



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00597

(22) Data de depozit: 23/10/2023

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. 3/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN
S.NICOLAU", ȘOS.MIHAI BRAVU NR.285,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• IANCU IULIA VIRGINIA,
STR.CONSTANTIN BRÂNCUȘI, NR.7,
BL.D14, SC.1, ET.7, AP.32, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DIACONU CARMEN CRISTINA,
STR. BABA NOVAC, NR.21, G11, 7/74,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BOTEZATU ANCA, ALEEA CUMINȚENIA
PĂMÂNTULUI, NR.10, BL.C1.14, SC.B,
ET.4, AP.34, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CONSTANTINESCU ȘTEFAN NICULAE,
STR.PARIS, NR.7, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• MAMBET CRISTINA, STR.DR. IACOB
FELIX, NR.95, BL.17A, AP.25, BUCUREȘTI,
B, RO;
• FUDULU ALINA, STR.MESTEACĂNULUI,
NR.1, RÂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
• BLEOTU CORALIA, ALEEA LUNCA
BRADULUI NR.2, BL.H5, SC.6, AP.2,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• GURBAN PETRUȚA, STR. MAȘINA DE
PÂINE, NR.20, BL.OD37, SC.5, ET.9,
AP.214, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• PLESA ADRIANA, STR.FRASINULUI,
NR.18, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALBULESCU ADRIAN, STR.GHEORGHE
LAZĂR, NR.6, CORP B, AP.5, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TATIC AURELIA, STR.THEODOR
D.SPERANTIA, NR.108, BL.S22, SC.1,
AP.6, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• BARDAS ALEXANDRU, STR.BORSA,
NR.19-21, BL.8E, SC.1, AP.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) TEST PENTRU DETECȚIA ȚINTITĂ A METILĂRII ÎN NEOPLASMELE MIELOPROLIFERATIVE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de testare a gradului de metilare a promotorilor genelor TET 1 și TET2 în scop de diagnostic și tratament personalizat al pacienților cu neoplasme mieloproliferative. Metoda, conform invenției, constă în evaluarea procentului de metilare utilizând secvențe de oligonucleotide specifice (primeri) pentru genele TET1 și TET2, care pot ținti metilarea celulelor CpG din promotori, influențând astfel expresia

acestora, astfel că se pot selecta și monitoriza pacienții care pot beneficia de tratament cu inhibitori ai ADN metil transferazei, în funcție de metilarea promotorului genei TET2 sau demetilarea genei TET1, împreună cu detectarea mutațiilor în aceste gene.

Revendicări: 1
Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



12.2 Descrierea brevetului: Test pentru detectia tintita a metilarii in neoplasmele mieloproliferative

Invenția se referă la evaluarea țintită a a gradului de metilare a promotorilor genelor TET1 și TET2 care poate fi utilizată pentru diagnosticul și tratamentul individualizat al pacienților cu neoplasme mieloproliferative. Testul constă în evaluarea gradului de metilare utilizând secvențe oligonucleotidice specifice (primeri) pentru genele TET1 și TET2 care pot suferi metilarea insulelor CpG de la nivelul promotorilor afectându-le astfel expresia. Cuantificarea gradului de metilare prin utilizarea acestui test poate ajuta nu numai în diagnosticul cât și în urmărirea răspunsului la tratamentul inițiat la pacienții cu boli mieloproliferative.

Design-ul primerilor specifici pentru metilarea genelor TET1, TET2

În acest scop s-a avut în vedere construirea unor primeri specifici pentru metilare care vizează regiunea promotor a genelor TET1 și TET2, utilizându-se un soft special pentru identificare insulelor CpG de la nivelul promotorului și proiectarea primerilor specifici de metilare și anume MethPrimer (<https://www.urogene.org/methprimer/>; Li, L. C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427-1431.)

Referitor la gena TET1, au fost identificate la nivelul promotorului o serie de insule CpG (zonele albastre din figura 1) care conțin un procent ridicat de CG (citozină-guanină). A fost selectată insula cu cea mai mare dimensiune (350 pb), aceasta reprezentând regiunea țintă pentru secvențele noi de primeri create.

