



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00651

(22) Data de depozit: 19/10/2022

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. 4/2024

(71) Solicitant:

- INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN S.NICOLAU", ȘOS.MIHAI BRAVU NR.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL DE ENDOCRINOLOGIE "C.I.PARHON" BUCUREȘTI, BD.AVIATORILOR, NR.34-36, BUCUREȘTI, B, RO;
- NET-CONNECT BUSINESS SUPPORT S.R.L., STR.ION ROATĂ, NR.9, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- BOTEZATU ANCA, ALEEA CUMINȚENIA PĂMÂNTULUI, NR.10, BL.C1.14, SC.B, ET.4, AP.36, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- FUDULU ALINA, STR. MESTEACĂNULUI, NR.1, RÂMNICU SĂRAT, BZ, RO;
- ALBULESCU ADRIAN, STR.GHEORGHE LAZĂR, NR.6, CORP B, AP.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- PLESA ADRIANA, STR.FRASINULUI, NR.18, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

- 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;
- DINU-DRAGANESCU DANIELA ANCA, SPLAIUL UNIRII, NR.8, BL.B4, SC.3, AP.60, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- VLADOIU SUZANA VILMA, BD.IULIU MANIU, NR.69, BL.5P, SC.6, ET.10, AP.245, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BADIU CORIN, STR.CONSTANTIN ARICESCU, NR.21, BL.20, SC.A, AP.3, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- MURESAN ANDREI, ALEEA RÂMNICU VÂLCEA, NR.20-22, ET.3, AP.3-4, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- POPA OANA, ALEEA POIANA CERNEI, NR.6, BL.E6, SC.A, ET.3, AP.17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- MARIN OCTAVIAN, STR.GAROFIȚEI, NR.33B, BRAGADIRU, IF, RO

(54) **PANEL DE OLIGONUCLEOTIDE ȚINTITE
PENTRU DIAGNOSTICUL EPIGENETIC AL INFERTILITĂȚII
MASCULINE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de utilizare a unui panel de oligonucleotide țintite pentru diagnosticul epigenetic și prognosticul terapiei la pacienții de sex masculin cu infertilitate idiopatică. Metoda, conform invenției, constă în etapele: conversia cu bisulfit a probelor izolate de ADN și a marcorilor de metilare, amplificarea regiunilor bogate în insule CpG din promotorul genelor CCDC103

și ZMYND15, amplificarea regiunilor bogate în insule CpG din promotorul genelor CYP1A1, DNAAF4 și CFTR1, și analiza gradului de metilare pentru genele selectate implicate în infertilitatea masculină.

Revendicări: 1
Figuri: 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a. 2022 ee 651
Data depozit	1.9.-10.- 2022

12.2 Descriere: Panel de oligonucleotide tintite pentru diagnosticul epigenetic al infertilitatii masculine.

Inventia se refera la un panel care poate fi utilizat la evaluarea tintita a gradului de metilare al unor gene pentru diagnosticul si tratamentul individualizat al pacienților cu infertilitate masculina idiopatica. Panelul consta in secvente oligonucleotidice specifice (primeri) unor gene tintite care pot suferi metilarea insulelor CpG de la nivelul promotorilor afectandu-le astfel expresia. Cuantificarea gradului de metilare prin utilizarea acestui panel in secventierea de noua generatie (NGS) poate ajuta nu numai in diagnosticul cat si in urmarirea raspunsului la tratamentul initiat la pacientii infertile.

Pentru identificarea potentialilor biomarkeri s-a utilizat baza de date (RGD, <https://disease-ontology.org/>) din care s-au selectat in functie de diagnostic doar genele a caror expresie a fost gasita scazuta intr-un numar mare de pacienti infertili. In continuare s-a verificat daca promotorul acestor gene prezinta insule CpG Tabel1.

