

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Ma Thị Huyền Thương

**NGHIÊN CỨU BIẾN THỂ DI TRUYỀN LIÊN QUAN ĐẾN
CÁC BỆNH LY THƯỢNG BÌ BÓNG NƯỚC, BẠCH TẠNG VÀ
THIỂU SẢN VÀNH TẠI BẢNG GIẢI TRÌNH TỰ HỆ GEN MÃ HÓA**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội - Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS. TS. Nguyễn Đăng Tôn, Viện Nghiên cứu hệ gen
2. Người hướng dẫn 2: PGS. TS. Nguyễn Hải Hà, Viện Nghiên cứu hệ gen

Phản biện 1: GS. TS. Nguyễn Văn Ba, Học viện Quân Y

Phản biện 2: GS. TS. Trần Huy Thịnh, Trường Đại học Y Hà Nội

Phản biện 3: PGS. TS. Đồng Văn Quyền, Viện Công nghệ sinh học

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Tại Việt Nam, cho đến nay, thông tin di truyền của ba bệnh ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai đều rất hạn chế. Phổ lâm sàng rộng, đôi khi chồng chéo giữa các phân nhóm trong mỗi bệnh khiến cho việc chẩn đoán chính xác trở nên khó khăn hơn, thậm chí là không phân loại được trong một số trường hợp phức tạp. Do đó các xét nghiệm di truyền là cần thiết, giúp phân loại chính xác các nhóm/phân nhóm bệnh. Bên cạnh đó, mặc dù các gen ứng viên tiềm năng cho bệnh thiếu sản vành tai đã được báo cáo, tuy nhiên, chưa có biến thể gen nào được chứng minh là nguyên nhân gây ra bệnh này. Do đó, cần tiếp tục các nghiên cứu sâu hơn về đa hình di truyền của các gen gây bệnh cũng như các cơ chế gây nên ba bệnh nói trên.

Các kết quả thu được trong nghiên cứu này sẽ là nền tảng bước đầu giúp xây dựng bộ dữ liệu về các biến thể di truyền ở nhóm người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai ở Việt Nam. Đồng thời, đây cũng là cơ sở khoa học hỗ trợ các bác sĩ/nhà di truyền học trong công tác tư vấn di truyền cũng như phát triển các nghiên cứu lâm sàng xa hơn hướng tới mục tiêu chữa trị các căn bệnh nói trên hay tiên lượng bệnh trong tương lai.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

- Giải trình tự và phân tích trình tự hệ gen mã hóa trên các đối tượng người bệnh Việt Nam mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai.

- Xác định các biến thể nguyên nhân/nguy cơ, các gen tiềm năng có thể liên quan đến các cơ chế tiềm ẩn dẫn đến ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiếu sản vành tai.

3. Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

1. Khai thác thông tin lâm sàng, thu thập mẫu máu và tách chiết DNA tổng số của người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng, thiếu sản vành tai cùng các thành viên trong gia đình (nếu có).

2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa các mẫu người bệnh.

3. Phân tích dữ liệu thu được và so sánh với các cơ sở dữ liệu đã công bố để xác định các biến thể gen liên quan/gây bệnh tiềm năng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Bệnh ly thượng bì bóng nước

Ly thượng bì bóng nước (Epidermolysis Bullosa - EB) là một nhóm rối loạn di truyền về da hiếm gặp được xác định bởi độ tổn thương trên da ở mức vừa phải cho đến tổn thương nghiêm trọng trên các biểu mô và hình thành các vết phỏng rộp. Tỷ lệ mắc EB được báo cáo là khoảng 11,1/1 triệu dân và 19,6/1 triệu ca sinh, đồng thời không có sự khác biệt giữa hai nhóm giới tính cũng như giữa các nhóm dân tộc. Biểu hiện lâm sàng ở người bệnh mắc EB có thể từ nhẹ đến nặng, rất nặng hoặc có thể dẫn đến tử vong. Cho đến nay, chưa có cách chữa trị đặc hiệu cho bệnh này, các phương pháp điều trị chỉ tập trung vào điều trị triệu chứng, chủ yếu là chăm sóc vết thương, kiểm soát nhiễm trùng, hỗ trợ dinh dưỡng, phòng ngừa và điều trị các biến chứng.

Trong ba thập kỷ qua, một nhóm đồng thuận quốc tế đã tiến hành tổng cộng 5 cuộc họp, hội bàn để sửa đổi và cập nhật các phân nhóm của EB dựa trên đặc điểm kiểu hình đặc trưng và các thông tin di truyền liên quan. Bốn phân nhóm chính của EB bao gồm: ly thượng bì bóng nước đơn giản - Epidermolysis bullosa simplex (EBS), ly thượng bì bóng nước liên kết - Junctional epidermolysis bullosa (JBS), ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng - Dystrophic bullermolysis bullosa (DEB) và hội chứng Kindler. Các loại EB khác nhau được đặc trưng bởi trạng thái hình thành các nốt phỏng rộp ở các lớp nhất định của da.

Cho đến nay, biến thể trên ít nhất 21 gen đã được mô tả là nguyên nhân dẫn đến EB, các gen này tham gia mã hóa cho các thành phần của keratin, các protein tiếp xúc bám dính và cấu trúc cầu nối bám (desmosomes). Về mặt cấu trúc, sự suy yếu ở mức độ phân tử dẫn đến sai cấu trúc và chức năng của protein kết dính trong biểu bì hoặc protein neo giữ giữa hạ bì-biểu bì, do đó làm mất kết nối giữa các tế bào và mô.

1.2. Bệnh bạch tạng

Bạch tạng được mô tả là một bệnh di truyền hiếm gặp (tỷ lệ mắc bệnh trong quần thể ước tính là 1/17.000 đến 1/20.000), đặc trưng bởi sự giảm sắc tố ở da, tóc và/hoặc mắt, đồng thời có ảnh hưởng liên quan đến võng mạc và có thể làm thay đổi thị lực của mắt. Những bất thường quan trọng ở

mắt ở các bệnh nhân bạch tạng ngoài chứng tăng sắc tố được biểu thị một cách rõ ràng thì còn có thể bao gồm các ảnh hưởng như thiếu sản hoàng điểm, giảm sắc tố của tế bào biểu mô sắc tố võng mạc, giảm tế bào hình que cảm thụ ánh sáng, hoạt động sai dây thần kinh ở vùng giao thoa thị giác, giảm sắc tố ở móng mắt, có biểu hiện của chứng sợ ánh sáng và rung giật nhãn cầu.

Có hai loại bạch tạng chính là bạch tạng da và mắt (oculocutaneous albinism – OCA) và bạch tạng mắt (ocular albinism – OA), được phân loại dựa trên kiểu hình lâm sàng, liên quan đến suy giảm sắc tố ở da, tóc và mắt (OCA), hoặc chỉ ở mắt (OA). Ngoài 2 phân nhóm chính là OCA và OA thì còn có hai hội chứng hiếm gặp của bạch tạng cũng đã được mô tả là hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) và hội chứng Chediak-Higashi (CHS).

Về mặt di truyền bệnh, bạch tạng được phân loại tùy theo các biến thể gen phát hiện ở các gen gây bệnh khác nhau. Tổng số 20 gen dẫn đến bạch tạng đã được báo cáo, trong đó 19 gen liên quan đến các trường hợp OCA và một gen nằm trên nhiễm sắc thể X liên quan đến OA.

Cũng giống như đa số các bệnh di truyền hiếm gặp khác, hiện chưa có cách chữa khỏi bạch tạng hoàn toàn, việc điều trị hiện nay là điều trị triệu chứng, ngăn ngừa tác hại của ánh nắng mặt trời đến da và tóc của bệnh nhân, đồng thời thăm khám nhãn khoa định kỳ.

1.3. Bệnh thiếu sản vành tai

Thiếu sản vành tai là một dị tật bẩm sinh của tai ngoài, hình thành trong quá trình phát triển phôi thai không đúng cách, được nhận biết bởi hình dạng tai nhỏ và bất thường (auricle-pinna). Tỷ lệ ước tính mắc thiếu sản vành tai rất khác nhau giữa các quốc gia, khu vực và dao động từ 0,8 đến 17,4 trên 10000 ca sinh. Triệu chứng đi kèm thường là ống tai hẹp, bị bịt hoặc là không có ống tai. Trường hợp nghiêm trọng nhất với vành tai hoàn toàn không phát triển được gọi là anotia. Thiếu sản vành tai có thể xảy ra ở một hoặc cả hai bên tai, tuy nhiên trường hợp dị tật một bên là phổ biến hơn cả, chiếm 79-93% các cá nhân bị ảnh hưởng. Trong số các trường hợp bị thiếu sản vành tai một bên thì trường hợp dị tật ở tai phải chiếm đến 60% trong tổng số các trường hợp phát hiện.

