



TransLimm Genome Center

Olaf Rieß
Peter Bauer

Wissenschaftliche Grundlagen

Für die individualisierte Immuntherapie von Tumoren ist die Kenntnis von zellulären Veränderungen in den Tumorzellen der Patienten essentiell. Jegliche Eigenart des Tumors, sei es eine bekannte oder neu entdeckte, liefert möglicherweise entscheidende Ansatzpunkte für tumorbekämpfende Antikörper oder Immunisierungsstrategien. Aus genetischer Sicht hat sich das Erbgut der Tumorzellen durch neu entstandene Mutationen immer weiter verändert. Dadurch entstehen zunehmend Schäden im Aufbau und in der Funktion von Eiweißstoffen und damit Struktur- und Stoffwechselbestandteilen. Die Tumorzellen werden damit allen Körperzellen des Tumorpatienten immer unähnlicher und Unterschiede zu gesunden Zellen des Patienten können in einer Immuntherapie - sofern sie bekannt sind - attackiert werden. Im Genomzentrum von TransLimm werden durch Hochdurchsatz-Sequenzanalysen dieser Tumor-Erbsubstanzen diese Veränderungen auf Ebene der DNA identifiziert. Die dabei eingesetzten neuartigen Sequenziertechnologien erlauben uns, zigtausende von Informationen zeitgleich zu erfassen (Abb. 1). Damit öffnet sich für die Krebspatienten erstmals ein Behandlungsfenster, weil unmittelbar nach chirurgischer Verkleinerung von Tumoren das gewonnene Gewebe genetisch analysiert und die erfassten Daten schon nach 3-4 Wochen für die Produktion von patienten-individuellen Immunisierungslösungen genutzt werden und damit für eine Tumorthherapie eingesetzt werden können.

Ziele

In einer ersten Phase werden tumorspezifische DNA-Veränderungen bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen und Peritonealkarzinose sequenziert. Noch in diesem Jahr soll die Technologie soweit ausgebaut sein, dass wir innerhalb von vier Wochen nach Tumor-Operation relevante Sequenzveränderungen entdecken und hinsichtlich der Wirksamkeit in einer Immuntherapie beurteilen können. Mit Ablauf des Jahres sollen die Analysen um die Sequenzierung und Beurteilung von RNA-(Transkript)-Veränderungen erweitert sein und ein vernetztes Datenwerk für die Immuntherapie zur Verfügung stehen.

Strategie

(1) Bei Krebspatienten werden im Rahmen der chirurgischen Therapie Proben des Tumor und des umgebenden gesunden Gewebes gewonnen und kryokonserviert. (2) Aus kleinen Teilen dieser Gewebeproben wird nach pathologischer Beurteilung eine DNA- und RNA-Präparation unternommen. (3) In diesen Nukleinsäure-Präparationen werden etwa 100-200 relevante Zielsequenzen mit Einfluss auf die immunogenen Eigenschaften des Tumors angereichert und für eine Sequenzierung vorbereitet. (4) Durch Hochdurchsatz-Sequenzierung werden Daten dieser 200 Zielgene hergestellt. (5) Die bioinformatische Analyse des individuellen Datensatzes identifiziert (i) immunogene Mutationen im Tumor, (ii) Fusionstranskripte, (iii) tumorspezifische Transkripte. (iii) Dieser Datensatz wird für die Immuntherapie bereitgestellt.

TransLimm Genome Center

Immunotherapy of tumors necessitates the knowledge of tumor-specific antigens which should be attacked by targeted immune cells. As a substantial part of tumor-specific alterations are due to somatic mutations in the tumor cell lines, high-throughput sequencing of relevant genes in tumors will be able to gather these tumor-specific information. The TransLimm Genome Center is dedicated to prepare and sequence tumor samples from our patients accordingly to provide a list of truncated or otherwise mutated

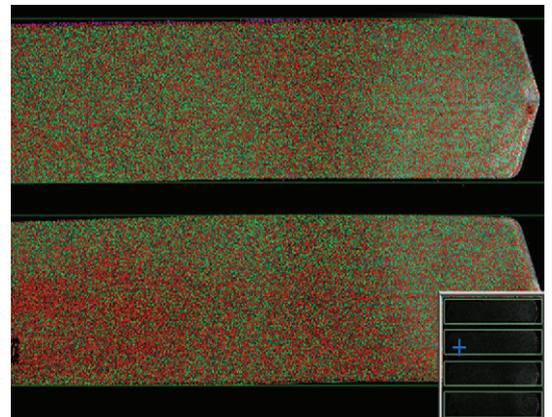


Abb. 1: Sequenzierdichte auf einem Next-Generation-Sequencing Gerät: Auf einer Fläche von 4x2 cm werden etwa 400.000 Sequenzierungen (grüne Punkte) parallel durchgeführt.