Tabel.1 Rezultatele interogarii bazei de date RDG

	Gena	Nivelul expresiei*		
		Mediu	Scazut	Sub limita
Inferilitate masculina	CCDC103	1	136	19
	CFTR	17	571	67
	CYP11A1	7	251	385

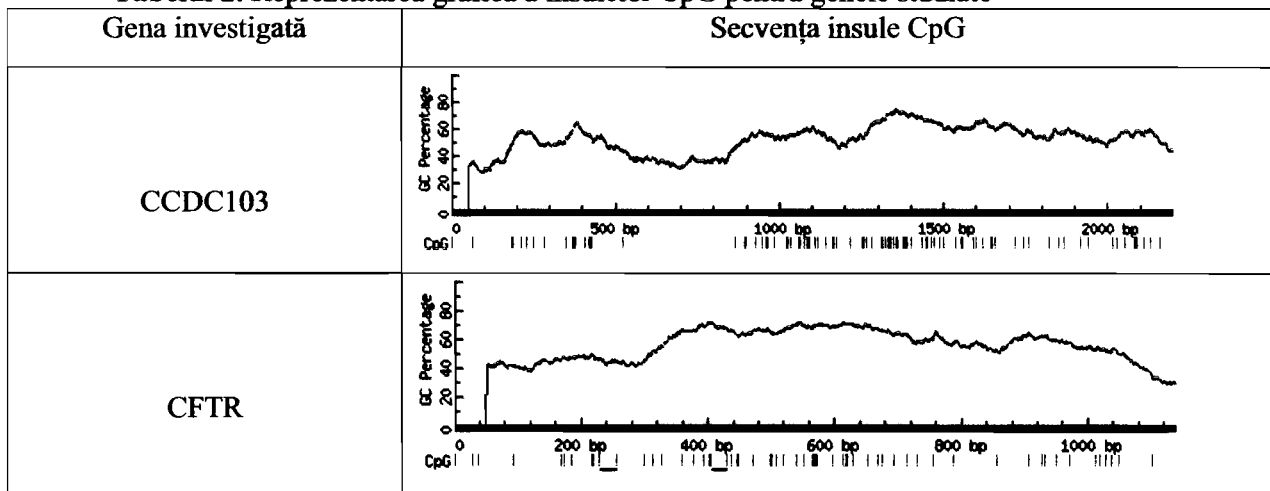
1

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

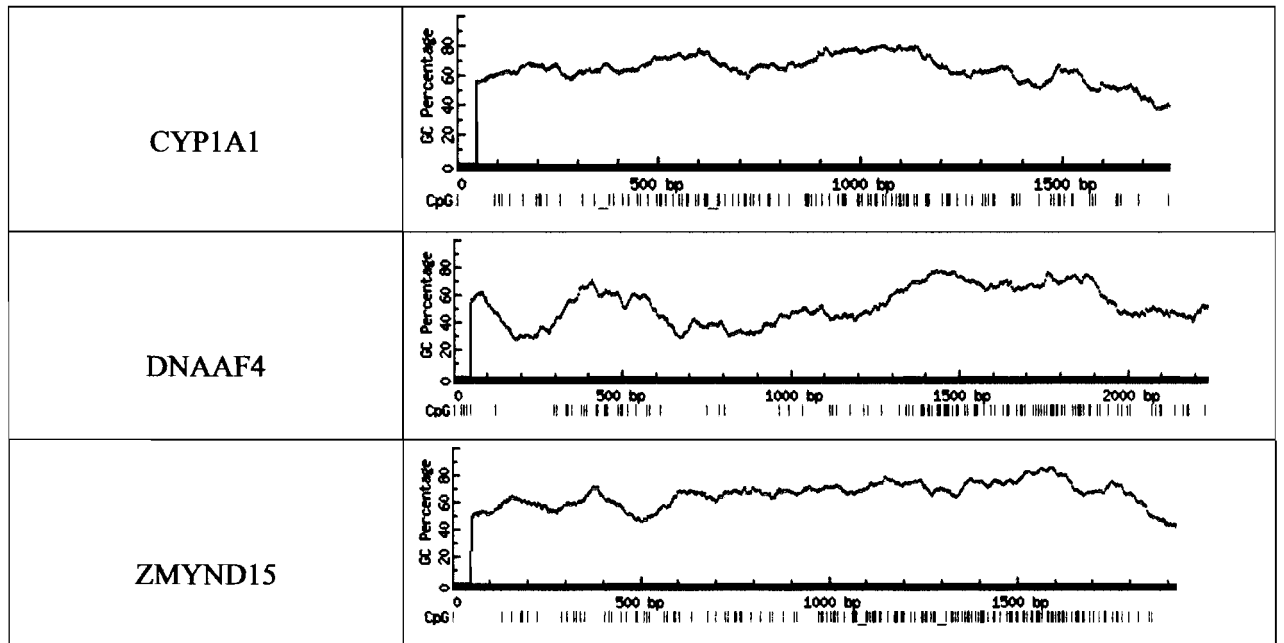
	DNAAF4	184	474	14
	ZMYND15	356	837	14
Azoospermie	CFTR	17	571	67