Thiểu sản vành tai có thể xảy ra như một dị tật bẩm sinh độc lập hoặc là một phần biểu hiện trong một tập hợp nhiều dị tật hoặc một hội chứng nào đó có liên quan đến sự bất thường từ cung mang thứ nhất và cung mang thứ hai trong quá trình phát triển phôi. Bất kỳ tác động nào dẫn đến các bất thường trong quá trình phát triển của tai trong giai đoạn phát triển phôi có thể là nguy cơ dẫn đến thiểu sản vành tai. Các tác động này có thể là các tác nhân trong môi trường hoặc cũng có thể liên quan đến yếu tố di truyền.

Vì thiểu sản vành tai được xác định khi không có ống tai ngoài, trẻ bị thiểu sản vành tai có thể bị mất thính lực một phần hoặc toàn bộ ở tai bị ảnh hưởng, do đó ảnh hưởng đến chất lượng cuộc sống. Nếu những đứa trẻ mắc bệnh ở cả hai tai, chúng có thể gặp khó khăn khi học nói và mặc cảm về tình trạng của mình khi chúng lớn lên. Do đó, mục tiêu điều trị thiểu sản vành tai hiện nay là tạo hình dạng tốt nhất cũng như cải thiện chức năng của tai kém phát triển.

1.4. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam số trường hợp được chẩn đoán mắc thiểu sản vành tai là 20-30 ca mỗi năm trong khi số bệnh nhân ly thượng bì bóng nước và bạch tạng vẫn chưa được thống kê. Cho đến thời điểm năm 2018, chưa có một nghiên cứu di truyền chuyên sâu nào được tiến hành trên các đối tượng mắc ly thượng bì bóng nước, bạch tạng và thiểu sản vành tai ở Việt Nam. Các nghiên cứu chủ yếu báo cáo về các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và biến chứng của bệnh, cụ thể là ở các bệnh nhi mắc ly thượng bì bóng nước được thăm khám và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương và Bệnh viện Da liễu Trung ương trong giai đoạn 2007-2011.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tám người bệnh ly thượng bì bóng nước, bảy người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiểu sản vành tai được thăm khám, chẩn đoán và kết luận bởi các bác sĩ tại Đại học Y Hà Nội và Học viện Quân y. Mẫu máu ngoại vi của người bệnh cùng các thành viên gia đình (ngoại trừ thành viên gia đình bệnh nhân bạch tạng lớn tuổi A1005) được tiến hành thu thập để phục vụ nghiên cứu. Riêng nhóm thiểu sản vành tai không thu được mẫu thành viên gia đình.

Tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ người bệnh

Tiêu chuẩn lựa chọn căn cứ dựa trên các tiêu chuẩn lâm sàng cùng với sự đồng ý tham gia nghiên cứu của người bệnh và gia đình người bệnh.

Tiêu chuẩn loại trừ căn cứ khi không đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ các bệnh/rối loạn có đặc điểm lâm sàng gần như tương tự dựa theo hướng dẫn cụ thể.

2.2. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được thông qua bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam theo Quyết định số 2-2019/NCHG-HĐĐĐ ngày 02 tháng 04 năm 2019. Bên cạnh đó, trước khi tiến hành thu mẫu máu, mục đích nghiên cứu đã được giải thích rõ ràng và các thành viên gia đình cũng đã xác nhận vào đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu.

2.3. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ 09/2019 đến 09/2022 tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam.

2.4. Hóa chất, trang thiết bị và dụng cụ

Các hóa chất, máy móc và thiết bị phục vụ cho nghiên cứu này thuộc Viện nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Chuẩn bị DNA tổng số

Mẫu máu ngoại vi (2 ml mỗi cá thể) được thu vào ống chứa máu EDTA K2 và lưu giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Các mẫu sau khi tiếp nhận đã được mã hóa sau đó tách chiết DNA tổng số sử dụng bộ *ExgeneTM Blood SV mini-Kit* (GeneAll-Hàn Quốc) tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA tổng số tách từ mẫu máu được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% và đo nồng độ DNA mạch đôi (dsDNA) sử dụng *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies-Mỹ).

2.5.2. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa

Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa (WES) được thực hiện trên 8 người bệnh ly thượng bì bóng nước (ngoại trừ EB008.E), 7 người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiếu sản vành tai. Thư viện DNA được thiết lập sử dụng bộ *Sure Select V6-Post* (Agilent Technologies, Mỹ), sau đó được giải trình tự trên hệ thống của Illumina.

2.5.3. Phân tích dữ liệu giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa

Quá trình xác định biến thể được thực hiện sử dụng bộ công cụ BWA.v0.7.12 để sắp xếp và so sánh các đoạn đọc với trình tự tham chiếu hg19/GRCh37. Công cụ Picard và tập hợp các công cụ phân tích hệ gen (GATK) được sử dụng lần lượt để đánh dấu các đoạn lặp và phát hiện các biến đổi đơn nucleotide (SNVs), các thêm/mất đoạn ngắn (Indels). Sau cùng, các biến thể được lọc qua các cơ sở dữ liệu bao gồm 1000G, dbSNP và gnomAD. Tất cả các biến thể có tần số lớn hơn 5% sẽ được loại bỏ. Chương trình ANNOVAR được sử dụng để chú giải các biến thể. Human Splicing Finder và phần mềm Alamut Visual được sử dụng để đánh giá khả năng làm thay đổi mô hình cắt nối mRNA thông thường của những biến thể splicing mới.

2.5.4. Giải trình tự Sanger

Các biến thể ứng viên được chỉ ra sau phân tích WES tiếp tục được đánh giá lại bằng giải trình tự Sanger. Các vùng trình tự mang các biến thể này được PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu với kích thước dao động từ 247 bp đến 485 bp, sau đó sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự sử dụng bộ *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Mỹ) tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.5. Phân tích ảnh hưởng ghép nối của biến thể splicing

Mẫu máu ngoại vi (2 ml mỗi cá thể) của 2 anh em người bệnh EB004, EB005 cùng bố mẹ được thu mới vào ống chứa máu EDTA K2 và lưu giữ ở 4°C trong ngày. Các mẫu sau khi tiếp nhận đã được mã hóa, tách chiết RNA tổng số sử dụng *Monarch® Total RNA Miniprep Kit* (New England Biolab, Mỹ) tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đó, quá trình tổng hợp cDNA được thực hiện nhờ sử dụng bộ *ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit* (New England Biolab, Mỹ). Phản ứng PCR phiên mã

ngược (RT-PCR) được thực hiện và điện di kiểm tra kết quả trên gel agarose 3%.

2.5.6. Khuếch đại đa đầu dò phụ thuộc phản ứng ghép nối (MLPA)

Sự thay đổi về số lượng bản sao của gen *COL7A1* ở trường hợp EB008 và EB008.E được xác định bởi bộ kit thương mại SALSA MLPA P415 COL7A1, KRT5 probemix (MRC-Holland, Amsterdam, Hà Lan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.7. Phân tích mạng lưới tương tác protein-protein

Trong thiếu sản vành tai, mạng lưới tương tác chức năng giữa các protein được dự đoán dựa trên liên kết giữa các gen mã hóa chúng sử dụng công cụ STRING (<http://string-db.org/>).

2.5.8. Phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG

Để xác định các biến thể, các gen ứng viên có tiềm năng là yếu tố nguy cơ liên quan đến thiếu sản vành tai hay không, phân tích làm giàu tập hợp gen (Enrichment analysis) sử dụng KEGG (Bách khoa toàn thư về gen và hệ gen của Kyoto) được thực hiện.

2.5.9. Phân loại khả năng gây bệnh của biến thể theo Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ

Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền Y học Hoa Kỳ (ACMG) đưa ra hướng dẫn phân loại biến thể với 5 cấp độ (hệ thống 5 bậc), bao gồm: gây bệnh, có khả năng gây bệnh, không chắc chắn, có khả năng lành tính và lành tính. Có hai bộ tiêu chí được đưa ra, một bộ để phân loại các biến thể gây bệnh hoặc có khả năng gây bệnh và một bộ để phân loại các biến thể lành tính hoặc có khả năng lành tính.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm lâm sàng ở người bệnh

3.1.1. Ly thượng bì bóng nước

Người bệnh (EB001-EB008 và EB008.E) được chẩn đoán mắc ly thượng bì bóng nước dựa trên thăm khám lâm sàng, biểu hiện với các tổn thương trên da bao gồm các vết phỏng rộp và hình thành sẹo. Người bệnh chủ yếu là nam (7/9 người bệnh, bao gồm cả EB008.E) và là bệnh nhi cùng

trẻ chưa thành niên (8/9 người bệnh). Trong đó, ba người bệnh gồm EB002 và anh em EB004, EB005 là những trường hợp bệnh nặng, với các bóng nước lan rộng, có biểu hiện của co rút ngón và không có móng. Người bệnh EB007 cũng có kiểu hình nặng khi mới sinh, tuy nhiên biểu hiện bệnh của trẻ được cải thiện theo thời gian khi trẻ lớn lên.

