

---

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

# Exploration of the epigenetic mechanisms with a role in the long-term proinflammatory effects of hyperuricemia

---

PhD student      **Oana Medeea Badii**

---

PhD supervisors    Prof.dr. **Leonardus AB Joosten**  
                                 Prof.dr. **Mihai G Netea (joint PhD)**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Table of Contents

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>STATE OF THE ART</b>	
1. Understanding the causes of gout	17
2. Hyperuricemia to gout	19
3. Innate immune memory; Implications for soluble urate and monosodium urate crystals	29
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
1. Working hypothesis/Objectives	37
2. General methodology	39
3. Study nr 1 - Urate-induced inflammatory reprogramming and DNA methylation	45
4. Study nr 2 - Regulation of SOCS3-STAT3 in urate-induced cytokine production in human myeloid cells	63
5. Study nr 3 - Downregulation of type 1 interferon signaling pathway by hyperuricemia	77
6. General conclusions (summary)	107
7. Originality of the thesis	109
<b>REFERENCES</b>	111
<b>ANEXES</b>	123

**Keywords:** Hyperuricemia, Soluble urate, Cytokines, Epigenetics, Gout, Inflammation, IL-1, SOCS3, STAT3, Type I interferons.

## SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

### State of the Art

Uric acid is the end product that results from the metabolic breakdown of purines in the liver. In the bloodstream, at physiological pH, uric acid is present in its ionized form as urate <sup>1</sup>. Hyperuricemia arises from elevated concentrations of serum urate and is recognized for its involvement in the onset of gout, but also its contribution to cardiovascular and metabolic diseases. Hyperuricemia can develop from either overproduction or underexcretion and is typically asymptomatic <sup>2</sup>. Humans and higher primates have lost the function of the enzyme uricase which metabolizes urate to allantoin, a water-soluble compound that is easier to excrete <sup>3</sup>. After surpassing the solubility threshold, urate can precipitate and form monosodium urate (MSU) crystals in joints and surrounding tissues. In gout, MSU crystals can lead to acute flares, and if not properly managed, can even accumulate in formations called tophi. The acute flares are initiated by the activation of the NLRP3 inflammasome and subsequent release of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) <sup>4</sup>. Gout is one of the oldest described rheumatic diseases and affects approximately 1% of the world's population, reaching up to 2.5-3.9% prevalence in developed countries <sup>5</sup>. Gout is often accompanied by other health issues like cardiovascular, metabolic syndrome, and kidney disease <sup>6</sup>.

High concentrations of urate, whether soluble or crystallized, play an important role in the initiation of pro-inflammatory states <sup>7</sup>. While soluble urate has been acknowledged for its antioxidant properties in the past, more recently, it has been demonstrated that urate exhibits pro-oxidant and proinflammatory characteristics <sup>8</sup>. Recent findings indicate that soluble urate can prime human monocytes *in vitro*, resulting in heightened immune responses when faced with a second challenge <sup>9</sup>. A growing number of studies underline the capacity of the innate immune system to establish immune memory (termed "trained immunity") to protect against infections. This phenomenon could be explained by the epigenetic and metabolic changes that the

cells of the innate immune cells experience as they develop and adapt to respond to immunological triggers <sup>10</sup>. However, there is still much to learn about the functions of urate in the serum and how it contributes to inflammatory processes within the body.

This thesis aims to explore if elevated concentrations of soluble urate (hyperuricemia) can induce epigenetic and transcriptional reprogramming within innate immune cells and investigate potential mechanisms underlying the hyperinflammatory state characterized by the shift in cytokine production (increased IL-1 $\beta$  and reduced IL-1Ra).

Within the scope of this thesis, our focus has been directed toward exploring inflammation associated with hyperuricemia and gout.

The specific aims are outlined as follows:

- ✚ To evaluate the epigenetic changes associated with increased immune responsiveness triggered by soluble urate.
- ✚ To characterize the urate priming profile in patients with hyperuricemia and gout. To investigate the role of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in inflammation induced by urate, as identified having differentially methylated regions in the previous study.
- ✚ To investigate the role of the type 1 interferon in urate-induced inflammation and the modulation of type 1 interferon pathway as possible mechanism for the observed urate-priming phenotype.

