

Giải trình tự exome ở bệnh nhi cơ tim phì đại, phát hiện đột biến mới thuộc gen GAA

Nguyễn Minh Hiệp¹, Bùi Chí Bảo^{2,3,4}, Vũ Bảo Quốc⁵, Phạm Hồ Thuật Khoa⁵
Nguyễn Văn Phúc⁵, Nguyễn Trường An⁶, Phan Sỹ Đức⁶, Nguyễn Huy Nam⁷
Phạm Thị Bạch Yến⁸, Nguyễn Thị Huỳnh Nga⁵

Trung tâm Công nghệ bức xạ, Viện nghiên cứu hạt nhân, Thành phố Đà Lạt¹

Trung tâm Y Sinh học Phân tử, Đại học Y Dược, Thành phố Hồ Chí Minh²

Đơn vị Sinh học Phân tử Di truyền, Bệnh viện Nhi đồng 2, Thành phố Hồ Chí Minh³

Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh⁴

Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt, Thành phố Đà Lạt⁵

Khoa Sau đại học, Trường Đại học Đà Lạt, Thành phố Đà Lạt⁶

Bệnh viện Phục hồi chức năng Tỉnh Lâm Đồng⁷

Sở Y tế Lâm Đồng⁸

TÓM TẮT

Cơ sở nghiên cứu: Bệnh cơ tim phì đại (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) là tình trạng rối loạn hoạt động của tế bào cơ tim, đặc trưng bởi sự gia tăng độ dày thành tâm thất trái hoặc toàn bộ cơ tim. Ở nước ta, hiện có rất ít nghiên cứu về HCM ở trẻ em và chủ yếu chỉ mới tập trung vào các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và dịch tễ học. Vì vậy, việc thực hiện một nghiên cứu về di truyền và cơ chế khởi phát bệnh HCM ở bệnh nhi là rất cần thiết, tạo cơ sở cho việc phòng ngừa, phát hiện sớm, điều trị và chăm sóc nâng đỡ.

Phương pháp: Bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới (NGS), 33 gen liên quan đến HCM đã được khảo sát ở một bệnh nhi nam 6 tháng tuổi.

Kết quả: Sử dụng chiến lược giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES), quá trình phân tích và sàng lọc phân tử đã xác định được một đột biến lệch khung thuộc exon thứ 11 trên gen acid α -glucosidase (GAA). Đột biến c.1579_1580del; p.(Arg527GlyfsTer3) thuộc domain Glycoside Hydrolase 31 của protein GAA. Đột biến làm mất

đoạn polypeptide lớn bao gồm 423 amino acid ở phía đuôi -COOH, ảnh hưởng nghiêm trọng đến cấu trúc và chức năng xúc tác của enzyme GAA, là nguyên nhân trực tiếp gây bệnh Pompe và khởi phát HCM ở bệnh nhi.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu di truyền và cơ chế gây bệnh giúp khẳng định chẩn đoán, tư vấn di truyền cho gia đình bệnh nhân và tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn.

Từ khóa: Cơ tim phì đại, đột biến, exome, HCM, GAA, Pompe.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh cơ tim phì đại (hypertrophic cardiomyopathy, HCM) là tình trạng rối loạn hoạt động của tế bào cơ tim, được đặc trưng bởi sự gia tăng độ dày thành tâm thất trái hoặc toàn bộ cơ tim, gây xáo trộn chức năng co bóp của tim và tăng xơ hóa cơ tim [1,2]. Chính điều này đã dẫn đến tình trạng suy giảm khả năng bơm máu hiệu quả của tim. Biểu hiện lâm sàng của HCM khác nhau đáng kể giữa các bệnh nhân, từ khó thở nhẹ khi gắng sức đến suy tim, đau thắt

