

**Các kỹ thuật xét nghiệm và Di truyền
của gen tiên đoán
trong chẩn đoán ung thư vú**

Dr Sylvie TAPIA

NỘI DUNG

A) Gen tiên đoán ung thư

- 1- Liên quan đến những ai?
- 2- Tại sao cần phải nghiên cứu ?
- 3- Làm sao để chứng minh ?

B) Phân tích bộ gen

- 1- Phân tích bộ nhiễm sắc thể
- 2- Kỹ thuật M. FISH
- 3- Kỹ thuật aCGH

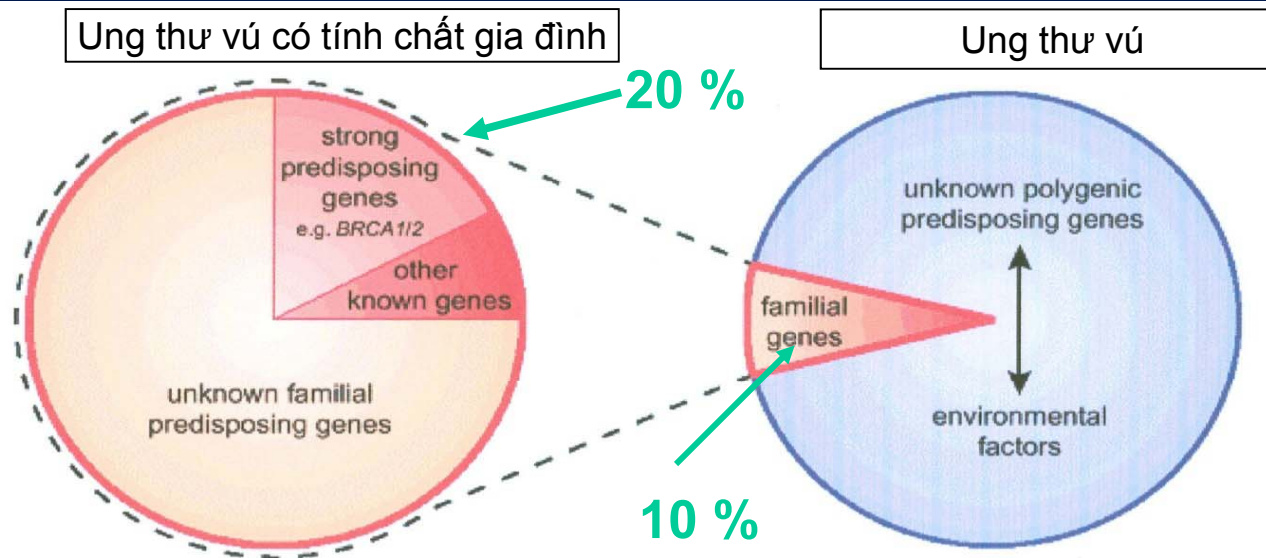
Ung thư vú

- 1 / 10 phụ nữ
- 42 000 ca / năm
- 11 000 ca tử vong / năm
- 5 - 10 % di truyền

The genetics and genomics of cancer

Allan Balmain et al., *Nature Genetics* 33, 238-244 (2003)

2000 ca mới / năm
Tại Pháp



Hình 1: Gen sinh ung thư vú

Ung thư vú gia đình (bên trái) chỉ chiếm khoảng 5 – 10% tổng các trường hợp ung thư vú (bên phải). Những gen được biết là tác nhân gây ung thư vú gia đình (BRCA1 và BRCA2) chiếm khoảng 20% trong số các nguyên nhân gây ung thư vú gia đình. Hầu hết các nhân tố di truyền khác có tác động đến sự hình thành ung thư vú đều chưa được nhận biết. Nhiều trong số đó có tương tác với yếu tố môi trường, như phóng xạ, đã được biết đến trong các nghiên cứu là có khả năng sinh ung.

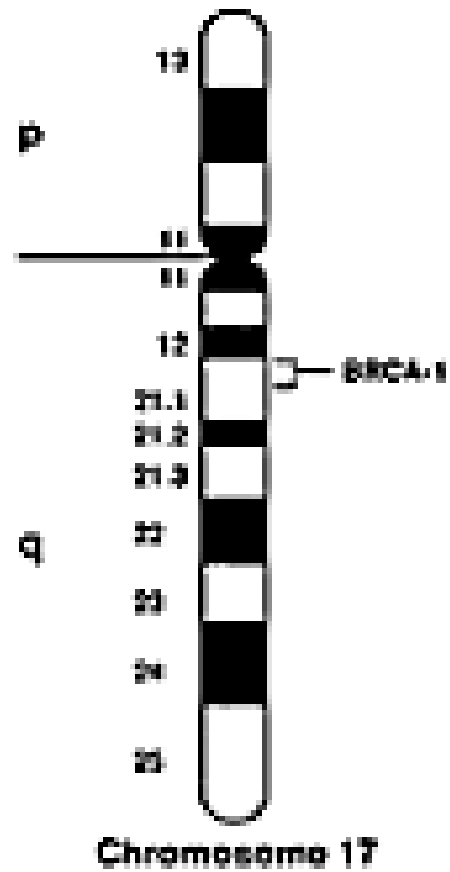
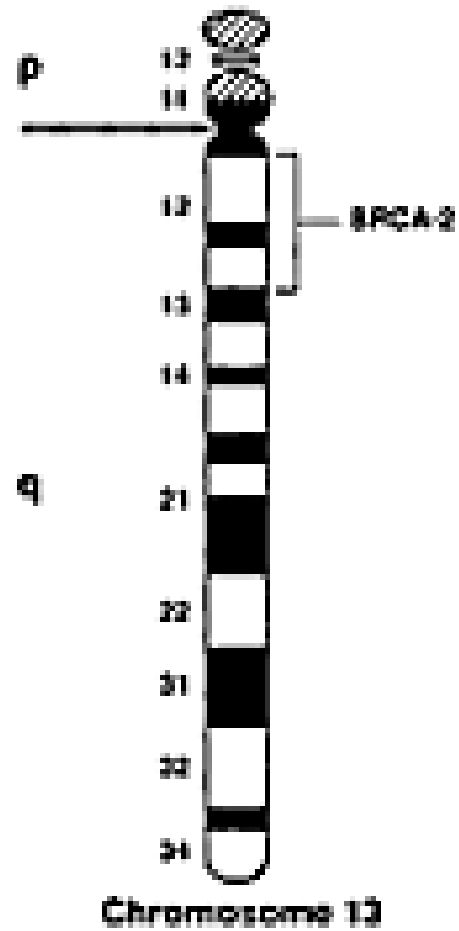
Phát hiện gen tiên đoán ung thư đầu tiên

