

# Ex vivo Methode zur Bestimmung der DNA Reparaturkapazität

Katja Matt<sup>1</sup>, Katharina Burger<sup>1</sup>, Karin Rupprecht<sup>2</sup>, Daniel Gebhard<sup>1</sup>, Jörg Bergemann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hochschule Albstadt-Sigmaringen

<sup>2</sup> Zentrum für TCM und Naturheilverfahren Sigmaringen

30<sup>th</sup> Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine  
Sept. 21 - 23, 2014 in Köln, Deutschland

## Hintergrund

Die meisten Studien zu DNA Reparaturprozessen in humanen Zellen werden mit *in vitro* Zellkulturen durchgeführt. Um ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben, werden die Zellen üblicherweise durch Wachstumsfaktoren und / oder Serum zur Teilung angeregt. Mit zunehmender Anzahl Zellteilungen können sich die Zellen aber verändern, so dass sie nicht mehr den Zustand im menschlichen Körper abbilden. Trotz aller Bemühungen spiegelt ein Zellkulturmodell zur Untersuchung der DNA Reparatur also nicht unbedingt die DNA Reparaturfähigkeit im menschlichen Körper wieder. Um dieses Problem zu umgehen und um systemische Einflüsse auf die DNA Reparatur messen zu können, wäre eine Methode vorteilhaft, die es erlaubt DNA Reparatur direkt aus dem menschlichen Körper heraus – *ex vivo* – zu untersuchen.

Der modifizierte Host Cell Reactivation Assay (HCRA) ist eine etablierte Methode, einen speziellen DNA-Reparaturweg (Nukleotidexzisionsreparatur) zu untersuchen. Der Vorteil dieser Assays ist die Messung der funktionellen Wiederherstellung eines zuvor geschädigten ringförmigen DNA-Stücks (Reporterplasmid). Mittels Durchflusszytometrie-basierter Einzelzellanalyse konnte bereits gezeigt werden, dass der HCRA für die Untersuchung von primären humanen Hautzellen geeignet ist [1,2].

Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass Kalorienrestriktion zu einer Reduktion von oxidativem Stress führt [3], die Basenexzisionsreparatur im Zellkern steigert [4], protektiv gegen altersbedingte Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose wirkt und bei vielen Modellorganismen wie Affen oder Ratten das Altern verlangsamt [6,7].

Um Veränderungen der DNA Reparatur direkt aus dem menschlichen Körper heraus zu untersuchen, wurde der HCRA für die Anwendung mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs; *ex vivo* Untersuchungen) optimiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob mittels HCRA Einflüsse der Mayr-Therapie auf die DNA Reparatur erfasst werden können. Die Mayr-Therapie beinhaltet individuelle Fastenkost zur Regeneration des Verdauungssystems und zum Erlernen einer gesunden Essweise, sowie manuelle Bachbehandlungen zur Unterstützung.

