

DOCTORAL SCHOOL

PhD THESIS SUMMARY

Genetic and epigenetic sources of variation in gout and urate-associated inflammation

PhD Student **Ildikó Orsolya Gaál**

PhD Supervisor Prof. Dr. **Leonardus A.B. Joosten**

PhD Supervisor Prof. Dr. **Mihai Netea (cotutelă)**



Table of Contents

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	15
1. Gout and hyperuricemia – current status	17
2. Urate metabolism	21
3. Urate induced inflammation	23
4. Regulation of IL-1	25
5. The genetic basis of hyperuricemia and gout	26
PERSONAL CONTRIBUTION	29
1. Work hypothesis/ Objectives	31
2. Study 1. Gout-associated SNP at the <i>IL1RN-IL1F10</i> region is functionally linked to altered cytokine production in PBMCs of patients with gout and controls	Error! Bookmark not defined.
3. Study 2. Gwas-identified hyperuricemia-associated IGF1R variant rs6598541 has a limited role in urate mediated inflammation in human mononuclear cells	51
4. Study 3. Urate-induced epigenetic modifications in myeloid cells	67
5. General conclusions	81
6. Thesis originality and innovative contributions	85
REFERENCES	87

Keywords: Gout, Soluble urate, Hyperuricemia, Cytokines, Inflammation, IL-1B, IL-Ra, SNP, IGF1R

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

State of the Art

Gout is the most common inflammatory arthritis, its incidence is being 3-4 times more common than that of rheumatoid arthritis. For many years, MSU crystals were thought to be the only indispensable cause for developing gout. As our understanding of the disease have evolved with the ongoing research, this paradigm has shifted and opened the door to understanding of the implications of urate on the inflammatory responses of the host.

Hyperuricemia, represents the most important risk factor in disease progression. Both soluble and crystallised urate have the ability to activate the NLRP3 inflammasome and to promote inflammation. Genetic factors also play a significant part in the variance of serum urate levels and the inflammatory status of the individual. GWAS studies showed the importance of urate excretion as the body's attempt to control for serum urate concentrations, this involving the gut, the kidneys and the liver as important regulatory centers. Moreover, these studies have uncovered multiple loci, associated with the development of hyperuricemia.

The aim of this thesis was to functionally evaluate methods of urate exposure on innate immune cells revealing epigenetic changes which are likely to play a role in this altered immunogenic phenotype. Therefore, hyperuricemia induced epigenetic changes and immune memory could contribute to this higher systemic inflammation reported in individuals with hyperuricemia. Also, by investigating the genetic profile of patients with gout and hyperuricemia, we tried to dissect the genetic landscape of variants in key factors associated with the inflammatory processes and link them to disease susceptibility and towards disease progression.

The specific aims are as follows:

- To evaluate the functional implications of the GWAS identified gout rs9973741 SNP at the *IL1RN-IL1F10* region and to assess the association of the SNP with the cytokine production capacity in patients with gout and controls
- To investigate the role of IGF-1/IGF1R signaling in the context of gouty inflammation and urate exposure. To test the gout and urate-associated *IGF1R* rs6598541 polymorphism for association with the inflammatory cytokine production capacity of mononuclear cells
- To evaluate the molecular substrates such as histone modifications and DNA methylation triggered by soluble urate

PERSONAL CONTRIBUTION

Study nr 1 – Title: Gout associated SNP at the *IL1RN-IL1F10* region is associated to altered cytokine production in PBMCs of patients with gout and controls

Gout is driven by the innate immune system's response to monosodium urate (MSU) crystals. A recent genome-wide association study (GWAS) identified a genetic signal at the **IL1RN-IL1F10** locus associated with gout, linked to the expression of *IL1RN/IL1F10* genes. This study assessed the functional implications of the lead gout-associated variant, **IL1RN rs9973741**, through transcriptional and cytokine production assays in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from gout patients and controls.

Key findings include:

- **In Unstimulated PBMCs:** The gout risk allele G did not affect **IL1RN** expression, and **IL1F10** was expressed at low levels.
- **In Stimulated PBMCs:** G allele carriers exhibited reduced **IL1RN** expression, lower circulating IL-1Ra (an anti-inflammatory cytokine), and reduced IL-1Ra production in response to MSU crystals or C16/MSU stimulation.
- G allele carriers also showed increased production of pro-inflammatory **IL-1 β** in stimulated conditions.

These results suggest that the **IL1RN-IL1F10** genetic region contributes to gout risk by altering IL-1Ra expression and exacerbating inflammatory responses to MSU crystals.