3.1.2. Bạch tạng

Những người bệnh được chẩn đoán mắc bạch tạng trong nghiên cứu này đều có các biểu hiện của suy giảm sắc tố trên da, tóc và mắt. Các ảnh hưởng thị lực liên quan đến khả năng nhìn sâu và các tật khúc xạ được quan sát thấy ở 6/7 người bệnh (trừ người bệnh A1006); rung giật nhãn cầu được xác định ở 5/7 người bệnh (A1001-A1005); trong khi đó biểu hiện thiếu sản hoàng điểm chỉ xuất hiện ở 2/7 người bệnh là hai anh em A1001 và A1002. Duy nhất người bệnh A1004 (em gái người bệnh A1003) có biểu hiện của lác và vết bầm máu ở mắt.

3.1.3. Thiếu sản vành tai

Các người bệnh được chẩn đoán thiếu sản vành tai trong nghiên cứu này bao gồm 6 nam (Mi001, Mi002, Mi004, Mi005, Mi007 và Mi011) và 5 nữ (Mi003, Mi006, Mi008, Mi009 và Mi010). Những người bệnh này đều được chẩn đoán với tối thiểu một bên tai bị dị tật và toàn bộ đều phát hiện dị tật tai phải. Trong số 11 người bệnh thì có 3 người bị dị tật ở cả hai tai là 2 người bệnh nam Mi002, Mi004 và 1 người bệnh nữ Mi009. Ngoài ra, 3 người bệnh gồm Mi002, Mi009 và Mi011 có biểu hiện của các dị tật khác ngoài các đặc điểm bất thường ở tai.

3.2. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của người bệnh cùng các thành viên gia đình sau khi tách chiết từ máu ngoại vi được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 0,8% và đo OD ở bước sóng 260 nm và 280 nm kiểm tra độ tinh sạch. Nồng độ DNA tổng số của các mẫu nghiên cứu thu được nằm trong khoảng từ 19,2 đến 86,6 ng/ μ l, có độ tinh sạch cao ($A_{260}/A_{280} > 1,80$), đảm bảo yêu cầu về chất lượng cho các bước sàng lọc gen tiếp theo.

3.3. Dữ liệu thô toàn bộ hệ gen mã hóa của người bệnh

Kết quả dữ liệu giải trình tự thô cho thấy hàng tỷ base đã được đọc trên mỗi mẫu, với số lượng trung bình vào khoảng hơn 7 tỷ base/ mẫu và số đoạn

đọc trung bình tới hơn 48 triệu read. Độ chính xác của từng nucleotide được đánh giá bằng điểm chất lượng Phred với số Q càng cao biểu thị độ chính xác càng cao (ví dụ Q20 tương đương với khả năng xảy ra lỗi nhỏ hơn 1/100, Q30 tương đương với khả năng xảy ra lỗi nhỏ hơn 1/1000). Kết quả đọc dữ liệu thô của các mẫu bệnh nhân cho thấy độ chính xác của phép đọc rất cao với Q30 trung bình là 94,34% (từ 93,19% - 95,63%), còn Q20 trung bình là 98,03% trong dải từ 97,53% đến 98,56%. Kết quả này đảm bảo dữ liệu đáp ứng đủ chất lượng và độ tin cậy để tiến hành các phân tích tiếp theo.

3.4. Các biến thể liên quan đến bệnh

3.4.1. Ly thượng bì bóng nước

3.4.1.1. Dự đoán chức năng *in silico* của các biến thể mới

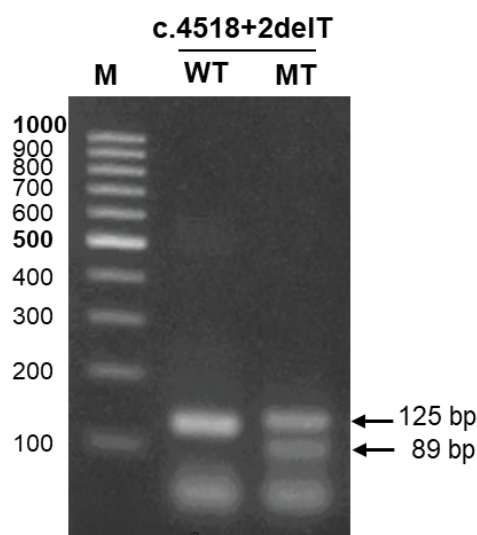
Với mục đích đánh giá khả năng ảnh hưởng của biến thể sai nghĩa mới *COL7A1* c.8279G>A, 3 công cụ online bao gồm SIFT, Polyphen-2 và Mutation Taster được sử dụng để dự đoán chức năng của protein được mã hóa. Cả 3 công cụ này đều chỉ ra sự kiện thay thế glycine bằng axit glutamic tại vị trí 2760 (p.G2760E) trên chuỗi polypeptide có khả năng gây hại đến phân tử protein được mã hóa.

Đối với các biến thể mới nằm trong intron của gen *COL7A1*, sử dụng công cụ Human Splicing Finder (HSF) và phần mềm Alamut Visual để đánh giá khả năng ảnh hưởng đến mô hình cắt nối tự nhiên của mRNA *COL7A1*. Kết quả cho thấy cả 2 công cụ đều chỉ ra ảnh hưởng của biến thể c.5821-2A>G đến mô hình cắt nối tự nhiên của mRNA của gen *COL7A1* với dự đoán xoá hoàn toàn exon 71 trên phân tử protein được mã hoá. Riêng biến đổi c.4581+2delT, có sự đối lập về dự đoán ảnh hưởng của biến thể đến mô hình cắt nối giữa 2 công cụ, HSF cho rằng c.4581+2delT không ảnh hưởng, trong khi Alamut Visual dự đoán có ảnh hưởng và có thể dẫn đến xoá hoàn toàn exon 43 trên phân tử protein được mã hoá.

3.4.1.2. Phân tích chức năng liên quan đến biến thể splicing *COL7A1* c.4581+2delT

Phản ứng RT-PCR được thực hiện để khuếch đại vùng trình tự mã hoá mang biến thể *COL7A1* c.4581+2delT kéo dài từ exon 42 đến hết exon 44 ở gia đình có 2 con cùng mắc EB (EB004 và EB005). Tiếp đó, phản ứng Nested-PCR được thực hiện để khuếch đại một lần nữa vùng trình tự này,

kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 3% cho thấy một băng sản phẩm duy nhất có kích thước 125 bp ở mẫu bố với kiểu gen đại (wt) và thêm một băng sản phẩm thứ 2 với kích thước 89 bp ngoài băng 125 bp ở mẫu người bệnh mang biến thể dị hợp tử c.4581+2delT (Hình 3.5). Kết quả này cho thấy, có một alen đã bị mất một vùng trình tự mã hoá có kích thước 36 bp, tương ứng với kích thước của exon 43 trên gen *COL7A1*. Như vậy, với sự hiện diện của biến thể c.4581+2delT, exon 43 có thể đã bị bỏ qua hoàn toàn trong quá trình phiên mã, kết quả này tương đồng với dự đoán *in silico* sử dụng phần mềm Alamut Visual trước đó.



Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR trên gel agarose 3%, marker (M) 1 Kbplus

Dải băng lớn hơn có kích thước 125 bp biểu thị bản sao kiểu đại (WT), dải băng nhỏ hơn với kích thước 89 bp biểu thị bản sao đột biến (MT), các dải băng phía dưới cùng của bản gel là các môi dư.

3.4.1.2. Các trường hợp DEB mang biến thể gen *COL7A1*

Người bệnh EB001

Phân tích kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa của người bệnh EB001, phát hiện biến thể đồng hợp tử *COL7A1* c.8279G>A, làm thay đổi axit amin tại vị trí 2760, trong đó glycine được thay thế bằng axit glutamic (p.G2760E). Đây là một biến thể mới, chưa được tìm thấy trên bất cứ cơ sở dữ liệu hay công bố nào trước đó. Ngoài ra, biến thể này cũng được tìm thấy ở cả bố và mẹ của bệnh nhân ở trạng thái dị hợp tử khi tiến hành giải trình tự Sanger. Dựa theo hướng dẫn phân loại biến thể của ACMG, biến thể *COL7A1* c.8279G>A được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” với 4 minh chứng gồm PM2, PM3 và PP1, PP3 - PP5.