ngực, rối loạn nhịp cả tâm nhĩ và tâm thất, huyết khối và đột tử [1]. Tần suất của bệnh HCM là 1:500 người và tỉ lệ người thân cấp độ 1 trong gia đình có nguy cơ mắc bệnh là 50 - 60% [1,3]. Phần còn lại là do các nguyên nhân không do di truyền và một số trường hợp nhỏ do đột biến de novo. Cho đến nay, các đột biến đã được xác định ở ít nhất 33 gen nhạy cảm với HCM [4]. Ngoài căn nguyên phức tạp, HCM còn có biểu hiện lâm sàng tương quan với nhiều loại bệnh cơ tim khác [2,3]. Hơn nữa, sự tương quan kiểu gen - kiểu hình phức tạp của HCM còn bởi vì không phải tất cả các đột biến trên cùng một gen đều dẫn đến kết quả lâm sàng tương tự [2 - 4]. Ngoài ra, kết quả lâm sàng không thể được dự đoán một cách chính xác vì cả chính đột biến cũng như quá trình phản ứng sinh lý học của nó đều ảnh hưởng đến sự biểu hiện bệnh lý [1 - 3]. Trong một số trường hợp, các phân nhóm HCM khác nhau cùng có hình thái tim giống hệt nhau [3,4]. Ngược lại, một đột biến duy nhất cũng có thể gây bệnh HCM với các dấu hiệu đặc trưng hoặc ngay cả việc biểu hiện những bệnh lý khác, dẫn đến sự khó khăn trong việc theo dõi và điều trị. Tóm lại, chính sự trùng lặp lớn về kiểu gen và kiểu hình giữa các nhóm HCM đã gây hạn chế cho việc chẩn đoán bệnh nếu chỉ dựa trên các đặc điểm lâm sàng [1 - 4]. Vì vậy, để chẩn đoán, tiên lượng cụ thể cho từng bệnh nhân cũng như dự đoán khả năng mắc bệnh HCM của người thân trong gia đình bệnh nhân, việc nghiên cứu kết hợp trên toàn bộ bộ gen là rất cần thiết.

Phương pháp giải trình tự Sanger là kỹ thuật cho phép xác định chính xác trình tự các nucleotide của phân tử DNA, được ứng dụng rộng rãi đối với các bệnh lý chủ yếu liên quan đến một gen gây bệnh đơn lẻ [5]. Tuy nhiên, phương pháp sàng lọc này rất mất thời gian và cho mức độ không đồng nhất di truyền cao. Cho đến nay, kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới (next generation sequencing, NGS) đã được ứng dụng đối với các gen liên quan đến HCM

[2,6]. NGS là một công nghệ giải trình tự DNA thông lượng cao, tạo ra dữ liệu của nhiều đoạn DNA trong một phản ứng duy nhất [7 - 9]. Phương pháp NGS, bao gồm giải trình tự toàn bộ vùng mã hoá exome (whole exome sequencing, WES) và giải trình tự toàn bộ bộ gen (whole genome sequencing, WGS), đã nhanh chóng trở thành công cụ có thể chẩn đoán phân tử cho các rối loạn di truyền Mendel [7,8]. Exome là tập hợp của tất cả các exon bộ gen, chiếm xấp xỉ 1% dung lượng bộ gen nhưng chứa đến 85% đột biến có thể dẫn đến sự biểu hiện các đặc điểm lâm sàng [10,11]. Theo đó, việc xác định và giải trình tự 1% vùng mã hóa mang ít trình tự lặp này sẽ dễ dàng hơn đối với vùng không mã hóa [7,8]. Kỹ thuật WES đã khắc phục những hạn chế của phương pháp giải trình tự Sanger về tốc độ, chi phí và độ chính xác [7 - 11]. Do đó, WES trở thành một công cụ chẩn đoán có hiệu quả tối ưu đối với việc xác định biến thể gây bệnh [9].

MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Trong dự án này, chúng tôi sẽ ứng dụng kỹ thuật WES để nghiên cứu và sàng lọc phân tử trên một bệnh nhi Việt Nam được nghi ngờ mắc bệnh HCM nhằm phát hiện biến thể mới liên quan đến bệnh, góp phần vào việc chẩn đoán phân tử đối với bệnh được chính xác hơn, từ đó có thể xác định sớm quá trình phát triển loạn nhịp tim và quản lý lâm sàng triệt để hơn.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng

Một bệnh nhân người Việt Nam được lập hồ sơ hội chứng, di truyền và quản lý lâm sàng tại Bệnh viện Nhi đồng 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Bệnh nhi là nam, 6 tháng tuổi, nhập viện trong tình trạng thờ mệt, ho nhiều, kiệt sức. Các dấu hiệu lâm sàng bước đầu cho thấy bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh HCM. Toàn bộ dữ liệu bệnh án của bệnh

nhân được gia đình bệnh nhân chấp thuận sử dụng cho nghiên cứu.

Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA

DNA tổng số (gDNA) từ tế bào bạch cầu trong 200 μ L mẫu máu toàn phần của bệnh nhân được tách chiết và tinh sạch bằng bộ kit QIAamp DNA Blood Mini Kit - QIAGEN (Đức). Sau đó, mẫu DNA được kiểm tra lại bằng máy NanoDrop. Mẫu DNA đạt tiêu chuẩn cần có nồng độ trong khoảng 100 - 200 ng/ μ L và giá trị OD 260/280 trong khoảng 1,8 - 1,9.

