

# Die Messung zirkulierender, zell-freier DNA aus geringsten Blutmengen in der Ergometrie

Breitbach, S., Sterzing, B., Magallanes, C., Tug, S., Simon, P.

Abteilung Sportmedizin, Rehabilitation und Prävention; Institut für Sportwissenschaft; Johannes Gutenberg-Universität Mainz

## Abstract

zurück zur Homepage des Instituts für Sportwissenschaft der Uni- Mainz

**Einleitung:** Die Bestimmung einer Kinetik der Konzentration zirkulierender, zell-freier DNA (cfDNA) im Plasma ist in der klinischen Medizin und Belastungsphysiologie von Bedeutung. Die Anstiege der cfDNA unter Belastung geben möglicherweise nicht nur Aufschluss über sportinduzierte Prozesse, sondern bieten auch ein praktikables Modell zur Erforschung der Akkumulation der cfDNA *in vivo* bei chronischen Erkrankungen. Bislang wurde die cfDNA aus größeren Volumina venösen Plasmas unter technisch bedingtem Verlust isoliert und gemessen. Ziel dieser Studie war die Etablierung einer minimal-invasiven Methode zur direkten Messung der cfDNA aus kleinsten Blutmengen vor, während und nach körperlicher Belastung.

**Methoden:** Die Probanden absolvierten einen Laufbandstufentest mit einer Startgeschwindigkeit von 6 km/h und einer Geschwindigkeitserhöhung um 2 km/h nach jeweils 3 Minuten. Vor Belastung, nach jeder Stufe und zu mehreren Zeitpunkten nach Belastung wurden kapillare Blutproben aus dem Ohrläppchen und der Fingerbeere zur Bestimmung der Laktat- und cfDNA-Konzentrationen entnommen. Außerdem wurden vor und nach Belastung venöse Proben gewonnen. Nach Zentrifugation der Proben wurde die cfDNA durch eine direkte quantitative real-time PCR-Methode aus 0,05 µl Plasma bestimmt.

**Ergebnisse:** Die Konzentrationsänderungen der cfDNA unterlagen einer ähnlichen Kinetik wie die der Laktatkonzentrationen ( $r=0,89$ ;  $p<0,0001$ ). Ein exponentieller Anstieg der Laktat- und cfDNA-Konzentrationen zeigte sich in der Regel nach Erreichen der ventilatorischen Schwelle. Im Vergleich zu den cfDNA-Konzentrationen in venösem Plasma wiesen die Proben aus Kapillarblut geringfügig niedrigere Werte auf.

**Diskussion:** Wir zeigen eine Methode zur hochsensitiven Quantifizierung der cfDNA aus kapillarem Blut. Die den Laktatkonzentrationen ähnliche Kinetik der cfDNA bei einem Stufentest lässt auf einen Zusammenhang des Freisetzungsmechanismus mit metabolischem Stress schließen. Inwiefern Ausgangskonzentration, Kinetik oder maximal erreichte cfDNA-Konzentration mit dem individuellen Grad der Leistungsfähigkeit oder Beanspruchung assoziiert sind und physiologische Prozesse widerspiegeln, bleibt Gegenstand weiterer Studien.

## Einleitung

Zell-freie, zirkulierende DNA (cfDNA) ist als doppelsträngige DNA-Fragmente im Größenbereich von ca. 70 bp bis zu 21 kb, zellungebunden oder an der äußeren Oberfläche von Blutzellen aufzufinden.<sup>1,2</sup> Anstiege der cfDNA wurden bereits bei chronischen Erkrankungen wie Tumoren oder Systemischem Lupus erythematoses, sowie akuten Zuständen nach Trauma, Herzinfarkt, Schlaganfall, Sepsis und nach sportlicher Belastung gezeigt.<sup>3,4,5</sup> Die Bestimmung einer Kinetik der cfDNA-Konzentration während einer körperlichen Belastung aus venösem Blut wurde bereits von Beiter et al. (2011)<sup>6</sup> demonstriert und gilt als Modell dafür, wie die Anstiege der cfDNA *in vivo* induziert und in Echtzeit untersucht werden können.

