

MMD GmbH & Co. KG

## **Das HOMEVIT-Konzept**

Analyse von mitochondrialen Funktionen – eine in-vitro Analyse

## INHALTSVERZEICHNIS

Zielstellung: .....	3
Durchführung: .....	3
Parameter .....	3
Periphere Blutleukozyten (PBMC).....	3
Verhältnis mitochondrialer DNA zu nukleärer (Kern-) DNA (mtDNA:ntDNA) .....	4
Mitochondriales ATP .....	4
PGC-1-alpha .....	4
Nrf-2 .....	4
Rhodanase.....	4
Ergebnisse .....	6
Funktionelle Charakterisierung der Mitochondrien in PBMC .....	6
Funktionelle Charakterisierung der Mitochondrien in PBMC nach Stressinduktion.....	7
Zusammenfassung .....	7

## ZIELSTELLUNG:

Es sollte in einem Pilotprojekt analysiert werden, inwieweit die HOMEVIT-Technologie die Einflüsse einer Umgebungsstrahlung auf Mitochondrienfunktionen neutralisieren kann.

## DURCHFÜHRUNG:

Es wurde EDTA-Blut eines freiwilligen Probanden verwendet. Das Blut wurde mit Alufolie umwickelt und innerhalb weniger Stunden ins Labor gebracht. Dort wurde das Blut in vier Aliquot aufgeteilt. Aus einem Aliquot (Aliquot „Basis“) wurden sofort die peripheren Blutleukozyten (PBMC) isoliert. Die anderen drei Aliquots wurden folgendermaßen behandelt:

Aliquot 1 (Kontrolle): Das Blut wurde in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Styroporbehälter für 24h bei Raumtemperatur inkubiert.

Aliquot 2 (Smart): Das Blut wurde in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Styroporbehälter für 24h bei Raumtemperatur in der Anwesenheit eines „sendenden“ Smartphones (Samsung Galaxy S3; S/N: RF1C94DYFDX) inkubiert.

Aliquot 3 (HomeVit-25 + Smart): Das Blut wurde in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Styroporbehälter für 24h bei Raumtemperatur in der Anwesenheit eines „sendenden“ Smartphones (Samsung Galaxy S3; S/N: RF1C91QFDRP) und des HomeVit-25 inkubiert.

Anschließend wurden die PBMC aus dem jeweiligen Aliquot isoliert und es erfolgte die Bestimmung der unten aufgeführten Parameter.

Alle Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

## PARAMETER

Die nachfolgend aufgeführten Analysen erfolgten mit isolierten peripheren Blutleukozyten (PBMC). Es wurde die Expression von PGC-1-alpha (Mitochondrienbiogenese), von Nrf-2 ("Master-Regulator" von Antioxidantien die Reaktion des Körpers), von Rhodanase, das Verhältnis von mitochondrialer DNA zu nukleärer DNA (ntDNA:mtDNA) als Marker der Mitochondrienmasse und der Anteil mutierter Mitochondrien (del4977bp mtDNA) bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung ATP-Synthese in den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC). Die ATP-Bestimmung erfolgte ebenfalls nach Zugabe eines Stressors (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in verschiedenen Konzentrationen für 72h bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>.

## PERIPHERE BLUTLEUKOZYTEN (PBMC)

Die peripheren Blutleukozyten (PBMC) werden aus dem Blut isoliert und setzen sich zusammen aus Monozyten, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten. PBMC mit nicht voll funktionsfähigen Mitochondrien sind wesentlich mitverantwortlich u. a. für neurodegenerative, kardiovaskuläre, cancerogene und autoimmune Krankheitsbilder sowie dem metabolischen Syndrom und generell chronisch inflammatorisch degenerativer Krankheitsbilder.

---

## VERHÄLTNIS MITOCHONDRIALER DNA ZU NUKLEÄRER (KERN-) DNA (MTDNA:NTDNA)

Um ihre vielen Funktionen zu erfüllen, benötigen Blutzellen funktionstüchtige Mitochondrien. Jede Zelle hat mehrere Mitochondrien und jedes Mitochondrium hat mehrere Kopien an eigener DNA. Das Verhältnis mtDNA:ntDNA gibt Aufschluss über die Anzahl von Mitochondrien. Ein geringes Verhältnis von mtDNA:ntDNA deutet auf eine reduzierte Anzahl von Mitochondrien hin durch toxische und entzündliche Schädigungen der Mitochondrien.

