *Trem2*^{-/-}-Sep e *Trem2*^{+/+}-Sep portatori di tumore MCA/1956 e trattati o meno con anti-PD-1. Sebbene la citofluorimetria non abbia rilevato variazioni significative nelle frequenze di cellule mieloidi totali, macrofagi, monociti e neutrofili, l'applicazione del sequenziamento dell'RNA a singola cellula su cellule CD11+ ha permesso di aumentare la risoluzione dell'analisi. Dopo i controlli di qualità, 16807 cellule sono state suddivise in dieci cluster, da 0 a 9 (Fig. 4A). Il recettore TREM2 è risultato espresso in tutti i sottogruppi di monociti-macrofagi. L'analisi dell'abbondanza relativa dei cluster, nelle condizioni di controllo e con trattamento anti-PD-1, ha mostrato che nei topi *Trem2*^{-/-} trattati con anti-PD-1, si verifica un arricchimento di macrofagi con profilo immunostimolatorio e infiammatorio (cluster 0 e 2) e una concomitante riduzione dei macrofagi immunosoppressori (cluster 1). Al contrario, nei topi wild-type o nei controlli non trattati non sono emersi cambiamenti rilevanti. Il trattamento con anti-PD-1 nei topi deleti per il gene *Trem2* orienta quindi i macrofagi intestinali verso un fenotipo pro-infiammatorio che, insieme all'espansione di *R. gnavus*, modula l'omeostasi del colon.

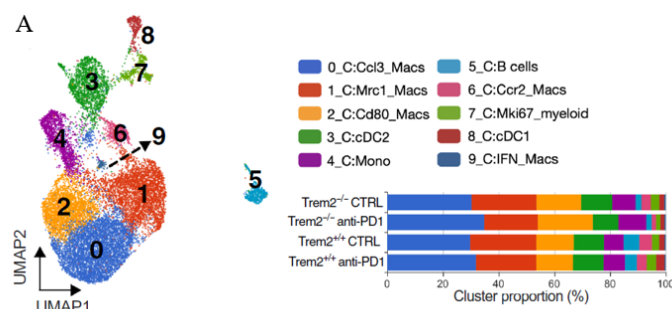


Figura 4A: L'assenza di TREM2 promuove un ambiente mieloide colico pro-infiammatorio dopo il trattamento con anti-PD-1. Grafico UMAP che mostra i cluster di cellule mieloide coliche ottenuti tramite scRNA-seq da condizione aggregate: *Trem2*^{+/+} o *Trem2*^{-/-} trattati o meno con anti-PD-1. A destra, istogramma delle proporzioni relative dei cluster (0-9) in ciascuna condizione sperimentale (*Trem2*^{+/+} CTRL/anti-PD-1 e *Trem2*^{-/-} CTRL/anti-PD-1). *n* = 2 topi per gruppo.

Infine, è stato esaminato il profilo delle cellule T isolate dal colon di topi con delezione per il gene *Trem2* portatori di tumore trattati con anti-PD-1. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato un incremento della frequenza dei linfociti T CD3 totali nella lamina propria di topi *Trem2*^{-/-}-Sep rispetto ai controlli al dodicesimo giorno; tale differenza scompare nel modello di co-stabulazione (Fig. 4B). Inoltre, nel gruppo *Trem2*^{-/-} trattato con anti-PD-1 è stata riscontrata una maggiore frequenza di cellule T CD4 produttrici di TNF (Fig. 4C).

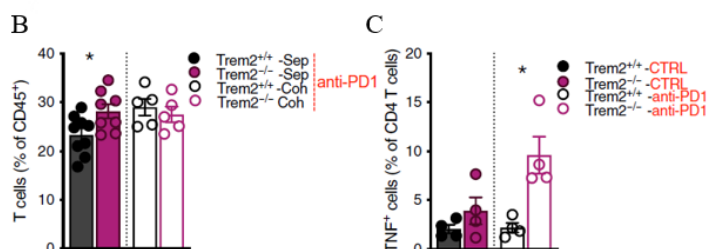


Figura 4(B-C): Analisi delle popolazioni di cellule T e della produzione di citochine infiammatorie nel colon. (B) Frequenza delle cellule T CD3 nella lamina propria del colon in topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-}, suddivisi tra stabulazione separata (Sep) e co-stabulazione (Coh), analizzati 12 giorni dopo l'iniezione del tumore e trattati con anti-PD-1. (C) Produzione di TNF da parte delle cellule T CD4 nel colon di topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-} in risposta al trattamento con anti-PD-1 (viola e rosa) rispetto ai controlli (nero e grigio). I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. L'analisi statistica è stata eseguita tramite il test U di Mann-Whitney (**p* < 0,05).

