

# ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an enteropathy characterised by an immune response to dietary gluten. Emerging evidence highlights the existence of a constitutive cellular phenotype that persists independently of gluten exposure. This thesis provides a comprehensive biochemical and molecular characterisation of this phenotype using, as study models, primary fibroblasts derived from skin and intestinal biopsies of CD patients, compared with matched healthy controls.

Skin fibroblasts from CD patients displayed reduced sensitivity to the ER stress-inducer thapsigargin, prolonged unfolded protein response (UPR), and impaired autophagic flux, linked to altered calcium homeostasis and decreased activation of type 2 transglutaminase (TG2). Similar defects were observed in intestinal fibroblasts, indicating that these alterations may be systemic and not tissue restricted.

Omics approaches further highlighted shared molecular signatures in both models. Proteomics identified consistent differential expression of proteins linked to extracellular matrix organisation, exosomes, vesicular trafficking, cytoskeletal remodelling, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, UPR signalling in CD cells. Interestingly, among proteins downregulated in both cell systems, we also found TG2, thus underlining the central role of this enzyme in the celiac phenotype. In addition, several proteins appeared differentially phosphorylated in skin fibroblasts. On the other hand, a metabolomic analysis conducted on intestinal fibroblasts revealed distinct energy metabolism defects, including altered levels of glucose, glutamine, and dihydroxyacetone, supporting impaired glycolysis and amino acid metabolism. Finally, transcriptomic profiling of CD intestinal fibroblasts treated with the clinically relevant irreversible TG2 inhibitor ZED1227 could provide new insights into TG2-dependent transcriptional networks, with differential expression analysis currently underway.

Altogether, these findings uncover a multi-layered cellular phenotype in CD across distinct tissue-derived fibroblast populations, comprising altered stress responses, autophagy, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, vesicular trafficking, and metabolic pathways. In conclusion, this thesis contributes to increasing knowledge about the celiac cellular phenotype and may pave the way for the research of new disease biomarkers and therapeutic targets.

# ABSTRACT

La malattia celiachia (CD) è un'enteropatia caratterizzata da una risposta immunitaria al glutine proveniente dagli alimenti. Nuove evidenze mostrano l'esistenza di un fenotipo cellulare costitutivo che persiste indipendentemente dall'esposizione al glutine. Questa tesi fornisce una caratterizzazione biochimica e molecolare completa di questo fenotipo utilizzando, come modelli di studio, fibroblasti primari derivati da biopsie cutanee e intestinali di pazienti con CD, confrontati con controlli sani.

I fibroblasti cutanei dei pazienti con CD hanno mostrato una ridotta sensibilità alla taspigargina, induttore di stress del reticolo endoplasmatico, una risposta dovuta a proteine malripiegate (UPR) prolungata e un flusso autofagico alterato, correlati a un'alterata omeostasi del calcio e a una ridotta attivazione della transglutaminasi di tipo 2 (TG2). Difetti simili sono stati osservati nei fibroblasti intestinali, indicando che queste alterazioni potrebbero essere sistemiche e non limitate ai tessuti specifici.

Gli approcci omici hanno ulteriormente evidenziato firme molecolari condivise in entrambi i modelli. La proteomica ha identificato un'espressione differenziale coerente di proteine legate all'organizzazione della matrice extracellulare, agli esosomi, al traffico vescicolare, al rimodellamento del citoscheletro, all'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  e alla segnalazione UPR nelle cellule celiache. È interessante notare che, tra le proteine down-regolate in entrambi i sistemi cellulari, è stata riscontrata anche TG2, sottolineando così il ruolo centrale di questo enzima nel fenotipo celiaco. Inoltre, diverse proteine apparivano differenzialmente fosforilate nei fibroblasti cutanei. D'altra parte, un'analisi metabolomica condotta sui fibroblasti intestinali ha rivelato distinti difetti del metabolismo energetico, tra cui livelli alterati di glucosio, glutammina e diidrossiacetone, a supporto di una glicolisi e di un metabolismo degli amminoacidi compromessi. Infine, il profilo trascrizionale dei fibroblasti intestinali CD trattati con l'inibitore irreversibile della TG2, entrato a far parte di un trial clinico ZED1227, potrebbe fornire nuove informazioni su questo enzima, mediante un'analisi della differente espressione dei trascritti che è attualmente in corso.

Nel complesso, questi risultati rivelano un fenotipo cellulare multistratificato nella celiachia in diverse popolazioni di fibroblasti derivati da diversi tessuti, comprendente risposte alterate allo stress, autofagia, omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$ , del traffico vescicolare e delle vie metaboliche. In conclusione, questa tesi contribuisce ad aumentare la conoscenza del fenotipo cellulare della celiachia e potrebbe aprire la strada alla ricerca di nuovi biomarcatori della patologia e a nuovi bersagli terapeutici.