

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (Duchenne Muscular Dystrophy-DMD) là một bệnh lý thần kinh cơ do di truyền thường gặp nhất, được phát hiện ở tất cả các chủng tộc khác nhau trên thế giới. Tần suất bệnh vào khoảng 1/3500 trẻ trai. Đây là một bệnh lý cơ rất nặng, mang tính chất tuần tiến, nặng dần theo thời gian. Với những biểu hiện nặng nề, cùng với rối loạn về tinh thần, DMD/BMD thực sự không chỉ là một tai họa đối với bản thân người bệnh mà còn là gánh nặng của gia đình cũng như của cả cộng đồng.

Hiện nay chưa có phương pháp điều trị đặc hiệu. Với sự phát triển của ngành sinh học phân tử trong những năm gần đây, liệu pháp điều trị gen đối với bệnh nhân DMD đã đem lại hy vọng to lớn cho người bệnh. Tuy nhiên với mỗi dạng đột biến gen dystrophin khác nhau sẽ có liệu pháp điều trị gen khác nhau. Vì vậy, việc nghiên cứu xác định đột biến gen cho bệnh nhân là tiền đề quan trọng để tìm ra liệu pháp điều trị gen hiệu quả nhất. Ngoài ra, việc xác định chính xác dạng đột biến gen còn giúp cho chẩn đoán người lành mang bệnh, chẩn đoán trước sinh tư vấn di truyền nhằm giảm tỉ lệ mắc bệnh, giảm hậu quả của bệnh gây cho gia đình bệnh nhi và xã hội.

Những năm gần đây, nhiều nhà khoa học nước ngoài cũng như trong nước đã tiến hành nghiên cứu và phát hiện đột biến gen dystrophin ở các bệnh nhân DMD. Ở Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về đột biến gen dystrophin. Tuy nhiên, các công trình chủ yếu mới chỉ dừng ở phát hiện đột biến xóa đoạn và tập trung vào 2 vùng đột biến trọng điểm, vẫn chưa có nghiên cứu nào tiến hành phát hiện toàn diện các dạng đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm trên toàn bộ 79 exon của gen dystrophin.

2. Mục tiêu đề tài

1. Xác định đột biến xóa đoạn, lặp đoạn và đột biến điểm của gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD.

2. Bước đầu xây dựng bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam.

3. Ý nghĩa thực tiễn và đóng góp mới của đề tài.

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là một trong những bệnh cần được chẩn đoán sớm để có hướng điều trị phù hợp và loại bỏ nguy cơ xuất hiện bệnh trong cộng đồng. Đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam áp dụng quy trình phát hiện các dạng đột biến gen dystrophin bao gồm đột

biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn, đột biến điểm. Quy trình này đã sử dụng kỹ thuật mới là MLPA. Kỹ thuật này có thể vừa phát hiện đột biến xóa đoạn vừa có thể phát hiện đột biến lặp đoạn. Hơn nữa MLPA là kỹ thuật có thời gian cho kết quả nhanh, chỉ với 2 phản ứng PCR đã khuếch đại tất cả 79 exon của gen dystrophin trong vòng 24 giờ. Nghiên cứu này đã được tiến hành trên số mẫu lớn: 201 bệnh nhân. Nghiên cứu tìm ra số lượng lớn bệnh nhân mang gen đột biến, bao gồm đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn, đột biến điểm. Đây là tiền đề cho việc áp dụng liệu pháp điều trị gen phù hợp, cũng như làm cơ sở để tư vấn di truyền, chẩn đoán người mang gen, chẩn đoán trước sinh nhằm hạn chế tỉ lệ mắc bệnh trong cộng đồng. Đây là kết quả không chỉ mang ý nghĩa khoa học, thực tiễn mà còn có tính nhân văn.

4. Cấu trúc luận án

Luận án được trình bày trong 111 trang (không kể tài liệu tham khảo và phụ lục); bao gồm: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan tài liệu (42 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (15 trang), kết quả nghiên cứu (27 trang), bản luận (23 trang), kết luận (1 trang), kiến nghị (1 trang).

Luận án gồm 14 bảng, 5 biểu đồ, 39 hình; 101 tài liệu tham khảo.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm của bệnh DMD

1.1.1. Biểu hiện lâm sàng của DMD

Trẻ trai hiếm khi biểu hiện các triệu chứng lúc sinh hoặc trong những năm đầu của thời kỳ ấu nhi. Những triệu chứng thường bắt đầu từ 3-5 tuổi, khởi đầu bởi sự khó đi lại, khó khăn khi leo cầu thang và khi đứng, chân bệnh nhân thường dạng ra cho chắc chắn, lưng uốn để bù trừ cho cơ mông bị yếu. Dấu hiệu **Gower** sớm có thể thấy rõ vào lúc 3 tuổi và biểu hiện đầy đủ vào lúc trẻ được 5 đến 6 tuổi. Thời gian bệnh nhi còn duy trì được khả năng di chuyển thay đổi rất lớn. Hầu hết trẻ mắc DMD có thể đi lại đến năm 12 tuổi. Sa sút trí tuệ gặp ở tất cả bệnh nhân mặc dù chỉ có 20 đến 30% bệnh nhân có chỉ số IQ dưới 70. Trẻ mắc bệnh DMD thường tử vong vào khoảng ngoài 20 tuổi. Nguyên nhân tử vong là suy hô hấp trong khi ngủ, suy tim xung huyết, viêm phổi hoặc đôi khi do sặc và tắt nghẽn đường thở.

1.1.1.3. Xét nghiệm cận lâm sàng

1.1.1.3.1. Định lượng hoạt độ Creatine Kinase

1.1.1.3.2. Phương pháp thăm dò điện sinh lý cơ

1.1.3.3. Sinh thiết cơ

1.1.3.4. Hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry)

1.1.3.5. Phương pháp di truyền phân tử xác định gen đột biến

1.1.4. Điều trị bệnh DMD

1.1.4.1. Điều trị nội khoa

1.1.4.2. Điều trị bằng liệu pháp gen

i) Thiết kế vector mang gen mini hoặc micro dystrophin

ii) Thử nghiệm các loại thuốc có hoạt tính readthrough

iii) Sử dụng antisense gây xóa đoạn exon

1.1.4.3. Điều trị bằng liệu pháp tế bào

Chuyển ghép nguyên bào cơ

1.1.5. Di truyền học của bệnh DMD

DMD là bệnh di truyền đơn gen, tuân theo quy luật di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên NST Y. Người mẹ là dị hợp tử mang gen bệnh có khả năng truyền bệnh cho 50% số con trai và truyền gen bệnh cho 50% số con gái của họ. Mặc dù DMD là bệnh di truyền lặn liên kết giới tính, có khoảng 30% bệnh nhân mắc bệnh là do các đột biến mới và dĩ nhiên người mẹ không mang gen bệnh.

1.2. Các dạng đột biến cấu trúc của gen dystrophin

Khoảng 60 - 65% trường hợp bệnh DMD là do đột biến xóa đoạn gen, đột biến lặp đoạn gen chiếm 5 - 10% trường hợp và khoảng 25 - 30% là đột biến điểm và các đột biến nhỏ khác.

1.2.1. Đột biến xóa đoạn gen

Người ta quan sát thấy khoảng 60 - 65% các đột biến gây bệnh DMD là xóa đoạn lớn trên gen dystrophin, tập trung chủ yếu ở 2 vùng trọng điểm (còn gọi là vùng “hot-spot”) là vùng tận cùng 5’ (chứa exon 1 - 19) và vùng trung tâm (chứa exon 43 - 60).

1.2.2. Đột biến lặp đoạn gen

Chiếm khoảng 5 - 10% trường hợp. Trong đó, khoảng 80% trường hợp lặp đoạn xảy ra ở đầu tận 5’, 20% xảy ra ở vùng trung tâm và sự phân bố này có sự khác biệt đôi chút giữa những dân số và chủng tộc khác nhau.

1.2.3. Đột biến điểm và những đột biến nhỏ khác

Chiếm 25 - 30% trường hợp. Đột biến điểm trong bệnh DMD hầu hết là đột biến tạo mã kết thúc sớm và gây thể bệnh nặng. Hiện nay có trên 200 vị trí đột biến điểm của gen DMD đã được xác định.

1.3. Các kỹ thuật phát hiện đột biến gen dystrophin

1.3.1. Kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction)

Nguyên tắc chung: phản ứng PCR dựa vào hoạt tính của các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch DNA khuôn, với nguyên liệu là bốn loại nucleotid. Phản ứng này cần mỗi xuôi và mỗi ngược có trình tự bổ sung với hai đầu của trình tự DNA khuôn.

1.3.2. Kỹ thuật FISH (Fluorescence in situ hybridization)

Sử dụng một trình tự ngắn của chuỗi DNA sợi đơn, được gọi là mẫu DNA dò (probe DNA) để phát hiện một trình tự đích. Các mẫu DNA dò được đánh dấu huỳnh quang và sẽ lai với DNA đích trên NST ở kỳ giữa hoặc gian kỳ. Nhờ sự lai của mẫu DNA dò với trình tự bổ sung, có thể phát hiện và định vị được vị trí chuỗi DNA đặc hiệu qua phân tích dưới kính hiển vi huỳnh quang.

1.3.3. Kỹ thuật Southern blot

Trong phương pháp này, DNA được phân cắt bằng các enzym đặc hiệu. Sau đó, các đoạn DNA trong hỗn hợp được phân tách bằng điện di trên gel agarose rồi chuyển sang màng lai. Bước tiếp theo, các đoạn DNA cần xác định nằm trên màng được lai với các oligonucleic đặc hiệu có gắn chất đánh dấu như phóng xạ, chất màu huỳnh quang, biotin... Các phương pháp xác định hình ảnh tương ứng được sử dụng để chỉ ra các vạch sản phẩm chứa các đoạn DNA cần phát hiện lai với oligonucleotid đánh dấu trên màng

1.3.4. Kỹ thuật MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Kỹ thuật MLPA (khuếch đại đa đoạn dò) được mô tả lần đầu vào năm 2002 bởi Schouten J.P. và CS, đây là phiên bản mới của phản ứng PCR, trong đó nhiều đoạn DNA đích được khuếch đại chỉ bằng 1 cặp môi [13].

* *Nguyên tắc của kỹ thuật MLPA:*

- Kỹ thuật MLPA sử dụng các đoạn dò (probe) có khả năng lai hóa với phân tử DNA đích đặc hiệu và vấn đề thiết kế các probe rất quan

trọng [14, 15]. Mỗi đoạn dò gồm 2 chuỗi oligonucleotide có kích thước khác nhau (gọi là đoạn dò xuôi và đoạn dò ngược). Phần nối giữa đầu 5' với đầu 3': là đoạn đệm nằm giữa đầu 3' và đầu 5', chứa 19 - 370 nucleotid và được thiết kế dài ngắn khác nhau ở các đoạn dò tùy loại tác nhân đích. Đoạn đệm được thiết kế dài ngắn khác nhau nên khi phản ứng PCR khuếch đại sẽ tạo ra nhiều đoạn DNA có chiều dài khác nhau và được phân tách bằng điện di mao quản (mỗi được đánh dấu huỳnh quang). Phân tích kết quả MLPA là bước quan trọng trong kỹ thuật. Phân tích được tiến hành dựa trên hình ảnh, dữ liệu thô tương ứng với từng probe.

1.3.5. Kỹ thuật giải trình tự gen bằng máy tự động

Máy giải trình tự gen tự động được thiết kế trên nguyên tắc sử dụng dideoxynucleotid (ddNTP) do Sanger và CS phát minh. Với các máy thế hệ sau này, người ta dùng 4 màu huỳnh quang khác nhau để đánh dấu 4 loại ddNTP.

1.4. Tình hình nghiên cứu bệnh DMD

Ở nước ta, một số nghiên cứu thường tập trung vào xác định đột biến xóa đoạn gen ở mức độ DNA (dựa vào kỹ thuật đơn PCR, multiplex PCR, PCR định lượng...) và chỉ ưu tiên xác định đột biến trong hai vùng trọng điểm, trong khi đột biến trên gen dystrophin có thể nằm rải rác khắp 79 exon của gen. Kỹ thuật MLPA cũng đã được nghiên cứu bước đầu trong chẩn đoán đột biến xóa đoạn trên gen dystrophin, nhưng chưa được ứng dụng trong chẩn đoán đột biến lặp đoạn và phát hiện người lành mang gen bệnh.

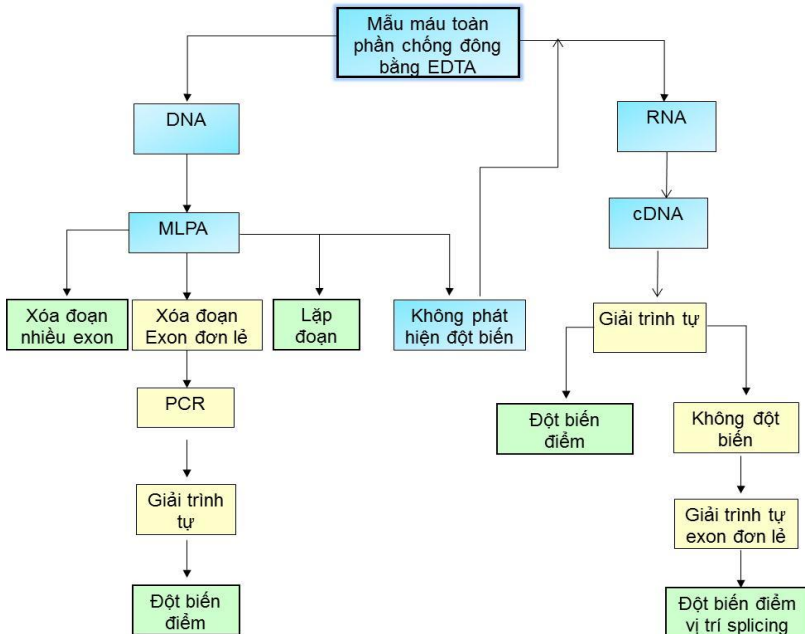
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lựa chọn 201 bệnh nhân được chẩn đoán xác định là bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne/Becker tại Bệnh viện Nhi Trung ương theo tiêu chuẩn đã được mô tả trước đây [2, 3].

2.2. Phương pháp nghiên cứu.

Thiết kế nghiên cứu: mô tả loạt ca.