In conclusione, l'alterazione del microbiota indotta dal trattamento con anti-PD-1 nei topi *Trem2*^{-/-} si associa a un'espansione di cellule T CD4 con un profilo pro-infiammatorio nel colon.

3.4 Il rimodellamento del microbiota intestinale stimola il reclutamento delle cellule T nel microambiente tumorale

All'interno dello studio esaminato, è stato indagato se il rimodellamento del microbiota intestinale e del microambiente immunitario possa influenzare l'efficacia del trattamento con anti-PD-1 nel controllo della crescita tumorale in un sito distante. In particolare, è stata testata l'ipotesi

che l'imprinting delle cellule T, derivante dall'inflammation subclinica indotta dal blocco di PD-1 nei topi *Trem2*^{-/-}, possa facilitarne la migrazione verso il letto tumorale. Per verificare tale ipotesi, è stato impiegato il modello tumorale MCA/1956 in topi transgenici che esprimono la proteina Kikume Green-Red (KikGR). Questa proteina emette fluorescenza verde (KikG) in condizioni basali, ma vira irreversibilmente verso il rosso (KikR) in seguito a stimolazione laser. Previa esposizione chirurgica, il colon e i linfonodi mesenterici (mLN) sono stati sottoposti a luce laser a infrarossi per marcare *in situ* le cellule residenti. La fotoconversione è risultata completa nei mLN (> 99%) e parziale nel colon (dal 55% all'80%). L'analisi successiva ha permesso di individuare cellule KikR sia nei tumori sia nei linfonodi drenanti il tumore (dLN), in un arco temporale compreso tra due e quattro giorni dopo la fotoconversione. La medesima procedura è stata applicata ai due gruppi di topi KikGR precedentemente sottoposti a trapianto di microbiota fecale prelevato da donatori *Trem2*^{+/+}-Sep o *Trem2*^{-/-}-Sep al giorno 12 (mbt-d12). Dopo la ricostituzione del microbiota e l'inoculo del tumore, i topi KikGR sono stati trattati con anti-PD-1, sottoposti a fotoconversione nei mLN e infine sacrificati per l'analisi dei tessuti dLN e tumorali. Da questi organi sono state isolate le cellule T poi testate per il contenuto di citochine intracellulari. Da questa caratterizzazione è emerso che le cellule T CD4 KikR di origine intestinale nei topi riceventi microbiota *Trem2*^{-/-} producono livelli significativamente maggiori di TNF rispetto alle cellule KikG dei medesimi animali e alle cellule KikR dei topi trapiantati con microbiota *Trem2*^{+/+} (Fig. 5A). Al contrario, non sono state osservate differenze significative nei linfociti T CD8 KikR. Questi risultati indicano che le cellule T CD4 intestinali, influenzate dal microambiente pro-infiammatorio indotto dalla carenza di TREM2 e dal trattamento con anti-PD-1, sono predisposte a una maggiore produzione di TNF una volta raggiunto il sito tumorale.

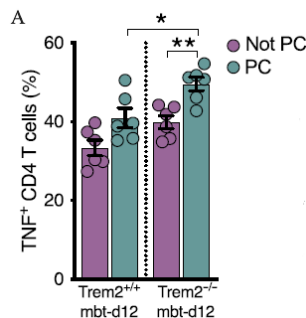


Figura 5A: Analisi della produzione di TNF nelle cellule T CD4 intestinali PC (Photoconverted) e non PC. Il grafico mostra la percentuale di cellule T CD4 che producono TNF in topi *Trem2*^{+/+} e *Trem2*^{-/-} riceventi microbiota (mbt-d12), suddivisi in gruppo di controllo (Not PC) e trattati (PC). Si osserva un aumento significativo della produzione di TNF nelle cellule dei topi con delezione per il gene *Trem2*. Ogni punto rappresenta un pool di due topi. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. L'analisi statistica è stata eseguita tramite il test U di Mann-Whitney per comparare due gruppi (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Inoltre, la frequenza delle cellule T KikR nei dLN è risultata sensibilmente superiore nei topi ricostituiti microbiota *Trem2*^{-/-}-Sep rispetto ai controlli (Fig. 5B e 5C).