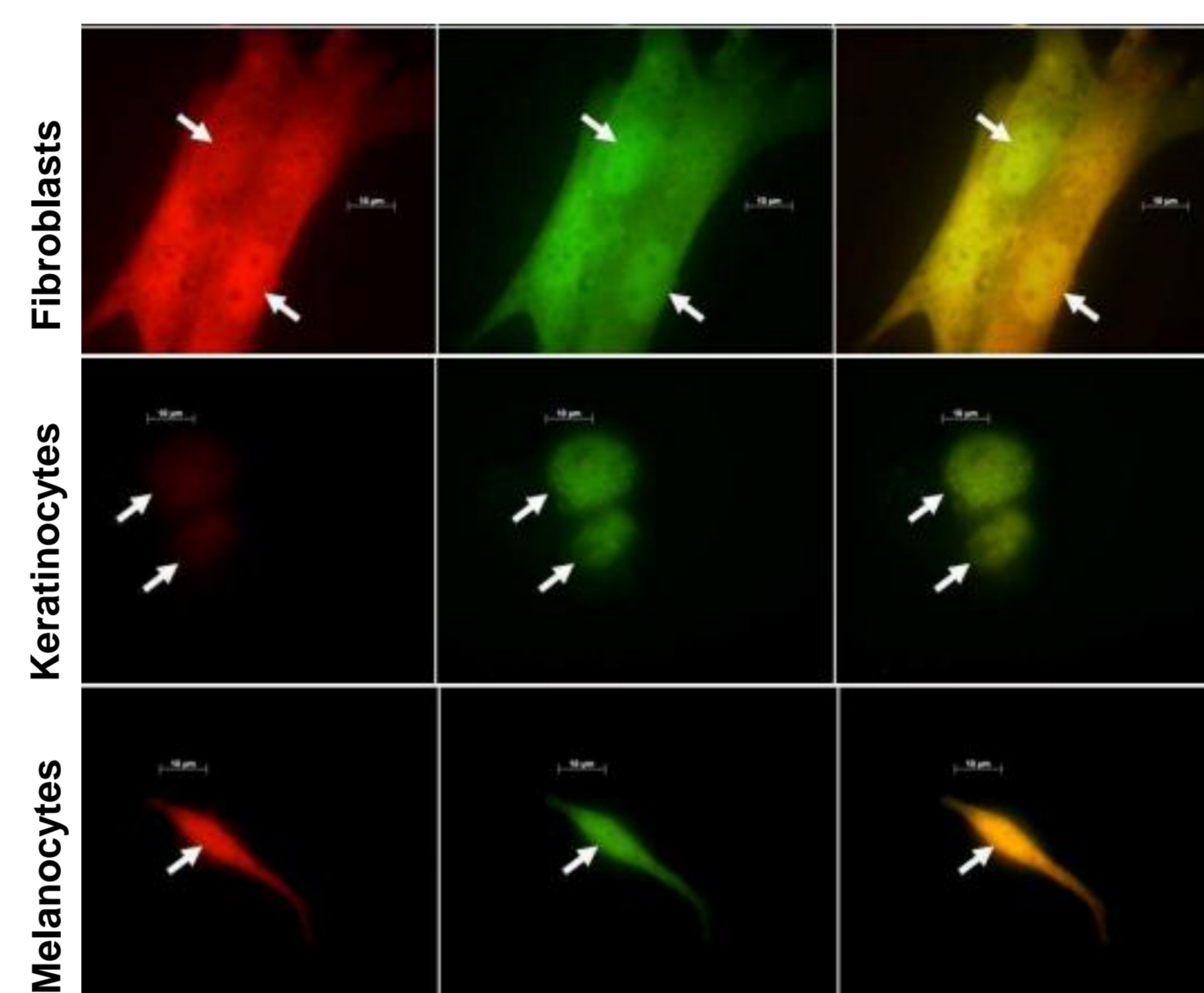