Chuẩn bị thư viện và giải trình tự

Các phân đoạn DNA kích thước 100 - 900 bp được phân cắt từ gDNA và được nối với adaptor và các cặp DNA thư viện. Sau khi được khuếch đại bởi kỹ thuật PCR, thư viện DNA được giải trình tự trên máy HiSeq 4000 với bộ kit TruSeq 3000/4000 SBS Kit v3 (protocol HiSeq 3000/4000 System User Guide Part # 15066496, Rev. A HCS 3.3.20). Thư viện cho giải trình tự được dựa trên nguyên tắc số mẫu dò (probe) được thiết kế cho hệ gen hoặc cho nhóm gen mục tiêu. Chúng tôi đã tạo số lượng mẫu dò cho nhóm 33 gen mục tiêu liên quan đến bệnh HCM bao gồm các gen: *ACTC1*, *ACTN2*, *ANKRD1*, *CALR3*, *CASQ2*, *CSRP3*, *DES*, *FHL-1*, *FLNC*, *FXN*, *GAA*, *GLA*, *JPH2*, *KRAS*, *LAMP2*, *LBD3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYOZ2*, *NEXN*, *PLN*, *PTPN11*, *PRKAG2*, *SOS1*, *TCAP*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *VCL*, *RAF1* [4].

Sắp xếp và phân tích dữ liệu

Các đoạn đọc có chất lượng thấp được loại bỏ. Dữ liệu trình tự được sắp xếp và so sánh với ngân hàng gen người (UCSC Genome Build hg19) bằng phần mềm Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Dữ liệu được phân tích bằng Genome Analysis Toolkit (GATK) và Sequence Alignment Map (SAMtools) để tìm tất cả những vị trí có sự thay đổi allele với tần số thống kê cao, bao gồm SNPs, đoạn chèn, đoạn mất ngắn và CNVs.

Chú giải và sàng lọc biến thể

Biến thể được chú giải bằng các phần mềm ANNOVAR và VEP. Biến thể sau đó được đối chiếu với bảng biến thể gây bệnh trên Human Gene Mutation Database (HGMD). Chúng tôi lọc các biến thể hiếm thuộc exon và vùng splice site có tần số allele lặn (minor allele frequency, MAF) \leq 0,0005.

Phân loại biến thể

Biến thể được phân loại theo tiêu chuẩn của American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Tần số allele được đối chiếu với Exome Aggregation Consortium (ExAC). Việc kết luận khả năng gây bệnh của biến thể được kết hợp bởi kết quả từ các phần mềm công cụ dự đoán chức năng bao gồm ENTPRISE-X, MutationTaster, PROVEAN và SIFT.

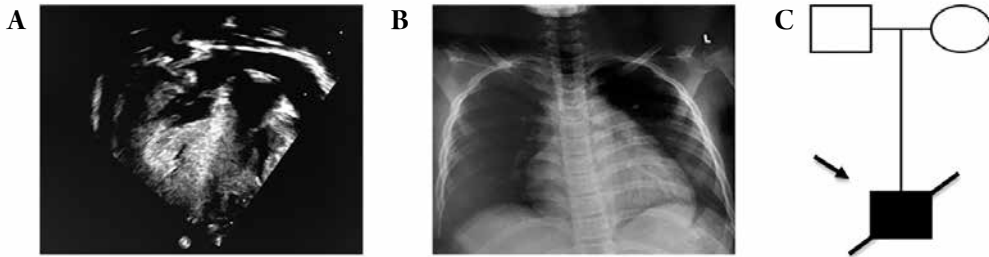
KẾT QUẢ

Thông tin của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên một bệnh nhi nam 6 tháng tuổi. Bệnh nhi là con đầu lòng của cặp vợ chồng khoẻ mạnh. Bệnh nhi có tiền sử bị sinh thiếu tháng khi mới được 34 tuần tuổi và cân nặng lúc sinh chỉ là 2.500g. Lúc nhập viện, bệnh nhi có thể trạng gầy yếu, da xanh xao, cân nặng 6.300g. Bệnh nhi được ghi nhận có triệu chứng khó thở, sốt, ho nhiều, kiệt sức và viêm phổi. Kết quả siêu âm tim (**Hình 1A**) cho thấy các dấu hiệu dày đồng tâm hai thất và hẹp buồng thoát hai thất. Tuy nhiên, không có luồng thông bất thường trong tim và nhịp tim đều, được duy trì ổn định trong khoảng 145 lần/phút. Các kết quả lâm sàng còn cho thấy bệnh nhi mắc tật tim lớn thông qua hình thái và kích thước tim bất thường (**Hình 1B**). Lúc này, bệnh nhi được hỗ trợ hô hấp bằng phương pháp thở áp lực dương liên tục qua mũi (nasal continuous positive airway pressure, NCPAP). Kết quả xét nghiệm ghi nhận các chỉ số enzyme CPK (creatine phosphokinase)

và CK-MB (creatine kinase-MB) tăng cao, có giá trị lần lượt là 771 $\mu\text{g/L}$ và 22,1 $\mu\text{g/L}$. Do đó, tỷ lệ CK-MB/CK là 2,87%. Giá trị men gan cao được thể hiện qua các chỉ số xét nghiệm nồng độ các enzyme ALT (alanine aminotransferase) là 60 IU/L và AST (aspartate aminotransferase) là 211

