



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00208**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/06/2024** BOPI nr. **6/2024**

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

(73) Titular:
• **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.DEMOCRĂȚIEI, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**MASAHARU UNO ȘI EISUKE NISHIDA,
"LIFESPAN-REGULATING GENES IN C.
ELEGANS AGING AND MECHANISMS OD
DISEASE", 2016; K. ROAYAIE, J. G.
CRUMP, A. SAGASTI, C.I. BARGMANN,
"THE G ALPHA PROTEIN ODR-3
MEDIATES OLFACTORY AND
NOCICEPTIVE FUNCTION AND
CONTROLS CILIUM MORPHOGENESIS IN
C. ELEGANS OLFACTORY NEURONS",
1998**

(54) **METODĂ DE OBȚINERE A MODELULUI GENETIC
C. ELEGANS odr - 3/ife - 2 CU UN FENOTIP LONGEVIV**



RO 134607 B1

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

5 Gena *odr-3* codifică o proteină tip Ga implicată în funcția neuronilor olfactivi și
nociceptivi ai *C. elegans*, pierderea funcției sau supraexpresia ei determinând defecte olfac-
7 tive severe (Roayaie K., Crump J. G., Sagasti A., Bargmann C. I. Neuron. 1998, 20:55-67).
În condiții de laborator, mutația de pierdere a expresiei *odr-3* duce la pierderea chemotactis-
mului pozitiv la diacetil, pirazină, 2,4,5-trimetil tiazol, alcool izoamilic, 2-butanona, clorura de
9 sodiu (Roayaie K., Crump J. G., Sagasti A., Bargmann C. I. Neuron. 1998, 20:55-67).

11 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
13 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
15 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 ocru datorită căreia
17 codifică o proteină truncată de doar 22 aminoacizi, nefuncțională¹. Reducerea expresiei
genei *ife-2* a fost realizată prin interferență ARN (RNAi), o tehnologie prin care expresia unei
19 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
21 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
23 biomedicale, atât în tratamentul bolilor asociate senectuții cât și în medicina preventivă.

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

31 În articolul *Lifespan-regulating genes in C. elegans*, Aging and Mechanisms of
Disease (2.06.2016) M. Uno și E. Nishida face referire la mecanismele moleculare care stau
33 la baza procesului de îmbătrânire care au atras multă atenție în ultimele decenii, deoarece
îmbătrânirea este cel mai semnificativ factor de risc pentru multe boli cronice, cum ar fi
35 diabetul de tip 2 și cancerul. Până de curând, procesul de îmbătrânire nu a fost considerat
a fi un proces reglementat activ; prin urmare, descoperirea faptului că calea de semnalizare
37 a insulinei/factorului de creștere like insulină-1 este o cale genetică care reglează durata de
viață în *Caenorhabditis elegans* a fost o descoperire majoră care ne-a schimbat înțelegerea
39 procesului de îmbătrânire. În prezent, se crede că durata de viață a animalelor este influențată
de factori genetici și de mediu. Genele implicate în reglarea duratei de viață sunt adesea
41 asociate cu căi majore de semnalizare care leagă rata de îmbătrânire de factori de mediu.
Deși multe dintre mecanismele majore care guvernează procesul de îmbătrânire au fost
43 identificate din studii de scurtă durată pe organisme model, cum ar fi drojdiile, viermii și
muștele, aceleași mecanisme sunt observate frecvent la mamifere, indicând faptul că genele
45 și căile de semnalizare care reglează durata de viață sunt foarte conservate între diferitele
specii. Această recenzie rezumă gene de reglare a duratei de viață, cu un accent special pe
47 studiile pe *C. elegans*.

RO 134607 B1

În articolul *The G α protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in C. elegans olfactory neurons* (ianuarie 1998) K. Roayaie, J. G. Crump, A. Sagasti, C. I. Bargmann prezintă o caracteristică a proteinei G alfa *odr-3* like G_i/G_o care este implicată puternic și selectiv în funcția neuronilor olfactivi și nociceptivi din *C. elegans*. Fie pierderea funcției *odr-3*, fie supraexprimarea *odr-3* cauzează defecte olfactive severe, iar funcția *odr-3* este esențială în neuronii ASH care simt stimuli chimici și mecanici nocivi. În neuronii nociceptivi, *odr-3* poate interacționa cu OSM-9, un canal similar cu receptorul capsaicinei de mamifer implicat în senzația de durere; în neuronii olfactivi AWC, *odr-3* poate interacționa pe o altă cale de transducție a semnalului. *Odr-3* prezintă o capacitate neașteptată de a regla morfogeneza cililor olfactivi. La mutații nuli *odr-3*, cilii AWC în formă de evantai capătă o morfologie filamentoasă ca cilii AWA normali, în timp ce supraexprimarea *odr-3* în AWA își transformă cilii filamentoși într-o morfologie asemănătoare evantaiului.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unei metode de obținere a unui fenotip longeviv și sănătos de nematod *C. elegans* cu o durată atât medie cât și maximă mai mari decât a tulpinii sălbatică dar și față de a mutațiilor simpli.