Study nr. 2 – Title: Gwas-identified hyperuricemia-associated IGF1R variant rs6598541 has a limited role in urate mediated inflammation in human mononuclear cells

Gout, an autoinflammatory joint disease caused by monosodium urate (MSU) crystal deposition, involves an innate immune response driven by inflammatory cytokines. The **IGF1R** gene is associated with both urate levels and gout susceptibility, and IGF-1/IGF1R signaling has been linked to urate regulation. This study explored the role of IGF-1/IGF1R signaling in gouty inflammation and the impact of the **IGF1R rs6598541** polymorphism on mononuclear cell inflammatory responses.

Key findings:

- **IGF1R expression** was not affected by urate exposure in vitro or in vivo.
- Modulating IGF1R through recombinant IGF-1 or neutralizing antibodies did not influence urate-induced inflammation or trained immunity.
- The **rs6598541 SNP** was not associated with IGF1R expression or cytokine production in stimulated PBMCs.

These results suggest that while IGF1R may play a role in urate level regulation, it does not directly regulate inflammatory signaling in gout, indicating its role may be tissue-specific.

Study nr. 3 – Title: Urate-induced epigenetic modifications in myeloid cells

Hyperuricemia, a key factor in gout, primes human monocytes to enhance IL-1 β production and release. This study investigated the epigenetic mechanisms underlying urate-induced hyper-responsiveness in human cells and mice.

Key findings:

- **Urate exposure** heightened inflammatory responses in vivo in mice.
- Broad-spectrum methylation inhibitors reversed the inflammatory effects of urate.
- Epigenetic changes, including increased **H3K4me3** and **H3K27ac** marks, were observed in urate-primed monocytes compared to controls.
- Histone modifications differed between hyperuricemic and normouricemic individuals, reflecting urate's impact on the epigenetic landscape.

These results suggest that urate influences inflammation by altering histone modifications, highlighting a potential epigenetic basis for gout pathogenesis.

Originality of the thesis

The originality of this thesis lies in its dual focus: the **functional genetic assessment** of cytokine production in individuals with gout and hyperuricemia, and the **epigenomic evaluation** of innate immune memory-related epigenetic changes in urate-driven inflammation. The first two studies provide new insights by using immunological in vitro evaluations and characterizations of fresh primary cells derived from each enrolled patient. This personalized approach offers a foundation for designing targeted diagnostic and therapeutic strategies for patients with autoinflammatory diseases.

While previous genetic studies have identified loci associated with gout, most are linked to urate homeostasis and transport, suggesting their contribution to gout risk is primarily through hyperuricemia. In contrast, this research focuses on identifying genes associated with inflammatory regulation in gout. By correlating polymorphisms in candidate genes with expression levels and cytokine profiles, we uncovered novel genetic associations related to inflammation and disease susceptibility. These findings highlight potential genetic risk variants that could serve as biomarkers for prognosis and targets for therapy.

An innovative aspect of this work is the integration of functional genetic approaches to study gout and hyperuricemia. The genetic association studies conducted reveal how specific mutations in key genes may influence chronic inflammation and disease progression. This has clinical significance, particularly as the genes identified may serve as targets for more effective

and affordable treatments. Given the high cost and limited adoption of anti-IL-1 therapies in gout, these findings emphasize the importance of developing new, targeted therapeutic strategies.

In the third study, we demonstrate that urate functions as a damage-associated molecular pattern (DAMP) capable of inducing **epigenetic reprogramming** in innate immune cells. Using a murine model of gouty arthritis, we explored the interaction between hyperuricemia and inflammation, providing evidence that epigenetic modulators may offer therapeutic benefits in hyperuricemic conditions. This discovery of metabolic imprinting, which establishes long-term memory in innate immune cells, represents a novel dimension of this research. Furthermore, we propose that urate, as a danger signal, induces epigenetic changes in innate immune cells, opening new avenues for therapeutic interventions in autoinflammatory rheumatic diseases.

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Variații genetice și epigenetice în gută și inflamația indusă de urat

Doctorand **Ildikó Orsolya Gaál**

Conducători de doctorat Prof. Dr. **Leonardus A.B. Joosten**

Prof. Dr. **Mihai Netea (cotutelă)**



CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Gută și hiperuricemie	17
2. Metabolismul uratului	21
3. Inflamația indusă de urat	23
4. Reglarea IL-1	25
5. Baza genetică a gutei și hiperuricemiei	26
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	29
1. Ipoteza de cercetare și obiectivele	31
2. Studiul 1. SNP-ul asociat gutei în regiunea IL1RN-IL1F10 este legat funcțional de producția alterată de citokine în PBMC ale pacienților cu gută și martori	33
3. Studiul 2. Varianta rs6598541 IGF1R asociată hiperuricemiei identificată de un studiu tip GWAS are un rol limitat în inflamația mediată de urat în celulele mononucleare umane	51
4. Studiul 3. Modificări epigenetice induse de urat în celulele mioeloide	67
5. Concluzii generale	81
6. Originalitatea tezei	85
REFERINȚE	87

Cuvinte cheie: gută, urat solubil, hiperuricemie, citokine, inflamație, IL-1B, IL-Ra, SNP, IGF1R

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Stadiul actual al cunoașterii

Guta este cea mai frecventă artrită inflamatorie, având o incidență de 3-4 ori mai mare decât artrita reumatoidă. Timp de mulți ani, cristalele de monosodiu urat (MSU) au fost considerate singura cauză indispensabilă pentru dezvoltarea gutei. Odată cu progresul cercetărilor și cu o mai bună înțelegere a bolii, acest paradigm s-a schimbat, deschizând calea pentru înțelegerea implicațiilor uratului asupra răspunsurilor inflamatorii din organism.