IU/L. Tổng hợp các dấu hiệu lâm sàng cho thấy bệnh nhi có biểu hiện của bệnh lý Pompe và được chỉ định xét nghiệm gen để có hướng điều trị tiếp theo. Tuy nhiên, chúng tôi nhận thấy sức khỏe bệnh nhân tiên lượng xấu, bệnh nhân đã ngưng thở trong quá trình điều trị.



Hình 1. Thông tin của đối tượng nghiên cứu. (A) Kết quả siêu âm tim với các dấu hiệu của bệnh cơ tim phì đại. (B) Hình chụp X quang lồng ngực nhìn thẳng thể hiện kích thước bóng tim to bất thường. (C) Sơ đồ phả hệ cho thấy đối tượng nghiên cứu (mũi tên) là người duy nhất trong gia đình mắc bệnh và đã qua đời do bệnh cơ tim phì đại dẫn đến suy hô hấp - tuần hoàn.

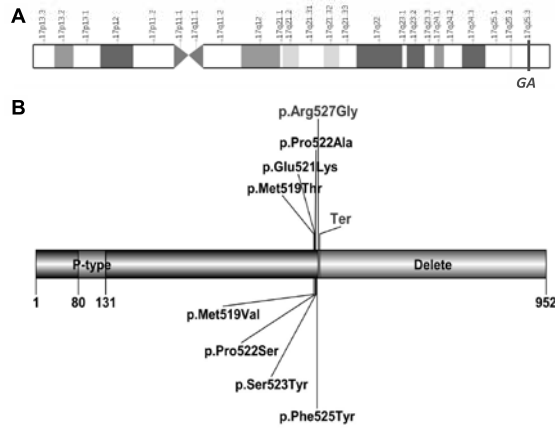
Kết quả đánh giá biến thể

Thông qua việc ứng dụng công nghệ NGS của Illumina, kết quả thu được đều đáp ứng các thông số kiểm soát chất lượng của quá trình giải trình tự. Dung lượng giải trình tự của mẫu là 2,1 Gbp, độ bao phủ (depth coverage) 138x, hàm lượng GC chiếm 48,9%. Phần lớn các lần đọc có chất lượng base cao, với Q30 (Phred-score) 96%. Sau quá trình giải trình tự WES, kết quả thu được 82.191 biến thể trong exome của bệnh nhân, được lọc bằng cách loại bỏ tất cả biến thể trên các gen không liên quan đến bệnh HCM, chỉ giữ lại các đột biến trên 33 gen đã được công bố liên quan đến bệnh HCM. Tiếp đó, chúng tôi loại bỏ các đột biến “synonymous”, MAF $\geq 0,05\%$.

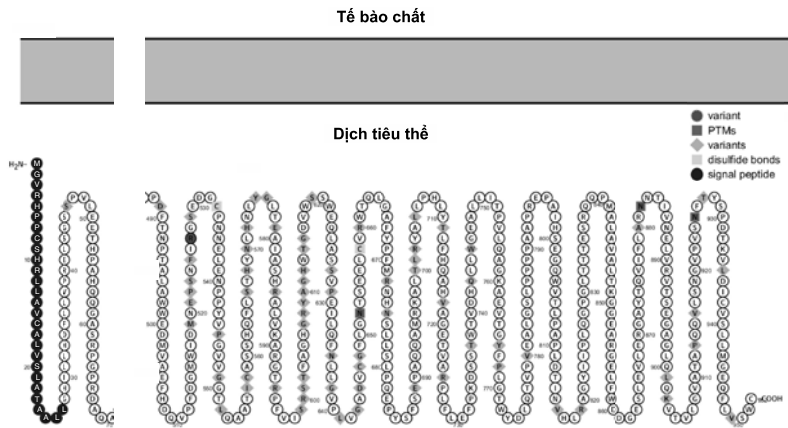
Kết quả là chúng tôi đã phát hiện được một biến thể lệch khung c.1579_1580del; p.(Arg527 GlyfsTer3) (Hình 2B) thuộc exon thứ 11 của gen acid α -glucosidase (GAA) (NM_000152.3), thuộc vị trí 78084767 trên chromosome 17 (17q25.2 - q25.3) (Hình 2A).

