



8° AIC CONGRESS/ 8° CONVEGNO AIC

6° FC RESEARCH WORKSHOP/ 6° WORKSHOP RICERCA FC



WITH THE PATRONAGE OF HEALTH MINISTRY / CON IL PATROCINIO DEL MINISTERO DELLA SALUTE

THE FUTURE OF CELIAC DISEASE

IL FUTURO DELLA CELIACHIA

Milan • 27 September 2019
27 Settembre 2019 • Milano

proceedings
atti congressuali



8° AIC CONGRESS / 8° CONVEGNO AIC

6° FC RESEARCH WORKSHOP / 6° WORKSHOP RICERCA FC



WITH THE PATRONAGE OF HEALTH MINISTRY / CON IL PATROCINIO DEL MINISTERO DELLA SALUTE

THE FUTURE OF CELIAC DISEASE *IL FUTURO DELLA CELIACHIA*

Milan • 27 September 2019
27 Settembre 2019 • Milano

proceedings
atti congressuali

INDEX

Foreword	7
Evolution of wheat gluten and novel approaches to develop wheat that is safe for coeliac patients	9
Troublesome T cells in celiac disease: Implications for diagnosis and treatment	10
The hunt for adjunctive or alternative therapies for coeliac disease	11
mTOR sustains inflammatory response in celiac disease- Project 006_FC_2015 (PI Giovanni Monteleone)	13
Celiac Disease and Vitamin D	14
LONG NON-CODING RNA EFFECTS ON THE DEVELOPMENT OF CELIAC DISEASE	15
The role of CB2 receptor in the pathogenesis of celiac disease and associated bone loss	17
Immuno-Laser capture microdissection to study immunomodulatory function of $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes in Celiac Disease	19
microRNA profiling in stool and plasma of subjects affected by celiac disease by Next-Generation-Sequencing	20

NDICE

Prefazione	23
<i>Evoluzione del glutine nel frumento e nuovi approcci di sviluppo di varietà di frumento sicure per i pazienti celiaci</i>	25
<i>Cellule T coinvolte nella malattia celiaca: implicazioni per la diagnosi e il trattamento</i>	26
<i>Quali terapie nuove o supplementari per la celiachia</i> <i>Ruolo patogenetico della chinasi mTOR nella malattia celiaca- Progetto 006_FC_2015 (PI Giovanni Monteleone)</i>	27
<i>Celiachia e Vitamina D</i>	29
EFFETTO DEI LONG NON-CODING RNA SULLO SVILUPPO DELLA MALATTIA CELIACA	31
<i>Ruolo del recettore CB2 nella patogenesi della malattia celiaca e nella perdita di massa ossea ad essa associata</i>	32
<i>Immuno-Laser capture microdissection per lo studio della funzione immunoregolatoria dei linfociti $\gamma\delta$ + IEL nella malattia celiaca.</i>	33
<i>Profili di espressione di microRNA in plasma e feci di soggetti affetti da celiachia mediante Next-Generation-Sequencing</i>	35
	37

SCIENTIFIC PROGRAM / PROGRAMMA SCIENTIFICO

10:00 Registration / <i>Registrazione</i>	12:45 - 13:25 The hunt for adjunctive or alternative therapies for celiac disease <i>Quali terapie nuove o supplementari per la celiachia</i> M. MAKI DISCUSSION / <i>DISCUSSIONE</i>
10:30 Welcome Remarks and Opening Session <i>Saluti e introduzione ai lavori</i>	13:30 - 15:00 Lunch / <i>Pranzo</i>
CHAIRMAN: PROF G.R. CORAZZA - PROF R. TRONCONE	
10:45 - 11:25 From dynamic epidemiology to the causality of celiac disease <i>Prospettive della Epidemiologia</i> <i>Dinamica di Celiachia</i> C. CATASSI DISCUSSION / <i>DISCUSSIONE</i>	FC Research Workshop Workshop Ricerca FC Chairman: Prof M. Silano
11:25 - 12:05 Evolution of wheat gluten and novel approaches to develop wheat that is safe for celiac patients <i>Evoluzione del glutine nel frumento e nuovi approcci di sviluppo di varietà di frumento sicure per i pazienti celiaci</i> MJM SMULDERS DISCUSSION / <i>DISCUSSIONE</i>	15:00 - 15:10 Welcome Remarks and Opening Session <i>Saluti e introduzione ai lavori</i>
12:05 - 12:45 Troublesome T cells in celiac disease: Implications for diagnosis and treatment <i>Cellule T coinvolte nella malattia celiaca: implicazioni per la diagnosi e il trattamento</i> L. SOLLID DISCUSSION / <i>DISCUSSIONE</i>	15:10 - 15:35 FINAL REPORT - INVESTIGATOR GRANT 006FC2015 Immunology of CD: Role of mTOR Kinase Cascade in Celiac Disease <i>REPORT FINALE - INVESTIGATOR GRANT 006FC2015</i> <i>Immunologia della Celiachia: Il ruolo patogenetico della chinasi mTOR nella malattia celiaca</i> S.SEDDA DISCUSSION / <i>DISCUSSIONE</i>

Foreword

The 2019 edition of the Annual Congress on Celiac Disease, organized by AIC – Associazione Italiana Celiachia (Italian Society for Celiac Disease) - presents a significant novelty. On the occasion of the simultaneous works of the annual General Assembly of AEOCS in Milan, the Official language of the Congress is English.

The challenging title of the congress is: "THE FUTURE OF CELIAC DISEASE", that is also the common thread of all the lectures of the event. This congress is a scientific event for the Medical professionals, aimed at meeting the celiac individuals' needs and necessity.

In the pages of these proceedings, the four lectures of the program are summarized. These lectures describe what the celiac disease will be like in the very next years, from different points of view: the evolution of wheat in relation to its toxicity in CD, the epidemiology and the clinical presentation, the implication for diagnosis and treatment of the latest findings about gluten-specific T cells phenotype and, finally, the therapeutic strategies alternative to gluten-free diet. The knowledge of the CD in the future will allow us to shape it to meet these needs in term of early and correct diagnosis, dietary treatment and life-long follow-up and care.

With the best wishes of a fruitful attendance to the congress,

Marco Silano

Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health,
Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

15:35 - 16:00

FINAL REPORT: INVESTIGATOR GRANT
008FC2015 Clinics of CD: Vitamin D
and Celiac Disease

*REPORT FINALE - INVESTIGATOR GRANT
008FC2015*

*Clinica della Celiachia: Vitamina D e
Celiachia*

C. CIACCI

DISCUSSION/DISCUSSIONE

16:00 - 16:15

PROGRESS REPORT: FELLOWSHIP GRANT
007FC2017 – Genetics of CD: Long
non-coding RNA Effects on the
Development of Celiac Disease

*REPORT DI AVANZAMENTO: FELLOWSHIP GRANT
007FC2017 – Genetica della
Celiachia: Effetti dell'RNA non
codificante sullo sviluppo della
malattia celiaca*

D. CIELO

DISCUSSION/DISCUSSIONE

16:15 - 16:30

PROGRESS REPORT: FELLOWSHIP GRANT
009FC2017 – Clinics of CD: The role of
CB2 receptor in the pathogenesis of
celiac disease and associated bone
loss

*REPORT DI AVANZAMENTO: FELLOWSHIP GRANT
009FC2017 – Clinica della Celiachia: Il
ruolo del recettore CB2 nella
patogenesi della malattia celiaca e
associata osteoporosi*

C. TORTORA

DISCUSSION/DISCUSSIONE

16:30 - 16:45

PROGRESS REPORT: FELLOWSHIP GRANT
014FC2017 – Immunology of CD:
Immunomodulatory function of $\gamma\delta+$
intraepithelial lymphocytes in Celiac
Disease: in vivo and in vitro responses
to gliadin stimuli

*REPORT DI AVANZAMENTO: FELLOWSHIP GRANT
014FC2017 – Immunologia della
Celiachia: Funzione
immunomodulante dei linfociti
intraepitaliali gamma-delta nella
malattia celiaca: risposte in vivo e in
vitro agli stimoli con gliadina*

V. ROTONDI AUFIERO

DISCUSSION/DISCUSSIONE

16:45 - 17:00

PROGRESS REPORT: FELLOWSHIP GRANT
015FC2017 – Genetics of CD: microRNA
profiling in
stool and plasma of subjects affected
by celiac disease by Next-Generation-
Sequencing

*REPORT DI AVANZAMENTO: FELLOWSHIP GRANT
015FC2017 – Genetica della
Celiachia: Profilo dei microRNA nelle
feci e nel plasma di soggetti affetti da
malattia celiaca mediante
Sequenziamento di Nuova
Generazione*

A. FRANCAVILLA

DISCUSSION/DISCUSSIONE

17:00 - 17:30

Closing Session
*Chiusura lavori e Questionario di
valutazione dell'apprendimento*

Evolution of wheat gluten and novel approaches to develop wheat that is safe for coeliac patients

M.J.M. (René) Smulders

Wageningen University & Research, Plant Breeding, Wageningen, The Netherlands

email: rene.smulders@wur.nl

Background. Currently the only reliable remedy for coeliac disease (CD) patients is a strict and lifelong gluten-free diet. While gluten-free products are available, there is a growing desire for coeliac-safe, whole-grain wheat-based products, as consumption of whole-grain foods (including wheat) reduces the risk of chronic diseases. Breeding wheat without immunogenic epitopes would be a definitive solution (Jouanin et al. 2018a). Developing “safe gluten” wheat varieties that retain baking quality is, however, very challenging. Bread wheat has more than 100 gluten genes on its three genomes, and therefore wheat that is coeliac-safe cannot be produced by combining naturally occurring, safe variants of gliadin genes by conventional breeding methods alone.

Recently, targeted gene editing using CRISPR/Cas9 has been developed as an additional tool with direct relevance to plant breeding. Gene editing has the potential to precisely remove or modify the DNA sequences coding for immunogenic peptides. We call these two possible routes “gluten-free wheat” and “wheat with safe gluten”. Sánchez-León et al. (2018) showed that it is possible to remove, in one round of editing, up to 35 gluten genes, reducing immunoreactivity by an estimated 85%.

We set out to edit the immunogenic epitopes with the aim of creating wheat with gliadins that are safe for CD patients while retaining baking quality. We also developed tools for screening the plants produced, both for changes in the DNA and in the resulting gluten proteins produced in the grains. In our hands, gene editing produced small edits in up to 10 alpha-gliadin genes plus deletion of 20 of the 87 alpha-gliadin genes in variety Fielder (Jouanin et al., 2019a,b). Thus, both studies have provided proof of concept for the use of gene editing to make wheat coeliac-safe.