Quy trình xác định đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD/BMD

2.3 Địa điểm nghiên cứu

- + Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội
- + Thời gian nghiên cứu 1/2011 - 12/1013

2.4 Các quy trình và kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- + Kỹ thuật MLPA xác định đột biến xóa đoạn và lặp đoạn
- + Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến điểm

2.5. Đề tài tuân thủ chặt chẽ đạo đức nghiên cứu trong Y học.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA, RNA, tổng hợp cDNA

3.2. Kết quả xác định đột biến gen dystrophin

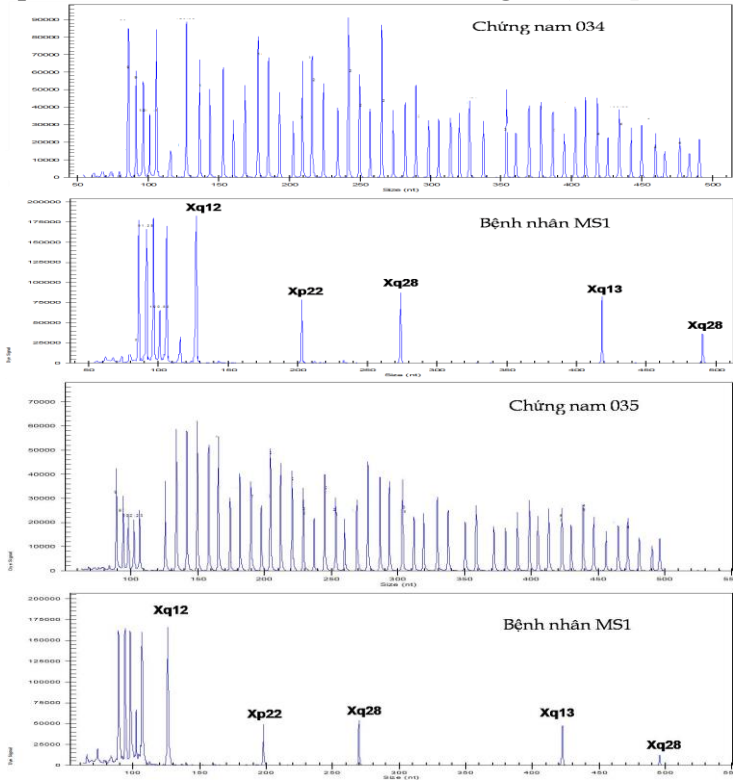
Nghiên cứu phát hiện được 182/201 trường hợp bệnh nhân có đột biến gen dystrophin gây bệnh DMD/BMD, chiếm tỷ lệ 91%. Số bệnh nhân chưa phát hiện được 19/201 trường hợp, chiếm tỷ lệ 9%.

3.2.1. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA

3.2.1.1 Kết quả xác định đột biến xóa đoạn gen

Trong nghiên cứu này tất cả 201 mẫu DNA đều được xác định đột biến gen bằng kỹ thuật MLPA. DNA của bệnh nhân được phân tích toàn bộ 79 exon tìm đột biến xóa đoạn và lắp đoạn bằng 2 probemix P34 và P35. Mỗi phản ứng MLPA đều chạy kèm mẫu đối chứng là người nam bình thường không mang gen dystrophin đột biến.

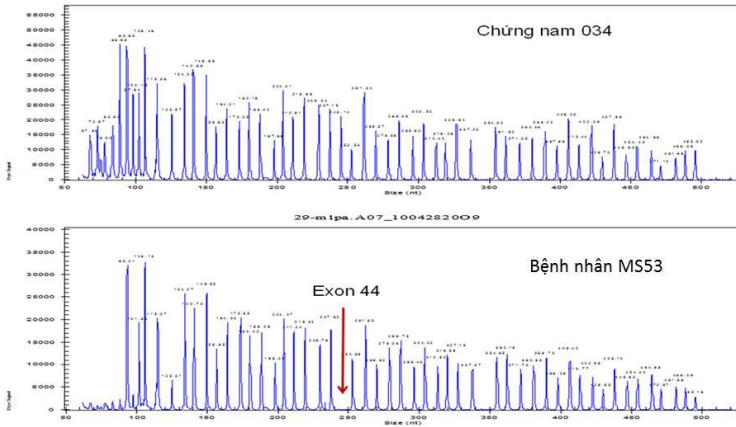
Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa toàn bộ gen dystrophin



Hình 3.3. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS1

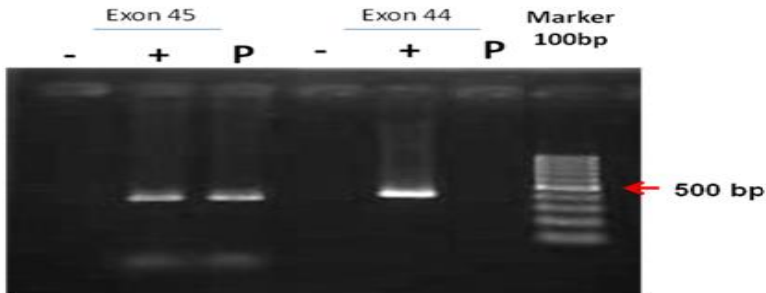
Nhận xét: Kết quả MLPA hình 3.3 cho thấy, so với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon từ 1-79 ở mẫu bệnh nhân bị mất hoàn toàn, trong khi đó các sản phẩm PCR của gen nội chuẩn (Xq12, Xp22, Xq28, Xq13) vẫn xuất hiện đỉnh cho thấy chất lượng DNA đạt yêu cầu. Điều đó chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn toàn bộ 79 exon trên gen dystrophin

Kết quả bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn đơn lẻ 1 exon gen dystrophin



Hình 3.7. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS53.

Nhận xét: Kết quả MLPA hình 3.7 cho thấy, so với với mẫu đối chứng nam, sản phẩm PCR tương ứng với các đỉnh của exon 44 bị mất hoàn toàn chứng tỏ bệnh nhân bị đột biến xóa đoạn exon 44. Đây là trường hợp mất đỉnh đơn lẻ nên phải kết hợp với kỹ thuật PCR để khẳng định.



Hình 3.8. Kết quả điện di sản phẩm PCR của DNA bệnh nhân MS53 với cặp mồi 44,45. (-) đối chứng âm, (+) đối chứng dương, (P) mẫu bệnh nhân

Nhận xét: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR exon 44, exon 45 cho thấy, ở mẫu đối chứng xuất hiện vạch PCR ở cả 2 exon 44 và 45 trong khi đó ở bệnh nhân chỉ xuất hiện vạch PCR ở exon 45 mà không xuất hiện vạch PCR ở exon 44, chứng tỏ bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon 44.

Bảng 3.1. Kết quả phát hiện đột biến xóa đoạn gen dystrophin

Exon xóa đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)	Exon xóa đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)
Exon 1-79	1	DMD	Outframe	Exon 40-43	1	DMD	Outframe
Exon 1-34	1	DMD	Inframe	Exon 42-43	1	DMD	Outframe
Exon 2-13	2	DMD	Outframe	Exon 43-52	1	DMD	Outframe
Exon 3	1	BMD	Inframe	Exon 44	6	DMD	Outframe
Exon 3-7	4	DMD	Outframe	Exon 45	1	DMD	Outframe
Exon 3-13	1	DMD	Inframe	Exon 45-46	1	BMD	Inframe
Exon 3- 17	1	DMD	Outframe	Exon 45-47	4	BMD	Inframe
Exon 3-21	1	DMD	Outframe	Exon 45-48	1	BMD	Inframe
Exon 3-43	1	DMD	Outframe	Exon 45-50	7	DMD	Outframe
Exon 3-44	1	DMD	Inframe	Exon 45-52	7	DMD	Outframe
Exon 3-45	1	DMD	Outframe	Exon 45-55	1	BMD	Inframe
Exon 3-47	1	DMD	Inframe	Exon 46-47	1	DMD	Outframe
Exon 5-27	1	DMD	Inframe	Exon 46-49	1	DMD	Outframe
Exon 5-37	1	DMD	Inframe	Exon 46-50	6	DMD	Outframe
Exon 8	1	DMD	Outframe	Exon 46-51	4	DMD	Outframe
Exon 8-9	4	DMD	Outframe	Exon 46-52	1	DMD	Outframe
Exon 8-12	1	DMD	Outframe	Exon 46-55	2	DMD	Outframe
Exon 8-13	1	DMD	Outframe	Exon 47	4	BMD	Inframe
Exon 8-43	1	DMD	Outframe	Exon 47-48	1	BMD	Inframe
Exon 8-46	1	DMD	Outframe	Exon 48-50	11	DMD	Outframe
Exon 10-17	1	DMD	Outframe	Exon 48-52	2	DMD	Outframe
Exon 11-39	1	DMD	Inframe	Exon 49-50	6	DMD	Outframe
Exon 11-41	1	DMD	Inframe	Exon 49-52	8	DMD	Outframe
Exon 12-34	1	DMD	Outframe	Exon 49-54	1	DMD	Outframe
Exon 15-19	1	DMD	Outframe	Exon 50-52	3	DMD	Outframe
Exon 16-17	1	DMD	Outframe	Exon 51	5	DMD	Outframe
Exon 16-19	1	DMD	Outframe	Exon 51-52	1	BMD	Inframe
Exon 17	1	DMD	Outframe	Exon 51-53	1	DMD	Outframe
Exon 19-50	1	DMD	Outframe	Exon 51-55	1	DMD	Outframe
Exon 30-43	1	DMD	Outframe	Exon 52	4	DMD	Outframe
Exon 31-43	1	DMD	Outframe	Exon 56-62	1	DMD	Outframe
Exon 32	1	BMD	Inframe	Exon 61-67	1	DMD	Inframe
Exon 38-43	1	DMD	Outframe				

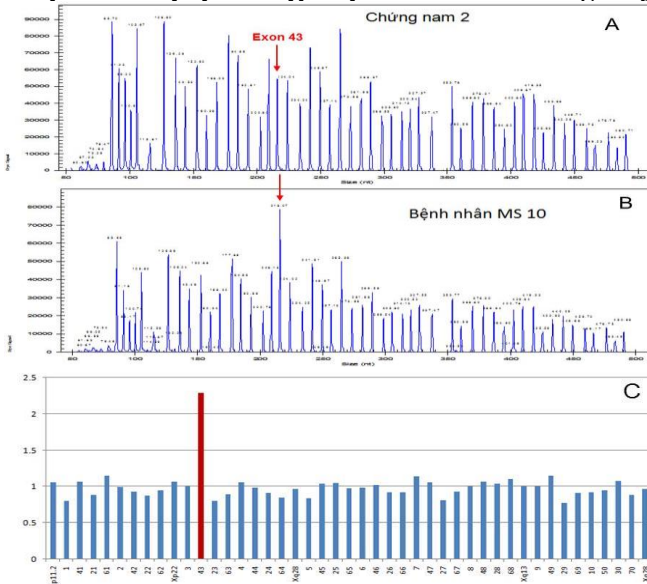
Outframe: Đột biến gây lệch khung dịch mã; Inframe: Đột biến không gây lệch khung dịch mã

Nhận xét: Bằng kỹ thuật MLPA đã phát hiện được 137/201 bệnh nhân BMD/DMD có đột biến xóa đoạn, trong đó có 24/137 bệnh nhân có đột biến xóa đơn lẻ một exon, 2/137 bệnh nhân có đột biến nằm ngoài vùng hotspot. Phát hiện 1/137 bệnh nhân có đột biến xóa toàn bộ 79 exon, có 24 đột biến xóa đoạn nhưng không làm lệch khung dịch mã (inframe), 113 đột biến gây lệch khung dịch mã (outframe).

3.2.1.2 Kết quả xác định đột biến lặp đoạn gen

Tất cả bệnh nhân không có đột biến xóa đoạn đều được phân tích dựa trên RPA để tìm đột biến lặp đoạn theo công thức của tác giả Lai K.K và cộng sự [44].

Kết quả bệnh nhân bị đột biến lặp đoạn đơn lẻ 1 exon trên gen dystrophin



Hình 3.7. Kết quả MLPA của bệnh nhân MS10

(A) chứng nam P034 (B) Bệnh nhân MS10 với probmix P034

(C) Kết quả phân tích dựa trên RPA.

Nhận xét: Đối với bệnh nhân MS10 hình ảnh MLPA tại probe tương ứng với exon 43 thấy cường độ tín hiệu của đỉnh cao hơn so với chứng nam. Sau khi phân tích dựa trên RPA có tỉ lệ RPR tại exon 43 của bệnh nhân so với chứng nam lớn hơn 2 trong khi tỉ lệ RPR của các exon khác giao động xung quanh 1. Chứng tỏ bệnh nhân có đột biến lặp đoạn đơn lẻ exon 43.

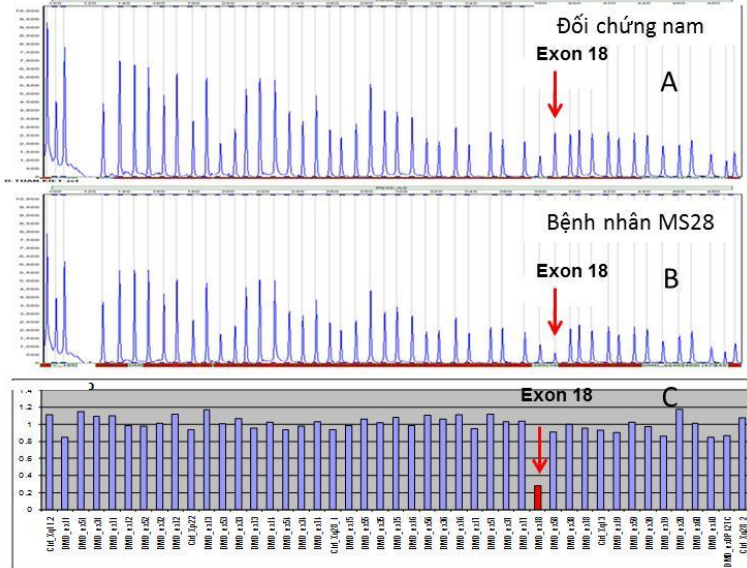
Bảng 3.2. Kết quả phát hiện đột biến lặp đoạn trên gen dystrophin

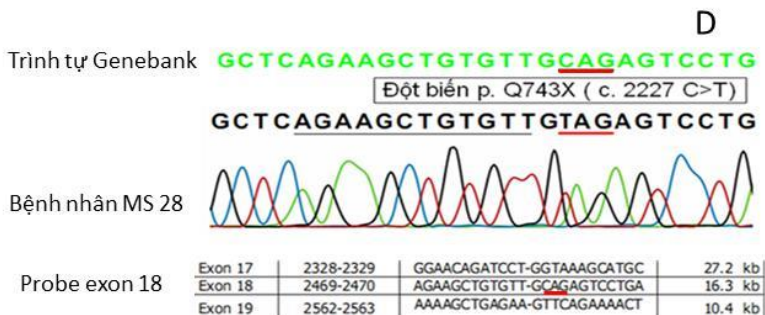
Exon lặp đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)	Exon lặp đoạn	Số lượng	Thể bệnh (phenotype)	Kiểu gen (genotype)
Exon 2	1	DMD	Outframe	Exon 19	1	DMD	Outframe
Exon 2-4	1	DMD	Outframe	Exon 19-34	1	DMD	Outframe
Exon 3-9	1	BMD	Inframe	Exon 31-34	1	DMD	Inframe
Exon 3-17	1	DMD	Outframe	Exon 43	1	DMD	Outframe
Exon 3-7	1	DMD	Outframe	Exon 61-63	1	DMD	Outframe
Exon 11-20, Exon 51-60	1	DMD	Outframe	Exon 62	1	DMD	Outframe
Exon 14-17	1	DMD	Outframe	Exon 5-7	1	DMD	Outframe

Outframe: Đột biến gây lệch khung dịch mã; Inframe: Đột biến không gây lệch khung dịch mã

Nhận xét: Bảng phân tích dựa trên RPA và trên cường độ tín hiệu của sản phẩm PCR tương ứng với mỗi exon so với chứng đã phát hiện được 14 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn, trong đó có 5/14 đột biến lặp đoạn exon đơn lẻ, 1/14 bệnh nhân có lặp đoạn 2 vùng, 8/14 đột biến lặp đoạn nhiều exon.