Biến thể p.(Arg527GlyfsTer3) đã dẫn đến sự thay thế 1 amino acid arginine ở vị trí 527 bởi glycine. Các amino acid này có đặc tính lý hoá (physico-chemical property) rất khác biệt do arginine là một amino acid béo, mạch thẳng, phân cực và tích điện, trong khi glycine là một aminoacetic acid, thuộc nhóm amino acid đơn giản nhất, không phân cực.

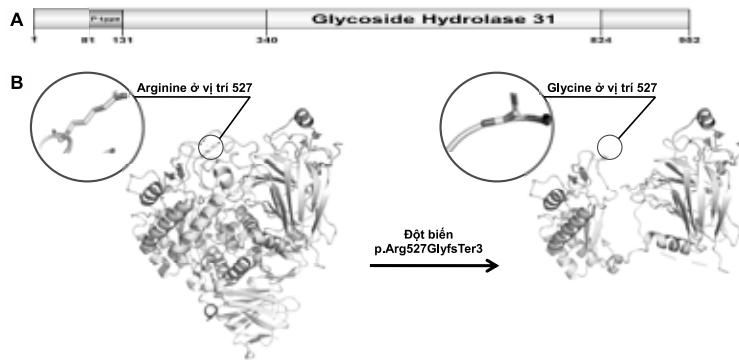
Ngoài ra, kết quả sàng lọc và phân loại biến thể cũng cho thấy p.(Arg527GlyfsTer3) là biến thể tiềm năng duy nhất có khả năng gây bệnh HCM ở bệnh nhân. Kết hợp với việc sử dụng các công cụ dự đoán chức năng bao gồm ENTPRISE-X, MutationTaster, PROVEAN và SIFT, chúng tôi nhận thấy đột biến p.(Arg527GlyfsTer3) gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cấu trúc của enzyme GAA (Hình 4) và đáp ứng các tiêu chuẩn về khả năng gây bệnh HCM. Nguy cơ gây bệnh cao càng được củng cố khi đột biến nêu trên xuất hiện ở vùng amino acid có độ bảo tồn cao. Trong đó, arginine ở codon thứ 527 trên chuỗi polypeptide của GAA được xác định là đều xuất hiện ở một số loài động vật có vú (Hình 5).



Hình 2. Vị trí của đột biến mới được phát hiện. (A) Hình ảnh nhuộm G-banding của chromosome 17 ở người với vị trí gen acid α -glucosidase (GAA). Locus gen GAA thuộc cánh dài (17q), nằm gần vùng đầu mút của chromosome 17 (17q25.2 - q25.3). (B) Sự phân bố của một số đột biến đã được công bố (cập nhật đến năm 2020) trên protein GAA gắn với vị trí đột biến mới được phát hiện c.1579_1580del; p.(Arg527GlyfsTer3): đột biến lệch khung (fs, frameshift) do mất 2 nucleotide ở vị trí 1579 và 1580 trên cDNA, làm dịch chuyển phức hợp dịch mã (ribosome) trên chuỗi polynucleotide của phân tử nucleic acid, dẫn đến sự thay thế amino acid arginine (Arg) thành glycine (Gly) ở vị trí codon 527. Khung đọc mã tiếp tục dịch chuyển được 3 codon thì gặp codon kết thúc (Ter, termination codon). Kết quả là chuỗi polypeptide bị mất một đoạn (Delete) dài 423 amino acid ở phía đuôi -COOH. Hình ảnh được vẽ bằng phần mềm DOG 2.0 với các thông tin được tham khảo trên UniProt.



Hình 3. Sơ đồ một phần cấu trúc của protein GAA ở người. Protein GAA là một enzyme hoà tan, giữ vai trò chuyển hoá glycogen trong lysosome (tiêu thể) thành glucose. Protein GAA được mã hoá bởi gen GAA. Đầu -NH₂ của chuỗi polypeptide bắt đầu bằng một peptide tín hiệu (signal peptide) dài 27 amino acid (màu xanh dương). Vị trí bắt đầu của đột biến mới phát hiện được ký hiệu màu đỏ. Các vị trí biến thể khác đã được công bố (tính đến năm 2020) được tô màu vàng và các cầu nối disulfide (disulfide bonds) được biểu thị bằng hình vuông màu xanh lục nhạt. Hình chữ nhật lớn màu cam minh hoạ cho màng tiêu thể. PTMs (post-translational modifications): vùng thực hiện các biến đổi sau dịch mã. Hình ảnh được vẽ bằng phần mềm Protter với các dữ liệu được tham khảo từ UniProt.