Die Quantifizierung der cfDNA erfolgte bislang aus isoliertem Probenmaterial (mit einer Ausnahme<sup>7</sup>). Nachteile der angewandten DNA-Extraktionsmethoden liegen im technisch bedingten Verlust der DNA, der sich je nach Methode unterschiedlich äußert und somit eine Vergleichbarkeit einzelner Studien untereinander ausschließt.<sup>8,9</sup> Außerdem werden große Mengen an venösem Plasma oder Serum benötigt. Aus diesen Gründen und im Hinblick auf die Untersuchung der cfDNA-Akkumulation in Echtzeit aus seriellen Blutentnahmen, war das Ziel dieser Studie die Etablierung einer minimal-invasiven Methode zur direkten Messung der cfDNA aus kapillarem Blutplasma. Dazu wurden vor, während und nach einer körperlichen Belastung unter standardisierten Bedingungen Blutproben zur Quantifizierung der cfDNA entnommen.

## Methoden

**Setting.** 15 männliche, sportlich aktive Probanden (Alter  $25,5 \pm 3,6$  Jahre; Größe  $183,0 \pm 6,9$  cm; Gewicht  $78,5 \pm 8,0$  kg) absolvierten einen stufen-förmigen Laufbandtest bis zur subjektiven Ausbelastung. Ausgehend von 6 km/h und einer Steigung von 1,5 % wurde die Geschwindigkeit alle 3 Minuten um 2 km/h erhöht. Vor der Belastung, nach jeder Stufe und zu mehreren Zeitpunkten nach Belastung wurden zur Bestimmung der Laktatkonzentrationen kapillare Blutproben aus dem Ohrläppchen mittels einer heparinisierten 20 µl Kunststoff-kapillare entnommen. Zu denselben Zeitpunkten wurden für die Messung der cfDNA-Konzentrationen 20-30 µl kapillares Blut aus der Fingerbeere mittels einer Microvette® CB 300 (Sarstedt, Nümbrecht, D) gewonnen. Außerdem wurde vor und nach Belastung in einem EDTA-K beschichteten Röhrchen Blut aus der Kubitalvene abgenommen.

**Verarbeitung der Blutproben.** Die Laktatkonzentrationen wurden unmittelbar nach Beendigung der Belastungstests mit dem EKF Biosen 5140 (EKF-diagnostic GmbH, Magdeburg, D) gemessen. Die weiteren Proben wurden durch Zentrifugation ( $1600 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 10 Minuten) in Plasma und zelluläre Blutbestandteile getrennt. Der Überstand wurde zusätzlich bei  $16.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert, um das Plasma von Zelldebris zu bereinigen.

**Messung der cfDNA.** Die absoluten Konzentrationen der cfDNA wurden durch eine direkte, quantitative real-time PCR-Methode (qPCR) bestimmt. Das Plasma wurde in Wasser verdünnt, um die Konzentration möglicher Inhibitoren wie Eiweiße und Salze zu verringern. Die qPCR-Messung erfolgte durch Detektion der Fluoreszenzstärke des Farbstoffs SYBR Green auf einem CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad, München, D). Jede Probe wurde in Triplets analysiert. In zwei Messungen wurden jeweils eine kurze (90 bp) und eine längere (222 bp) Sequenz der LINE-1 Subfamilie L1PA2 amplifiziert.

**Statistik.** Statistische Analysen wurden mit JMP® 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Aus Gründen der Normalverteilung wurden Korrelations- und Regressionsanalysen mit logarithmierten Daten berechnet. Laktat- und cfDNA-Konzentrationen aller vollständig durchlaufenen Stufen wurden als verbundene Stichproben behandelt.

## Ergebnisse

Die Kinetik der Konzentrationsänderungen der cfDNA zeigte im Vergleich zu den Laktatkurven einen sehr ähnlichen Verlauf. Ein exponentieller Anstieg der Laktat- und cfDNA-Konzentrationen zeigte sich in der Regel nach Erreichen der ventilatorischen Schwelle (Abb. 1 A, B). Der Korrelationskoeffizient für eine Probanden gebundene Analyse der Gesamtwerte lag bei  $r=0,89$ ;  $p<0,0001$ . Bei Betrachtung der einzelnen Korrelationen von Laktat- und cfDNA-Werte je Proband zeigten sich Korrelationskoeffizienten von  $r=0,62 - 0,99$  ( $p<0,0001$ ; Abb. 2).

