

The discovery and implications of DNA protection and rejuvenation effects of DNA gaps

Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.

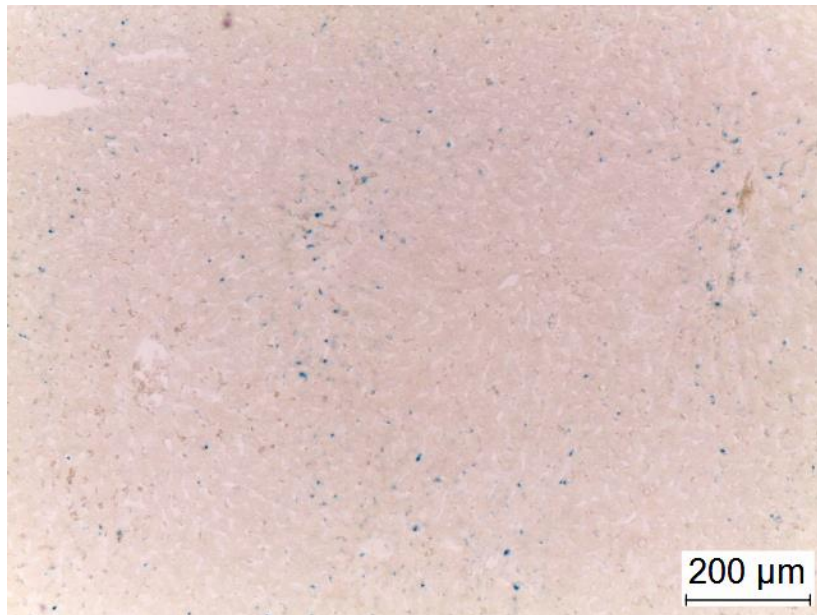
Center of Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

The discovery and implications of DNA protection and rejuvenation effects of DNA gaps

1. Youth associated genomic stabilization DNA gaps (Youth-DNA-GAPs)
2. “How does our DNA age? **DNA gap reduction hypothesis**”
3. Implications of **RE**juvenating **DNA** by **GE**nomic stability **M**olecules (**RED-GEMs**)
4. The **vicious cycle** of aging process (Why aging is naturally inevitable?)

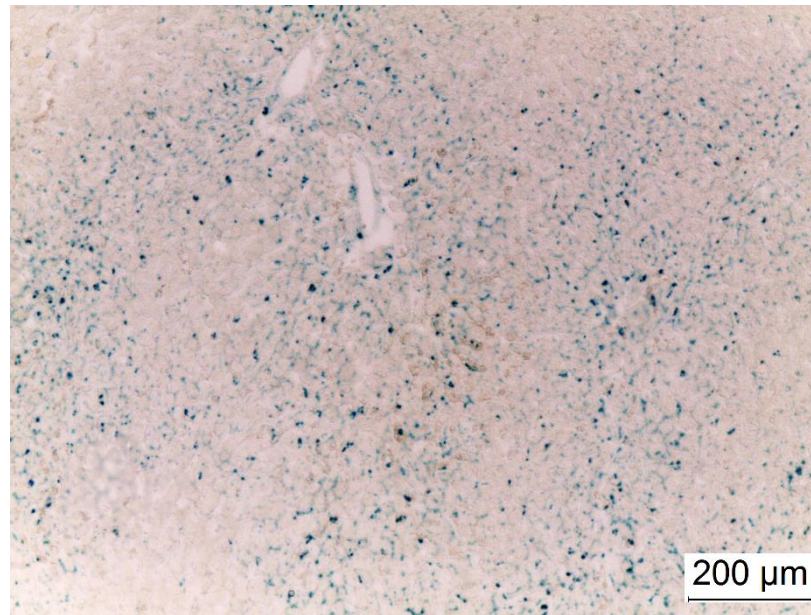
Rat liver

7 months



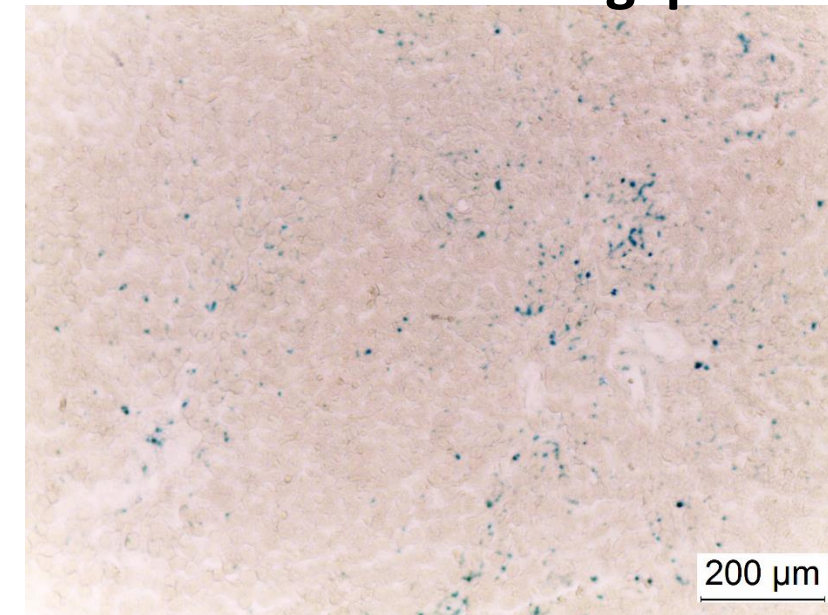
Blue = senescence cells

30 months



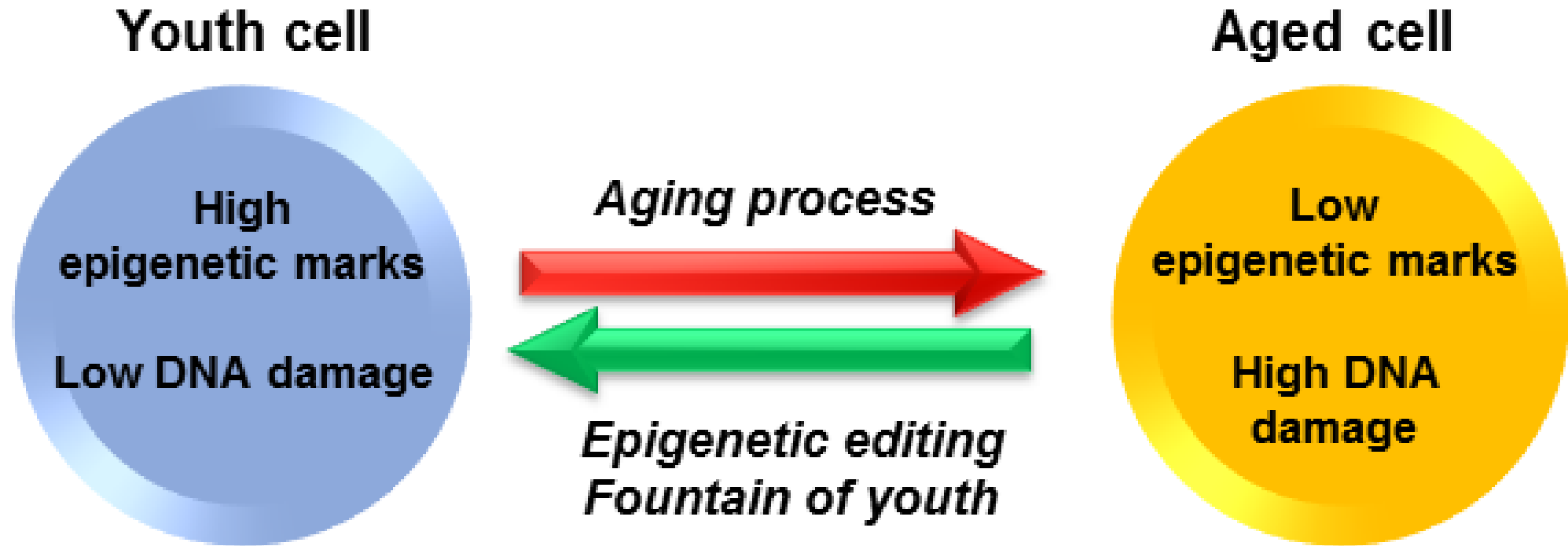
Blue = senescence cells

30 months after
increased DNA gaps

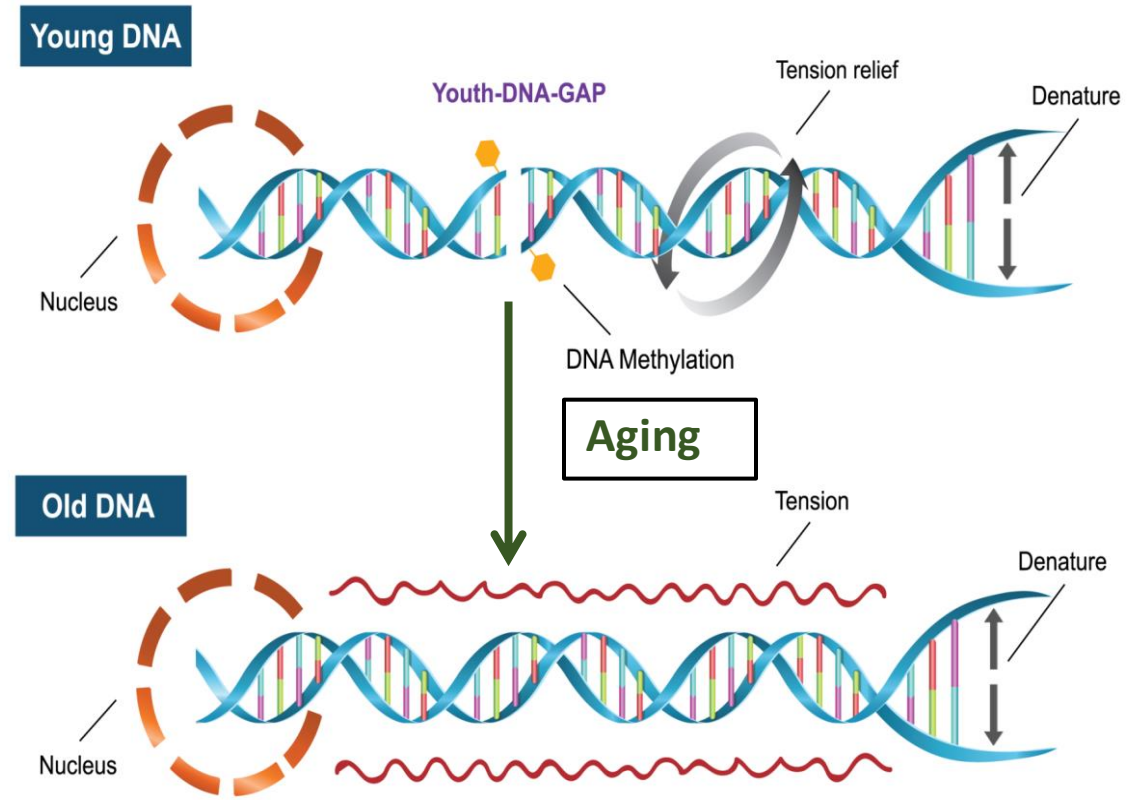


Blue = senescence cells

Epigenetics, DNA damage and Aging



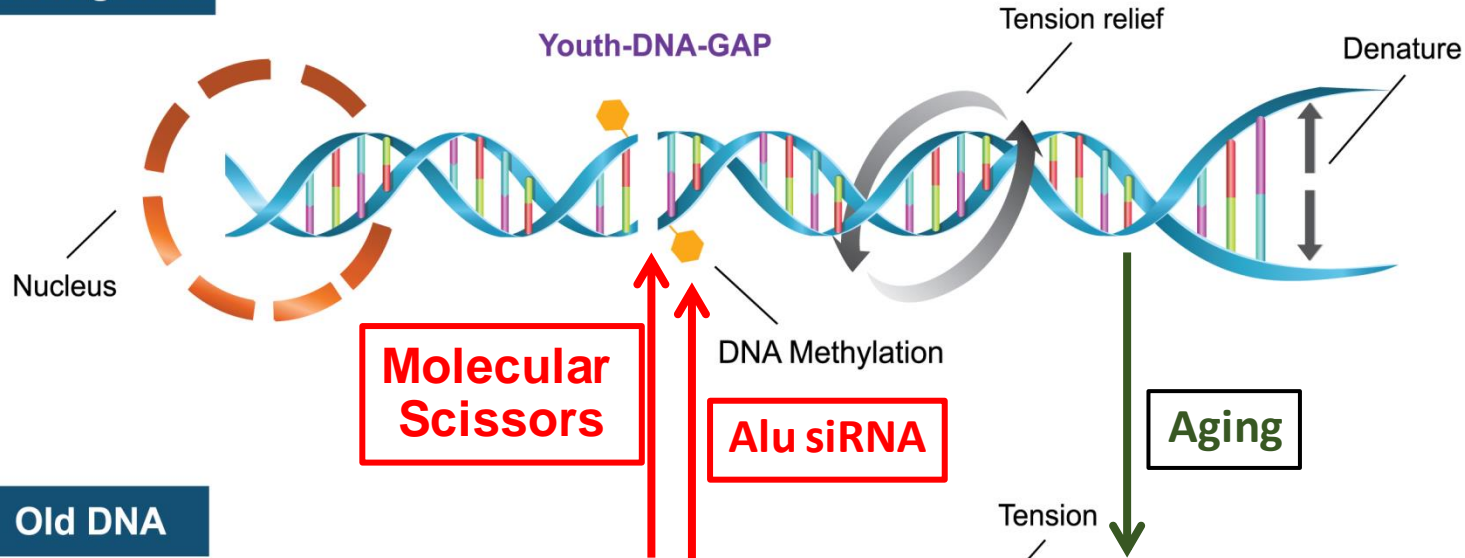
How does our DNA age? >> DNA gap reduction hypothesis



