

Phát hiện đột biến gen *BTK* trên các bệnh nhân chẩn đoán bệnh không gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X (XLA)

Ngô Mạnh Tiến^{1*}, Nguyễn Thị Vân Anh¹, Nguyễn Thị Phương Mai¹, Ngô Diễm Ngọc¹, Nguyễn Ngọc Quỳnh Lê¹, Trần Thị Chi Mai¹, Nguyễn Thanh Bình¹, Khuất Hữu Thanh², Lê Thanh Hải¹, Lê Thị Minh Hương¹

¹Bệnh viện Nhi Trung ương

²Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài 24/7/2018; ngày chuyển phản biện 27/7/2018; ngày nhận phản biện 4/9/2018; ngày chấp nhận đăng 10/9/2018

Tóm tắt:

Protein cytoplasmic tyrosine kinase (*BTK*) được mã hóa bởi gen *BTK*. Đột biến trên gen *BTK* là nguyên nhân gây nên bệnh không gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X (XLA). **Mục tiêu:** phát hiện các đột biến trên gen *BTK* ở các bệnh nhân mắc bệnh XLA. **Đối tượng và phương pháp:** 3 bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh XLA. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện các đột biến trên gen *BTK*. **Kết quả:** 3 bệnh nhân đều có đột biến trên gen *BTK*, trong đó 1 bệnh nhân có đột biến mất đoạn từ exon 2 đến exon 5; 2 bệnh nhân có đột biến điểm thay thế axit amin trên exon 10, các đột biến lần lượt là c.862C>T (p.Arg288Trp) và c.843G>A (p.Trp281Stop). **Kết luận:** kỹ thuật giải trình tự gen là phương pháp chính xác cho phép sàng lọc toàn bộ các đột biến trên gen *BTK*. Phương pháp giải trình tự gen là cơ sở để chẩn đoán xác định bệnh XLA, đây là cơ sở để giúp các bác sỹ lâm sàng tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh trong tương lai.

Từ khóa: đột biến, gen *BTK*, giải trình tự gen, XLA.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Bệnh XLA là bệnh giảm gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X khiến cho cơ thể không sản xuất được BTK. Do đó, các tế bào lympho B không thể biệt hóa hoặc trưởng thành được, dẫn tới hậu quả trực tiếp là không sản xuất được kháng thể để đưa ra máu ngoại vi. Vì vậy, cơ thể bệnh nhân bị giảm khả năng chống chọi với các tác nhân gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn. Tỷ lệ mắc bệnh XLA khoảng 1/200.000 trẻ. Đây là bệnh di truyền liên kết giới tính X hiếm gặp. Protein BTK có 5 vùng chức năng khác nhau, gồm: vùng pleckstrin - homology (PH) nằm ở đầu N, tiếp theo là vùng Tec (TH), Src- (SH3), SH2 homology và Kinase (TK hoặc SH1). Trong khi vùng SH1 là vùng tổng hợp cho quá trình Tyr phosphoryl hóa, vùng PH lại có chức năng quan trọng trong vị trí của màng BTK. Vùng TH giữ vai trò quan trọng trong quá trình giữ protein và điều hòa hoạt động, vùng SH3 và SH2 giữ vai trò trong quá trình tương tác giữa các protein [1].

Năm 1993, lần đầu tiên hai nhóm nghiên cứu độc lập cùng tìm ra gen *BTK* gây bệnh XLA và giải thích được cơ chế sinh bệnh. Đột biến ở gen này gây giảm chức năng của BTK khiến cho tế bào lympho B không thể biệt hóa hoặc trưởng thành và không sản xuất ra kháng thể [2]. Gen *BTK* nằm ở cánh dài của nhiễm sắc thể X, ở vị trí Xq 21.3-q 22.