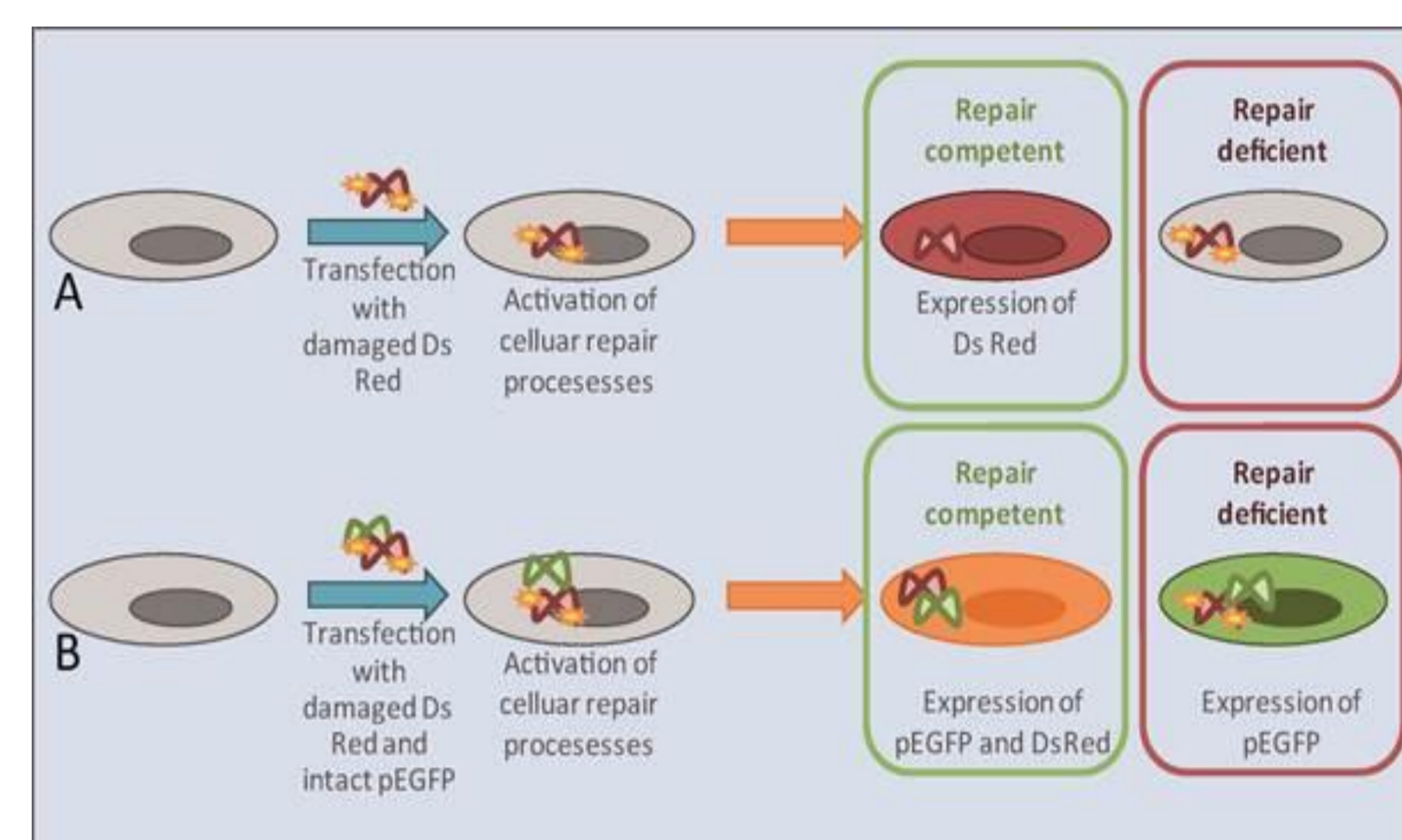
## Ergebnisse