Designul primerilor. In acest scop au fost verificate toate genele selectate anterior pentru prezența insulelor CpG prin introducerea secvenței promotorului în soft-ul MethPrimer (Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics. 2002 Nov;18(11):1427-31. PMID: 12424112.). În imagini se pot observa zonele albastre care reprezintă un conținut crescut al CG (citozină-guanină), acestea fiind zonele de interes ce urmează a fi investigate. (Tabelul 2)

Tabelul 2. Reprezentarea grafica a insulelor CpG pentru genele studiate



Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.



Dupa identificarea insulelor CpG s-a folosit aplicatia Primer Suite. Acesta este o suită de software online disponibil gratuit pentru generarea de primeri utilizati in PCR cu bisulfite multiplex. Aceasta este o tehnică scalabilă care poate fi utilizată pentru a analiza gradul de metilare a mai multor regiuni simultan, folosind cantități minime de ADN. În urma analizei, Primer Suite a generat un fisier de tip Excel (Anexa 1) cu trei foi de calcul cu primerii rezultati. Fisierul conține primeri Ct, întâlniți pe catena C→T și primeri Ga, întâlniți pe catena G→A împreună cu alți parametri: primeri forward, primeri reverse, structura dimerica, dimensiune ampliconi, Ct, temperaturi. Din lista de primeri generați, au fost selectați doar acei primeri care se lipeau la regiunile de interes (insulele CpG), astfel încât acesta ca formeze ampliconi de dimensiuni cuprinse între 400 și 600 bp, să aibă un conținut cât mai crescut de GC și să fie cât mai stabil (stabilitatea fiind dată de scorul dimerului- dS, care cu cât este mai mică, cu atât stabilitatea este mai crescută).

3

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

Problema pe care inventia actuala o rezolva este stabilirea unui panel pentru diagnosticul epigenetic si prognosticul terapiei la pacientii de sex masculin cu infertilitate idiopatica.

Infertilitatea afectează aproximativ 15-20% din cupluri, iar factorul masculin este estimat a fi prezent în aproximativ 50% din cazuri, cu responsabilitatea exclusivă în 30% (Winters, B. R., & Walsh, T. J. (2014). The epidemiology of male infertility. *Urologic Clinics*, 41(1), 195-204). Cauzele infertilității masculine sunt foarte diferite de anomalii anatomice sau genetice, boli sistemice sau neurologice, infecții, traumatisme, leziuni iatrogenice, gonadotoxine și dezvoltarea anticorpilor spermatozoizilor (Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility-the other side of the equation. *Australian family physician*, 46(9), 641.). Cel mai important de menționat este că 30-40% din cazurile de infertilitate masculină nu are o cauză aparentă (infertilitate masculină idiopatică). Evaluarea potențialului de fertilitate al partenerului de sex masculin este o parte importantă pentru evaluarea unui cuplu care nu a reușit să conceapa un copil.

Având în vedere ca modificările epigenetice sunt reversibile, iar unele tratamente pot restabili starea normal este de foarte mare interes gasirea unor metode de diagnostic ale acestor modificari. Printre modificările epigenetice, metilarea ADN a fost asociată până acum cu infertilitatea masculină, în special cu oligozoospermia.

Solutia este îmbunătățirea protocoalelor de investigație și diagnostic pentru pacienții infertili de sex masculin. Utilizand analiza bioinformatică au fost selectate cele mai importante gene care suferă hipermetilare în infertilitatea masculină. Biomarkerii stabiliți au fost punctul de plecare pentru proiectarea unui test de detectie a nivelului de metilare a unor regiuni țintite

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Cioabanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

(panel) utilizând secvențierea de noua generație. Acest obiectiv a fost atins prin dezvoltarea unei panel epigenetic care evaluează nivelul de metilare pentru genele selectate implicate în infertilitatea masculina.