Kết quả bệnh nhân có đột biến điểm ở vùng probe của exon 18





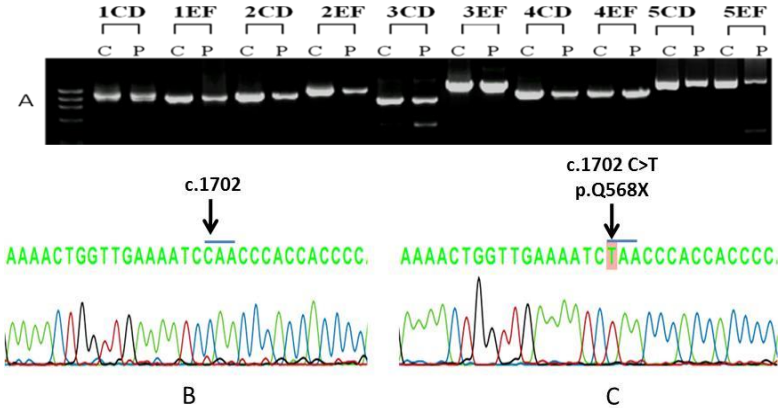
Hình 3.12. Kết quả xác định đột biến gen của bệnh nhân mã số MS28
 (A) chứng nam P034, (B) Bệnh nhân MS28 với probmix P034, (C) Kết quả phân tích dựa trên RPA, (D) Kết quả giải trình tự so với trình tự Genebank (exon 18) và probe exon 18 cho phản ứng MLPA. Vạch màu đỏ dưới các trình tự nucleotid là vị trí của bộ 3 acid amin bị đột biến.

Nhận xét: Trên hình ảnh MLPA của bệnh nhân MS28, sản phẩm PCR tương ứng với đỉnh của exon 18 có xuất hiện đỉnh nhưng tín hiệu rất thấp, kết quả này cho thấy có thể bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon 18. Chúng tôi kiểm tra xem exon 18 có thực sự bị xóa đoạn hay không bằng kỹ thuật PCR, kết quả cho thấy vẫn xuất hiện vạch PCR tương ứng với sản phẩm của exon 18 chứng tỏ bệnh nhân không bị xóa đoạn exon 18. Sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự gen, kết quả cho thấy xuất hiện đột biến điểm tại vị trí c.2227C>T, đột biến này nằm tại vị trí gắn probe của exon 18 nên đã làm ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại exon 18 của phản ứng MLPA, làm cho đỉnh tín hiệu thu được thấp hơn so với mẫu đối chứng.

3.2.2. Kết quả xác định đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự gen

Kết quả bệnh nhân bị đột biến thay thế 1 nucleotid tạo stop codon

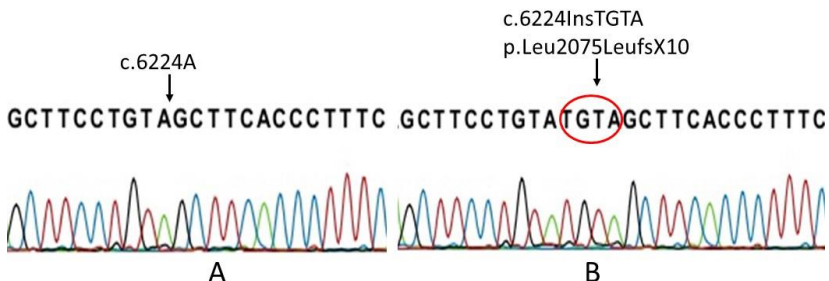
Những bệnh nhân không phát hiện đột biến xóa đoạn, lặp đoạn được tiến hành giải trình tự ở mức độ cDNA. Sử dụng kỹ thuật RT-nested PCR để khuếch đại toàn bộ chiều dài cDNA của gen dystrophin tương ứng với 10 đoạn gen khác nhau. Sản phẩm RT-nested PCR sẽ được giải trình tự gen.



Hình 3.13. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân mã số MS123
 (A) Hình ảnh điện di sản phẩm RT-PCR của bệnh nhân mã số MS123; (B) Kết quả giải trình tự cDNA của mẫu chứng; (C) Kết quả giải trình tự cDNA mẫu bệnh nhân.

Nhận xét: Hình ảnh điện di RT-nested PCR cho thấy sản phẩm rõ nét, đặc hiệu theo như kích thước đã tính toán và bằng với mẫu đối chứng. Sản phẩm RT-PCR được giải trình tự, so sánh với trình tự GeneBank cho thấy có đột biến thay thế nucleotid C thành T tại vị trí 1702 trên cDNA, làm thay đổi bộ ba mã hóa CAA thành TAA tạo nên mã kết thúc sớm. Kết quả trên cho thấy bệnh nhân có đột biến c.1702C>T (p.Q568X) tại exon 14 của gen dystrophin.

Kết quả bệnh nhân bị đột biến thêm 4 nucleotid



Hình 3.14. Kết quả phân tích cDNA của bệnh nhân MS128
 (A) Kết quả giải trình tự cDNA của mẫu chứng; (B) Kết quả giải trình tự cDNA mẫu bệnh nhân MS128.

Nhận xét: Trên kết quả giải trình tự cho thấy bệnh nhân MS128 có đột biến thêm 4 nucleotid TGTA tại vị trí c.6224 trên exon 43 của gen dystrophin. Đột biến thêm 4 nucleotid này đã tạo thành vị trí kết thúc sớm tại acid amin thứ 10 bắt đầu từ vị trí đột biến làm cho protein dystrophin bị cắt ngắn.

Bảng 3.3. Kết quả đột biến điểm trên gen dystrophin

TT	MSNC	Đột biến trên c.DNA	Exon	Biến đổi protein	Thể bệnh
1	MS127	c.184ins C	Exon 3	p.Leu61profsX27	DMD
2	MS134	c.433C>T	Exon 6	p.Arg145X	DMD
3	MS189	c.724C>T	Exon 8	p.Gln252X	DMD
4	MS138	c.1062G>A	Exon 10	p.Trp345X	DMD
5	MS129	c.2797C>T	Exon 11	p.Gln933X	DMD
6	MS132	c.1201C>T	Exon 11	p.Gln401X	DMD
7	MS137	c.1492G>T	Exon 13	p.Glu498X	DMD
8	MS123	c.1702C>T	Exon 14	p.Gln568X	DMD
9	MS126	c.1827A>T	Exon 16	p.Lys613X	DMD
10	MS28	c.2227C>T	Exon 18	p.Gln743X	DMD
11	MS176	c.2365G>T	Exon 19	p.Glu789X	DMD
12	MS144	c.2302C>T	Exon 19	p.Arg768X	DMD
13	MS122	c.2569C>T	Exon 20	p.Gln856X	DMD
14	MS196	c.2887delT	Exon 22	p.Ser963Pfsx40	DMD
15	MS200	c.3151C>T	Exon 23	p.Arg1051X	DMD
16	MS141	c.3347-3350delAGAA	Exon 25	p.Lys1116MetfsX15	DMD
17	MS159	c.3580C>T	Exon 26	p.Gln1194X	DMD
18	MS131	c.3715InsTAAATAG	Exon 27	p.Glu1438X	DMD
19	MS139	c.3767InsT	Exon 27	p.Gly1256ValfsX15	DMD
20	MS162	c.3766,3767InT	Exon 27	p.Gly1256Valfs15X15	DMD
21	MS184	c.3940C>T	Exon 29	p.Arg1314X	DMD
22	MS130	c.4212,4213 del TC	Exon 30	p.Gln1405fsX11	DMD
23	MS146	c.4186InA	Exon 30	p.Tyr1396Xfs	DMD
24	MS180	c.4729C>T	Exon 34	p.Arg1577X	DMD
25	MS171	c.5530C>T	Exon 39	p.Arg1844X	DMD
26	MS187	c.5899C>T	Exon 41	p.Arg1967X	DMD
27	MS121	c.6274 Ins TA	Exon 43	p.Tyr2092LeufsX22	DMD
28	MS124	c.6237,6238 del CC	Exon 43	p.Ser2079Serfs2X	DMD
29	MS128	c.6224InsTGTA	Exon 43	p.Leu2075LeufsX10	DMD
30	MS125	c.7522G>T	Exon 51	p.Glu2508X	DMD
31	MS207	9361+1 G>A	intron 64		BMD

3.3 Bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam

3.3.1. Phân bố các dạng đột biến gen dystrophin

Sử dụng kỹ thuật MLPA, RT-nested PCR và giải trình tự gen để xác định đột biến xóa đoạn, đột biến lặp đoạn và đột biến điểm trên toàn bộ 79 exon của gen dystrophin. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen dystrophin được chỉ ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen dystrophin

Loại đột biến	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Xóa đoạn	137	75,3
Lặp đoạn	14	7,7
Đột biến điểm	31	17,0
Tổng số	182	100

Nhận xét: 182/201 bệnh nhân DMD/BMD có đột biến gen dystrophin, trong đó đột biến xóa đoạn 137/182 chiếm 75,3%, đột biến lặp đoạn 14/182 (7,7%), đột biến điểm 31/182 (17%).

Bảng 3.5. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến gen trên bệnh nhân DMD và BMD

Loại đột biến	Thể bệnh			
	DMD		BMD	
	n	%	n	%
Xóa đoạn	122	74	15	88
Lặp đoạn	13	8	1	6
Đột biến điểm	30	18	1	6
Tổng số	165	100	17	100

Nhận xét: Số lượng bệnh nhân DMD được phát hiện đột biến là 165 trường hợp chiếm tỷ lệ 91%. Trong đó 122/165 trường hợp xóa đoạn chiếm 74%. Đột biến lặp đoạn 13/165 trường hợp chiếm 8% và đột biến điểm 30/165 trường hợp chiếm 18%. Số lượng bệnh nhân BMD được phát hiện đột biến là 17 trường hợp. Trong đó đột biến xóa đoạn chiếm đa số với 15/17 trường hợp chiếm 88%, còn lại đột biến lặp đoạn 1/17 trường hợp chiếm 6%, đột biến điểm 1/17 (6%).

3.3.2. Phân bố các dạng đột biến xóa đoạn gen dystrophin

Bảng 3.6. Tỷ lệ các dạng đột biến xóa đoạn

Loại đột biến	Số lượng (n=137)	Tỷ lệ (%)
Xóa đơn lẻ 1 exon	24	17.5
Xóa nhiều exon	111	81.0
Xóa exon ngoài vùng hotspot	2	1.5

Nhận xét: Với 137 trường hợp đột biến xóa đoạn: có 24/137 xóa đơn lẻ một exon, 2/137 xóa đoạn ngoài vùng hotspot, 111/137 trường hợp xóa đoạn nhiều exon.

Bảng 3.7. Tỷ lệ phân bố vùng đột biến xóa đoạn

Vùng đột biến xóa đoạn	Số lượng (n=137)	Tỷ lệ (%)
Xóa đoạn vùng 5' tận (Exon 1-20)	25	18.2
Xóa đoạn vùng trung tâm (Exon 40-53)	97	70.8
Xóa đoạn dài 5' tận – Vùng trung tâm	12	8.8
Xóa vị trí khác	3	2.2

Nhận xét: Trong số 137 trường hợp đột biến xóa đoạn phát hiện được: Xóa đoạn vùng trung tâm chiếm phần lớn 97/137 chiếm tỷ lệ 70.8%, tiếp theo là vùng 5' 12/137 chiếm tỷ lệ 18%, xóa đoạn dài từ vùng 5' tới vùng trung tâm 12/137 chiếm tỷ lệ 12%, còn lại là các đột biến xóa đoạn ở vùng khác.

3.3.3. Phân bố các dạng đột biến lặp đoạn gen dystrophin

Bảng 3.8. Tỷ lệ phân bố vùng đột biến lặp đoạn

Vùng đột biến lặp đoạn	Số lượng (n=14)	Tỷ lệ (%)
Lặp đoạn vùng 5' tận (Exon 1-20)	8	57
Lặp đoạn vùng trung tâm (Exon 40-53)	1	7
Lặp đoạn dài 5' tận – vùng trung tâm	1	7
Lặp đoạn vị trí khác	4	29

Nhận xét: Trong số 14 trường hợp đột biến lặp đoạn phát hiện được: Lặp đoạn vùng 5' tận chiếm phần lớn 8/14 chiếm tỷ lệ 57%, tiếp theo là lặp đoạn ở ngoài vùng 5' tận và vùng trung tâm 4/14 chiếm tỷ lệ 29%, 1/14 (7%) trường hợp có đột biến lặp đoạn ở vùng trung tâm và 1/14 (7%) trường hợp có đột biến lặp đoạn dài từ vùng 5' tới vùng trung tâm.