Nachdem der modifizierte HCRA für die Untersuchung mit humanen PBMCs optimiert war, wurde zuerst die Reproduzierbarkeit des Assays geprüft. Hierfür wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur selben Uhrzeit PBMCs von zwei gesunden Erwachsenen isoliert und der HCRA jeweils in Triplikaten pro Tag durchgeführt.

Die Ergebnisse der Reparaturkapazitätsmessungen sind in **Abbildung 1** als Mittelwerte  $\pm$ SEM dargestellt. Proband A zeigte geringere Abweichungen während der drei Tage (~ 0,9 %), während Proband B etwas höhere Abweichungen zeigte (~ 4 %). Beide Probanden zeigten die größte Abweichung der Triplikate an Tag 1, dennoch können mit dem an PBMCs angepassten HCRA verlässliche und reproduzierbare Daten gewonnen werden.

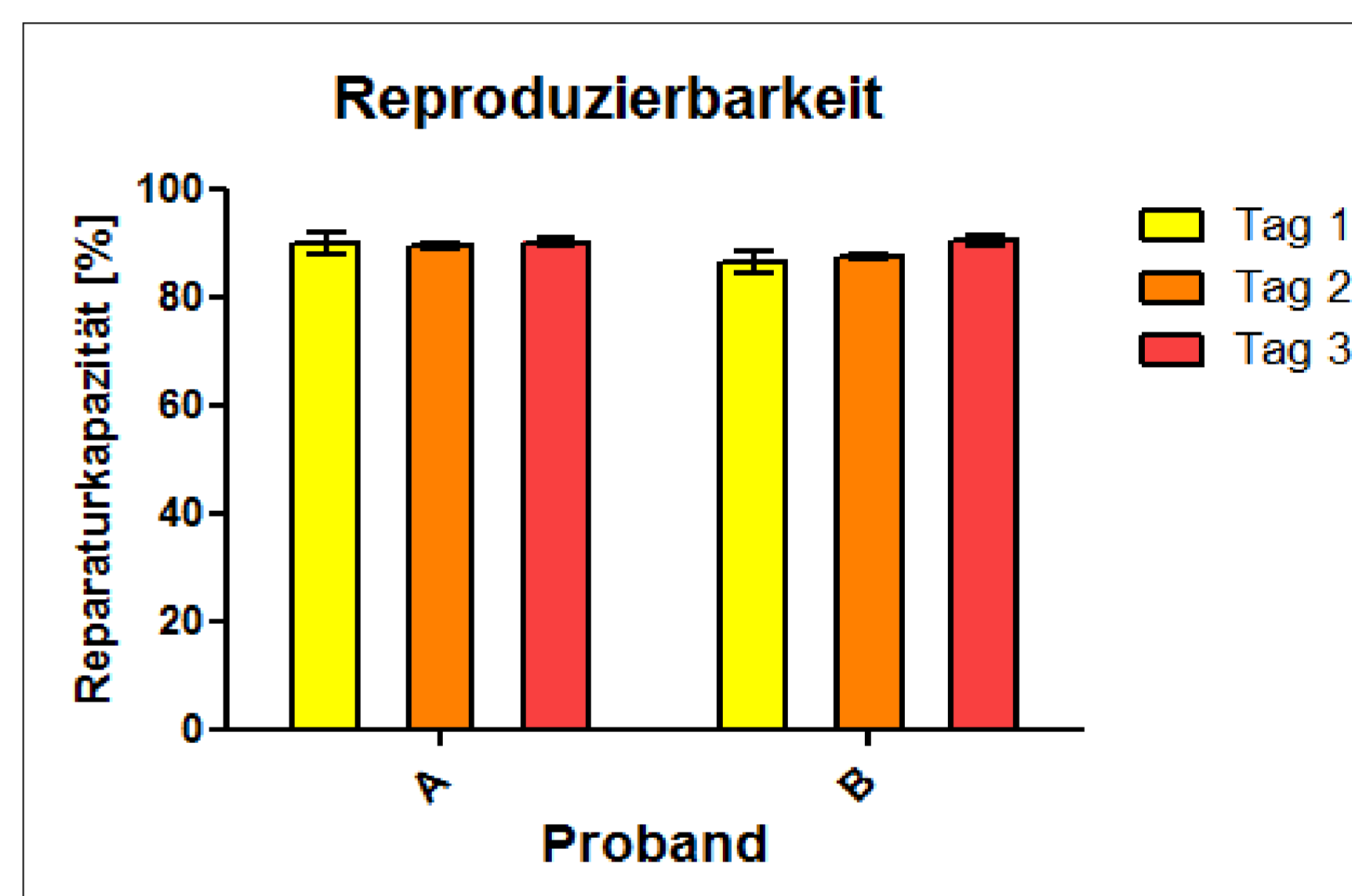
Zwei Reporterplasmide werden in die Zellen eingebracht (transfiziert), eines codiert für ein grün fluoreszierendes Protein und das andere für ein rot fluoreszierendes Protein. Das eine Plasmid dient als Marker für Reparatur und wird vor dem Einbringen in die Zellen mit UVC Strahlung geschädigt, um UV-spezifische Schäden zu erzeugen. Das andere Plasmid dient als Kontrolle und wird nicht geschädigt.