Conclusions and perspective. This application of gene editing in wheat will be discussed within the context of food production and in view of current national and international regulatory frameworks. Healthy products derived using this new technology may become available in the United States, Canada, Argentina and many other countries but not in the EU, as here these plants would classify as genetically modified, even though no foreign DNA is present (Jouanin et al., 2018b).

References

Jouanin A, LJWJ Gilissen, LA Boyd, J Cockram, FJ Leigh, EJ Wallington, HC van den Broeck, IM van der Meer, JG Schaart, RGF Visser, MJM Smulders (2018a) Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Research International* 110: 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.025>

Jouanin A, Schaart JG, Boyd LA, Cockram J, Leigh FJ, Bates R, Wallington EJ, Visser RGF, Smulders MJM (2019a) Outlook for coeliac disease patients: Towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and β -gliadin gene families. *BMC Plant Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1889-5> (open access)

Jouanin A, T Borm, LA Boyd, J Cockram, F Leigh, BACM Santos, RGF Visser, MJM Smulders (2019b) Development of the GlutEnSeq capture system for sequencing gluten gene families in hexaploid bread wheat with deletions or mutations induced by γ -irradiation or CRISPR/Cas9. *Journal of Cereal Science* 88, 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.008> (open access)

Jouanin A, LA Boyd, RGF Visser, MJM Smulders (2018b) Development of wheat with hypoimmunogenic gluten obstructed by the gene editing policy in Europe. *Frontiers in Plant Science* 9: 1523. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01523> (open access)

Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal* 16, 902-910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837> (open access)

Troublesome T cells in celiac disease: Implications for diagnosis and treatment

Ludvig M. Sollid

KG Jebsen Coeliac Disease Research Centre, Department of Immunology, University of Oslo and Oslo University Hospital – Rikshospitalet. l.m.sollid@medisin.uio.no

Celiac disease is a prevalent polygenic disorder caused by a harmful immune response to cereal gluten proteins. While exhibiting features of food intolerance, the disease also has many autoimmune characteristics including highly disease specific autoantibodies targeting the enzyme transglutaminase 2. Celiac disease patients, but not healthy subjects, possess gluten-specific CD4⁺ T cells (1,2). These gluten-specific CD4⁺ T cells, likely drivers of the immunopathology of the condition, are uniquely restricted by disease-associated HLA-DQ allotypes, namely HLA-DQ2.5 (HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*02), HLA-DQ2.2 (HLA-DQA1*02:01/HLA-DQB1*02) and HLA-DQ8 (HLA-DQA1*03/HLA-DQB1*03:02). Conveniently, HLA-DQ:gluten tetramers consisting of HLA:peptide complexes multimerized on fluorescently labeled streptavidin enable visualization and isolation of such disease driving CD4⁺ T cells. We have combined tetramer isolation of gluten-specific T cells with T-cell receptor sequencing as well as high-dimensional cell phenotyping and RNASeq analysis. We found that the T cells carry a surprisingly narrow phenotype, a phenotype sugges-

tive of T-cell help to B cells and a role of the T cells in antibody production (3). T-cell receptor sequencing of single and bulk populations of cells revealed persistence of the same clonotypes in gut and blood compartments over decades (4). Hence, in established celiac disease, the T cell clonotypes that recognize gluten persist for decades, make up fixed repertoires. The presence and long-time persistence of gluten specific T cells in celiac disease implicates that HLA-DQ:gluten tetramer detection of these cells can also be used as a diagnostic marker. I will review these new findings and discuss their implications for diagnosis and treatment of this important disorder (5).

References:

1. Lundin, K. E. A., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T. S., Fausa, O., Thorsby, E., and Sollid, L. M. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* **178**, 187-196
2. Molberg, Kett, K., Scott, H., Thorsby, E., Sollid, L. M., and Lundin, K. E. A. (1997) Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand. J. Immunol.* **46**, 103-109
3. Christophersen, A., Lund, E. G., Snir, O., Sola, E., Kanduri, C., Dahal-Koirala, S., Zuhlke, S., Molberg, O., Utz, P. J., Rohani-Pichavant, M., Simard, J. F., Dekker, C. L., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., and Davis, M. M. (2019) Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med* **25**, 734-737
4. Risnes, L. F., Christophersen, A., Dahal-Koirala, S., Neumann, R. S., Sandve, G. K., Sarna, V. K., Lundin, K. E., Qiao, S. W., and Sollid, L. M. (2018) Disease-driving CD4+ T cell clonotypes persist for decades in celiac disease. *J Clin Invest* **128**, 2642-2650
5. Christophersen, A., Risnes, L. F., Dahal-Koirala, S., and Sollid, L. M. (2019) Therapeutic and diagnostic implications of T cell scarring in celiac disease and beyond. *Trends Mol Med*

The hunt for adjunctive or alternative therapies for coeliac disease

Markku Mäki, MD, PhD, professor emeritus

Faculty of Medicine and Health Technology, Tampere University, Tampere, Finland
email: markku.maki@tuni.fi

Background. Small intestinal mucosal healing is our gold standard outcome measure in gluten-free diet and a prerequisite for sustaining health. Mucosal injury and inflammation is worldwide very common in treated patients and symptoms do occur in 20-50%. There is an unmet need for novel adjunctive or alternative therapies.

Outcome measures. A pill, device, or vaccine/immunotherapy meant for CD treatment should attenuate or prevent mucosal injury. The grade of mucosal injury can be accurately measured using morphometry (1-3). Validated patient-related outcome (PRO) instruments are used to measure symptoms and quality of life (4). Safety endpoints always include reporting of adverse events. CD-related serolog-

ical and immunological as well as exploratory biomarker endpoints are often used in phase 2a studies.

Study designs. Randomized placebo-controlled gluten challenge-designed efficacy phase 2a proof-of-concept trials are used to tell whether the drug is attenuating or preventing gluten-induced mucosal injury. Also other type of study designs have been used where biopsy has not been the primary outcome.

Past and present trials. At present there are approximately 30 novel drug/vaccine pipelines within academy and industry. Ongoing clinical trials are to be found in ClinicalTrials.gov and/or EudraCT databases. Attempts to detoxify wheat or gluten have not been successful. On the drug side the glutenase ALV003 (Alvine, USA) was sown to attenuate mucosal injury in CD. However, a follow-up phase 2b study in nonresponsive CD did not meet its primary endpoint, the placebo healing effect was similar to the drug effect. ImmunogenX (USA) is presently continuing the development of this glutenase. Larazotide acetate, an epithelial tight junction regulator, has passed phase 2 studies but biopsy has not been a primary outcome (Innovate, USA). The development of the polymer BL-7010 meant to bind the ingested gluten and sequester it to the feces was stopped at the safety stage (Bio-LineRx, Israel). Nexvax2 desensitization therapy has passed extensive phase 1 trials, proceeded to a phase 2 trial, which again upon interim analysis was discontinued in June 2019 (Immusant, USA). A transglutaminase 2 inhibitor, ZED1227, from the companies Zedira and Dr. Falk Pharma (Germany) is at present tested in a gluten challenge trial with biopsies as primary outcome. Many other pharma companies are evaluating whether their already existing biological drug could be effective in CD. The monoclonal anti-IL-15 antibody AMG714 is an example of this (Celimmune/Amgen, USA). The drug did not prevent gluten-induced mucosal injury but an anti-inflammatory and symptom-attenuating effect was seen. Further development of AMG714 is underway. Many other novel treatment approaches are in the discovery phase or in phase 1 preclinical studies.

Conclusions and perspectives. At this point all clinical drug trials in CD have been performed in adults. No trials have so far exclusively addressed dermatitis herpetiformis. The hunt for novel treatment options in CD is ongoing.

1. Lähdeaho M-L, Mäki M, Laurila K, Huhtala H, Kaukinen K. Small-bowel mucosal changes and antibody responses after low- and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterology* 2011;11:129.
2. Lähdeaho M-L, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova O-P, Kärjä-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman D, Mäki M. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 2014;146:1649-1658.
3. Taavela J, Koskinen O, Huhtala H, Lähdeaho M-L, Popp A, Laurila K, Collin P, Kaukinen K, Kurppa K, Mäki M. Validation of morphometric analyses of small-intestinal biopsy readouts in celiac disease. *Plos One* 2013;8:e76163.
4. Ludvigsson J, Ciacci C, Green P, Kaukinen K, Korponay-Szabo I, Kurppa K, Murray J, Lundin K, Maki M, Popp A, Reilly N, Rodriguez-Herrera A, Sanders D, Schuppan D, Sleet S, Taavela J, Voorhees K, Walker M, Leffler D. Outcome measures in coeliac disease trials: the Tampere recommendations. *Gut* 2018, 67:1410-1424.

mTOR sustains inflammatory response in celiac disease- Project 006_FC_2015 (PI Giovanni Monteleone)

S. Sedda, V. Dinallo, I. Marafini †, OA. Paoluzi †, R. Izzo, P. Giuffrida*, A. Di Sabatino*, GR: Corazza*, G. Monteleone

*Dipartimento di Medicina dei Sistemi e †Dipartimento di Gastroenterologia, Policlinico Tor Vergata di Roma; *Dipartimento di Medicina Interna, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia*

Background. Celiac disease (CD) is an enteropathy triggered by the ingestion of gluten proteins in genetically predisposed individuals and characterized by excessive activation of effector immune cells and enhanced production of inflammatory cytokines [1-4]. However, factors/mechanisms that amplify the ongoing mucosal inflammation in CD are not fully understood.

Aim. In this study, we assessed whether mammalian target of Rapamycin (mTOR), a pathway that combines intra- and extra-cellular signals and acts as a central regulator for the metabolism, growth, and function of immune and non-immune cells [5], sustains CD-associated immune response.

Methods. Expression of phosphorylated (p)/active form of mTOR was assessed in protein lysates of duodenal biopsies taken from patients with active CD (ACD) and healthy controls (CTR) by Western Blotting and immunofluorescence. p-4EBP1 and p-Rictor were assessed in protein lysates of duodenal biopsies taken from patients with ACD and CTR by Western Blotting. Mucosal explants of inactive CD (ICD) patients were cultured in the presence or absence of pepsin-trypsin-digested (PT)-gliadin and then p-4EBP1 expression was evaluated by Western Blotting. Mucosal explants of ICD patients were cultured in the presence or absence of the pro-inflammatory cytokines IL-21 and IFN- γ and p-4EBP1 expression was evaluated by Western blotting. In parallel, mucosal explants of ICD patients were treated with the JAK/STAT inhibitor AG490 or left untreated and then stimulated either with IL-21 or IFN- γ , and p-4EBP1 protein expression was evaluated by Western Blotting. Mucosal explants of ACD patients were cultured in the presence or absence of the antibodies neutralizing IL-21 and IFN- γ , and p-4EBP1 expression was evaluated by Western blotting. Mucosal explants of ACD patients were cultured with rapamycin, an inhibitor of mTOR activity, and then p-4EBP1 and IL-15 expression was evaluated by Western Blotting.