Metodă de obținere a modelul genetic *C. elegans odr-3/ife-2* cu un fenotip longeviv, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că, constă în următoarele etape:

- o tulpină bacteriană HT115(DE3), respectiv clona RNAi R04A9.4, iar pentru control s-a folosit clona RNAi L4440, a fost crescută peste noapte la 37°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 14-16 h la 37°C, apoi bacteriile au fost sedimentate și resuspendate în mediu LB proaspăt astfel încât atât clona bacteriană R04A9.4 cât și clona L4440 să aibă aceeași densitate optică;

- au fost însămânțate volume identice din cele două clone obținute anterior pe plăci NGM suplimentat cu carbenicilină 25 μg/mL și IPTG 1 mM și au fost incubate timp de 48 h la temperatura camerei pentru inducerea efectului RNAi;

- plăcile astfel obținute au fost însămânțate în paralel cu 3-5 indivizi *C. elegans* aflați în stadiu larvar L4, tipul sălbatic N2 și mutantul *odr-3* (n1605) care au fost apoi transferați după 24 de ore pe o placă proaspătă și înlăturați după alte 24 de ore pentru a obține o populație sincronă de indivizi în stadiu larvar L4 prezentând o creștere a duratei medii și maxime de viață datorită unui efect epistatic rezultat prin pierderea funcției proteinei codificate de *odr-3* și reducerea expresiei genei *ife-2*.

Metoda de extindere a duratei de viață conform revendicării 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 dona 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 clonă bacteriană RNAi crescută peste noapte la 37°C pe plăci Petri conținând agar bacteriologic LB, suplimentat cu ampicilină 100 μg/mL

RO 134607 B1

1 și tetraciclină 100 µg/mL, a fost inoculată în mediu LB lichid suplimentat doar cu ampicilina
100 µg/mL și crescută timp de 14-16 h la 37°C. Bacteriile au fost sedimentate și
3 resuspendate în mediu LB proaspăt astfel încât atât dona bacteriană R04A9.4 cât și dona
L4440 să aibă aceeași densitate optică. Volume identice din cele două clone au fost
5 însămânțate pe plăci NGM suplimentat cu carbenicilina 25 µg/mL și IPTG 1 mM, și incubate
7 timp de 48 h 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
9 sălbatic N2 și mutantul *odr-3 (n1605)* (CGC, UoM, Minneapolis, MN, SUA), fiind apoi trans-
ferati după 24 h pe o placă proaspătă, și înlăturați după alte 24 h pentru a obține o populație
11 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,
13 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.

15 În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 și
2 care reprezintă:

17 - fig. 1, este 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*.

19 - fig. 2, prezintă curbele de supraviețuire pentru **1** tulpina sălbatică control (repre-
zentată cu roșu), **2** tulpina sălbatică supusă inactivării ARNm *ife-2* prin RNAi (reprezentată
21 cu verde), **3** mutanta *odr-3 (n1605)* (reprezentată cu albastru), **4** mutanta *odr-3 (n1605)* în
care expresia genei *ife-2* a fost redusă.

Exemplul 1

23 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
25 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
27 expresie redusă a genei *ife-2*), iar în cealaltă populație cu bacterii transformate cu vectorul
RNAi gol (expresia genei *ife-2* nefiind afectată). Experimentele au fost realizate în triplicat,
29 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,
31 folosind testul log-rank pentru compararea curbelor. Se poate observa din fig. 1 că atât
durata medie cât și durata maximă de viață ale tulpinei supuse dublei intervenții sunt mai
33 ridicate decât ale tulpinilor supuse intervențiilor genetice individuale, precum și decât ale
tulpinei sălbatică. Tulpina cu dublă intervenție genetică *odr-3 (n1605); ife-2* (RNAi) prezintă
35 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
37 trăiesc, în medie, cu doar 16%, respectiv 24% mai mult decât tulpina sălbatică.

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

39 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
41 număr restrâns de neuroni senzitivi fapt care constituie un avantaj datorită limitării efectelor
secundare sistemice ce pot apărea în urma modulării diferitelor căi de semnalizare implicate
43 în extinderea longevității. Acest model longeviv este foarte util în studiul îmbătrânirii, cu
precădere pentru identificarea altor intervenții genetice sau farmacologice, sau mecanisme
45 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
47 ales în identificarea altor intervenții și mecanisme sinergice cu *odr-3/ife-2*.