Gen này dài 37 kb và chứa 19 exon. Ngày nay, có khoảng 2.152 nghiên cứu về đột biến gen *BTK* đã được công bố trên thế giới (<http://structure.bmc.lu.se/idbase/BTKbase/index.php?content=index/IDbases>) [3-5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện các đột biến trên gen *BTK* ở vùng exon và vùng ranh giới exon/intron trên 3 bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc bệnh XLA.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 3 bệnh nhân tuổi từ 36 tháng tới 10 năm, không có quan hệ huyết thống với các triệu chứng lâm sàng là nhiễm khuẩn tái diễn nhiều đợt, khởi phát từ 8,4 tháng tuổi. Các bệnh nhân này đủ tiêu chuẩn chẩn đoán xác định bệnh XLA theo các tiêu chuẩn của Hiệp hội suy giảm miễn dịch châu Âu (1999) như sau [6]:

Tiêu chuẩn chẩn đoán xác định: bệnh nhân nam có số lượng tế bào lympho B CD19+ ≤2% và ít nhất một tiêu chuẩn sau:

- Tìm thấy đột biến trên gen *BTK* (Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase).

*Tác giả liên hệ: Email: ntmanh@gmail.com

Identify mutations in *BTK* gene of patients with X-linked agammaglobulinemia (XLA)

Manh Tien Ngo^{1*}, Thi Van Anh Nguyen¹,
Thi Phuong Mai Nguyen¹, Diem Ngoc Ngo¹,
Ngoc Quynh Le Nguyen¹, Thi Chi Mai Tran¹,
Thanh Binh Nguyen¹, Huu Thanh Khuat²,
Thanh Hai Le¹, Thi Minh Huong Le¹

¹National Children's Hospital

²Hanoi University of Science and Technology

Received 24 July 2018; accepted 10 September 2018

Abstract:

The cytoplasmic tyrosine kinase (BTK) protein is encoded by the *BTK* gene. Mutations in the *BTK* gene are responsible for the primary immunodeficiency X-linked agammaglobulinemia (XLA). **Objectives:** to detect mutations in *BTK* gene in patients with XLA. **Subjects and Methods:** three patients were diagnosed with XLA. Sequencing techniques were used to detect mutations in the *BTK* gene. **Results:** all the three patients had mutations in the *BTK* gene; one had a loss mutation of exon 2 to 5; two patients had an amino acid substitution mutation on exon 10, and the mutants respectively were c.862C>T (p.Arg288Trp) and c.843G>A (p.Trp281Stop). **Conclusion:** sequencing technique is the accurate method for screening all mutations in the *BTK* gene. Sequencing technique will support for the diagnosis of XLA, for clinicians to provide genetic counselling and prenatal diagnosis in the future.

Keywords: *BTK* gene, mutation, sequencing, XLA.

Classification number: 3.2

- Anh, em trai cùng mẹ của bệnh nhân, cậu và bác trai bên mẹ, hoặc cháu trai bên mẹ có số lượng tế bào lympho B CD19+ $\leq 2\%$.

- Không có mARN của gen *BTK* trong mẫu phân tích mARN của bạch cầu hạt trung tính và bạch cầu mono theo phương pháp Northern blot analysis.

- Không có protein BTK trong tế bào bạch cầu mono hoặc tiểu cầu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch thứ phát do HIV, thuốc hoặc hóa chất.

- Bệnh nhân hoặc người nhà không chấp thuận tham gia nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm: 2 ml máu ngoại vi chống đông EDTA.

Tách chiết ADN từ máu ngoại vi: sử dụng kit tách chiết QiaAmp DNA blood mini kit (Qiagen - Đức).

Phương pháp PCR nhân đoạn gen *BTK*: trình tự mỗi được thiết kế theo Wing và cs. Chu trình nhiệt PCR được thực hiện trong điều kiện 95°C, 5 phút; [95°C, 45 giây; 60°C, 45 phút; 72°C, 1 phút 45 giây] x 35 chu kỳ; 72°C, 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên Agarose 1%. Độ lớn của sản phẩm PCR được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Sản phẩm PCR và độ lớn của sản phẩm.

Sản phẩm PCR	Exon	Độ lớn (bp)
1	Exon 1	600
2	Exon 2-3	949
3	Exon 4-5	1.829
4	Exon 6-7	649
5	Exon 8-9	796
6	Exon 10-13	1.933
7	Exon 14-15	1.058
8	Exon 16-18	1.620
9	Exon 19	627

Tinh sạch sản phẩm PCR: sử dụng kit tinh sạch QIAamp PCR purification kit (Qiagen - Đức).