---

## COMMON DELETION 4977BP MUTATION

Die bestuntersuchte mtDNA-Deletion ist die sogenannte common deletion, eine 4977 bp  $\Delta$ mtDNA-Spezies, welche oft in Fällen von sporadischer Deletion auftritt. Diese Deletion wurde als molekulare Ursache für Krankheiten wie Kearns-Sayre-Syndrom oder oculare Myopathien identifiziert. Bei der common deletion fehlen die DNA Abschnitte, die für die oxidative Phosphorylierung verantwortlich sind. Mitochondrien mit der common deletion Mutation sind bezüglich der oxidativen Phosphorylierung defekt.

---

## MITOCHONDRIALES ATP

In den Zellen unseres Organismus wird ununterbrochen chemische, osmotische oder mechanische Arbeit geleistet. Für diese ablaufenden metabolischen Prozesse wird stetig Energie benötigt, die in Form von ATP bereitgestellt werden muss. Daher dient als ein Parameter für die Effizienz der Mitochondrienfunktion die mitochondriale ATP-Messung. Funktionsfähige Mitochondrien zeigen eine hohe Effizienz. Schädigungen der Mitochondrien führen zu einem Verlust an Effizienz. Eine geringere Ausbeute an ATP-Generierung ist ein spät auftretender Biomarker für eine Schädigung der Mitochondrien oder Störung der mitochondrialen Funktionalität.

---

## PGC-1-ALPHA

PGC-1 alpha ist einer der wichtigsten Regulatoren der mitochondrialen Biogenese und ein Schlüsselenzym für den Energiemetabolismus. Als Transkriptions Coaktivator interagiert er mit vielen Transkriptionsfaktoren, die bei vielen biologischen Prozessen beteiligt sind. So ist er ein Regulator der Thermogenese, der Gluconeogenese, der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, des Hormonstoffwechsels und des antioxidativen Systems.

---

## NRF-2

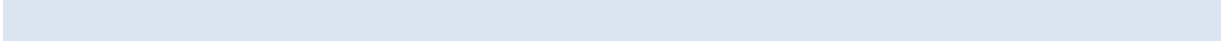
Nuclear factor-erythroid-derived2-like2 (Nrf-2) ist der Hauptregulator des antioxidativen Verteidigungssystems. Nrf-2 aktiviert das Phase-II-Entgiftungssystem (vor allem die Glutathion-S-Transferasen) und antioxidative Enzyme, darunter die SOD-2, Katalase, Glutathionperoxidase, u.a.

---

## RHODANASE

Etwa 1-2 % des Sauerstoffs werden nicht vollständig reduziert und in freie Radikale (ROS) umgewandelt. ROS werden vornehmlich innerhalb des mitochondrialen Elektronentransports über die Multienzymkomplexe I-IV gebildet. Das antioxidative Protein Rhodanese, auch Thiosulfat-Sulfurtransferase genannt, ist teilweise in der innermitochondrialen Membran verankert und ist Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der Eisen-Schwefel-Zentren (FeS-Zentren) ausbilden kann [11]. Rhodanese enthält vier Sulfhydrylgruppen, die den Transfer von Schwefelatomen auf die FeS-enthaltenen Multienzymkomplexe I-III der Elektronentransportkette bewirken. Eine reduzierte Proteinexpression könnte zu einer verminderten Regulation dieser FeS-Proteine führen und die Zunahme an ROS zur Folge haben. Rhodanese kann zudem als Thioredoxinoxidase wirken und

auf diesem Wege an der Beseitigung von ROS beteiligt sein. Des Weiteren gilt Rhodanase als Schwefeldonator für Glutathion und Thioredoxin.



## ERGEBNISSE

### FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIEN IN PBMC

Es ist deutlich zu erkennen, dass es in Anwesenheit des Smartphones zu einer reduzierten ATP Synthese in den PBMC (68%) im Vergleich zu den Kontrollzellen (100%) kommt. Der negative Einfluss des Smartphones auf die ATP Synthese kann durch den HomeVit-25 aufgehoben werden.

Die Suppression der PGC-1-alpha Expression durch das Smartphone konnte durch das HomeVit-25 nicht aufgehoben werden.

Die Nrf-2 Expression in den PBMC wurde durch das Smartphone nicht beeinflusst. Die zusätzliche Anwesenheit des HomeVit-25 führte zu keiner weiteren Veränderung der Nrf-2 Expression in den PBMC.

Die Rhodanase Expression wurde in den PBMC, die dem Smartphone ausgesetzt waren, deutlich erhöht. Die Anwesenheit des HomeVit-25 zum Smartphone neutralisierte die Rhodanase Expression minimal.