1994: BRCA1

1995: BRCA 2

BRCA Genes

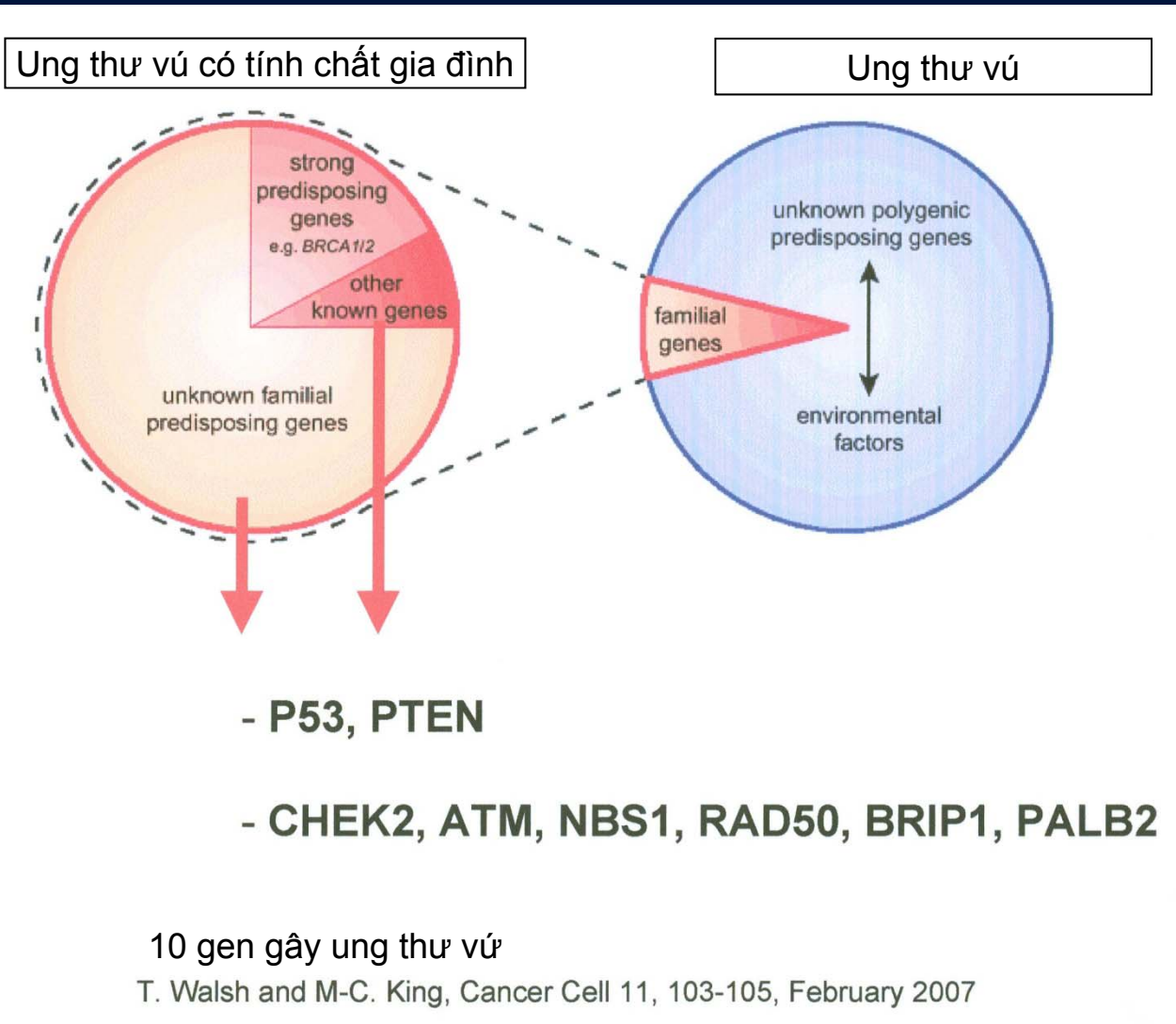
Tumor Suppressor Genes



Những gen tiên đoán ung thư khác

- 10 gen có liên quan
- BRCA1/2 hiện diện 50% tổng số ca
- Điểm chung : cùng liên quan đến hệ thống đáp ứng gây hủy hoại ADN

Vào năm 2007



I) Định danh và xử trí các gen tiên đoán ung thư vú

Thực hiện nghiên cứu trên dân số nào để tìm đột biến mất đoạn BRCA_{1/2}

Không có sự thống nhất

→ Người bệnh là người yêu cầu

→ Người bệnh phải có thể là người mang đột biến mất đoạn BRCA_{1/2}

- Trong số những người có tiền căn gia đình bị ung thư vú: 7% có đột biến BRCA
- Thực tế, việc tầm soát cho thấy 9 / 10 xn âm tính
- Nhưng xn âm tính không có nghĩa không có nguy cơ mà nguy cơ tương đương với dân số chung

Người bệnh là người yêu cầu

→ Tham vấn di truyền (CG)

- Được tham vấn kỹ**
- Giải thích vấn đề và các giới hạn**
- Tham vấn di truyền được thực hiện trước khi lấy máu**

⇒ Tính đến khả năng tham vấn trường hợp có bất thường di truyền.

**Ai cần được chỉ định xét nghiệm SHPT
Thực hiện can thiệp trên kq âm tính
khi đã có tiền căn bệnh trong gia đình**

Xét nghiệm di truyền tại Pháp

Luật quy định :

Đề ra các quy định bắt buộc nhằm giới hạn số lượng các xét nghiệm di truyền.

Xét nghiệm di truyền tại Pháp

Luật quy định

1) Luật 94-654 từ 29/7/1994, số L 145-15 :

« Kiểm tra những đặc tính di truyền của một người" có liên quan đến vấn đề sức khỏe ...

2) Tìm hiểu thông tin từ Ủy ban tham vấn quốc gia về chủng tộc (CCNE)

INSERM-FNCLCC

Hội Di truyền và Ung thư (GGC)

Xét nghiệm di truyền tại Pháp

Luật quy định

3) Quy định số 2000-570 từ 23/6/2000 :

Cần thiết :

- phải được tham vấn kỹ trước xét nghiệm
- phải cung cấp thông tin liên quan
- kết quả xét nghiệm di truyền phải được gửi lại bác sĩ cho chỉ định

Xét nghiệm di truyền tại Pháp

Luật quy định

4) Từ 2 / 5 / 2001

Các xn di truyền phải do bác sĩ chỉ định đối với những người **không có triệu chứng** nhưng có tiền căn gia đình mắc bệnh

5) Từ 31 /10 / 2001

bổ sung thêm các quy định của Ủy ban quốc gia về di truyền

Xét nghiệm di truyền tại Pháp

Luật quy định

6) Luật 2004-800 từ 6/8/2004 : chủng tộc và Sinh Y học được quy định theo L. 1131-1 đến 5, không chịu trách nhiệm với các trường hợp không được thông báo về kết quả xét nghiệm di truyền từ những người có liên quan.

Người bệnh phải là người có thể mang đột biến mất đoạn $BRCA_{1/2}$

→ Không có định nghĩa rõ ràng cho hội chứng ung thư vú và buồng trứng di truyền (HBOC)

→ Thực tế, những trường hợp được đề nghị xn :

- Phụ nữ bị ung thư vú và < 30 tuổi
- Phụ nữ bị ung thư ở cả 2 bên
- Phụ nữ bị ung thư vòm trứng
- Nam giới bị ung thư tuyến vú
- Phụ nữ có tiền căn gia đình bị ung thư vú và / hoặc bị ung thư vòm trứng
- Phụ nữ thuộc chủng tộc juive ashkénaze (irlandaise, polonaise...)

Tính điểm

Tiền căn gia đình giúp tham vấn khách quan hơn

- Tính điểm dựa vào bảng đánh giá (nguồn gốc từ bố hoặc mẹ)
 - ≥ 5 : chỉ định thành công
 - 3 – 4 : có thể
 - ≤ 2 : thất bại

	Điểm
Đột biến mất đoạn BRCA 1/2 đã được xác định trong gia đình	5
Ung thư vú ở phụ nữ < 30 tuổi	4
Ung thư vú ở phụ nữ 30 đến 40 tuổi	3
Ung thư vú ở phụ nữ 40 đến 50 tuổi	2
Ung thư vú ở phụ nữ 50 đến 70 tuổi	1
Ung thư vú ở nam giới	4
Ung thư vòm trứng	3

➤ **Nên biết rằng**

Trong 1000 ca mắc phải ung thư vú

→ **170 được tham vấn di truyền ung thư**

→ **50 % được chỉ định xn di truyền**

→ **10 % có đột biến mất đoạn**

➤ **Xét nghiệm**

- **Được khuyến cáo khi khả năng mang đột biến BRCA 1/2 là $\geq 25\%$**

- **và không khuyến khích khi $< 10\%$**

➤ **Nhiều thông kê hữu ích :**

- **Myriad Genetics (10 000 xét nghiệm – được nâng cấp đều)**

- **BRCA Pro Model (Frank *et al.*) được sử dụng rộng rãi hơn**

II) Tại sao cần tìm đột biến ?

- 2000 ca ung thư vú di truyền mới tại Pháp
- 1 / 300 người có mang đột biến BRCA₁
- 1 / 800 người có mang đột biến BRCA₂
- Có từ 17 000 đến 45 000 phụ nữ từ 30 đến 69 tuổi

Đột biến BRCA_{1/2} cho thấy **Tăng nguy cơ** phát triển ung thư vú hay ung thư buồng trứng

- Dân số chung:
 - . K vú: 12% . Ung thư buồng trứng: 1,4%
- Có đột biến BRCA1:
 - . K vú: 65% . Ung thư buồng trứng: 45%
- Có đột biến BRCA2:
 - . K vú: 45% . Ung thư buồng trứng: 11% trước 70 tuổi

Đột biến BRCA_{1/2} cho thấy **Tăng nguy cơ** phát triển ung khác

- Tụy (BRCA₂)
- Tinh hoàn
- Vòi trứng
- Cả 2 vú

Không có cũng có thể tăng nguy cơ ung thư đại trực tràng

Đột biến BRCA1/2 có thể làm thay đổi xử trí ở bệnh nhân không có triệu chứng

- Tự khám vú : không
- Khám bởi bác sĩ : Có
 - Từ độ tuổi nào? 25 tuổi ?
 - Mỗi 4 – 6 tháng?
- Tầm soát sinh học : khi khám thấy bất kỳ dấu hiệu nào
- Chụp MRI vú đối với những phụ nữ trẻ có nguy cơ cao
- Điều trị hormon thay thế : cần thận trọng
- Hóa trị dự phòng
 - Hiệu quả của tamoxifène établie
- Đoạn nhũ dự phòng
 - 90 % có hiệu quả
 - không thực hiện trước 30 tuổi
 - Không tính theo tuổi xuất hiện ung thư trong gia đình
- Cắt buồng trứng dự phòng khi có đột biến BRCA1

KHÔNG MAY LÀ :

- **Bất kỳ chất đánh dấu sinh học nào cũng không cho phép tiên đoán mang đột biến BRCA1/2 nào sẽ bị ung thư**
- **Rất khó để đánh giá chính xác nguy cơ ung thư của một người.**
- **Có đột biến BRCA không có nghĩa sẽ bị ung thư (vú hoặc buồng trứng)**
- **không xác định mức độ nguy cơ với sự chính xác sẽ mắc bệnh**
- **không dự đoán số năm sống còn**

Rapport des experts réunis par l'HAS en 2005

- Không thể chẩn đoán trước sinh
- Khuyến cáo đối với những phụ nữ có đột biến mất đoạn không nên cho trứng để thực hiện PMA

III) Tìm đột biến BRCA_{1/2} như thế nào ?