## Prinzip des Assays

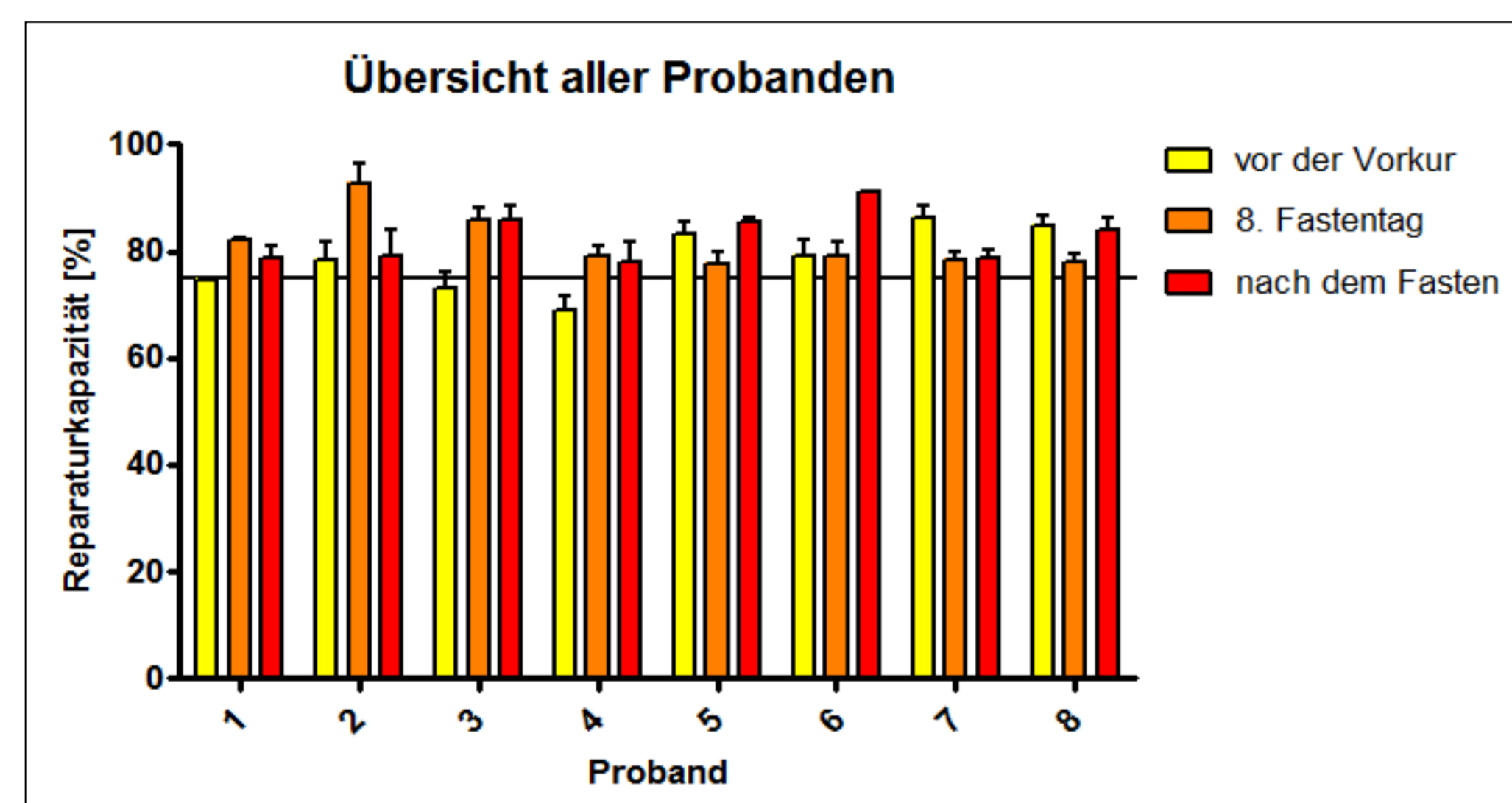


Wenn die Zelle die UV-spezifischen DNA-Schäden reparieren kann, werden beide fluoreszierende Proteine synthetisiert, wenn nicht, wird nur vom nicht beschädigten Plasmid Protein hergestellt.

Die Menge des vom zuvor bestrahlten Plasmid hergestellten Reporterproteins ist direkt proportional zur DNA-Reparaturkapazität der Zelle.



**Abbildung 1: Reproduzierbarkeit des HCRA über drei Tage.** Proband A zeigte geringere Abweichungen (~ 0,9 %) während des untersuchten Zeitraums, während Proband B etwas größere Abweichungen zeigte (~ 4 %).