Người bệnh EB002

Sự kết hợp của hai biến thể dị hợp tử làm dịch khung đọc của gen *COL7A1* (c.2858_2859delAG và c.6081delC) được tìm thấy ở người bệnh EB002. Cả hai biến thể này đều là những biến thể đã biết làm xuất hiện mã kết thúc sớm trên trình tự axit amin lần lượt tại hai vị trí p.E953fs*8 và p.P2029fs*177, trong đó biến thể c.6081delC (p.P2029fs*177) đã được báo cáo là biến thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000418654). Sự tương đồng kết quả được chỉ ra khi kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger, đồng thời cho thấy hai biến thể này lần lượt được di truyền từ bố (c.2858_2859delAG) và mẹ (c.6081delC) của người bệnh. Biến thể c.2858_2859delAG (p.E953fs*8) được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” dựa theo tiêu chí phân loại của ACMG với một minh chứng rất mạnh (PVS1), hai minh chứng trung bình (PM3, PM4) và hai minh chứng định hướng (PP1 và PP4).

Người bệnh EB003 và hai anh em người bệnh EB004, EB005

Sự kết hợp hai biến thể dị hợp tử, bao gồm 1 biến thể vô nghĩa tạo mã kết thúc và một biến thể dạng khác được tìm thấy ở người bệnh EB003 và hai anh em bệnh nhân EB004 và EB005. Người bệnh EB003 mang hai biến thể đã biết c.6205C>T (rs121912855) và c.8233C>T (rs768202310), trong đó biến thể c.6205C>T (p.R2069C) được báo cáo là gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000017463). Bên cạnh đó, mỗi biến thể cũng lần lượt được tìm thấy ở trạng thái dị hợp tử khi tiến hành giải trình tự mẫu mẹ (c.6205C>T) và bố (c.8233C>T) của bệnh nhân.

Hai người bệnh EB004 và EB005 là hai anh em trai, cùng mang hai biến thể dị hợp tử c.4518+2delT trên intron 43 và c.5047C>T trên exon 54 gen *COL7A1*. Kết quả giải trình tự Sanger chỉ ra cả 2 anh em cùng nhận 2 biến thể c.4518+2delT và c.5047C>T lần lượt từ mẹ và bố. Trong đó, biến thể ảnh hưởng đến mô hình cắt nối thông thường c.4518+2delT là biến thể mới, chưa được công bố trên bất kỳ cơ sở dữ liệu nào trước đó. Căn cứ theo hướng dẫn phân loại biến thể của ACMG, biến thể này được xếp vào nhóm biến thể “gây bệnh” bao gồm các minh chứng PVS1, PM2, PP1, PP3 và PP4. Biến thể c.5047C>T là một biến thể vô nghĩa gây bệnh đã biết (rs587780490, VCV000130673), tạo mã kết thúc tại vị trí codon 1683 tương ứng trên trình tự axit amin (p.R1683*).

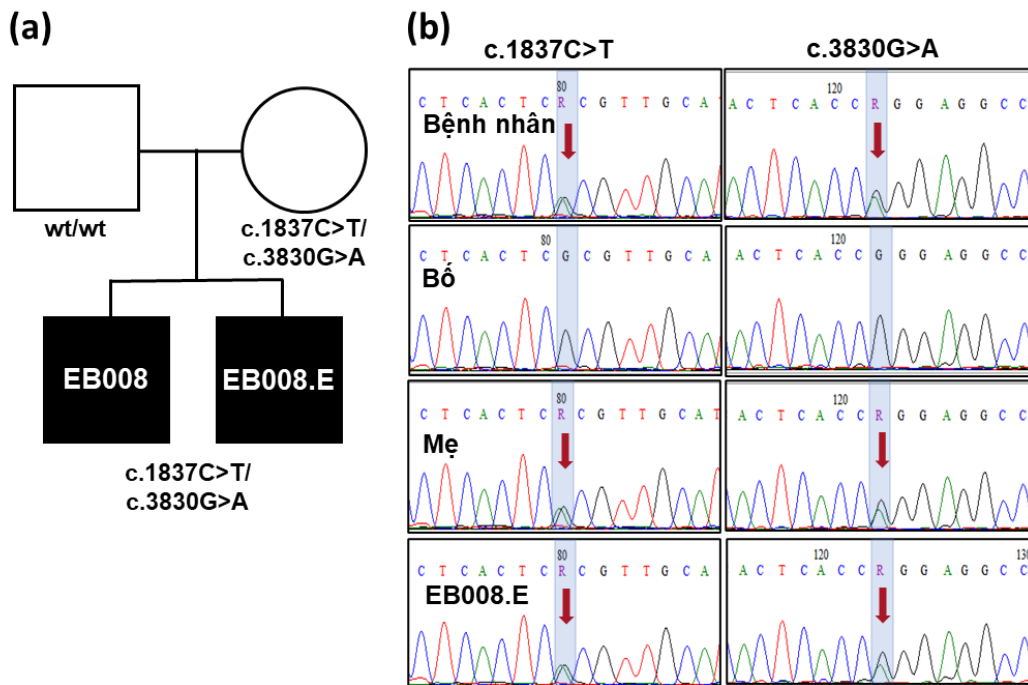
Người bệnh EB006

Sự kết hợp của hai biến thể dị hợp tử bao gồm một biến thể ảnh hưởng đến mô hình cắt nối thông thường (c.5821-2A>G) và một biến thể sai nghĩa (c.6205C>T) được tìm thấy ở người bệnh EB006. Kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger cho thấy biến thể c.5821-2A>G được di truyền từ bố và biến thể c.6205C>T được di truyền từ mẹ. Biến thể c.5821-2A>G là một biến thể mới trong khi biến thể c.6205C>T là biến thể gây bệnh đã biết (rs121912855, VCV000017463) đồng thời cũng là biến thể được tìm thấy ở trường hợp EB003. Dựa theo tiêu chí phân loại biến thể của ACMG, biến thể *COL7A1* c.5821-2A>G được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “*có khả năng gây bệnh*” với một minh chứng mạnh (PM2) và ba minh chứng định hướng (PP1, PP3 và PP4) được xác định.

Người bệnh EB008

Người bệnh EB008 và em trai (EB008.E) đều được chẩn đoán mắc ly thượng bì bóng nước. Kết quả phân tích WES mẫu EB008 đưa ra 2 biến thể dị hợp tử ứng viên nằm trên gen *COL7A1* là c.1837C>T (p.R613*) và c.3830G>A (p.P1277L) có thể là nguyên nhân dẫn đến bệnh. Cả hai biến thể này đều là những biến thể đã biết (rs759634066 và rs35761247), trong đó c.3830G>A (p.P1277L) là một biến thể lành tính, đã được báo cáo trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000255109.16). Giải trình tự Sanger chỉ ra cả hai biến thể này đều được tìm thấy ở hai anh em (biểu hiện bệnh) và người mẹ (không biểu hiện bệnh) ở trạng thái dị hợp tử, trong khi người bố không mang biến thể nào (Hình 3.11). Như vậy, chưa kết luận được đây là hai biến thể nguy cơ do không chỉ ra được mô hình di truyền phù hợp (di truyền lặn nhiễm sắc thể thường).

Với mong muốn tìm ra căn nguyên di truyền trong gia đình bệnh nhân, phân tích MLPA được thực hiện trên hai mẫu người con (EB008 và EB008.E) để xác định các mất đoạn lớn gen *COL7A1* mà WES không phát hiện được do hạn chế trong phân tích CNV. Tuy nhiên, kết quả MLPA cho thấy không phát hiện được bất thường nào về số lượng bản sao ở hai anh em bệnh nhân EB008 và EB008.E. Dựa theo tiêu chí phân loại biến thể của ACMG, biến thể *COL7A1* c.1837C>T (p.R613*) được đề xuất xếp vào nhóm biến thể “*không chắc chắn*” về khả năng gây bệnh với minh chứng PVS1 được xác định.



Hình 3.11. Hai biến thể độc lập *COL7A1* c.1837C>T và c.3830G>A được tìm thấy ở gia đình người bệnh EB008

(a) Sơ đồ phả hệ gia đình người bệnh EB008, hình vuông/tròn biểu thị nam/nữ, màu đen/trắng biểu thị người bệnh/người khỏe mạnh. (b) Kết quả giải trình tự Sanger ở mẫu anh em người bệnh và bố mẹ. Vị trí biến đổi được đánh dấu bằng mũi tên màu đỏ.

3.4.1.2. Trường hợp EBS mang biến thể gen *KRT5*

Biến thể duy nhất nằm trên gen *KRT5* là biến thể dị hợp tử c.1429G>A (p.E477K) được tìm thấy ở người bệnh EB007 (3 tuổi). Đây là biến thể đã biết (rs59190510) và được báo cáo là biến thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar (VCV000021174.4). Kết quả giải trình tự Sanger chỉ ra đây là biến thể phát sinh mới (*de novo*) ở người bệnh và không tìm thấy ở cả bố và mẹ.