Results. Our findings indicate that expression of p-mTOR is increased in protein lysates of duodenal biopsy samples taken from patients with ACD as compared to normal controls. In ACD, activation of mTOR occurs mainly in the epithelial compartment and associates with enhanced expression of p-4EBP, a downstream target of mTOR complex (mTORC)1, while expression of p-Rictor, a component of mTORC2, is not increased. Stimulation of mucosal explants of inactive CD patients

with pepsin-trypsin-digested (PT)-gliadin or IFN- γ /IL-21, two cytokines produced in CD by gluten-specific T cells, increases p-4EBP expression. Consistently, blockade of such cytokines in cultures of ACD mucosal explants reduces p-4EBP. Finally, we show that inhibition of mTORC1 with rapamycin in ACD mucosal explants reduces p-4EBP and production of IL-15, a master cytokine produced by epithelial cells in this disorder.

Conclusion. Our data indicate that mTOR is highly activated in ACD and suggest a role for this kinase in sustaining inflammatory response in this disorder.

References

1. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. "Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease". *Gastroenterology*. 2000 Oct;119(4):996-1006.
2. Nilsen EM1, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. "Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma". *Gut*. 1995 Dec;37(6):766-76.
3. Ivan Monteleone, Massimiliano Sarra, Giovanna Del Vecchio Blanco, Omero Alessandro Paoluzi, Eleonora Franzè, Daniele Fina, Alessia Fabrizi, Thomas T. MacDonald, Francesco Pallone and Giovanni Monteleone. "Characterization of IL17A-Producing Cells in Celiac Disease Mucosa". *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):2211-8. doi: 10.4049/jimmunol.0901919.
4. Bodd M1, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, Sollid LM. "HLADQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22". *Mucosal Immunol*. 2010 Nov;3(6):594-601. doi: 10.1038/mi.2010.36. Epub 2010 Jun 23
5. E. Dazert, MN Hall. "mTOR signaling in disease". *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Dec;23(6):744-55. doi: 10.1016/j.ceb.2011.09.003. Epub 2011 Sep 29.

Celiac Disease and Vitamin D

Carolina Ciacci, University of Salerno

Background. Patients with celiac disease (CeD) frequently show low bone density (BMD). Guidelines recommend the VitD supplementation in case of low BMD. Studies on Vitamin D (Vit D) in CeD report the 25(OH) VitD deficiency at diagnosis that disappears on a gluten-free diet, independently of any supplementation, whereas in the few studies in which the 1,25 (OH) Vi D, was evaluated, it resulted high at the time of CeD diagnosis.

Aims. We aimed to study patients with untreated or treated CeD for: diet and nutrients, 25-hydroxy vitD and 1,25-dihydroxy vitD levels, measurements of ions indices of mineral metabolism and parathyroid gland activity. Bone mass/bone density by pQCT and its correlation with the above mentioned indices. Secondly, we aimed to study the effect of 25-hydroxy VitD and of 1,25-dihydroxy vitD on the early immunologic/inflammatory events upon in vitro gliadin challenge of intestinal biopsies in active and treated CeD.

Results. We enrolled 111 CeD, 39 at diagnosis and 72 at follow-up. Roughly, 60% of adult patients with CeD show BMD lower than peers. About 15% of CeD at diagnosis showed very low levels of BMD. However, GFD did not vary the BMD. Dietary assessment demonstrated that nutritional imbalance seems not to play a role in low bone density of CeD patients, as they consume milk and derivate in the same amount of controls. 25-OH VitD levels were similar at diagnosis and follow-up (19.36 ± 8.7 and 21.60 ± 8.9 , $p=ns$) while 1,25-OH VitD levels were higher at diagnosis than at follow-up (61.63 ± 20.69 vs 54.91 ± 13.60 , $p = 0,07$). Levels of 25-OH VitD were low in patients with low BMD, while the levels of 1,25-OH VitD tended to be higher in patients with low BMD compared to those with normal BMD. Calcium, phosphorous, albumin levels were within the normal range for all and not significantly different between groups. Notably iPTH values (normal range 10-60 pg/ml) were higher in CeD at diagnosis than the patients on GFD ($73,1 \pm 2,0$ vs $56,3 \pm 4,1$, $p = 0,015$).

In vitro study. We were able to investigate the mucosa of 62 patients. Six culture were not evaluated because of technical problems (contamination, high temperature of the culture chamber, small corrupted biopsies). Therefore, we could study the effect of VitD at different levels in 56 patients. The results of the present study show an unexpected biological pro-inflammatory effect of both vitamins D on the biopsies from celiac patients. In our model Vit D, upon contact with the intestinal mucosa, increases also the oxidative stress. The results of a global pro-inflammatory effect of VitD on the intestinal mucosa, obtained through a different methodology, are generally in agreement with each other. However, further experiments are needed to confirm the datum.

Conclusion. Our findings support the theory that low BMD in CeD may not result from Vit D deficiency, but rather from the inflammation or the reduced level of calcium binding proteins, due to enterocytes loss. The latter impairs the response to the 1,25OH VitD, further potentiating calcium loss and inducing secondary hyperparathyroidism.

LONG NON-CODING RNA EFFECTS ON THE DEVELOPMENT OF CELIAC DISEASE

Donatella Cielo, Luigi Greco
University of Naples "Federico II", Department of Translational Medical Sciences

Background. Genetic association studies have identified 112 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with celiac disease (MC) of which 90% are found in non-coding regions, suggesting that most of them have a potentially regulatory role. In the last few years, it has been discovered that non-coding RNAs

(ncRNAs), defined as small RNA molecules that are transcribed but not translated into proteins, represent the majority of human transcripts. Furthermore, it is also known that they are strongly involved in the post-transcriptional regulation of gene expression which is therefore not controlled only by transcription factors. The non-coding RNAs that influence epigenetic processes can be grouped into "short ncRNAs" and "long ncRNAs", the latter being the subject of our work. In the first part of this study the objective is to evaluate the effect and location of 7 SNPs present in the sequence of 7 lncRNAs associated with celiac disease that influence their functionality, in intestinal epithelial and non-epithelial cells and subsequently in sections fixed in formalin (FFPE) of intestinal biopsies of celiac patients and controls.

Methodology. We selected 7 SNPs associated with celiac disease which are cis eQTL^{2,3,4}, that is they influence the expression of the gene regions in which they are situated, located within lncRNA coding regions. Intestinal biopsies of 17 celiac patients and 19 control patients were recruited. lncRNA expression experiments were performed on them by RT-PCR. Subsequently for those results to be deregulated by the analysis of gene expression, we observed the specific localization in formalin-fixed sections (FFPE) in a specific cell population, by RNAScope, an innovative technique combining in situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC).

Results. By immuno-sorting with MicroBeads CD326 (EpCAM), we have isolated from the intestinal biopsies the epithelial cells and *lamina propria* cells, from which we then analyzed the expression of the lncRNAs and the genes they regulated by Real Time PCR in order to highlight any differences between CDs and CTRs. 5 of the lncRNAs were not found to be expressed at the intestinal level, while the lncRNA AL139246 showed similar expression levels in both compartments, and without differences between CDs and CTRs. Very interesting instead, the data obtained for LINC01882, associated with the PTPN2⁵ locus, that we have seen to be a transcript mainly of the *lamina propria* and which showed greater expression in celiacs. In light of the results obtained, we have concentrated our attention on LINC1882, and started ISH experiments to visualize the specific localization and expression directly in situ and to relate it to the results obtained from the Real-Time PCR experiments. Furthermore, to date, further experiments on the gene expression of the PTPN2 gene are in progress on the same samples, since it is interesting to look at how it is regulated by LINC1882.

Bibliography

1. Dubois PC, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010;42:295-302
2. Ricano-Ponce, C. Wijmenga. Mapping of immune-mediated disease genes. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2013 (14): 325-353
3. Fairfax BP1, Humburg P, Makino S, Naranbhai V et al. Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. *Science* 2014; 343, doi: 10.1126/science.1246949

4. Lee MN1, Ye C, Villani AC, Raj T, et al. Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. *Science* 2014; 343, 1246980
5. Houtman M, Shchetynsky K, Chemin K, et al. T cells are influenced by a long non-coding RNA in the autoimmune associated PTPN2 locus. *J Autoimmun.* 2018 Jun;90:28-38.

The role of CB2 receptor in the pathogenesis of celiac disease and associated bone loss

Chiara Tortora, Francesca Rossi

Department of Women, Child and General and Specialist Surgery, University of Campania "Luigi Vanvitelli" Naples

Background and preliminary data. Low bone mineral density and osteoporosis (OP) are frequent complications of Celiac disease (CD). The etiology of pathologic bone alteration in CD is multifactorial and related to malabsorption of essential micronutrients for bone mineralization and to pro-inflammatory cytokines release that stimulates osteoclastogenesis. The gluten-free diet is the only effective treatment for CD, but is not always enough to restore bone mass. In a previous study we demonstrated a significant association between the Cannabinoid Receptor type 2 (CB2) Q63R variant and CD, suggesting the receptor as a biomarker for the diagnosis of CD. Moreover, CB2 is involved in bone cell differentiation, survival and function and its stimulation is beneficial for reducing osteoclasts (OCs) activity in OP associated with different diseases. Based on these evidences, to highlight a possible role of the CB2 receptor in CD-induced bone alteration, we investigated the expression of the receptor in OCs obtained from celiac patients and evaluated the effects of the pharmacological modulation of the CB2 on osteoclast activity.

Methodology. Six children just diagnosed with CD and six healthy donors, age and sex matched, were enrolled after formal approval of the Ethics Committee. OCs were obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of enrolled subjects, after signing informed consent. In order to obtain fully differentiated OCs, the PBMCs were cultured for 21 days in presence of 25 ng/mL recombinant human macrophage colony-stimulating factor (rh-MCSF) and 50 ng/mL receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand (RANK-L). Mature OCs were identified as Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive multinucleated cells containing 3 or more nuclei at the end of the culture period. The mature OCs were characterized by Real time PCR and Western Blot for the expression of CB2 receptor and the osteoclast biomarkers TRAP and Cathepsin K, before and after 24h exposure to CB2 agonist, JWH-133 [100nM] or to the reverse agonist AM630 [10 μ M]. Moreover, to evaluate OCs activity, TRAP assay and bone resorption assay were performed before and after treatments.

