



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Propojení výzkumu a vzdělávání v oblasti medicínální chemie
reg. číslo: CZ.1.07/2.3.00/30.0060

Zpráva z mezinárodní konference/ Report from international conference

Účel cesty/Aim of travel: X. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days

Účastník/Participant: Mgr. Jana Stránská, Ph.D.

Doba trvání cesty/Duration of travel: od 1.-3.12.2014

Místo/Location: Olomouc, Czech Republic

Podrobnosti cesty: Konference se konala v Olomouci, na místo konference jsem chodila pěšky.

Stravné: V rámci konference byly poskytnuty obědy a drobné občerstvení o přestávkách.

Ubytování: Náhradu ubytování nepožaduji.

Další výdaje: poster, konferenční poplatek

Zpráva:

V termínu od 1.12.2014 do 2.12.2014 jsem pod záštitou projektu PropMedChem navštívila konferenci X. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, Hotel nH Collection Olomouc Congress, Olomouc, ČR. Konference probíhala převážně v angličtině, účastnili se čeští i zahraniční hosté. Navštívili jsme řadu plenárních přednášek, krátkých sdělení a posterové sekce. Diskutovali jsme s účastníky konference během posterové sekce ohledně výsledků naší práce i prezentovaných výsledků práce ostatních vědeckých týmů, o možnosti budoucího vývoje námi řešených témat a případné spolupráce.

Aktivně jsem se účastnila s posterem „Ultra deep amplicon sequencing of *RAS* genes and its use for mCRC predictive diagnostics” a s krátkým sdělením “Problematické vzorky” na Satellite Workshop on Predictive Tumour Diagnostics dne 1.12.2014.

Studentka Bc. G. Gabčová (jsem její konzultant) se aktivně účastnila s přednáškou “Introduction to *RAS* pyrosequencing of FFPE samples”.

Abstrakty s programem jsou k nahlédnutí na <http://ddpeo.imtm.cz/?p=225> (Abstract archive 2014).

Přílohy: kopie účastnického diplomu, zmenšenina posteru, fotodokumentace

V Olomouci dne 4.12.2014

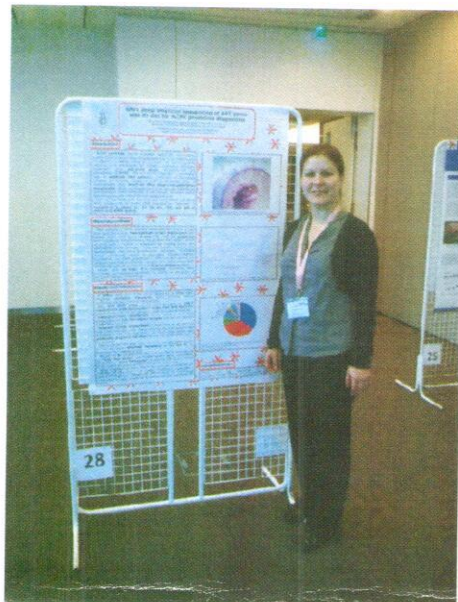
Jméno, podpis

Jana Stránská

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Fotodokumentace/Photos:

Jana Stránská s posterem a konferenčním poutačem, na konferenci během přednášek.



Gabriela Gabčová s přednáškou.



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



Ultra deep amplicon sequencing of RAS genes and its use for mCRC predictive diagnostics

Rastislav Slavkovsky, Jana Stranska, Veronika Venskova, Veronika Holinkova, Miroslava Rabcanova, Jiri Drabek
Institute of Molecular and Translational Medicine,
Palacký University, Olomouc, Czech Republic

INSTITUTE OF MOLECULAR AND TRANSLATIONAL MEDICINE

Introduction

EGFR pathway (Fig.1) regulates cancer-cell proliferation, apoptosis and tumor-induced angiogenesis. Tumor DNA testing of **KRAS** and **NRAS** (RAS) genes, from the EGFR signaling network, is a prerequisite for proper personalized biological treatment using **anti-EGFR drugs** (panitumumab and cetuximab) in **mCRC**. The anti-EGFR treatment is prescribed only in **wildtype RAS patients**. Detection of increasing number of possible mutations with probe-based qPCR is cumbersome while **amplicon ultra deep next-generation sequencing** (NGS) has a potential to be suitable method for simultaneous direct detection of all somatic mutation within tested regions and with a defined detection limit.

Aim of the study is to optimize and verify **KRAS** and **NRAS** NGS sequencing of tumor DNA samples for detection of **mutations at codon 12, 13, 59, 61, 117, and 146 of NRAS and KRAS genes**.

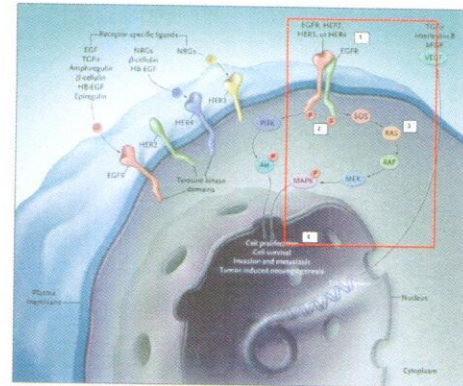


Fig.1: EGFR signaling pathway (<http://www.keywordpicture.com>).