Bảng 3.9. Tỷ lệ các dạng đột biến lặp đoạn

Loại đột biến lặp đoạn	Số lượng (n=14)	Tỷ lệ (%)
Lặp đoạn đơn lẻ 1 exon	4	29
Lặp đoạn nhiều exon	9	64
Lặp đoạn 2 vùng trên gen dystrophin	1	7

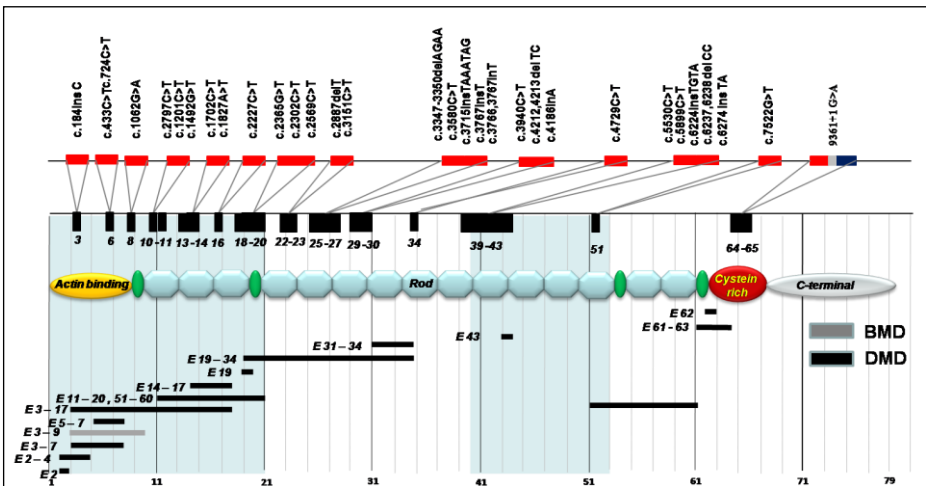
Nhận xét: Với 14 trường hợp đột biến lặp đoạn: có 4/14 lặp đoạn đơn lẻ một exon, 1/14 lặp đoạn hai vùng, 9/14 trường hợp lặp đoạn nhiều exon.

3.3.4. Phân bố các dạng đột biến điểm gen dystrophin

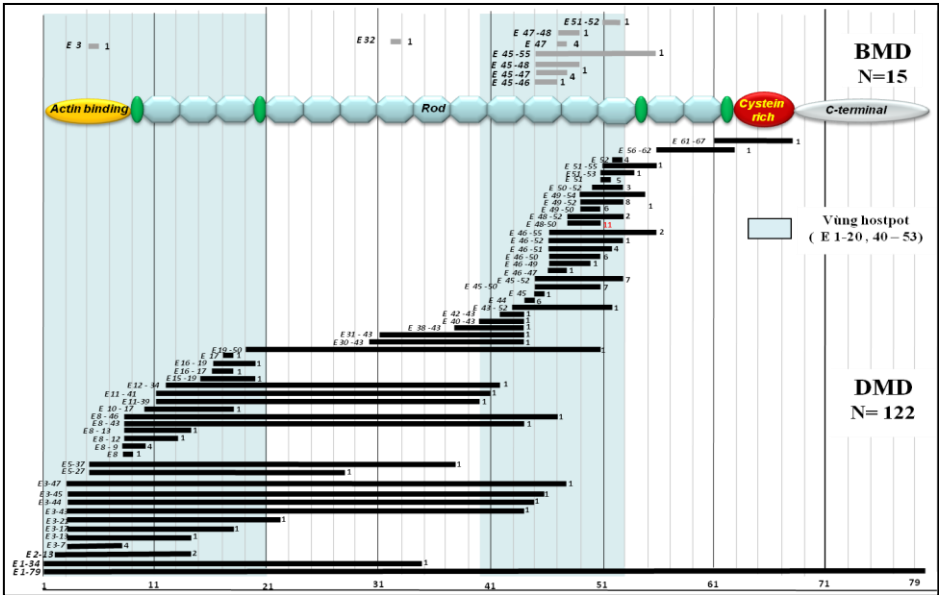
Bảng 3.10. Tỷ lệ phân bố các dạng đột biến điểm

Loại đột biến	Số lượng (n=31)	Tỷ lệ (%)
Tạo stop codon	20	65
Xóa, thêm nucleotid	10	32
Đột biến tại vị trí splicing	1	3

Nhận xét: Với kỹ thuật giải trình tự trực tiếp chúng tôi đã phát hiện được 31 trường hợp đột biến điểm trong đó đột biến tạo stop codon chiếm ưu thế với 20 trường hợp. Đột biến thêm và xóa nucleotid là 10 trường hợp. 1 trường hợp có đột biến tại vị trí splicing.



Hình: Bản đồ đột biến lặp đoạn, đột biến điểm gen dystrophin



Hình: Bản đồ đột biến xóa đoạn gen dystrophin

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Quy trình tách chiết DNA, RNA và tổng hợp cDNA

4.2. Xác định đột biến gen dystrophin

4.2.1. Xác định đột biến bằng kỹ thuật MLPA

Kỹ thuật MLPA là kỹ thuật có thể khuếch đại về sự đa dạng trong số lượng các bản sao ở một vài gen khác nhau. Dựa vào ưu điểm này, MLPA thường được sử dụng trong chẩn đoán ở cấp độ phân tử một vài bệnh lý di truyền mà nguyên nhân gây bệnh là do hiện tượng bị xóa bỏ hay bị nhân đôi của các gen đặc hiệu. Phương pháp MLPA trong vài năm gần đây là một kỹ thuật được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu về di truyền để chẩn đoán ở mức độ phân tử một số bệnh. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật MLPA đã sử dụng với bộ kit đã được thương mại hóa là **SALSA MLPA KIT P034-A2/P035-A2** của công ty MRC Hà Lan. Probemix P034/P035 DMD này chứa các probe cho mỗi exon của gen DMD trên vị trí Xp21.2 của nhiễm sắc thể. Ngoài ra, có một probe cho exon DP427c. Bộ Kit gồm 80 probe được chia thành 2 probemix: P034 và P035. Như vậy, với việc thực hiện hai phản ứng MLPA, đủ để khảo sát số lượng bản sao của tất cả 79 exon trên gen

dystrophin. Trong mỗi probemix, ngoài 40 probe đặc hiệu cho 40 exon của gen dystrophin còn có 5 probe tham chiếu đóng vai trò như chứng nội đảm bảo kiểm soát chất lượng cho mỗi phản ứng MLPA. MLPA là một kỹ thuật mới tại Việt Nam với nhiều ưu điểm vượt trội, chỉ cần 2 phản ứng PCR với thời gian là 2 ngày kỹ thuật MLPA có thể kiểm tra được toàn bộ 79 exon trên gen dystrophin để phát hiện đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen là chiếm 65-75%. Trong nghiên cứu này, toàn bộ 201 bệnh nhân được áp dụng kỹ thuật MLPA để xác định đột biến gen. Kết quả thu được sau khi chạy bằng máy điện di mao quản sẽ được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng để xác định bệnh nhân có đột biến xóa đoạn hay lặp đoạn gen. Bằng kỹ thuật MLPA, đã phát hiện 152 trường hợp có đột biến xóa đoạn và lặp đoạn chiếm tỉ lệ 75%. Trong đó xóa đoạn là 137/201 trường hợp chiếm tỉ lệ 68%, lặp đoạn 14 trường hợp chiếm tỉ lệ 7%. Kỹ thuật MLPA có ưu điểm là phát hiện được toàn bộ đột biến xóa đoạn trên 79 exon của gen dystrophin mà các kỹ thuật như multiplex PCR cổ điển không phát hiện được. Với kỹ thuật multiplex PCR, hai tác giả là chamberlain và Begg đã thiết kế từ năm 1988 và 1990 dùng để phát hiện các đột biến phổ biến ở 2 vùng đột biến trọng điểm là vùng 5' tận (exon 1-20) và vùng trung tâm (exon 40-53), và như vậy chỉ phát hiện được 19 exon mà không phát hiện được các đột biến ở ngoài vùng này. Trong nghiên cứu này, ngoài những đột biến xóa đoạn hay gặp được phát hiện nghiên cứu còn phát hiện được 14 bệnh nhân có đột biến lặp đoạn và 2 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn nằm ngoài vùng hotspot. Với ưu điểm như vậy MLPA được xem như là một kỹ thuật hữu dụng nhất trong việc xác định đột biến xóa đoạn và lặp đoạn gen dystrophin. Theo nghiên cứu của Tanja Latic và cộng sự năm 2005, áp dụng kỹ thuật MLPA trên 133 trường hợp tác giả phát hiện được 88 trường hợp đột biến chiếm tỉ lệ 66%. Trong số các bệnh nhân có đột biến xóa đoạn, kết quả thu được ở bệnh nhân MS1 cho thấy có sự vắng mặt tất cả các sản phẩm khuếch đại của các probe tương ứng với 79 exon của gen dystrophin. Trong khi đó, các sản phẩm khuếch đại tương ứng với các probe tham chiếu và nội chuẩn vẫn có mặt. Điều này chứng tỏ chất lượng DNA tách chiết từ máu ngoại vi của bệnh nhân đảm bảo yêu cầu và quy trình kỹ thuật MLPA là diễn ra bình thường. Điều này chứng tỏ rằng bệnh nhân MS1 có đột biến xóa đoạn toàn bộ 79 exon của gen dystrophin. Đây là đột biến gây bệnh cảnh lâm sàng nặng vì protein dystrophin hoàn toàn không được tổng hợp. Kết quả phân tích gen cũng hoàn toàn tương đồng với đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân: Bệnh nhân xuất hiện yếu cơ ngay từ khi còn nhỏ lúc 3 tuổi, dấu hiệu giả phì đại cơ cẳng chân rõ, khó khăn khi leo cầu thang, nồng

độ CK trong máu tăng rất cao (15.000 UI/l) và bệnh nhân đã hoàn toàn mất khả năng đi lại từ năm 9 tuổi, sớm hơn so với các bệnh nhân DMD khác là thường mất khả năng đi lại lúc 12 hoặc 13 tuổi. Ở bệnh nhân mã số nghiên cứu 3 MS3, kết quả phân tích MLPA cho thấy bệnh nhân có đột biến xóa đoạn từ exon 61-67. Tương tự như bệnh nhân có mã số nghiên cứu MS24, đột biến này cũng không gây lệch khung dịch mã, và theo như lý thuyết sẽ gây nên thể bệnh nhẹ BMD, tuy nhiên trên lâm sàng bệnh nhân có biểu hiện ở thể bệnh nặng DMD. Điều này có thể giải thích là do bệnh nhân bị đột biến ở vùng C tận, đây là vùng có chức năng rất quan trọng đối với protein dystrophin, vùng liên kết màng tế bào, vì vậy đột biến ở vùng này sẽ làm mất khả năng liên kết gây nên thể bệnh nặng. Đối với các trường hợp đột biến xóa đoạn exon đơn lẻ, do một trong những hạn chế của kỹ thuật MLPA là các probe không bắt cặp hoặc bắt cặp kém với exon tương ứng khi tại vị trí bắt cặp có đột biến điểm. Vì vậy, trên hình ảnh MLPA thu được sẽ mất hoặc giảm độ cao của đỉnh tương ứng, giống với hình ảnh xóa đoạn 1 exon. Cho nên, đối với những đột biến xóa đoạn đơn lẻ một exon thu được bằng kỹ thuật MLPA, phải kiểm tra lại bằng PCR cổ điển với cặp mồi tương ứng để tránh trường hợp đột biến giả. Trong nghiên cứu này, bằng kỹ thuật MLPA và kỹ thuật PCR cổ điển, đã phát hiện được 24 bệnh nhân có đột biến xóa đoạn exon đơn lẻ, chiếm tỉ lệ 17.5 % trong tổng số bệnh nhân có đột biến xóa đoạn. Trong số 24 trường hợp phát hiện bằng kỹ thuật MLPA, một trường hợp xóa đoạn đơn lẻ exon 18. Kết quả này không phù hợp với kết quả kiểm tra lại bằng kỹ thuật PCR khi khuếch đại exon 18. Tiến hành giải trình tự exon 18 đã phát hiện ra bệnh nhân có đột biến điểm c.2227C>T (p.Q743X) . Đột biến này nằm tại vị trí gần probe của exon18 trong phản ứng MLPA, nên đã ngăn cản sự bắt cặp của probe này hoặc làm ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại exon 18 của phản ứng MLPA, làm cho đỉnh tín hiệu thu được không rõ ràng. Điều này diễn giải kết quả thu được bằng kỹ thuật MLPA. Về tỉ lệ đột biến xóa đoạn, trong nghiên cứu này đã đạt được là 68%, so với các nghiên cứu khác trên thế giới có sự khác biệt. Trong nghiên cứu của tác giả Trimarco (2008) trên quần thể Italia tỉ lệ xóa đoạn là 74.5%. So sánh với một số nước ở khu vực châu Á cho thấy: Nghiên cứu trên bệnh nhân DMD/BMD Trung quốc với cỡ mẫu là 249, Zeng và cộng sự (2008) đã đưa ra tỉ lệ đột biến xóa đoạn là 65%. Nghiên cứu của tác giả Hwa (2007) trên bệnh nhân DMD/BMD Đài loan thì tỉ lệ đột biến xóa đoạn thấp với 36%. Trong khi đó nghiên cứu trên bệnh nhân DMD/BMD Mỹ của 3 tác giả Gaudio (2008) với cỡ mẫu 97 bệnh nhân và Hegde (2008) White (2002) với cỡ mẫu 102 bệnh nhân tỉ lệ xóa đoạn cũng thấp hơn