Results. As expected, TRAP and Cathepsin K are highly expressed in OCs from CD patients, as demonstrated by Real Time PCR and Western Blot. Accordingly, the colorimetric Trap assay and the bone resorption assay, revealed an increase in osteoclast number, size and activity. Interestingly, the expression of CB2 is lower in OCs from CD patients than in OCs from healthy subjects. Considering that CB2 receptor is implicated in modulation of bone metabolism inhibiting activity and formation of OCs, this result suggests a role for CB2 in the pathogenesis of CD-related bone resorption. In support of these data, the CB2 agonist JWH-133 [100nM] significantly reduces the osteoclasts activity in CD and counteracts the resorption. Moreover, the CB2 blockade with the reverse agonist AM630 [10µM] exacerbates the increase of TRAP and the osteoclast over-activation. In conclusion, the receptor CB2 could be a useful marker to predict the risk of pathological bone alteration in CD subjects at the moment of diagnosis, ameliorating their quality of life.

Publications and Accepted Papers. Manuscript in preparation

Bibliography

1. Webster J, Vajravelu ME, Choi C, Zemel B, Verma R. Prevalence of and Risk Factors for Low Bone Mineral Density in Children With Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jul;17(8):1509-1514.
2. Volkan B, Fettah A, İşlek A, Kara SS, Kurt N, Çayır A. Bone mineral density and vitamin K status in children with celiac disease: Is there a relation? *Turk J Gastroenterol.* 2018 Mar;29(2):215-220.
3. Rossi F, Bellini G, Tolone C, Luongo L, Mancusi S, Papparella A, Sturgeon C, Fasano A, Nobili B, Perrone L, Maione S, del Giudice EM. The cannabinoid receptor type 2 Q63R variant increases the risk of celiac disease: implication for a novel molecular biomarker and future therapeutic intervention. *Pharmacol Res.* 2012 Jul;66(1):88-94.
4. Rossi F*, Tortora C*, Punzo F, Bellini G, Argenziano M, Di Paola A, Torella M, Perrotta S. The Endocannabinoid/Endovanilloid System in Bone: From Osteoporosis to Osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 18;20(8).
5. Strisciuglio C, Bellini G, Miele E, Martinelli M, Cenni S, Tortora C, Tolone C, Miraglia Del Giudice E, Rossi F. Cannabinoid Receptor 2 Functional Variant Contributes to the Risk for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2018 May/Jun;52(5):e37-e43

Immuno-Laser capture microdissection to study immunomodulatory function of $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes in Celiac Disease

Vera Rotondi Aufiero, Istituto di Scienze dell'Alimentazione ISA-CNR, Avellino, Italy

Background and preliminary data. An increase of $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes (IELs) is one of the hallmark of Celiac Disease (CD). The role of these cells in the pathogenesis of CD has not been established yet, but there are many evidences which suggest their regulatory function by the production of anti inflammatory cytokines^{1,2}. Different approaches have been used to study the pattern of cytokines released by IELs in CD, which have led sometimes to contradictory results. Most data has been found analyzing mRNA expression, by using techniques that fail to provide an isolation of highly pure cell populations. The development in the last decade of laser capture microdissection (LCM), combined with quantitative real-time PCR (qRT-PCR), has allowed this goal to be achieved.

Although some immuno-LCM protocols, to identify and isolate specific types of cells, have been proposed to counteract RNA degradation³, the avoidance of RNA degradation is almost inevitable⁴.

The aim of this work was to provide an optimal protocol useful to identify and isolate of $\gamma\delta$ + IEL as well as to obtain sufficient amounts of high-quality RNA useful for cytokine gene expression analysis.

Methods. Seven µm cryostatic sections from intestinal biopsies of untreated CD patients were processed using two protocols that is classic immuno-LCM protocol or LCM on immunostained serial tissue sections⁵.

In the first case, criostatic sections have been collected on a Rnase-free membrane slides, immunostained to identify $\gamma\delta$ + cells within a minimal incubation times of 15 minutes, and then processed for LCM. RNase inhibitors, ice-cold DEPC-treated water and RNase-free PBS, have been used to prevent RNA degradation. Regards LCM on immunostained serial tissue sections, cryostatic sections have been collected on a normal slide and processed for immunohistochemistry (IHC) to stain $\gamma\delta$ + cells, whereas the serial section has been collected on a RNasefree membrane slides and processed for LCM. Such pairs of serially adjacent sections were carefully compared for the identification of $\gamma\delta$ + IEL to microdissect.

Total RNA obtained by both methods, was subsequently extracted, reverse transcribed and analysed by RT-qPCR assays.

Results. Applying the immuno-LCM protocol, the stability of RNA was markedly reduced by the activation of endogenous tissue RNases., and such activation was mainly due from the aqueous solutions, used during the immunostaining process. On the contrary, LCM combined with IHC on serial tissue sections, allows us to isolate $\gamma\delta$ + IELs and at the same time prevent RNA degradation, obtaining high-quality RNA.

Therefore, utilizing such protocol we could identify and isolate of $\gamma\delta$ + IEL and obtain good RNA quality from such cells useful to investigate the cytokine gene expression profiles of $\gamma\delta$ + IEL in CD.

Bibliography

1. Hayday A., Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:233–242. [PubMed]
2. Chen Y., Chou K., Fuchs E., Havran W.L., Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99:14338–14343. [PMC free article] [PubMed]
3. Mojsilovic-Petrovic J, Nestic M, Pen A, Zhang W, Stanimirovic D. Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. *J Neurosci Methods.* 2004 Feb 15;133(1-2):39-48.
4. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol.* 2000 Sep;53(9):666-72. Review. PMID: 11041055
5. Masahiko Kase, Takeshi Houtani, Satoru Sakuma, Toshiyuki Tsutsumi, Tetsuo Sugimoto. Laser microdissection combined with immunohistochemistry on serial thin tissue sections: a method allowing efficient mRNA analysis. *Histochemistry and Cell Biology.* February 2007, Volume 127, Issue 2, pp 215–219

microRNA profiling in stool and plasma of subjects affected by celiac disease by Next-Generation-Sequencing

Antonio Francavilla, Paolo Vineis, Italian Institute for Genomic Medicine (IIGM), Torino

Background and preliminary data. Celiac disease (CD) occurs in about 1% of the population worldwide, although most people affected remain undiagnosed (1). Additional markers could be useful in CD detection/management. In this respect, molecular markers based on newly discovered non-coding RNA (ncRNA) species detectable in surrogate tissue or microbiome composition may represent an interesting field of research. microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules of ~22 nucleotides in length with a dysregulated expression in many gastrointestinal diseases and so interesting to use as potential biomarkers. Despite already more a decade of studies on miRNA alterations, few of them explored their expression in relation to CD mostly by arrays and RT-qPCR. In duodenal tissue and blood samples of CD patients some miRNAs, including mir-192-5p, miR-31-5p and miR-338-3p, were downregulated in paediatric and adult CD patients compared to controls (2,3). At our knowledge, there are no studies which analyzed miRNA and microbiome profiles in stool/plasma specimens by Next Generation Sequencing (NGS) comparing the effect of gluten free diet (GFD) in CD vs healthy subjects and in new diagnosed CD patients before and after one year of GFD.

Methods. In collaboration with gastroenterological department of 2 hospitals in Torino and by the use of a flyer (approved by AIC/FC, explaining the objectives

and aims of the study distributed all over the city of Turin in pharmacies, bars and restaurants attended by Celiac subjects), 48 subjects were recruited (24 CD patients following the GFD and 24 healthy controls) and their stool and plasma samples collected. Each subject signed an informed consent to study and filled dietary and lifestyle questionnaires.

All the biological samples are stored at -80°C until RNA extraction. Fecal RNA extraction was performed with the Stool Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp). RNA from plasma exosomes was isolated using the miRNeasy plasma/serum kit by the QiaCube extractor (Qiagen, Venlo, Netherlands). To perform the metagenomic analyses, DNA isolation from stool samples was performed using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands).

Barcoded library were prepared using the NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina. Fragments of 135-160 bp are used for small RNA-Seq analysis on the Illumina HiSeq4000 platform. One lane in 24-plex produces about 4 millions of single reads per sample, 50 nt long. An already optimized workflow for quantification of miRNAs obtained from NGS and pipelines of analyses of data have been developed and published by my research group (4).

Results. From Stool RNA and DNA isolation good results were obtained in terms of quality and quantity. Libraries for small RNA sequencing were prepared for 45 samples including those of 21 CD patients on GFD and the relative 21 matched controls (14 women and 7 men in each group, mean age \pm 39.3 \pm 12.64) as well as two samples from one newly diagnosed CD patient (one at the diagnosis and the other after 3 months of GFD). Barcoded libraries have been sequenced and reads quality check performed with positive results. The bioinformatic analyses to highlight differentially expressed miRNAs are ongoing.

References

- (1) Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. Benjamin Lebwohl, Jonas F Ludvigsson, Peter HR Green *BMJ* 2015;351:h4347 doi: 10.1136/bmj.h4347
- (2) miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in Celiac Disease. Serena Magni, Gaia Buoli Comani, Luca Elli, Samanta Vanessi, Elisa Ballarini, Gabriella Nicolini, Michela Rusconi, Mirco Castoldi, Raffaella Meneveri, Martina U. Muckenthaler, Maria Teresa Bardella and Donatella Barisani *Am J Gastroenterol* 2014; 109:1662–1674; doi: 10.1038/ajg.2014.203
- (3) miRNA-regulated gene expression differs in celiac disease patients according to the age of presentation. Gaia Buoli Comani, Roberto Panceri, Marco Dinelli, Andrea Biondi, Clara Mancuso, Raffaella Meneveri, Donatella Barisani. *Genes Nutr* (2015), doi 10.1007/s12263-015-0482-2
- (4) Small non-coding RNA profiling in human biofluids and surrogate tissues from healthy individuals: description of the diverse and most represented species. Giulio Ferrero, Francesca Cordero, Sonia Tarallo, Maddalena Arigoni, Federica Riccardo, Gaetano Gallo, Guglielmo Ronco, Marco Allasia, Neha Kulkarni, Giuseppe Matullo, Paolo Vineis, Raffaele A. Calogero, Barbara Pardini and Alessio Naccarati. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 3), pp: 3097-3111

Prefazione

L'edizione 2019 del Convegno Annuale sulla Celiachia organizzato da AIC – Associazione Italiana Celiachia – presenta una significativa novità. In occasione dei lavori paralleli della General Assembly dell'AEOCS a Milano, il convegno si svolgerà in lingua inglese trasformandosi in evento internazionale.

