



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00208

(22) Data de depozit: 16/04/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/12/2020 BOPI nr. 12/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE BIOCHIMIE AL  
ACADEMIEI ROMÂNE,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI 296,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• TACUTU ROBI MARCEL,  
BD. CAMIL RESSU, NR.39, BL.Z5, SC.4,  
ET.3, AP.55, SECTORUL 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• GHENEA SIMONA, STR.DUNEI NR.17,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• MATEI IOAN VALENTIN,  
STR. DEMOCRATIEI, NR.2, BL.F, SC.A,  
AP.14, PLOIEȘTI, PH, RO;  
• SAMUKANGE VIMBAI NETSAI CHARITY,  
BVD. DACIA, NR.45, AP.58, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BUNU GABRIELA, STR.REZERVELOR,  
NR.54, BL.2, ET. 5, AP.109, SAT DUDU,  
COMUNA CHIAJNA, IF, RO;  
• TOREN DMITRI, STR.CUZA VODĂ,  
NR.132, BL.1, SC.2, AP. 26, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODA DE EXTINDERE A DURATEI DE VIAȚĂ  
LA CAENORHABDITIS ELEGANS PRIN INTERVENȚII  
GENETICE EPISTATICE ÎN odr - 3 ȘI ife - 2**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui model genetic de *C. elegans* cu un fenotip longeviv utilizată în studii asupra mecanismelor îmbătrânirii și bolilor asociate. Metoda, conform invenției, constă în dubla intervenție genetică asupra unei tulpini de nematod mutant *Caenorhabditis elegans* prin modularea funcției, respectiv, expresiei în două gene: odr-3 și ife-2, rezultând

o tulpină *C. elegans* deficientă în expresia genelor odr-3 și ife-2 cu o creștere de 38% a duratei medii de viață comparativ cu tulpina sălbatică.

Revendicări: 2  
Figuri: 2



## METODA DE EXTINDERE A DURATEI DE VIAȚA LA CAENORHABDITIS ELEGANS PRIN INTERVENȚII GENETICE EPISTATICHE ÎN *odr-3* ȘI *ife-2*

Această invenție propune o metodă prin care durata de viață poate fi extinsă la nematodul *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) printr-un efect epistatic obținut prin modularea funcției, respectiv expresiei în două gene: *odr-3* și *ife-2*.

Gena *odr-3* codifică o proteină tip  $G_{\alpha}$  implicată în funcția neuronilor olfactivi și nociceptivi ai *C. elegans*, pierderea funcției sau supraexpresia ei determinând defecte olfactive severe<sup>1</sup>. În condiții de laborator, mutația de pierdere a expresiei *odr-3* duce la pierderea chemotactismului pozitiv la diacetil, pirazina, 2,4,5-trimetil tiazol, alcool izoamilic, 2-butanona, clorura de sodiu<sup>1</sup>.

Gena *ife-2*, este un ortolog al genelor umane EIF4E și EIF4E1B, prezentând activitate de legare a ARN 7-metil guanozinei și ARN trimetil guanozinei. Este implicată în mai multe procese, inclusiv determinarea duratei de viață adulte, reglarea negativă a răspunsului la stresul oxidativ și reglarea pozitivă a translației.

În această cerere de brevet arătăm că nematodele care au gena *odr-3* nefuncțională și o expresie scăzută a genei *ife-2* prezintă o durată de viață extinsă. Drept model pentru a arăta efectul epistatic al dublei intervenții genetice a fost folosită alela *odr-3* (*n1605*) ce prezintă o mutație de tip ocră datorită căreia codifică o proteină truncată de doar 22 aminoacizi, nefuncțională<sup>1</sup>. Reducerea expresiei genei *ife-2* a fost realizată prin interferență ARN (RNAi), o tehnologie prin care expresia unei proteine poate fi redusă datorită inhibării ARN-ului mesager corespunzător. Mutantul *odr-3* (*n1605*) este un mutant longeviv comparativ cu tulpina sălbatică, iar dubla intervenție moleculară (*odr-3*, *ife-2*) duce la o extindere și mai mare a longevității. Acest tip de inovație poate aduce cunoștințe noi despre procesul de îmbătrânire, având multiple aplicații biomedicale, atât în tratamentul bolilor asociate senectuții cât și în medicina preventivă.