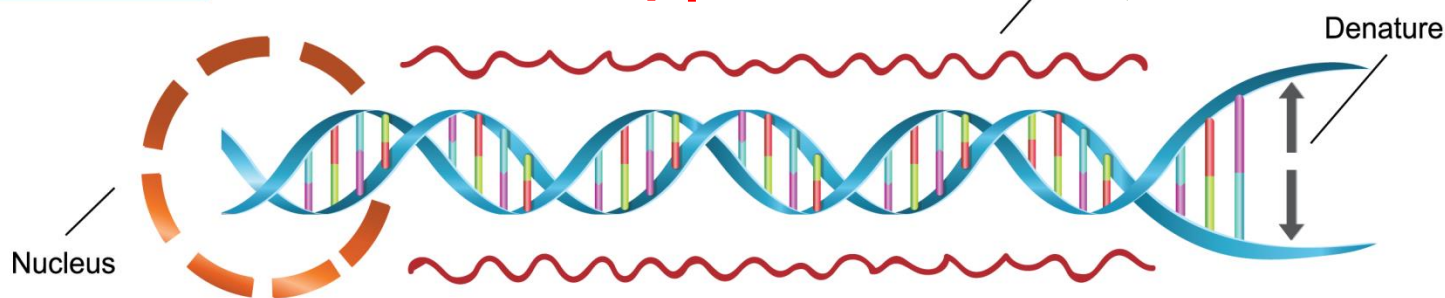
The discovery and implications of DNA protection and rejuvenation effects of DNA gaps

How does our DNA age? DNA gap reduction hypothesis

Young DNA



Old DNA



Reference:

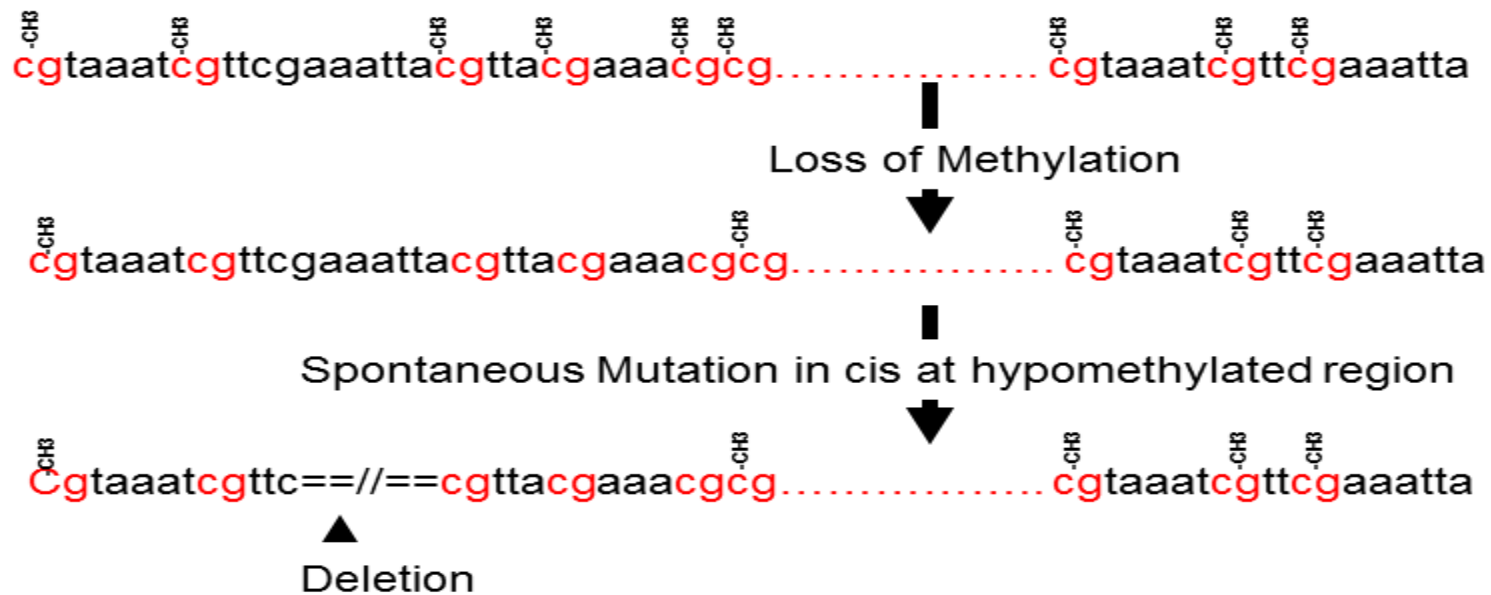
1. Discovery of DNA gaps
Nucleic Acids Research 2008,
36(11):3667-3675.
2. Discovery of Molecular Scissors
Plos One 2013, 8(8).
3. Youth associated genomic stabilization
DNA gaps (Youth-DNA-GAPs)
FASEB J. 2018:fj201800218RR
4. Alu siRNA
Epigenomics. 2018;10(2):175-85.
5. **Molecular Scissors to complete rat
rejuvenation Yasom et al. submitted**

Apiwat Mutirangura
Chulalongkorn University

Because deletion is frequently occurred in hypomethylated DNA, DNA methylation around DNA breaks should be hypomethylated.

Hypomethylation leads to mutation in cis.
Perhaps by spontaneous or endogenous DNA breaks (EDSBs).

Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12871-6 (2003). [1st EDSBs proposed](#)

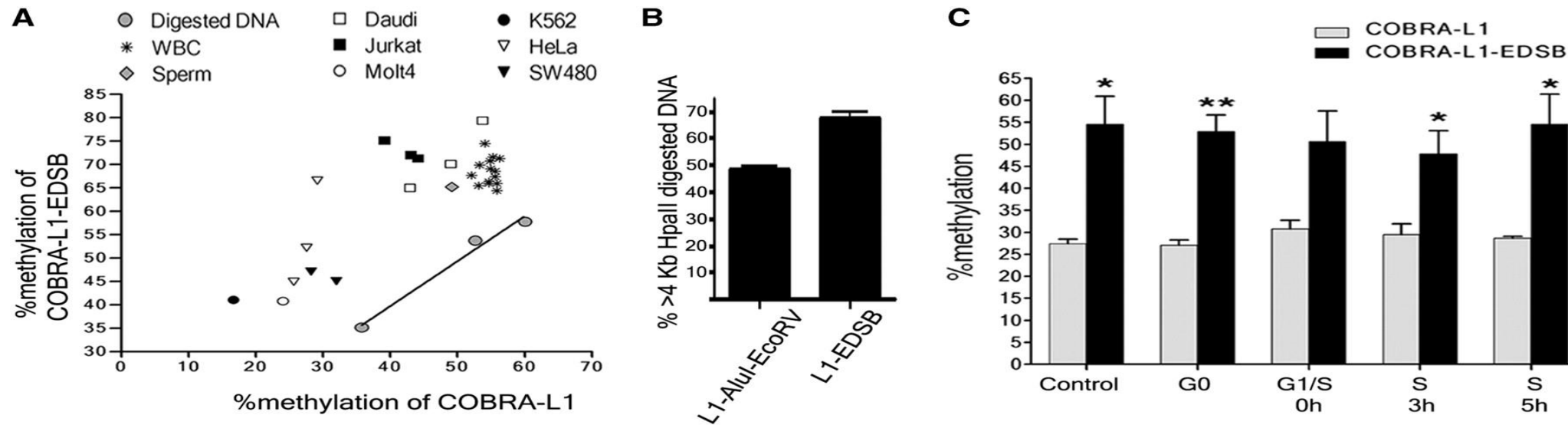


LINE-1 methylation status of endogenous DNA double-strand breaks

Wichai Pornthanakasem¹, Narisorn Kongruttanachok², Chutipha Phuangphairoj¹, Chotika Suyarnsestakorn^{2,3}, Taweap Sanghangthum⁴, Somjarod Oonsiri⁴, Wanpen Poneyam¹, Thatchawan Thanasupawat¹, Oranart Matangkasombut⁵ and Apiwat Mutirangura^{1,*}

¹Center of Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, ²Inter-Department Program of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, ³The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani 12120, ⁴Department of Radiology, Division of Radiation Oncology, Faculty of Medicine and ⁵Department of Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Hypothesis EDSBs should be hypomethylated.
But we found all of them are hypermethylated.



Acknowledgements

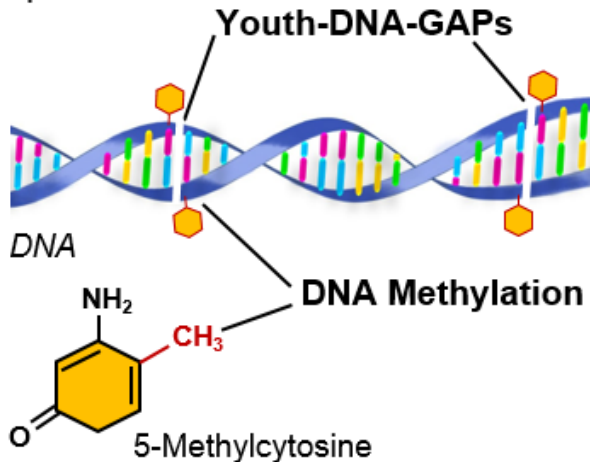
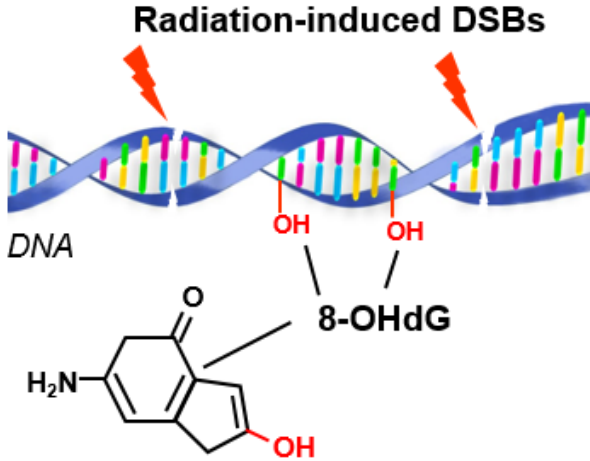
This study was supported by the Thailand Research Fund and Chulalongkorn

Apiwat Mutirangura
Chulalongkorn University



DNA gap vs DNA break

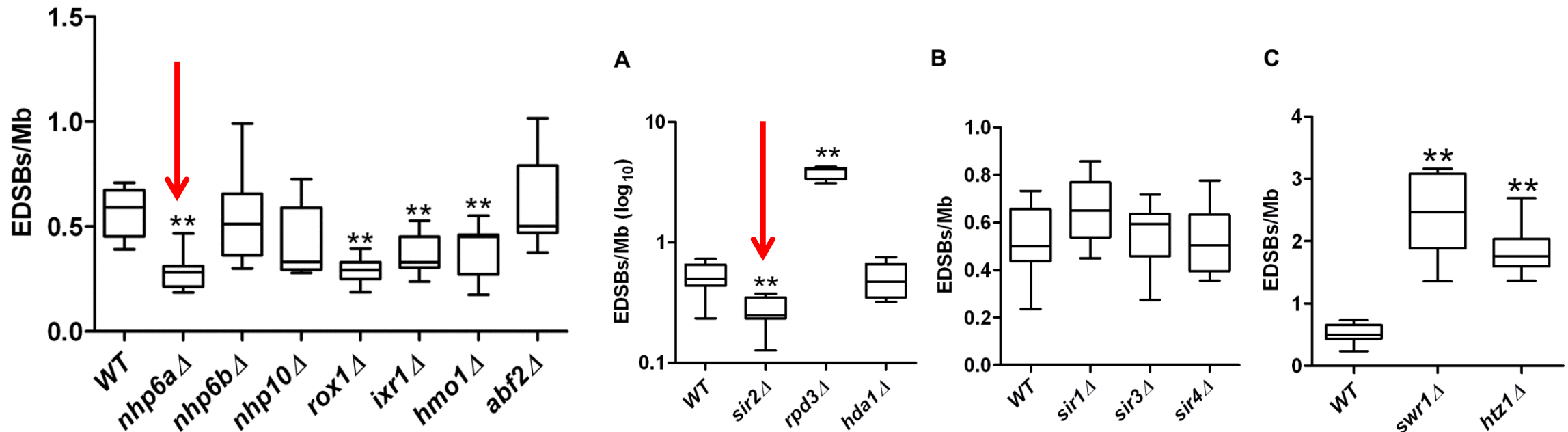
- One persistent DNA break can kill the cell, should be hypomethylated, and is created by DNA replication.
- We found weird DNA breaks in all cells, hypermethylated, and DNA replication-independent (RIND-EDSB or DNA gap).
- These cell-produced DNA gaps prevent DNA damage may be an epigenetic mark.