Hình 4. Sự phân bố domain và mô hình cấu trúc tổng thể của protein GAA. (A) Protein GAA bao gồm 952 amino acid. Tại mạng lưới nội chất, sau khi trải qua quá trình phân cắt 27 amino acid vùng peptide tín hiệu ở đầu -NH₂, protein GAA 110 kDa (đoạn 28 - 952) được vận chuyển đến thể Golgi để tiếp tục được phân cắt thành đoạn 57 - 952. Các lần phân cắt tiếp theo tại endosome và tiêu thể sẽ tạo thành enzyme GAA trưởng thành bao gồm 2 domain chính: domain P-type có chức năng liên kết với carbohydrate (carbohydrate-binding module, CBM) và domain Glycoside Hydrolase 31 có chức năng xúc tác quá trình thủy phân cấu nối glycoside. (B) Sự biến đổi hoàn toàn về cấu trúc không gian 3D của enzyme GAA khi đột biến xuất hiện ở trung tâm hoạt động cho thấy sự ảnh hưởng của đột biến đến chức năng xúc tác của enzyme. Các domain tương ứng ở Hình A và Hình B được chú thích cùng màu. Hình ảnh được vẽ bằng phần mềm PyMOL và DOG 2.0 với các dữ liệu được tham khảo từ Protein Data Bank và UniProt.

P10253	LYAG_HUMAN	481	WPGSTAFPDPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPPFDGMWIDMNEPSNFIR	ESSE	DGCPNNELEN	540
Q9MYM4	LYAG_BOVIN	468	WPGLTAFPDPFTNPTLDWQDMVTEFHAQVPPFDGMWIDMNEPSNFVR	SSV	DGCPDNSLEN	527
P70699	LYAG_MOUSE	481	WPGTTAFPDPFTNPTLDWQDMVSEFHAQVPPFDGMWLDMNEPSNFVR	SSQ	QGCPNNELEN	540
Q6P7A9	LYAG_RAT	481	WPGSTAFPDPFTNPTLDWQDMVSEFHAQVPPFDGMWIDMNEPSNFIR	SSQ	QGCPDNELEN	540
H2R287	H2R287_PANTR	481	WPGSTAFPDPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPPFDGMWLDMNEPSNFIR	ESSE	DGCPNNELEN	540

Hình 5. Sự bảo tồn tự nhiên của amino acid arginine (R) ở vị trí 527 của protein GAA. Một phần của các trình tự polypeptide khác nhau cho thấy arginine 527 trên protein GAA ở người được giữ nguyên khi đối chiếu với trình tự tương ứng của một số loài động vật có vú khác bao gồm bò, chuột nhỏ, chuột lớn và tinh tinh. Thông tin được tham khảo và trích xuất từ UniProt.

THẢO LUẬN

Ở người, gen GAA quy định sản xuất enzyme GAA (còn được gọi là acid α -glucosidase, α -1,4-glucosidase hay acid maltase) [12,13]. Enzyme GAA hoạt động trong lysosome (tiêu thể), là cấu trúc đóng vai trò trung tâm tái sinh của tế bào [14]. Lysosome sử dụng các enzyme tiêu hóa để phá vỡ các phân tử phức tạp thành các phân tử đơn giản ở dạng tế bào có thể sử dụng được. Trong đó, enzyme GAA xúc tác quá trình thủy phân đường glycogen phức tạp thành glucose thông qua việc phá vỡ các liên kết α -1,4- và α -1,6-glycoside [12 - 15]. Glucose là

nguồn năng lượng chính cho hầu hết các hoạt động của tế bào [15]. Sự thiếu hụt enzyme GAA sẽ gây tích tụ glycogen trong lysosome của nhiều loại tế bào thuộc các mô khác nhau. Trong đó, tế bào cơ tim, cơ xương, cơ trơn và thần kinh bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất. Tế bào sẽ dần bị mất chức năng do sự rối loạn các quá trình chuyển hoá nội bào [13].