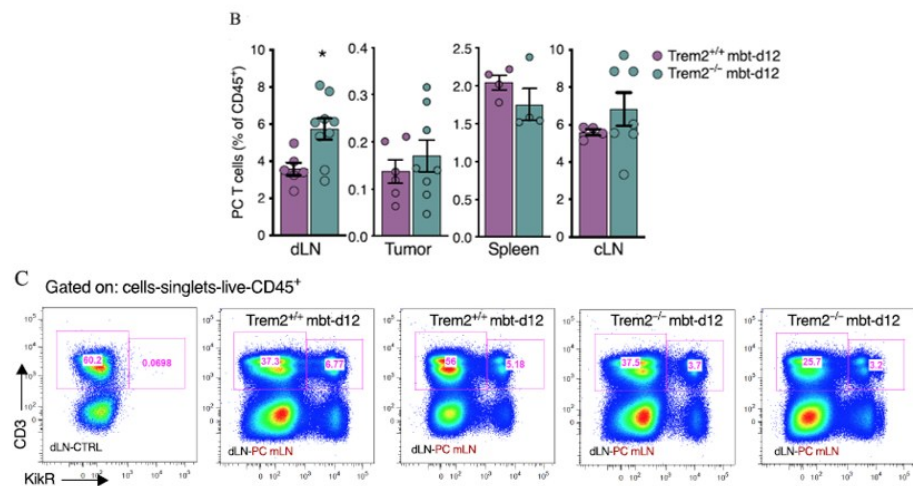


Figura 5(B e C): Analisi della distribuzione delle cellule T fotoconvertite. (B) Frequenza delle cellule T PC individuate in diversi distretti: linfonodi drenanti (dLN), tumore, milza e linfonodi di controllo (cLN). I dati confrontano topi trapiantati con microbiota da donatori *Trem2*^{+/+} (viola) e *Trem2*^{-/-} (azzurro). Si nota un incremento significativo di cellule PC nei dLN dei topi riceventi microbiota *Trem2*^{-/-}. **(C)** Grafici citometrici rappresentativi che mostrano l'espressione di CD3 e KikR (cellule fotoconvertite) nei dLN per i diversi gruppi sperimentali. I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. L'analisi statistica è stata eseguita tramite il test U di Mann-Whitney per comparare due gruppi (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

Significativamente, anche la quota delle cellule T KikG, non derivanti direttamente dalla fotoconversione nei mLN, è risultata maggiore nei topi trapiantati con microbiota *Trem2*^{-/-}-Sep (Fig. 5D). questo dato suggerisce che tale microbiota promuova non solo la migrazione di linfociti T dall'intestino, ma anche la loro espansione *in situ* o il reclutamento da altri distretti sistemici.

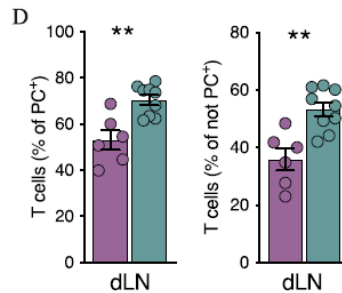


Figura 5D: Analisi in citometria a flusso delle cellule T PC e non PC nei gruppi indicati. I grafici mostrano la percentuale di cellule T fotoconvertite (PC) e non fotoconvertite (not PC) nei linfonodi drenanti. Il confronto evidenzia un aumento significativo di entrambe le popolazioni nei topi riceventi microbiota da donatori *Trem2*^{-/-} (azzurro) rispetto ai controlli *Trem2*^{+/+} (viola). I dati sono rappresentati come media $\pm$ SEM. L'analisi statistica è stata eseguita tramite il test U di Mann-Whitney per comparare due gruppi (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

In conclusione, i dati confermano che il microbiota mbt-d12 associato alla carenza di TREM2 esercita un'influenza sistemica, potenziando il reclutamento e l'attivazione delle cellule T nel microambiente tumorale.

3.5 Effetto della somministrazione di *R. gnavus* sulla risposta tumorale all'anti-PD-1

È stato inoltre valutato l'impatto specifico di *R. gnavus* sull'efficacia del

trattamento con anti-PD-1, indipendentemente dalla carenza di TREM2. L'obiettivo era determinare se l'arricchimento di questa specie batterica, osservato nei topi *Trem2*^{-/-}-Sep, svolga un ruolo cruciale nel potenziamento del controllo sulla crescita tumorale. A topi wild-type è stato somministrato *R. gnavus* ($1,5 \times 10^6$ CFU/topo) tramite *gavage* orale quotidiano; il trattamento è iniziato al decimo giorno dall'inoculo tumorale per la durata di una settimana, in combinazione con la terapia anti-PD-1. Il monitoraggio della progressione tumorale ha rivelato che i topi wild-type riceventi *R. gnavus* mostrano un controllo significativamente migliore della massa tumorale rispetto ai controlli (Fig. 6A). Per gli esperimenti di controllo è stato impiegato il batterio *Clostridium scindens*, identificato come il taxon più prossimo alla sequenza V4-16S di *R. gnavus*, la cui somministrazione, tuttavia, non ha influenzato la crescita tumorale.