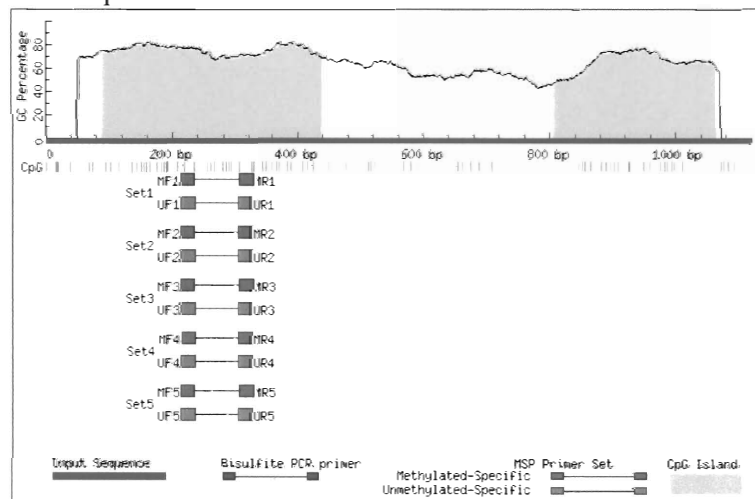


Figura 1. Reprezentarea grafica a insulelor CpG pentru gena TET1

Au fost astfel create două seturi de primeri, una pentru secvența metilată (primeri M) și una pentru secvența nemetilată (primeri U). În vederea alegerii primerilor specifici pentru metilare au fost luați în considerare cațiva parametri precum: specificitatea primerilor, însemnând că primerii M prezintă cât mai puține nepotriviri (mismatches) cu secvența nemetilată de ADN și reciproc referitor la primerii U; temperatura de melting a primerilor (T_m) pentru cele două perechi să fie apropiată pentru a asigura eficiența în aceeași reacție de PCR.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



În mod asemanator s-a procedat și pentru primerii țintind gena TET2, în figura 2 fiind reprezentată regiunea țintă pentru primerii de metilare.

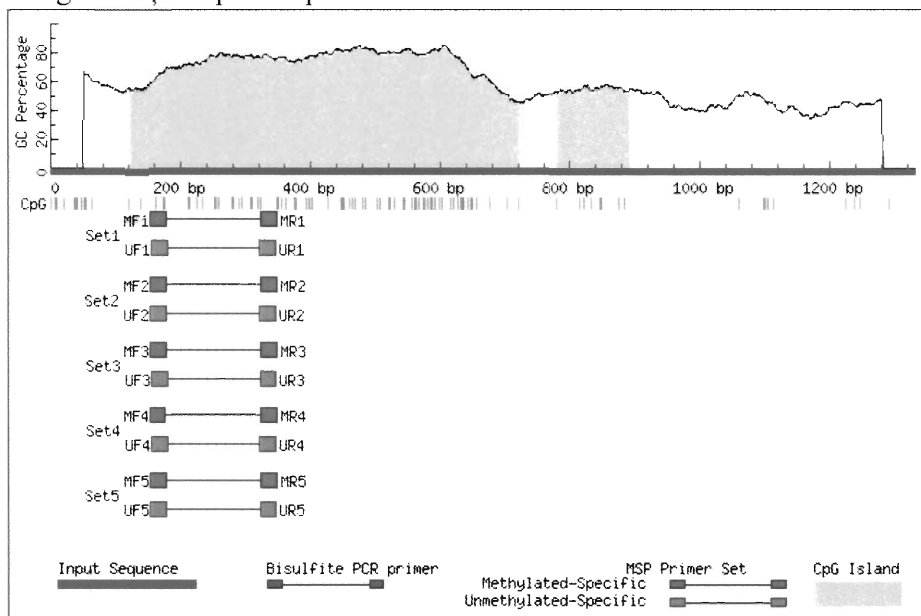


Figura 2. Reprezentarea grafică a insulelor CpG pentru gena TET1

O etapă importantă a constat în validarea experimentală și optimizarea condițiilor de PCR pentru primerii astfel creați. În acest scop s-au folosit probe control (martori) de ADN metilat/nemetilat, seturile de primeri fiind testate în reacția de PCR cantitativ specific pentru metilare (qMSPCR), optimizându-se temperatura de atașare cât și concentrația primerilor în vederea obținerii celor mai bune condiții de lucru.

Problema

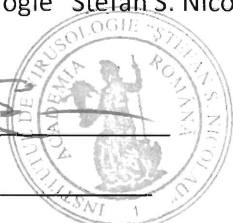
Modificările epigenetice reprezintă un semn distinctiv al cancerului ce apar cu mult înainte de manifestările patologice ale bolii și au proprietatea extrem de importantă de a fi reversibile. Datorită rolului central în multiple procese biologice și a numeroaselor interacțiuni celulare, factorii epigenetici sunt considerați piese centrale în patogeneza cancerului. Acest lucru a condus la un studiu intens a metilării ADN în ultimele decenii, cu accent pe insulele CpG asociate promotorilor genelor și pe secvențele codificatoare.

Gena TET1 este primul membru identificat al familiei de enzime care convertesc 5-metil citozina (5-mC) la 5-hidroximetil citozina (5-hmC). În leucemia acută mieloidă (LAM) gena TET1 a fost inițial descoperită ca fiind fuzionată cu gena MLL, având o expresie crescută, însă, rolul ei nu a fost complet elucidat. Informațiile despre funcțiile acestei gene sunt deseori contradictorii, fiind observate valori scăzute ale expresiei tuturor membrilor acestei familii de enzime (TET1, TET2 și TET3) în diferite tipuri de cancer, precum și valori semnificativ crescute ale TET1 în leucemii care prezintă fuziunea genei TET1 cu MLL, ceea ce conduce la o creștere puternică a nivelului global de 5-hmC. (Huang, H., Jiang, X., Li, Z., Li, Y., Song, C. X., He, C., Sun, M., Chen, P., Gurbuxani, S., Wang, J., Hong, G. M.,

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Elkahloun, A. G., Arnovitz, S., Wang, J., Szulwach, K., Lin, L., Street, C., Wunderlich, M., Dawlaty, M., Neilly, M. B., ... Chen, J. (2013). TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 11994–11999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310656110>