49 2. În identificarea mecanismelor anti-îmbătrânire prin dezvoltarea de medicamente
ce pot mima efectul epistatic al celor două intervenții genetice.

RO 134607 B1

Revendicări

1. Metodă de obținere a modelul genetic *C. elegans odr-3/ife-2* cu un fenotip longeviv, caracterizată prin aceea că: 1
- o tulpină bacteriană HT115(DE3), respectiv clona RNAi R04A9.4, iar pentru control s-a folosit clona RNAi L4440, a fost crescută peste noapte la 37°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 14-16 h la 37°C, apoi bacteriile au fost sedimentate și resuspendate în mediu LB proaspăt astfel încât atât clona bacteriană R04A9.4 cât și clona L4440 să aibă aceeași densitate optică; 3
 - au fost însămânțate volume identice din cele două clone obținute anterior pe plăci NGM suplimentat cu carbenicilină 25 µg/mL și IPTG 1 mM și au fost incubate timp de 48 h la temperatura camerei pentru inducerea efectului RNAi; 5
 - plăcile astfel obținute au fost însămânțate în paralel cu 3-5 indivizi *C. elegans* aflați în stadiu larvar L4, tipul sălbatic N2 și mutantul *odr-3* (n1605) care au fost apoi transferați după 24 de ore pe o placă proaspătă și înlăturați după alte 24 de ore pentru a obține o populație sincronă de indivizi în stadiu larvar L4 prezentând o creștere a duratei medii și maxime de viață datorită unui efect epistatic rezultat prin pierderea funcției proteinei codificate de *odr-3* și reducerea expresiei genei *ife-2*. 7
2. Model genetic *C. elegans odr-3/ife-2* cu un fenotip longeviv, obținut prin metoda definită în revendicarea 1. 9

(51) Int.Cl.

A01K 67/00 (2006.01);

G01N 33/50 (2006.01);

C12Q 1/00 (2006.01)

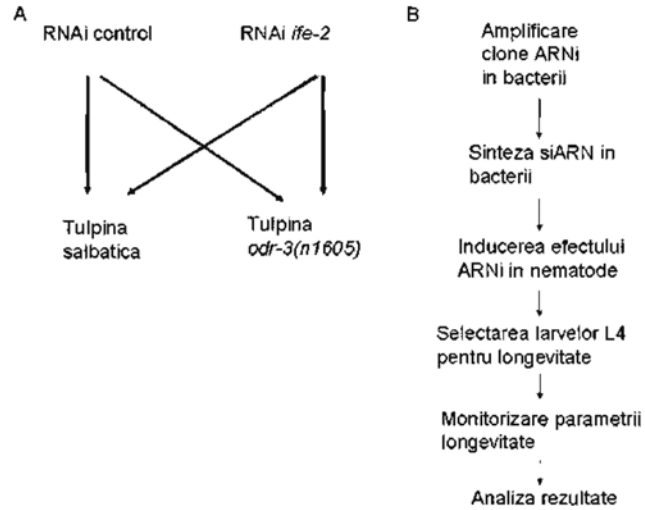


Fig. 1

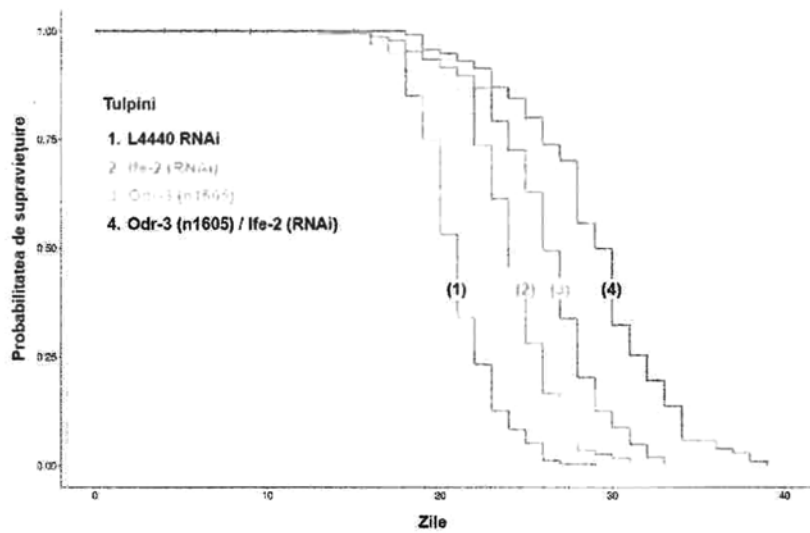


Fig. 2



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 262/2024