Thực hiện phản ứng PCR mỗi đơn: phản ứng PCR mỗi đơn được thực hiện theo chu trình nhiệt [95°C, 30 giây; 55°C, 1 phút; 72°C, 2 phút] x 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR mỗi đơn được tinh sạch sử dụng kit tinh sạch chuyên dụng BigDye X Terminator (ABI).

Giải trình tự gen *BTK*: được tiến hành trên máy Genetic

Analysar 3130 (ABI). Trình tự gen được phân tích bằng phần mềm Chromas Pro, sau đó được so sánh với trình tự chuẩn U2281904 của Ngân hàng gen thế giới (GeneBank).

Kết quả

Trước khi được chẩn đoán, các bệnh nhân đều bị viêm phổi >2 đợt/năm, viêm tai giữa tái phát, 2 trong số 3 bệnh nhân bị nhiễm khuẩn ngoài da cần điều trị kháng sinh, một hoặc hai đợt nhiễm khuẩn huyết; một bệnh nhân bị viêm não - màng não do nhiễm khuẩn và di chứng nghiêm trọng gây chậm phát triển tinh thần, vận động và viêm phổi nặng dẫn tới tử vong.

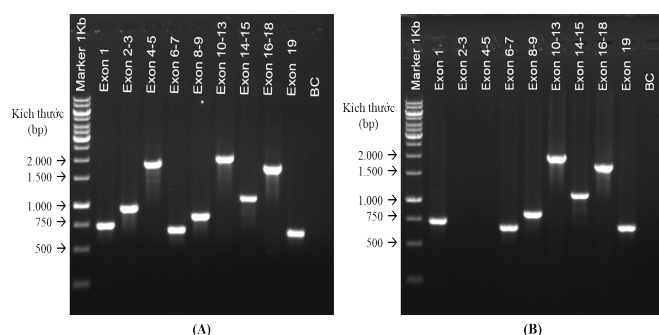
Xét nghiệm cận lâm sàng của cả 3 bệnh nhân cho thấy nồng độ gammaglobulin trong máu ngoại vi giảm nặng (bảng 2). Nồng độ IgG tại thời điểm trước chẩn đoán của 2 bệnh nhân trước khi truyền gammaglobulin dưới -2SD so với tuổi, bệnh nhân số 3 sau khi được truyền gammaglobulin tại bệnh viện tỉnh với chỉ định điều trị nhiễm khuẩn huyết nặng IgG đo được chỉ đạt 4,6 g/l (tương đương ngưỡng thấp của giá trị bình thường so với tuổi).

Bảng 2. Kiểu gen và kiểu hình các bệnh nhân XLA.

Bệnh nhân	Immunoglobuline			Lympho B		Đột biến	
	IgA	IgM	IgG	Số lượng	%	c.ADN	Protein
1	0,01	0,30	0,09	0	0		Del exon 2-5
2	0,02	0,70	2,40	9,1	0,18	c.862C>T	p.Arg288Trp
3	0,45	0,53	4,60*	0	0	c.843G>A	Trp281Stop

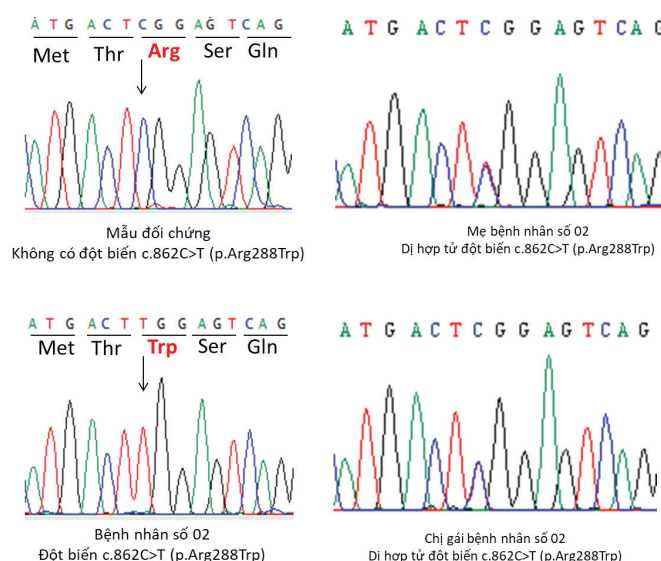
*Bệnh nhân đã được truyền gammaglobulin trước khi định lượng (tại bệnh viện tỉnh do nhiễm khuẩn huyết).