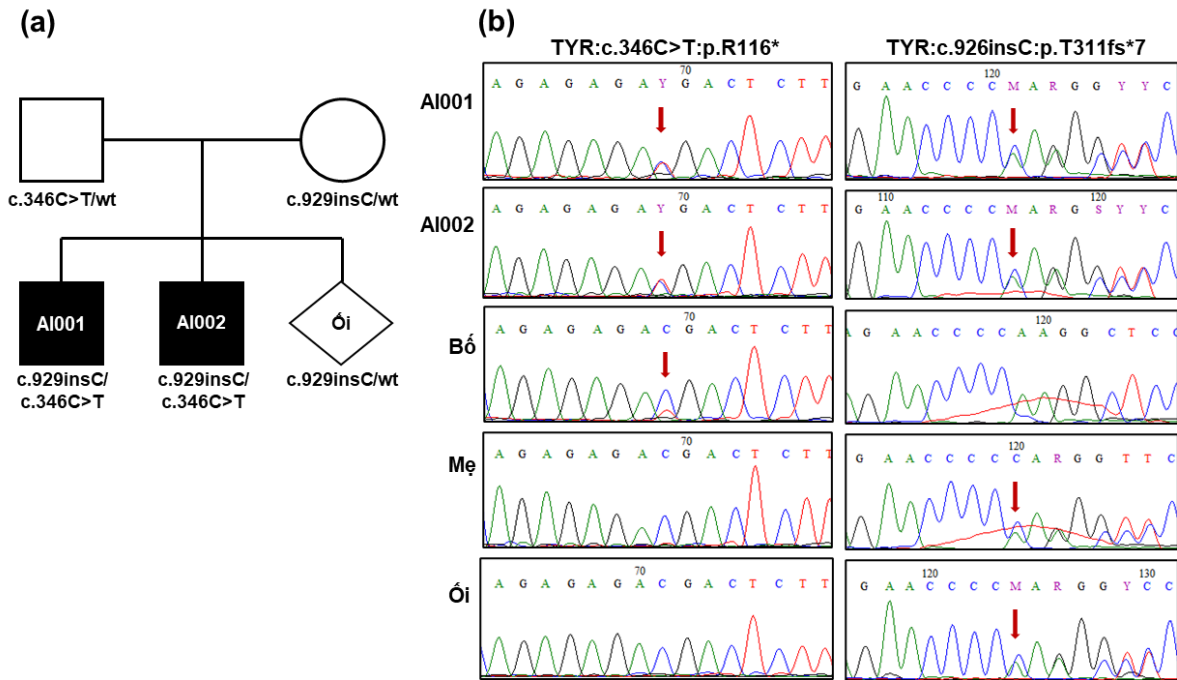
3.4.2. Bạch tạng

3.4.2.1. Các trường hợp bạch tạng da và mắt mang biến thể gen *TYR*

Người bệnh A1001 và A1002

Người bệnh A1001 (7 tuổi) và A1002 (5 tuổi) là hai anh em trai trong cùng một gia đình, phân tích kết quả WES cho thấy cả 2 anh em đều mang 2 biến thể dị hợp tử lần lượt nằm trên exon 1 (c.346C>T, p.R116*) và exon 2 (c.926insC, p.R311fs*7) gen *TYR* (NM_000372.3). Cả 2 biến thể này đều là những biến thể tạo mã kết thúc sớm (PTCs) và được báo cáo là gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar, có liên quan đến thể bạch tạng da và mắt nhóm

1 (OCA1). Kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger chỉ ra sự tương đồng với kết quả WES, trong đó biến thể c.346C>T được di truyền từ bố và biến thể c.926insC được di truyền từ mẹ. Ngoài ra, sàng lọc trước sinh 2 biến thể trên sử dụng giải trình tự Sanger trên mẫu dịch ối (mang thai lần 3) phát hiện biến thể dị hợp tử c.926insC (Hình 3.14). Cũng giống như bố mẹ, em bé sinh ra không có bất kỳ biểu hiện nào của bạch tạng và hiện tại vẫn đang phát triển khỏe mạnh.



Hình 3.14. Dị hợp tử phức *TYR* c.346C>T và c.926insC được phát hiện ở gia đình người bệnh AI001 và AI002

(a) Sơ đồ phả hệ của gia đình người bệnh AI001 và AI002. (b) Giải trình tự Sanger chỉ ra hai biến thể *TYR* dị hợp tử ở mẫu bệnh nhân, lần lượt được di truyền từ bố (c.346C>T) và mẹ (c.926insC), biến thể dị hợp tử c.346C>T được tìm thấy ở mẫu dịch ối. Các thay đổi được đánh dấu bởi mũi tên màu đỏ.

Người bệnh AI003 và AI004

Người bệnh AI003 (25 tuổi) và AI004 (23 tuổi) là hai con đầu trong một gia đình có ba người con, được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt với các biểu hiện lâm sàng đặc trưng liên quan đến màu da, màu tóc và màu mắt và suy giảm thị lực. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể sai nghĩa đồng hợp tử *TYR* c.115T>C (p.W39R). Đây là một biến thể đã biết và được báo cáo trên cơ sở dữ liệu đột biến HGMD với mã số CM100987, có liên quan đến thể bạch tạng da và mắt nhóm 1B (OCA1B). Giải trình tự Sanger chỉ ra biến thể c.115C>T được di truyền đồng thời từ bố và mẹ của

người bệnh. Ngoài ra, giải trình tự trực tiếp cũng chỉ ra người em trai út trong gia đình không mang biến thể này và không có biểu hiện bất thường nào trên kiểu hình.

Người bệnh A1005

Người bệnh A1005 là nam, 63 tuổi, được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể gen *TYR* c.559_560insCATTATTATGTGTCAAATTATCCCC (c.559_560ins25) ở trạng thái đồng hợp tử, làm xuất hiện sớm mã bộ ba kết thúc trên trình tự chuỗi polypeptide (p.G190Cfs*12). Đây là biến thể hiếm đã biết liên quan đến nhóm OCA1A và được báo cáo trên cơ sở dữ liệu đột biến HGMD với mã số CN1414183. Kiểm chứng lại bằng giải trình tự Sanger cũng chỉ ra kết quả tương đồng với phân tích WES. Do đây là bệnh nhân cao tuổi nên không thu được mẫu bố mẹ, vì vậy chưa xác định được chính xác mô hình di truyền. Tuy nhiên, tham khảo dựa trên 3 người bệnh Trung Quốc mắc bạch tạng mang biến thể c.559_560ins25 thì đều nhận biến thể này từ bố hoặc mẹ, do đó có thể dự đoán cả bố và mẹ của người bệnh A1005 đều mang biến thể c.559_560ins25 ở trạng thái dị hợp tử và cùng di truyền cho con.

3.4.2.2. Trường hợp bạch tạng da và mắt mang biến thể gen *OCA2*

Người bệnh A1006

Người bệnh A1006 là nữ, 26 tuổi, là con thứ 2 trong gia đình có 2 anh em. Bố mẹ và anh trai của bệnh nhân đều có kiểu hình bình thường, trong khi đó bệnh nhân được chẩn đoán là mắc bệnh bạch tạng da và mắt với các biểu hiện đặc trưng. Kết quả phân tích WES cho thấy người bệnh mang biến thể hiếm đã biết *OCA2* c.2323G>A (p.G775S) (rs774822330) ở trạng thái đồng hợp tử. Giải trình tự Sanger cho thấy người bệnh nhận cả 2 alen mang biến thể từ cả bố và mẹ, trong khi đó anh trai của người bệnh lại nhận được hai alen kiểu dại ở trạng thái bình thường.

3.4.2.3. Trường hợp bạch tạng da và mắt mang biến thể gen *HPS1*

Người bệnh A1007

Người bệnh A1007 là một bé trai 5 tuổi, được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt. Giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa phát hiện biến thể đồng hợp tử *HPS1* c.972delC (p.M325fs*6). Đây là biến thể gây bệnh đã biết, được báo cáo trên cơ sở dữ liệu dbSNPs (rs281865082) và ClinVar

(VCV000005280.5) liên quan đến các trường hợp mắc hội chứng Hermansky–Pudlak, một dạng bạch tạng da và mất thể hiêm. Biến thể c.972delC được kiểm chứng lại trên mẫu người bệnh và các thành viên trong gia đình bao gồm bố, mẹ và anh trai thông qua giải trình tự trực tiếp. Kết quả cho thấy người bệnh mang biến thể đồng hợp tử c.972del trong khi bố mẹ và anh trai của người bệnh đều mang biến thể này ở trạng thái dị hợp tử và có kiểu hình bình thường. Như vậy, người bệnh đồng thời nhận biến thể này từ cả bố và mẹ và biểu hiện bệnh.