Il tema chiave del Convegno, che sarà trattato nei suoi diversi aspetti dai relatori intervenuti, è interessante e complesso: Il Futuro della Malattia Celiaca. Tradizionalmente, il Convegno Annuale AIC sulla Celiachia rappresenta l'evento scientifico di riferimento in Italia per i medici e i ricercatori, ma fortemente orientato verso i bisogni e le necessità degli individui affetti da celiachia.

Questi atti Congressuali presentano, tra l'altro, un estratto delle 4 letture magistrali del mattino, che hanno lo scopo di farci vedere come sarà la patologia celiaca nel prossimo futuro: l'evoluzione dei grani rispetto alla loro tossicità per i celiaci, l'epidemiologia e la presentazione clinica, quali implicazioni per la diagnosi e il trattamento in seguito alle più recenti evidenze sul fenotipo linfocitario T glutine-specifico, e infine le strategie terapeutiche alternative alla dieta priva di glutine.

La conoscenza della malattia celiaca nel prossimo futuro ci permetterà di andare incontro ai bisogni delle persone affette da celiachia, in termini di nuovi approcci diagnostici, trattamento dietetico e più in generale nella presa in carico e assistenza.

Con I migliori auguri di una proficua partecipazione al Convegno,

Marco Silano
Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Evoluzione del glutine nel frumento e nuovi approcci di sviluppo di varietà di frumento sicure per i pazienti celiaci

M.J.M. (René) Smulders, Wageningen University & Research, Plant Breeding, Wageningen, Olanda
(email: rene.smulders@wur.nl)

Background. Attualmente l'unica terapia possibile per la celiachia è una dieta senza glutine permanente e rigorosa. Sebbene prodotti senza glutine siano disponibili, c'è un desiderio crescente di prodotti a base di grano integrale, ma sicuri per i celiaci. Varietà di grano prive degli epitopi immunogenici per la celiachia sarebbe la soluzione migliore (Jouanin et al. 2018a). Lo sviluppo di grani sicuri che mantengano le proprietà di panificazione nonostante la mancanza di glutine sono tuttavia difficili da ottenere. Il grano possiede più di 100 geni distribuiti nei suoi 3 genomi che codificano per le proteine del glutine, e quindi un grano che sia sicuro per i celiaci non può essere ottenuto semplicemente ibridando le varianti non tossiche che esistono in natura con i metodi tradizionali.

Gli studi. Recentemente, un nuovo metodo di modifica genetica basato su CRISPR/Cas9 è stato messo a punto come strumento ulteriore di sviluppo di nuove varietà di cereali. L'editing genetico ha il vantaggio di rimuovere o modificare in modo preciso le sequenze di DNA che codificano per i peptidi immunogenici. Si potrebbero quindi avere due tipologie di grano, una definita grano gluten-free, l'altra grano con glutine sicuro. Sánchez-León et al. (2018) hanno dimostrato che è possibile rimuovere con un solo processo di editing genetico fino a 35 geni del glutine, riducendo l'immunoreattività del grano di circa l'85%.

Nel nostro laboratorio abbiamo cercato di modificare gli epitopi immunogenici con l'obiettivo di creare un grano con gliadine che siano sicure per il celiaco ma conservino le proprietà di panificazione. Abbiamo anche sviluppato metodologie per testare i grani così prodotti, in termini sia di cambiamenti del DNA sia di corrispondenti proteine del glutine generate. Stante ai nostri risultati, l'editing genetico ha prodotto modifiche in circa 10 geni di alfa-gliadina e la delezione di 20 degli 87 geni complessivi della stessa alfa-gliadina nella varietà Fielder (Jouanin et al., 2019a,b). si tratta quindi di studi che provano l'efficacia dell'editing genetico per la produzione di grani sicuri per i celiaci.

Conclusioni e prospettive. L'impiego dell'editing genetico per la produzione di grani sarà affrontato in ambito legislativo e regolatorio nazionale ed internazionale. Prodotti ottenuti con questa nuova tecnologia potrebbero diventare disponibili in USA, Canada, Argentina e altri paesi fuori dall'UE, siccome in Europa questi grani sarebbero classificati come OMG sebbene essi non contengano alcun DNA estraneo aggiunto (Jouanin et al., 2018b).

Bibliografia

- Jouanin A, LJWJ Gilissen, LA Boyd, J Cockram, FJ Leigh, EJ Wallington, HC van den Broeck, IM van der Meer, JG Schaart, RGF Visser, MJM Smulders (2018a) Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Research International* 110: 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.025>
- Jouanin A, Schaart JG, Boyd LA, Cockram J, Leigh FJ, Bates R, Wallington EJ, Visser RGF, Smulders MJM (2019a) Outlook for coeliac disease patients: Towards bread wheat with hypomunogenic gluten by gene editing of α - and β -gliadin gene families. *BMC Plant Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1889-5> (open access)
- Jouanin A, T Borm, LA Boyd, J Cockram, F Leigh, BACM Santos, RGF Visser, MJM Smulders (2019b) Development of the GlutEnSeq capture system for sequencing gluten gene families in hexaploid bread wheat with deletions or mutations induced by γ -irradiation or CRISPR/Cas9. *Journal of Cereal Science* 88, 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.008> (open access)
- Jouanin A, LA Boyd, RGV Visser, MJM Smulders (2018b) Development of wheat with hypomunogenic gluten obstructed by the gene editing policy in Europe. *Frontiers in Plant Science* 9: 1523. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01523> (open access)
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal* 16, 902-910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837> (open access)

Cellule T coinvolte nella malattia celiaca: implicazioni per la diagnosi e il trattamento

Ludvig M. Sollid. KG Jebsen Coeliac Disease Research Centre, Department of Immunology, Università di Oslo, Norvegia – Rikshospitalet. l.m.sollid@medisin.uio.no

La malattia celiaca è prevalentemente una patologia poligenica caratterizzata da una dannosa risposta immunitaria alle proteine del glutine. Oltre a presentare le caratteristiche di un'intolleranza alimentare, la celiachia ha molte caratteristiche delle patologie autoimmuni incluso la produzione di autoanticorpi altamente specifici che legano l'enzima transglutaminasi 2. A differenza dei soggetti sani, i pazienti celiaci possiedono linfociti CD4+ T specifici per il glutine (1,2). Questi linfociti, sicuramente responsabili dell'immunopatologia della celiachia, hanno aplotipi HLA-DQ tipici della malattia, quali HLA-DQ2.5 (*HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*02*), HLA-DQ2.2 (*HLA-DQA1*02:01/HLA-DQB1*02*) e HLA-DQ8 (*HLA-DQA1*03/HLA-DQB1*03:02*). Specifici tetrameri HLA-DQ:glutine (consistenti in complessi HLA:peptide polimerizzati su streptavidina fluoresceinata) consentono la visualizzazione e l'isolamento di questi linfociti CD4+ T patogenici. Nel nostro laboratorio, abbiamo combinato l'isolamento dei linfociti T glutine-specifici mediante tetrameri con un sequenziamento del recettore T, come pure effettuato la fenotipizzazione cellulare e l'analisi RNASeq. Abbiamo trovato che le cellule T hanno un fenotipo molto ristretto che suggerisce che un tipo di cellule T interagisca con i linfociti B e un ruolo delle cellule T nella produzione di anticorpi (3). Le analisi, inoltre, dimo-

strano che le popolazioni linfocitarie trovate sono simili nell'intestino e nel sangue periferico e persistono per decenni nell'organismo (4). Quindi, nella celiachia conclamata i clonotipi T che riconoscono il glutine persistono per decenni, dando luogo a repertori definiti. La presenza e la lunga persistenza di cellule T glutine-specifiche nella malattia celiaca implica che il metodo di rilevazione di queste cellule mediante tetrameri HLA-DQ:glutine può essere usato anche come marcatore diagnostico. Nella relazione si discuteranno queste nuove scoperte e le loro implicazioni nella diagnosi e nella cura della celiachia (5).

Bibliografia:

1. Lundin, K. E. A., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T. S., Fausa, O., Thorsby, E., and Sollid, L. M. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ(α 1*0501, β 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* **178**, 187-196
2. Molberg, Kett, K., Scott, H., Thorsby, E., Sollid, L. M., and Lundin, K. E. A. (1997) Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand. J. Immunol.* **46**, 103-109
3. Christophersen, A., Lund, E. G., Snir, O., Sola, E., Kanduri, C., Dahal-Koirala, S., Zuhlke, S., Molberg, O., Utz, P. J., Rohani-Pichavant, M., Simard, J. F., Dekker, C. L., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., and Davis, M. M. (2019) Distinct phenotype of CD4(+) T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med* **25**, 734-737
4. Risnes, L. F., Christophersen, A., Dahal-Koirala, S., Neumann, R. S., Sandve, G. K., Sarna, V. K., Lundin, K. E., Qiao, S. W., and Sollid, L. M. (2018) Disease-driving CD4+ T cell clonotypes persist for decades in celiac disease. *J Clin Invest* **128**, 2642-2650
5. Christophersen, A., Risnes, L. F., Dahal-Koirala, S., and Sollid, L. M. (2019) Therapeutic and diagnostic implications of T cell scarring in celiac disease and beyond. *Trends Mol Med*

Quali terapie nuove o supplementari per la celiachia

Markku Mäki (MD, PhD, professore emerito)
Università di Tampere, Tampere, Finlandia
email: markku.maki@tuni.fi

Background. La normalizzazione della mucosa intestinale è l'attuale standard per misurare la sicurezza della dieta senza glutine e un prerequisito per la salute del paziente celiaco. Il danno e l'infiammazione mucosale è molto frequente nei pazienti celiaci in trattamento e i sintomi persistono nel 20-50% dei casi. Ne consegue la necessità per terapie alternative o almeno adiuvanti la dieta senza glutine. **Outcome.** Una terapia a base di un vaccino un'immunoterapia mirata per la celiachia potrebbe attenuare o prevenire il danno mucosale. Il grado di danno mucosale può essere accuratamente misurato con la morfometria (1-3). Validated patient-related outcome (PRO) sono utilizzati per misurare i sintomi e la qualità di vita (4). Inoltre, safety endpoints includono la descrizione di eventi avversi. Endpoints serologici e immunologici correlati alla celiachia sono spesso usati negli studi di fase 2a.

Il disegno degli Studi clinici. Studi clinici di fase 2° finalizzati alla misurazione dell'efficacia e della validità, randomizzati e con controllo placebo versus challenge di glutine, sono generalmente impiegati per verificare se il farmaco sta attenuando o prevenendo il danno mucosale indotto da glutine. Sono stati sviluppati anche altri tipi di studi in cui la biopsia non è stata impiegata come endpoint primario.