## **Methodologies used**

### **Participants**

The study participants in Cluj-Napoca, Romania, were recruited on the base of the HINT Project - Hyperuricemia-induced Inflammation: Targeting the central role of uric acid in rheumatic and cardiovascular diseases, ID P 37 762; MySMIS 103587). All participants gave written informed consent before inclusion. Peripheral blood was drawn from the cubital vein on EDTA tubes under sterile conditions. The current study was approved by the Ethical Committee of the „Iuliu Hațieganu” University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca (approval no. 425/2016).

### **Cell stimulations and other analysis.**

- The urate-priming procedure typically involves a 24h pre-treatment with urate, followed by an additional 24h stimulation with pattern receptor agonists (e.g. LPS) to facilitate robust changes in cytokine responses. These experiments are carried out in the presence of 10% pooled human serum. There is no production of IL-1 $\beta$  and IL-6 after the 24h urate treatment alone (often referred to as « priming »), however, there is a notable basal decrease of IL-1Ra, which persists even after restimulation. This suggests a silent effect of urate pre-exposure, that primes the cells for an increased proinflammatory response to later stimulations <sup>9</sup>. Another 24h in vitro experiments involved direct stimulation of PBMCs with Poly: IC, CpG and heat-killed *C. albicans* without serum supplementation. Several in vitro experiments were performed at RadboudUMC, Nijmegen, The Netherlands, using healthy volunteers of Dutch nationality from the 200 Functional Genomics (200FG) cohort in the Human Functional Genomics Project (<http://www.humanfunctionalgenomics.org>).
- The supernatants from the in vitro experiments were used for cytokine measurements with ELISA.
- Intracellular expression of phosphorylated proteins was measured using flow cytometry and was performed at RadboudUMC, Nijmegen, The Netherlands.
- DNA was isolated from stimulated/non-stimulated cells for DNA methylation analysis. DNA methylation of urate treated human monocytes used samples from healthy volunteers in Cluj-Napoca, Romania. DNA methylation analysis from non-stimulated cells of patients of New Zealand Māori ancestry was approved by the New Zealand Lower South Health and Disability Ethics Committee (MEC/05/10/130).
- RNA was isolated from stimulated PBMCs for RNA-Sequencing analysis using the DNBseq technology.

## **Personal contribution**

### **Study nr 1 – Title: Urate-induced inflammatory reprogramming and DNA methylation**

In the **first study**, we investigate the impact of urate exposure on the production of proinflammatory cytokines in human cells at the epigenetic level. As described previously, we confirm that in vitro urate-priming of the immune cells results in a shift in cytokine production, characterized by increased production of pro-inflammatory IL-1 $\beta$  and decreased production of anti-inflammatory IL-1Ra<sup>11</sup>. Our current findings show that these effects persist even after removing urate and allowing the cells to rest. We hypothesized that urate priming induces innate immune memory, and we investigated whether urate treatment can trigger epigenetic reprogramming in myeloid cells. Based on previous evidence linking metabolic stimuli to epigenetic changes<sup>12</sup>, we assessed DNA methylation status in 76 New Zealand Māori individuals with varying levels of serum urate. Our findings suggest that mechanisms of epigenetic regulation may be associated with urate exposure, providing potential new targets for further investigation into gout and urate-induced inflammation.

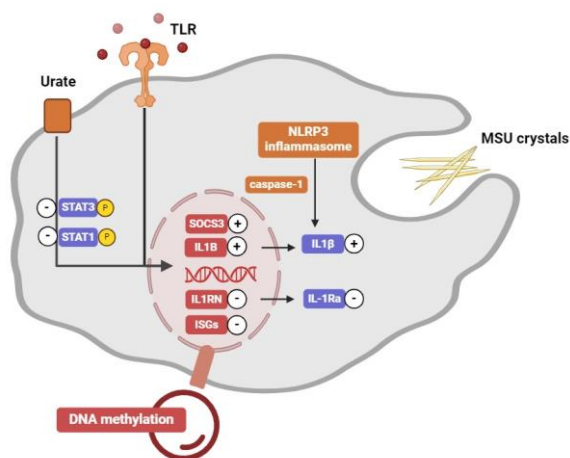
### **Study nr 2 – Title: Regulation of SOCS3-STAT3 in urate-induced cytokine production in human myeloid cells**