3.4.2. Thiếu sản vành tai

3.4.3.1. Các biến thể hiêm và mới tìm thấy ở người bệnh thiếu sản vành tai

Tổng số phát hiện được 108 biến thể dị hợp tử ($MAF < 0,05\%$) nằm trên 74 gen khác nhau, bao gồm 105 biến thể sai nghĩa chiếm 97%, 2 biến thể dịch khung (FS) chiếm 2% và 1 biến thể vô nghĩa chiếm 1%. Trong đó có 27 biến thể mới bao gồm cả 2 biến thể dịch khung và 25 biến thể sai nghĩa. Hai biến thể dịch khung mới là *PCDH15* c.5027delA (p.E1676Gfs*128) và *CANT1* c.775dupC (p.H259Pfs*25), lần lượt được tìm thấy ở người bệnh Mi005 và Mi010. Biến thể *EYA1* c.C922T (p.R308*) là biến thể vô nghĩa duy nhất đã được tìm thấy ở người bệnh Mi002 trong nghiên cứu này.

Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của các biến thể đến chức năng của protein, tập hợp 9 công cụ online tích hợp trong ANNOVAR được thực hiện. Tất cả các biến thể được đánh giá là gây hại/có thể gây hại trên ít nhất 5 công cụ dự đoán bên cạnh các biến thể dịch khung và biến thể tạo mã kết thúc tiếp tục được sàng lọc để đánh giá tiếp. Sau quá trình sàng lọc, tổng số có 47 biến thể đáp ứng tiêu chí trên nằm trên 45 gen khác nhau; trong đó chỉ có 2 biến thể đã được báo cáo là gây bệnh (*EYA1* p.R308*) và có thể gây bệnh (*ABCC6* p.R1235W) trên cơ sở dữ liệu ClinVar. Ngoài ra, trong số 47 biến thể nguy cơ được sàng lọc thì chỉ có hai biến thể gen *NCF1* p.R90H và *PLEC* p.D3627N cùng được xác định ở các bệnh nhân khác nhau, còn lại, mỗi biến thể chỉ tìm thấy trên một bệnh nhân mà không xuất hiện ở các bệnh nhân khác.

3.4.3.2. Phân tích dựa trên mô hình di truyền đơn gen

Tổng số 9/11 bệnh nhân thiếu sản vành tai xác định được các biến thể gen tuân theo mô hình di truyền; trong đó 5 bệnh nhân gồm Mi002, Mi003, Mi006, Mi008 và Mi010, mỗi bệnh nhân mang một biến thể dị hợp tử trên 5 gen khác nhau tương ứng với mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD). Các biến thể gen ứng viên tìm thấy ở các trường hợp này lần lượt là *EYA1* p.R308*, *TRPV4* p.V254L, *ABCC6* p. R1235W, *DNASE1* p.D115Y và *COL3A1* p.A1045T. Ở trường hợp người bệnh Mi004, có hai biến thể sai nghĩa dị hợp tử nằm trên 2 gen khác nhau được biết đến với mô hình di truyền trội nhiễm sắc thể thường (AD) được xác định là *EVC* p.E681K và *LMNA* p.S543L. Ở trường hợp Mi005, cả hai mô hình di truyền AD và AR đều được chỉ ra với tổng số 5 biến thể ứng viên được xác định. Trong đó, hai dị hợp tử phức đơn gồm *PCDH15* (p.E1676Gfs*128 và p.E49G) và *PLEC* (p.D3627N và p.Q1737P) liên quan đến mô hình di truyền lặn nhiễm sắc thể thường. Biến thể dị hợp tử *LRP5* p.V61M được xác định tuân theo mô hình di truyền AD. Ở trường hợp Mi009, có 3 biến thể ứng viên liên quan đến mô hình di truyền AD được xác định, bao gồm: *COG4* p.D542Y, *FN1* p.M1693T và *LRP5* p.C967F. Ở người bệnh Mi011, cả hai mô hình di truyền AD và AR được chỉ ra với tổng số 4 biến thể ứng viên được xác định. Hai biến thể dị hợp tử độc lập gồm *COL11A1* p.P1383S và *MITF* p.A111V tương ứng với mô hình di truyền trội; trong khi dị hợp tử phức đơn *PLEC* p.R1082C và p.D3627N tương ứng với mô hình di truyền lặn.

3.4.3.3. Mạng lưới tương tác protein-protein

Phân tích mạng lưới tương tác protein (PPI) dựa trên 74 gen ứng viên mang các biến thể hiếm (MAF < 0,5%) được sàng lọc trên 11 bệnh nhân thiếu sản vành tai được thực hiện, mạng lưới bao gồm 74 nút tương ứng với 74 protein và 116 cạnh tương ứng với 116 tương tác protein-protein. Trong đó với FN1 và BMP2 là hai protein trung tâm với lượng tương tác nhiều nhất.

3.4.3.4. Phân tích làm giàu tập hợp gen dựa theo KEGG

Tổng số 16 con đường tín hiệu với chỉ số FDR < 0,05 (biểu thị mức độ tin cậy của phân tích) được chỉ ra trong phân tích làm giàu tập hợp gen theo KEGG. Trong đó có 6 con đường tín hiệu có thể có liên quan đến thiếu sản vành tai, bao gồm: (1) Tương tác với thụ thể ECM, (2) Sự biệt hóa của tế

bào xương, (3) Con đường lây nhiễm HPV, (4) Đường dẫn tín hiệu MTOR, (5) Tiêu hóa và hấp thụ protein, và (6) Con đường lây nhiễm Amip.

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN

4.1. Mối tương quan kiểu gen, kiểu hình ở nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước mang các biến thể gen *COL7A1* và *KRT5*

Trong nghiên cứu này, một biến thể đồng hợp tử và bốn dị hợp tử phức đơn gen *COL7A1* đã được tìm thấy trên 6 người bệnh EB (EB001-EB006). Bên cạnh đó, mỗi biến thể ở trạng thái dị hợp tử cũng được tìm thấy ở bố và mẹ của các bệnh nhân và những người này đều không có biểu hiện bất kỳ triệu chứng bệnh nào, do đó có thể dự đoán mô hình di truyền lặn ở các trường hợp này.

Biểu hiện kiểu hình nghiêm trọng nhất được quan sát thấy ở ba người bệnh, gồm EB002, anh em EB004 và EB005 có liên quan đến biến thể tạo mã kết thúc sớm (PTC). Trong đó, dị hợp tử phức đơn PTC (*COL7A1* c.2858_2859delAG và c.6081delC) được tìm thấy ở người bệnh EB002 và sự kết hợp của một biến thể PTC (p.R1683*) và một biến thể splicing (c.4518 +2delT) gen *COL7A1* được xác định ở anh em người bệnh EB004 và EB005. Người bệnh EB003 có kiểu hình nhẹ hơn, phân tích di truyền chỉ ra một dị hợp tử phức đơn bao gồm một biến thể PTC (p.R2745*) và một biến thể sai nghĩa (p.R2069C). Các biến thể khác trên gen *COL7A1* không tạo ra PTC thường biểu hiện với các ảnh hưởng ít nghiêm trọng hơn và có thể được giải thích ở hai trường hợp EB001 (p.G2760E) và EB006 (c.5821-2A>G và c.6205C>T). Như vậy, có thể thấy, các ảnh hưởng tương quan từ kiểu gen đến kiểu hình được quan sát ở những người bệnh EB trong nghiên cứu này, với sự có mặt của ít nhất một đột biến PTC có liên quan đến những biểu hiện lâm sàng nghiêm trọng nhất, tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố trước đây.

Trường hợp EBS duy nhất gây ra bởi biến thể gen *KRT5* (c.1429G>A, p.E477K) được xác định trong nghiên cứu này là người bệnh EB007, được chẩn đoán mắc EB. Biến thể p.E477K có liên quan chặt chẽ đến tỷ lệ tử vong cao ở các trường hợp GS-EBS, với ít nhất bảy trường hợp tử vong trong vòng sáu tháng đầu đời được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó. Tuy nhiên, vẫn có những trường hợp ngoại lệ được báo cáo với các biểu hiện nghiêm trọng khi sinh và trong thời thơ ấu, được cải thiện khi lớn lên.

Các đặc điểm này cũng được quan sát thấy ở người bệnh EB007 trong nghiên cứu này với sự hiện diện của biến thể *KRT5* p.E477K.