Studi clinici passati e presenti. Attualmente sono attive circa 30 linee di ricerca su nuovi farmaci e vaccini, sia presso gli istituti pubblici sia presso le aziende. Questi studi clinici possono essere trovati su ClinicalTrials.gov e sul database EudraCT. I tentativi di detossificare i grani non sono stati al momento efficaci. Sul versante farmacologico, la glutenasi ALV003 (Alvine, USA) ha mostrato una certa attenuazione del danno mucosale celiaco. Tuttavia, uno studio clinico di fase 2b volto al monitoraggio in pazienti con celiachia refrattaria non ha provato l'efficacia di ALV003, dato che il placebo e il gruppo trattato con ALV003 davano gli stessi risultati. ImmunogenX (USA) sta attualmente continuando lo sviluppo di questa glutenasi. Il Larazotide acetato, un regolatore delle Tight junction, ha passato gli studi di fase 2 ma la biopsia non è stata usata come misuratore primario (Innovate, USA). Lo sviluppo del polimero BL-7010 aveva lo scopo di legare il glutine ingerito sequestrandolo all'interno delle feci e è stato bloccato nella fase di valutazione della sicurezza (BioLineRx, Israele). Il vaccino Nexvax2 ha passato una fase 1 abbastanza estesa e poi è andato in valutazione nella fase 2, che anche questa è stata interrotta nel giugno 2019 (ImmusanT, USA). Un inibitore della transglutaminasi 2, ZED1227, delle aziende Zedira e Dr. Falk Pharma (Germania) è attualmente in fase di sperimentazione in uno studio clinico che include la valutazione della biopsia. Molte altre aziende farmaceutiche stanno valutando se farmaci biologici già esistenti possano essere utilizzati per il trattamento della celiachia. L'anticorpo monoclonale anti-IL-15, AMG714, è uno di questi esempi (Celimmune/Amgen, USA). Questo farmaco non ha mostrato di prevenire il danno mucosale indotto dal glutine, tuttavia presenta attività antinfiammatorie. Ulteriori sviluppi di AMG714 sono in fase di studio. Molti altri nuovi approcci terapeutici sono in fase di scoperta o di studi preclinici di fase 1.

Conclusioni e prospettive. Attualmente molti studi clinici farmacologici sono stati effettuati nell'adulto per la celiachia. Al contrario, nessuno studio clinico è stato condotto in modo specifico per la dermatite erpetiforme. La ricerca di nuove opzioni terapeutiche è ancora in corso.

Bibliografia

1. Lähdeaho M-L, Mäki M, Laurila K, Huhtala H, Kaukinen K. Small-bowel mucosal changes and antibody responses after low- and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterology* 2011;11:129.
2. Lähdeaho M-L, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova O-P, Kärjä-Lahdensuu T, Marcantonio A, Adelman D, Mäki M. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 2014;146:1649-1658.
3. Taavela J, Koskinen O, Huhtala H, Lähdeaho M-L, Popp A, Laurila K, Collin P, Kaukinen K, Kurppa K, Mäki M. Validation of morphometric analyses of small-intestinal biopsy readouts in celiac disease. *Plos One* 2013;8:e76163.

4. Ludvigsson J, Ciacci C, Green P, Kaukinen K, Korponay-Szabo I, Kurppa K, Murray J, Lundin K, Maki M, Popp A, Reilly N, Rodriguez-Herrera A, Sanders D, Schuppan D, Sleet S, Taavela J, Voorhees K, Walker M, Leffler D. Outcome measures in coeliac disease trials: the Tampere recommendations. *Gut* 2018, 67:1410-1424.

Ruolo patogenetico della chinasi mTOR nella malattia celiaca- Progetto 006_FC_2015 (PI Giovanni Monteleone)

S. Sedda, V. Dinallo, I. Marafini †, OA. Paoluzi †, R. Izzo, P. Giuffrida*, A. Di Sabatino*, GR: Corazza*, G. Monteleone

*Dipartimento di Medicina dei Sistemi e †Dipartimento di Gastroenterologia, Policlinico Tor Vergata di Roma; *Dipartimento di Medicina Interna, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia*

Background. La malattia celiaca (CD) è un'enteropatia scatenata dall'ingestione del glutine in soggetti geneticamente predisposti ed è caratterizzata da un'eccessiva attivazione di cellule immunitarie effettrici e da un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie [1-4]. Tuttavia, i fattori/meccanismi che amplificano l'infiammazione mucosale nella malattia celiachia non sono completamente noti.

Scopo. In questo studio, abbiamo indagato se il pathway di mTOR (mammalian target of Rapamycin), che risponde a segnali intra ed extracellulari ed agisce come regolatore centrale del metabolismo, della crescita e di varie funzioni delle cellule immunitarie e non [5], possa sostenere la risposta immunitaria associata alla malattia celiaca.

Metodologia. L'espressione della forma fosforilata/attiva di m-TOR è stata valutata in lisati proteici di biopsie duodenali prelevate da pazienti con celiachia attiva e soggetti sani tramite Western Blotting e immunofluorescenza. p-4EBP1 e p-Rictor sono stati valutati in lisati proteici di biopsie duodenali prelevate da pazienti con celiachia attiva e soggetti sani tramite Western Blotting. Biopsie duodenali di pazienti con celiachia inattiva sono state messe in coltura in presenza o meno del digesto peptico-triptico della gliadina e successivamente l'espressione di p-4EBP è stata valutata tramite Western Blotting. Biopsie duodenali di pazienti con celiachia inattiva sono state messe in coltura in presenza o meno delle citochine pro-infiammatorie IL-21 and IFN- γ e successivamente l'espressione di p-4EBP è stata valutata tramite Western Blotting. Contemporaneamente, biopsie duodenali di pazienti con celiachia inattiva sono state trattate o meno con l'inibitore di JAK/STAT AG490 e successivamente stimulate con IL-21 o IFN- γ e poi l'espressione proteica di p-4EBP è stata valutata tramite Western Blotting. Biopsie duodenali di pazienti con celiachia attiva sono state messe in coltura in presenza o meno di anticorpi neutralizzanti IL-21 and IFN- γ e l'espressione di p-4EBP è stata valutata tramite We-

stern Blotting. Biopsie duodenali di pazienti con celiachia attiva sono state trattate con la rapamicina, un inibitore dell'attività di mTOR, e successivamente l'espressione di p-4EBP e della IL-15 è stata valutata tramite Western Blotting.

Risultati. I nostri risultati indicano che l'espressione di p-mTOR è aumentata nei lisati proteici di campioni biotici duodenali prelevati da soggetti con malattia celiaca attiva rispetto a controlli sani. Nella malattia celiaca attiva, l'attivazione di mTOR avviene principalmente nell'epitelio e si associa ad un'aumentata espressione di p-4EBP, un target a valle del complesso 1 di mTOR (mTORC1), mentre l'espressione di p-Rictor, un componente di mTORC2, non è aumentata. La stimolazione di biopsie di pazienti con celiachia inattiva con il digesto peptico-triptico della gliadina o con IFN- γ /IL-21, due citochine prodotte nella malattia celiaca da cellule T-glutine specifiche, aumenta l'espressione di 4-EBP. Coerentemente, l'inibizione di queste citochine in colture d'organo di biopsie di pazienti con celiachia attiva riduce l'espressione di 4-EBP e la produzione di IL-15, una citochina fondamentale prodotta dalle cellule epiteliali in questa patologia.

Conclusioni. I nostri dati indicano che mTOR è attivato in corso di celiachia attiva e suggeriscono un ruolo per questa chinasi nel sostenere la risposta infiammatoria in tale patologia.

Bibliografia

1. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. "Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease". *Gastroenterology*. 2000 Oct;119(4):996-1006.
2. Nilsen EM1, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. "Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma". *Gut*. 1995 Dec;37(6):766-76.
3. Ivan Monteleone, Massimiliano Sarra, Giovanna Del Vecchio Blanco, Omero Alessandro Paoluzi, Eleonora Franzè, Daniele Fina, Alessia Fabrizi, Thomas T. MacDonald, Francesco Pallone and Giovanni Monteleone. "Characterization of IL17A-Producing Cells in Celiac Disease Mucosa". *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):2211-8. doi: 10.4049/jimmunol.0901919.
4. Bodd M1, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, Sollid LM. "HLADQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22". *Mucosal Immunol*. 2010 Nov;3(6):594-601. doi: 10.1038/mi.2010.36. Epub 2010 Jun 23
5. E. Dazert, MN Hall. "mTOR signaling in disease". *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Dec;23(6):744-55. doi: 10.1016/j.ceb.2011.09.003. Epub 2011 Sep 29.

Celiachia e Vitamina D

Carolina Ciacci, Centro Celiachia ed intolleranze alimentari Università di Salerno

La celiachia (CeD) si associa a ridotta massa ossea (BMD). Le Linee Guida raccomandano valutazione metabolismo dell'osso alla diagnosi e follow-up. Recentemente è possibile dosare anche la forma attiva della Vitamina D (1,25OHVitD). Recenti studi però indicano che i livelli di 25OHVitD, sia pure bassi alla diagnosi, si correggono senza supplementazione con la GFD. Inoltre quando si è dosata la forma attiva, la 1,25OHVitD, i suoi valori sono risultati aumentati a dieta libera. Scopo dello studio è stato valutare dieta e stile di vita, i livelli medi delle vitamine D nel siero di celiaci pre- e post dieta senza glutine (GFD), livelli sierici dei minerali, del PTH, la densità ossea(BMD) misurata con la pQCT. In vitro abbiamo valutato l'effetto del contatto della vitD sulla mucosa duodenale da biopsie endoscopiche di pazienti celiaci in un modello di infiammazione in vitro (gliadin challenge)

Risultati. Abbiamo arruolato 111 CeD, 39 alla diagnosi e 72 al follow-up. Circa il 60% dei celiaci avevano valori di BMD inferiori ai controlli e il 15% alla diagnosi avevano osteoporosi. La GFD non ha migliorato la BMD. La valutazione dietetica ha evidenziato che squilibri alimentari non sembrano giocare un ruolo determinante nella densità ossea, visto che il consumo di latte e derivati nei celiaci è paragonabile alla popolazione di controllo. I livelli di 5-OHVitD erano simili sia alla diagnosi che al follow-up (19.36 ± 8.7 and 21.60 ± 8.9 , $p=ns$) mentre i livelli della 1,25-OHVitD sono risultati più alti alla diagnosi che non al follow-up (61.63 ± 20.69 54.91 ± 13.60 , $p = 0,07$). I livelli di calcio, fosforo, e di albumina erano nella norma sia pre che post GFD. Invece, i valori di iPTH (normale range 10-60 pg/ml) erano più elevati alla diagnosi che non a GFD ($73,1 \pm 2,0$ vs $56,3 \pm 4,1$ $p= 0,015$).