To further investigate the mechanisms associated with urate-induced inflammation in vitro, the **second study** employs an immunological, transcriptomic, and epigenetic approach to investigate the role of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in urate-induced inflammation, using both healthy donors and patients. It has previously been shown in vitro that urate priming facilitates IL-1 $\beta$  production in peripheral blood mononuclear cells and that a mechanism for the amplification of IL-1 $\beta$  consists in the down-regulation of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In the present study, we extend these findings to individuals with hyperuricemia and patients with gout. We further show that in vitro urate priming would result in higher levels of SOCS3 due to the suppression of phosphorylated STAT3, accompanied by a reduction in IL-1Ra cytokine production. The observed shift in elevated SOCS3 and reduced

pSTAT3 could play a role in urate-induced hyperinflammation since urate priming had no effect on PBMCs from patients with constitutively activated STAT3.

### Study nr 3 – Title: Downregulation of type 1 interferon signaling pathway by hyperuricemia

In the **third study**, we assess the modulation of the type 1 interferon (IFN1) pathway by urate priming in human myeloid cells. To this end, we analyze the type I interferon-related genes in the transcriptome of human primary cells in response to soluble urate in vitro and in correlation to serum urate levels in patients. We find that urate priming downregulates genes in the type 1 interferon-related pathways in both human monocytes and PBMCs. However, stimulation of PBMCs with INF- $\beta$  does not rescue the pro-inflammatory effects of urate. Interestingly, we observed an inverse correlation between serum urate levels in vivo and in vitro stimulations. These findings suggest that downregulation of IFN1 is most likely not the driving mechanism behind urate priming, but nevertheless, these results support a deficient IFN1 signaling, which could potentially lead to an increased vulnerability to viral infections in patients with hyperuricemia.



**Figure 1. Schematic representation of data described in the thesis. IL1B/IL-1 $\beta$**  – Interleukin 1 beta, **IL1RN/IL-1Ra** – Interleukin-1 receptor antagonist, **ISGs** – Interferon stimulated genes, **MSU** – monosodium urate, **P** – Phosphate, **SOCS3** – Suppressor Of Cytokine Signaling 3, **STAT1** – Signal transducer and activator of transcription 1, **STAT3** – Signal transducer and activator of transcription 3, **TLR** – Toll-Like Receptor.

## Originality of the thesis

This thesis presents a novel and comprehensive approach to understanding the mechanisms and effects of urate exposure in vitro treated myeloid cells and in patients with hyperuricemia and gout. It includes multiple layers of analysis, such as DNA methylation, cytokine production, and transcriptomic data, adding to the existing research on urate priming.

Building upon previous studies, this thesis extends the understanding of urate priming and further shows a persistence of urate's effects after an initial exposure and its capacity to induce immune innate memory. It was previously demonstrated that urate priming results in a shift in cytokine production, with increased proinflammatory and decreased anti-inflammatory cytokine production, and this process is mediated by mechanisms involving the AKT and PRAS40 phosphorylation and mTOR activation. We were able to further extend the effects of urate priming in samples from hyperuricemic and gout patients and show that this was accompanied by an increased SOCS3 expression and downregulated STAT3 phosphorylation. We observed the effect of soluble urate on many biological pathways, including the downregulation of type 1 interferons and STAT1 phosphorylation. Moreover, STAT3 is known for the induction of SOCS3 but also for the regulation of type 1 interferon activity under certain conditions. These findings underscore a pro-inflammatory effect of soluble urate, extending its significance beyond gout disease, and emphasize the necessity for further research involving larger sample sizes and exploration of different time-points in vitro.

## References:

1. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol.* 2016;213:8–14. A
2. Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(2):186–91.
3. Kratzer JT, Lanaspas MA, Murphy MN, Cicerchi C, Graves CL, Tipton PA, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(10):3763–8.
4. Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, Khanna PP, Matsuo H, Perez-Ruiz F, et al. Gout. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1).
5. Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general



- population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3136-41.
6. Singh JA, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 2020;50(3):S11-6.
  7. Crisan TO, Netea MG, Joosten LAB. Innate immune memory: Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *Eur J Immunol.* 2016;46(4):817-28.
  8. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. In: *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2008.
  9. Crişan TO, Cleophas MCP, Oosting M, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, Netea MG, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(4):755-62.
  10. Netea MG, van der Meer JWM. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe.* 2017;21(3):297-300.
  11. Crişan TO, Cleophas MCP, Novakovic B, Erler K, van de Veerdonk FL, Stunnenberg HG, et al. Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT-PRAS40 autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(21):5485-90.
  12. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016; 352(6284):aaf1098.