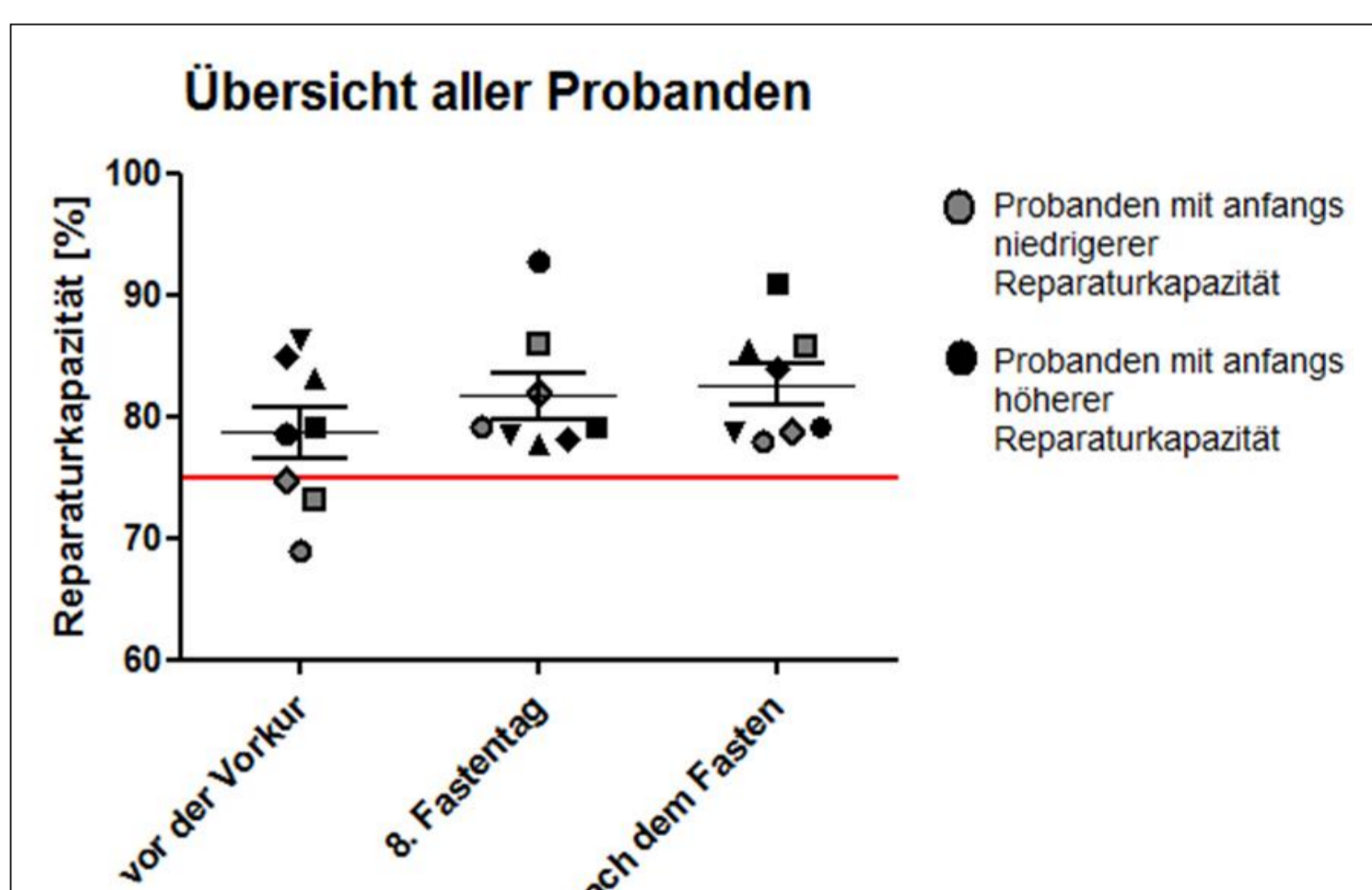


**Abbildung 2: Übersicht der DNA Reparaturkapazitäten aller Probanden.** Offensichtlich gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen, aber auch zwischen den Zeitpunkten der Probenahme. Proband 4 wies insgesamt die niedrigste, Proband 2 insgesamt die höchste DNA Reparaturkapazität auf. Die schwarze Linie zeigt den Schwellenwert bei 75 %.

Die DNA Reparatur von acht Probanden - sechs weibliche und zwei männliche – die an einer Mayr-Therapie teilnahmen, wurde untersucht. Die Probenahme erfolgte vor Beginn der Therapie, am achten Fastentag und am 21. Fastentag (am Ende des Fastens). Die Ergebnisse zeigen die **Abbildungen 2 und 3**.