Studio In vitro. Abbiamo potuto testare gli effetti delle due forme di VitD in 62 pazienti. Di questi però 6 non erano valutati per problemi tecnici (contaminazione, temperatura troppo alta nella piastra di cultura, biopsie troppo piccole e sfrangiate). Nei rimanenti 56 casi abbiamo evidenziato un effetto biologico inatteso di entrambe le forme di VitD. Infatti, nel nostro modello, il contatto di VitD sulla mucosa ha avuto un effetto pro infiammatorio, causando l'aumentata espressione sia dei marcatori immunoistochimici che dello stress ossidativo.

In conclusione, i nostri risultati supportano l'ipotesi che la ridotta massa ossea nei celiaci non sia tanto dovuta al ridotto intake di calcio o al suo malassorbimento quanto piuttosto all'infiammazione e alla perdita di proteine calcium binding dovuta alla perdita della massa enterocitaria per il danno mucosale indotto dal glutine. Questa ridotta capacità calcio-legante potrebbe alterare la risposta alla 1,25OHVitD, contribuendo a potenziare la perdita di calcio e inducendo iperparatiroidismo secondario. Il dato della azione proinfiammatoria delle due vitamine al contatto della mucosa, invece, richiede cautela nella sua interpretazione ed è necessario un approfondimento con tecniche sperimentali differenti.

EFFETTO DEI LONG NON-CODING RNA SULLO SVILUPPO DELLA MALATTIA CELIACA

Donatella Cielo, Luigi Greco

Dipartimento di scienze mediche traslazionali, Università degli studi di Napoli Federico II

Background. Gli studi di associazione genetica hanno identificato 112 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) associati alla malattia celiaca (MC) di cui il 90% si trova in regioni non codificanti, suggerendo che la maggior parte di essi ha un ruolo potenzialmente regolatorio¹. Nel corso degli ultimi anni, è stato scoperto che gli RNA non codificanti (ncRNAs), definiti come piccole molecole di RNA che sono trascritte ma non tradotte in proteine, rappresentano la maggior parte dei trascritti umani. Inoltre, è anche noto che essi sono fortemente coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica che quindi non è controllata solo da fattori di trascrizione. Gli RNA non codificanti che influenzano i processi epigenetici possono essere raggruppati in "short ncRNAs" e "longncRNAs", questi ultimi sono oggetto del nostro lavoro. Nella prima parte di questo studio triennale l'obiettivo è quello di valutare l'effetto e la localizzazione di 7 SNPs presenti nella sequenza di 7 lncRNA associati alla MC che ne influenzano la loro funzionalità, in cellule intestinali epiteliali e non epiteliali e successivamente in sezioni fissate in formalina (FFPE) di biopsie intestinali di pazienti celiaci e controlli.

Metodologia. Abbiamo selezionato 7 SNPs associati alla MC che sono cis eQTL^{2,3,4}, cioè influenzano l'espressione delle regioni geniche in cui sono situati, localizzati all'interno di regioni codificanti lncRNA. Sono state reclutate le biopsie intestinali di 17 pazienti celiaci e 19 pazienti controllo. Su di esse sono stati condotti esperimenti di espressione dei lncRNA mediante RT-PCR. Successivamente per quelli risultati essere deregolati dall'analisi di espressione genica, abbiamo osservato la specifica localizzazione in sezioni fissate in formalina (FFPE) in una determinata popolazione cellulare, mediante RNAScope, che è una tecnica innovativa che combina ibridazione in situ (ISH) e immunisto chimica (IHC).

Risultati. Mediante immuno-sorting con MicroBeads CD326 (EpCAM), abbiamo isolato dalle biopsie intestinali le cellule epiteliali e quelle della lamina propria, da cui abbiamo poi analizzato l'espressione dei lncRNA e dei geni da essi regolati mediante Real Time PCR al fine di evidenziare eventuali differenze tra CD e CTR. 5 dei lncRNA non sono risultati essere espressi a livello intestinale, mentre il lncRNA AL139246 ha mostrato livelli di espressione simili in entrambi i compartimenti, e senza differenze tra CD e CTR. Molto interessanti invece, i dati ottenuti per LINC01882, associato al locus PTPN2⁵, che abbiamo visto essere un trascritto prevalentemente della lamina propria e che ha mostrato una maggiore espressione nei celiaci. Alla luce dei risultati ottenuti, abbiamo concentrato l'attenzione su

LINC1882, e avviato gli esperimenti di ISH per visualizzarne la specifica localizzazione e l'espressione direttamente *in situ* e metterla in relazione con i risultati ottenuti dagli esperimenti di Real-Time PCR. Inoltre ad oggi, sugli stessi campioni sono in corso ulteriori esperimenti di 'gene expression' del gene PTPN2 poiché è interessante andare ad osservare in che modo esso viene regolato da LINC1882.

Bibliografia

1. Dubois PC, Trynka G, Franke L, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. Nat Genet 2010;42:295-302
2. Ricano-Ponce, C. Wijmenga. Mapping of immune-mediated disease genes. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 2013 (14): 325-353
3. Fairfax BP1, Humburg P, Makino S, Naranbhai V et al. Innate immune activity conditions the effect of regulatory variants upon monocyte gene expression. Science 2014; 343, doi: 10.1126/science.1246949
4. Lee MN1, Ye C, Villani AC, Raj T, et al. Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells. Science 2014; 343, 1246980
5. Houtman M, Shchetynsky K, Chemin K, et al T cells are influenced by a long non-coding RNA in the autoimmune associated PTPN2 locus. J Autoimmun. 2018 Jun;90:28-38.

Ruolo del recettore CB2 nella patogenesi della malattia celiaca e nella perdita di massa ossea ad essa associata

Chiara Tortora, Francesca Rossi

Dipartimento della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica, Università della Campania "Luigi Vanvitelli" Napoli

Background e dati preliminari. La riduzione della densità minerale ossea e l'osteoporosi (OP) rappresentano frequenti complicanze della malattia celiaca (MC). L'eziologia dell'OP nella MC è multifattoriale e correlata sia al malassorbimento dei micronutrienti essenziali per la mineralizzazione ossea sia all'azione di citochine pro-infiammatorie che stimolano l'osteoclastogenesi. La dieta priva di glutine, attualmente unico trattamento efficace per la MC, non è sempre sufficiente per ripristinare la massa ossea. Abbiamo precedentemente dimostrato un'associazione significativa tra la MC e la variante Q63R del recettore Cannabinoide di tipo 2 (CB2), suggerendolo come possibile marcatore per la diagnosi della MC. Inoltre, il CB2 è coinvolto nella differenziazione, sopravvivenza e attività delle cellule ossee e la sua stimolazione è in grado di ridurre l'iperattività osteoclastica associata a diverse patologie. Sulla base di queste conoscenze, per evidenziare un suo possibile ruolo nella perdita di massa ossea associata alla MC, abbiamo analizzato l'espressione del recettore CB2 in osteoclasti (OCs) di pazienti celiaci e valutato gli effetti della sua modulazione farmacologica sull'attività osteoclastica.

Metodologia. Dopo l'approvazione del Comitato Etico sono stati arruolati sei bambini con MC alla diagnosi e sei donatori sani di pari età e sesso. Gli OCs sono stati ottenuti dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) dei soggetti arruolati dopo consenso informato. Al fine di ottenere gli OCs, le PBMC sono state coltivate per 21 giorni in presenza di 25 ng/mL del fattore stimolante le colonie macrofagiche (rh-MCSF) e di 50 ng/mL del fattore nucleare kappa- χ ligando (RANK-L). Gli OCs maturi sono stati identificati come cellule multinucleate (3 o più nuclei) positive alla fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP). Mediante Real Time PCR e Western Blot è stata valutata l'espressione di CB2 e dei marcatori di attività osteoclastica, TRAP e Catepsina K, prima e dopo trattamento con l'agonista selettivo di CB2, JWH-133 [100nM], e l'agonista inverso AM630 [10 μ M]. Allo scopo di valutare l'attività osteoclastica sono stati inoltre effettuati il saggio TRAP e il saggio di riassorbimento osseo, prima e dopo trattamento.

Risultati. Come atteso, l'espressione genica e proteica di TRAP e Catepsina K è significativamente più alta negli OCs ottenuti da pazienti con MC. In accordo, come dimostrato mediante saggio colorimetrico TRAP e saggio di riassorbimento osseo gli OCs dei pazienti con MC si presentano più numerosi, grandi ed attivi. Sorprendentemente, l'espressione del recettore CB2 è risultata più bassa negli OCs dei pazienti con MC rispetto ai donatori sani. Considerando che il recettore è implicato nella modulazione del riassorbimento osseo inibendo formazione e attività degli OCs, questo risultato suggerisce il potenziale ruolo del recettore nella patogenesi della perdita di massa ossea associata alla MC. A sostegno di questi dati, l'agonista CB2, JWH-133 [100nM], riduce l'attività degli OCs dei pazienti con MC e contrasta il riassorbimento osseo. Al contrario, l'inibizione del recettore con l'agonista inverso AM630 [10 μ M], sembra esacerbare l'iper-attività osteoclastica. In conclusione, il recettore CB2 potrebbe essere un *marker* predittivo utile per selezionare alla diagnosi i pazienti con MC a rischio di alterazioni patologiche dell'osso, migliorandone la qualità di vita.