Trường hợp duy nhất không kết luận được biến thể gây bệnh trong nghiên cứu này là trường hợp gia đình người bệnh EB008 do hai biến thể di hợp tử *COL7A1* (p.R613* và p.P1277L) cùng được tìm thấy ở hai người con mắc bệnh (EB008 và EB008.E) và ở người mẹ không mang bất kỳ bất thường nào. Phân tích MLPA cũng không phát hiện thêm bất kỳ biến thể nào liên quan đến thêm/mất đoạn lớn gen *COL7A1*. Do đó, trong trường hợp này nên mở rộng nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen hoặc phân tích microarray trong các nghiên cứu xa hơn, giúp mở rộng khả năng phát hiện biến thể gây bệnh.

Các thông tin di truyền hữu ích được xác định thông qua chẩn đoán phân tử trên nhóm người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước trong nghiên cứu này có thể được cung cấp làm cơ sở khoa học phục vụ trong điều trị cũng như tư vấn di truyền phù hợp và tiên lượng lý thuyết tiến triển bệnh trong tương lai.

4.2. Phân tích di truyền giúp chẩn đoán chính xác các phân nhóm bạch tạng mà lâm sàng khó có thể chỉ ra được

Trong nghiên cứu này, cả 7 người bệnh đều được chẩn đoán mắc bạch tạng da và mắt (OCA) dựa trên các biểu hiện lâm sàng đặc trưng liên quan đến suy giảm sắc tố ở da, tóc và mắt. Chẩn đoán phân tử bằng WES chỉ ra cả 7 trường hợp đều phát hiện các biến thể liên quan đến OCA, bao gồm 5 trường hợp OCA1 (A1001-A1005), 1 trường hợp OCA2 (A1006) và 1 trường hợp liên quan đến hội chứng Hermansky-Pudlak (HPS) (A1007). OCA1 và OCA2 là hai phân nhóm phổ biến nhất của OCA, trong khi đó HPS là một hội chứng hiếm của OCA.

Trong năm trường hợp OCA1 được chỉ ra trong nghiên cứu này, ba người bệnh (A1001, A1002 và A1005) được xếp vào nhóm OCA1A, mang các biến thể PTC gen *TYR* (p.R116*; p.R311fs*7 và p.G190Cfs*12) ở cả hai alen, là nguyên nhân dẫn đến hình thành một tyrosine mất chức năng, do đó không sản xuất được melanin trong tế bào hắc tố. Theo hiểu biết của nhóm nghiên cứu thì người bệnh A1005 là trường hợp thứ tư mang biến thể c.559_560ins25 (p.G190Cfs*12) và là ca bệnh đầu tiên được tìm thấy không phải là người Trung Quốc. Ở trường hợp gia đình có 2 con cùng bị bạch tạng

(A1001 và A1002), tư vấn di truyền đã được thực hiện trong lần mang thai thứ ba của người mẹ, em bé sinh ra hoàn toàn khỏe mạnh và không có biểu hiện bất thường nào của OCA. Từ đó cho thấy sàng lọc trước sinh ở các cặp vợ chồng có nguy cơ là khả thi và có hiệu quả. Trường hợp của hai anh em người bệnh A1003 và A1004 được xếp vào nhóm OCA1B, với biến thể gen *TYR* c.115T>C (p.W39R) được tìm thấy, liên quan đến giảm hoạt động của tyrosine, kéo theo một lượng rất nhỏ melanin được tạo ra và tích lũy theo thời gian.

Trường hợp OCA2 duy nhất được phát hiện trong nghiên cứu này là người bệnh A1006, mang biến thể đồng hợp tử *OCA2* c.2323G>A (p.G775S). Đây là một biến thể đã biết và được tìm thấy trước đó trên một người bệnh Việt Nam, trong nghiên cứu của Markus và cộng sự thuộc đại học Regensburg, Đức vào năm 2011. Markus cho rằng c.2323G>A (p.G775S) là một biến thể lành tính và không phải là nguyên nhân chính gây nên ảnh hưởng có hại ở người bệnh do kết quả trái ngược nhau của 2 phân tích *in silico* gồm SIFT và Polyphen-2. Tuy nhiên, khi tiến hành phân tích lại, cả hai công cụ này đều đưa ra đánh giá là có khả năng gây hại đến protein được mã hóa. Ngoài ra, glycin ở vị trí codon 775 có tính bảo thủ cao, nằm trong vùng xuyên màng 11 trong tổng số 12 miền trên polypeptide P được mã hóa bởi gen *OCA2*. Do đó, sự thay thế G775 có thể ức chế sự gấp nếp của P-protein và dẫn đến những hậu quả có hại. Dựa trên những đề xuất này, có thể xem xét *OCA2* c.2323G>A (p.G775S) như một biến thể “*có khả năng gây bệnh*” dựa theo hướng dẫn của ACMG và cần được chứng minh chức năng trong các nghiên cứu xa hơn.

Một loại OCA khác, hội chứng Hermansky-Pudlak, là phân nhóm hiếm của bạch tạng cũng được quan sát trong nghiên cứu này ở trường hợp người bệnh A1007 mang biến thể đồng hợp tử c.972delC nằm trên gen *HPS1* (p.M325fs*6), là nguyên nhân dẫn đến không hình thành hoặc hình thành một protein mất chức năng sau quá trình dịch mã. Trong HPS, các đặc điểm lâm sàng bao gồm các biểu hiện đặc trưng của OCA kèm theo rối loạn chức năng tiểu cầu, rối loạn chảy máu và có thể phát triển u hạt, xơ phổi hoặc giảm bạch cầu trung tính trong một số trường hợp. Tuy nhiên, ngoài những ảnh hưởng lâm sàng của OCA, các biểu hiện đặc trưng khác của HPS không

tìm thấy ở người bệnh A1007. Vì lý do này, các xét nghiệm phân tử có thể cần thiết giúp phân loại cụ thể các phân nhóm bệnh bạch tạng.

4.3. Yếu tố di truyền trong thiếu sản vành tai

Trong nghiên cứu này, kết quả phân tích WES của 11 người bệnh thiếu sản vành tai chỉ ra 108 biến thể bao gồm 81 biến thể hiếm và 27 biến thể mới liên quan đến 74 gen ứng viên. Tất cả các biến thể này góp phần bổ sung vào cơ sở dữ liệu về các biến thể tiềm ẩn có thể là nguy cơ dẫn đến thiếu sản vành tai. Trong số đó, có 2 biến thể đã được báo cáo là gây bệnh/có thể gây bệnh trên cơ sở dữ liệu ClinVar, bao gồm biến thể *EYA1* p.R308* (rs121909195, VCV000007929.6) phát hiện ở người bệnh Mi002 và biến thể *ABCC6* p.R1235W (rs63750402, VCV000433323.3) tìm thấy ở người bệnh Mi006. Tuy nhiên, khi căn cứ theo mô hình di truyền cũng như bệnh lý liên quan đến biến thể thì chỉ có *EYA1* p.R308* có thể là nguyên nhân dẫn đến kiểu hình bệnh ở trường hợp Mi002. Biến thể *EYA1* p.R308* được báo cáo liên quan đến các trường hợp mắc hội chứng cung mang-tai-thận (BOR) hoặc các trường hợp khác ngoài hội chứng BOR nhưng có các biểu hiện lâm sàng tương tự. Hội chứng BOR là một rối loạn di truyền AD gây ra bởi các biến thể gây bệnh trên 3 gen *EYA1*, *SIX5* và *SIX1*, đặc trưng bởi các triệu chứng như mất thính giác, rò trước tai và cổ, hở trước não thất và các bất thường ở thận. Người bệnh Mi002 được chẩn đoán thiếu sản vành tai phải độ I, trái độ II kèm với các dị tật khác gồm dò luân nhĩ hai bên, dò vùng cổ đã phẫu thuật và chỉ có một quả thận. Như vậy có thể thấy mối tương quan kiểu gen kiểu hình ở trường hợp Mi002 với biến thể gây bệnh *EYA1* p.R308* được xác định, từ đó khẳng định độ chính xác và lợi ích của phân tích WES phát hiện căn nguyên dẫn đến hội chứng di truyền liên quan đến thiếu sản vành tai trong trường hợp này, đồng thời có thể có giá trị vận dụng trong tư vấn di truyền cho các gia đình có nguy cơ mắc các bệnh lý liên quan.

Ngoài ra, nghiên cứu cũng đã chỉ ra 18 biến thể hiếm/mới có thể liên quan căn cứ theo mô hình di truyền cũng như qua phân tích *in silico* với dự đoán gây hại/có thể gây hại trên ít nhất năm công cụ dự đoán. Tất cả các biến thể này cần được quan tâm và nghiên cứu mở rộng trên lượng mẫu lớn hơn cũng như trong các nghiên cứu chức năng xa hơn trong tương lai.

Phân tích PPI dựa trên 74 gen ứng viên chỉ ra BMP2 là một trong hai protein trung tâm có khả năng trao đổi thông tin tối đa với các protein khác, do đó protein này có thể đóng một vai trò quan trọng nào đó trong các con đường sinh học liên quan đến thiếu sản vành tai.