---

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

# Explorarea mecanismelor epigenetice cu rol în efectele proinflamatorii, pe termen lung, în hiperuricemie

---

Doctorand

**Oana Medeea Badii**

---

Conducători de doctorat Prof.dr. **Leonardus AB Joosten**  
Prof.dr. **Mihai G Netea (joint PhD)**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# Cuprins

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
1. Înțelegerea cauzelor gutei	17
2. De la hiperuricemie la gută	19
3. Memoria imunologică înăscută ; Implicații ale uratului solubil și ale cristalelor de urat monosodic	29
<b>CONTRIBUȚIE PERSONALĂ</b>	
1. Ipoteză de lucru și obiective generale	37
2. Metodologia generală a cercetării	39
3. Studiul 1 - Reprogramarea inflamatorie indusă de urat și metilarea ADN-ului	45
4. Studiul 2 - Reglarea căii SOCS3-STAT3 în producția de citokine indusă de urat în celulele mieloide umane	63
5. Studiul 3 - Subexpresia căii de semnalizare a interferonului de tip 1 sub acțiunea hiperuricemiei	77
6. Concluzii generale (rezumat)	107
7. Originalitatea tezei	109
<b>REFERINȚE</b>	111
<b>ANEXE</b>	123

Cuvinte cheie: Hiperuricemie, Urat solubil, Citokine, Epigenetică, Gută, Inflamație, IL-1, SOCS3, STAT3, Interferon de tip I.

# REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

## Stadiul actual al cunoașterii

Acidul uric este produsul final ce rezultă în urma metabolismului purinelor în ficat. În plasmă, la pH fiziologic, acidul uric este prezent sub forma sa ionizată, denumită urat <sup>1</sup>. Hiperuricemia rezultă ca și consecință a concentrației crescute de urat seric și este recunoscută pentru implicația sa în apariția gutei, dar și pentru rolul său în bolile cardiovasculare și metabolice. Hiperuricemia poate apărea fie din supraproducție, fie din subexcreție de acid uric și este de obicei asimptomatică <sup>2</sup>. Oamenii și primatele superioare și-au pierdut funcția enzimei uricază care metabolizează acidul uric în allantoină, un compus solubil în apă care este mai ușor de excretat <sup>3</sup>. După ce depășește pragul de solubilitate, uratul poate precipita și forma cristale de urat monosodic (MSU) în articulații și țesuturile înconjurătoare. Cristalele de MSU pot duce la atacuri de gută acută și, dacă nu sunt gestionate corespunzător, se pot acumula în formațiuni numite tofi. Atacul de gută este inițiat de activarea inflamazomului NLRP3 și eliberarea ulterioară a interleukinei-1 beta (IL-1 $\beta$ ) <sup>4</sup>. Guta este una dintre cele mai vechi boli reumatice descrise și afectează aproximativ 1% din populația lumii, atingând o prevalență de până la 2.5-3.9% în țările dezvoltate <sup>5</sup>. Guta este adesea însoțită de alte comorbidități, cum ar fi boli cardiovasculare, sindromul metabolic și bolile de rinichi <sup>6</sup>.

Concentrațiile crescute de urat, fie solubile sau cristalizate, joacă un rol important în inițierea proceselor proinflamatorii <sup>7</sup>. În timp ce uratul solubil a fost recunoscut în trecut pentru proprietățile sale antioxidante, mai recent, s-a demonstrat că acesta prezintă caracteristici pro-oxidante și proinflamatorii <sup>8</sup>. Descoperiri recente indică faptul că uratul solubil poate amorsa monocitele umane in vitro, ceea ce duce la răspunsuri imune crescute atunci când sunt confruntate cu o provocare imunologică ulterioară <sup>9</sup>. Un număr tot mai mare de studii subliniază capacitatea sistemului imunitar înăscut de a stabili memorie imunologică (numită „imunitate antrenată”)

pentru a proteja împotriva infecțiilor. Acest fenomen ar putea fi explicat de modificările epigenetice și metabolice dezvoltate de celulele imune înnăscute pe măsură ce acestea se dezvoltă și se adaptează pentru a răspunde la factorii imunologici declanșatori <sup>10</sup>. Cu toate acestea, mai sunt multe de învățat despre funcțiile uratului în ser și despre modul în care acesta contribuie la procesele inflamatorii din organism.