Mutațiile în gena *CCDC103* (domeniul spiralat 103) care conduc la scăderea mARN sugerează, un rol în infertilitate. *CCDC103* se presupune a avea mai multe funcții în biologia procesului de asamblare a dienceinei axonemale și reproducerea (Zubair M, Khan R, Ma A, Hameed U, Khan M, Abbas T, Ahmad R, Zhou JT, Shah W, Hussain A, Ahmed N, Khan I, Khan K, Zhang YW, Zhang H, Wu LM, Shi QH. A recurrent homozygous missense mutation in *CCDC103* causes asthenoteratozoospermia due to disorganized dynein arms. *Asian J Androl.* 2022 May-Jun;24(3):255-259. doi: 10.4103/aja2021122.)

Anomaliile genei *CFTR* (reglator de conductanță transmembranară a fibrozei chistice) cuprind un grup eterogen de mutații genetice care au efecte variabile. Implicate în reglarea vâscozității secreției, mutațiile *CFTR* pot duce la fibroza cistica și boli datorate dereglării expresiei *CFTR*, inclusiv anomalii ale sistemului reproducător și infertilitate masculina. Severitatea modificărilor sistemului reproducător variază atât cu genotipul, cât și cu frecvența mutațiilor *CFTR*. Studiile au demonstrat anomalii genetice la aproape toți pacienții cu fibroza cistica, aproximativ 80% dintre bărbații cu absența bilaterală congenitală a canalului deferent, 46% dintre pacienții cu absența unilaterală congenitală a canalului deferent, 33-47% dintre bărbații cu obstrucție epididimală și 17,5% dintre bărbații cu oligospermie (Bieniek JM, Lapin CD, Jarvi KA. Genetics of *CFTR* and male infertility. *Transl Androl Urol.* 2021 Mar;10(3):1391-1400. doi: 10.21037/tau.2020.04.05).

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

Gena CYP1A1 (citocromul P-4501A1) este responsabilă pentru metabolismul estrogenului și testosteronului, fiind implicată în hidroxilarea și biotransformarea acestor hormoni. Această activitate alterată a CYP1A1 ar putea fi implicată în procesul de fertilitate masculină. Polimorfismele genei CYP1A1 scad semnificativ numărul total de spermatozoizi și procentul de spermatozoizi cu mobilitate progresivă la subiecții de sex masculin, dar efectul lor asupra morfologiei spermatozoizilor nu a fost semnificativ statistic (Singh A, Koner BC, Ray PC, Prasad S, Jamatia E, Masroor M, Singh VK. Effect of CYP1A1 gene polymorphism and psychological distress on seminal analysis parameters. *Reprod Health*. 2016 May 24;13(1):60. doi: 10.1186/s12978-016-0169-1.)

DNAAF4 (factorul 4 de asamblare axonemală a dineinei) este implicat în principal în preasamblarea proteinei dineinei multisubunități, care este fundamentală pentru buna funcționare a cililor și flagelilor. Noi variante ale genei au fost detectate și asociate cu dischinezie ciliară primară și infertilitate (astenoteratozoospermie) (Guo T, Lu C, Yang D, Lei C, Liu Y, Xu Y, Yang B, Wang R, Luo H. Case Report: *DNAAF4* Variants Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Infertility in Two Han Chinese Families. *Front Genet*. 2022 Jul 12;13:934920. doi: 10.3389/fgene.2022.934920.)

Gena ZMYND15 acționează ca un represor al transcripției prin recrutarea enzimelor histon-deacetilază (HDAC) și controlează expresia temporală normală a genelor celulelor haploide în timpul procesului de spermiogeneză. S-a demonstrat că deficitul de ZMYND15 cauzează perturbări în expresia genei haploide și, în consecință, duce la epuizarea tardivă a spermatidelor și azoospermie atât la om, cât și în model animal (Ayhan Ö, Balkan M, Guven

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

A, Hazan R, Atar M, Tok A, Tolun A. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. J Med Genet. 2014 Apr;51(4):239-44. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102102.)

Avantajul acestui panel este ca ar putea fi utilizat in diagnosticul si evaluarea terapiei pacienților cu scădere progresivă a numărului de spermatozoizi, a motilității și a modificărilor morfologice, precum si a celor care suferă proceduri de reproducere asistată. Identificarea acestor biomarkeri stabili, permit nu numai diagnosticul cat si explorarea raspunsului la tratament prin analiza probelor de sperma, metilarea ADN fiind un proces reversibil.