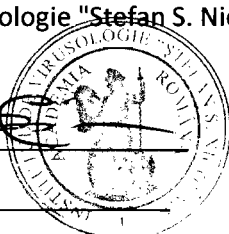
Expresia genei TET1 variază puternic între diferitele forme ale neoplasmelor mieloproliferative. În leucemia acută mieloidă (LAM) gena TET1 este subexprimată, în timp ce în leucemia limfoblastică acută cu celule T (LLA-T) nivelurile de expresie sunt înalte, fiind esențiale pentru dezvoltarea ei. (Zhang T, Zhao Y, Zhao Y, Zhou J. Expression and prognosis analysis of family in acute myeloid leukemia. *Aging* (Albany NY). 2020. <https://doi.org/10.18632/aging.102928>., Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-210039>). Experimentele de knock-down au arătat totodată ca lipsa expresiei TET1 în șoareci nu afectează proliferarea celulelor T normale. Promovarea proliferării leucemice dată de TET1 este dependentă de proprietatea catalitică a acestei proteine de a menține nivelurile de 5-hmC, controlând astfel ciclul celular, activitatea genelor de reparare ADN, sau activitatea oncogenelor asociate LLA-T. Supraexpresia domeniului catalitic activ a TET1 este suficientă pentru a crește nivelurile globale de 5-hmC și proliferarea celulelor LLA-T *in vivo*. (Bamezai S, Demir D, Pulikkottil AJ, Ciccarone F, Fischbein E, Sinha A, et al. TET1 promotes growth of T-cell acute lymphoblastic leukemia and can be antagonized via PARP inhibition. *Leukemia*. 2021;35(2):389–403. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0864-3>.)

Un alt fenomen de remarcat este că gena TET2 acumulează mutații somatice odată cu înaintarea în vârstă, mutații care au fost descoperite în indivizi sănătoși, cu hematopoieză clonală (Busque, L., Patel, J. P., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., Hassimi, M., Socci, N., Bhatt, P. K., Gonen, M., Mason, C. E., Melnick, A., Godley, L. A., Brennan, C. W., Abdel-Wahab, O., & Levine, R. L. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature genetics*, 44(11), 1179–1181. <https://doi.org/10.1038/ng.2413>). Gena TET2 suferă mutații frecvent la pacienții cu LAM, sindroame mielodisplazice (SMD) sau leucemii mioeloid cronice (LMC) (Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The ten-eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*. 2014;28(3):485–96. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.337>). Cateva studii au sugerat că mutațiile TET2 sunt printre primele, dacă nu chiar primele evenimente desfășurate în evoluția clonală a bolilor hematologice (Jan, M., Snyder, T. M., Corces-Zimmerman, M. R., Vyas, P., Weissman, I. L., Quake, S. R., & Majeti, R. (2012). Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Science translational medicine*, 4(149), 149ra118. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004315>)(Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Morabito, M., Preudhomme, C., Berthon, C., Adès, L., Fenaux, P., Platzbecker, U., Gagey, O., Rameau, P., Meurice, G., Oréar, C.,

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Delhommeau, F., Bernard, O. A., Fontenay, M., Vainchenker, W., Droin, N., & Solary, E. (2013). Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*, *121*(12), 2186–2198. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-440347>). Din aceste motive se poate specula că pot exista mutații latente inactivatoare ale genei TET2 în celulele hematopoietice cu ani sau decenii înainte de debutul bolii și că în această perioadă, metilarea progresivă la nivelul regiunilor enhancer poate conduce la o expresie aberantă și dominare clonală. În plus, în unii indivizi, aceste celule premaligne pot acumula o serie de mutații adiționale, care pot conduce la afecțiuni hematologice maligne asociate cu mutațiile TET2.

În cazul LAM, pierderea TET2 și reducerea nivelului global de 5-hmC este asociat cu o supraviețuire slabă. (Pethusamy K., Seethy A., Dhar R., Karmakar A., Chaudhary S., Bakhshi S., P J.K., Chopra A., Chauhan S.S., Karmakar S. Loss of TET2 with reduced genomic 5-hmC is associated with adverse-risk AML. *Leuk. Lymphoma*. 2022:1–7. doi: 10.1080/10428194.2022.2126278) În cazul leucemiei mielomonocitare juvenile (LMMJ), un procent ridicat de metilare a ADN indică o șansă de recidivă ridicată și o supraviețuire generală slabă, în timp ce un procent scăzut de metilare a ADN este asociat cu un rezultat favorabil. Studiile au arătat că silențierea TET2 are loc prin hipermetilarea promotorului acestuia, în special în cazul LLA-T. Tratatamentul cu un agent demetilant, 5-azacitidina, deși are un efect citotoxic puternic asupra celulelor T cu expresie TET2 silențiată, a condus la re-expresia normală a genei. (Bensberg, M., Rundquist, O., Selimović, A., Lagerwall, C., Benson, M., Gustafsson, M., Vogt, H., Lentini, A., & Nestor, C. E. (2021). TET2 as a tumor suppressor and therapeutic target in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(34), e2110758118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110758118>)