Cấu trúc và chức năng BRCA_{1/2}

BRCA mã hóa 1 protein có liên quan đến 1 protein khác và ảnh hưởng đến sự sửa chữa ADN

Trên chuột đã knockout, làm mất hoàn toàn gen BRCA₁, dẫn đến sự chết phôi do lỗi trong quá trình tăng trưởng tế bào

Ứng dụng Di truyền

Phòng xét nghiệm chuyên biệt

Kỹ thuật ổn định

Luôn có kết quả :

Thực hiện nhiều xn

Phân tích các thành viên trong gia đình

Tham vấn di truyền kỹ

Giá mắc hơn

BRCA₁

- Chuỗi 80 kb
- Mã hóa 1 ARNm / từ 7,8 kb
/ từ 22 exons
- Mã hóa 1 protéine
 - từ 1863 acide amin (220 kd)
 - Có trong mọi mẫu mô được phân tích

BRCA₂

- Mã hóa 1 ARNm / từ 10.4 kb
/ từ 27 exons
- Mã hóa protéine
 - từ 3 418 acide amin (380 kd)

Có hơn 2 000 đột biến được mô tả

- **Biến đổi từ vài base đến mất đoạn lớn
→ Khó xét nghiệm sàng lọc**
- **Các loại đột biến không có cùng nguy cơ phát triển thành ung thư**
- **30 % các đột biến sẽ còn thay đổi**

Trong trường hợp đó, phải làm gì ?

- Được tìm thấy có đột biến XXXX
- Chưa được biết đến
- Không tìm thấy thông tin : không thư viện, không Base biến đổi
- Vị trí quan trọng ít hay nhiều
- Đột biến khá quan trọng (nhưng không lớn)
- Vậy thì?

Kết quả tìm thấy

Một vài đột biến thường gặp hơn ở một nhóm quần thể nào đó

- **juifs ashkénazes** : 2,5% phụ nữ có đột biến mất đoạn nhiều hơn 5 lần so với dân số chung
- **irlandais**

Giá trị của các xét nghiệm

Chiều dài của gen BRCA1/2

Sự phân bố đột biến trên gen

Sự khác nhau của các loại đột biến

→ Các rắc rối trong kỹ thuật xét nghiệm

1 xn không thể phát hiện tất cả các đột biến

Giải trình tự tất cả các exons

Xn phát hiện đột biến đi từ phổ biến đến ít gặp

Đột biến điểm
Thêm đoạn nhỏ
Mất đoạn nhỏ

Xn protéines

DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

+ → Đột biến điểm + biến đổi nhỏ

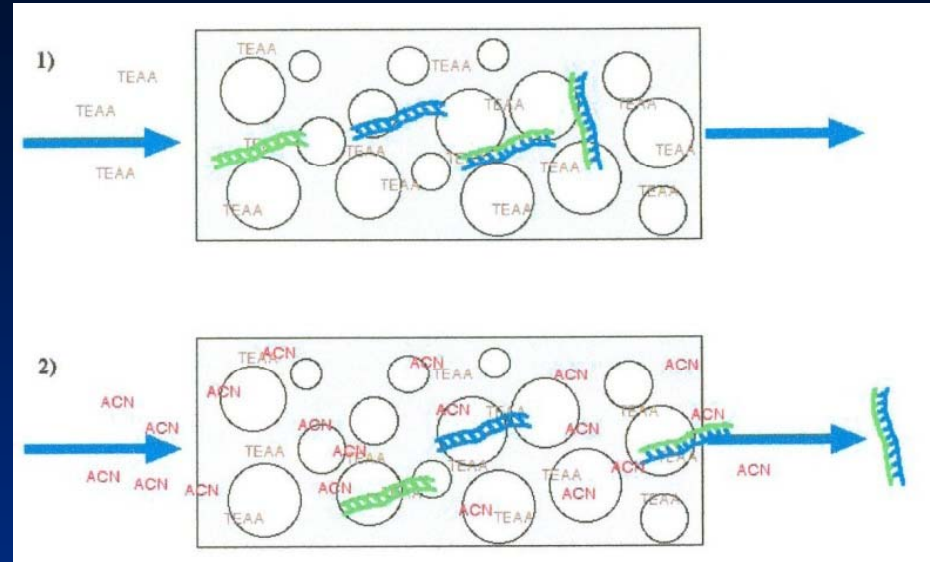
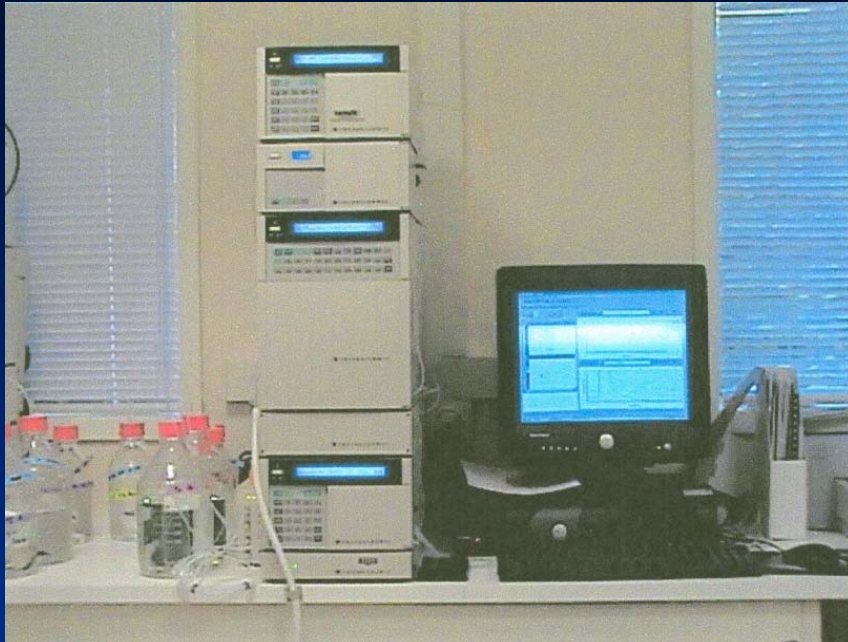
MLPA (Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification) → Biến đổi lớn

Sinh học Phân tử

- **Giải trình tự**
- **Phân tích thể dị hợp tử (HA)**
 - Điện di Gel biến tính tuyến tính (DGGE)**
 - XN Biến dạng đa hình chuỗi đơn (SSCP) / SSCA / SSLP**
 - Sắc ký lỏng cao áp biến tính (DHPLC)**
 - Phân cắt hóa học theo nguyên tắc không bổ sung (CMC)**
 - Phân tích các đoạn không bổ sung dựa vào huỳnh quang (FAMA)**
- **Men cắt giới hạn các đoạn đa hình (RFLP)**
- **Để phân tích các đoạn dài (RGT)**
 - Phản ứng PCR đa mồi đánh dấu huỳnh quang (QMPSF)**
 - Khuếch đại các đoạn dò đặc hiệu (MLPA)**

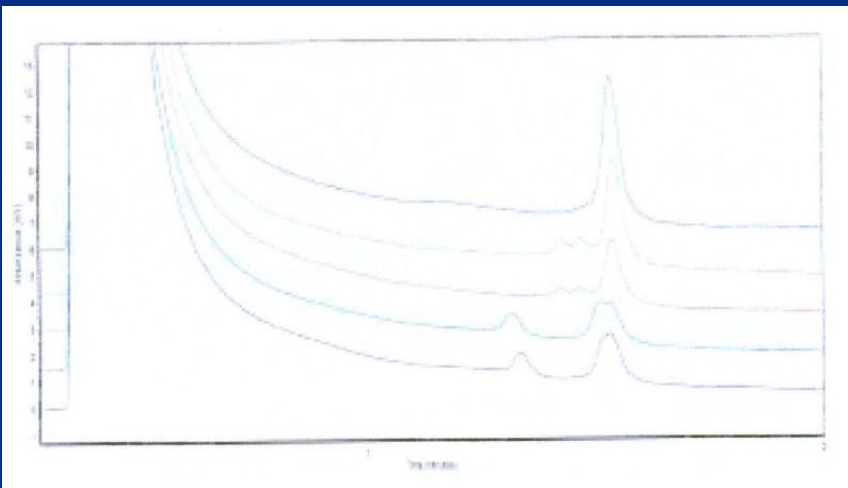
- **Mắc tiền (nhưng càng lúc càng giảm ...)**
- **Phân tích nhiều kỹ thuật**
- **Không thể phân tích các đoạn dài**

SẮC KÝ LỎNG CAO ÁP BIẾN TÍNH



TEAA : triethylammonium acetate

ACN : acetonitrile



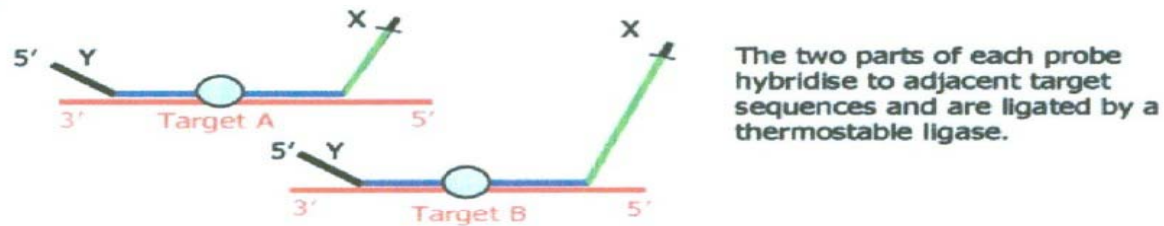
Nguyên tắc của MLPA

MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

1. Denaturation & hybridisation



2. Ligation



3. PCR

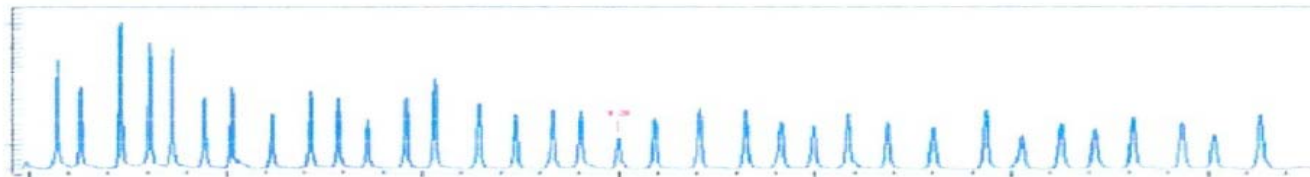
All probe ligation products are amplified by PCR using only one primer pair.