Bibliografia

1. Webster J, Vajravelu ME, Choi C, Zemel B, Verma R. Prevalence of and Risk Factors for Low Bone Mineral Density in Children With Celiac Disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019 Jul;17(8):1509-1514.
2. Volkan B, Fettah A, χ lek A, Kara SS, Kurt N, χ ayır A. Bone mineral density and vitamin K status in children with celiac disease: Is there a relation? Turk J Gastroenterol. 2018 Mar;29(2):215-220.
3. Rossi F, Bellini G, Tolone C, Luongo L, Mancusi S, Papparella A, Sturgeon C, Fasano A, Nobili B, Perrone L, Maione S, del Giudice EM. The cannabinoid receptor type 2 Q63R variant increases the risk of celiac disease: implication for a novel molecular biomarker and future therapeutic intervention. Pharmacol Res. 2012 Jul;66(1):88-94.
4. Rossi F*, Tortora C*, Punzo F, Bellini G, Argenziano M, Di Paola A, Torella M, Perrotta S. The Endocannabinoid/Endovanilloid System in Bone: From Osteoporosis to Osteosarcoma. Int J Mol Sci. 2019 Apr 18;20(8).
5. Strisciuglio C, Bellini G, Miele E, Martinelli M, Cenni S, Tortora C, Tolone C, Miraglia Del Giudice E, Rossi F. Cannabinoid Receptor 2 Functional Variant Contributes to the Risk for Pediatric Inflammatory Bowel Disease. J Clin Gastroenterol. 2018 May/ Jun;52(5):e37-e43

Immuno-Laser capture microdissection per lo studio della funzione immunoregolatoria dei linfociti $\gamma\delta$ + IEL nella malattia celiaca

Vera Rotondi Aufiero, Istituto di Scienze dell'Alimentazione ISA-CNR

Background e dati preliminari. Un aumento dei linfociti intraepiteliali (IEL) $\gamma\delta$ + è uno dei segni distintivi della malattia celiaca (MC). Il ruolo di queste cellule nella patogenesi della MC non è stato ancora stabilito, ma ci sono molte prove che suggeriscono che la loro funzione regolatoria sia abbinata alla produzione di citochine antinfiammatorie¹⁻².

Diversi approcci utilizzati per studiare il pattern di citochine rilasciate dai linfociti intraepiteliali nella MC, hanno portato a risultati contraddittori.

La maggior parte dei dati è stata ottenuta analizzando l'espressione dell'mRNA, utilizzando tecniche che non riescono a isolare popolazioni cellulari altamente pure. Negli ultimi anni lo sviluppo della microdissezione di acquisizione laser (LCM) combinata con la PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) ha permesso di raggiungere questo obiettivo.

Nonostante alcuni protocolli di immuno-LCM, per identificare e isolare specifiche popolazioni cellulari siano stati proposti per contrastare la degradazione dell'RNA³, tale evento è inevitabile attraverso le procedure di immunocolorezione⁴.

Lo scopo di questo lavoro è quello di fornire il miglior protocollo utile per isolare e identificare $\gamma\delta$ + IEL e ottenere quantità sufficienti di RNA di alta qualità per l'analisi dell'espressione genica delle citochine.

Metodi. Sezioni criostatiche di 7 μ m da biopsie intestinali di pazienti con MC attiva sono processate utilizzando due protocolli quali il protocollo classico di immuno-LCM e l'utilizzo della LCM associata a IHC su sezioni di tessuto seriali⁵.

Nel primo caso le sezioni criostatiche sono state raccolte su vetrini con membrana RNase-free, processate con un protocollo di IHC per distinguere $\gamma\delta$ + IEL modificato, per abbreviare i tempi di incubazione a 15 minuti, e quindi sottoposte a LCM. Inibitori di RNase, acqua trattata con DEPC ghiacciata e PBS RNase-free, sono stati usati per prevenire la degradazione dell'RNA.

Riguardo il protocollo di LCM combinato con IHC su sezioni di tessuto seriale, le sezioni criostatiche sono state raccolte su un normale vetrino e sottoposte al protocollo classico di IHC, per l'identificazione di $\gamma\delta$ + IEL, mentre la sezione adiacente / seriale è stata raccolta su un vetrino con membrana RNase-free ed utilizzata per la LCM. Tali coppie di sezioni adiacenti in serie sono state accuratamente confrontate per l'identificazione di $\gamma\delta$ + IEL da microSD errare.

L'RNA totale ottenuto con entrambi i metodi, è stato successivamente estratto, retroscritto e analizzato mediante saggi RT-qPCR.

Risultati. Utilizzando il protocollo di immuno-LCM, la stabilità dell'RNA viene notevolmente ridotta a causa dell'attivazione delle RNasi del tessuto endogeno e tale attivazione è particolarmente legata all'utilizzo delle soluzioni acquose durante il protocollo di IHC.

Al contrario, la LCM combinata con IHC su sezioni di tessuto seriale, ci consente di isolare $\gamma\delta$ + IEL e allo stesso tempo, prevenire la degradazione dell'RNA, ottenendo RNA di alta qualità.

Tutte queste caratteristiche ci consentiranno di studiare l'espressione delle citochine prodotte da $\gamma\delta$ + IEL nella MC e di definire il loro ruolo nella risposta immunitaria nella mucosa dei pazienti celiaci.

Bibliografia

1. Hayday A., Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. Nat. Rev. Immunol. 2003;3:233-242. [PubMed]
2. Chen Y., Chou K., Fuchs E., Havran W.L., Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002;99:14338-14343. [PMC free article] [PubMed]
3. Mojsilovic-Petrovic J, Nestic M, Pen A, Zhang W, Stanimirovic D. Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. J Neurosci Methods. 2004 Feb 15;133(1-2):39-48.
4. Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. J Clin Pathol. 2000 Sep;53(9):666-72. Review. PMID: 11041055
5. Masahiko Kase, Takeshi Houtani, Satoru Sakuma, Toshiyuki Tsutsumi, Tetsuo Sugimoto. Laser microdissection combined with immunohistochemistry on serial thin tissue sections: a method allowing efficient mRNA analysis. Histochemistry and Cell Biology. February 2007, Volume 127, Issue 2, pp 215-219

Profili di espressione di microRNA in plasma e feci di soggetti affetti da celiachia mediante Next-Generation-Sequencing

Antonio Francavilla, Paolo Vineis, Italian Institute for Genomic Medicine (IIGM), Torino

Background e dati preliminari. La malattia celiachia si verifica in circa l'1% della popolazione mondiale, sebbene la maggior parte delle persone colpite ne rimanga ignara nel corso della vita (1). Nuovi biomarcatori potrebbero essere utili nella diagnosi e nel monitoraggio della Celiachia. A questo proposito, i marcatori molecolari basati su nuove specie di RNA non codificante (ncRNA) rilevabili in tessuto surrogato o la composizione del microbioma possono rappresentare un interessante campo di ricerca. I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante lunghe ~22 nucleotidi con un'espressione alterata in molte malattie gastrointestinali e quindi interessanti da studiare come potenziali biomarcatori. Nonostante più di un decennio di studi sulle alterazioni dei miRNA, pochi di questi hanno esplorato la loro espressione in relazione alla Celiachia e principalmente mediante array e RT-qPCR. Nei campioni di tessuto duodenale e di sangue di pazienti con CD alcuni miRNA, tra cui mir-192-5p, miR-31-5p e miR-338-3p, sono stati trovati meno espressi in pazienti celiaci pediatrici e adulti rispetto ai controlli sani (2,3). Ad oggi, non ci sono studi che hanno analizzato i profili di miRNA e microbioma nei campioni di feci / plasma mediante Next Generation Sequencing (NGS) confrontando l'effetto della dieta priva di glutine (GFD) in soggetti celiaci vs soggetti sani e in nuovi pazienti celiaci prima e dopo un anno di GFD.

Metodi. In collaborazione con il dipartimento gastroenterologico di 2 ospedali di Torino e con l'uso di un volantino (approvato da AIC / FC, che spiega gli obiettivi e gli scopi dello studio, distribuito in tutta la città di Torino in farmacie, bar e ristoranti frequentati da soggetti celiaci), sono stati reclutati 48 soggetti (24 pazienti celiaci in GFD e 24 controlli sani) e ne sono stati raccolti i campioni di feci e plasma. Ogni soggetto ha firmato un consenso informato per lo studio e ha compilato questionari sulla dieta e stile di vita.

Tutti i campioni biologici sono stati conservati a -80° C fino all'estrazione dell'RNA. L'estrazione dell'RNA fecale è stata eseguita mediante Stool Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp). L'RNA dagli esosomi plasmatici è stato isolato usando il kit miRNeasy plasma/siero mediante l'estrattore QiaCube (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi). Per eseguire le analisi metagenomiche, l'isolamento del DNA dai campioni di feci è stato eseguito utilizzando il QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Paesi Bassi).

Le librerie sono state preparate utilizzando il set di preparazione NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set per Illumina. Frammenti di 135-160 bp vengono utilizzati

per le analisi di small RNA-Seq sulla piattaforma Illumina HiSeq4000. Una lane in 24 plex produce circa 4 milioni di letture singole per campione, lunghe 50 nt. Il workflow e la pipeline bioinformatica per l'analisi dei dati di sequenziamento, sono stati sviluppati dal mio gruppo di ricerca (4).

Risultati. Dall'isolamento dell'RNA e del DNA delle feci sono stati ottenuti buoni risultati in termini di qualità e quantità. Sono state preparate le librerie per il sequenziamento di small RNA per 45 campioni, di cui 21 celiaci in GFD e 21 soggetti sani di uguale sesso/età (14 donne e 7 uomini in ciascun gruppo, età media \pm sd 39,3 \pm 12,64). Sono stati anche inclusi due campioni di un paziente celiaco con recente diagnosi (uno alla diagnosi e l'altro dopo 3 mesi di GFD). Le librerie sono state sequenziate e il controllo di qualità ha portato risultati positivi. Al momento, sono in corso le analisi bioinformatiche per evidenziare i miRNA espressi in modo differenziato.

Referenze

(1) Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. Benjamin Lebwohl, Jonas F Ludvigsson, Peter HR Green *BMJ* 2015;351:h4347 doi: 10.1136/bmj.h4347

(2) miRNAs affect the expression of innate and adaptive immunity proteins in Celiac Disease. Serena Magni, Gaia Buoli Comani, Luca Elli, Samanta Vanessi, Elisa Ballarini, Gabriella Nicolini, Michela Rusconi, Mirco Castoldi, Raffaella Meneveri, Martina U. Muckenthaler, Maria Teresa Bardella and Donatella Barisani *Am J Gastroenterol* 2014; 109:1662-1674; doi: 10.1038/ajg.2014.203

(3) miRNA-regulated gene expression differs in celiac disease patients according to the age of presentation. Gaia Buoli Comani, Roberto Panceri, Marco Dinelli, Andrea Biondi, Clara Mancuso, Raffaella Meneveri. Donatella Barisani. *Genes Nutr* (2015), doi 10.1007/s12263-015-0482-2

(4) Small non-coding RNA profiling in human biofluids and surrogate tissues from healthy individuals: description of the diverse and most represented species. Giulio Ferrero, Francesca Cordero, Sonia Tarallo, Maddalena Arigoni, Federica Riccardo, Gaetano Gallo, Guglielmo Ronco, Marco Allasia, Neha Kulkarni, Giuseppe Matullo, Paolo Vineis, Raffaele A. Calogero, Barbara Pardini and Alessio Naccarati. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 3), pp: 3097-3111