Epigenetic marks	DNA damage
Cause: Cellular enzyme	Deleterious DNA events
Role: Physiological functions	Pathological effects
Example: 	

Replication-Independent Endogenous DNA Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae* Model

Jirapan Thongsroy¹, Oranart Matangkasombut^{2*}, Araya Thongnak³, Prakasit Rattanatanyong^{3,4}, Siwanon Jirawatnotai^{5,6}, Apiwat Mutirangura^{3,4*}

1 Inter-Department Program of BioMedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, **2** Department of Microbiology and Developing Research Unit on Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, **3** Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, **4** Center for Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, **5** Department of Cancer Biology, Dana-Farber Cancer Institute, and Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America, **6** Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand



This study not only suggested that RIND-EDSBs (**DNA gaps**) are epigenetic marks having physiological function but they are also protein candidates producing physiological RIND-EDSBs.

How does our DNA age?



DNA gap reduction hypothesis

THE
FASEB JOURNAL • RESEARCH • www.fasebj.org

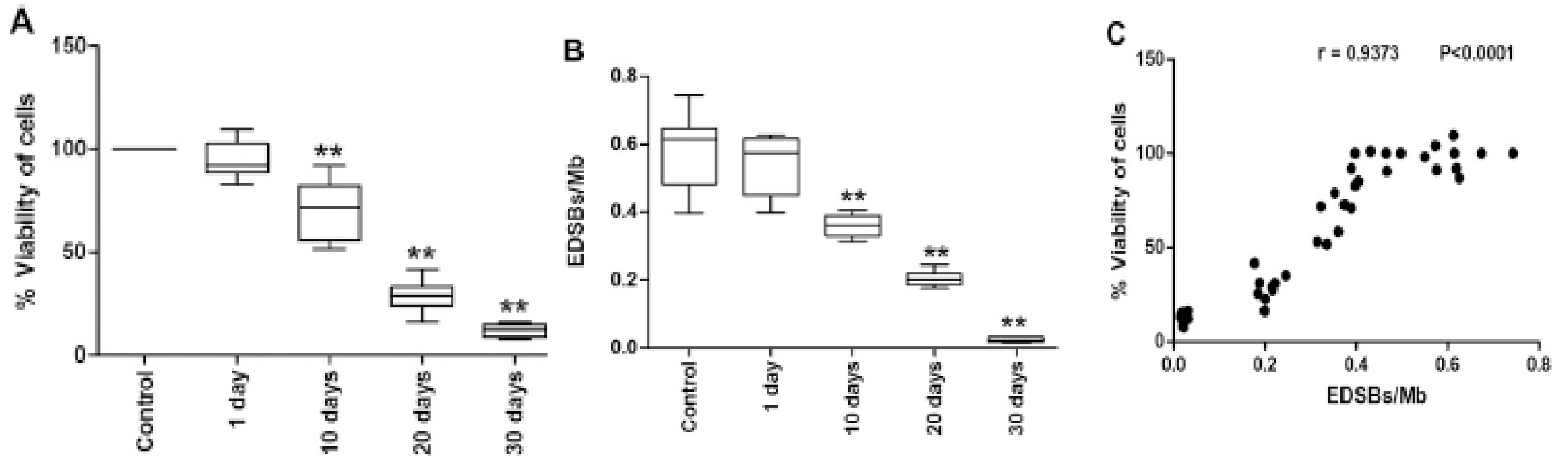
Reduction in replication-independent endogenous DNA double-strand breaks promotes genomic instability during chronological aging in yeast

Jirapan Thongsroy,^{*,1} Maturada Patchsung,^{†,1} Monnat Pongpanich,^{†,‡,§,1} Sirapat Settayanon,[†] and Apiwat Mutirangura^{†,¶,2}

^{*}School of Medicine, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, Thailand; and [†]Center for Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Diseases, [‡]Department of Mathematics and Computer Science, and [§]Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, and

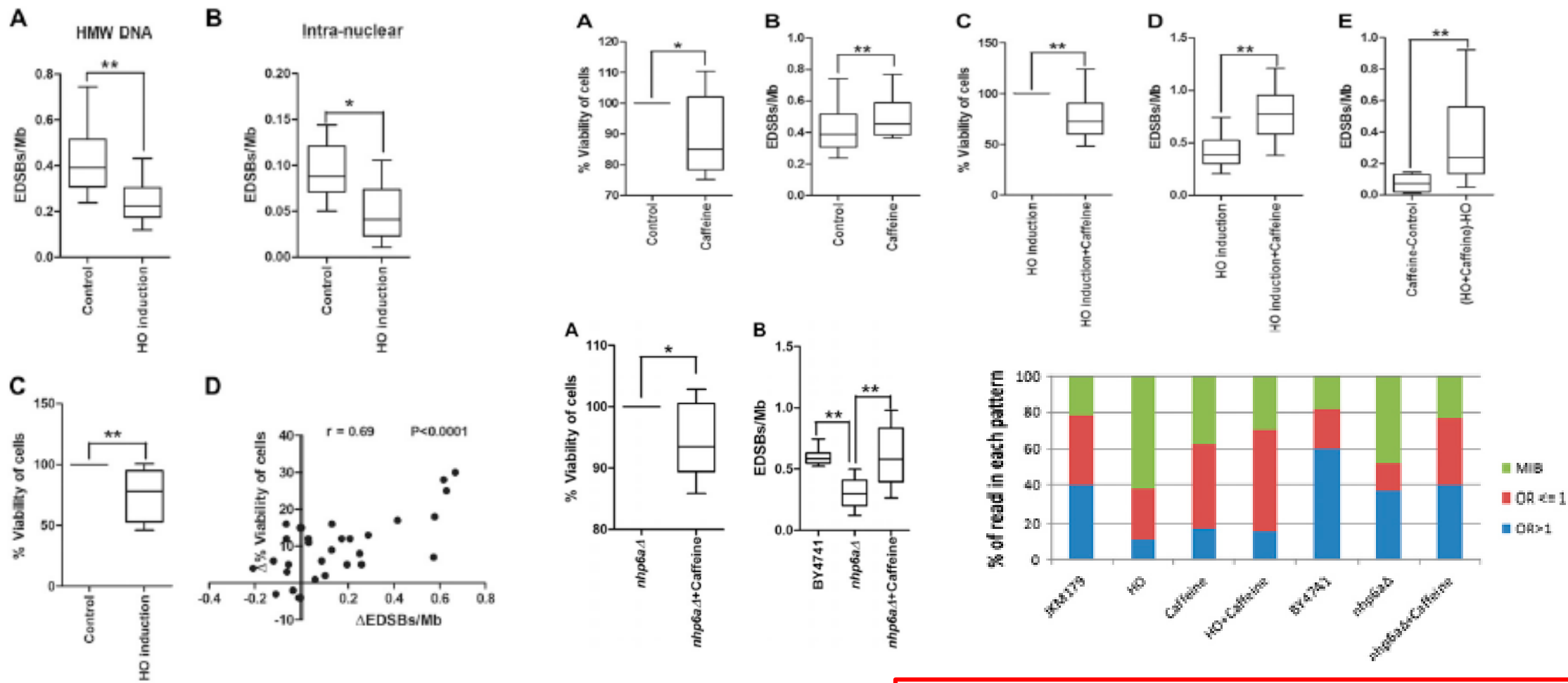
[¶]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

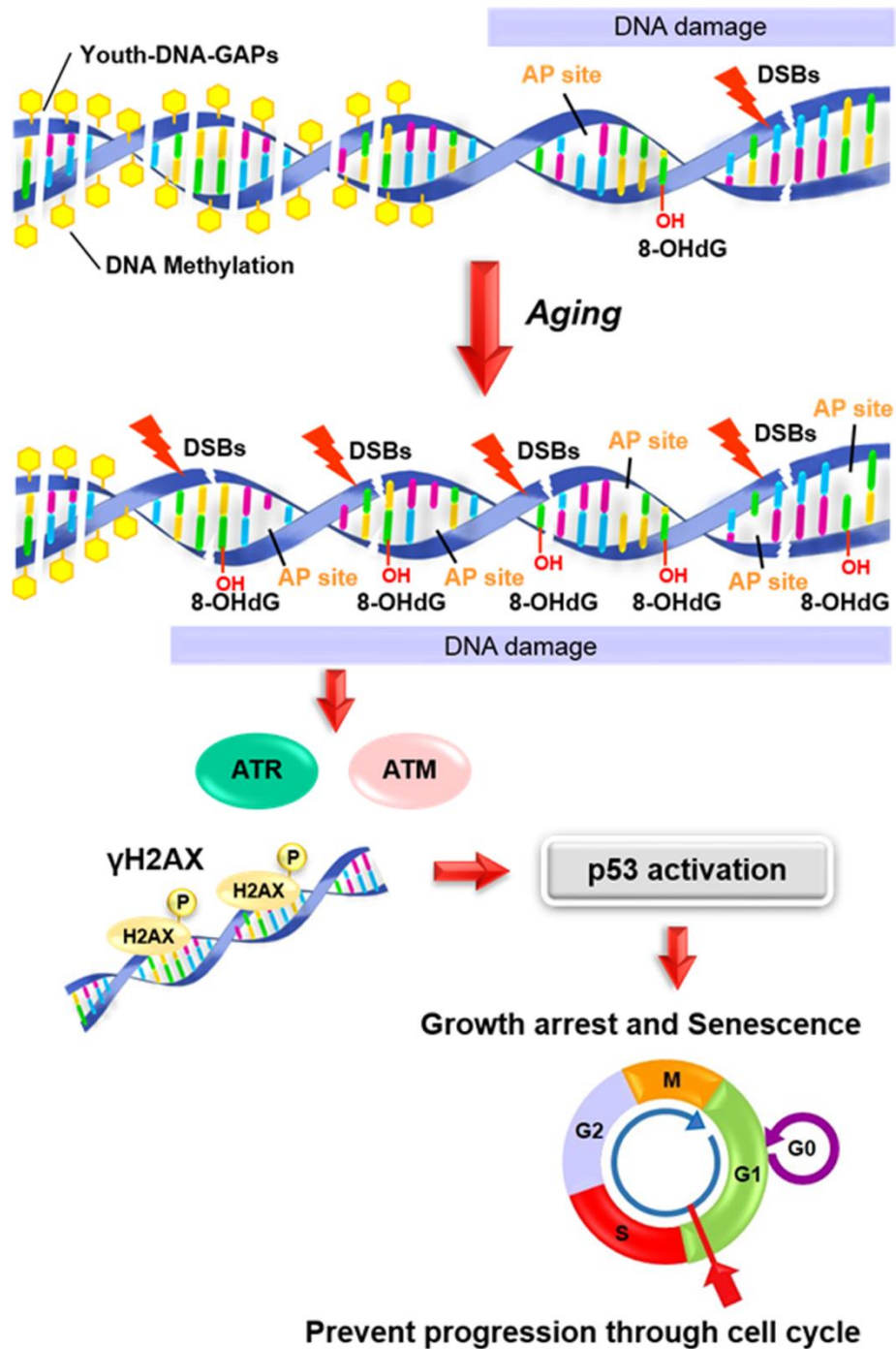
DNA gap reduction in chronologically aging yeast



Thongsroy J, et al. FASEB J. 2018:fj201800218RR.

Reduction of DNA gaps shears DNA and reduces cell viability.



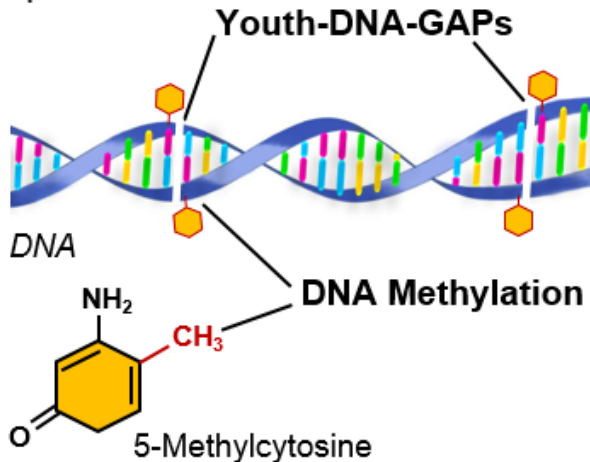
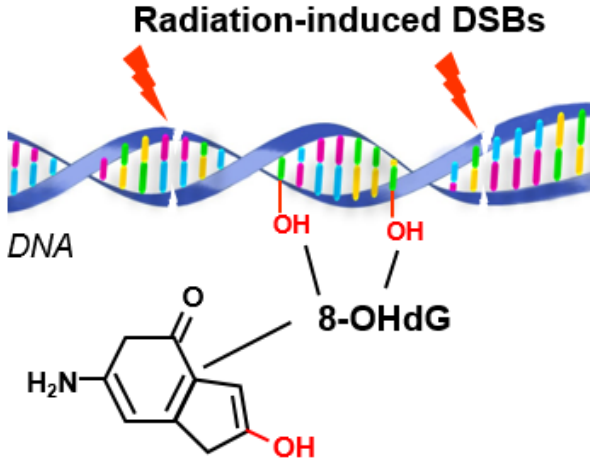


- DNA damage is the mediator of genomic instability and can cause all hallmarks of aging.
- Youth-DNA-GAP reduction causes DNA damage so low Youth-DNA-GAPs in the elderly is the **nidus** of the aging process.



