

## ABSTRACT

La celiachia (CD) è una malattia immunomediata, causata dall'intolleranza al glutine, che colpisce principalmente l'intestino tenue di soggetti predisposti geneticamente. La transglutaminasi di tipo 2 (TG2) ha due ruoli cruciali nella patogenesi della CD: come enzima deamidante, di importanza fondamentale nel potenziare l'immunogenicità del glutine, e come autoantigene bersaglio della risposta immunitaria. Recentemente, la presenza di alterazioni costitutive nelle cellule CD rispetto a quelle non CD ha portato alla definizione del cosiddetto "fenotipo cellulare celiaco", che potrebbe rappresentare una condizione predisponente agli effetti dannosi del glutine. Anche la TG2, e in particolare gli autoanticorpi anti-TG2, contribuiscono a questo fenotipo. Infatti, tali autoanticorpi, formando complessi con la TG2 presente sulla superficie cellulare, sono in grado di ridurre l'assorbimento del peptide tossico dell' $\alpha$ -gliadina 31-43 (p31-43) da parte delle cellule non CD ma non da parte di quelle CD. In questo lavoro di tesi di dottorato sono state studiate le differenze nella distribuzione subcellulare della TG2 in cellule CD e non CD per determinare come l'enzima possa contribuire al diverso assorbimento di p31-43 da parte dei due gruppi di cellule. Inoltre, nel tentativo di identificare altre differenze costitutive riguardanti la TG2, è stato verificato se p31-43 fosse in grado di modulare diversamente l'espressione e l'attività della TG2 tra cellule CD e non CD. I dati ottenuti hanno dimostrato che la TG2 è maggiormente associata al lato esterno della membrana cellulare, al compartimento endosomiale precoce e al compartimento autofagico nelle cellule CD rispetto a quelle non CD e, inoltre, che p31-43 influenza diversamente l'espressione e l'attività della TG2 nei due gruppi di cellule (in particolare, attivando di meno la TG2 nelle cellule CD rispetto a quelle non CD e inducendo l'espressione della TG2 solo nelle cellule CD). Tali risultati supportano l'idea che la localizzazione della TG2 all'interno delle cellule CD contribuisce a definire il "fenotipo cellulare celiaco". Successivamente, è stato studiato se vi fossero differenze nella regolazione dell'omeostasi del  $Ca^{2+}$  intracellulare riguardo il reticolo endoplasmatico (ER) tra cellule CD e non CD. Inoltre, è stato analizzato come le cellule CD e non CD rispondessero alla stimolazione con la Tapsigargina (THP), un induttore di ER-stress e autofagia, focalizzando l'attenzione anche sulla modulazione della TG2. I dati ottenuti hanno dimostrato che, nelle cellule CD, l'omeostasi del  $Ca^{2+}$  intracellulare è deregolata, causando così sia una forte Unfolding Protein Response (UPR) sia un ritardo nel flusso autofagico in risposta alla stimolazione con THP. È interessante notare che, nelle cellule CD, p31-43 mobilita più  $Ca^{2+}$  dai depositi intracellulari; tuttavia, nelle cellule CD, l'aumento di  $Ca^{2+}$  indotto da p31-43 attiva solo parzialmente la TG2. Nel complesso, questo lavoro di tesi aggiunge un piccolo tassello alla conoscenza della complessa interazione tra peptidi del glutine e TG2 nei meccanismi patogenetici della CD.

## ABSTRACT

Celiac disease (CD) is a life-long gluten-sensitive immune-mediated disorder that primarily affects the small intestine of genetically susceptible individuals worldwide. Type 2 transglutaminase (TG2) has two crucial roles in CD pathogenesis: as a deamidating enzyme, of crucial importance in enhancing gluten immunogenicity, and as a target autoantigen in the immune response. The presence of constitutive alterations in CD cells compared to non-CD ones has recently led to the definition of the so-called “celiac cellular phenotype”, that may represent a predisposing condition to the damaging effects of gluten. TG2, and particularly anti-TG2 autoantibodies, also contributes to this phenotype. Indeed, anti-TG2 autoantibodies, by forming complexes with cell-surface TG2, specifically derange the uptake of the toxic  $\alpha$ -gliadin peptide 31-43 by non-CD cells but not by CD ones. In this PhD thesis work, differences in TG2 subcellular distribution in CD and non-CD cells were investigated to determine how TG2 may be able to contribute to the different handling of p31-43 by the two groups of cells. Then, in the attempt to identify other constitutive differences regarding TG2 in CD and non-CD cells, it was investigated whether p31-43 differentially modulated TG2 expression and activity in fibroblasts from the two groups of subjects. The data obtained showed that TG2 was associated with the cell surface membrane, the early endosomal compartment and the autophagic compartment more in CD cells than in non-CD ones. The data also showed the p31-43 differently affected TG2 expression and activity in CD and non-CD cells, activating TG2 more in non-CD cells than in CD ones and inducing TG2 expression in CD cells but not in non-CD ones. These findings support the idea that TG2 localization inside CD cells contributes to defining the “celiac cellular phenotype”, thus having an important but still undefined role in CD pathogenesis. Subsequently, it was investigated whether regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis regarding the endoplasmic reticulum (ER) was different in CD and non-CD cells. Relatedly, it was analyzed how CD and non-CD cells responded to stimulation with thapsigargin (THP), an ER-stress and autophagy inducer, also focusing the attention on TG2 modulation. The data obtained showed that, in CD cells, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis was deregulated, thus causing both a strong Unfolding Protein Response (UPR) and an engulfed autophagy in response to stimulation with THP. Interestingly, p31-43 mobilized  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores more in CD cells than in non-CD ones; however, the p31-43-induced increase in  $\text{Ca}^{2+}$  only partially activated TG2. Overall, this PhD thesis work adds a small piece of knowledge about the complex interplay between gluten peptides and TG2 in the pathogenetic mechanisms of CD.