**Abbildung 2** zeigt eine Übersicht der Reparaturkapazitäten aller acht Probanden. Offensichtlich gibt es Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Individuen als auch zwischen den Zeitpunkten der Probenahme während der Mayr-Therapie.

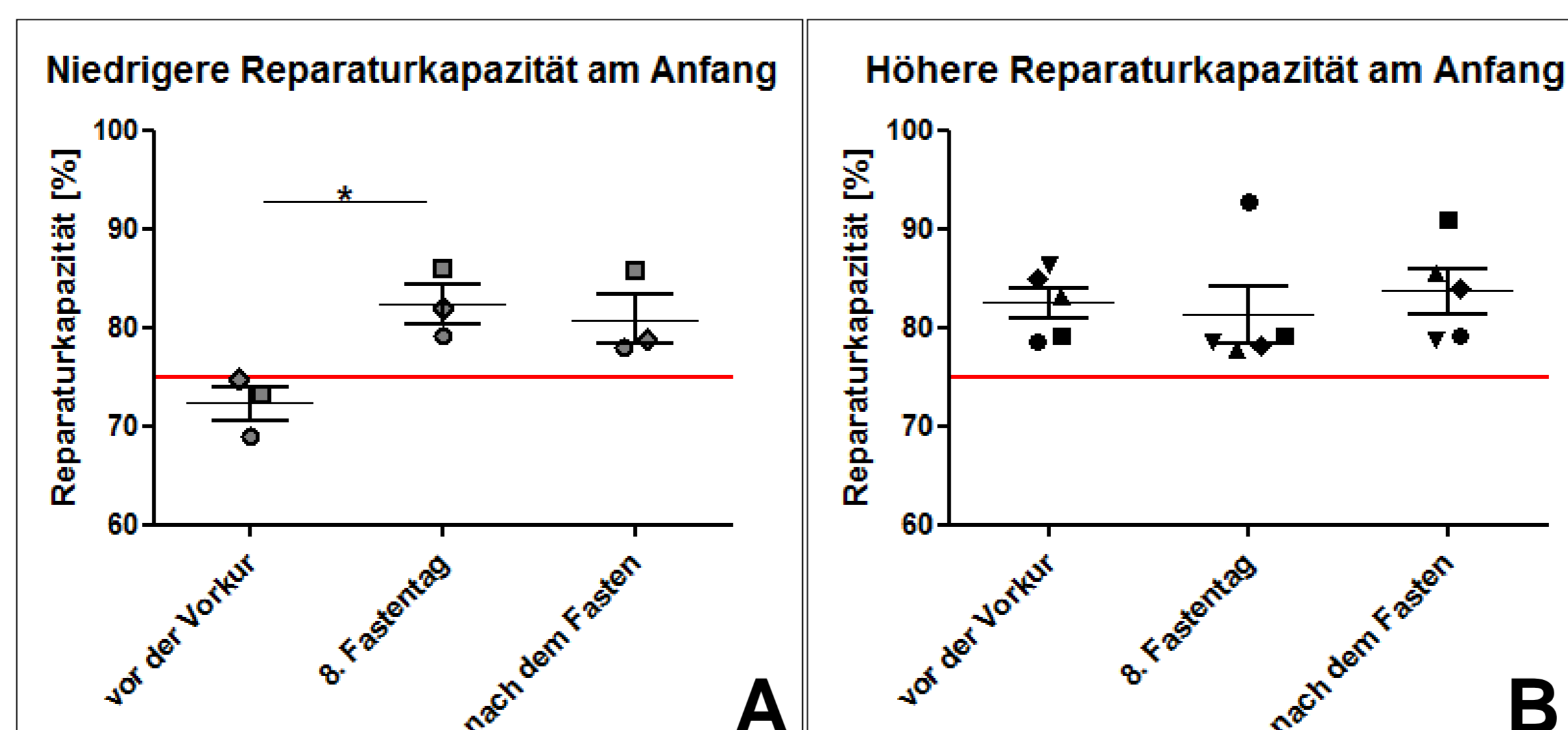
Eine etwas detailliertere Darstellung bietet **Abbildung 3**, hier sind drei Individuen erkennbar, die sich zu Beginn der Therapie von den übrigen Probanden. Diese drei Individuen haben eine etwa 5 % niedrigere Reparaturkapazität, so dass der Schwellenwert bei 75 % Reparaturkapazität gesetzt wurde. Alle Werte unterhalb der 75 % wurden als niedrigere DNA Reparaturkapazität zu Beginn der Therapie bezeichnet.