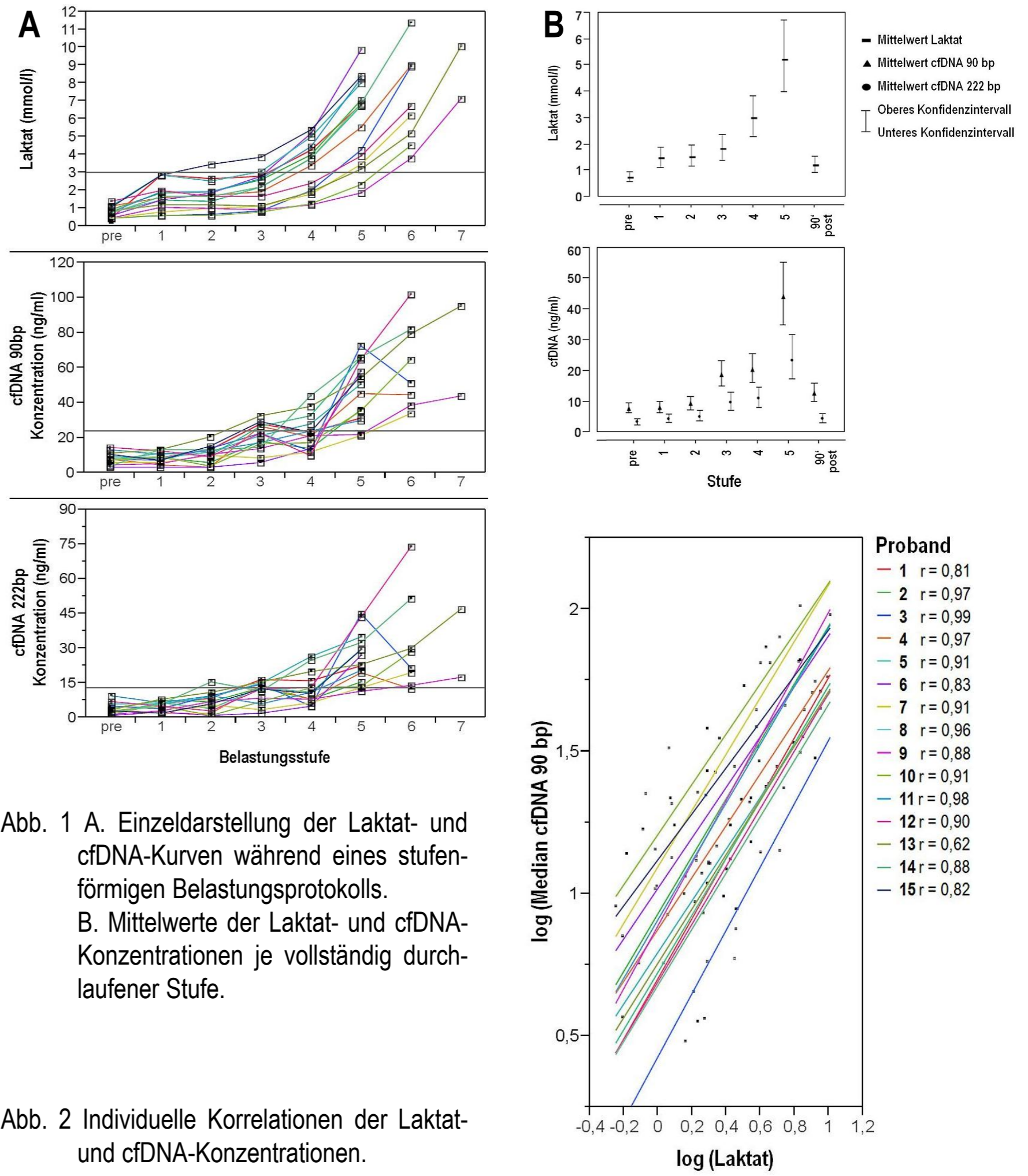


Abb. 2 Individuelle Korrelationen der Laktat- und cfDNA-Konzentrationen.

Das Plasma aus kapillaren Blutproben wies in der Regel geringfügig niedrigere cfDNA-Konzentrationen auf, als das Plasma aus den venösen Blutproben (Abb.3). Im Kapillarblut zeigte sich ein  $8,53 (\pm 5,76)$ -facher relativer Anstieg der cfDNA von vor Belastung zu nach Belastung. In den venösen Proben stieg die cfDNA  $9,41 (\pm 3,87)$ -fach an.