S-a demonstrat că noi tipuri de medicamente cu efect epigenetic au sporit eficiența tratamentului standard anti-cancer, îmbunătățind chemosensibilitatea, radiosensibilitatea, și conducând la rezultate favorabile ale imunoterapiei într-o serie de patologii maligne ce au introdus și agenți epigenetici în schema de tratament. În baza acestor rezultate, azacitidina și decitabina au fost aprobate pentru terapia SMD și LAM din 2004, respectiv 2006. (Ginder, G. D., & Williams, D. C., Jr (2018). Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets. *Pharmacology & therapeutics*, *184*, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.11.002>)

Conform unui studiu clinic de fază 1 publicat în 2018, azacitidina poate fi folosită în siguranță împreună cu chimioterapia intensivă în leucemia pediatrică mieloidă acută recurentă și oferă rezultate încurajatoare (A Phase I Study of 5-Azacytidine in Combination With Chemotherapy for Children With Relapsed or Refractory ALL or AML) (Sun, W., Triche, T., Jr, Malvar, J., Gaynon, P., Sposto, R., Yang, X., Bittencourt, H., Place, A. E., Messinger, Y., Fraser, C., Dalla-Pozza, L., Salhia, B., Jones, P., Wayne, A. S., Gore, L., Cooper, T. M., & Liang, G. (2018). A phase 1 study of azacitidine combined with chemotherapy in childhood leukemia: a report from the TACL consortium. *Blood*, *131*(10), 1145–1148. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-803809>). În 2019, un copil diagnosticat

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



cu LMMJ, cu mutații somatice în KRAS și cu monosomie 7, a intrat în remisie în urma monoterapiei cu azacitidină (Hashmi, S. K., Punia, J. N., Marcogliese, A. N., Gaikwad, A. S., Fisher, K. E., Roy, A., Rao, P., Lopez-Terrada, D. H., Ringrose, J., Loh, M. L., Niemeyer, C. M., & Rau, R. E. (2019). Sustained remission with azacitidine monotherapy and an aberrant precursor B-lymphoblast population in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatric blood & cancer*, 66(10), e27905. <https://doi.org/10.1002/pbc.27905>). Un adolescent cu leucemie mielomonocitică cronică a primit venetoclax și decitabină ca trecere spre transplantul cu celule stem hematopetice (Molina, J. C., Asare, J. M., Tuschong, L., West, R. R., Calvo, K. R., Persky, R., Boyce, A. M., Hammoud, D. A., Holland, S. M., Hickstein, D., & Shah, N. N. (2021). Venetoclax/decitabine for a pediatric patient with chronic myelomonocytic leukemia. *Pediatric blood & cancer*, 68(3), e28865. <https://doi.org/10.1002/pbc.28865>).

În ultimii ani, efectele sinergice ale agenților epigenetici în terapia anti-cancer au fost evidențiate din ce în ce mai mult. Combinarea lizin demetilazei (LSD1) și inhibitorii JAK-STAT au avut efecte sinergice antileucemice într-un model de leucemie mieloidă asociată cu sindrom Down. (Grimm, J., Bhayadia, R., Gack, L., Heckl, D., & Klusmann, J. H. (2022). Combining LSD1 and JAK-STAT inhibition targets Down syndrome-associated myeloid leukemia at its core. *Leukemia*, 36(7), 1926–1930. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01603-3>)

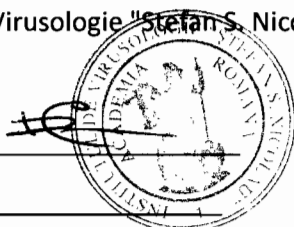
Profilurile epigenetice ale tumorilor pediatrice sunt semnificativ diferite față de cancerule adulte. Impactul biologic al unor reglatori epigenetici depinde puternic de micromediul țesutului. Același agent de modificare a cromatinei poate avea rol atât de supresor tumoral cât și de oncogenă, în funcție de tipul tumorii. Acest lucru este influențat de heterogenitatea genetică și epigenetică intratumorală, fapt care sporește rezistența tumorii la terapie, contribuie la evoluția ei și la recidivă (Karlsson, J., Valind, A., Holmquist Mengelbier, L., Bredin, S., Cornmark, L., Jansson, C., Wali, A., Staaf, J., Viklund, B., Øra, I., Börjesson, A., Backman, T., Braekeveldt, N., Sandstedt, B., Pal, N., Isaksson, A., Lackner, B. G., Jonson, T., Bexell, D., & Gisselsson, D. (2018). Four evolutionary trajectories underlie genetic intratumoral variation in childhood cancer. *Nature genetics*, 50(7), 944–950. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0131-y>) (Ciceri, S., Carezzo, A., Iannó, M. F., Bertolotti, A., Morosi, C., Luksch, R., Spreafico, F., Collini, P., Radice, P., Massimino, M., De Cecco, L., & Perotti, D. (2022). Gene expression-based dissection of inter-histotypes, intra-histotype and intra-tumor heterogeneity in pediatric tumors. *Scientific reports*, 12(1), 17837. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20536-6>).