**Abbildung 3: Detailliertere Darstellung der Probanden.** Drei Probanden zeigten zu Beginn der Studie eine etwa 5 % niedrigere Reparaturkapazität als die übrigen Probanden. Deshalb wurden die Werte unterhalb des Schwellenwertes als niedrigere DNA Reparaturkapazität zu Beginn bezeichnet.

Werden die drei Probanden mit anfangs niedrigerer DNA Reparatur getrennt von den übrigen ausgewertet, so ist ein signifikanter Anstieg der DNA Reparatur ( $p=0,0238$ ) von der ersten Probenahme zur zweiten am achten Fastentag zu erkennen (siehe **Abbildung 4A**). Die DNA Reparatur blieb anschließend in etwa gleich hoch, obwohl keine Signifikanz mehr gegeben war.

Bei den Probanden, die anfangs eine höhere Reparaturkapazität aufwiesen, blieb die DNA Reparatur auf einem vergleichbar hohen Niveau (siehe **Abbildung 4B**). Des Weiteren waren keine Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Probanden zu erkennen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4: Getrennte Auswertung der Probanden mit anfangs niedrigerer Reparaturkapazität.** Bei Probanden mit anfangs niedrigerer DNA-Reparatur ist ein signifikante Anstieg ( $p=0,0238$ ) der DNA Reparatur zu erkennen (A). Bei den übrigen Probanden blieb die Reparaturkapazität auf einem vergleichbaren Niveau (B)

## Schlussfolgerung

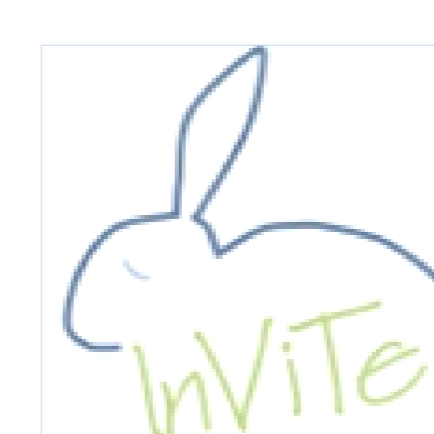
Der HCRA konnte erfolgreich für die Untersuchung von humanen PBMCs angepasst werden.

Die Untersuchung von humanen PBMCs mittels HCRA liefert verlässliche und reproduzierbare Daten.

Durch die Mayr-Therapie konnte bei Probanden mit niedrigerer DNA Reparatur ein signifikanter Anstieg der Reparaturkapazität erreicht werden. Am Ende der Therapie wiesen diese Probanden vergleichbare Reparaturkapazitäten wie die übrigen Probanden auf.

## References

- [1] Burger et al. (2010) A modified fluorimetric host cell reactivation assay to determine the repair capacity of primary keratinocytes, melanocytes and fibroblasts. BMC Biotechnol. Jun 22;10:46
- [2] Burger et al. (2007) The influence of folic acid depletion on the Nucleotide Excision Repair capacity of human dermal fibroblasts measured by a modified Host Cell Reactivation Assay. Biofactors. 31(3-4):181-90
- [3] Qiu et al. (2010) Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. Cell Metab. 12(6):662-7
- [4] Stuart et al. (2004) Mitochondrial and nuclear DNA base excision repair are affected differently by caloric restriction. FASEB J 18(3):595-7
- [5] Fontana et al. (2004) Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 101(17):6659-63
- [6] Roth et al. (2001) Caloric restriction in primates and relevance to humans. Ann N Y Acad Sci. 928:305-15
- [7] Cabelof et al. (2003) Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. DNA Repair (Amst) 2(3):295-307



Hochschule  
Albstadt-Sigmaringen  
Albstadt-Sigmaringen University