The amplification product of each probe has a unique length (130-480 bp).

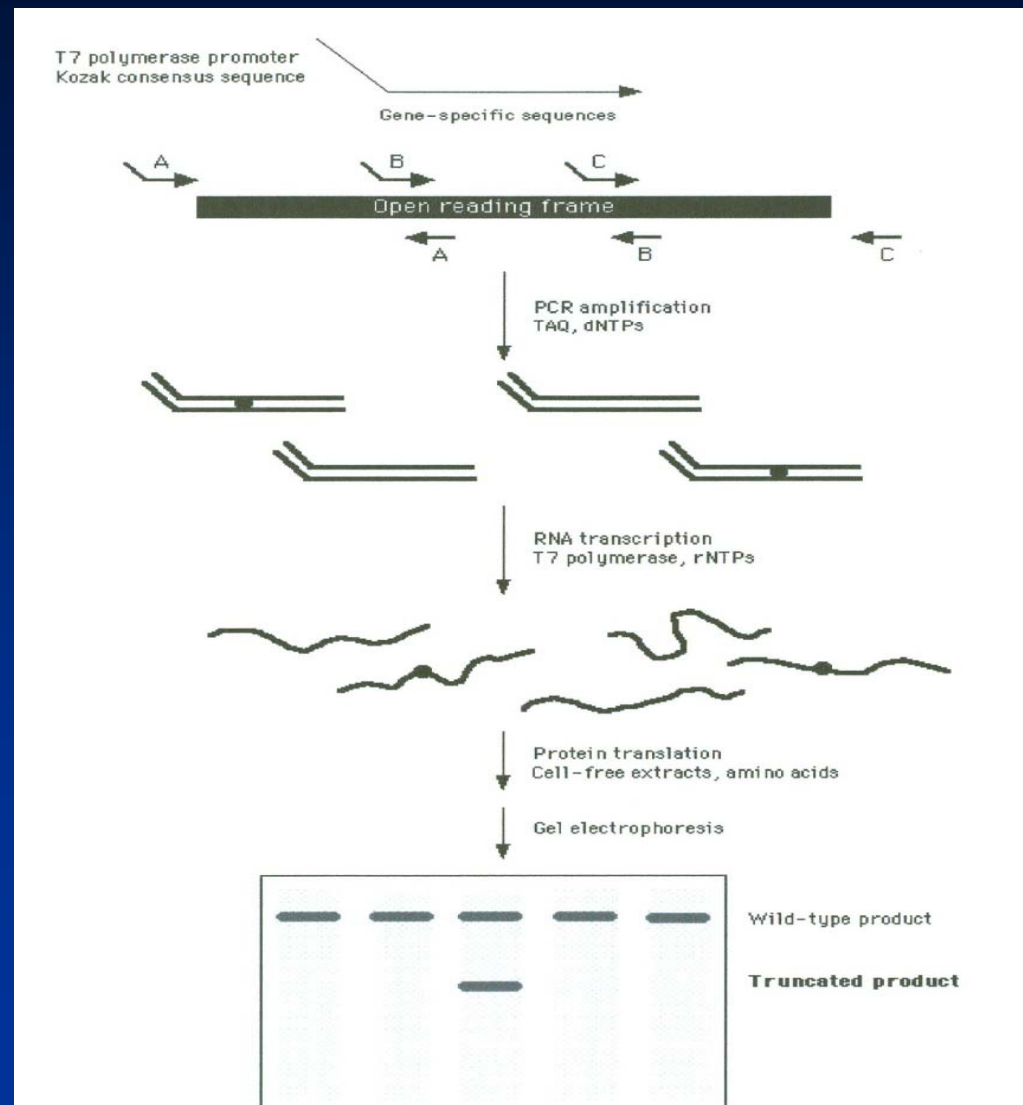
4. Separation by electrophoresis

Amplification products are separated by electrophoresis. Relative amounts of probe amplification products, as compared to a control DNA sample, reflect the relative copy number of target sequences.



Schouten, J.P. et al. Nucl. Acid Res. 30, e57.

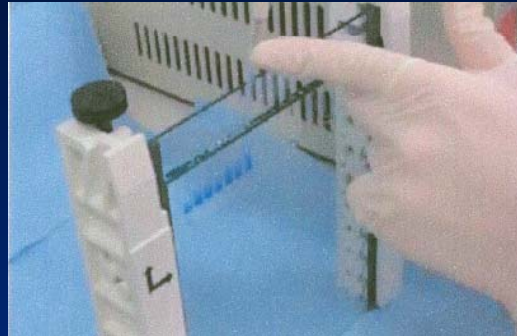
Protein truncation Test (PTT / PTA)



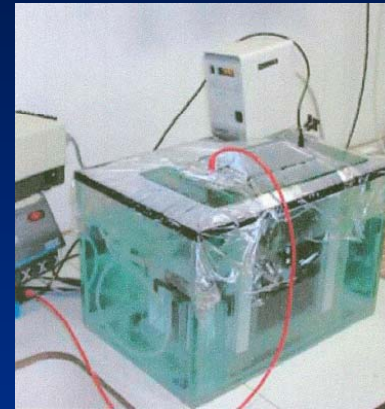
Điện di Gel biến tính tuyến tính (DGGE)



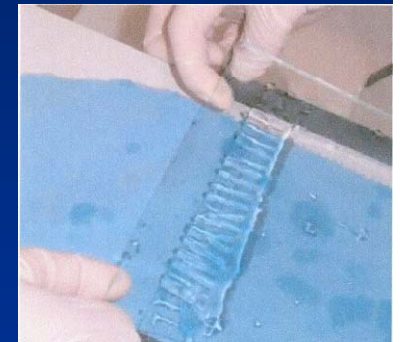
Chuẩn bị gel



Nhỏ mẫu



Điện di



Tháo khuôn

Tóm lại

80% phụ nữ bị ung thư vú không có tiền sử gia đình bị ung thư vú

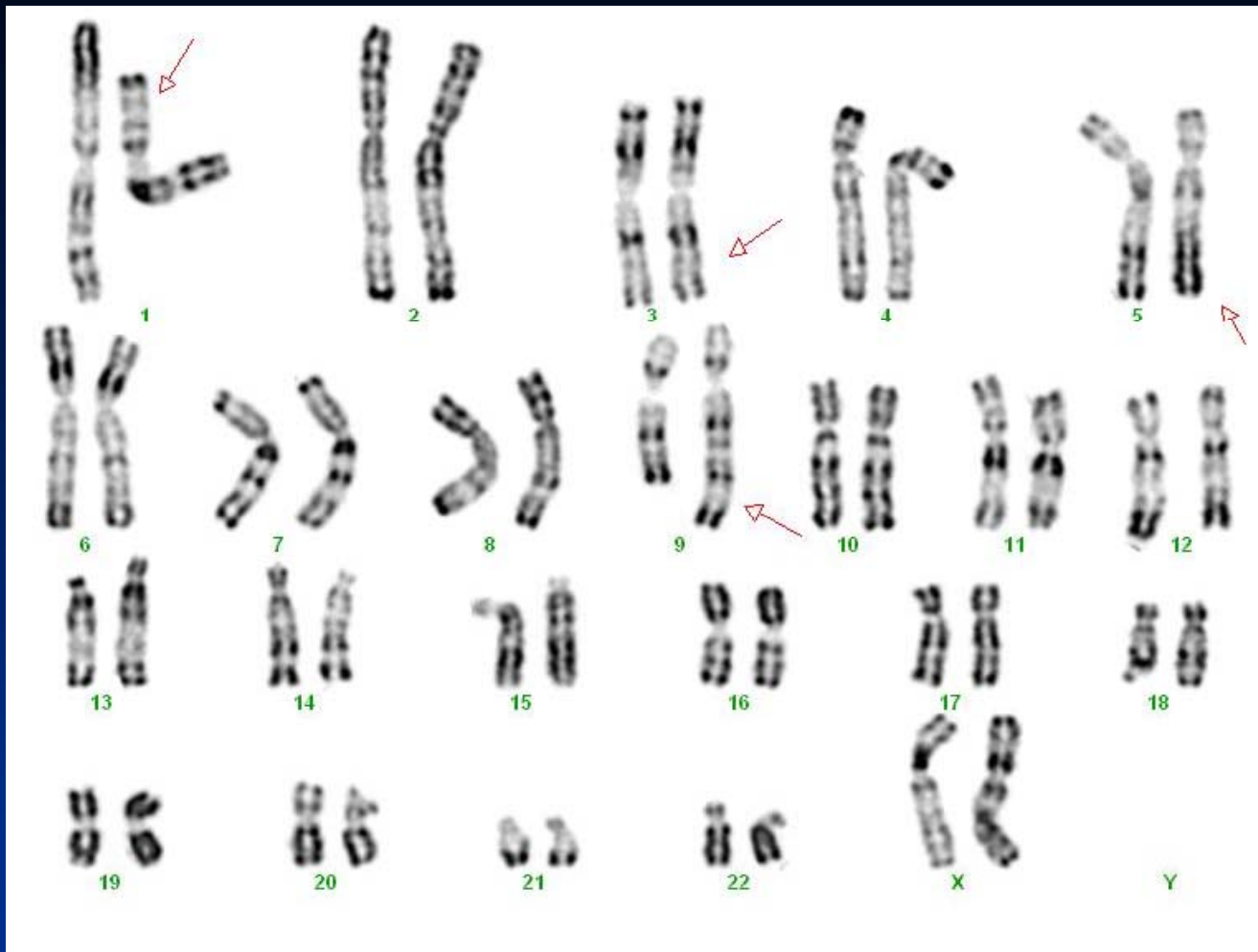
15% phụ nữ bị ung thư vú có tiền sử gia đình bị ung thư vú