Se prezinta in continuare 3 exemple ale inventiei in legatura cu figurile 1,2:

Exemplul 1. Conversia cu bisulfit a probelor izolate de ADN si a martorilor de metilare.

Pentru a evalua putea fi evaluat gradul de metilare probele de la pacienti alaturi de martorii de metilare (ADN total metilat si ADN nemetilat) au fost tratate cu bisulfit de Na utilizand kit-ul EpiTect (Qiagen) pentru conversia citozinei nemetilate in uracil. Etapele tratamentului cu ajutorul EpiTect Bisulfite sunt: conversia mediata de bisulfit a citozinelor nemetilate, legarea ADN monocatenar convertit de membrana unei coloane, desulfonarea ADN atasat de membrana, spalarea membranei ce contine ADN pentru a indeparta agentii de desulfonare si eluarea ADN purificat. ADN astfel obtinut se poate folosi pentru toate tehnicile utilizate in prezent pentru analiza metilarii ADN. Pentru tratament cantitatea de ADN utilizata trebuie sa fie intre 700 – 1000 ng.

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velica	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

Exemplul 2. Amplificarea regiunilor bogate in insule CpG din promotorul genelor CCDC103 si ZMYND15

Primerii de pe catena C→T au primit denumirea geni si un numar care indica perechea aleasa in urma generarii de catre programul PrimerSuite (e.g. CCDC103-3), iar cei de pe catenae G→A au fost notati cu denumire insotita litera "b"(e.g. CCDC1-103-3b). Martorii de metilare impreuna cu probele au fost supuse reactiei de amplificare (PCR- Polymerase Chain Reaction) utilizand kit-ul GoTaq Flexi (Promega) protocolul regasindu-se in tabelul 3.

Tabelul3. Protocol pentru mix de reactie de amplificare

Protocol	
Buffer Green GoTaq Flexi 5X	5uL
Clorura de magneziu (25mM)	2 uL
Mix Nucleotide	0.5 uL
Polimeraza ADN GoTaq	0.2 uL
Mix de primeri	1 uL
Nuclease-free water	10.3 uL
ADN total metilat (10 ng/ug)	1 uL

8

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

Reactia PCR s-a desfasurat conform urmatoarelor pasi:

Etapa initiala: 50°C – 2 minute

Denaturare: 95°C – 10 minute

Recombinare: 95°C – 15 secunde
 61°C – 1 minut } x 40 de cicluri

Extensie: 72°C – 5 minute

Ampliconii au putut fi observati prin migrare in gel de agaroză 2% prin colorare cu bromura de etidium in lumina UV (Fig.1)

Exemplu 3. Amplificarea regiunilor bogate in insule CpG din promotorul genelor CYP1A1, DNAAF4 si CFTR1

Pentru genele CYP1A1, DNAAF4 si CFTR1 Martorii de metilare impreuna cu probele au fost supuse reactiei de amplificare (PCR-Polymerase Chain Reaction) utilizand kit-ul GoTaq Flexi (Promega) si acelasi protocol (tabelul 3).

Reactia PCR s-a desfasurat conform urmatoarelor pasi:

Denaturare: 95°C – 2 minute

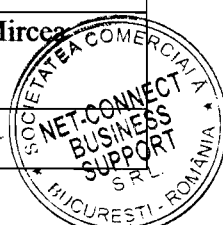
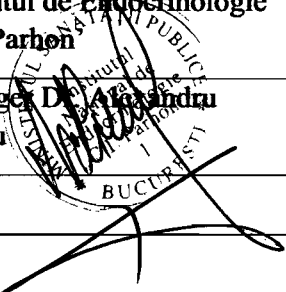
Recombinare: 95°C – 30 secunde
 58°C – 1 minut } x 40 de cicluri
 65°C – 1 minut

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Marcea
L.S.	L.S.	L.S.

Extensie: 72°C –5 minute

Ampliconii au putut fi observati prin migrare in gel de agaroză 2% prin colorare cu bromura de etidium in lumina UV (Fig.2)

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.