Această teză își propune să exploreze dacă concentrațiile crescute de urat solubil (hiperuricemie) pot induce reprogramarea epigenetică și transcripțională în celulele imune înnăscute și să investigheze potențialele mecanisme care stau la baza statusului hiperinflamator caracterizat printr-o schimbare în producția de citokine (creșterea IL-1 $\beta$  și reducerea IL-1Ra).

În cadrul acestei teze, accentul a fost îndreptat spre explorarea inflamației asociate cu hiperuricemie și gută.

Obiectivele specifice sunt prezentate după cum urmează:

- ✚ Evaluarea modificărilor epigenetice asociate cu creșterea răspunsului imun declanșat de uratul solubil.
- ✚ Caracterizarea profilului de amorsare cu urat la pacienții cu hiperuricemie și gută. Investigarea rolului supresorului de semnalizare citokinică (SOCS3) în inflamația indusă de urat; SOCS3 fost identificat ca având regiuni diferențial metilate în studiul anterior.
- ✚ Evaluarea rolului interferonului de tip 1 în inflamația indusă de urat și modularea căii interferonului tip 1 ca posibil mecanism pentru amorsarea cu urat.

## **Metodologie**

### **Participanți**

Participanții la studiu din Cluj-Napoca, Romania, au fost recrutați pe baza proiectului HINT ( Hyperuricemia-induced Inflammation: Targeting the central role of uric acid in rheumatic and cardiovascular diseases, ID P 37 762; MySMIS 103587). Toți participanții și-au dat consimțământul informat în scris înainte de includere. Sângele periferic a fost recoltat din vena cubitală pe tuburi EDTA în condiții sterile. Actualul

studiu a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca (aviz nr. 425/2016).

### **Stimulări celulare și alte analize.**

- Procedura de amorsare cu urat solubil implică de obicei un pretratament de 24 de ore, urmat de o stimulare suplimentară de 24 de ore cu agoniști ai receptorilor PRR - Pattern Recognition Receptor (de exemplu, LPS) pentru a facilita modificări robuste în răspunsul citokinelor. Aceste experimente sunt suplimentate cu 10% ser uman. Nu se detectează producție de IL-1 $\beta$  și IL-6 doar după tratamentul de 24 de ore cu acid uric (denumit „amorsare”). Cu toate acestea, există o scădere bazală notabilă a IL-1Ra, care persistă chiar și după restimulare. Acest lucru sugerează un efect silențios al pre-expunerii la urat, care antrenează celulele pentru un răspuns proinflamator crescut la stimulările ulterioare <sup>9</sup>. Ale experimente in vitro de 24 de ore au implicat stimularea PBMC-urilor cu Poly: IC, CpG și *C. albicans*, însă fără a fi suplimentate cu ser. Experimentele in vitro efectuate la RadboudUMC, Nijmegen, au inclus voluntari sănătoși de naționalitate olandeză din cohorta 200 Functional Genomics (200FG) în cadrul Human Functional Genomics Project (<http://www.humanfunctionalgenomics.org>).
- Supernatantele rezultate în urma experimentelor in vitro au fost utilizate pentru a măsura concentrațiile de citokine cu tehnica ELISA.
- Expresia intracelulară a proteinelor fosforilate a fost măsurată folosind citometrie în flux și a fost efectuată la RadboudUMC, Nijmegen.
- ADN-ul a fost izolat din celulele stimulate/nestimulate pentru analiza metilării ADN-ului. Analiza de metilarea ADN-ului în monocitele umane tratate cu urat solubil a folosit probe de la voluntari sănătoși din Cluj-Napoca, România. Analiza de metilare a ADN-ului în sange de la pacienți de origine Măori din Noua Zeelandă a fost aprobată de Comitetul de etică pentru sănătate și dizabilități din New Zealand Lower South (MEC/05/10/130).
- ARN-ul a fost izolat din PBMC stimulate pentru analiza de secvențiere a ARN folosind tehnologia DNBseq.