### Brevete și soluții existente

Deși nu exista un brevet în acest sens, până în prezent au fost publicate date despre longevitatea mutantului simplu *odr-3* (*n1605*), care trăiește cu 2-10% mai mult decât

<sup>1</sup> Roayaie K, Crump JG, Sagasti A, Bargmann CI. *Neuron*. 1998, 20:55–67

tulpina sălbatică<sup>2</sup>, precum și despre efectul RNAi asupra genei *ife-2*, care rezultă într-o creștere a longevității între 23-38%<sup>3</sup>. De asemenea, atât gena *odr-3* cât și *ife-2* au mai fost implicate în dubli mutații (în combinații cu alte gene) a căror longevitate a fost evaluată, dar până în acest moment nu au fost raportate efectele directe ale unei intervenții duble, implicând *odr-3* și *ife-2*.

### Descrierea Metodei

Metoda de extindere a duratei de viață propusă în această cerere implică obținerea unei tulpini *C. elegans* deficientă în expresia genelor *odr-3* și *ife-2*. Pentru a demonstra metoda, această tulpină a fost obținută în laboratorul nostru, pornind de la mutantul achiziționat *odr-3* (*n1605*) în care expresia genei *ife-2* a fost redusă prin tehnologia RNAi. În experimentele prezentate (inclusiv rezultatele din Fig. 1), reducerea expresiei genei *ife-2* a fost realizată prin hrănirea mutantei *odr-3* (*n1605*) cu o tulpină bacteriană HT115 (DE3) transformată, ce prezintă un fragment genomic necesar inactivării genei *ife-2*, clonat în vectorul L4440 (mai precis, s-a folosit clona RNAi R04A9.4 extrasă din biblioteca *C. elegans* RNAi Ahringer Collection - Source BioScience, Nottingham, UK), în timp ce pentru control s-a folosit clona RNAi transformată cu vectorul L4440 gol (CGC, UoM, Minneapolis, MN, SUA). Experimentele au fost realizate pe plăci NGM standard folosind un procedeu modificat al metodei Ahringer de pregătire a clonelor RNAi. Astfel, o clona bacteriana RNAi crescută peste noapte la 37 grade C pe plăci Petri conținând agar bacteriologic LB, suplimentat cu ampicilină 100 μg/mL și tetraciclină 100 μg/mL, a fost inoculată în mediu LB lichid suplimentat doar cu ampicilină 100 μg/mL și crescută timp de 14-16h la 37 grade C. Bacteriile au fost sedimentate și resuspendate în mediu LB proaspăt astfel încât atât clona bacteriana R04A9.4 cât și clona L4440 să aibă aceeași densitate optică. Volume identice din cele două clone au fost insamantate pe plăci NGM suplimentat cu carbenicilina 25 μg/mL și IPTG 1 mM, și incubate timp de 48h la temperatura camerei pentru inducerea efectului RNAi. Plăcile astfel obținute au fost însămânțate în paralel cu 3-5 indivizi *C. elegans* aflați în stadiul larvar L4, tipul sălbatic N2 și mutantul *odr-3* (*n1605*) (CGC, UoM, Minneapolis, MN, SUA), fiind apoi transferați după 24h pe o placă proaspătă, și înlăturați după alte 24h pentru a obține

<sup>2</sup> Lans H, Jansen G. *Dev Biol.* 2007, 303:474–482

<sup>3</sup> Syntichaki P, Troulinaki K, Tavernarakis N. *Nature.* 2007, 445:922–926

o populație sincronă de indivizi în stadiul larvar L4. Experimentul de longevitate a fost inițiat prin transferul indivizilor din generația F1 aflați în stadiul larvar L4 pe plăci conținând agar NGM, suplimentat cu carbenicilina 25 μg/mL, IPTG 1 mM și FUdR 15 μg/mL. Un număr de 85 indivizi, per tulpină studiată, au fost monitorizați pentru evaluarea longevității.