so với nghiên cứu này, tỉ lệ tìm thấy lần lượt là 17.5%, 40% và 36%. Về phân bố vùng đột biến xóa đoạn trong nghiên cứu này cho thấy, đột biến xóa đoạn tập trung chủ yếu vùng trung tâm với 97 trường hợp chiếm tỉ lệ 70.8%, tiếp theo là vùng 5' với tỉ lệ 18.2 %, đột biến xóa đoạn dài từ vùng 5' tận tới vùng trung tâm là 12 trường hợp chiếm tỉ lệ 8.8 %. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu ở một số quốc gia khác như Đức với tỉ lệ đột biến vùng trung tâm lên tới 92.5% tiếp theo là các quốc gia Nhật Bản, Nga, Thổ Nhĩ Kỳ, Israel, Hy Lạp, Tây Ban Nha và Nam Ấn Độ với tỉ lệ giao động trong khoảng từ lần lượt là 76.6-81%. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Chaudhary năm 2009. Trong nghiên cứu này khi phân tích lặp đoạn, chúng tôi sử dụng công thức của tác giả Lai và cộng sự (2006) như đã được nêu ở phần phương pháp nghiên cứu. Ở bệnh nhân mã số MS120, trên hình ảnh MLPA thu được đỉnh tương ứng với exon 62 cao hơn đỉnh của exon 62 của mẫu chứng, trong khi đó chiều cao các đỉnh tương ứng với các exon khác tương đối bằng nhau. Sau khi tính toán tỉ lệ RPR exon 62 của bệnh nhân so với mẫu chứng, tỉ lệ RPR exon 62 của bệnh nhân gần bằng 2. Điều này chứng tỏ có sự lặp đoạn exon 62 ở bệnh nhân mã số MS120. Trên bệnh nhân khác có mã số 110, dựa trên hình ảnh MLPA thu được và sau khi tính toán tỉ lệ RPR cũng đi đến kết luận bệnh nhân có lặp đoạn exon 3-7. Với ưu điểm kỹ thuật MLPA đã phát hiện được thêm 14 trường hợp có đột biến lặp đoạn trên tổng số 201 bệnh nhân phân tích chiếm tỉ lệ 7%. Tỉ lệ này tương đồng với một số nghiên cứu khác trên thế giới. Nghiên cứu của Casanar (2010) và Latic (2005) tỉ lệ phát hiện thấy đột biến lặp đoạn là 7.3%. Nghiên cứu trên bệnh nhân Trung Quốc của tác giả Wang (2008) và Zeng (2008) lần lượt phát hiện được đột biến lặp đoạn là 6.2% và 5%. Một nghiên cứu khác của tác giả Takeshima (2010) và cộng sự trên 442 bệnh nhân Nhật tỉ lệ phát hiện đột biến lặp đoạn là 8% [55]. Tuy nhiên, tỉ lệ đột biến lặp đoạn lại khá cao trên quần thể Mỹ với các tỉ lệ lần lượt là 26.4%, 25%, 14.4% của các tác giả White (2002), Hegde (2008), Gaudio (2008). Đây là điểm mới trong nghiên cứu của này so với các nghiên cứu trước đó ở Việt Nam. Về phân bố vùng đột biến lặp đoạn trong nghiên cứu này cho thấy, đột biến lặp đoạn tập trung chủ yếu vùng 5' tận với 8 trường hợp chiếm tỉ lệ 57%, vùng trung tâm chiếm tỉ lệ thấp với 1 trường hợp, chiếm tỉ lệ 7 % và 1 trường hợp bệnh nhân có đột biến kéo dài từ vùng 5' tận đến vùng trung tâm chiếm tỉ lệ 7%. Ngoài ra 4 bệnh nhân có đột biến ở ngoài vùng 5' tận và vùng trung tâm chiếm tỉ lệ 29%. Kết quả nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu ở một số quốc gia khác. Trong nghiên cứu này tỉ lệ lặp đoạn và xóa đoạn thu được là 75% gần

với nghiên cứu của Antonella Carsana (81.1%) của Trimarco (84.6 % trong tổng số 506 bệnh nhân nghiên cứu. Cao hơn nhiều so với các nghiên cứu ở Mỹ, Đức và Đài Loan. Ở Việt Nam, các nghiên cứu đa số mới chỉ dừng ở mức độ xác định đột biến xóa đoạn bằng kỹ thuật Multiplex PCR như các nghiên cứu của Nguyễn Thị Phương năm 2002, Nguyễn Thị Phương Mai năm 2007. Tuy nhiên, các nghiên cứu bằng kỹ thuật Multiplex PCR với 19 cặp mồi chỉ xác định được các đột biến hay gặp ở vùng hotspot và không xác định được vị trí kết thúc của đột biến (deletion end point) đối với những đột biến xóa đoạn nhiều exon. Một kỹ thuật nữa có nhiều ưu điểm hơn đó là xác định đột biến xóa đoạn ở mức độ mRNA của tác giả Nguyễn Thị Băng Sương và cộng sự áp dụng. Với kỹ thuật này tác giả đã phát hiện được 20 trên tổng số 40 bệnh nhân nghiên cứu chiếm tỉ lệ 50%. Tỉ lệ này thấp hơn nhiều so với 68% đột biến xóa đoạn trong nghiên cứu này. Tuy là một kỹ thuật mới có nhiều ưu điểm hơn so với kỹ thuật PCR cổ điển hay Multiplex PCR nhưng kỹ thuật này cũng mới chỉ dừng lại ở mức phát hiện đột biến xóa đoạn và người mang gen xóa đoạn. So với kỹ thuật MLPA không những có thể phát hiện xóa đoạn, người mang gen xóa đoạn mà còn có thể phát hiện đột biến lặp đoạn và người mang gen lặp đoạn.

4.2.2. Đột biến điểm

Những bệnh nhân không phát hiện được đột biến bằng kỹ thuật MLPA sẽ được tiến hành giải trình tự toàn bộ 79 exon ở mức độ cDNA. Kết quả đã phát hiện được 31/201 (15%) bệnh nhân có đột biến điểm. Trong đó, 20 bệnh nhân có đột biến vô nghĩa (nonsense mutation) còn lại là các đột biến thêm nucleotid, mất nucleotid. Tỉ lệ về đột biến điểm trong nghiên cứu này so với tác giả Yasuhiro Takeshima và cộng sự khi nghiên cứu trên 442 bệnh nhân DMD Nhật bản là khá tương đồng. Tỉ lệ phát hiện được đột biến điểm trong nghiên cứu của Yasuhiro Takeshima và cộng sự là 16%. Trong 20 đột biến vô nghĩa có 14 đột biến thay thế nucleotid C>T, 1 đột biến thay thế nucleotid A>T và 3 đột biến thay thế nucleotid G>T, một đột biến G>A như trong các nghiên cứu khác trên số lượng bệnh nhân lớn ví dụ như của Kevin M. Flanigan năm 2009 và Yasuhiro Takeshima năm 2010 . Đối với bệnh nhân có đột biến vô nghĩa, quá trình tổng hợp protein dystrophin sẽ bị dừng lại khi xuất hiện bộ 3 kết thúc này. Như vậy, cấu trúc protein sẽ bị cắt ngắn và bị thay đổi làm mất chức năng, gây nên bệnh DMD. Trong nghiên cứu này đột biến thay thế nucleotid C bằng T là hay gặp nhất. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Takeshima và cộng sự (2010) với 33/40 trường hợp đột biến vô nghĩa. Các đột biến nằm rải rác các exon. Riêng ở exon 43 gặp 3 trường hợp bao gồm đột biến xóa đoạn và thêm

đoạn nhỏ. Đột biến mất và thêm đoạn nhỏ đa số làm lệch khung dịch mã gây nên bệnh DMD. Những đột biến này làm lệch khung dịch mã và tạo ra mã kết thúc sớm (stop codon). Ví dụ, đột biến c.6274 InsTA trên bệnh nhân MS121, đột biến này là đột biến thêm 2 nucleotid TA vào vị trí nucleotide 6274 trên cDNA. Đột biến này làm lệch khung dịch mã khi biến đổi bộ 3 TAC mã hóa acid amin Tyrosine (Y) thành bộ 3 TTA mã hóa acid amin Leucine (L). Không những vậy, đột biến này còn tạo ra stop codon ở vị trí acid amin 2114 (sau vị trí đột biến 22 acid amin). Đột biến này làm thay thế hoàn toàn cấu trúc và chức năng protein dystrophin gây lên bệnh DMD. Ở đột biến khác trên bệnh nhân MS146 có đột biến c.4186InsA, đột biến này tạo lên stop codon ngay tại vị trí đột biến. Về tỉ lệ các dạng đột biến điểm. Đột biến tạo mã kết thúc sớm (stop codon) chiếm ưu thế với 20/201 (10%) trường hợp, đột biến thêm hay xóa nucleotid chiếm tỉ lệ ít hơn với 10/201 (5%) trường hợp. Tỉ lệ này tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Takeshima (2010). Nghiên cứu cũng đã phát hiện được 1 bệnh nhân có đột biến tại vị trí splicing site làm ảnh hưởng đến quá trình phiên mã gen. Nghiên cứu này đã phát hiện được 90% bệnh nhân loạn dưỡng cơ Duchenne có đột biến gen dystrophin và 10% bệnh nhân DMD/BMD chưa phát hiện thấy đột biến gen dystrophin, điều này có thể do một số đột biến nằm ở vùng intron mà nghiên cứu này chưa tìm thấy.

4.3 Một số ứng dụng của bản đồ đột biến trong điều trị và chẩn đoán người mang gen

Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne là bệnh di truyền gây hậu quả nặng nề với bản thân bệnh nhân, gia đình và xã hội. Do chưa có thuốc điều trị triệt để nên việc điều trị bằng liệu pháp gen, chẩn đoán người mang gen và tư vấn di truyền sẽ giúp phần nâng cao chất cuộc sống cho bệnh nhân, gia đình. Trong nghiên cứu này với kết quả đột biến thu được từ bệnh nhân. Chúng tôi tiến hành các kỹ thuật phù hợp để xác định sự mang gen bệnh cho các người nhà bệnh nhân. Với sự biết trước các đột biến, việc xác định mang gen bệnh cho người nhà bệnh nhân trở nên dễ dàng và thuận tiện hơn nhiều. Việc phát hiện được số lượng lớn bệnh nhân có đột biến gen dystrophin sẽ là nguồn dữ liệu di truyền quan trọng giúp cho việc xác định người lành mang gen bệnh và chẩn đoán trước sinh, trên cơ sở đó sẽ có những tư vấn di truyền thích hợp nhằm giảm tỉ lệ mắc bệnh trong cộng đồng. Hơn nữa, với sự phát triển của các liệu pháp điều trị gen, nguồn dữ liệu di truyền này sẽ làm tiền đề cho việc áp dụng các liệu pháp điều trị phù hợp cho những ca bệnh riêng biệt. Điều này thật sự có ý nghĩa to lớn khi mà tại nước ta hiện nay các phương pháp điều trị mới dừng lại ở điều trị nội khoa.

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi đưa ra kết luận sau:

1. Xác định đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD

Đã phát hiện được 182/201 bệnh nhân DMD/BMD có đột biến gen dystrophin chiếm tỉ lệ 91%.

Các dạng đột biến được phát hiện bao gồm: Đột biến xóa đoạn chiếm tỉ lệ cao nhất với 75,3%, đứng thứ hai là đột biến điểm chiếm tỉ lệ 17%, đột biến lặp đoạn chiếm tỉ lệ thấp nhất với 7,7%.

2. Xây dựng bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam

Bước đầu đã xây dựng thành công bản đồ đột biến gen dystrophin trên bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam.

Đột biến xóa đoạn chủ yếu tập trung ở vùng trung tâm (70,8%) và vùng 5' tận (18,2%).

Đột biến lặp đoạn chủ yếu tập trung ở vùng 5' tận, chiếm tỉ lệ 57%.

Đột biến điểm không tập trung ở vùng đột biến trọng điểm mà nằm rải rác trên các exon từ exon 3-51. Trong đó, đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm tỉ lệ cao nhất (65%), tiếp theo là đột biến thêm và mất nucleotid (32%), phát hiện một đột biến ở vị trí splicing (3%).

KIẾN NGHỊ

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen dystrophin ở bệnh nhân DMD/BMD Việt Nam
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về người mang gen bệnh DMD/BMD.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những người mang gen bệnh trước - trong quá trình mang thai.

INTRODUCTION

1. RESEARCH RATIONALE

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease most common hereditary, was detected in all of the different races in the world. The frequency of the disease is about 1/3500 boys. This is a very severe myopathy, progressive nature, severe over time. With severe manifestations, along with mental disorders, DMD / BMD really is a disaster not only for the patients themselves but also the burden of the family and the whole community.

Currently there is no specific treatment method. With the development of molecular biology in recent years, gene therapy for DMD patients has brought great hope to patients. But with each dystrophin gene mutation will have different gene therapy differently. Therefore, the researchers identified genetic mutations in patients is an important prerequisite to finding gene therapy effectively. In addition, determining the exact gene mutation helps to diagnose chronic carriers, prenatal diagnosis of genetic counseling in order to reduce the incidence of disease, reduce the consequences of disease for family patients and social.

In recent years, many foreign scientists as well as in the country has conducted research and discovered genetic mutation of dystrophin in patients with DMD. In Vietnam, there have been many studies on the genetic mutation of dystrophin. However, major projects are only of detecting mutations delete sections and focuses on two key mutation region, there is no study yet conducted a comprehensive detection of deletion mutations, duplication mutations and point mutations in exon 79 of the whole dystrophin gene.

2. Target

1. Identifying deletion mutations, duplication mutations and point mutation of the dystrophin gene in patients with DMD / BMD.

2. Initial mapping dystrophin gene mutations in patients with DMD / BMD Vietnam.

3. Practical significance and make new contributions to the thesis.

Duchenne muscular dystrophy is one of the disease should be diagnosed early in order to have appropriate treatment and eliminate the

risk of disease in the community. This study is the first in Vietnam to apply the process to detect the dystrophin gene mutations include deletion mutation, duplication mutation, point mutation. The process for using the new technique is MLPA. This technique can detect both deletion mutations and can detect duplication mutations. Moreover MLPA technique is time for fast results, with only 2 PCR has amplified all exon 79 of the dystrophin gene in 24 hours. This study was conducted on a large sample of 201 patients. The findings suggest a large number of patients carrying the gene mutations, including deletion mutations, duplication mutations, point mutation. This is a precondition for the application of gene therapy suitable, as well as provide a basis for genetic counseling, diagnosis, genetic carriers, prenatal diagnosis to minimize the incidence of community. This is the result not only of scientific significance, practice but also humane.

4. Thesis structure

The thesis is presented in 111 pages (excluding references and appendices); include: questioning (2 pages), review document (42 pages), object and research methods (15 pages), results (27 pages), discussion (23 pages), concluding (1 page) and recommendations (1 page). The thesis includes 14 tables, 5 charts, 39 form; 101 references.

CHAPTER 1. REVIEW OF LITERATURE

1.1. Features of DMD

1.1.2. Clinical manifestations of DMD

Boys rarely manifest symptoms at birth or in the first years of the period of early childhood. These symptoms usually begin between 3-5 years old, initiated by the difficulty walking, difficulty climbing stairs and standing, legs apart patients often for sure, back hyperextension to offset weak gluteal muscles . Gower early signs can be seen at 3 years old and full expression at children 5 to 6 years. Time remaining patients maintained the ability to move huge change. Most children with DMD can go back to the age of 12. Dementia occurs in all patients, although only 20 to 30% of patients under 70. Children's IQ with DMD often fatal in about 20s. The cause of death was respiratory failure during

sleep, congestive heart failure, pneumonia or choking and sometimes due to clogged airways.