Solutia este îmbunătățirea protocoalelor de investigație și diagnostic pentru neoplasme mieloproliferative. Testul pentru identificarea nivelului de metilare a promotorilor genelor TET1 și TET2 alături de mutațiile acestora poate ajuta în triajul pacienților cu neoplasme mieloproliferative, pentru diagnostic și tratament. Studiul prezentat în această cerere indică diferențe semnificative între gradul de metilare a genelor TET1 și TET2 în loturile studiate față de control (Anova $p=0,0084$, respectiv $p=0.0009$).

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Gena TET1 se exprimă în măduva hematofomatoare la nivel scăzut indicând faptul că promotorul este funcțional, fiind parțial metilat. Rezultatele noastre au evidențiat un procent intermediar de metilare în control (mediana=36.26, interval:19.49-52.77) și semnificativ mai scăzut la pacienții cu LMMJ (mediana=24.6, interval:10.43-31.52; $p=0.0113$) și SMD (mediana=21.77, interval:16.76-24.39; $p=0.0019$). Pacienții diagnosticați cu LAM post mielofibroza (LAM-postMF) și cei cu LMMC prezintă valori similare cu lotul control (Desene: Figura 2).

Gena TET2 are o expresie crescută în măduva hematofomatoare ceea ce înseamnă că promotorul prezintă un grad mai mic de metilare în condiții normale. Rezultatele noastre indică un procent scăzut de metilare în grupul control (mediana=8.07, limite:4.85-41.18) și semnificativ mai crescute la pacienții cu LAM post-MF (mediana=96.63, limite: 91.84-99.84; $p<0.0001$) și LMMC (mediana=59.44, limite:56.42-61.64; $p=0.0107$). Pacienții diagnosticați cu LMMJ și cei cu SMD prezintă valori crescute intermediar față de lotul control (Desene; Figura 4).

Avantajul soluției propuse este că ar putea fi utilizat în diagnosticul și evaluarea terapiei pacienților cu neoplasme mieloproliferative, ajutând la selecția pacienților care pot fi supuși tratamentului cu inhibitori ai metilării ADN. Pacienții indentificați ca prezentând promotorul genei TET2 metilat sau demetilat în cazul genei TET1, alături de diagnosticarea mutațiilor în aceste gene, pot beneficia de o evaluare atentă a statusului epigenetic la nivelul întregului genom pentru a indentifica primele evenimente moleculare asociate evoluției bolii și eventual a unor ținte pentru medicamente ce acționează asupra întregii ierarhii clonale a celulelor hematopoietice maligne. Analiza acestor modificări epigenetice permite nu numai diagnosticul, cât și evaluarea răspunsului la tratament, metilarea ADN fiind un proces reversibil.

Luând toate aceste date în calcul, intervențiile la nivelul epigenetic pot deschide noi orizonturi în terapia bolilor maligne ce afectează copii. O imagine cât mai detaliată la nivel atât genetic, cât și epigenetic este necesară pentru administrarea unei combinații eficiente de terapie convențională și agenți epigenetici, pentru a combate afecțiunile din etapele cele mai incipiente. (Gaál Z. (2022). Targeted Epigenetic Interventions in Cancer with an Emphasis on Pediatric Malignancies. *Biomolecules*, 13(1), 61. <https://doi.org/10.3390/biom13010061>)

Se prezinta în continuare 3 exemple ale invenției în legătură cu figurile 1,2,3,4 și tabelele 1 și 2:

Figura 1. Evaluarea cantitativă a gradului de metilare a genei TET1

Figura 2. Nivelul de metilare a genei TET1 în diverse grupe de pacienți

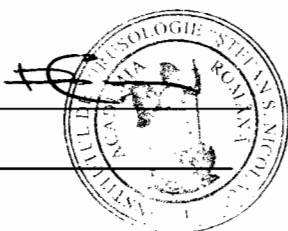
Figura 3. Evaluarea cantitativă a gradului de metilare a genei TET2

Figura 4. Nivelul de metilare a genei TET2 în diverse grupe de pacienți

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Exemplul 1. Izolarea ADN din sânge

Probele de sânge de la pacienții care au fost incluși în studiu au fost recoltate pe EDTA și utilizate pentru izolarea ADN cu ajutorul următorului protocol: într-un tub de 50 mL se adaugă sângele, se completează cu buffer de liza RBC (hematii) până la 50 mL, iar mixul obținut se lasă pe gheață timp de 10 min, agitându-se ușor din când în când. Se centrifughează la 2000 rpm timp de 10 min la o temperatură de 4°C. Se aruncă supernatantul, apoi se adaugă din nou buffer de liza RBC și se repetă centrifugarea în aceleași condiții. În continuare, pentru 1 mL de sânge se adaugă: 1mL TLN (tampon de liza nucleii), 50 μL SDS 10% și 1.25 mL Proteinază K și se agită prin inversie. Se lasă la incubat la temperatura camerei peste noapte.