5% phụ nữ bị ung thư vú có tiên đoán di truyền bị ung thư vú (đột biến mất đoạn BRCA)

Các phân tích di truyền khác

- Nhiễm sắc thể
- Les puces

- Tế bào ung thư = gen không ổn định
→ Đột biến nhiễm sắc thể bất kỳ
- Nếu một bất thường đi kèm với thuận lợi, sẽ nhanh chóng tạo thành dòng tế bào mới

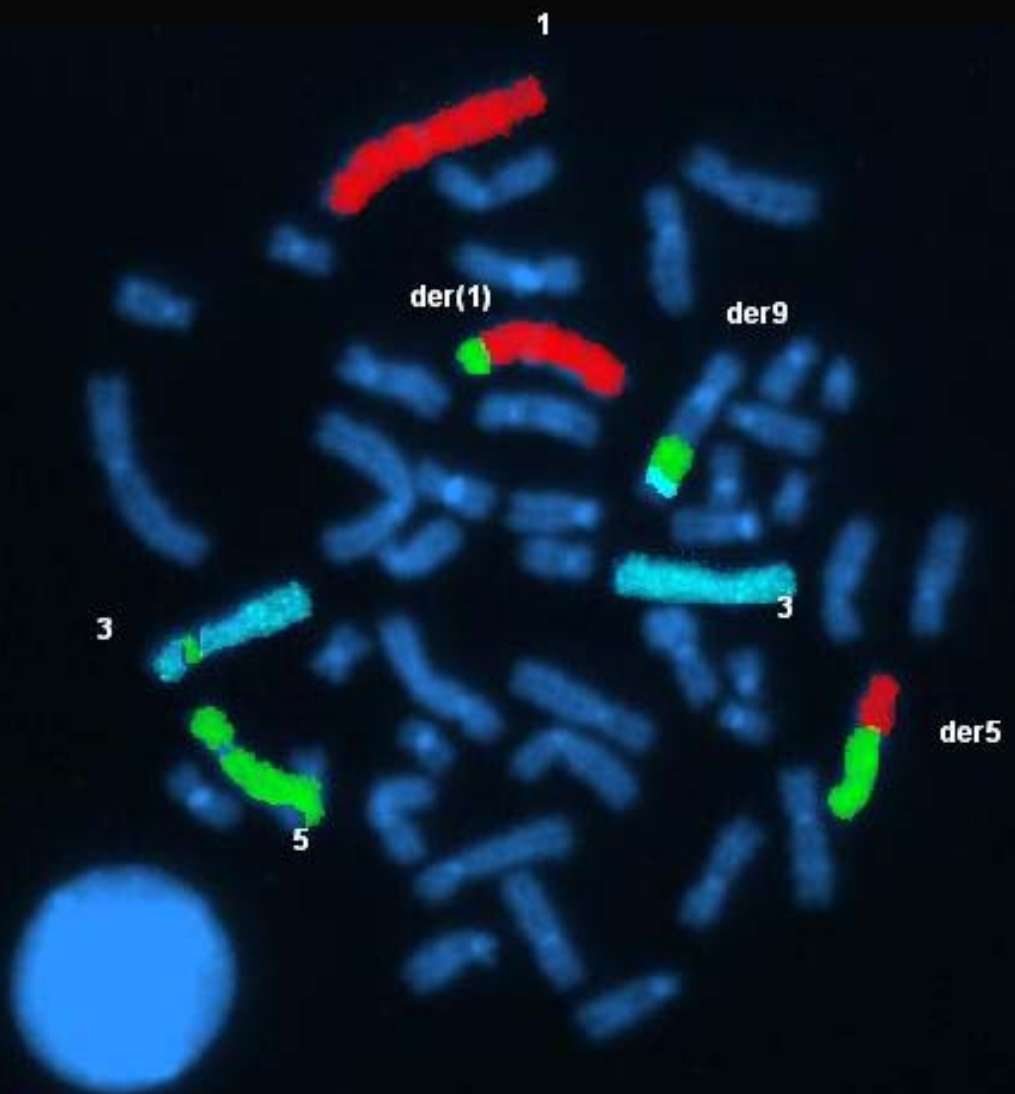


**46,XX,der(1)t(1;5)(p22;q32),der(3)ins(3;5)
(q21;q?),der(9)ins(9;3;5)(q22?;q?;q?)dn**

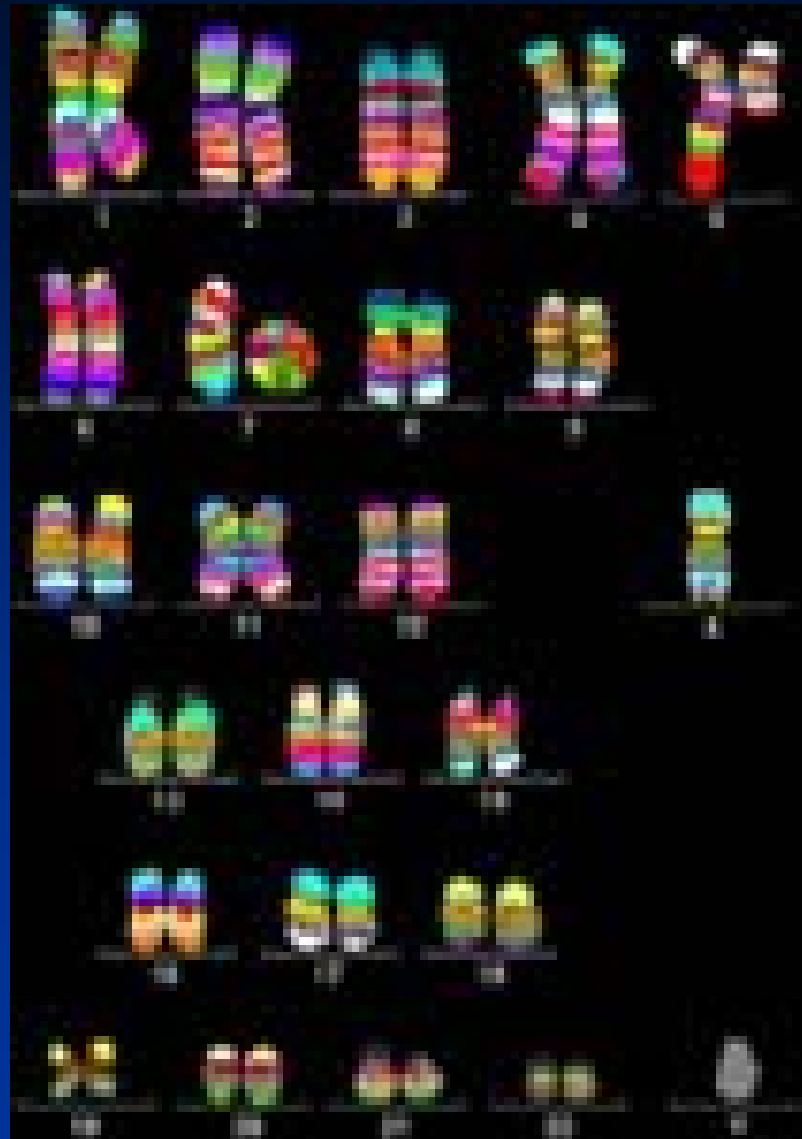
peinture(5)

peinture (3)

peinture (1)



Bộ nhiễm sắc thể với M FISH



1990 : Hybridation Génomique Comparative (CGH)

- Lấy từ ADN của khối u
- Lai huỳnh quang nhiễm sắc thể ở kỳ giữa
- → sự thay đổi về số lượng của các bản sao (mất đi và tăng thêm trên cùng một bộ gen của khối u)
- Độ phân giải 1 Mb (1 band của nhiễm sắc thể)
- Dựa vào sự tăng thêm và mất đi khác nhau giữa ung thư và không phải ung thư
- Nguyên tắc nhận biết ung thư sẽ dựa trên base liên quan chính đến gen bất thường