Hiperuricemia reprezintă cel mai important factor de risc în progresia bolii. Atât uratul solubil, cât și cel cristalizat au capacitatea de a activa inflammasomul NLRP3 și de a promova inflamația. Factorii genetici joacă, de asemenea, un rol semnificativ în variabilitatea nivelurilor serice de urat și în statusul inflamator al individului. Studiile GWAS au evidențiat importanța excreției uratului ca mecanism prin care organismul încearcă să controleze concentrațiile serice de urat, implicând intestinul, rinichii și ficatul ca centre de reglare importante. Mai mult, aceste studii au identificat multiple loci asociați cu dezvoltarea hiperuricemiei.

Scopul acestei teze a fost de a evalua funcțional metodele de expunere la urat asupra celulelor imune înnăscute, evidențiind modificări epigenetice care ar putea juca un rol în acest fenotip imunogenic alterat. Astfel, modificările epigenetice și memoria imună induse de hiperuricemie ar putea contribui la inflamația sistemică crescută raportată la indivizii cu hiperuricemie. De asemenea, investigând profilul genetic al pacienților cu gută și hiperuricemie, s-a încercat disecarea peisajului genetic al variantelor implicate în procesele inflamatorii și asocierea acestora cu susceptibilitatea la boală și progresia acesteia.

Obiectivele specifice sunt următoarele:

- Evaluarea implicațiilor funcționale ale SNP-ului rs9973741 identificat în studiile GWAS în regiunea IL1RN-IL1F10 și analizarea asocierii acestuia cu capacitatea de producție a citokinelor la pacienții cu gută și la martori.
- Investigarea rolului semnalizării IGF-1/IGF1R în contextul inflamației gutoase și al expunerii la urat. Testarea polimorfismului IGF1R rs6598541 asociat cu gută și

hiperuricemia pentru asocierea cu capacitatea de producție a citokinelor inflamatorii a celulelor mononucleare.

- Evaluarea substraturilor moleculare, precum modificările histonelor și metilarea ADN, declanșate de uratul solubil.

Contribuție personală

Studiul 1 – Titlu: SNP-ul asociat gutei în regiunea IL1RN-IL1F10 este legat funcțional de producția alterată de citokine în PBMC ale pacienților cu gută și martori

Guta este determinată de răspunsul sistemului imunitar înăscut la cristalele de urat monosodic (MSU). Un studiu recent de asociere genomică la nivel de întreg genomul (GWAS) a identificat un semnal genetic la nivelul locusului **IL1RN-IL1F10**, asociat cu guta și legat de expresia genelor **IL1RN/IL1F10**. Acest studiu a evaluat implicațiile funcționale ale variantei asociate cu guta, **IL1RN rs9973741**, prin analize ale transcripției și producției de citokine în PBMC-uri (celule mononucleare din sângele periferic) prelevate de la pacienți cu gută și de la martori.

Principalele constatări includ:

- **În PBMC-uri nestimulate:** Alela de risc pentru gută, G, nu a influențat expresia IL1RN, iar IL1F10 a fost exprimată la niveluri scăzute.
- **În PBMC-uri stimulate:** Purtătorii alelei G au prezentat o expresie redusă a IL1RN, niveluri mai scăzute de IL-1Ra circulant (o citokină antiinflamatoare) și o producție redusă de IL-1Ra ca răspuns la cristale MSU sau stimulare cu C16/MSU.
- **În condiții stimulate:** Purtătorii alelei G au prezentat o producție crescută de IL-1β proinflamator.

Aceste rezultate sugerează că regiunea genetică **IL1RN-IL1F10** contribuie la riscul de gută prin modificarea expresiei IL-1Ra și amplificarea răspunsurilor inflamatorii la cristalele MSU.

Studiul 2 – Titlu: Varianta rs6598541 IGF1R asociată hiperuricemiei identificată de un studiu tip GWAS are un rol limitat în inflamația mediată de urat în celulele mononucleare umane

Guta, o boală articulară autoinflamatorie cauzată de depunerea cristalelor de urat monosodic (MSU), implică un răspuns imun înnăscut mediat de citokine inflamatorii. Gena **IGF1R** este asociată atât cu nivelurile de urat, cât și cu susceptibilitatea la gută, iar semnalizarea prin **IGF-1/IGF1R** a fost legată de reglarea uratului. Acest studiu a investigat rolul semnalizării IGF-1/IGF1R în inflamația gutoasă și impactul polimorfismului **IGF1R rs6598541** asupra răspunsurilor inflamatorii ale celulelor mononucleare.