Gen *BTK* được chia làm 9 đoạn với độ lớn tương ứng. Kết quả khuếch đại gen cho thấy, các đoạn gen đều được khuếch đại với độ lớn mong muốn (hình 1A). Sản phẩm PCR tiếp tục được sử dụng để giải trình tự, phân tích gen *BTK*.

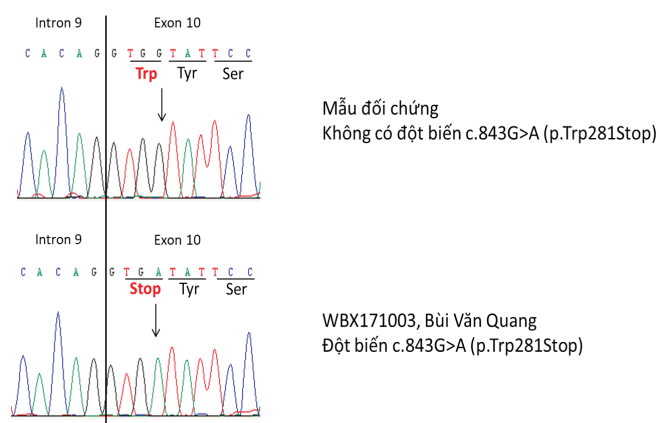


Hình 1. Sản phẩm khuếch đại gen *BTK*. (A) Sản phẩm khuếch đại gen *BTK* trên mẫu không có đột biến. **(B)** Đột biến mất đoạn từ exon 2 đến exon 5 gen *BTK* được phát hiện trên bệnh nhân số 1.

Nghiên cứu phát hiện 3 bệnh nhân có đột biến trên gen *BTK* (bảng 2). Trong đó, một bệnh nhân có đột biến mất đoạn từ exon 2 đến 5 (hình 1B); 2 bệnh nhân có đột biến điểm kiểu thay thế axit amin trên exon 10 lần lượt là c.862C>T (p.Arg288Trp) và c.843G>A (p.Trp281Stop) (hình 2, 3). Kiểu gen và kiểu hình của các bệnh nhân được thể hiện ở bảng 2.



Hình 2. Đột biến c.862C>T (p.Arg288Trp) trên gen *BTK* ở bệnh nhân số 2.



Hình 3. Đột biến c.843G>A (p.Trp281Stop) trên gen *BTK* ở bệnh nhân số 3.

Bàn luận

3 bệnh nhân đều có nồng độ IgA, IgM giảm nặng <-2SD so với tuổi của bệnh nhân (bảng 2). Số lượng tế bào lympho B của cả 3 bệnh nhân đều giảm nặng <1%, phù hợp tiêu chuẩn chẩn đoán của bệnh nhân. Đây là chỉ số đánh giá không phụ thuộc vào điều trị truyền IVIG, phản ánh bệnh nhân không có khả năng sản xuất kháng thể do giảm rất nặng tế bào lympho B trong máu ngoại vi.