## **Contribuție personală**

### **Studiul 1 – Titlu: Reprogramarea inflamatorie indusă de urat și metilarea ADN-ului**

În primul studiu, s-a evaluat la nivel epigenetic, impactul expunerii la urat asupra producției de citokine proinflamatorii în celulele umane. După cum s-a descris anterior, rezultatele prezente confirmă că amorsarea cu urat *in vitro* a celulelor imune are ca rezultat o schimbare în producția de citokine, caracterizată prin producție crescută de IL-1 $\beta$  și producție scăzută de IL-1Ra <sup>11</sup>. Descoperirile actuale indică că aceste efecte persistă chiar și după ce acidul uric fost îndepărtat și celulele au fost lăsate să se odihnească. Am emis ipoteza că amorsarea cu urat induce memorie imunologică înăscută și am investigat dacă expunerea la urat poate declanșa reprogramarea epigenetică în celulele mieloide. Pe baza dovezilor anterioare care leagă stimulii metabolici de modificările epigenetice <sup>12</sup>, am evaluat profilul de metilare al ADN-ului la 76 de indivizi maori din Noua Zeelandă având concentrații variate de urat seric. Rezultatele acestui studiu sugerează că mecanismele de reglare epigenetică pot fi asociate cu expunerea la urat solubil, oferind potențiale noi ținte pentru viitoare investigații în gută și în inflamația indusă de urat.

### **Studiul 2 – Titlu: Reglarea căii SOCS3-STAT3 în producția de citokine indusă de urat în celulele mieloide umane**

Pentru a investiga în continuare mecanismele asociate cu inflamația indusă de urat *in vitro*, al doilea studiu folosește o abordare imunologică, transcriptomică și epigenetică pentru a investiga rolul supresorului semnalizării citokinei 3 (SOCS3), folosind probe de donatori sănătoși, dar și de la pacienți. S-a demonstrat anterior că amorsarea *in vitro* cu urat solubil facilitează producția de IL-1 $\beta$  în celulele mononucleare din sângele periferic, iar unul dintre mecanismele pentru amplificarea IL-1 $\beta$  constă în reducerea antagonistului receptorului IL-1 (IL-1Ra). În studiul de față, extindem aceste constatări la indivizi cu hiperuricemie și la pacienți cu gută. De asemenea, arătăm că amorsarea *in vitro* cu urat duce la creșterea nivelurilor de SOCS3 datorită suprimării STAT3 fosforilat, însoțită de o reducere în producția IL-1Ra. Această schimbare caracterizată prin SOCS3 crescut și STAT3 fosforilat redus ar putea

juca un rol în hiperinflamația indusă de urat, având în vedere că amorsarea cu urat nu a avut niciun efect asupra celulelor PBMC izolate de la pacienții cu STAT3 activat constitutiv.

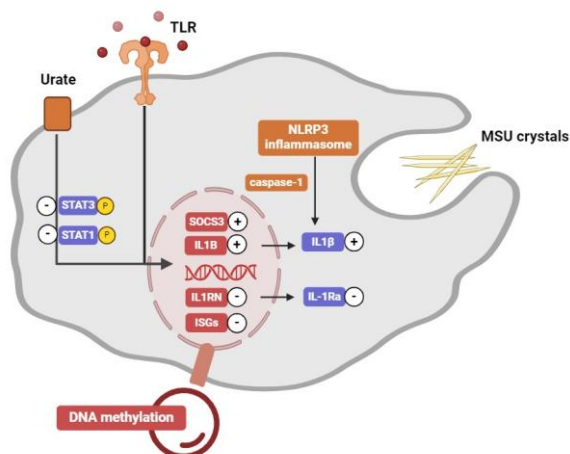
### **Studiul 3 – Titlu: Subexpresia căii de semnalizare a interferonului de tip 1 sub acțiunea hiperuricemiei**