Constatări principale:

- Expresia **IGF1R** nu a fost influențată de expunerea la urat in vitro sau in vivo.
- Modularea IGF1R prin proteine recombinante IGF-1 sau anticorpi neutralizanți nu a afectat inflamația indusă de urat sau imunitatea dobândită.
- SNP-ul **rs6598541** nu a fost asociat cu expresia **IGF1R** sau cu producția de citokine în PBMC-uri stimulate.

Aceste rezultate sugerează că, deși IGF1R poate juca un rol în reglarea nivelurilor de urat, nu influențează direct semnalizarea inflamatorie în gută, indicând o posibilă specificitate tisulară a funcției sale.

Studiul 3 – Titlu: Modificări epigenetice induse de urat în celulele mieloide

Hiperuricemia, un factor cheie în gută, determină monocitele umane să intensifice producția și eliberarea de IL-1 β . Acest studiu a investigat mecanismele epigenetice care stau la baza hiper-receptivității induse de urat în celulele umane și la șoareci.

Constatări principale:

- Expunerea la urat a amplificat răspunsurile inflamatorii in vivo la șoareci.

- Inhibitorii de metilare cu spectru larg au inversat efectele inflamatorii ale uratului.
- Schimbări epigenetice, inclusiv creșterea markerilor **H3K4me3** și **H3K27ac**, au fost observate în monocitele expuse la urat, comparativ cu martorii.
- Modificările histonelor au diferit între indivizii hiperuricemici și normouricemici, reflectând impactul uratului asupra peisajului epigenetic.

Aceste rezultate sugerează că uratul influențează inflamația prin modificări ale histonelor, evidențiind o posibilă bază epigenetică pentru patogeneza gutei.

Originalitatea tezei

Originalitatea acestei teze constă în focalizarea sa dublă: evaluarea genetică funcțională a producției de citokine la persoanele cu gută și hiperuricemie, precum și analiza epigenomică a modificărilor epigenetice legate de memoria imună în inflamația indusă de urat. Primele două studii aduc perspective noi prin utilizarea evaluărilor imunologice *in vitro* și caracterizarea celulelor primare proaspete prelevate de la fiecare pacient inclus. Această abordare personalizată oferă o bază solidă pentru proiectarea unor strategii diagnostice și terapeutice direcționate pentru pacienții cu boli autoinflamatorii.

Deși studiile genetice anterioare au identificat loci asociați cu guta, majoritatea sunt legate de homeostazia și transportul uratului, sugerând că contribuția lor la riscul de gută este în principal prin hiperuricemie. Spre deosebire de acestea, cercetarea prezentă se concentrează pe identificarea genelor asociate cu reglarea inflamației în gută. Prin corelarea polimorfismelor în genele candidate cu nivelurile de expresie și profilele de citokine, au fost descoperite noi asocieri genetice legate de inflamație și susceptibilitatea la boală. Aceste descoperiri subliniază variante genetice de risc potențiale care ar putea servi drept biomarkeri de prognostic și ținte terapeutice.

Un aspect inovator al acestei lucrări este integrarea abordărilor genetice funcționale în studiul gutei și hiperuricemiei. Studiile de asociere genetică efectuate dezvăluie modul în care mutațiile specifice în genele cheie pot influența inflamația cronică și progresia bolii. Acest

lucru are o semnificație clinică, în special deoarece genele identificate pot servi drept ținte pentru tratamente mai eficiente și mai accesibile. Având în vedere costul ridicat și adoptarea limitată a terapiilor anti-IL-1 în gută, aceste descoperiri subliniază importanța dezvoltării unor strategii terapeutice noi și țintite.

În cel de-al treilea studiu, demonstrăm că uratul acționează ca un model molecular asociat cu lezarea (DAMP), capabil să inducă reprogramarea epigenetică în celulele imune înnăscute. Utilizând un model murin de artrită gută, am explorat interacțiunea dintre hiperuricemie și inflamație, oferind dovezi că modulatorii epigenetici pot oferi beneficii terapeutice în condiții de hiperuricemie. Această descoperire a imprimării metabolice, care stabilește o memorie pe termen lung în celulele imune înnăscute, reprezintă o dimensiune nouă a cercetării. Mai mult, propunem că uratul, ca semnal de pericol, induce modificări epigenetice în celulele imune înnăscute, deschizând noi direcții pentru intervenții terapeutice în bolile reumatice autoinflamatorii.