FILK Freiberg Institute

IMMUNOGENITÄT VON KOLLAGENPRODUKTEN IN BEZUG ZUM DNA-GEHALT

BMWK INNO-KOM 49VF210004 | Laufzeit: 07.2021 – 10.2023 | Sandra Stenzel, Franziska Ullm, Ina Prade, FILK Freiberg

Categories: **Biogenic Raw Materials**, **Collagen**

AUSGANGSSITUATION

Für die Zulassung von Biomaterialien aus dezellularisierten xenogenen Geweben muss eine Reihe von Nachweisen erbracht werden, die belegen sollen, dass eine Immunantwort im Patienten ausgeschlossen werden kann. Im Mittelpunkt stehen dabei der Nachweis der erreichten Azellularität anhand der Messung des verbliebenen DNA-Gehaltes und der Nachweis des DNA-Fragmentierungsgrades. Folgende Parameter sind dabei einzuhalten: (1) weniger als 50 ng doppelsträngiger DNA (dsDNA) per mg ECM-Trockengewicht (ECM = Extracelluläre Matrix) und (2) <200 Basenpaare (bp) Fragmentlänge der DNA.

Da bislang keine Forschungsergebnisse zur Korrelation zwischen der Immunogenität eines kollagenbasierten Biomaterials und dessen DNA-Gehalt vorlagen, sollten erstmalig systematische Untersuchungen dieses Zusammenhangs erfolgen. Dabei ergab sich allerdings das Problem, dass die bisher angewendeten DNA-Analysenmethoden die in dezellularisierten Biomaterialien enthaltene fragmentierte DNA nicht erfassen und daher für fragmentierte DNA neu etabliert werden müssen.

PROJEKTZIEL

Das Ziel des Projektes war daher eine Korrelation des real enthaltenen DNA-Gehaltes in dezellularisierten Kollagenmaterialien mit der unspezifischen Immunantwort humaner Immunzellen.

LÖSUNGSWEG

Geplant war, die DNA gezielt in definiert kleine Bruchstücke, vorzugsweise Nukleotide, abzubauen, um damit einen einheitlicheren Extinktionskoeffizienten e für die Absorptionsmessungen zu generieren. Die gewählte Methodik zur Herstellung einzelner Nukleotide mittels DNase führte nicht zum Erfolg. Anschließend wurde auf eine andere Methodik der DNA-Fragmentierung ausgewichen: die Einwirkung erhöhter Temperatur (98 °C).

Mittels HPLC konnte gezeigt werden, dass bei genomischer DNA die einzelnen DNA-Fragmente nach 2 h bei 98 °C unter 25 bp liegen. Leider reichte die Genauigkeit der verwendeten HPLC-Methode nicht aus, um nachzuweisen, dass einzelne Nukleotide erhalten wurden. Der gemessene Extinktionskoeffizient e lässt darauf schließen, dass größere DNA-Oligonukleotide um die 30 bp entstanden sind, für eine zweifelsfreie Messung müssten aber einzelne Nukleotide entstehen.

Die gewählte Methodik funktionierte bei genomischer DNA, aber bereits vorfragmentierte DNA aus dezellularisierten Biomaterialien zerfällt bei 2 h bei 98 °C in kleinere Bruchstücke als genomische DNA zerfällt.

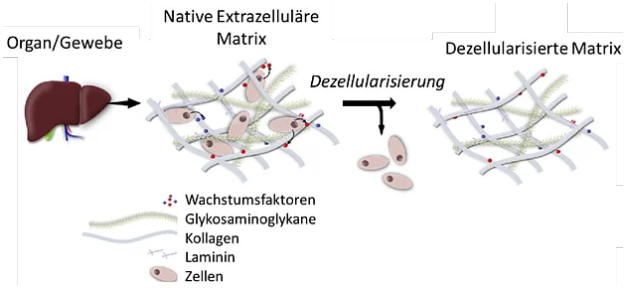

Abb. 1: Entstehung von dezellularisiertem Organen/ Geweben für die Gewebeersatztherapie (aus: Bourgine, P.E., Pippenger, B.E., Todorov Jr, A., Tchang, L., Martin, I., 2013. Tissue decellularization by activation of programmed cell death. Biomaterials 34, 6099–6108)

Abb. 2: Dezellularisierte, am FILK hergestellte Wundauflage

ERGEBNISSE

Es wurde gezeigt, dass die Gesamtmenge an isolierter DNA am höchsten ist, wenn das EZNA DNA Tissue Kit verwendet wird. Dieses Kit isoliert bei Anwesenheit von fragmentierter DNA die größte DNA-Gesamtmenge. Eine einfache, labornahe Methode zur Bestimmung des DNA-Gehaltes bei Vorliegen von fragmentierter DNA konnte nicht etabliert werden.

Eine Methode zur Bestimmung des Fragmentierungsgrades konnte teilweise etabliert werden. Solange die eingesetzte DNA-Menge bekannt ist, kann mittels Reai-Time-PCR der DNA-Fragmentierungsgrad gemessen werden. Dies war der Fall bei der Etablierung der Methode, bei der mit der gleichen DNA-Konzentration für alle Proben gearbeitet wurde und dadurch die Werte zusätzlich zur internen Kontrolle zum DNA-Gehalt normiert sind. Bei unbekannten DNA-Mengen, die aus dezellularisierten Biomaterialien isoliert wurden, funktioniert diese Methodik noch nicht. In Kombination mit einem realen DNA-Gehalt wäre die Methodik aber anwendbar.

Die Immunogenität der hergestellten dezellularisierten Materialien konnte dagegen bestimmt werden. Mit zunehmender Anzahl der durchgeführten Dezellularisierungsschritte nahm die Immunogenität der Materialien ab. Dies zeigte sich sowohl in den in-vitro- (ELISA und Real-Time-PCR) als auch in den in-vivo-Versuchen. Mit allen drei Messmethoden zur DNA-Quantifizierung (Absorption, Absorption nach Fragmentierung und Berechnung mit neuem e, Fluoreszenz) konnte nachgewiesen werden, dass der DNA-Gehalt mit zunehmender Anzahl der durchgeführten Dezellularisierungsschritte abnimmt. Jedoch kann kein Absolutwert als Grenzwert angegeben werden, da die fragmentierte DNA sich einer definierten DNA-Quantifizierung entzieht. Dementsprechend ist die Angabe eines DNA-Grenzwertes irreführend. Es wurde jedoch

gezeigt, dass die bisherigen Messmethoden zur DNA-Quantifizierung keine verlässlichen Daten generieren. Ein DNA-Grenzwert für dezellularisierte Materialien, der mittels Absorption oder Fluoreszenz gemessen wird, ist demnach nicht zielführend. Trotzdem eignet sich die DNA sehr wohl als Marker für unbekannte Antigene in den Proben, da sie sich chemisch stark von den enthaltenen Proteinen in den kollagenen Biomaterialien abhebt. Als Näherung muss demnach weiter mit den Absorptions- und Fluoreszenzwerten gearbeitet werden.

DANK

Das Forschungsvorhaben „Immunogenität von Kollagenprodukten in Bezug zum DNA-Gehalt“, Reg.-Nr.: 49VF210004 wurde anteilig vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages innerhalb des Förderprogramms „FuE-Förderung gemeinnütziger externer Industrieforschungseinrichtungen – Innovationskompetenz (INNOKOM) – Modul Vorlaufforschung (VF)“ über den Projektträger EuroNorm GmbH gefördert. Wir bedanken uns für die gewährte Unterstützung.

Gefördert durch:

Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

INNO-KOM