Các nghiên cứu mới nhất cho thấy có mối liên hệ mật thiết giữa chức năng của enzyme GAA và bệnh lý Pompe, còn được gọi là bệnh thiếu hụt GAA, bệnh thiếu hụt acid maltase hay bệnh rối

loạn lưu trữ glycogen loại II (glycogen storage disease type II, GSDII) [12,13,16]. Bệnh Pompe được chia làm 2 loại biểu hiện bệnh lý: loại bẩm sinh điển hình, khởi phát sớm ở bệnh nhi dưới 1 tuổi, đi kèm với bệnh HCM và loại khởi phát muộn, khi các triệu chứng xuất hiện ở bệnh nhi tròn 1 tuổi hoặc muộn hơn, không đi kèm với bệnh HCM [17].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng kỹ thuật WES để xác định trình tự toàn bộ vùng mã hoá của bệnh nhân, từ đó phát hiện một đột biến lệch khung c.1579_1580del; p.(Arg527GlyfsTer3) thuộc exon thứ 11 của gen GAA. Đột biến làm mất một đoạn polypeptide lớn bao gồm 423 amino acid ở phía đuôi -COOH, là trình tự mã hoá của exon thứ 11 đến exon cuối cùng (exon 20). Đột biến xuất hiện ở vùng giữa domain Glycoside Hydrolase 31. Domain này có cấu tạo nếp gấp thùng TIM (triose-phosphate isomerase) với cấu trúc (β/α)₈ đặc trưng, rất bảo tồn của họ enzyme glycoside hydrolase 31 với chức năng xúc tác quá trình thủy phân cầu nối glycoside [18]. Ngoài ra, đầu mút -COOH có vai trò tạo các cấu trúc vòng (loop) và chứa thêm 2 domain nếp gấp β -sandwich. Do đó, đột biến p.(Arg527GlyfsTer3) đã gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cấu trúc của enzyme GAA, làm bất hoạt trung tâm hoạt động, cản trở sự liên kết của enzyme với cơ chất. Kết quả là đột biến đã làm cơ thể thiếu hụt enzyme GAA, gây bệnh Pompe và khởi phát bệnh HCM ở bệnh nhi.

Một số công trình nghiên cứu trên nhiều đối tượng bệnh nhi dưới 1 tuổi cho thấy đột biến lệch khung xuất hiện ở domain Glycoside Hydrolase 31 của protein GAA dẫn đến mất đoạn ở đuôi -COOH gây hậu quả rất nghiêm trọng [19,20]. Cụ thể, một bệnh nhi ở Đài Loan nhập viện lúc 3 tháng tuổi trong tình trạng khó thở, chậm phát triển vận động và gan phình to. Bệnh nhi được chẩn đoán phì đại hai thất, hở van hai lá, chỉ số CK 550 u/L và chỉ số phân suất tổng máu (thất trái) rất thấp:

ER = 30%. Bệnh nhi được xác định mang đột biến c.1411_1414delGAGA; p.Glu471fsX5 trên gen GAA và đã tử vong khi được hơn 1 tuổi [19]. Một bệnh nhi khác ở Thái Lan khởi phát bệnh lúc 3 tháng tuổi với các tình trạng khó thở, giảm trương lực cơ và chậm phát triển vận động. Thăm khám cận lâm sàng cho kết quả phì đại hai thất và biểu đồ điện tim ghi nhận khoảng PR ngắn. Quy trình giải trình tự cho kết quả bệnh nhi có đồng thời 2 đột biến trên gen GAA: một đột biến lệch khung c.1226insG; p.Asp409GlyfsX95 và một đột biến thêm nucleotide nhưng vẫn duy trì được khung đọc (in-frame deletion mutation) c.2024_2026delACA; (p.Asn675del). Bệnh nhi đã tử vong lúc 9 tháng tuổi vì mất nước trầm trọng do tiêu chảy [20]. Hoạt tính enzyme GAA trong các trường hợp này được xác định lần lượt là 0,05%, 0% và các bệnh nhi đều mang gen di truyền từ cha hoặc mẹ [19,20].

KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu này chứng minh đột biến mới được phát hiện trên gen GAA là nguyên nhân gây bệnh hiếm Pompe và khởi phát sớm HCM ở bệnh nhi. Bệnh Pompe có kiểu di truyền gen lặn. Trường hợp bệnh lý khởi phát sớm ở trẻ em dưới 1 tuổi sẽ gây tử vong trước khi trẻ bước sang tuổi thứ 2 nếu không được can thiệp kịp thời bằng liệu pháp thay thế enzyme hoặc liệu pháp gen [16,21]. Do đó, việc giải trình tự và sàng lọc phân tử ở bệnh nhân tim mạch và người khỏe mạnh là rất cần thiết, giúp cho việc tư vấn di truyền, phòng ngừa, phát hiện sớm, điều trị và chăm sóc nâng đỡ, cùng với việc tầm soát bệnh tim mạch được triệt để hơn.

Lời cảm ơn

* Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.01-2016.39.