A doua zi, se adaugă 1 mL TLN pentru 1 mL de sânge, se agită prin inversie și se incubează timp de 5 min la o temperatură de 55°C, pe baie de apă. În continuare, se adaugă pentru fiecare mL de sânge o cantitate de 300 μL de NaCl 6M și se vortexează timp de 25 sec. Se centrifughează la 3800 rpm timp de 15 min la o temperatură de 25°C. În această etapă se schimbă tubul și se adaugă izopropanol în cantitate egală cu volumul probei. Se agită manual cu mișcări circulare până precipită ADN. Se centrifughează 3800 rpm timp de 10 min și se îndepărtează supernatantul cu grijă. Se adaugă 1 mL de etanol 70% de la congelator și se centrifughează din nou la 3000 rpm timp de 5 min. Se îndepărtează etanolul și se lasă la uscat. Se adaugă 200 μL de TE pentru rehidratare și se păstrează la -20°C.

Exemplul 2 Conversia cu bisulfita a probelor izolate de ADN și a martorilor de metilare.

Pentru a putea fi evaluat gradul de metilare, probele de la pacienți și martorii de metilare (ADN total metilat și ADN nemetilat) au fost tratate cu bisulfita de Na utilizând kit-ul EpiTect (Qiagen) pentru conversia citozinei nemetilate în uracil. Etapele tratamentului cu ajutorul EpiTect Bisulfite sunt: conversia mediata de bisulfita a citozinelor nemetilate, legarea ADN monocatenar convertit de membrana unei coloane, desulfonarea ADN atașat de membrană, spălarea membranei ce conține ADN pentru a îndepărta agenții de desulfonare și eluarea ADN purificat. Pentru tratament cantitatea de ADN utilizată trebuie să fie între 700 – 1000 ng. ADN obținut se va folosi în continuare pentru tehnicile utilizate în prezent pentru analiza metilării ADN. Se prepară amestecul de reactivi utilizând tuburi de 500 μl conform tabelului 1.

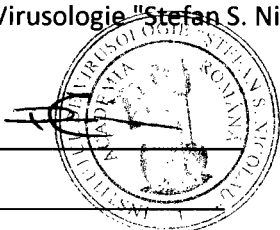
Tabelul 1. Protocol pentru mix de reacție de tratament cu bisulfita de Na

| Componente | Volum per reacție |
|--------------------|--------------------------|
| ADN genomic | Variabil (pana la 20 μl) |
| Bisulfite Mix | 85 uL |
| DNA Protect Buffer | 35 uL |
| Apa fara nucleaze | Variabil |
| Volum total | 140uL |

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Se amestecă fiecare tub vortexând ușor. Culoarea albastră a DNA protect buffer trebuie să devină verde, ceea ce indică un pH corect al probei. Reacția de conversie a ADN se realizează într-un termocycler utilizând următorul program (Tabel 2):

Tabelul 2. Condițiile de reacție pentru conversia citozinei

| Etapa | Timp | Temperatura |
|------------|---|-------------|
| Denaturare | 5 min | 95°C |
| Incubare | 25 min | 60°C |
| Denaturare | 5 min | 95°C |
| Incubare | 85 min (1h 25min) | 60°C |
| Denaturare | 5 min | 95°C |
| Incubare | 175 min (2h 55min) | 60°C |
| Menținere | se poate lăsa în termocycler peste noapte | 20°C |

După incubare probele sunt centrifugate și transferate în tuburi de 1.5 mL pentru purificare. Se adaugă 560 μ l Buffer BL care conține 10 μ g/mL carrier RNA și se transferă pe coloană amestecul. Se centrifughează 1 min la viteză maximă, se aruncă lichidul cumulat și se păstrează tubul de colectare;

Se adaugă 500 μ l Wash Buffer BW (tampon de spălare) în rezervorul tubului cu filtru. Se centrifughează 1 min la viteză maximă, se aruncă lichidul cumulat și se păstrează tubul de colectare. Se adaugă 500 μ l Buffer BD (tampon de desulfonare) în rezervorul tubului cu filtru și se incubează 15 min la temperatura camerei (15-25°C). Se centrifughează 1 min la viteză maximă, se aruncă lichidul cumulat și se păstrează tubul de colectare. Se adaugă 500 μ l Wash Buffer BW (tampon de spălare) în rezervorul tubului cu filtru. Se centrifughează 1 min la viteză maximă, se aruncă lichidul cumulat și se păstrează tubul de colectare (repetare). Se aruncă tubul de colectare și se pune unul nou, se centrifughează 1 min la viteză maximă pentru a elimina orice urmă de lichid reziduală. Se incubează tuburile 5 min la 56°C. Se adaugă 20 μ l Elution Buffer EB (tampon de eluție) în rezervorul tubului cu filtru. Se centrifughează 1 min la 12000 RPM. După tratament probele sunt stocate la -80°C.