1890 : Di truyền tế bào cổ điển

- Nuôi cấy tế bào
- Lệch bội : số lượng ↗ khi diễn tiến ↗
- Nhưng nhiều vấn đề :
 - Band của nhiễm sắc thể bị mất hay nhân đôi ?
 - Điểm thường bị đứt gãy của gen được quan tâm ? (ex : LMC)

MCF7

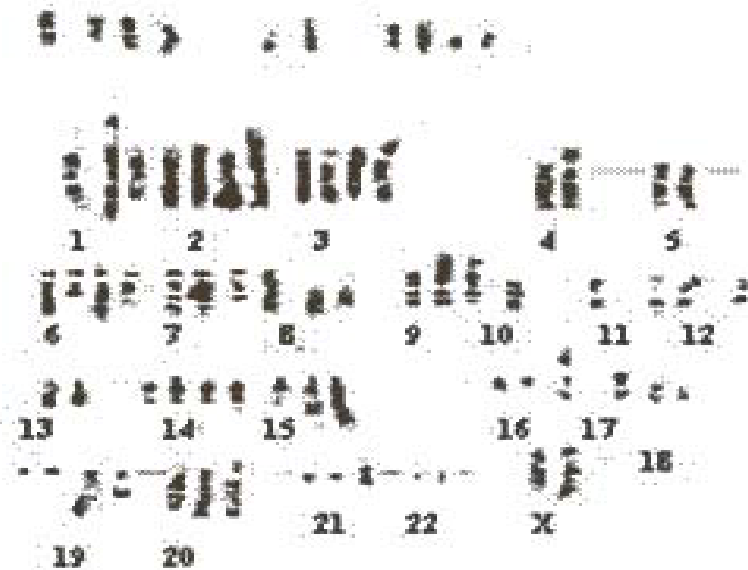


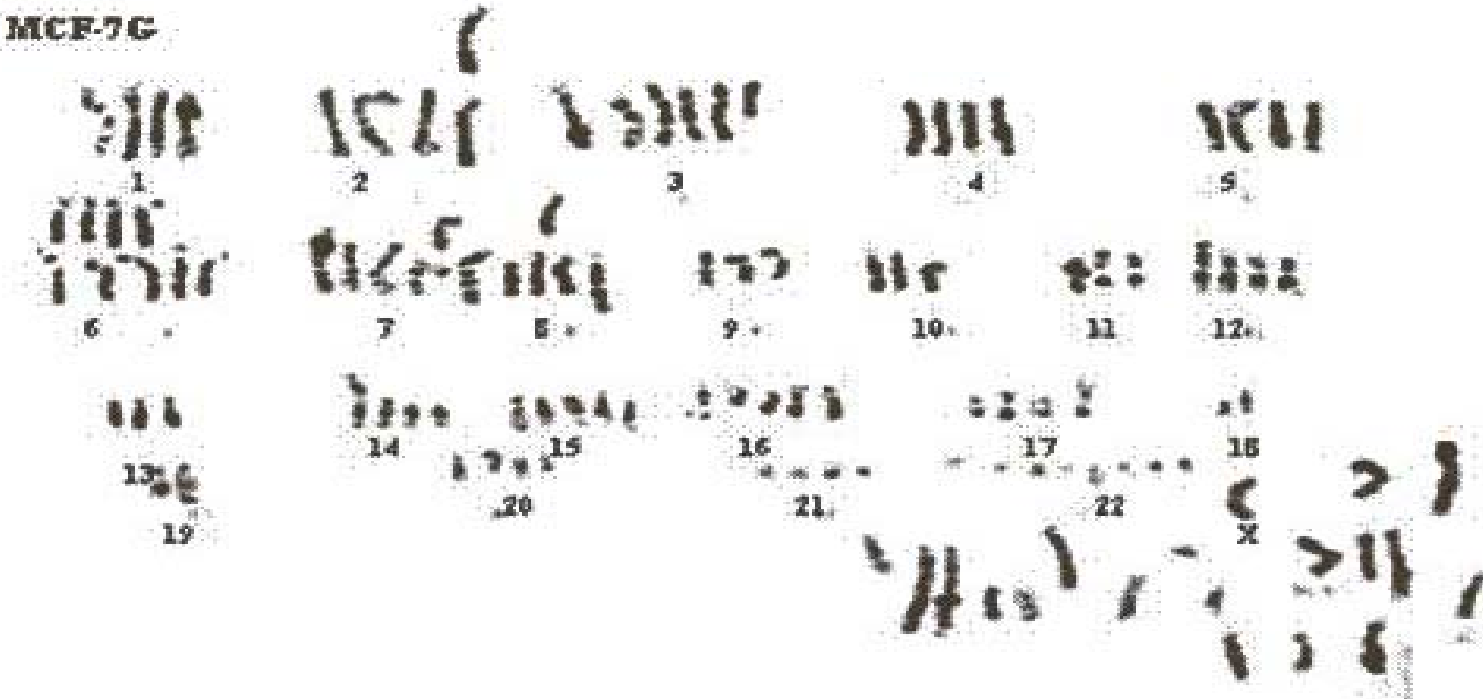
Figure 2. Karyotype

Cytogenetic analyses of Giemsa-stained parent (upper panel) and subline (lower panel) cells were performed to identify differences in karyotype (Fig. 2).

These studies showed that the modal chromosome number determined for the parent cells was 74, with a range of 61 to 76, which is nearly identical to that of the MCF7 cell line of origin.

The chromosome number determined for the MCF7G subline cells was found to be much higher, with a mode of 124, and a range of 78 to

MCF-7G



Lệch bội nhiễm sắc thể (NST 1, 11, 17) phát hiện bằng lai huỳnh quang tại chỗ có thể là yếu tố tiên lượng trong ung thư vú.

Masatsugu Takehisa, Mitsunori Saa, Yoshimi Bando *et al.*

Anticancer Research 27:1073-1078 (2007).

Bất thường nhiễm sắc thể và u vú

- Thường gặp nhưng không đặc hiệu
- lq, 3p, 6q, 8p
- +7, +8, +20
- t (1 ; 16)

Mất cấu trúc dị hợp tử (P.H.)

- Tương ứng với sự mất đoạn nhiễm sắc thể chứa gen đè nén u.
- Nằm trên nhiễm sắc thể 1p, 1q, 3p, 6q, **8p**, 11q, 13q, **16q**, **17p**, 17q
được tìm thấy dưới 50 % các khối u
- Mọi khối u có ít nhất 1 P.H.
- Một vài khối u tiền ung thư có 1 P.H.

Puces à ADN

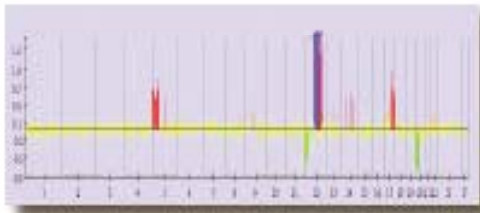
Chuẩn bị lame



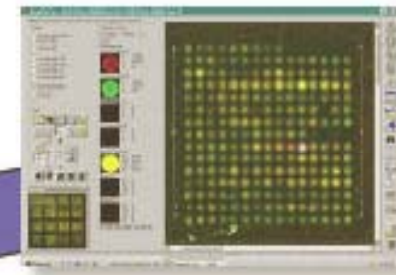
Đánh dấu và lai



Thu nhận hình ảnh



Phân tích kết quả



Phân tích hình ảnh

Chuẩn bị lame



Le robot : le spotter
Pièce propre: absence
de poussière
Température et
humidité contrôlées