1.1.3. At the laboratory

1.1.3.1. Quantification Creatine Kinase activity

1.1.3.2. Method electrophysiological probe muscle

1.1.3.3. Muscle biopsy

1.1.3.4. Immunohistochemistry

1.1.3.5. Methods of molecular genetics determine gene mutations

1.1.4. Treatment of DMD

1.1.4.1. Medical treatment

1.1.4.2. Treatment by gene therapy

i) Design vector carrying for dystrophin mini or micro dystrophin gene

ii) Experimental drugs active readthrough

iii) Using antisense cause exon deletion

1.1.4.3. Treatment with cell therapy

1.1.5. Genetics of DMD

DMD is a genetic disease gene unit, follow the rules of genetics linked recessive X chromosome has no corresponding allele on chromosome Y. The mother is heterozygous gene carriers are capable of transmitting the disease to 50% of boys and transmit the disease gene to 50% of their daughter. Although DMD is a genetic disease linked recessive sex, approximately 30% of patients are due to new mutations, and of course the mother does not carry the disease.

1.2. The mutation of the dystrophin gene structure

Approximately 60-65% of the cases of DMD are due to deletion mutation, gene duplication mutation accounts for 5-10% of cases and about 25-30% are point mutations and other small mutations.

1.2.1. Deletion mutations

It was observed that about 60-65% of DMD mutations that delete large sections on the dystrophin gene, concentrated mainly in two key areas (also known as the "hot-spot") is the bottom 5 '(containing exons 1-19) and the central region (containing exons 43-60).

1.2.2. Duplication mutations

Accounts for about 5-10% of cases. Of these, about 80% of cases occur in the first loop section 5 'end, 20% occur in the central region

and the distribution may differ slightly between populations and different races.

1.2.3. Point mutations and other mutations

Occupy 25-30% of cases. Point Mutations in DMD mostly generated stop code and cause serious illness. Currently there are over 200 positions of the DMD gene mutations have been identified.

1.3. Techniques for detecting genetic mutation of dystrophin

1.3.1. Polymerase chain reaction

PCR-based DNA polymerase activity of the synthetic operation a new DNA strand from DNA mold circuit, with four types of nucleotide material. This reaction should primers forward and reverse primers have complementary sequences to the ends of the DNA sequence mold.

1.3.2. Fluorescence in situ hybridization

Using a short sequence of single stranded DNA sequences, called DNA probe (probe DNA) to detect a target sequence. The DNA sample is marked fluorescent probe and will hybridize with the target DNA on the chromosome in mid or dispensation. Because of DNA probe hybridization with complementary sequences, can detect and locate specific locations DNA sequence analysis under fluorescent microscopy.

1.3.3. Southern blot

In this method, the DNA is cleaved by specific enzymes. Then, the DNA fragment in the mixture was separated by agarose gel electrophoresis and then transferred to hybrid membranes. Next, the DNA fragments to determine situated on the membrane is hybridized with the specific oligonucleic fitted as radioactive tracers, fluorescent dye, biotin ... The method of determining the corresponding image is used to point out the product lines contain DNA fragments to be detected with oligonucleotid hybrid membrane marker

1.3.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MLPA technique (amplification multiple probes) was first described in 2002 by Schouten JP and CS, this is the new version of PCR, in which multiple target DNA fragment was amplified only by 1 primers.

* The principle of the MLPA technique:

MLPA technique using probes capable of hybridization with specific target DNA and probe design issues are very important. Each chain oligonucleotide probes with 2 different sizes (called probes forward and reverse probes). Connections between the 5' to 3': is the buffer between the 3' and 5', containing 19-370 nucleotides and designed different lengths depending on type probes in the destination agent. Clips cushion designed different lengths so when PCR amplification will generate DNA fragments with different length and separated by capillary electrophoresis (marked fluorescent primers). Analysis results are important steps in the MLPA technique. The analysis was conducted based on image onions, raw data corresponding to each probe.

1.3.5. Sequencing

Machine automated gene sequencing is designed on the principle of using dideoxynucleotid (ddNTP) invented by Sanger et al. With the next generation of this machine, we used 4 different fluorescent colors to highlight four types ddNTP.

1.4. Situation study DMD

In Vietnam, several studies tend to focus on identifying mutants deleted gene fragment DNA level (based on single-PCR technique, multiplex PCR, quantitative PCR ...) and only priority identified mutations in two regions sentinel, while mutations in the dystrophin gene could scattered across 79 exons of the gene. MLPA technique has also been researching the first step in diagnosing mutations in the dystrophin gene deletion segment, but has not been applied in the diagnosis of mutations detected duplication and healthy people carry the disease gene.

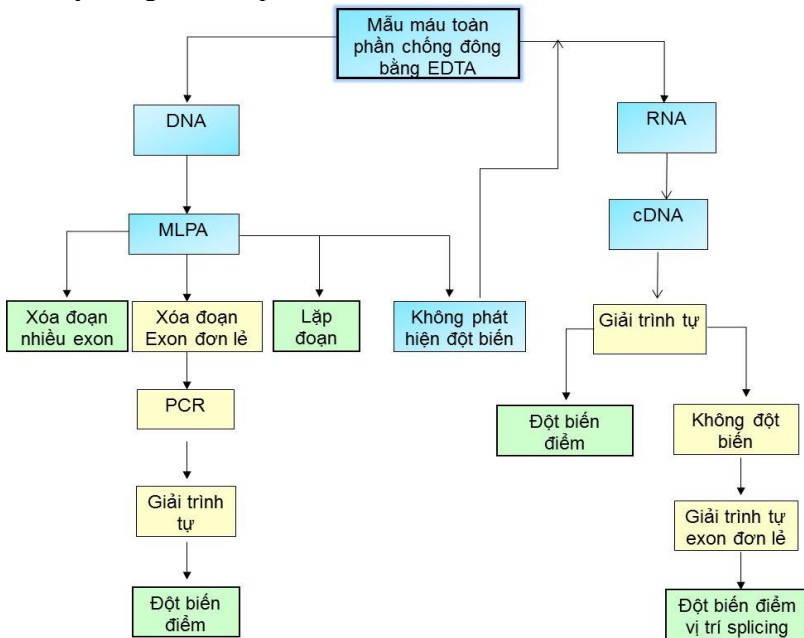
Chapter 2. SUBJECTS AND METHODS

2.1. Research subjects

Selection of 201 patients were diagnosed as muscular dystrophy Duchenne / Becker at National Hospital of Pediatrics. Standard has been described previously.

2.2. Methods

Study design: descriptive case series



The process of determining the genetic mutation of dystrophin in patients with DMD / BMD

2.3 Location Research

- + Center for Gene – Protein Research, Hanoi Medical University
- + Time study 1/2011 - 12/1013

2.4 The processes and techniques used in research

- + *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
- + *Sequencing*

2.5. Subject adhere research ethics in medicine

Chapter 3. RESULTS

3.1. Results DNA extraction, RNA, cDNA synthesis

3.2. The results identify genetic mutation of dystrophin

Research findings 182/201 patients case dystrophin gene mutation causing DMD / BMD, 91% occupancy rate. Some patients have not detected 19/201 cases, accounting rate of 9%.

3.2.1. Results identified mutations using MLPA technique

3.2.1.1 The results identify deletion mutations

In this study, all 201 samples of DNA are genetic mutations identified by MLPA technique. DNA analysis of patients find the entire exon 79 deletion mutation and duplication section P34 and P35 by 2 probemix. Each reaction MLPA are run together control samples were normal men do not carry the dystrophin gene mutations.

Results of patients with mutations delete all dystrophin gene

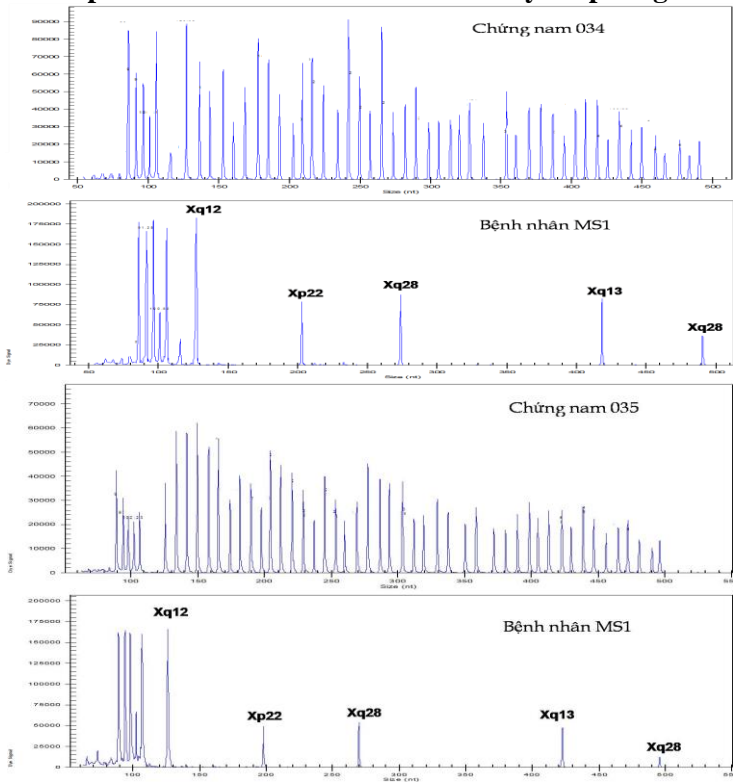


Figure 3.3. The MLPA results of the patient's MS1

Comment: MLPA results Figure 3.3 shows, compared with control, PCR products correspond to the vertices of the exon from 1-79 in the patient sample is lost completely, whereas PCR products of the internal standard gene (Xq12, Xp22, Xq28, Xq13) still appeared the Summit

showed the DNA quality meet the requirements. It demonstrates that patients with mutations delete whole 79 exons on dystrophin gene

Results Patients with single exon deletion mutations

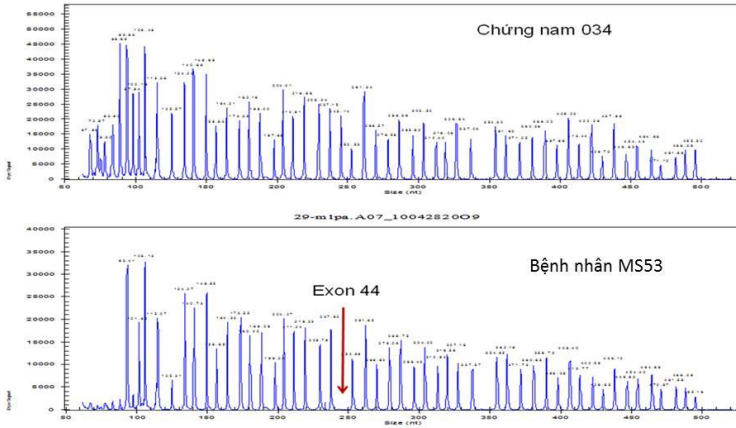


Figure 3.7. MLPA Results of patients MS53.

Comment: Results MLPA Figure 3.7 shows that, compared with control samples male, PCR products corresponding to the peak of exon 44 completely lost demonstrate mutations in patients with exon 44 deletion. This is the case top single loss should be combined with PCR to confirm.

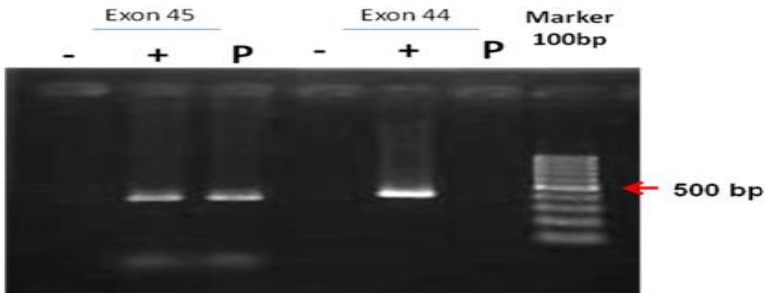


Figure 3.8. Electrophoresis of DNA PCR products with primers MS53 patients 44,45. (-) negative control, (+) positive control (P) patient samples

Comment: Photos electrophoresis PCR product of exon 44 and exon 45 shows, in control samples appeared in the second exon PCR lines 44 and 45 while in patients only present in exon 45 PCR bar disappear

PCR pointed out in exon 44, proving patients with exon 44 deletion mutation.

Table 3.1. Results detect deletion mutation dystrophin gene

Exon	n	pheno- type	genotype	Exon	n	pheno- type	genotype
Exon 1-79	1	DMD	Outframe	Exon 40-43	1	DMD	Outframe
Exon 1-34	1	DMD	Inframe	Exon 42-43	1	DMD	Outframe
Exon 2-13	2	DMD	Outframe	Exon 43-52	1	DMD	Outframe
Exon 3	1	BMD	Inframe	Exon 44	6	DMD	Outframe
Exon 3-7	4	DMD	Outframe	Exon 45	1	DMD	Outframe
Exon 3-13	1	DMD	Inframe	Exon 45-46	1	BMD	Inframe
Exon 3- 17	1	DMD	Outframe	Exon 45-47	4	BMD	Inframe
Exon 3-21	1	DMD	Outframe	Exon 45-48	1	BMD	Inframe
Exon 3-43	1	DMD	Outframe	Exon 45-50	7	DMD	Outframe
Exon 3-44	1	DMD	Inframe	Exon 45-52	7	DMD	Outframe
Exon 3-45	1	DMD	Outframe	Exon 45-55	1	BMD	Inframe
Exon 3-47	1	DMD	Inframe	Exon 46-47	1	DMD	Outframe
Exon 5-27	1	DMD	Inframe	Exon 46-49	1	DMD	Outframe
Exon 5-37	1	DMD	Inframe	Exon 46-50	6	DMD	Outframe
Exon 8	1	DMD	Outframe	Exon 46-51	4	DMD	Outframe
Exon 8-9	4	DMD	Outframe	Exon 46-52	1	DMD	Outframe
Exon 8-12	1	DMD	Outframe	Exon 46-55	2	DMD	Outframe
Exon 8-13	1	DMD	Outframe	Exon 47	4	BMD	Inframe
Exon 8-43	1	DMD	Outframe	Exon 47-48	1	BMD	Inframe
Exon 8-46	1	DMD	Outframe	Exon 48-50	11	DMD	Outframe
Exon 10-17	1	DMD	Outframe	Exon 48-52	2	DMD	Outframe
Exon 11-39	1	DMD	Inframe	Exon 49-50	6	DMD	Outframe
Exon 11-41	1	DMD	Inframe	Exon 49-52	8	DMD	Outframe
Exon 12-34	1	DMD	Outframe	Exon 49-54	1	DMD	Outframe
Exon 15-19	1	DMD	Outframe	Exon 50-52	3	DMD	Outframe
Exon 16-17	1	DMD	Outframe	Exon 51	5	DMD	Outframe
Exon 16-19	1	DMD	Outframe	Exon 51-52	1	BMD	Inframe
Exon 17	1	DMD	Outframe	Exon 51-53	1	DMD	Outframe
Exon 19-50	1	DMD	Outframe	Exon 51-55	1	DMD	Outframe
Exon 30-43	1	DMD	Outframe	Exon 52	4	DMD	Outframe
Exon 31-43	1	DMD	Outframe	Exon 56-62	1	DMD	Outframe
Exon 32	1	BMD	Inframe	Exon 61-67	1	DMD	Inframe
Exon 38-43	1	DMD	Outframe				

Outframe: Frame shift mutation translation; *Inframe*: frame shift mutation causes no translation

Comment: With MLPA technique discovered 137/201 patients BMD / DMD deletion mutations, including 24/137 patients with a single mutated exon deletion, mutation 2/137 patients outside hotspot areas. Detecting 1/137 patients with mutations of exon 79 deletion whole, 24 deletion mutations but not deflect translational frame (inframe), 113 frame shift mutations translation (outframe).