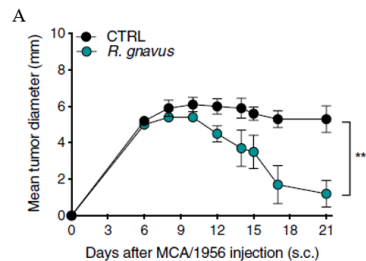


Figura 6A: Impatto dell'esposizione a *R. gnavus* sulla progressione tumorale di MCA/1956. Il grafico mostra la variazione del diametro medio del tumore (mm) nel tempo (giorni successivi all'iniezione sottocutanea delle cellule tumorali MCA/1956). Il gruppo di controllo è costituito da topi trattati con veicolo e mostra una crescita tumorale costante che si stabilizza intorno ai 5-6 mm. Il gruppo trattato con *R. gnavus* è costituito da topi esposti al batterio e che mostrano una significativa riduzione della massa tumorale a partire dal giorno 12, indicando un effetto protettivo o sinergico con la terapia. I risultati sono rappresentativi di almeno due esperimenti indipendenti e sono presentati come media $\pm$ SEM. per confrontare la crescita tumorale tra le condizioni indicate è stata utilizzata l'ANOVA a due vie da confronti *post hoc* dei punti temporali; la significatività statistica è indicata per l'ultimo punto temporale della curva (*** $P < 0,001$).

È stata inoltre valutata la capacità protettiva di *R. gnavus* in seguito a inattivazione termica. Poiché l'effetto protettivo viene perso a temperature elevate, si ipotizza che l'integrità del microrganismo vivo o di suoi componenti termosensibili sia fondamentale per l'induzione della risposta antitumorale.

Per valutare l'influenza di *R. gnavus* sul microambiente immunitario tumorale, è stata condotta un'analisi scRNA-seq su cellule CD45⁺ isolate dai tumori MCA/1956 in topi che avevano ricevuto il trattamento con anti-PD-1 e che avevano subito *gavage* orale. Dopo i controlli di qualità, 25095 cellule sono state analizzate mediante proiezione UMAP, identificando cinque popolazioni principali (Fig. 6B). In seguito all'esposizione a *R. gnavus*, si osserva un profondo rimodellamento del compartimento macrofagico e un incremento di tutti i cluster di cellule T (cluster 4, 6 e 12). Al contrario, il cluster delle cellule T regolatorie (cluster 8) è rimasto invariato, mentre quello delle cellule T TCR $\gamma\delta$ (cluster 15) mostra una lieve contrazione (Fig. 6 da C ad F).

