

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm
B I O L O G I E

Förderkennzeichen:

01GU0804

Forschungsvorhaben:

Verbundprojekt: Immuntherapie primärer maligner Lebertumoren

Teilprojekt 1

Exom-, Copy-Number- und Transcriptom-Analysen zur Identifizierung von tumorspezifischen Mutationen

Zuwendungsempfänger:

Institut für Medizinische Genetik & Angewandte Genomik

Calwerstr. 7

72076 Tübingen

Projektleitung:

Prof. Dr. Olaf Riess

Laufzeit:

01.08.2009 bis 31.07.2012

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01GU0804 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegen bei den Autoren".

Schlussbericht zum Teilprojekt 1 des Projektes :

IndividualLiver, Immuntherapie primärer maligner Lebertumoren (BMBF-Projekt FKZ 01GU0804)

Autoren: Peter Bauer, Michael Bonin, Olaf Riess

I.1. Aufgabenstellung:

Das Ziel des Teilprojektes war die Identifizierung von tumorspezifischen Mutationen in Operationspräparaten aus Lebergewebe (HCC – Hepatozelluläres Karzinom bzw. CCC – Cholangiozelluläres Karzinom), um damit mögliche tumorspezifische Vakzinierungspeptide vorherzusagen. Technisch wurden dafür Next-Generation-Sequencing Analysen für Exome („whole-exome-sequencing“ –WES) und Transkript-Sequenzierungen („RNAseq“) eingesetzt.

Diese tumorspezifischen Varianten sollten nach entsprechender Peptid- und HLA-Prädiktion unabhängig validiert und schließlich für die Produktion eines individuellen, patientenspezifischen Impfpeptidgemischs genutzt werden.

I.2. Voraussetzungen:

Bei dem Projekt handelt es sich um einen Verbund aus 4 Projekt-Partnern, die in I.5. aufgelistet sind.

I.3 Planung und Ablauf:

- **AP 01: DNA-Library-Generierung, Exome-Anreicherung und Sequenzierung in Tumor und Normalgeweben von Patienten; Copy-Number-Analysen**

Das Probenmaterial stammt von 14 unterschiedlichen Patienten. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren die Patienten zwischen 48 und 66 Jahren alt (Tumor und Normalgewebe). Das Tumorgewebe wurde intraoperativ von Leber bzw. hepatobiliärem Trakt entnommen und zur histologischen Begutachtung an die Pathologie übergeben. Ein Teil des Gewebes wurde an die Humangenetik zur Isolation der DNA für die Exom Sequenzierung versandt. Bei dem korrespondierenden Normalgewebe handelt es sich um Blut oder gesundes Lebergewebe, das ebenfalls zum Zeitpunkt der Operation entnommen wurde. Ursprünglich wurden 14 Proben mit dem dazugehörigen tumorfreien Referenzgewebe sequenziert. Eine der Proben stellte sich bei genauerer Untersuchung lediglich als Leberzirrhose ohne ein primäres Leberkarzinom heraus. Die restlichen 13 Proben konnten einwandfrei durch den pathologischen Befund als primäre Leberkarzinome identifiziert werden. Acht der 13 Tumorproben sind hepatozelluläre Karzinome und fünf sind cholangiozelluläre Karzinome. Das Durchschnittsalter der Patienten mit HCC lag bei 69 Jahren und mit CCC bei 57 Jahren.

Die DNA-Präparation, Generierung von NGS-DNA-Libraries, Exom-Anreicherung (Sequence Capture mit NimbleGen Exome Kits) und schließlich die Next-Generation-Sequenzierung durch Illumina GAIIX Sequenzierung (paired-end Sequencing mit 2 x 76 bp Readlänge) sind jeweils etablierte Standardmethoden. Das Normalgewebe (Blut) wurde in der Regel auf einer Flowcell Lane sequenziert (ca. 40 Mio reads) und die Tumorproben jeweils mit doppelter Tiefe analysiert, um möglichst auch niedrigere Mosaikzustände im Tumor sensitiv zu erfassen.

Ebenso wurden Gendosis-Analysen (Copynumber analyses CNA) mithilfe des Affymetrix Cytoscan HD Arrays durchgeführt, um genomische Rearrangements aufzudecken. Parallel mit der Datenproduktion wurde eine in-house Analyse-Pipeline zur Identifizierung tumor-spezifischer Varianten aufgesetzt. Dieses Tool wurde schließlich durch „deep-sequencing“ validiert (AP3).