12.6. Lista de secvente de nucleotide si/sau aminoacizi, parte a descrierii

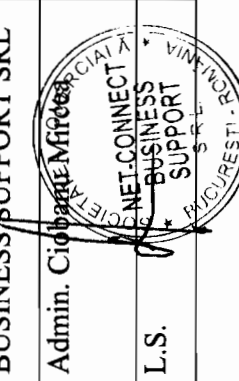
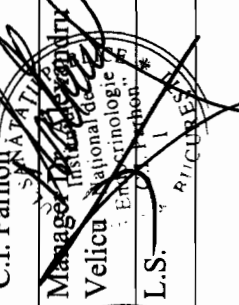
Genă și regiunea în cromozom	Nume primer	Secvența primer	Amplicon Start	Amplicon End	Amplicon Size	Dimer Score (dS)	Forward Tm	Reverse Tm
CCDC103 chr17:42975460 -42977934	CCDC103-2 F	ATTGGATAGTTAGAGTATTATTTTATTATTAG	990	1583	593	-4.29	60.387	61.82
chr17:42975460 -42977934	CCDC103-2 R	CTCCCCCAATTTTCAAAAATAATCC	720	1215	495	-3.35	61.136	61.557
CYP1A1 chr15:75017810 -75020019	CYP1A1-3 F	GGAAATTTTTTGTATAGGGTTTTTAGG	1395	1845	450	-3.74	61.331	60.267
chr15:75017810 -75020019	CYP1A1-3 R	CCTTCCCTAACCCCTTATTTT	1339	1848	509	-1.69	60.111	60.387
DNAAF4 chr15:55698800 -55701228	DNAAF4-1 F	TTAAGAAAGGAGTATTTTTTATATTTTTTAAAT G	223	747	524	-4.07	60.267	60.387
chr15:55698800 -55701228	DNAAF4-1b F	ATCTAAAAAAAATAATTTCCACACCTTT	221	704	483	-2.48	60.524	60.524
chr15:75017810 -75020019	DNAAF4-3 F	TTTTTTGAGTTTAGGTTATATAGTAGAAG AAGTTTTAGTGTTATTTGGTATGGTTTAG	1336	1850	514	-3.24	61.937	60.453

Institutul de Virologie 'Stefan S. Nicolau' 	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon' Manager Dr. <i>[Signature]</i> Velicu 	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL Admin. Cioara Mare L.S.
L.S.	L.S.	L.S.

12.6. Lista de secvente de nucleotide si/sau aminoacizi, parte a descrierii

DNAAF4-3 R	CAAAACCTTCCCTAACCCCC	1339	1848	509	-1.69	60.111	60.387
chr15:75017810-75020019	CCCCAATACCAATTAACATAACCT						
DNAAF4-3b R	AGGTTTTTTTTTGATTTTTTTTGGTTTGAATTG						
CFTR							
chr7:117119208-117120582	GGTATAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAATGTATTT TG	262	825	563	-2.47	60.16	60.267
CFTR-1 R	CATTTACTTCCAATTCCTCCCA						
chr7:117119208-117120582	ATTTTCCTTCCCTTTTCAAAATACACC	267	850	583	-5.48	62.199	60.387
CFTR-1b R	TTTTTTTTTTGATTTGTTGTGAIGTTATTTG						
ZMYND15							
chr17:4641633-4643789	GGGTTTTGGAGGTAATTTGTAAGG	378	907	529	-2.97	61.077	60.111
ZMYND15 R	CAAAAAACCCAAATTCCTCCATCA						
chr17:4641633-4643789	CTAAACCAAAAAAATCTAAAAACACC	366	880	514	-5.96	61.331	60.681
ZMYND15b R	GAAGGGGTTGAGTTGGGG						

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec.Beres Juliana	Manager Velicu	Admin. Cioaba
L.S.	L.S.	L.S.



Revenicări depuse conform
 art. 15 alin. 7 din legea nr. 64 / 1991
 la data de 17-11-2022

12.3. REVENDICARE: PANEL DE OLIGONUCLEOTIDE TINTITE PENTRU DIAGNOSTICUL EPIGENETIC AL INFERTILITATII MASCULINE.

Revendicarea referitoare la cererea de brevet inregistrata cu nr.A/00651/2022 care reprezinta un panelul alcatuit din secvente oligonucleotidice specifice (primeri) unor gene tintite care pot suferi metilarea insulelor CpG de la nivelul promotorilor afectandu-le astfel expresia.