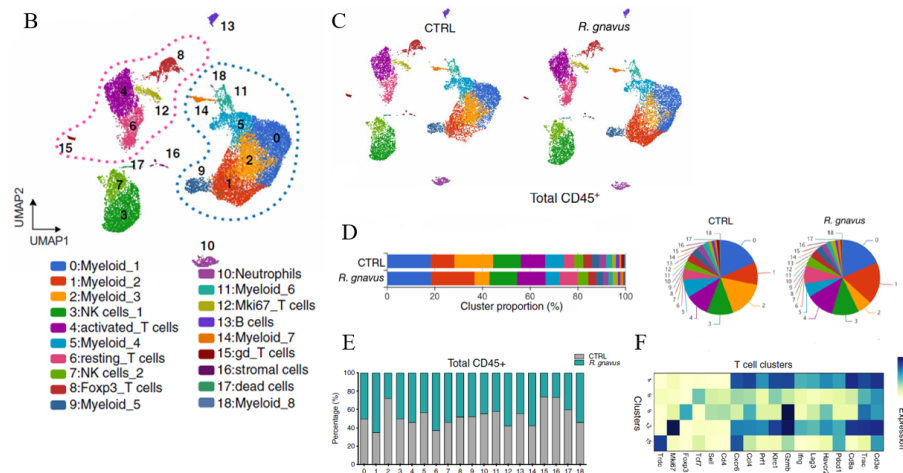


Figura 6(B, C, D, E ed F): Analisi delle popolazioni immunitarie e rimodellamento del microambiente tumorale. (B) Proiezione UMAP delle cellule CD45+ infiltrate nel tumore, raggruppate in 18 cluster trascrittomici distinti. La legenda identifica le principali popolazioni: compartimento mieloide (cluster 0-5, 8-11, 13, 14 e 16), linfociti T e cellule NK (cluster 6, 7, 12 e 15), linfociti B (cluster 13) e cellule staminali e detriti (cluster 17 e 18). **(C)** Visualizzazione UMAP comparativa tra il gruppo di controllo (CTRL) e il gruppo di trattamento con *R. gnavus*, che mostra le differenze nella distribuzione spaziale delle popolazioni cellulari. I topi sono stati sottoposti ad eutanasia dl giorno 14 ($n = 4$ topi per gruppo). **(D)** Grafici a barre e a torta che rappresentano l'abbondanza relativa delle diverse popolazioni cellulari CD45+ totali nei due gruppi sperimentali. **(E)** Istogramma delle proporzioni delle cellule CD45+ totali che dettaglia la percentuale di ciascun cluster cellulare per ogni campione analizzato, evidenziando la variabilità tra i gruppi di controllo e quelli trattati con *R. gnavus*. **(F)** Heatmap dei cluster di cellule T, che mostra i livelli di espressione genica di marcatori specifici per i diversi sottogruppi di linfociti T identificati.

Le popolazioni mieloidi sono state sottoposte a una seconda analisi di clustering per meglio definire la complessità dei cambiamenti macrofagici, portando all'identificazione di 14 sottogruppi. Nei topi trattati con *R. gnavus*, i cluster 0 e 3 risultano ridotti, mentre i cluster 2, 4 e 5 subiscono un'espansione. L'impatto del trattamento è particolarmente evidente nei cluster 3 e 4, che esprimono marcatori associati all'immunosoppressione. È stato quindi generato un modulo genico curato manualmente basato sulla firma immunosoppressiva dei cluster 3 e 4; la proiezione di tale modulo sulle mappe UMAP ha confermato un arricchimento di questa firma genetica esclusivamente nel gruppo di controllo. Infine, l'infiltrazione immunitaria nei tumori, nei linfonodi mesenterici (mLN) e nel colon è stata indagata tramite citometria a flusso. Il trattamento con *R. gnavus* induce un arricchimento di macrofagi MHCII+, confermando la transizione verso un fenotipo mieloide meno soppressivo nel tumore (Fig. 7A). Parallelamente, si osserva un aumento delle cellule dendritiche convenzionali migratorie (migcDCs) e delle cellule T totali nei mLN (Fig. 7B), oltre a un incremento di macrofagi e cellule T attivate nel colon (Fig. 7C). Tali evidenze confermano che *R. gnavus* è in grado di orchestrare cambiamenti immunitari sistemici che originano dal distretto intestinale.

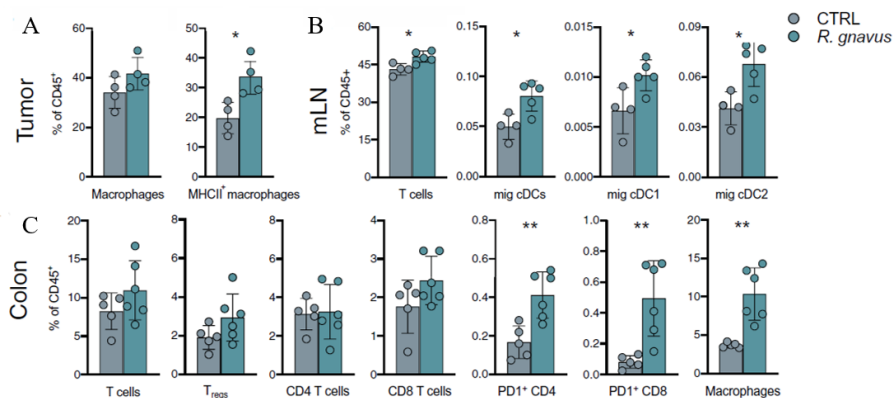


Figura 7(A, B e C): Caratterizzazione delle sottopopolazioni immunitarie nei diversi compartimenti tissutali. (A) Analisi del compartimento mieloidale all'interno della massa tumorale, con particolare attenzione a macrofagi totali e macrofagi MHCII⁺. **(B)** Frequenza dei linfociti T totali e delle diverse sottopopolazioni di cellule dendritiche migratorie nei linfonodi mesenterici (mLN) dei gruppi indicati. **(C)** Frequenza delle cellule T, dei loro sottogruppi e dei macrofagi nel tessuto colonico dei gruppi indicati. I risultati sono presentati come media $\pm$ SEM. Per confrontare i due gruppi è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney (** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