DNA gap vs DNA break

- One persistent DNA break can kill the cell, should be hypomethylated, and is created by DNA replication.
- We found weird DNA breaks in all cells, hypermethylated, and DNA replication-independent (RIND-EDSB or DNA gap).
- These cell-produced DNA gaps prevent DNA damage may be an epigenetic mark.

Epigenetic marks	DNA damage
Cause: Cellular enzyme	Deleterious DNA events
Role: Physiological functions	Pathological effects
Example: 	Example: 

The roles of HMGB1-produced DNA gaps in DNA protection and aging biomarker reversal

Sakawdaurn Yasom^{1,2,†}, Papitchaya Watcharanurak^{1,2,†}, Narumol Bhummaphan^{1,†}, Jirapan Thongsroy^{3,†}, Charoenchai Puttipanyalears^{1,†}, Sirapat Settayanon^{1,2,†}, Kanwalat Chalertpet^{1,2,†}, Wilunplus Khumsri^{1,2}, Aphisek Kongkaew⁶, Maturada Patchsung¹, Chutha Siriwattanakankul¹, Monnat Pongpanich^{4,5}, Piyapat Pin-on¹, Depicha Jindatip¹, Rujira Wanotayan⁷, Mingkwan Odton⁸, Suangsuda Supasai⁸, Thura Tun Oo^{9,10}, Busarin Arunsak^{9,10}, Wasana Pratchayasakul^{9,10}, Nipon Chattipakorn^{10,11}, Siriporn Chattipakorn^{9,10}, Apiwat Mutirangura^{1,*}

¹Center of Excellence in Molecular Genetics of Cancer and Human Disease, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

²Interdisciplinary Program of Biomedical Sciences, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

³School of Medicine, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161, Thailand.

⁴Department of Mathematics and Computer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁵Omics Sciences and Bioinformatics Center, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

⁶Research Administration Section, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

⁷Department of Radiological Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170, Thailand.

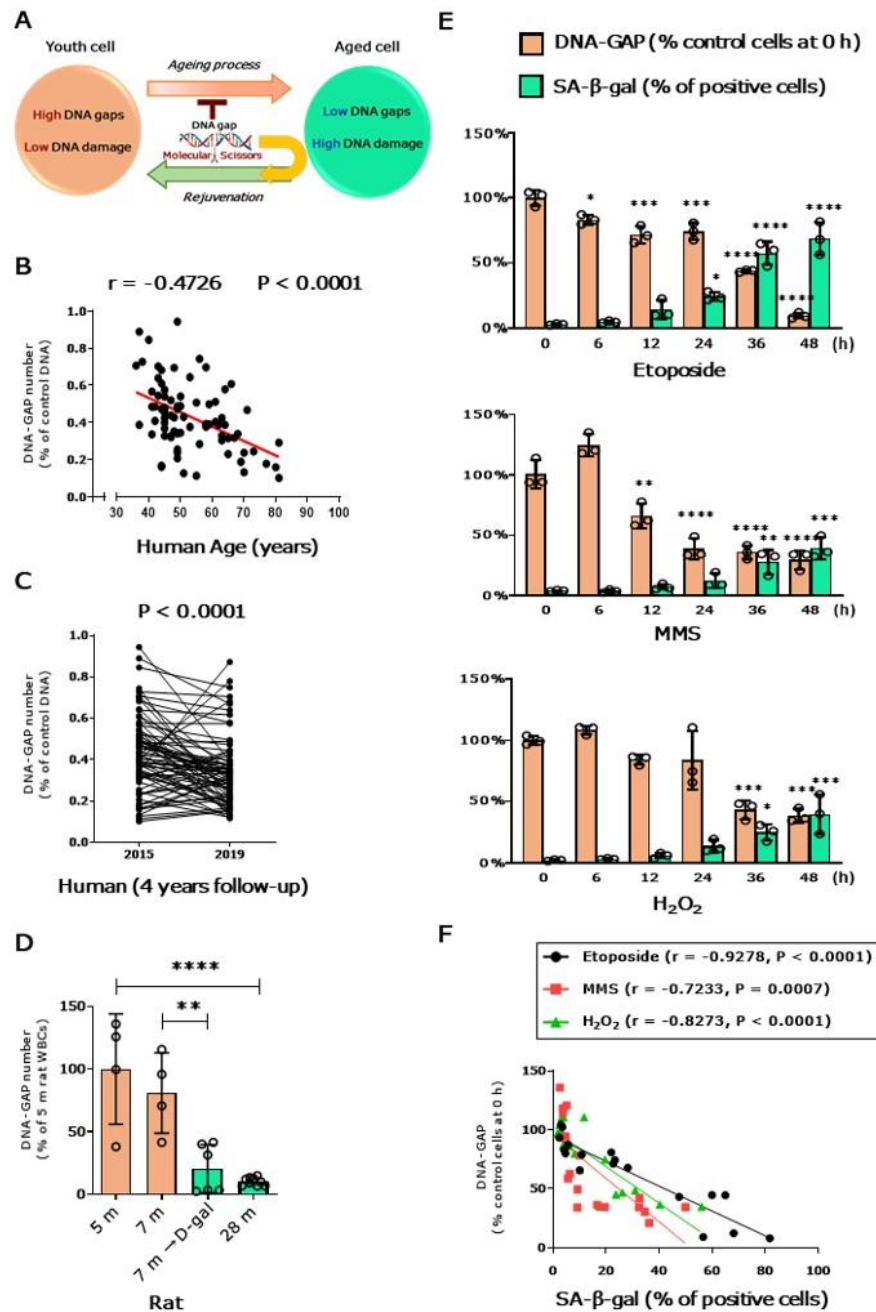
⁸Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand.

⁹Neurophysiology Unit, Cardiac Electrophysiology Research and Training Center, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

¹⁰Center of Excellence in Cardiac Electrophysiology Research, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

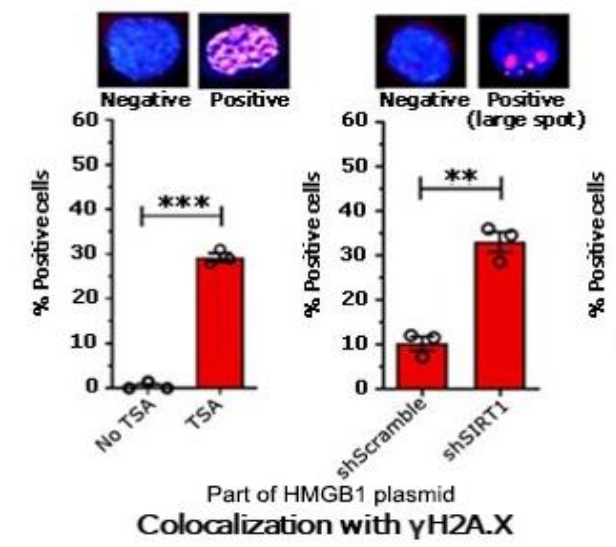
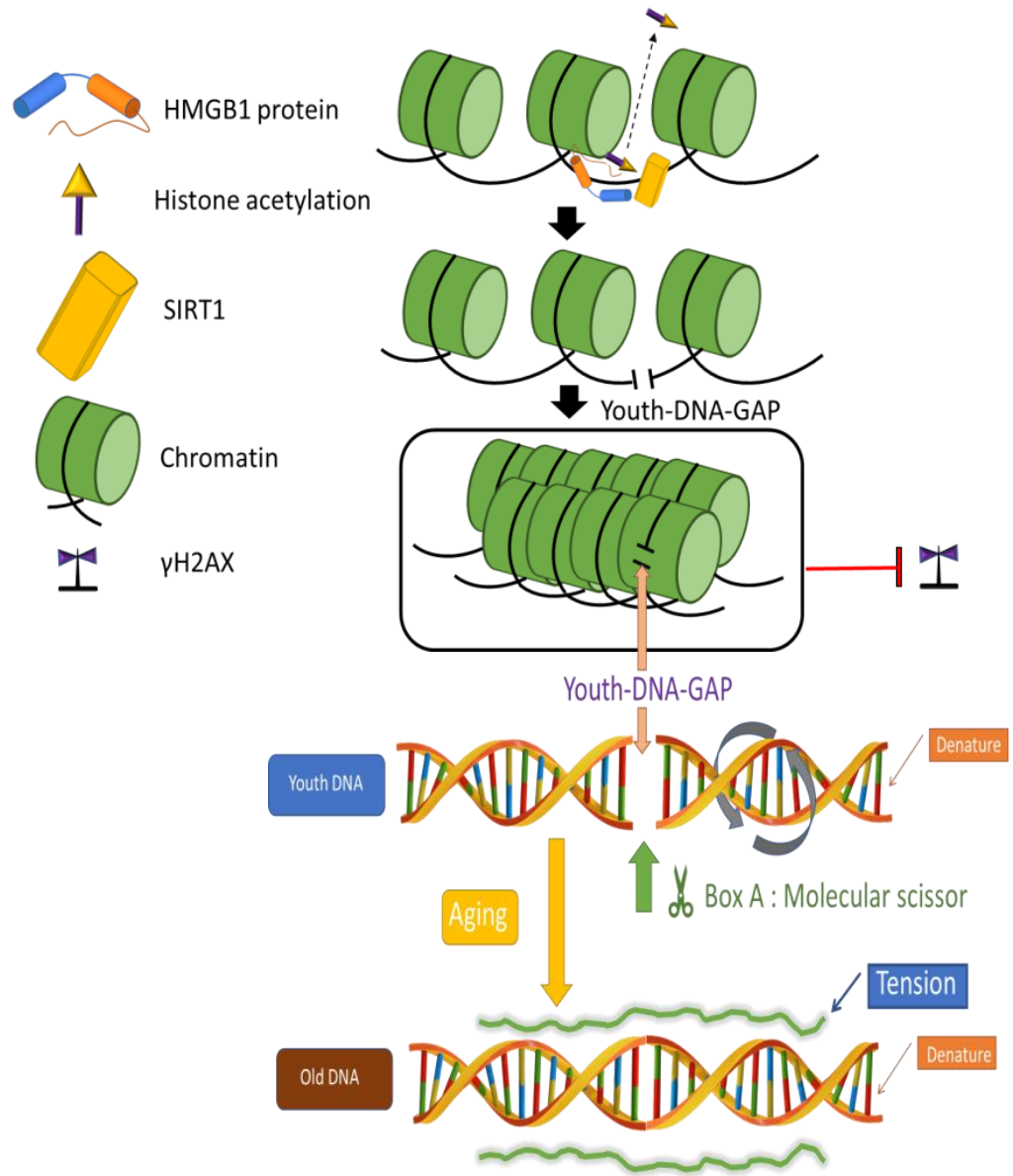
¹¹Cardiac Electrophysiology Unit, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand.