Các bệnh nhân trong nghiên cứu đều có đột biến trên gen *BTK*, trong đó 1 bệnh nhân có đột biến mất đoạn từ exon 2 đến 5 và 2 bệnh nhân có đột biến điểm trên exon 10. Hai đột biến điểm là đột biến thay thế axit amin (p.Arg288Trp) và đột biến tạo codon kết thúc sớm (p.Trp281Stop). Đột biến p.Arg288Trp được mô tả lần đầu tiên vào năm 1994 bởi Bradley và cs [7]. Tác giả sử dụng phương pháp SSCP để phát hiện đột biến trên gen *BTK* ở 10 bệnh nhân. Kết quả phát hiện được 8/10 bệnh nhân có đột biến, trong đó 7 đột biến là đột biến điểm và 1 đột biến ở dạng chèn đoạn nhỏ. Đột biến p.Trp281Stop là đột biến tạo codon kết thúc sớm trên exon 10. Đột biến này đã được công bố năm 1995 bởi Hagemann và cs [8]. Các tác giả này cũng sử dụng phương pháp SSCP để phát hiện các đột biến trên gen *BTK*. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự gen để phát hiện toàn bộ đột biến trên gen *BTK*. Ngày nay, đã có nhiều nghiên cứu sử dụng kỹ thuật giải trình tự để phát hiện đột biến trên gen *BTK*. Năm 2015, nghiên cứu của Chear và cs [9] đã phát hiện đột biến mới trên exon 13 nhờ sử dụng phương pháp giải trình tự gen. Năm 2016, Abolhassani và cs [10] cũng đã sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen để phát hiện đột biến gen *BTK*. Nghiên cứu này đã phát hiện 37/87 bệnh nhân có đột biến, trong đó có 1 đột biến mới chưa được công bố. Phương pháp giải trình tự gen là phương pháp có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có thể xác định các đột biến điểm trên toàn bộ gen *BTK*. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp giải trình tự gen là không phát hiện được các đột biến mất đoạn lớn trên bệnh nhân và người mang đột biến loại này. Vì vậy, cần có phương pháp khác để phát hiện các đột biến mất đoạn lớn như MLPA, PRC-RFLP...

Việc phát hiện các đột biến trên gen *BTK* gây bệnh XLA sẽ giúp chẩn đoán xác định bệnh XLA, là tiền đề cho tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh sau này.

Kết luận

Nghiên cứu phát hiện 3 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh XLA đều có đột biến trên gen *BTK*, trong đó 1 bệnh nhân có đột biến mất đoạn từ exon 2 đến 5; 1 bệnh nhân có đột biến p.Arg288Trp và 1 bệnh nhân có đột biến p.Trp281Stop trên exon 10.

Kỹ thuật giải trình tự gen là kỹ thuật có độ chính xác cao, có thể phát hiện các đột biến trên gen *BTK*. Đây là tiền đề cơ bản cho việc xác định dị hợp tử, phòng bệnh bằng tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Desiderio (1997), "Role of BTK in B cell development and signaling", *Curr. Opin. Immunol.*, **9**(4), pp.534-540.
- [2] D. Vetrie, et al. (1993), "The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases", *Nature*, **361**(6409), pp.226-233.
- [3] X. Kong, et al. (2014), "Mutation analysis and prenatal diagnosis in families of X-linked agammaglobulinemia caused by BTK gene mutation", *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **94**(18), pp.1405-1408.
- [4] J. Lee, et al. (2016), "A novel BTK gene mutation, c.82delC (p.Arg28 Alafs(*)5), in a Korean family with X-linked agammaglobulinemia", *Korean J. Pediatr.*, **59**(Suppl 1), pp.S49-S52, doi: 10.3345/kjp.2016.59.11.S49.
- [5] N. Rattanachartnarong, et al. (2014), "In vitro correction of a novel splicing alteration in the BTK gene by using antisense morpholino oligonucleotides", *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **62**(5), pp.431-436.
- [6] M.E. Conley, L.D. Notarangelo, A. Etzioni (1999), "Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies)", *Clin. Immunol.*, **93**(3), pp.190-197.
- [7] L.A. Bradley, et al. (1994), "Mutation detection in the X-linked agammaglobulinemia gene, BTK, using single strand conformation polymorphism analysis", *Hum. Mol. Genet.*, **3**(1), pp.79-83.
- [8] T.L. Hagemann, F.S. Rosen, S.P. Kwan (1995), "Characterization of germline mutations of the gene encoding Bruton's tyrosine kinase in families with X-linked agammaglobulinemia", *Hum. Mutat.*, **5**(4), pp.296-302.
- [9] C.T. Chear, et al. (2015), "A novel BTK gene mutation creates a de-novo splice site in an X-linked agammaglobulinemia patient", *Gene*, **560**(2), pp.245-248.
- [10] H. Abolhassani, et al. (2016), "Cohort of Iranian Patients with Congenital Agammaglobulinemia: Mutation Analysis and Novel Gene Defects", *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **2**(4), pp.479-486.