Trong các con đường tín hiệu được chỉ ra thông qua phân tích làm giàu tập hợp gen KEGG, có 5/6 con đường có sự tham gia của gen *COL4A4*, bao gồm cả con đường tương tác với thụ thể ECM. Thêm vào đó, gen này cũng đã được đề xuất là một trong những gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai trong nghiên cứu dựa trên 307 gen gây điếc ở 32 bệnh nhân thiếu sản vành tai. Do đó, *COL4A4* có thể đóng một vai trò quan trọng nào đó trong cơ chế sinh bệnh của thiếu sản vành tai và cần được chú tâm phân tích tác động ảnh hưởng một cách chi tiết và đầy đủ trong các nghiên cứu xa hơn.

4.4. Ý nghĩa của chẩn đoán phân tử trong công tác tư vấn di truyền và quản lý bệnh hiếm

Do tính không đồng nhất về mặt di truyền, đa dạng trong biểu hiện lâm sàng, tính thấm không hoàn toàn bên cạnh sự biến đổi của gen và các yếu tố môi trường khác có thể làm phức tạp thêm quá trình tiến tới chẩn đoán cụ thể ở những trường hợp mắc các rối loạn hiếm gặp. Điều này không chỉ gây căng thẳng và đau khổ về mặt tâm lý cho người bệnh cũng như gia đình họ mà còn là thách thức và gánh nặng đối với các hệ thống chăm sóc sức khỏe. Vì vậy, chẩn đoán phân tử chính xác là cần thiết nhằm đưa ra các phương thức điều trị phù hợp và quản lý hiệu quả các bệnh hiếm gặp. Các thông tin di truyền được sử dụng như một nguồn dữ liệu bổ trợ, góp phần xây dựng các hoạch định liên quan đến kế hoạch hóa gia đình trong tương lai và hình thành mạng lưới hỗ trợ các cá nhân và gia đình bị ảnh hưởng. Ngoài ra, chẩn đoán di truyền không chỉ được quan tâm ở nhóm đối tượng có triệu chứng mà còn có ích trong việc sàng lọc, xác định người mang mầm bệnh ở nhóm không có triệu chứng; do đó rất có ý nghĩa trong công tác phòng ngừa cấp II ở cả nhóm bệnh lành tính và ác tính. Tóm lại, chẩn đoán phân tử nên được cung cấp như một dịch vụ toàn diện bao gồm tư vấn trước và sau xét nghiệm. Các cố vấn di truyền trình độ cao là chìa khoá đảm bảo các gia đình người bệnh nhận được sự hỗ trợ phù hợp khi phát hiện các rối loạn di truyền.

Những hạn chế trong nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện trên ba nhóm bệnh hiếm, có tỉ lệ rất thấp trong quần thể; đồng thời giới hạn về kinh phí cũng như thời gian thực hiện khiến cho nghiên cứu còn khiêm tốn về số lượng mẫu. Đặc biệt, thiếu sản vành tai là một trạng thái di truyền chưa rõ nguyên nhân, có thể tồn tại độc lập hoặc như một triệu chứng ở rất nhiều các hội chứng liên quan khác nhau nên rất khó khăn trong việc xác định các biến thể nguy cơ tiềm năng và cần tiếp tục triển khai trên một cỡ mẫu lớn hơn ở các nghiên cứu sau. Ngoài ra, việc không thu được mẫu các thành viên trong gia đình cũng như các hình ảnh lâm sàng liên quan ở nhóm người bệnh này cũng là một hạn chế. Tuy nhiên, bất kỳ thông tin hay giả thuyết nào được đưa ra cũng có thể là một nguồn dữ liệu để tham khảo, cùng với các nghiên cứu khác xây dựng các bằng chứng đủ lớn với mục tiêu tìm ra nguyên nhân cũng như cơ chế bệnh sinh của thiếu sản vành tai. Từ đó làm tiền đề cho các nghiên cứu chức năng xa hơn tiến đến mục tiêu thực hành lâm sàng trong tương lai.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

- Đã giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hóa trên đối tượng người bệnh Việt Nam, gồm 8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7 người bệnh bạch tạng và 11 người bệnh thiếu sản vành tai với kích thước trung bình mỗi bộ dữ liệu là 48 triệu đoạn đọc và Q30 đạt 94%.

- Đã xác định được các biến thể có khả năng gây bệnh ở 7/8 người bệnh ly thượng bì bóng nước, 7/7 người bệnh bạch tạng và 1 biến thể nguy cơ ở 1/11 người bệnh thiếu sản vành tai, cụ thể như sau:

- + Đã xác định được 6 người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước loạn dưỡng mang các biến thể mới/hiếm gen *COL7A1* (c.8279G>A, c.4518+2delT, c.5821-2A>G/c.2858_2859delAG, c.5047C>T, c.6081delC, c.6205C>T và c.8233C>T) và 1 người bệnh ly thượng bì bóng nước đơn giản mang biến thể gen *KRT5* c.1429G>A (p.E477K).

- + Đã phân loại người bệnh bạch tạng thuộc 3 nhóm: bao gồm 5 người bệnh OCA1 (3 người bệnh OCA1A và 2 người bệnh OCA1B), 1 người bệnh OCA2 và 1 người bệnh mắc hội chứng Hermansky-Pudlak được xác định tương ứng với các biến thể trên gen *TYR* (c.346C>T, c.926insC, c.115T>C

và c.559_560ins25), *OCA2* (c.2323G>A) và *HPS1* (c.972delC). Chẩn đoán trước sinh được thực hiện ở lần mang thai thứ ba trong gia đình có hai con đầu mắc OCA1A (A1001 và A1002) với em bé sinh ra hoàn toàn khỏe mạnh.

+ Đã xác định được 108 biến thể bao gồm 81 biến thể hiếm và 27 biến thể mới trên 74 gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai ở 11 mẫu nghiên cứu. Trong đó, biến thể *EYA1* p.R308* có thể được xem là nguyên nhân gây bệnh ở trường hợp Mi002 liên quan đến hội chứng cung mang-tai-thận (BOR).

Kiến nghị:

Từ những kết quả đạt được trong nghiên cứu, chúng tôi xin đưa ra một số kiến nghị như sau:

1. Cần tiến hành các nghiên cứu phân tích chức năng sử dụng mô hình *in vitro* hoặc mô hình động vật phù hợp nhằm đánh giá tác động thực sự của các biến thể mới phát hiện ở nhóm người bệnh ly thượng bì bóng nước, từ đó làm rõ cơ chế bệnh sinh liên quan.

2. Cần khảo sát với số lượng mẫu lớn hơn để mở rộng quy mô phát hiện biến thể gây bệnh/biến thể nguy cơ, đặc biệt ở nhóm thiếu sản vành tai với cơ chế phân tử gây bệnh phức tạp chưa được làm rõ.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đã xác định được các biến thể gen là nguyên nhân di truyền ở người bệnh mắc ly thượng bì bóng nước, trong đó có ba biến thể mới nằm trên gen *COL7A1* (c.8279G>A, c.4518+2delT và c.5821-2A>G).

Đã xác định được nguyên nhân di truyền ở người bệnh bạch tạng, trong đó, biến thể *TYR* c.115T>C (p.W39R) là nguyên nhân dẫn đến phân nhóm bạch tạng da và mắt loại 1 lần đầu tiên được tìm thấy ở trạng thái đồng hợp tử.

Đã xác định được 27 biến thể mới nằm trên các gen ứng viên có thể liên quan đến thiếu sản vành tai.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Ma THT**, Luong TLA, Hoang TL, Nguyen TTH, Vu TH, Tran VK, Nguyen DB, Trieu TS, Nguyen HH, Nong VH, Nguyen DT. *Novel and very rare causative variants in the COL7A1 gene of Vietnamese patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa revealed by whole-exome sequencing*. Mol Genet Genomic Med. 2021 Aug;9(8):e1748. doi: 10.1002/mgg3.1748.
2. **Thuong MTH**, Anh LTL, Nhung VP, Ngoc TTB, Lan HT, Phuong DK, Ha NH, Van Hai N, Ton ND. *Genetic analyses of Vietnamese patients with oculocutaneous albinism*. J Clin Lab Anal. 2022 Jul 23:e24625. doi: 10.1002/jcla.24625.
3. **Ma Thi Huyen Thuong**, Dang Tien Truong, Nguyen Hai Ha, Nguyen Dang Ton. *Identification of a de novo mutation in KRT5 gene underlying epidermolysis bullosa simplex by whole exome sequencing in a Vietnamese patient*. Vietnam Journal of Biotechnology 19(2): 223-228, 2021.