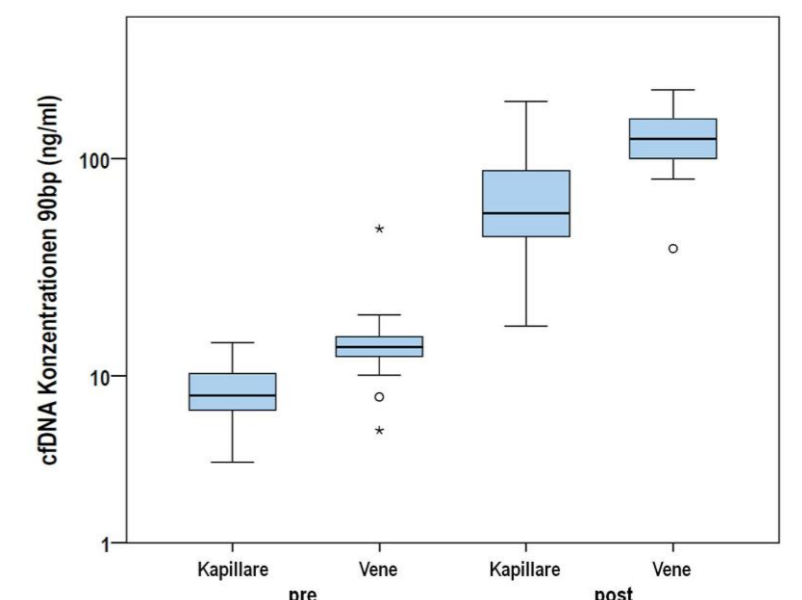


Abb. 3 Vergleich der cfDNA-Konzentrationen (90 bp-Fragmente) detektiert im Plasma aus kapillarem und venösem Blut.

## Diskussion

Wir zeigen eine Methode zur hochsensitiven, direkten Quantifizierung der cfDNA aus Plasma ohne vorherige DNA-Extraktion. Die Anstiege der cfDNA-Konzentrationen während eines stufen-förmigen Laufbandtests zeigten eine den Laktatkonzentrationen ähnliche Kinetik, was mit den Ergebnissen von Beiter et al. (2011)<sup>6</sup> übereinstimmt. Die hohen Korrelationskoeffizienten zwischen cfDNA- und Laktatkonzentrationen lassen auf einen Zusammenhang des Freisetzungsmechanismus mit metabolischem Stress schließen. Im Gegensatz zum Einzelmolekül Laktat setzt sich die cfDNA aus heterogenen DNA-Fragmenten zusammen. Dadurch lässt die cfDNA weitergehende qualitative Analysen zu, wie z.B. in der Brustkrebsdiagnostik, wo man mutationsspezifische DNA in der zirkulierenden Erbsubstanz detektieren konnte.<sup>2</sup>

Die individuell unterschiedlichen Zusammenhänge der Laktatkurve mit den cfDNA-Werten sowie individuelle Unterschiede zwischen cfDNA-Konzentrationen im kapillaren und venösen Blut können derzeit noch nicht erklärt werden. Außerdem bleibt Gegenstand weiterer Studien, inwiefern Ausgangskonzentration, Kinetik oder maximal erreichte cfDNA-Konzentration mit dem individuellen Grad der Leistungsfähigkeit oder der Beanspruchung assoziiert sind und physiologische Prozesse widerspiegeln.

## Literatur

- Jahr, S. et al., DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2011; 61: 1659-1665.
- Schwarzenbach, H. et al. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Cancer Rev.* 2011; 11 (6): 426-437.
- Ziegler et al. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treatment Reviews* 2002; 28 (5): 255-271.
- Atamaniuk, J. et al. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008; 104 (4): 711-717.
- Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nickolaidis MG, et al. Time sampling is crucial for measurements of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clin Biochem.* 2010; 43 (16-17): 1368-1370.
- Beiter, T. et al., Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics *in vivo*. *Clin Chem.* 2011 Apr; 57 (4): 633-636.
- Umetani, N. et al. Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin Chem.* 2006; 52 (6): 1062-1069.
- Clausen, F. B. et al. Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn.* 2007; 27 (1): 6-10.