Exemplul 3. Amplificarea regiunilor bogate în insule CpG din promotorul genei TET1 și TET2

Pentru evaluarea cantitativă a gradului de metilare a unei probe s-a utilizat tehnica de PCR sensibil la metilare (qMSP). Pentru aceasta, s-au obținut curbe standard utilizând controlul pozitiv (ADN total metilat) și negativ (ADN total nemetat). Controalele (pozitiv și negativ) au fost diluate pentru a obține o diluție serială: 5 pg, 50 pg, 500 pg, 5 ng, și 50 ng conform instrucțiunilor Absolute Quantitation Using Standard Curve Getting Started Guide (Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System, Foster City, CA) (Desene: Figura 1 și 3). Toate probele de ADN sunt diluate până la o concentrație finală de 10 ng/ μ l. Pentru amplificare este utilizat un volum de 12.5 μ l de Maxima SYBR Green Master

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



Mix (ROX) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), primeri în concentrație de $0.3\mu\text{M}$ și $5\mu\text{l}$ de ADN. Direct Q-MSP este realizat într-un volum final de $25\mu\text{l}$, iar condițiile utilizate sunt: 95°C -10 min (1 ciclu), și 40 cicluri la 95°C pentru 15 sec și 60 sec la temperatura de anealing specifică genei țintă (59°C) .

Metoda de calcul a procentului de metilare. Procentul de metilare este calculat conform metodei publicate de Fackler et al (Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, Garrett E, Argani P, Sukumar S. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter). Procentul de metilare este calculat utilizând formula: $M = 100 \times \frac{\text{ng molecule metilate gena A}}{\text{ng molecule metilate gena A} + \text{ng molecule nmetilate gena A}}$, numărul total de molecule ADN țintă fiind reprezentat de suma moleculelor M+U.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



12.6. Lista de secvențe de nucleotide și/sau aminoacizi, parte a descrierii**TET1**

NCBI Reference Sequence: NC_000010.11

Regiunea țintă pentru secvențele noi de primeri create a fost cea de a doua insula CpG cu cea mai mare dimensiune și anume 350 pb (din poziția 366 până la 715).

- **Set primeri TET1 secvența metilată M:**

TET1M Forward primer (5'-3'): GTTTTGCGTTTTTGGTTTTTTC

TET1M Reverse primer (5'-3'): CCGAAAACATTATTTATCTCCGA

Tm: 59°C

- **Set primeri TET1 secvența nemetilată U:**

TET1U Forward primer (5'-3'): GTTTTGTGTTTTTGGTTTTTTTGT

TET1U Reverse primer (5'-3'): CAAAAACATTATTTATCTCCAAC

Tm: 57°C

TET2

NCBI Reference Sequence: NG_028191.1

Regiunea țintă pentru secvențele de primeri pentru metilare a fost insula CpG cea mai mare densitate având 601 pb (401 - 1001).

- **Set primeri TET2 secvența metilată M:**

TET2M Forward primer (5'-3'): TTTTATTTTCGTTTTTAATTTTCGC

TET2M Reverse primer (5'-3'): AATAAAAACCTAAACTACCCTCACG

Tm: 59°C

- **Set primeri TET2 secvența nemetilată U:**

TET2U Forward primer (5'-3'): TTTTATTTTGTTTTTAATTTTGTGT

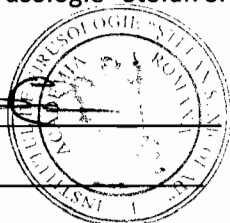
TET2U Reverse primer (5'-3'): TAAAAACCTAAACTACCCTCACACC

Tm: 57°C

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



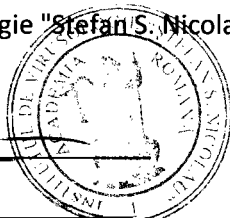
12.3. Revendicare:

Test pentru detecția țintită a metilării în scop de diagnostic și tratament personalizat al pacienților cu neoplasme mieloproliferative, prin evaluarea gradului de metilare a promotorilor genelor TET1 și TET2, utilizând secvențe oligonucleotidice specifice (primeri) care pot ținti metilarea insulelor CpG din promotori, astfel permițând selecția și monitorizarea pacienților care pot beneficia de tratament cu inhibitori ai ADN metil transferazei, în funcție de metilarea promotorului genei TET2 sau demetilarea genei TET1, împreună cu detectarea mutațiilor în aceste gene.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



12.4. Desene

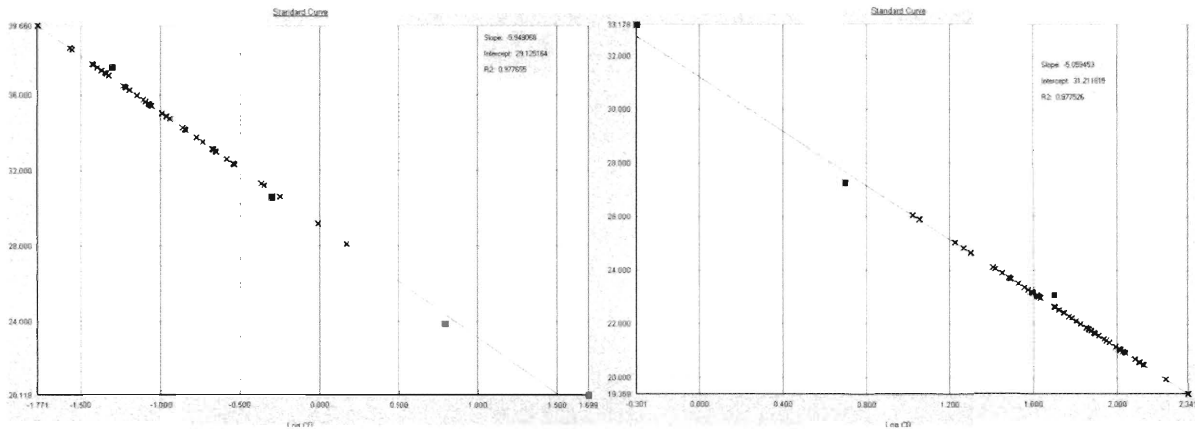


Figura 1.