Materials/methods

DNA samples of mCRC patients with sufficient quality of DNA were used for testing. **Two methods of NGS RAS assays** with **longer** (189 - 295 bp) or **shorter** (70 - 150 bp) **amplicons** were introduced into laboratory (Fig.2). Both RAS assays consist of qPCR with a control of amplicons by melting curves and purification of the samples. "Long RAS assay" continues with tagmentation and index amplification, otherwise "short RAS assay" procedures consist of end-repair, adapter ligation, purification, and index amplification. After size selection of the products and their purification, samples from both assays were normalized, pooled, and applied to **Illumina MiSeq** platform.

Results with **at least 5 % mutation** frequency were concluded as "mutation detected", according to consensus of the Czech Society of Pathology.

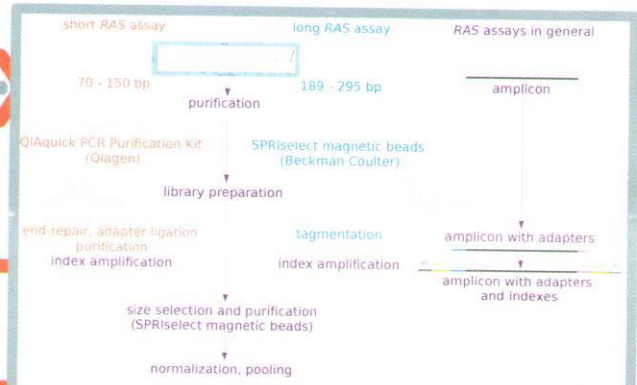


Fig.2: Procedures used in "short" and "long" NGS RAS assays.

Results and conclusions

In **every RAS run**, **KRAS G13D** (46±1 %) or **NRAS Q61L** (47±3 %) **mutation standards** were correctly found, confirming reproducibility of the method.

The **first pilot study** of 24 samples was in **100 % concordance with theascreen® KRAS RQG PCR Kit** (KRAS codons 12 and 13, CE-IVD, Qiagen), in 96 % in last 50 samples.

Interlaboratory comparison of 12 samples with CGB Ostrava yielded **one discrepant sample** that will be retested in both laboratories.

External quality assessments yielded one result differing from consensus out of ten. Upon investigating the cause of this discrepancy with EQA organizers, we found that sample was **artificially prepared cell line** that did not cover sequence of our primers.

During almost one year, more than 237 samples were tested. So far we have **detected mutations in 11 out of 12 investigated codons** (Fig.3).

36 out of 40 samples that were not possible to be analyzed by "**long RAS assay**" due to DNA quality, were successfully analyzed by "**short RAS assay**". 4 samples (10 %, 1.7 % from total number of tested samples) remained untestable.

Taken together we show that it is crucial to understand the topology of DNA around the studied mutations. Especially in case of FFPE derived samples the shortening of the sequencing area could be very beneficial for improving the quality of the results.

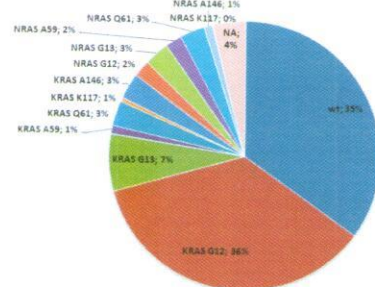


Fig.3: Proportion of samples with different RAS mutations detected during almost one year in LEM-IMTM. (NA - not possible to analyze)

Acknowledgement

The work was supported by grants CZ.1.07/2.3.00/30.0060 & CZ.1.07/2.3.00/30.0041.



Institute of Molecular and Translational Medicine,

Faculty of Medicine and Dentistry,

Palacky University in Olomouc

hereby confirms that

Jana Stránská

has successfully completed conference

**„X. Diagnostic, Predictive
and Experimental Oncology Days “**

held on December 2 - 3, 2014, in Olomouc, Czech Republic, within the project
“New technologies in biomedicine at PU” (CZ. 1.05/3.1.00/14.0307).


Marián Hajdúch, MD., PhD.

conference president



**INSTITUTE OF MOLECULAR AND
TRANSLATIONAL MEDICINE**



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
OP Vzdělávání a výzkum
pro inovace



EGFR
KRAS

Institute of Molecular and Translational Medicine,

Faculty of Medicine and Dentistry,

Palacky University in Olomouc

hereby confirms that

Dr. Jana STRÁNSKÁ

has successfully completed

„Satellite Workshop: Predictive tumor diagnostics

held on December 1, 2014, in Olomouc, Czech Republic, within the project
“New technologies in biomedicine at PU” (CZ. 1.05/3.1.00/14.0307)


Marián Hajdúch, MD., PhD.
conference president

KRAS
HER2
NRAS
BRAF

GIST