La Biobanque : le génome



+

Le support : les lames

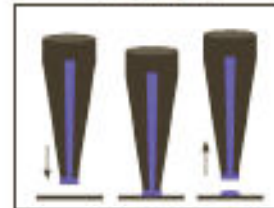


+

L'outil : les pointes

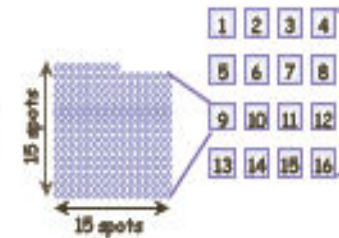


Le dépôt



Les spots : 180 μ m

La puce



1 pointe
= 218 spots

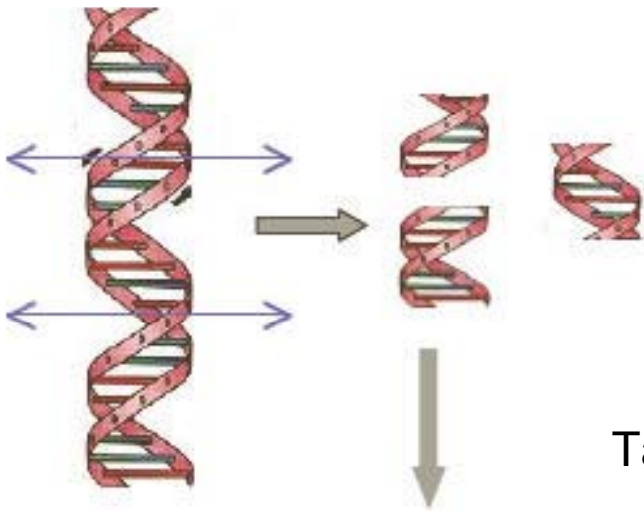
16 pointes
218 x 16
= 3488 spots



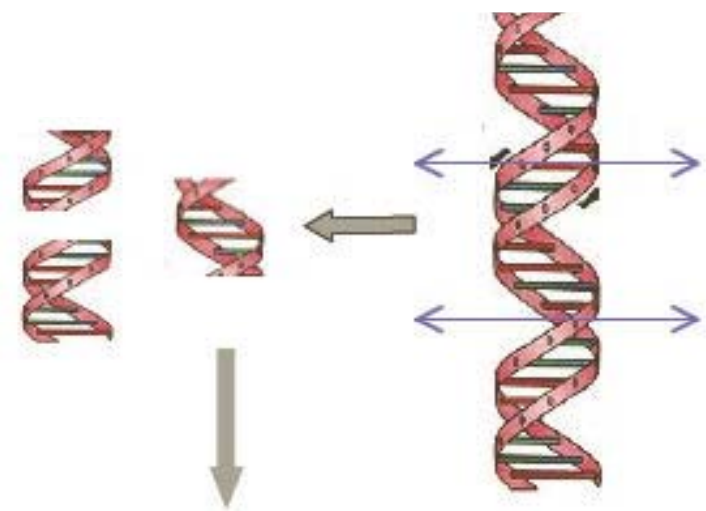
1 lame
3488 x 3
= 10464 spots

Đánh dấu và lai

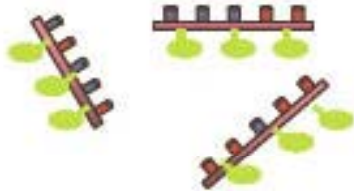
AND bình thường



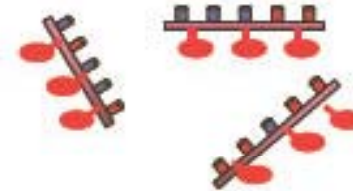
AND khối u



Tách AND thành
2 sợi đơn



AND bình thường được
đánh dấu huỳnh quang xanh lá

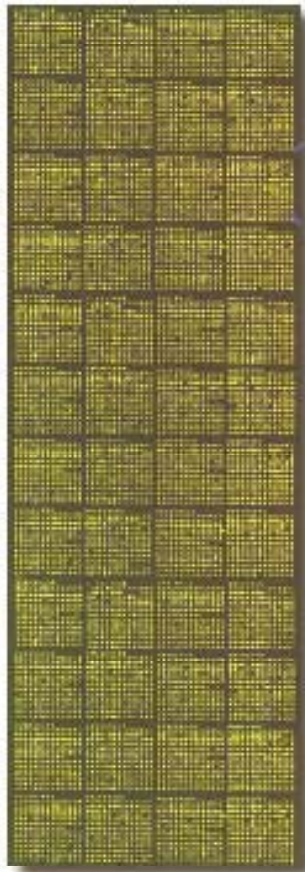


AND khối u được
đánh dấu huỳnh quang đỏ

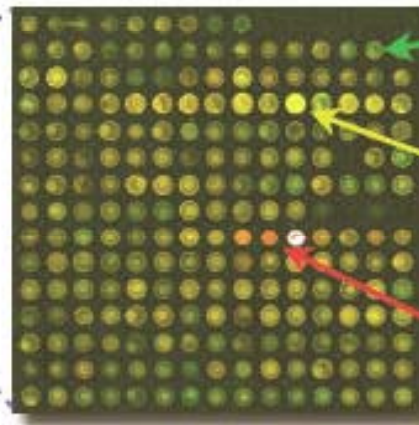
Lai huỳnh quang

Phân tích hình ảnh

Số lượng hình ảnh
cho 1 lần scan



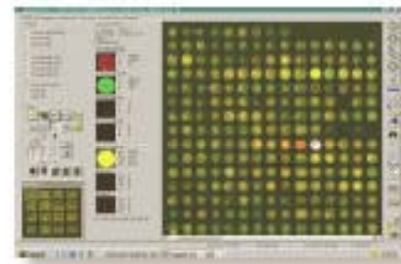
Chi tiết



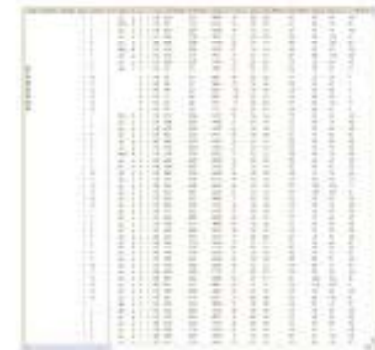
vert : ADN tumoral < ADN normal

jaune : ADN tumoral = ADN normal

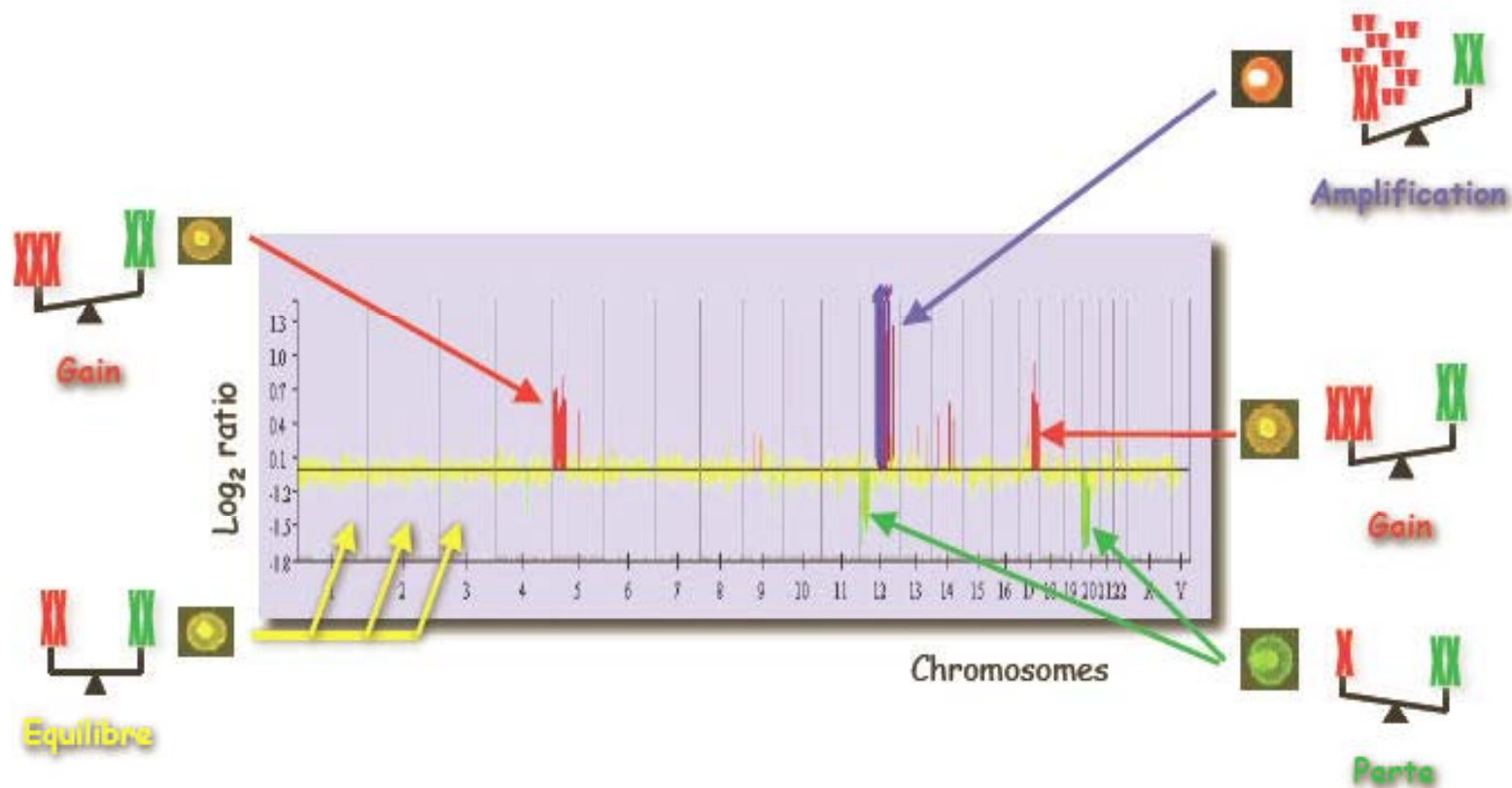
rouge : ADN tumoral > ADN normal



Phân tích hình ảnh:
Số lượng tín hiệu
huỳnh quang

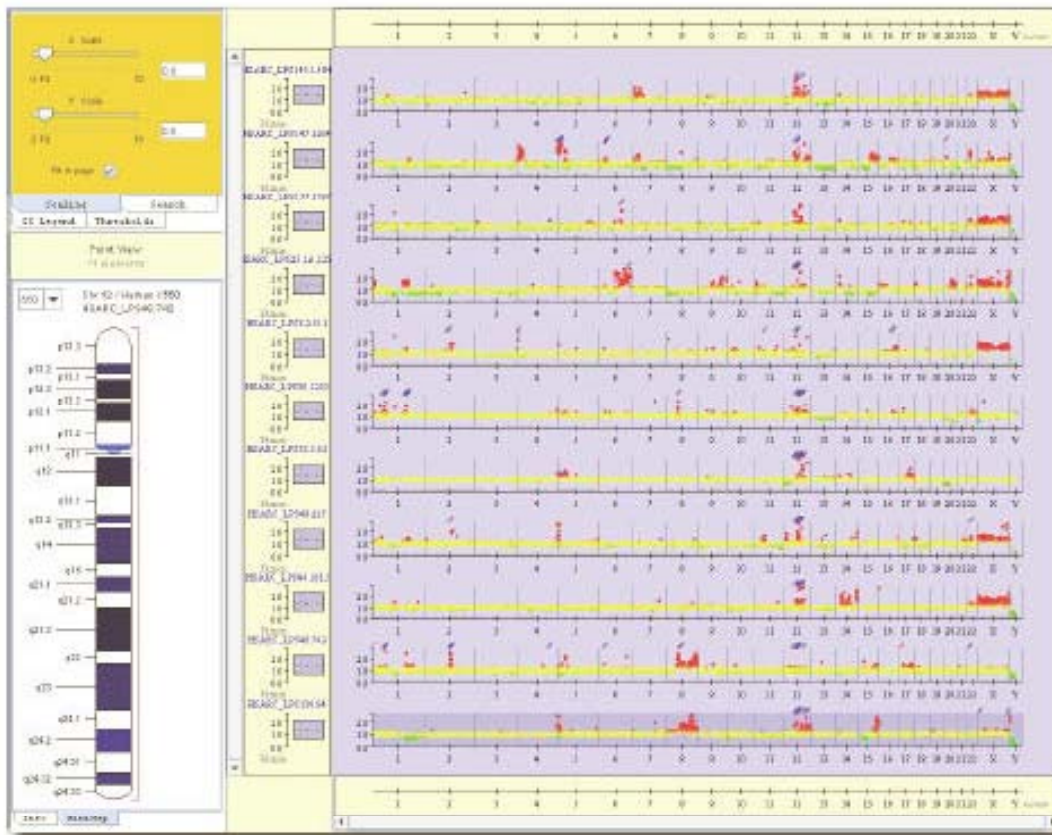


Phân tích KQ



Thực hiện trên những cá thể bình thường để “nhận dạng” khối u.
Kq nồng độ huỳnh quang AND của khối u / AND bình thường (= tỉ số) được tính cho mỗi cột. Tỉ số này hệ thống trong bộ gen theo vị trí từng cột của UCSC (theo từng nhiễm sắc thể).

Phân tích nhiều khối u



- Thay đổi
- Bệnh lý
- Bình thường
- Biến mất

Collaboration avec l'équipe de bioinformatique (<http://bioinfo.curie.fr>)