TET1

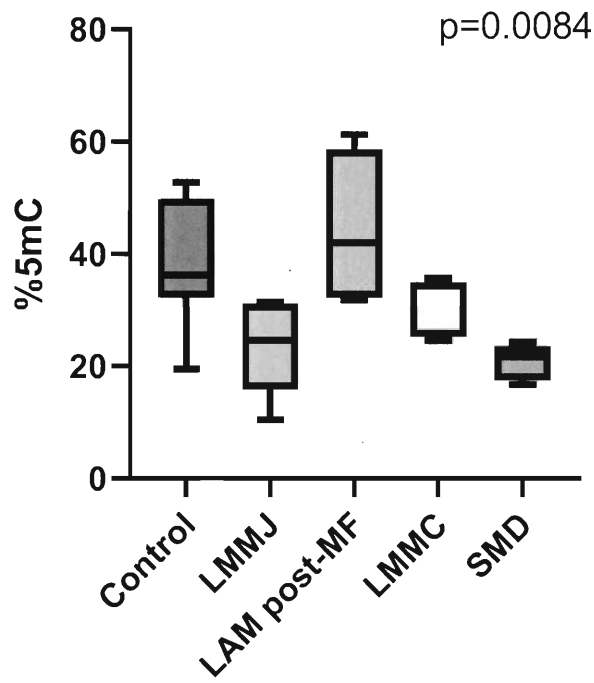


Figura.2

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____



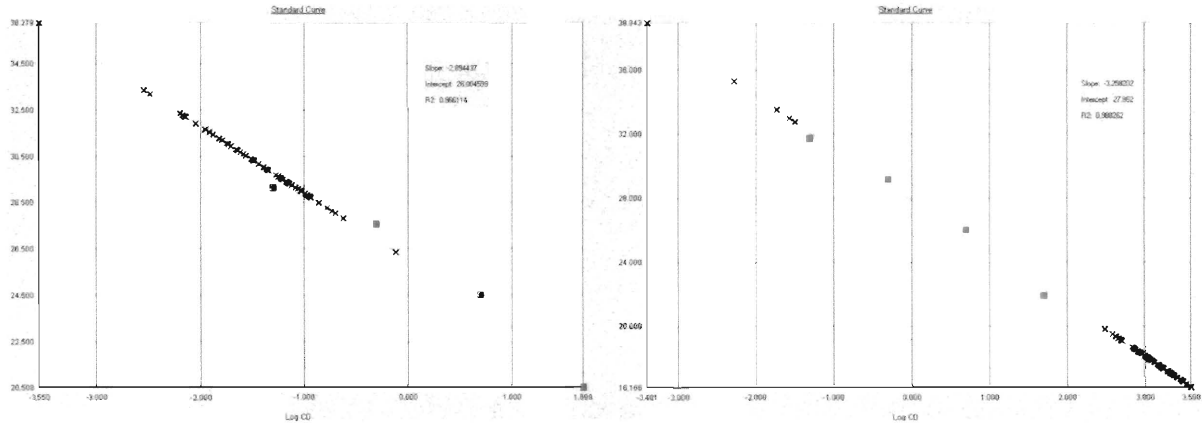


Figura 3.

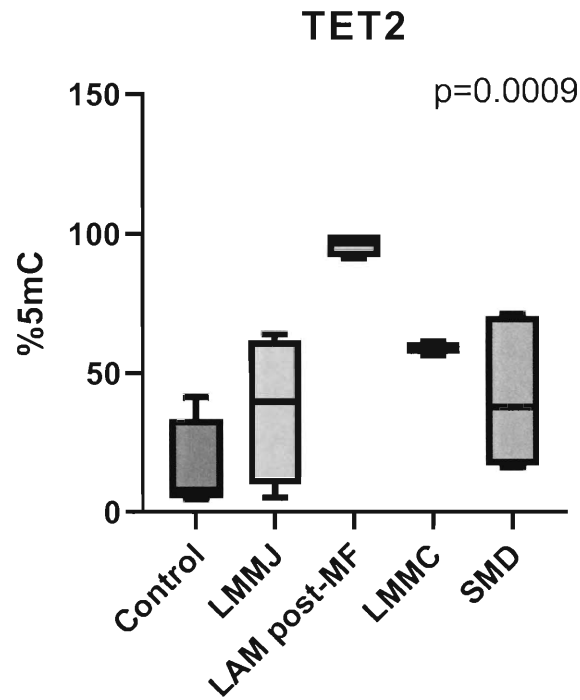


Figura 4.

Institutul de Virusologie "Stefan S. Nicolau" Director Dr. Carmen C. Diaconu, CSI

Semnatura: _____

L.S. _____