The National Science and Technology Development Agency, Thailand [Research Chair Grant, P-19-50189]

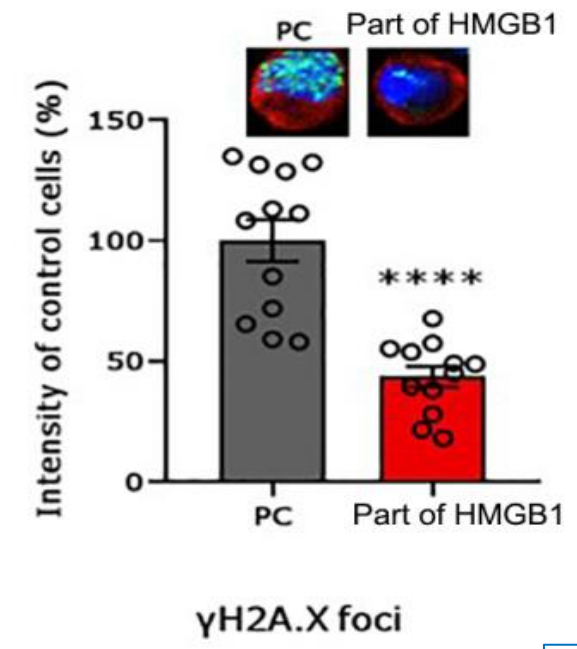


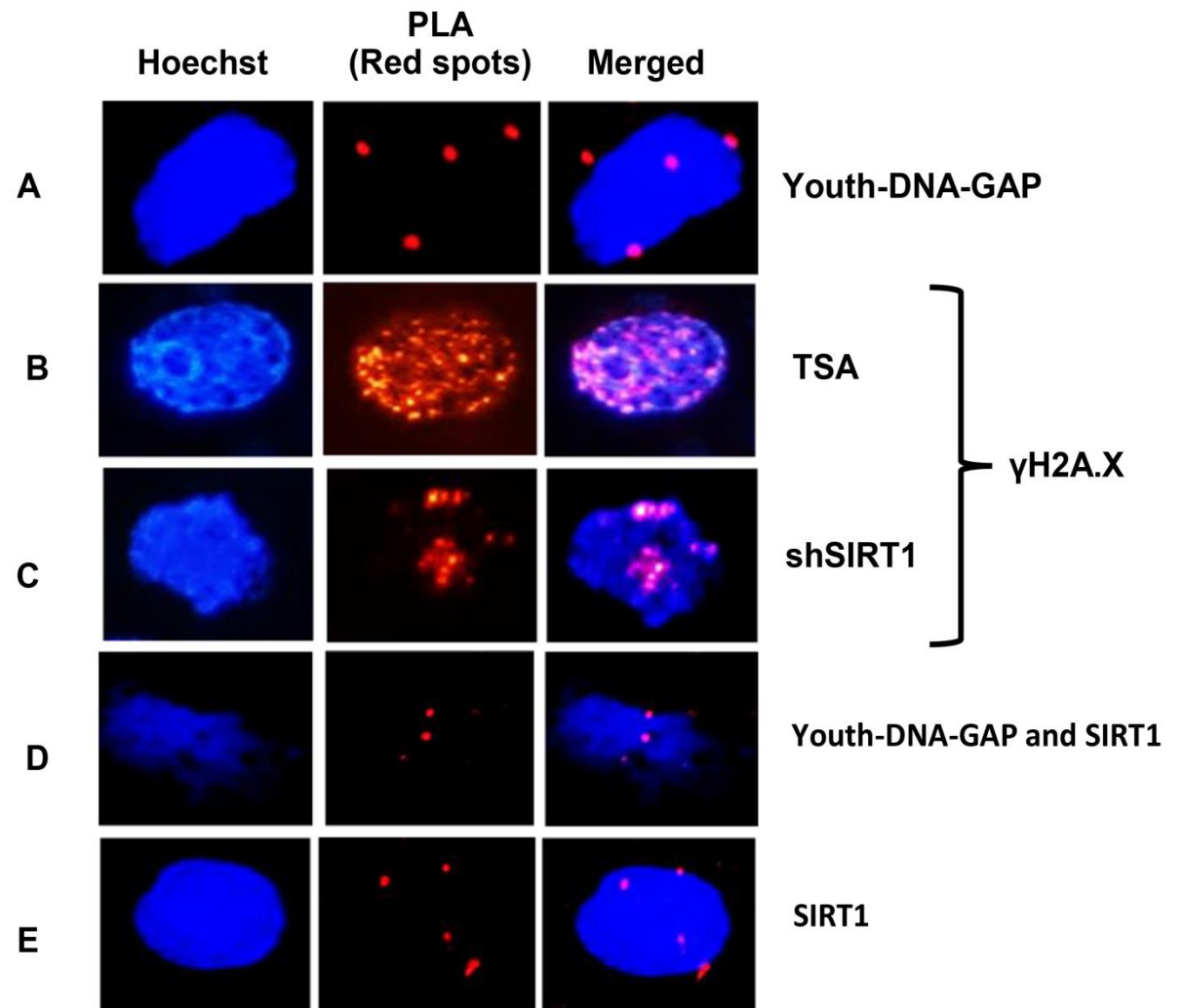
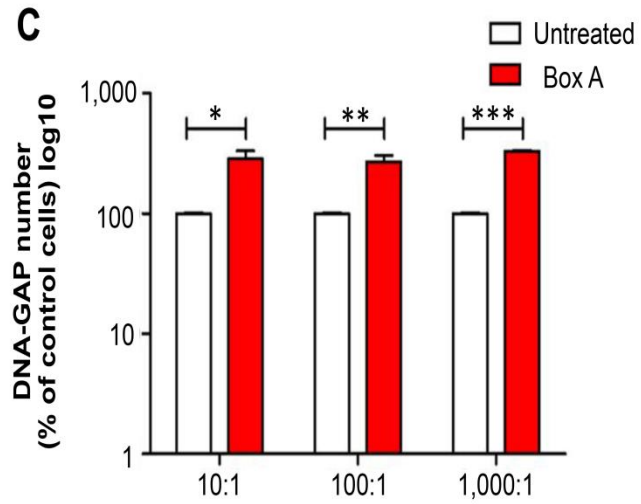
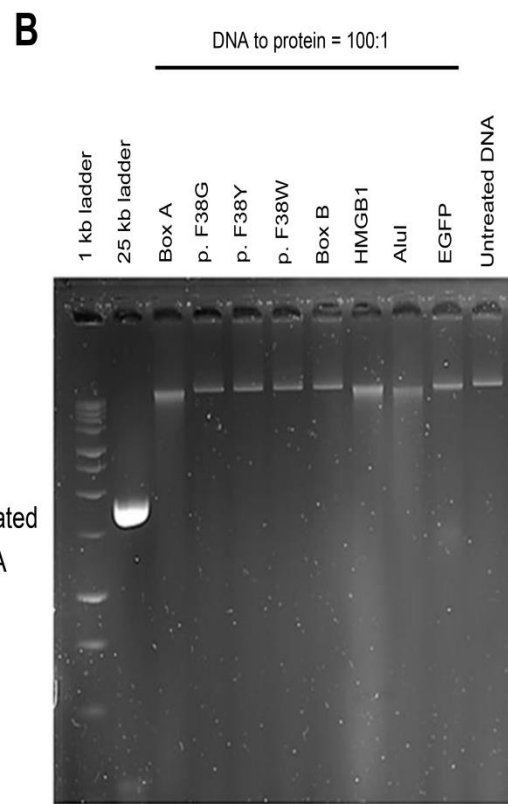
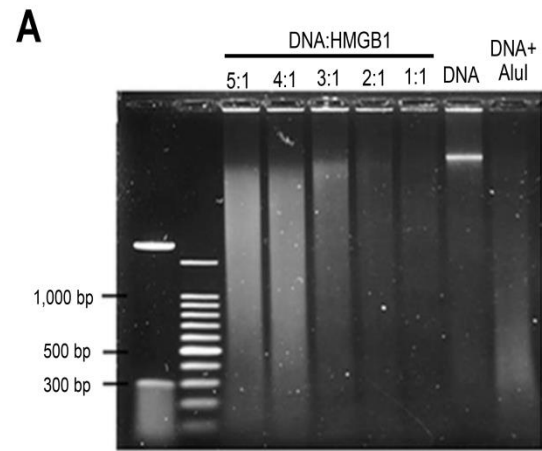
Reduction in Youth-DNA-GAPs during chronological aging in mammals.

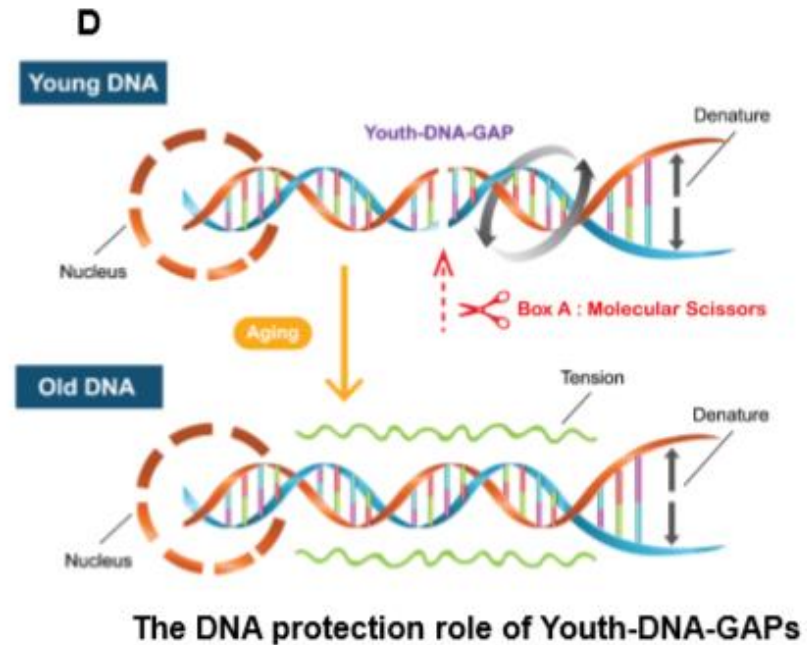
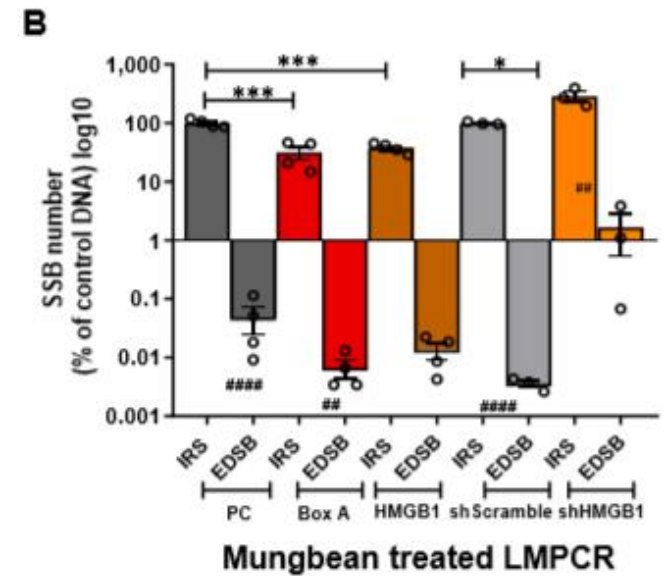
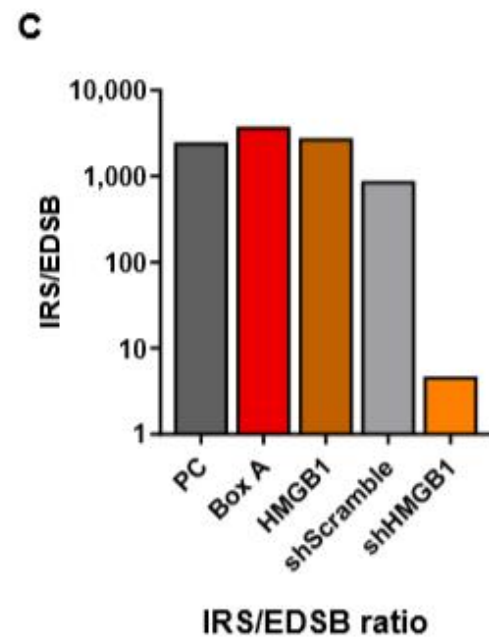
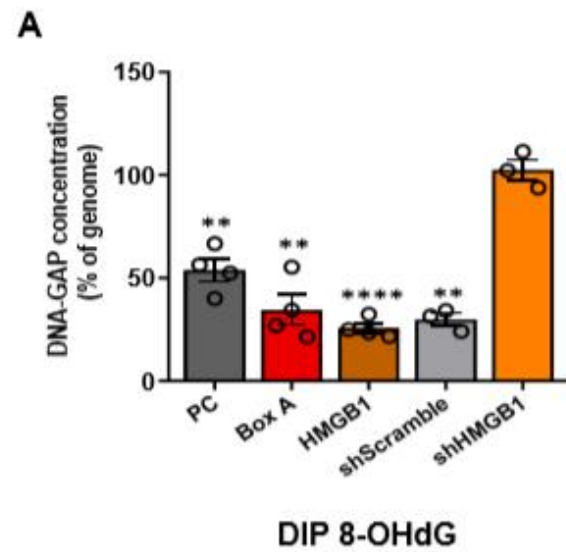
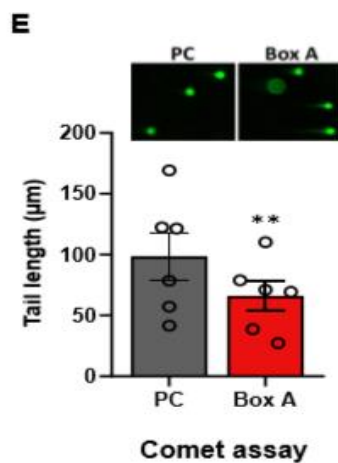
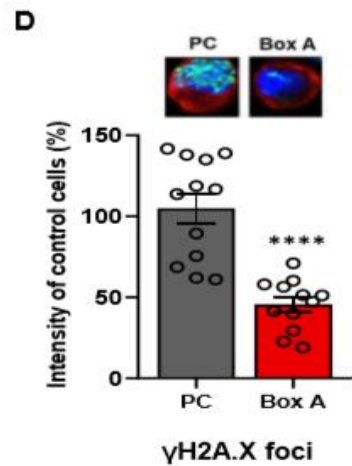
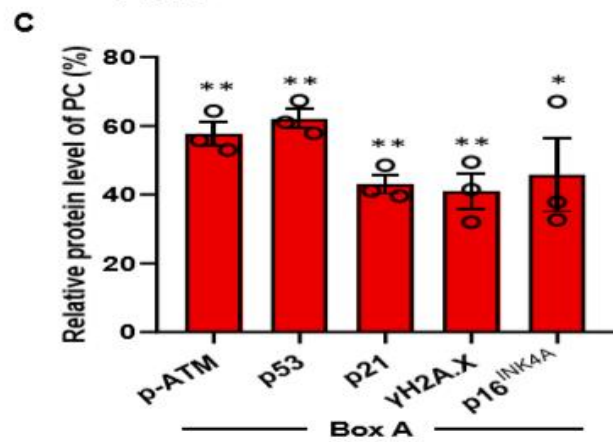
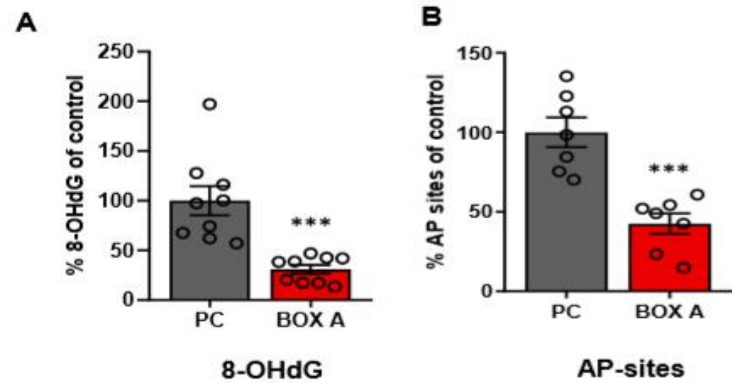
- (A) A diagram representing the homeostasis of DNA gaps and DNA damage. Molecular scissors represent DNA gap-forming proteins.
- (B) Correlation between the number of DNA gaps and age ($n=80$). Pearson's correlation coefficient (r) with the P-value is indicated.
- (C) Youth-DNA-GAP levels at the four-year follow-up (2015-2019) in the same person ($n = 76$). P-value is indicated (paired t-test).
- (D) The numbers of DNA gaps in 5-month-old ($n=4$), 7-month-old ($n=4$), 7-month-old D-gal induced ($n=6$), 30-month-old ($n=14$) rats.
- (E) The relative percentage of DNA gaps and SA- β -gal-positive cells in the cells exposed to etoposide, MMS, or H_2O_2 at different time points from 0 to 48 hours (each data point is the mean of 6 experiments under intra-assay conditions).
- (F) Correlation between the number of DNA gaps and SA- β -gal-positive cells.