Leistung in %	ohne	Smart-Phone	HomeVit-25 und Smart-Phone
Mitochondriale ATP Synthese	100	68	111
PGC-1-alpha Expression	100	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Nrf-2 Expression	100	97	86
Rhodanase Expression	100	171	146

**Tabelle 1: Mitochondriale ATP-Synthese, PGC-1-alpha-, Nrf-2, Rhodanase mRNA Expression in PBMC in Abwesenheit eines Smartphones/HomeVit-25, in Anwesenheit eines Smartphone und in Anwesenheit eines Smartphone + HomeVit-25 für 24h.**

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Verhältnis mitochondrialer DNA zu nukleärer DNA (mtDNA:ntDNA) durch die Anwesenheit des Smartphones deutlich zunimmt. Im Zusammenhang mit der deutlich verminderten ATP Synthese deutet diese Konstellation auf eine Verminderung funktionsfähiger Mitochondrien in den dem Smartphone ausgesetzten PBMC im Vergleich zu den PBMC in Abwesenheit des Smartphones bzw. in Anwesenheit des Smartphones + HomeVit-25.

Leistung in %	ohne	Smart-Phone	Home-Vit 25 und Smart-Phone
<b>Verhältnis mtDNA:ntDNA</b>	100	202	93
<b>Mitochondriale 4977 Deletionsmutante (mt4977del)</b>	Nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

**Tabelle 2: Verhältnis von mtDNA:ntDNA Mitochondriale und Anteil der mt4977bp Deletionsmutante in PBMC in Abwesenheit eines Smartphones/HomeVit-25, in Anwesenheit eines Smartphone und in Anwesenheit eines Smartphone + HomeVit-25 für 24h.**

## FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIEN IN PBMC NACH STRESSINDUKTION

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zugabe von  $H_2O_2$  zu einem Abfall der ATP-Produktion in den PBMC führt (Kontrolle). In der Anwesenheit des sendenden Smartphones kommt es zu einer stark verminderten Stressresistenz. So führt bereits eine geringe  $H_2O_2$  Konzentration von  $0,163\mu M$  in Gegenwart des Smartphones zu einem 50%igen Abfall der ATP-Bildung in den PBMC. Höhere  $H_2O_2$  Konzentrationen inhibieren in Gegenwart des Smartphones die ATP Synthese der PBMC komplett. Der negative Einfluss des Smartphones auf die ATP Synthese konnte durch die Anwesenheit des HomeVit-25 komplett aufgehoben werden. Im Vergleich zur Kontrolle ist sogar in Gegenwart des HomeVit-25 bei der geringsten  $H_2O_2$  Konzentration von  $0,163\mu M$  eine verbesserte Signalverarbeitung in den PBMC zu erkennen. Dies spiegelt sich durch eine gesteigerte ATP Bildung in den PBMC (180%) in Gegenwart des Stressors ( $0,163\mu M H_2O_2$ ) im Vergleich zu PBMC in Abwesenheit des Stressors (100%).

Mitochondriale ATP Synthese Leistung in %	$H_2O_2$ Konzentration			
	$0\mu M$	$0,163\mu M$	$16,3\mu M$	$163\mu M$
Kontrolle	100	99	22	<0,25
Smart	100	48	<0,25	<0,25
Smart + HomeVit-25	100	180	16	<0,25

**Tabelle 3: Mitochondriale ATP-Synthese nach Stressung von PBMC mit  $H_2O_2$  für 72h in verschiedenen Konzentrationen ( $0,163\mu M$ ,  $16,3\mu M$ ,  $163\mu M$ ). Die Inkubation der PBMC ohne Stressor diente als Kontrolle. Der ATP-Ausgangswert ist auf 100% gesetzt und ist in allen Gruppen identisch.**

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass

- eine 24stündige Handystrahlung die ATP Synthese in peripheren Blutleukozyten um 32% reduziert.
- das HomeVit-25 den negativen Einfluß der Handystrahlung auf die ATP Synthese in peripheren Blutleukozyten neutralisieren kann.
- eine 24stündige Handystrahlung die Energieleistung der Mitochondrien reduziert.
- das HomeVit-25 den negativen Einfluß der Handystrahlung auf die Energieleistung der Mitochondrien neutralisiert.
- eine 24stündige Handystrahlung die Stressresistenz der PBMC um etwa 50% reduziert.
- das HomeVit-25 den negativen Einfluß der Handystrahlung auf die Stressresistenz der Mitochondrien neutralisiert.
- Das HomeVit-25 die positive Signaltransduktion in PBMC durch Sauerstoffradikale begünstigt.