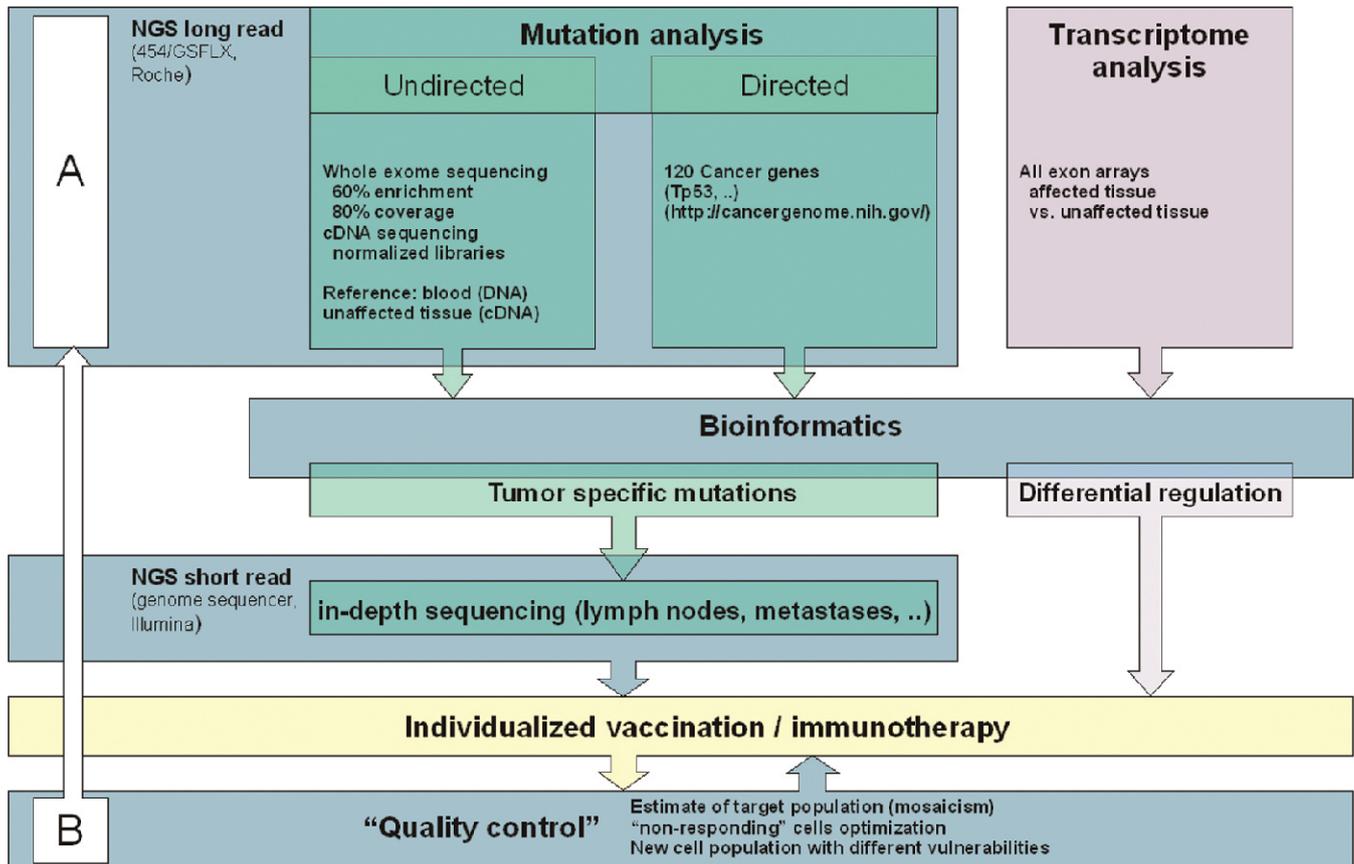


Fig. 2: Highthroughput sequencing in tumor samples (top to down): All patients included in the workflow will receive massive parallel sequencing in tumor samples and normal tissue in order to identify tumor specific mutations (A). After bioinformatic analyses a second sequencing approach might further characterize the status of relevant lymph nodes or in metastases. The individualized vaccination targets are selected upon this complete body of information (including standard expression profiling data). A quality control phase (B) takes up estimates of target populations (mosaicism) and gathers second-line targets in non-responders. All results of this phase help to further streamline the general workflow.

tumor-specific proteins. In a first approach we anticipate to enrich this target sequences for 100-200 relevant genes (Fig. 2) and resequence targeted DNA fragments with 80-100 fold coverage in order to capture part of the constitutional mosaicism. Secondly, these efforts will be complemented by cDNA sequencing of the respective samples. The compilation of both data sets helps to cross-validate and prioritize tumor specific variants. An additional filter set will annotate biological relevance and antigenicity of the respective variants. Thus the TransLimm Genome Center is dedicated to produce accurate genome and transcriptome based targets for immunotherapy. The most critical resource of this objective is time as therapeutic intervention should be available latest 8-10 weeks after surgery. Therefore all steps will be quality controlled and tailored for high validity as there is no time for extended second step validation.

Projektleitung

Prof. Dr. Olaf Riess
Dr. Peter Bauer

Eberhard Karls Universität Tübingen
Institut für Humangenetik,
Abteilung Medizinische Genetik
Calwerstrasse 7
72076 Tübingen

Tel.: 0049/(0)7071/29 76458
Fax: 0049/(0)7071/29 5171

olaf.riess@med.uni-tuebingen.de
peter.bauer@med.uni-tuebingen.de

www.genetik-tuebingen.de