În al treilea studiu, evaluăm modularea căii interferonului de tip 1 în urma expunerii celulele mieloide umane la urat. În acest scop, analizăm genele din calea de semnalizare interferon de tip I din transcriptomul celulelor primare umane ca răspuns la expunerea in vitro la urat solubil și în corelație cu nivelurile de urat seric de la pacienți. Rezultatele indică o reducere a expresiei genelor implicate în căile de semnalizare legate de interferon de tip 1 atât în monocitele umane, cât și în PBMC, în urma expunerii la urat. Cu toate acestea, stimularea PBMC-urilor cu INF- $\beta$  nu a reversat efectele proinflamatorii ale preexpunerii la urat. În mod interesant, am observat o corelație inversă între nivelurile de urat seric ale pacienților și expresia genelor din calea de semnalizare interferon de tip I în urma stimulărilor in vitro cu liganzi TLR. Aceste descoperiri sugerează că reducerea expresiei genelor din căile de semnalizare ale interferonului de tip I, cel mai probabil, nu constituie mecanismul de amorsare a uratului solubil în celulele mieloide. Cu toate acestea, aceste rezultate susțin o semnalizare deficitară a genelor din calea de semnalizare a interferonului tip 1, care ar putea duce la o vulnerabilitate crescută la infecțiile virale la pacienții cu hiperuricemie.

### **Originalitatea tezei**

Această teză prezintă o abordare nouă și cuprinzătoare pentru înțelegerea mecanismelor și efectelor expunerii celulele mieloide la urat in vitro, cât și la pacienții cu hiperuricemie și gută. Această teză include mai multe straturi de analiză, cum ar fi metilarea ADN-ului, producția de citokine și date transcriptomice, venind în completarea cercetărilor existente privind amorsarea cu urat.





**Figura 1. Reprezentarea schematică a datelor descrise în teză. IL1B/IL-1 $\beta$**  - Interleukin 1 beta, **IL1RN/IL-1Ra** - Interleukin-1 receptor antagonist, **ISGs** - Interferon stimulated genes, **MSU** - monosodium urate, **P** - Phosphate, **SOCS3** - Suppressor Of Cytokine Signaling 3, **STAT1** - Signal transducer and activator of transcription 1, **STAT3** - Signal transducer and activator of transcription 3, **TLR** - Toll-Like Receptor.

Bazându-ne pe studiile anterioare, această teză extinde înțelegerea efectului proinflamator al uratului și, în continuare, demonstrează o persistență a efectelor acestuia după o expunere inițială, atât și capacitatea acestuia de a induce memorie imunologică înăscută. S-a demonstrat anterior că pretratamentul cu urat are ca rezultat o schimbare în producția de citokine, cu producție crescută de citokine proinflamatorii și scăderea producției de citokine antiinflamatorii, un proces mediat de mecanisme care implică fosforilarea AKT și PRAS40 și activarea mTOR. Am reușit extinderea efectelelor expunerii la urat în probe de la pacienții hiperuricemici și cu gută. De asemenea, am arătat că aceasta este însoțită de o expresie crescută a *SOCS3* și de fosforilare STAT3 scăzută. Am observat efectul uratului solubil asupra mai multor căi biologice, inclusiv a interferonului tip 1 și a fosforilării STAT1. Mai mult, STAT3 este cunoscut pentru inducerea de *SOCS3* dar și pentru reglarea activității căii interferon tip 1 în anumite condiții. Aceste descoperiri subliniază un efect pro-inflamator al uratului solubil, și extind rolul acestuia dincolo de gută.

**Referințe:**

1. Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, Muscoli C, Mollace V. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *Int J Cardiol.* 2016;213:8–14.
2. Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. *Curr Opin Rheumatol.* 2014;26(2):186–91.
3. Kratzer JT, Lanaspas MA, Murphy MN, Cicerchi C, Graves CL, Tipton PA, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(10):3763–8.
4. Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, Khanna PP, Matsuo H, Perez-Ruiz F, et al. Gout. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1).
5. Zhu Y, Pandya BJ, Choi HK. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: The National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2008. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3136–41.
6. Singh JA, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(3):S11–6.
7. Crisan TO, Netea MG, Joosten LAB. Innate immune memory: Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *Eur J Immunol.* 2016;46(4):817–28.
8. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: The oxidant-antioxidant paradox. In: *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2008.
9. Crișan TO, Cleophas MCP, Oosting M, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, Netea MG, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(4):755–62.
10. Netea MG, van der Meer JWM. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe.* 2017;21(3):297–300.
11. Crișan TO, Cleophas MCP, Novakovic B, Erler K, van de Veerdonk FL, Stunnenberg HG, et al. Uric acid priming in human monocytes is driven by the AKT–PRAS40 autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(21):5485–90.
12. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016; 352(6284):aaf1098.