ABSTRACT**Whole exome sequencing in an infant with hypertrophic cardiomyopathy identified a novel GAA gene mutation**

Background: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a disorder of the myocardium characterised by an increase in left ventricular wall thickness or hypertrophy of the entire heart muscle parts. In Vietnam, there are few studies conducted on HCM in children. Most of which focused only on clinical and subclinical presentations as well as epidemiology of the disorder. Genetic studies together with disease onset mechanism researches of HCM are compulsory in order to provide better disease preventions, diagnoses, therapeutic treatments as well as palliative carings, therefore.

Methods: A next generation sequencing (NGS) assay was developed in order to analyze a panel of 33 known HCM genes in a 6-month-old male infant.

Results: Whole exome sequencing (WES) validated a frameshift mutation on exon 11 of acid α -glucosidase (GAA) gene. The c.1579_1580del; p.(Arg527GlyfsTer3) mutation was identified to locate at the Glycoside Hydrolase 31 domain of GAA protein. This mutation results in deletion of a long C-terminal polypeptide chain of 423 amino acids, causes serious dysfunction for the catalytic activity of GAA enzyme, leading to Pompe disease with early-onset infantile HCM.

Conclusions: These genetic and disease onset mechanism results support clinical diagnoses, provide genetic counseling as well as better clinical managements of cardiomyopathy patients and families.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Konno T, Chang S, Seidman JG et al.** Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 2010; 25: 205 - 209.
2. **Tuohy CV, Kaul S, Song HK et al.** Hypertrophic cardiomyopathy: the future of treatment. *Eur J Heart Fail* 2020; 22: 228 - 240.
3. **Semsarian C, Ingles J, Maron MS et al.** New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65: 1249 - 1254.
4. **Akhtar M, Elliott P.** The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Glob Cardiol Sci Pract* 2018; 2018: 36.
5. **Chen L, Cai Y, Zhou G et al.** Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens. *PLoS One* 2014; 9: e88886.
6. **Ochoa JP, Lopes LR, Pérez-Barbeito M et al.** Deletions of specific exons of FHOD3 detected by next-generation-sequencing are associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2020; doi: 10.1111/cge.13759.
7. **Linthorst GE, Hollak CEM.** Whole exome sequencing and whole genome sequencing in undiagnosed disease: of value for certain patient populations. *Ned Tijdschr Geneesk* 2019; 16: D3711.
8. **Sun Y, Man J, Wan Y et al.** Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for Mendelian diseases: a cohort diagnostic study. *Sci Rep* 2018; 8: 11646.

9. **Barbitoff YA, Plev DE, Glotov AS et al.** Systematic dissection of biases in whole-exome and whole-genome sequencing reveals major determinants of coding sequence coverage. *Sci Rep* 2020; 10: 2057
10. **Choi M, Scholl UI, Ji W et al.** Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106, 19096 - 19101.
11. **Ng SB, Turner EH, Robertson PD et al.** Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; 461: 272 - 276.
12. **Dasouki M, Jawdat O, Almadhoun O et al.** Pompe disease: literature review and case series. *Neurol Clin* 2014; 32: 751 - 776.
13. **Lee DH, Qiu WJ, Lee J et al.** Hypertrophic cardiomyopathy in pompe disease is not limited to the classic infantile-onset phenotype. *JIMD Rep* 2014; 17: 71 - 75.
14. **van der Ploeg AT, Reuser AJ.** Pompe's disease. *Lancet* 2008; 372: 1342 - 1353.
15. **Fukuda T, Roberts A, Plotz PH et al.** Acid alpha-glucosidase deficiency (Pompe disease). *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007; 7: 71 - 77.
16. **Salabarria SM, Nair J, Clement N et al.** Advancements in AAV-mediated gene therapy for Pompe disease. *J Neuromuscul Dis* 2020; 7: 15 - 31.
17. **Kishnani PS, Steiner RD, Bali D et al.** Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2006; 8: 267 - 288.
18. **Rigden DJ, Jedrzejak MJ, de Mello LV.** Identification and analysis of catalytic TIM barrel domains in seven further glycoside hydrolase families. *FEBS Lett* 2003; 544: 103 - 111.
19. **Wan L, Lee CC, Hsu CM et al.** Identification of eight novel mutations of the acid alpha-glucosidase gene causing the infantile or juvenile form of glycogen storage disease type II. *J Neurol* 2008; 255: 831 - 838.
20. **Ngwiwara L, Wattanasirichaigoon D, Tim-Aroon T et al.** Clinical course, mutations and its functional characteristics of infantile-onset Pompe disease in Thailand. *BMC Med Genet* 2019; 20: 156.
21. **Ansong AK, Li JS, Nozik-Grayck E et al.** Electrocardiographic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Genet Med* 2006; 8: 297 - 301.