Puces à ADN = CGH array

- Đoạn từ 2 - 100 kb
- Vùng quan tâm
- Chọn gen hoặc vị trí mà sự biến đổi số lượng bản sao gây ảnh hưởng kiểu hình
- Phân loại mô học
- Nguy cơ tái phát tại chỗ hoặc di căn
- Tiên lượng đáp ứng điều trị
- Dấu ấn di truyền

MAMMAPRINT®

(signature génomique d'Amsterdam)

MAMMAPRINT®

Mục đích: Phân loại bệnh nhân < 60 tuổi / KHÔNG / khối u \leq 5cm
Theo nguy cơ nguy cơ ít / trung bình / cao

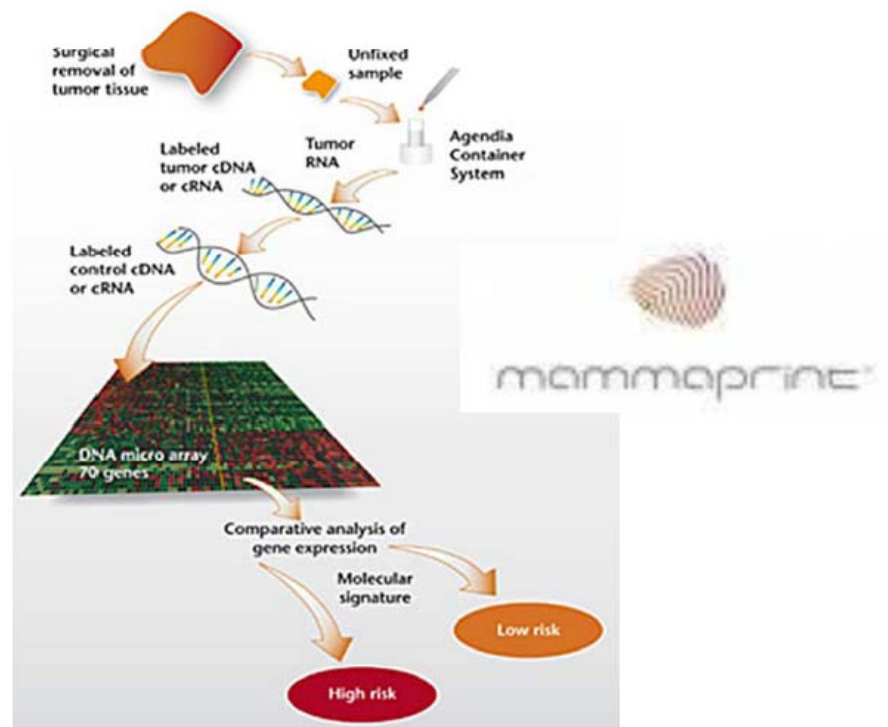
Mẫu: Mô lạnh hoặc mô cố định trong RNAretain

Kỹ thuật: đo 70 gen trên ARNm bằng microarray

Agilent - FDA

Nơi xn: Amsterdam

Giá xn: 2000\$



XN TIÊN LƯỢNG (THUỐC THỬ Mindact): LOE3

- NGUY CƠ TÁI PHÁT ÍT
- NGUY CƠ TÁI PHÁT CAO

XN TIÊN ĐOÁN (THUỐC THỬ Mindact):

- NGUY CƠ TÁI PHÁT ÍT: theo dõi
- NGUY CƠ TÁI PHÁT CAO: CT

ONCOTYPE DX™



ONCOTYPE DX™

Mục đích: Phân loại bệnh nhân có dùng thuốc Tamoxifène theo KHÔNG / CÓ + nguy cơ ít / trung bình / cao

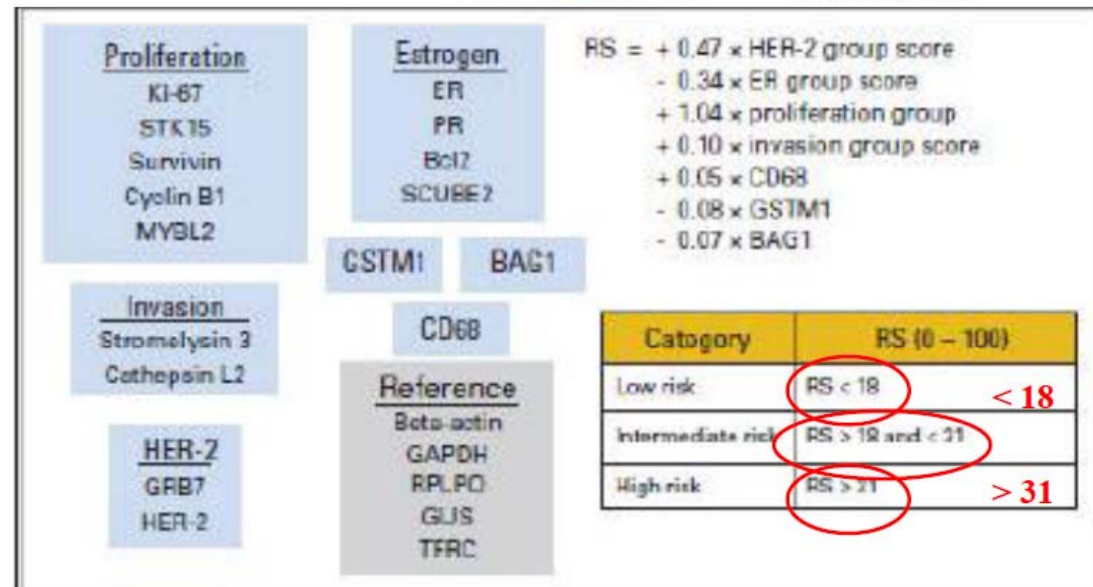
Mẫu: Mô trong paraffine

Kỹ thuật: đo 21 gen trên ARNm bằng RT-PCR, điểm 0 – 100

Nơi xn: Châu Âu
Giá xn: 3600\$



301 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063
Tel (866) ONCOTYPE (866-682-6897)
www.oncotypeDX.com



XN TIÊN LƯỢNG (THUỐC THỬ TAILORX): LOE2

- NGUY CƠ TÁI PHÁT ÍT
- NGUY CƠ TÁI PHÁT TRUNG BÌNH
- NGUY CƠ TÁI PHÁT CAO

XN TIÊN ĐOÁN (THUỐC THỬ TAILORX): LOE2

- NGUY CƠ TÁI PHÁT ÍT
- Không có hỗ trợ CT
- NGUY CƠ TÁI PHÁT TRUNG BÌNH
- HT + CT
- NGUY CƠ TÁI PHÁT CAO
- HT + CT