4. DISCUSSIONE

Sebbene l'immunoterapia abbia rivoluzionato l'approccio clinico di diverse patologie neoplastiche, una percentuale significativa di pazienti non risponde efficacemente a causa del microambiente tumorale immunosoppressivo. In questo contesto risultano fondamentali le terapie che mirano ai macrofagi associati al tumore (TAM) o che bersagliano in microbiota per migliorare le risposte antitumorali nei pazienti.

L'articolo esaminato ha portato alla luce risultati interessanti che mostrano che modelli murini con delezione del gene per il recettore macrofagico TREM2, sovraespresso nei TAM, hanno una migliore risposta antitumorale dipendente da variazioni nel microbiota. La somministrazione di una terapia anti-PD-1 ad animali deleti per il gene *Trem2* porta ad un'espansione di *Ruminococcus gnavus*, in grado di produrre un polisaccaride che stimola la produzione di TNF da parte delle cellule dendritiche. I metaboliti prodotti da questo batterio anaerobio potrebbero agire localmente portando all'attivazione e alla migrazione delle cellule T permettendo un miglioramento della risposta immunitaria antitumorale anche in siti distanti. I risultati dell'articolo in esame ampliano quelli di studi precedenti, suggerendo che l'arricchimento di specie del microbiota associate ad una migliore risposta alla terapia anti-PD-1 sia influenzato anche dai macrofagi intestinali. I ricercatori hanno messo in luce anche che il contributo del microbiota all'efficacia della terapia nella carenza o nel blocco di TREM2 non dipende sempre da *R. gnavus*, ma potrebbe basarsi sull'espansione di diverse specie microbiche che attuano meccanismi simili a quelli di *R. gnavus*. Dato che l'abbondanza relativa di *R. gnavus* nell'intestino è relativamente bassa, l'impatto di queste specie potrebbe dipendere dalla loro abbondanza relativa prima del trattamento anticorpale. Alcuni aspetti, quali l'effetto specifico della delezione di TREM2 e del blocco di PD-1 sulla permeabilità e l'integrità intestinale e il meccanismo attraverso cui *R.*

gnavus promuove le risposte antitumorali in distretti anatomici distanti dall'intestino, richiedono ulteriori analisi. Inoltre, sarà importante convalidare questi concetti all'interno della popolazione umana.

Constatate le funzioni immunomodulanti della carenza di TREM2 e la sua capacità di riprogrammare l'asse mieloide-microbiota con esperimenti *in vitro* e *in vivo*, lo studio analizzato ha sottolineato l'importanza che il targeting di questo recettore può avere nel potenziare la risposta ai checkpoint immunitari e nel migliorare l'efficacia del trattamento delle patologie neoplastiche resistenti.

5. BIBLIOGRAFIA

1. P. Sharma, B. A. Siddiqui, S. Anandhan, S. S. Yadav, S. K. Subudhi, J. Gao, S. Goswami, J. P. Allison, (2021) *The next decade of immune checkpoint therapy*. Cancer Discov. 11, 838–857.
2. A. Mantovani, P. Allavena, F. Marchesi, C. Garlanda, (2022) *Macrophages as tools and targets in cancer therapy*. Nat. Rev. Drug Discov. 21, 799-820.
3. S. Roy, G. Trinchieri, (2017) *Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy*. Nat. Rev. Cancer. 17, 271-285.
4. Blanda Di Luccia, M. Molgora, D. Khantakova, N. Jaeger, Hai-Wei Chang, R. S. Czepielewski, B. A. Helmink, E. J. Onufer, J. L. Fachi, B. Bhattarai, T. Trsan, P. F. Rodrigues, JinChao Hou, J. K. Bando, C. Sécca da Silva, M. Cella, S. Gilfillan, R. D. Schreiber, J.I Gordon, M. Colonna, (2024) *TREM2 deficiency reprograms intestinal macrophages and microbiota to enhance anti-PD-1 tumor immunotherapy*. Sci.Immunol. 10,

Nel presente elaborato l'IA è stata impiegata allo scopo di migliorarne il linguaggio e la leggibilità.