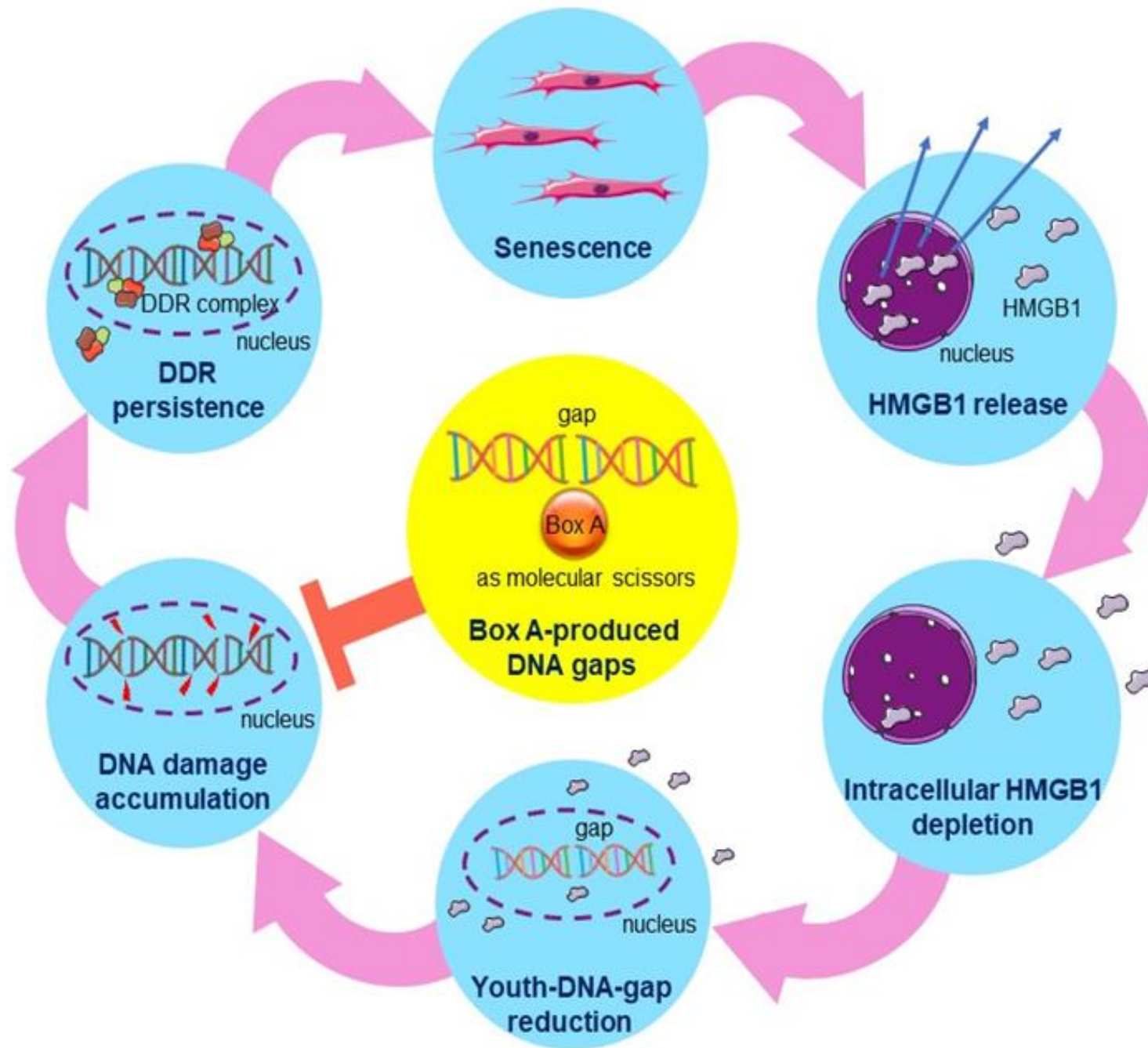


Yasom et al.
submitted

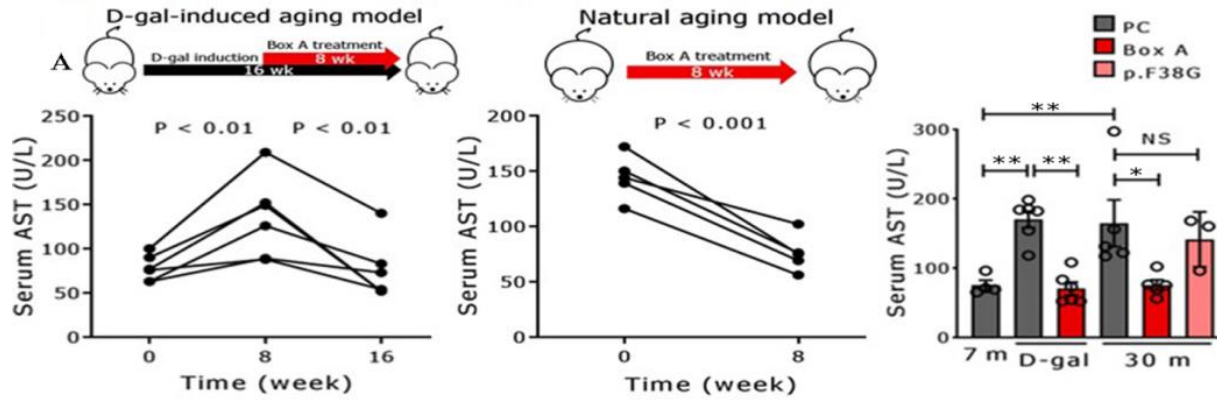




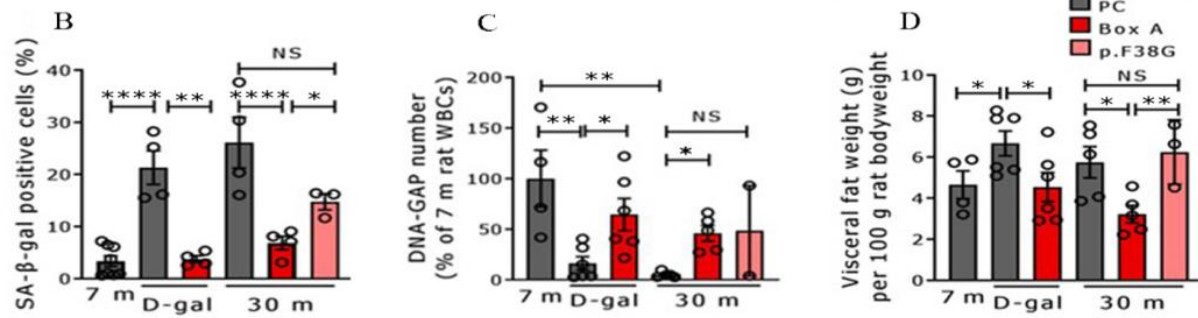




A
การทำงานของตับ



B
ปริมาณเซลล์แก่

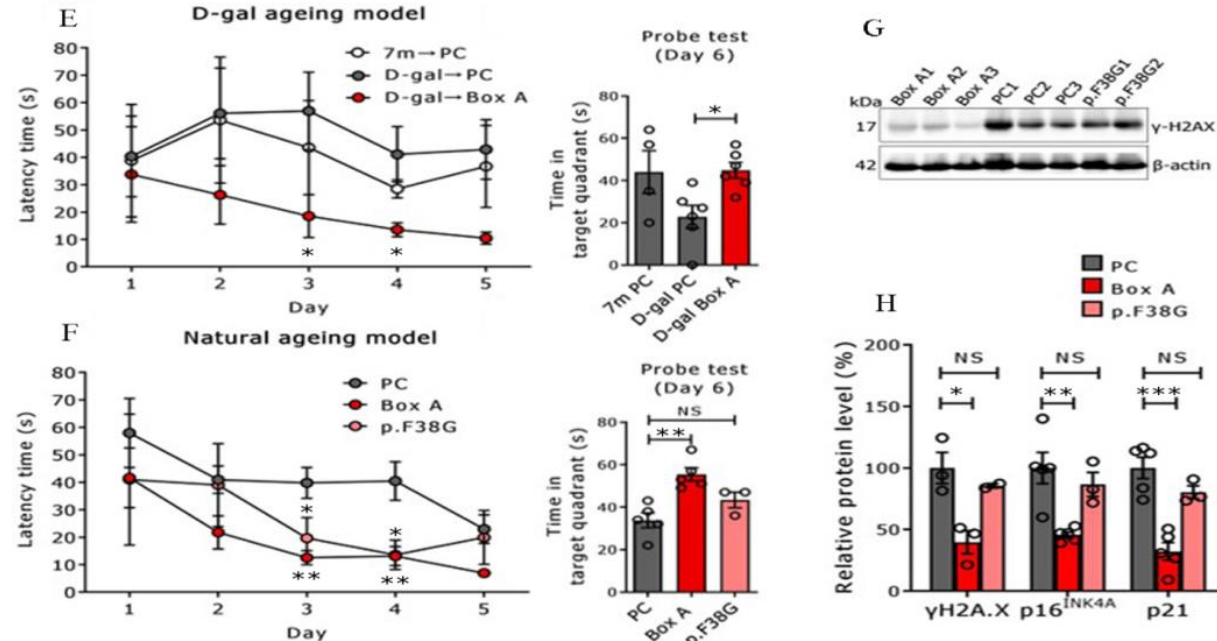


A
การทำงานของตับ

D
ไขมันในช่องท้อง

G & H
โปรตีนสูงในเซลล์แก่

E & F
ความจำ



H

H

Confidential data

7m = หนูหนุ่ม
30m = หนูแก่
D-gal = หนูแก่
PC = placebo
Box A = มณีแดง
p.F38G = มณีแดงปลอม

มณีแดงย่อนวัย
A การทำงานของตับ
B ความชรา
D visceral fat
E&F สมอ
G&H โมเลกุลในเซลล์
จากหนูชราเป็นหนูหนุ่ม