Utilizarea acestui panel conform inventiei trebuie sa urmeze etapele enumerate:

1. Conversia cu bisulfit a probelor izolate de ADN si a martorilor de metilare.
2. Amplificarea regiunilor bogate in insule CpG din promotorul genelor CCDC103 si ZMYND15
3. Amplificarea regiunilor bogate in insule CpG din promotorul genelor CYP1A1, DNAAF4 si CFTR1

Cuantificarea gradului de metilare prin utilizarea acestui panel poate ajuta nu numai in diagnosticul cat si in urmarirea raspunsului la tratamentul initiat la pacientii infertili.

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julijana	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.

12.4. Desene

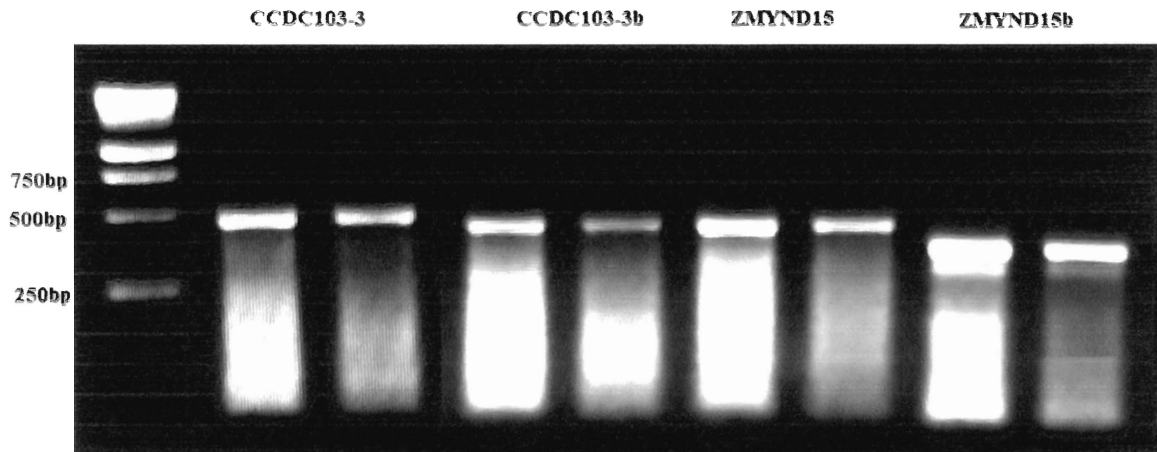


Fig.1

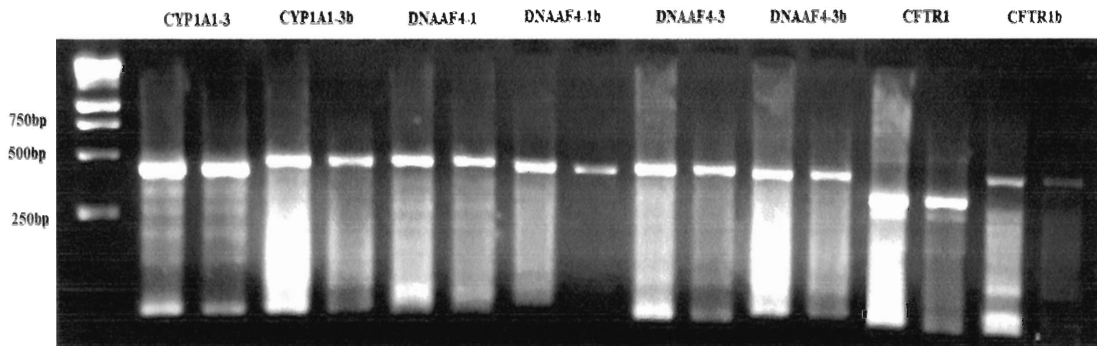


Fig.2

Institutul de Virusologie 'Stefan S. Nicolau'	Institutul de Endocrinologie 'C.I. Parhon'	NET - CONNECT BUSINESS SUPPORT SRL
Ec. Beres Julieta	Manager Dr. Alexandru Velicu	Admin. Ciobanu Mircea
L.S.	L.S.	L.S.