### Descrierea rezultatelor din desenele explicative

În figura 1 este prezentată schema procedurii prin care s-a obținut un model *C. elegans* longeviv datorat efectului sinergic al pierderii funcției genei *odr-3* și reducerea expresiei genei *ife-2*. Pentru a demonstra efectul sinergic al dublei intervenții genetice au fost testate 4 grupe de nematode. În două populații s-a pornit de la tulpina sălbatică, iar în alte două populații de la mutanta *odr-3 (n1605)*. În ambele cazuri, hrănirea s-a realizat: într-o populație, cu bacterii conținând vectorul RNAi corespunzător inactivării genei *ife-2* (rezultând într-o expresie redusă a genei *ife-2*), iar în cealaltă populație cu bacterii transformate cu vectorul RNAi gol (expresia genei *ife-2* nefiind afectată). Etapele procedurii sunt prezentate schematic și implică pregătirea secvențială a plăcilor RNAi și a nematodelor.

În figura 2 sunt afișate curbele de supraviețuire pentru (1) tulpina sălbatică control (reprezentată cu roșu), (2) tulpina sălbatică supusă inactivării ARNm *ife-2* prin RNAi (reprezentată cu verde), (3) mutanta *odr-3 (n1605)* (reprezentată cu albastru), (4) mutanta *odr-3 (n1605)* în care expresia genei *ife-2* a fost redusă. Experimentele au fost realizate în triplicat, efectuându-se o urmărire zilnică a populațiilor de nematode, cu numărarea indivizilor vii, morți și cenzurați. Rezultatele sunt redată sub forma curbelor de supraviețuire Kaplan-Meier, folosind testul log-rank pentru compararea curbelor. Se poate observa din figura 1 că atât durata medie cât și durata maximă de viață ale tulpinei supuse dublei intervenții sunt mai ridicate decât ale tulpinilor supuse intervențiilor genetice individuale, precum și decât ale tulpinei sălbatică. Tulpina cu dubla intervenție genetică *odr-3 (n1605); ife-2 (RNAi)* prezintă o creștere de 38% a duratei medii de viață, comparativ cu tulpina sălbatică, semnificativ ( $p < 1.0E-4$ ) mai mare decât creșterea obținută la tulpina *ife-2 (RNAi)* și mutanta *odr-3* care trăiesc, în medie, cu doar 16%, respectiv 24% mai mult decât tulpina sălbatică.

**Utilitatea invenției și exemplul de folosire**

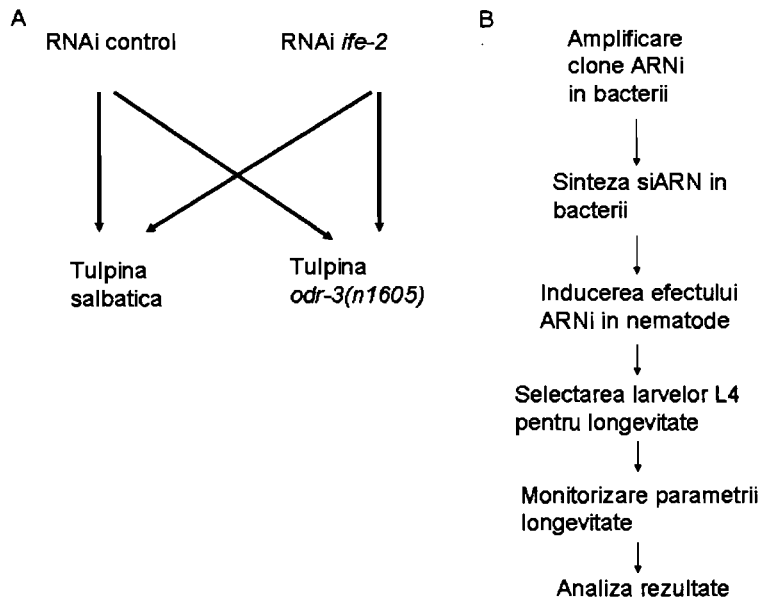
Modelul dublei intervenții *odr-3* (*n1605*); *ife-2* (RNAi), poate fi folosit:

1. În studiul teoretic al mecanismelor îmbătrânirii pentru testarea unor ipoteze și intervenții într-un model genetic longeviv. În *C. elegans* gena *odr-3* este exprimată într-un număr restrâns de neuroni senzitivi fapt care constituie un avantaj datorită limitării efectelor secundare sistemice ce pot apare în urma modulării diferitelor căi de semnalizare implicate în extinderea longevității. Acest model longeviv este foarte util în studiul îmbătrânirii, cu precădere pentru identificarea altor intervenții genetice sau farmacologice, sau mecanisme care nu au activitate decât în cazuri de longevitate excepțională. Metoda prezentată în acest brevet oferă un procedeu de obținere a unei tulpini longevive de *C. elegans*, fiind utilă mai ales în identificarea altor intervenții și mecanisme sinergice cu *odr-3* / *ife-2*.
2. În identificarea mecanismelor anti-îmbătrânire prin dezvoltarea de medicamente ce pot mima efectul epistatic al celor două intervenții genetice.

**REVENDICĂRI**

1. O metodă de creștere a duratei medii și maxime de viață datorată unui efect epistatic rezultat prin pierderea funcției proteinei codificate de *odr-3* și reducerea expresiei genei *ife-2*.
2. Un model genetic de *C. elegans*, *odr-3 / ife-2*, cu un fenotip longeviv.

## DESENE EXPLICATIVE



**Figura 1. A.** Comparațiile de intervenții genetice investigate. **B.** Procedul de obținere a tulpinii *odr-3(n1605); ife-2* (RNAi) cu efect longeviv.

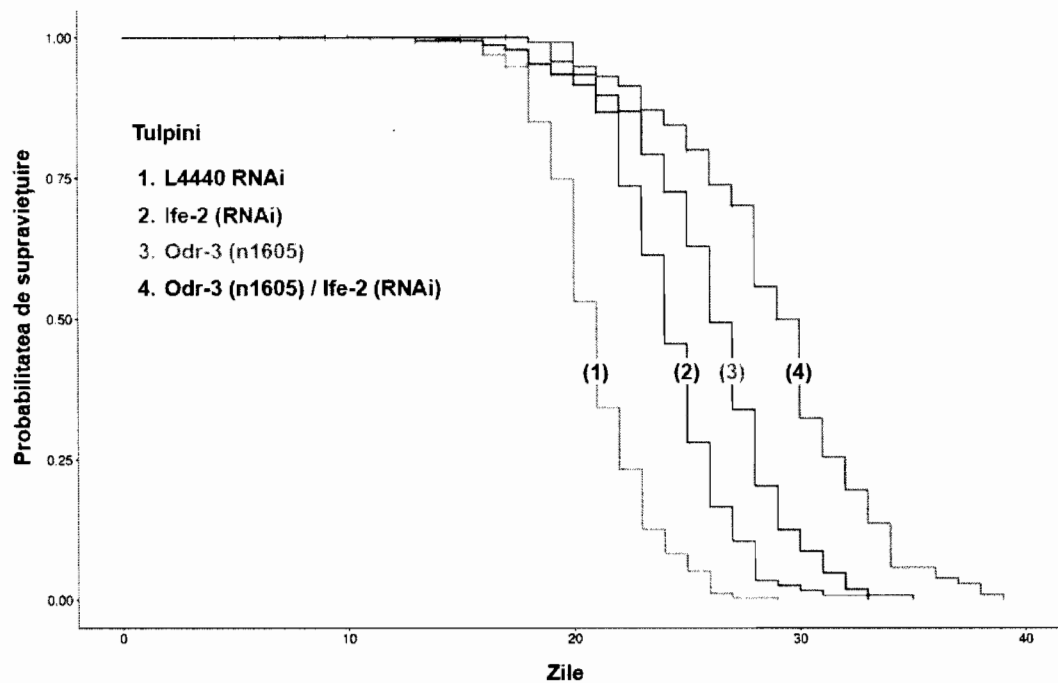


Fig. 2. Curba de supraviețuire Kaplan-Meier pentru dublul mutant *odr-3 / lfe-2*, în comparație cu mutanții simpli și tulpina sălbatică