Apiwat Mutirangura
Chulalongkorn University

Confidential data

ปริมาณเซลล์แก่

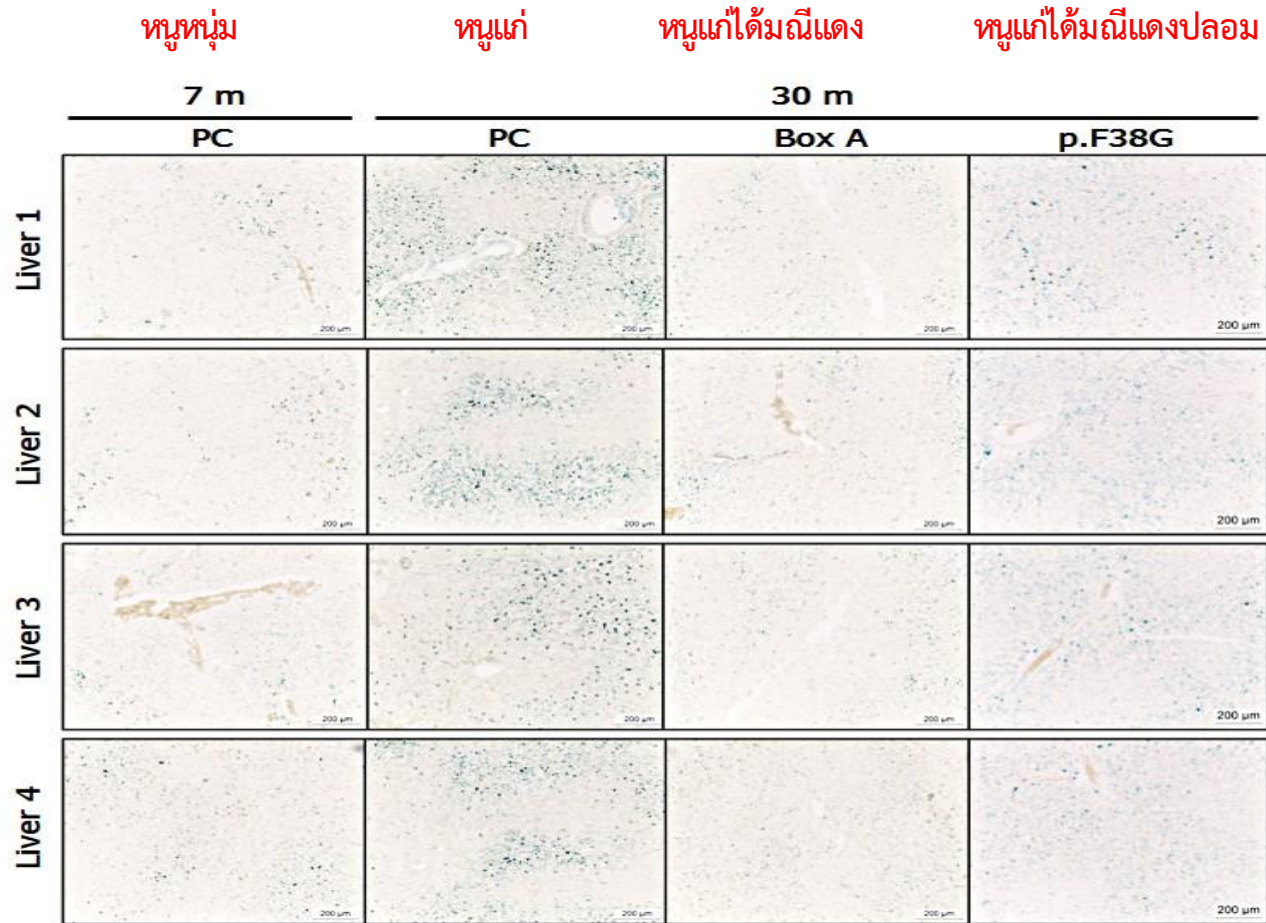
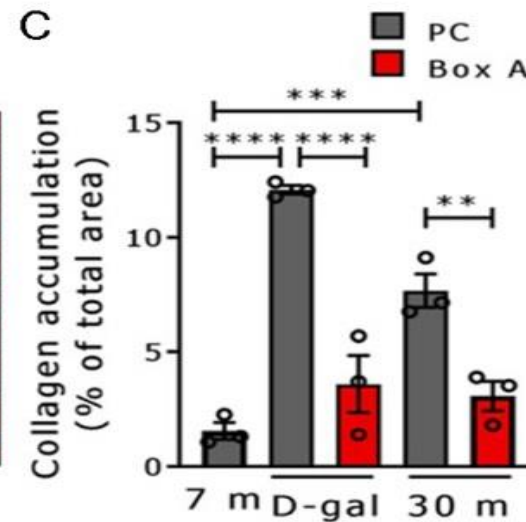
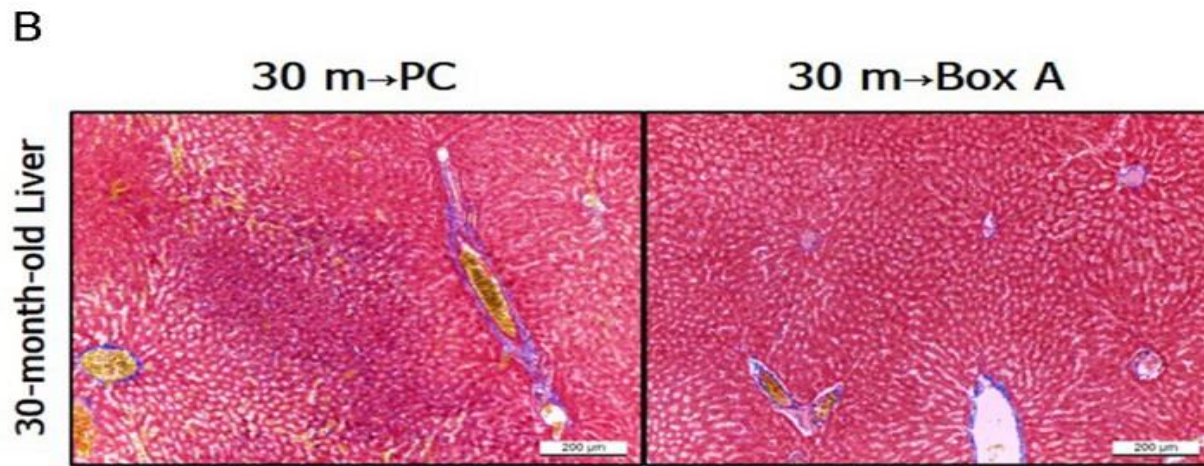
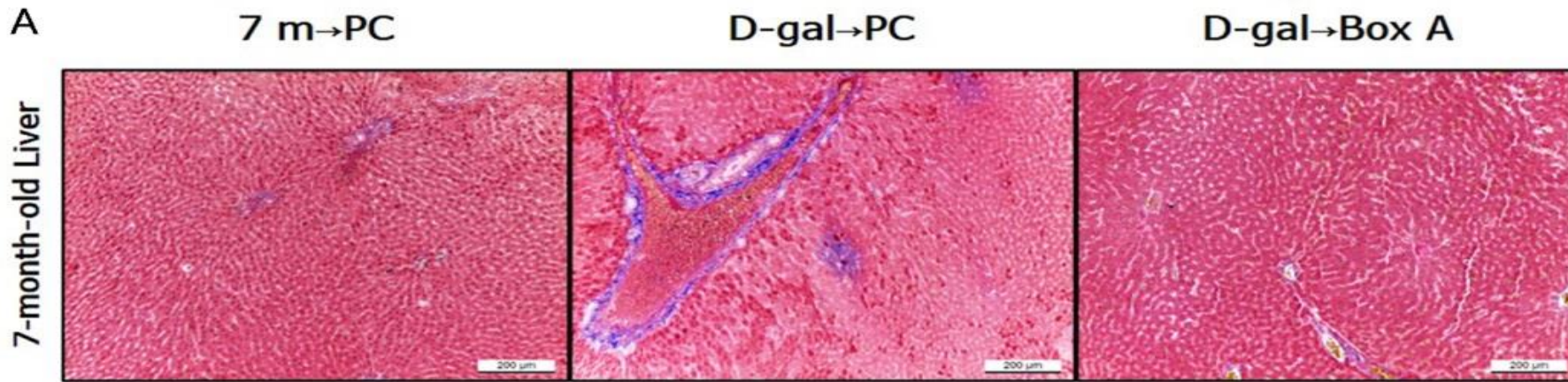


Fig. 7: A decrease in an aging marker (SA-β-gal) in Box A-treated naturally aging rat livers. Rat liver sections were stained for SA-β-gal activity (blue color) to investigate the effect of Box A treatment in 30-month-old rats compared to the age-matched PC- or p.F38G-treated rats and 7-month-old normal groups (n=3-4 rats per group). The images were captured at 10x magnification.



Confidential data

7m = หมูหนุ่ม
 30m = หมูแก่
 D-gal = หมูแก่
 PC = placebo
 Box A = มณีแดง
 p.F38G = มณีแดงปลอม

การลดพังผืดในตับเป็นเรื่องน่ายินดีอย่างยิ่ง เพราะแสดงศักยภาพของมณีแดงในการประยุกต์ใช้รักษาโรคที่เกิดจากการสะสมสิ่งผิดปกติต่าง ๆ เช่น อมัลลอยในโรคสมองเสื่อมจากอัลไซเมอร์ หรือปอดเป็นพังผืดจากการติดเชื้อโควิด หรือการมีเส้นเลือดแข็งจากการมีไขมันสะสมตามผนังหลอดเลือด เป็นต้น

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยคะแนนความเข้มของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อหมู ส่วนสันนอก 3 ตัวอย่าง

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	ตัวอย่าง			P-Value	Significant
	A	B	C		
เนื้อสัมผัส (Texture)					
1 ความนุ่ม*	6.52 ± 0.07 ^a	6.40 ± 0.08 ^b	6.51 ± 0.08 ^a	0.000	Significant
2 ความแน่นเนื้อ*	7.55 ± 0.11 ^b	7.65 ± 0.09 ^a	7.52 ± 0.08 ^b	0.000	Significant
3 ความยากในการเคี้ยว	5.58 ± 0.11	5.63 ± 0.08	5.57 ± 0.10	0.117	Non Significant
4 ความชุ่มชื้น*	2.79 ± 0.16 ^a	2.67 ± 0.09 ^b	2.71 ± 0.11 ^b	0.005	Significant
5 ความเป็นเส้นใย	6.71 ± 0.12	6.65 ± 0.08	6.68 ± 0.12	0.164	Non Significant
6 ความหยาบ	5.05 ± 0.06	5.07 ± 0.06	5.04 ± 0.06	0.139	Non Significant

หมายเหตุ : ตัวอักษร a - c ในแนวนอนที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เครื่องหมาย * หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

มณีแดงมีศักยภาพใช้ทำอะไรได้บ้าง

Theoretically. What ever
senolytic can do REDGEM
can do better!

Review Article

[Published: 07 October 2021](#)

Strategies for targeting senescent cells in human disease

[Nathan S. Gasek](#), [George A. Kuchel](#), [James L. Kirkland](#) & [Ming Xu](#) *Nature Aging* **volume 1**, pages870–879 (2021)

[Cite this article](#)

17k Accesses

107 Altmetric

Table 2 | New and ongoing clinical trials for senolytic therapies

Senolytic therapy	Indication	Trial
D+Q	Diabetic kidney disease	NCT02848131
	Alzheimer's disease	ALSENLITE, NCT04785300 SToMP-AD, NCT04685590
	Accelerated age-like state post bone marrow transplantation	HTSS, NCT02652052
	Accelerated age-like state in childhood cancer survivors	SENSURV, NCT04733534
	Age-related osteoporosis	NCT04313634
	Fisetin	Frailty in older women
Diabetic and chronic kidney disease		NCT03325322
Accelerated age-like state in childhood cancer survivors		SENSURV, NCT04733534
Age-related osteoporosis		NCT04313634
Osteoarthritis		NCT04210986
Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in nursing home patients		COVID-FIS, NCT04537299
COVID-19 in hospitalized patients		COVID-FISETIN, NCT04476953
COVID-19 in outpatients		COVFIS-HOME, NCT04771611
Diabetic macular edema		NCT04537884

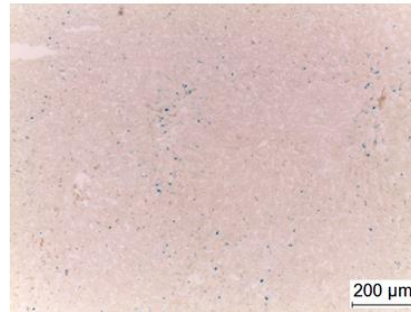
(REjuvenating DNA by GENomic stability Molecules (RED-GEMs))

Our results showed that after giving **REDGEM** to old rats once a week for 2 months, **REDGEM** completely reversed aging by testing,

1. Liver function test
2. Memory
3. Number of senescence cells
4. Senescence-associated proteins, H2AX and p16
5. Visceral fat
6. **Liver fibrosis**
7. Youth-DNA-GAP