3.2.1.2 Results identified duplication mutations

All patients who did not have mutations delete paragraphs are based analysis to find mutations RPA formula duplication of author KK Lai et al

Results Patients with single duplication mutation in the dystrophin gene

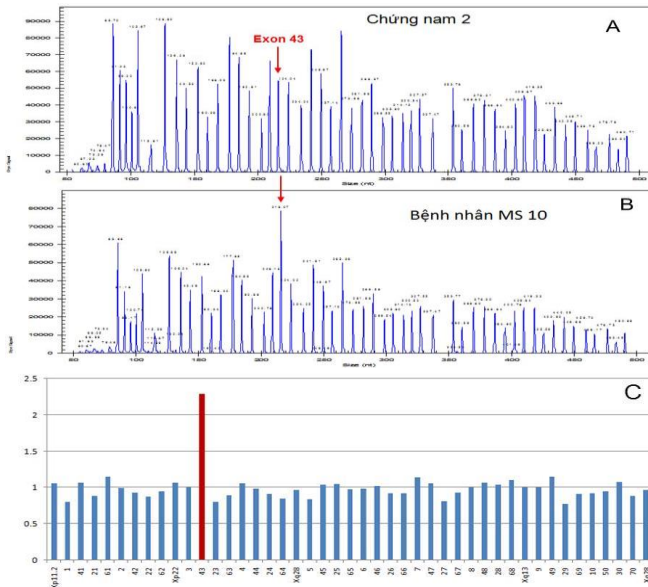


Figure 3.7. MLPA Results of patient MS10

(A) Male control P034 (B) Patients with probmix P034 MS10

(C) The results of analysis based on RPA.

Comment: For patients with MS10 image corresponding MLPA probe in exon 43 shows the signal strength of the peak than the male witness. After analysis based on RPR RPA ratio in exon 43 of the

patients compared with male witness greater than 2 while the rate of exon other RPR fluctuated around 1. Demonstrate patients with single duplication mutation exon 43.

Table 3.2. Results of duplication mutations in the dystrophin

Exon	n	Pheno- type	Genotype	Exon	n	Pheno- type	Genotype
Exon 2	1	DMD	Outframe	Exon 19	1	DMD	Outframe
Exon 2-4	1	DMD	Outframe	Exon 19-34	1	DMD	Outframe
Exon 3-9	1	BMD	Inframe	Exon 31-34	1	DMD	Inframe
Exon 3-17	1	DMD	Outframe	Exon 43	1	DMD	Outframe
Exon 3-7	1	DMD	Outframe	Exon 61-63	1	DMD	Outframe
Exon 11-20, Exon 51-60	1	DMD	Outframe	Exon 62	1	DMD	Outframe
Exon 14-17	1	DMD	Outframe	Exon 5-7	1	DMD	Outframe

Outframe: Frame shift mutation translation; *Inframe*: frame shift mutation causes no translation

Comment: By analysis based on RPA and signal intensity of PCR products corresponding to each exon compared to placebo was detected in 14 patients with duplication mutations, including mutations duplication 5/14 single exon, 1/14 patients had repeat paragraph 2 regions, 8/14 multiple exon duplication mutation.

Results Patients with point mutations in the probe of exon 18

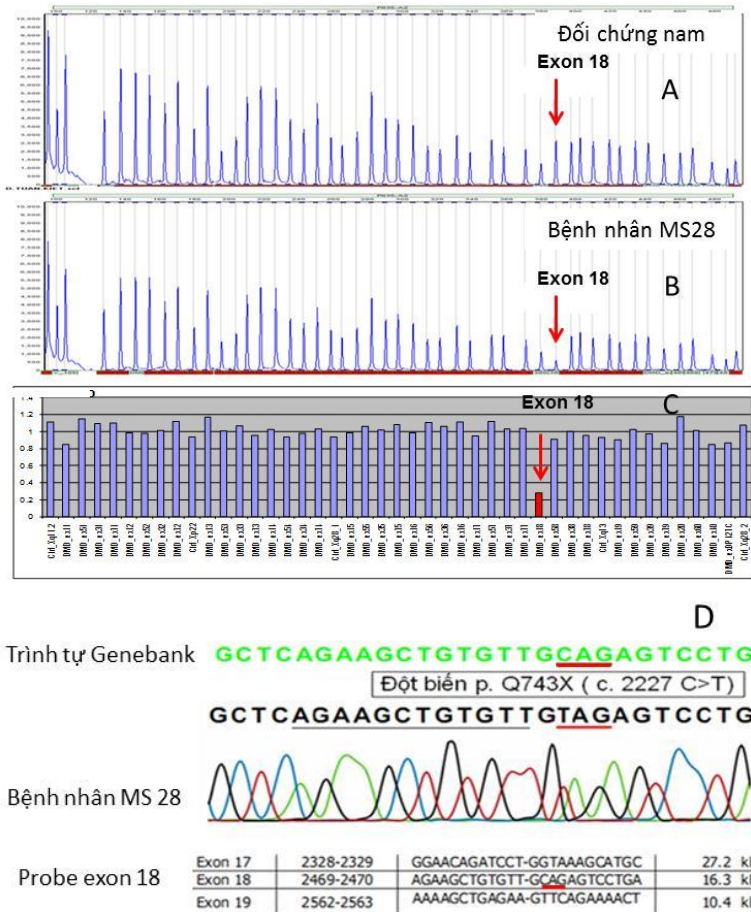


Figure 3.12. The results identify gene mutations of patients MS28 (A) male control P034, (B) Patients with probmix P034 MS28, (C) Results of analysis based on RPA, (D) Results of sequencing compared to Genebank sequence (exon 18) and exon 18 probe .

Comment: On the image of the patient MLPA MS28, PCR products corresponding to the peak of exon 18 can appear very low signal peaks but this result shows that the patient may have mutated exon 18. They cleared I check exon 18 have actually been deleted paragraph or by

PCR, the results showed that still appear lines corresponding PCR product of exon 18 patients demonstrated not deleted exon 18. PCR products conducted sequenced, the results showed that mutations occur at positions point c.2227C> T, this mutation is located in attachment site of exon 18 probe should have affected the performance amplified exon 18 MLPA reaction, making the top of the received signal is lower than the control sample.

3.2.2. The result determined by sequencing

Results Patients with mutations replace one nucleotide created stop codon

These patients did not detect deletion mutations, duplication mutations is conducted sequenced cDNA level. Using nested RT-PCR technique to amplify the full length cDNA of the dystrophin gene corresponding to 10 different gene segments. RT-nested PCR products will be sequenced.

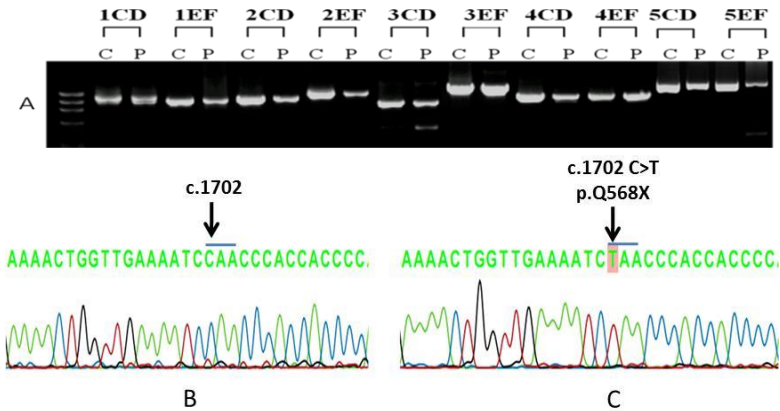


Figure 3.13. Results of analysis cDNA of patient MS123

A) Image electrophoresis of RT-PCR products patients MS123 code; (B) Results of samples sequenced cDNA evidence; (C) Results cDNA sequencing the patient sample.

Comments: Photos electrophoresis nested RT-PCR showed that the clarity, specificity was calculated as the size and with the reference sample. RT-PCR products were sequenced, compared with GeneBank sequence indicate nucleotide mutation of C to T substitution at position

1702 in the cDNA, altering the codon CAA TAA create codes ending . Results showed that patients with mutations c.1702C> T (p.Q568X) in exon 14 of the dystrophin gene.

Results Patients with mutations insertion 4 nucleotides

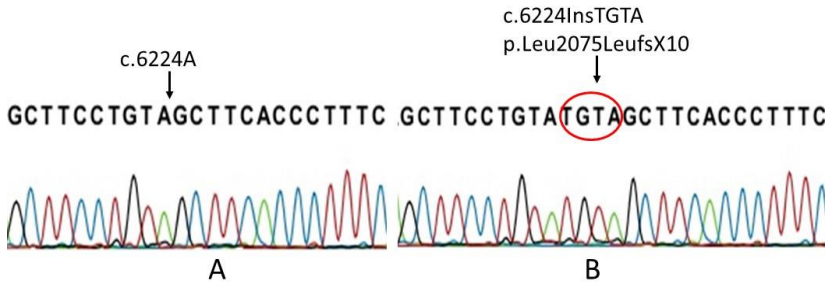


Figure 3.14. Results cDNA analysis of patients MS128

(A) Results of samples sequenced cDNA evidence; (B) Results cDNA sequencing MS128 patient sample.

Comments: On the sequencing results showed that patients with mutations MS128 TGTA additional 4 nucleotides at position c.6224 in exon 43 of the dystrophin gene. More 4 nucleotide mutations were formed early end position in the amino acid 10th starting position for the protein dystrophin mutations truncated.

Table 3.3. Results point mutations in the dystrophin gene

TT	MS	c.DNA	Exon	Protein	Phenotype
1	MS127	c.184ins C	Exon 3	p.Leu61profsX27	DMD
2	MS134	c.433C>T	Exon 6	p.Arg145X	DMD
3	MS189	c.724C>T	Exon 8	p.Gln252X	DMD
4	MS138	c.1062G>A	Exon 10	p.Trp345X	DMD
5	MS129	c.2797C>T	Exon 11	p.Gln933X	DMD
6	MS132	c.1201C>T	Exon 11	p.Gln401X	DMD
7	MS137	c.1492G>T	Exon 13	p.Glu498X	DMD
8	MS123	c.1702C>T	Exon 14	p.Gln568X	DMD
9	MS126	c.1827A>T	Exon 16	p.Lys613X	DMD
10	MS28	c.2227C>T	Exon 18	p.Gln743X	DMD
11	MS176	c.2365G>T	Exon 19	p.Glu789X	DMD
12	MS144	c.2302C>T	Exon 19	p.Arg768X	DMD
13	MS122	c.2569C>T	Exon 20	p.Gln856X	DMD
14	MS196	c.2887delT	Exon 22	p.Ser963Pfsx40	DMD

15	MS200	c.3151C>T	Exon 23	p.Arg1051X	DMD
16	MS141	c.3347-3350delAGAA	Exon 25	p.Lys1116MetfsX15	DMD
17	MS159	c.3580C>T	Exon 26	p.Gln1194X	DMD
18	MS131	c.3715InsTAAATAG	Exon 27	p.Glu1438X	DMD
19	MS139	c.3767InsT	Exon 27	p.Gly1256ValfsX15	DMD
20	MS162	c.3766,3767InT	Exon 27	p.Gly1256Valfs15X15	DMD
21	MS184	c.3940C>T	Exon 29	p.Arg1314X	DMD
22	MS130	c.4212,4213 del TC	Exon 30	p.Gln1405fsX11	DMD
23	MS146	c.4186InA	Exon 30	p.Tyr1396Xfs	DMD
24	MS180	c.4729C>T	Exon 34	p.Arg1577X	DMD
25	MS171	c.5530C>T	Exon 39	p.Arg1844X	DMD
26	MS187	c.5899C>T	Exon 41	p.Arg1967X	DMD
27	MS121	c.6274 Ins TA	Exon 43	p.Tyr2092LeufsX22	DMD
28	MS124	c.6237,6238 del CC	Exon 43	p.Ser2079Serfs2X	DMD
29	MS128	c.6224InsTGTA	Exon 43	p.Leu2075LeufsX10	DMD
30	MS125	c.7522G>T	Exon 51	p.Glu2508X	DMD
31	MS207	9361+1 G>A	intron 64		BMD

3.3 Map dystrophin gene mutations in patients with DMD / BMD Vietnam

3.3.1. Distribution of the dystrophin gene mutation

Using MLPA technique, nested RT-PCR and sequenced to identify mutations delete paragraph, duplication mutation and point mutation in exon 79 of the whole dystrophin gene. Percentage distribution of the dystrophin gene mutation is only in table 3.4.

Table 3.4. Percentage distribution of the dystrophin gene mutation

Mutation	n	Ratio (%)
Deletion	137	75,3
Duplication	14	7.7
Point	31	17,0
Sum	182	100

Comments: 182/201 patients DMD / BMD dystrophin gene mutations, including mutations delete sections 137/182 75.3%, duplication mutation 14/182 (7.7%), 31 point mutations 31/ 182 (17%).

Table 3.5. Percentage distribution of gene mutations in patients DMD and BMD

Mutation	Phenotype			
	DMD		BMD	
	n	%	n	%
Deletion	122	74	15	88
Duplication	13	8	1	6
Point	30	18	1	6
Sum	165	100	17	100

Comments: Number of patients with DMD mutations detected 165 cases, accounting for 91% ratio. In which case deleting sections 122/165 74%. Duplication mutation 13/165 8% of cases and point mutations 30/165 18% of cases. The number of BMD patients with mutations detected 17 cases. Of these mutants deleted paragraph majority with 88% 15/17 case, remaining duplication mutation 1/17 6% of cases, point mutations 1/17 (6%).