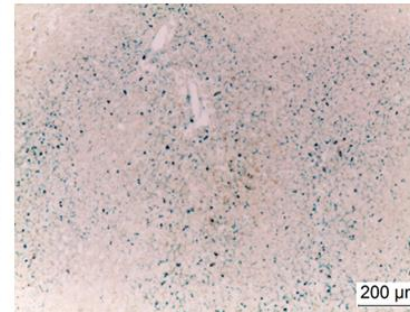
Ultimate rejuvenation

Liver rat 7 months

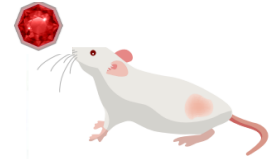
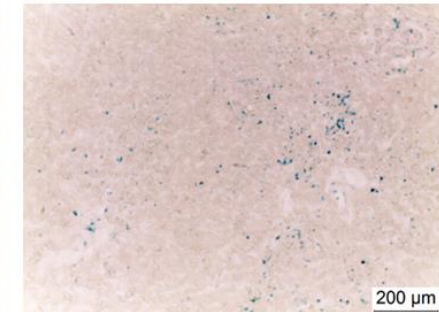


Senescence cells = blue spots

30 months

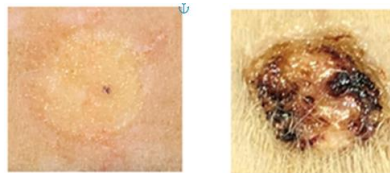


30 months after increase DNA gaps



REDGEM facilitated healing of burn wound

Burn



Burn Rx



Day0

Day14

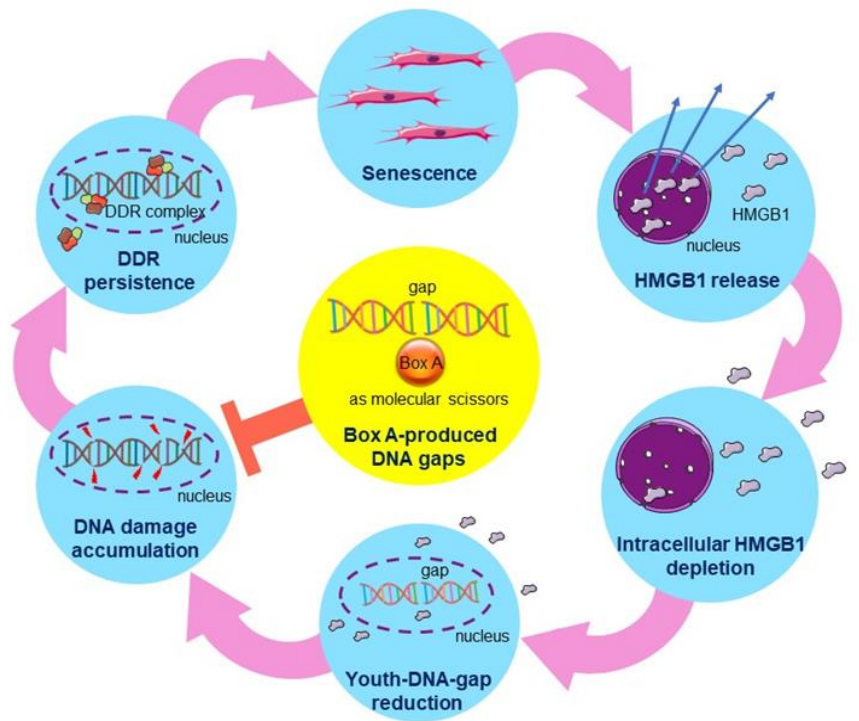
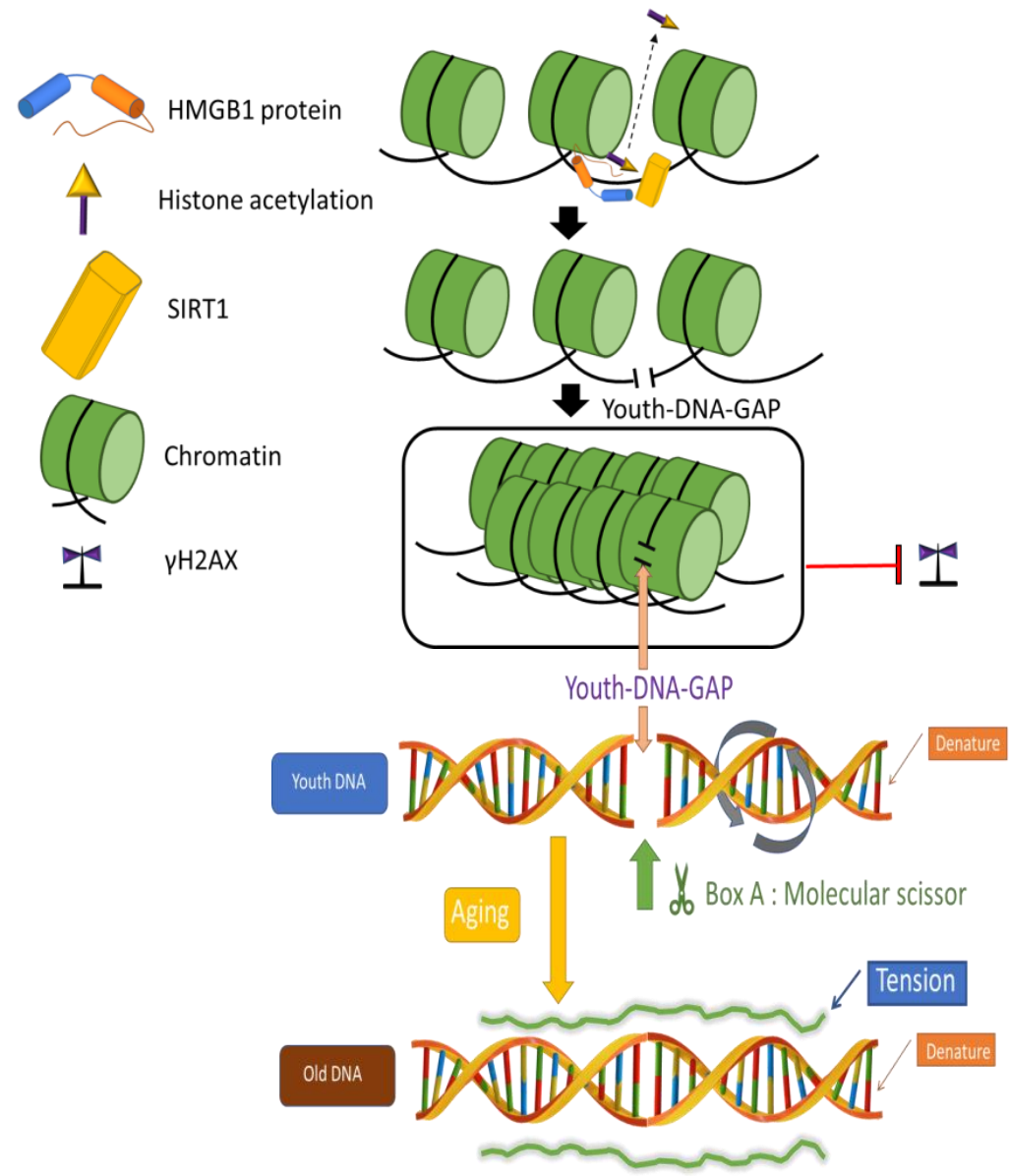
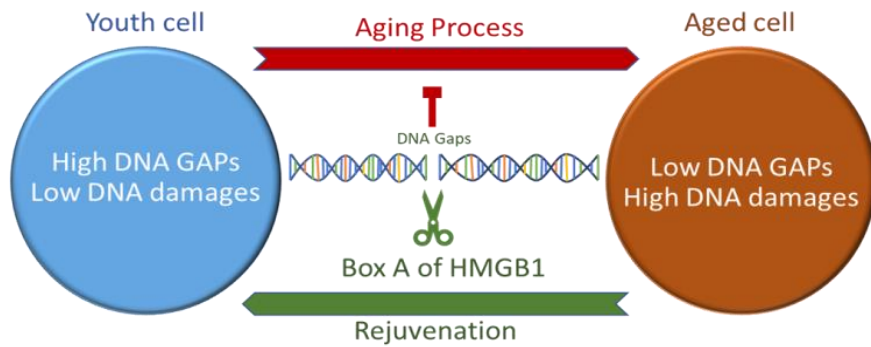
REDGEM facilitated healing of DM wound and improved quality of pork meat $p < 0.0001$.

Potential implications of "REDGEM"

1. Treatment of diseases that have mechanisms from cells, tissues and organs deterioration found in old people from certain diseases such as diabetes, or those which currently cannot be cured, such as Alzheimer's dementia, heart attack, high blood pressure, arteriosclerosis, impaired function in various organs, wounds, etc.
2. Treat organ deterioration from environmental damage such as fire, scald, lung damage from smoking, liver, brain damage from alcohol, kidney damage from toxins, etc.
3. Rejuvenation
4. It may be used to prevent and treat cancer. (by correcting the aging of white blood cells that are responsible for destroying cancer cells and prevent cancer by reducing the chance of DNA breakage leading to gene mutations)
5. It may be used to delay degeneration of the body in children with abnormalities in DNA repair genes.
6. Cosmetics
7. Agricultural products
8. Congenital malformation prevention

Confidential data

ทฤษฎีใหม่ของการแก่ของ DNA และวิธีการย้อนวัย คณะผู้วิจัยได้ค้นพบรอยแยกของ DNA (DNA gap) DNA gap ที่ค้นพบใหม่นี้ช่วยลดแรงบิดลงและปกป้องไม่ให้ DNA ถูกทำลาย ในเซลล์ที่ชราจะมี DNA gap น้อยกว่าเซลล์หนุ่มสาว DNA ของคนแก่ถึงถูกทำลายมากกว่า มณีแดงคือส่วนต้น (Box A) ของยีน HMGB1 (confidential information) ที่มีหน้าที่สร้าง DNA gap ทีมวิจัยใช้เทคโนโลยีที่คล้ายคลึงกับเทคโนโลยีวัคซีนในปัจจุบัน โดยใช้ Box A plasmid ห่อหุ้มด้วย Calcium Phosphate nanoparticle



- มณีแดงเกิดจากการค้นพบทฤษฎีใหม่ที่ควบคุมการแก่ของ DNA โดยคณะผู้วิจัยทำให้ในต่างประเทศไม่มีองค์ความรู้นี้
- เนื่องจาก DNA เป็นตัวกำหนดสภาพของเซลล์ต่างๆ ในร่างกายมนุษย์ ทฤษฎีใหม่ที่คณะผู้วิจัยค้นพบ จึงเป็นการอธิบายกลไกฐานรากของการแก่ของมนุษย์
- ในต่างประเทศมีการผลิตยาย้อนวัยได้ผ่านกลไกต่างๆ อย่างไรก็ตามกลไกของยาเหล่านั้นล้วนเป็นกลไกต่อเนื่องจาก กลไกทฤษฎีใหม่ของการแก่ของ DNA ของคณะผู้วิจัย ดังนั้น ผลการศึกษาของยาต่างๆ ในต่างประเทศไม่สามารถย้อนวัยได้สมบูรณ์เท่า มณีแดง

มณีแดงมีศักยภาพใช้ทำอะไรได้บ้าง

- ๑ รักษาโรคที่มีกลไกมาจาก เซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะเสื่อมสภาพที่พบในคนชราหรือชราเร็วจาก โรคบางชนิด เช่น เบาหวาน โดยในปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เช่น สมองเสื่อม อัลไซเมอร์ หัวใจวาย ความดันโลหิตสูง เส้นเลือดแข็ง เสื่อมสมรรถภาพในอวัยวะต่าง ๆ แผล เป็นต้น
- ๒ รักษาโรคที่อวัยวะเสื่อมสภาพจากการทำลายจากสิ่งแวดล้อม เช่น ไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ปอดพังจากบุหรี่ ตับสมองพังจากสุรา ไตพังจากสารพิษ เป็นต้น
- ๓ เสริมสมรรถภาพของคนชราให้มีศักยภาพทางกาย รูปร่างหน้าตา เท่ากับคนหนุ่มสาว
- ๔ อาจใช้ป้องกันและรักษามะเร็งได้ (โดยการแก้ไขความชราของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีหน้าที่ทำลายเซลล์มะเร็ง และป้องกันมะเร็งจากการลดโอกาสเกิดการแตกทำลายของ DNA อันนำไปสู่การกลายพันธุ์ของยีน)
- ๕ ใช้ชะลอการเสื่อมของร่างกายในเด็กที่มีความผิดปกติของยีนซ่อมแซมดีเอ็นเอ
- ๖ ใช้เสริมความงาม
- ๗ ใช้เพิ่มผลิตผลทางการเกษตร
- ๘ ใช้ป้องกันความพิการแต่กำเนิด

Grants

1. The National Science and Technology Development Agency, Thailand [Research Chair Grant, P-19-50189]
2. สกว. เมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์วิจัยดีเด่น
3. สภาวิจัยแห่งชาติ