3.3.2. Distribution of deletion mutations of the dystrophin gene

Table 3.6. The rate of deletion mutations

Deletion mutation	(n=137)	Ratio (%)
Single exon	24	17.5
Multi exon	111	81.0
Deletion mutation outside hotspot areas	2	1.5

Comments: With 137 cases of mutations delete paragraph: there is a single exon deletion 24/137, 2/137 outside hotspot areas to delete paragraphs, sections 111/137 delete multiple exon case.

Table 3.7. Percentage distribution of region deletion mutation

Region of deletion mutation	(n=137)	Ratio (%)
5' region (Exon 1-20)	25	18.2
Center region (Exon 40-53)	97	70.8
Long deletion: 5' to center region	12	8.8
Other	3	2.2

Comments: Of the 137 cases detected mutations are deleted: Deletion the center dominate 70.8% 97/137 proportion, followed by region 5' 12/137 proportion of 18%, deletion long from region 5' to the central region 12/137 proportion of 12%, the rest are deleted mutations in other region.

3.3.3. Distribution of duplication mutation dystrophin gene

Table 3.8. Percentage distribution duplication mutation region

Region of duplication mutation	(n=14)	Ratio (%)
5' region (Exon 1-20)	8	57
Center region (Exon 40-53)	1	7
Long deletion: 5' to center region	1	7
Other	4	29

Comments: Of the 14 cases of duplication mutation detected: Repeat a section of region 5' end majority proportion 8/14 57%, followed by repeat segments and region outside region central 5' tan 4 / 14 percentage of 29%, 1/14 (7%) cases of duplication mutation in the center and 1/14 (7%) cases have mutations repeat long passages from region 5' to the center .

Table 3.9. The rate of duplication mutation

Duplication mutation	(n=14)	Ratio (%)
Single exon	4	29
Multi exon	9	64
Duplication mutation on two separated region	1	7

Comments: With 14 cases of duplication mutation: with a single 4/14 exon duplication, duplication, two region 1/14, 9/14 cases multiple duplication exon.

3.3.4. Distribution of point mutations of the dystrophin gene

Table 3.10. Percentage distribution of point mutations

Point mutation	(n=31)	Ratio (%)
Stop codon	20	65
Insertion / deletion small	10	32
Splicing site	1	3

Comments: With technical direct sequencing we have detected 31 cases in which point mutations creating stop codon mutations prevail with 20 cases. Add and delete nucleotide mutation was 10 cases. 1 cases have mutations in splicing position.

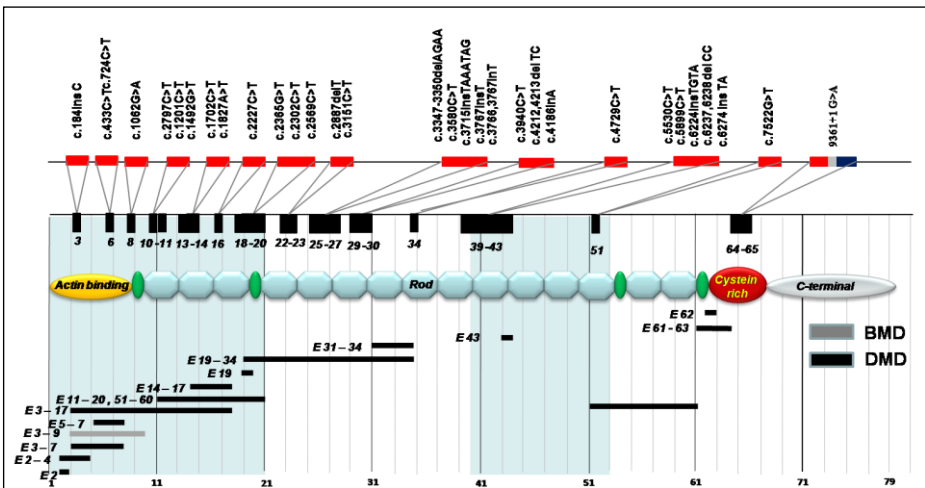


Figure: Map of mutation duplication, point mutations

: Vùng hotspotgen dystrophin

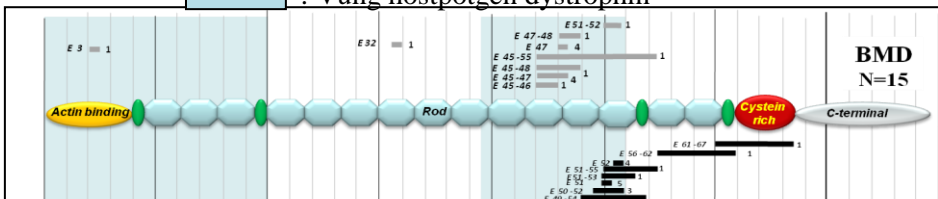


Figure: Map of deletion mutation dystrophin gene
Chapter 4. DISCUSSION

4.1. The process of extracting DNA, RNA and cDNA synthesis

4.2. Determining the genetic mutation of dystrophin

4.2.1. Identifying mutations using MLPA technique

MLPA technique is technically possible to amplify the diversity in the number of gene copies in a few different. Based on this advantage, MLPA is often used in the diagnosis at the molecular level some genetic disease that causes the phenomenon is due to be deleted or duplicated by specific genes. MLPA method in recent years is a technique widely used in research laboratories for diagnostic genetics at the molecular level of some diseases. In this study, MLPA technique was used with the kit has been commercialized as SALSA MLPA P034 KIT-A2 / P035-A2 of the company MRC Holland. Probemix P034 / P035 DMD contains probes for each exon of the DMD gene on the location of the chromosome Xp21.2. Also, there is a probe for exon DP427c. Kit includes 80 probes are divided into 2 probemix: P034 and P035. Thus, with the implementation of two MLPA reaction, enough to survey the number of copies of all 79 exons in the dystrophin gene. In each probemix, besides 40 probe specific for exon 40 of the dystrophin

gene also has 5 reference probe serves as proof internal quality assurance controls for each reaction MLPA. MLPA is a new technology in Vietnam with many outstanding features, just 2 PCR with a time of 2 days MLPA technique can examine the entire exon 79 in the dystrophin gene to detect mutations delete paragraph and gene duplication is accounted for 65-75%. In this study, 201 patients received the full technical application MLPA to identify gene mutations. The results obtained after running by capillary electrophoresis machines will be analyzed by software dedicated to identifying patients with deletion mutant gene segment or duplication. By MLPA technique, discovered 152 cases have mutations deletion and duplication segment accounted for 75% ratio. In which case deleting paragraph is 137/201 proportion 68%, 14 cases accounting duplication ratio of 7%. MLPA technique has the advantage of detecting mutations delete the entire paragraph on exon 79 of the dystrophin gene that multiplex PCR technique as classical undetectable. With multiplex PCR technique, two authors is Chamberlain and Begg was designed between 1988 and 1990 used to detect common mutations in two key areas that mutation is the 5' end (exons 1-20) and central region (exons 40-53), and thus only detectable exon 19 without detectable mutations outside this region. In this study, in addition to the deleted paragraph common mutations detected research also detected 14 patients with a duplication mutation and 2 patients had mutations delete the sections outside hotspot. With such advantages MLPA is seen as a useful technique in determining deletion mutant dystrophin gene segments and duplication. According to research by Tanja Latic et al 2005, MLPA technique applied in 133 cases the authors detected 88 cases of mutation accounts for 66% ratio. Among patients with mutated delete paragraph, the results obtained in patients with MS1 showed an absence all the amplification products of the probe corresponding to exon 79 of the dystrophin gene. Meanwhile, the amplification products corresponding to the reference probe and internal standard are present. This demonstrates the quality of the DNA extracted from peripheral blood of patients to ensure the requirements and technical procedures MLPA is a normal place. This demonstrates that patients with mutations MS1 delete the entire paragraph exon 79 of the dystrophin gene. This is a mutation causing a severe clinical picture dystrophin protein is synthesized completely. Analytical results also completely homologous genes with clinical characteristics of patients: Patients with muscle weakness appear at an early age was 3 years old, false muscular hypertrophy signs clearly legs, difficulty climbing stairs, CK levels in the blood rise very high (15,000 IU / l) and patients who

had completely lost the ability to walk since age 9, earlier than other DMD patients often lose the ability to walk at 12 or 13 years old. In patients studied 3 MS3 codes, MLPA analysis showed that patients with mutations deleted from exon 61-67 segment. Similar numbers of patients with MS24 study, this mutation did not cause translational frame shift, and as far as can theoretically cause mild disease BMD, however, clinical manifestations in patients with severe disease DMD. This can be explained by mutations in patients with end zone C, this region has a very important function for the protein dystrophin, the connective membrane, so mutations in this region will lose link function can cause severe illness. For instance mutations delete a single exon, by one of the technical limitations of the probe MLPA is not paired or paired with exon corresponding poorly positioned when paired with point mutations. So on images obtained MLPA will lose or reduce the height of the peak respectively, similar to the images to delete paragraph 1 exon. So, for those mutations delete a single piece obtained by exon MLPA technique, to reexamine classic PCR primers corresponding to prevent false mutations. In this study, using MLPA technique and classic PCR techniques, has detected 24 patients with mutations delete a single exon, representing 17.5% of patients have mutations delete paragraphs. Of the 24 cases detected by MLPA technique, a single case of deleting paragraph exon 18. This result is inconsistent with the test results back by PCR to amplify exon 18. Undertake sequencing exon 18 have found patients with point mutations c.2227C> T (p.Q743X). This mutation is located at the mounting location of the probe in response exon18 MLPA, should have prevented the pairing of this probe or affect amplifier performance exon 18 of the MLPA reaction, making the top of the received signal does not clearly. This interpretation of the results obtained by the MLPA technique. Regarding paragraph deleted mutation rate in this study was achieved was 68%, compared with other studies worldwide have differences. In the study by authors Trimarco (2008) on Italian population ratio was 74.5% clip deletion. Compared to some countries in Asia showed: research on patients with DMD / BMD China with a sample size of 249, Zeng et al (2008) have given mutation rate is 65% deleted paragraph. The study's author Hwa (2007) in patients with DMD / BMD Taiwan, the rate of deletion mutants low segment with 36%. While research on DMD patients / US BMD of 3 authors Gaudio (2008) with a sample size of 97 patients and Hegde (2008) White (2002) with a sample size of 102 patients who delete paragraphs also lower than this study, who found 17.5%, respectively, 40% and 36%. Regarding regional

distribution of mutants deleted paragraph in this study showed that mutations delete segment focuses primarily central region with 97 cases of proportion 70.8%, followed by the 5' with ratio 18.2%, mutation long paragraph deleted from the 5' end to the central region of 12 cases, accounting for 8.8% rate. The study results are consistent with studies in several other countries such as Germany, who surge up the center to 92.5% followed by the countries Japan, Russia, Turkey, Israel, Greece Spain and South India, who ranged between 76.6-81% respectively. This result is consistent with studies of Chaudhary 2009. In this study, duplication analysis, we used the formula of the author Lai et al (2006) as described in the methodology section. In patients with code MS120, on images obtained MLPA peaks corresponding to exon 62 of exon 62 peaks higher than the control samples, while the height of the peak corresponding to the other exon relatively equal. After calculating the ratio RPR exon 62 of the patients compared with control samples, the percentage of patients RPR near exon 62 by 2. This proves that there is repetition in patients with exon 62 MS120 code. On the other patient with codes 110, based on images obtained MLPA and after calculating the RPR, who also came to the conclusion patients with exon 3-7 iterations. With technical advantages MLPA detected an additional 14 cases of duplication mutation of the total 201 patients analyzed proportion of 7%. The rate was similar to some other studies worldwide. Casanar Research (2010) and Latic (2005), who found that mutation is 7.3% duplication. Research on Chinese patients of author Wang (2008) and Zeng (2008) respectively detect duplication mutation is 6.2% and 5%. Another study author Takeshima (2010) and colleagues in 442 Japanese patients who detect duplication mutations was 8% [55]. However, the rate of mutation has been costly duplication on the US population with the rate are 26.4%, 25%, 14.4% of the authors White (2002), Hegde (2008), Gaudio (2008). This is new in this study compared with previous studies in Vietnam. Regarding regional distribution duplication mutation in this study showed that mutations focused primarily duplication region 5' end with 8 cases of proportion 57%, the proportion of low center with 1 case, accounting the rate of 7% and 1 case of patients with mutations extending from the 5' end to the central region accounted for 7% rate. In addition, 4 patients have mutations outside the 5' end and center regions accounted for 29% ratio. The study results are consistent with studies in several other countries. In this study, who duplication and delete sections obtained 75% reach of Antonella Carsana study (81.1%) of Trimarco (84.6% of 506 patients studied. Higher than the studies in USA, Germany and Taiwan. In

Vietnam, the majority of studies implemented only to the extent determined by mutants deleted paragraph Multiplex PCR techniques such as Nguyen Thi Phuong's research in 2002, Nguyen Thi Phuong Mai 2007 . However, the study by Multiplex PCR techniques with primers 19 only identified mutation common in hotspot areas and not determined by the end position of mutation (deletion end point) for the mutation delete multiple exon segments. A further technique has several advantages over it's identified deletion mutations in mRNA levels passage of Nguyen Thi Bang Dew et al application. With this technique the author has detected 20 out of 40 patients studied proportion of 50%. This rate is much lower than the 68% surge in paragraph delete this research. But a new technique has several advantages compared to PCR neck Multiplex PCR dictionary or technical but also just stop at detecting mutant gene deletion carriers segment and delete sections. Compared with MLPA technique can not detect deleted passage, people carry genes that can erase sections detect mutant gene duplication and bearer duplication.

4.2.2. Point mutations

Patients with mutations undetectable by MLPA technique will be conducted sequenced exon 79 entire cDNA level. Results were discovered 31/201 (15%) patients with point mutations. Of these, 20 patients with nonsense mutation (nonsense mutation), the rest are more nucleotide mutations, loss of nucleotides. The rate of point mutations in this study compared with author Yasuhiro Takeshima et al when research on 442 patients with DMD Japan is quite similar. Rate detect point mutations in the study by Yasuhiro Takeshima et al was 16%. Nonsense mutations in 20 of 14 mutant nucleotide substitution C> T, 1 mutations replacing nucleotides A> T and 3 nucleotide mutations replaced G> T, a mutation G> A as in other studies on Large numbers of patients such as Kevin M. Flanigan Yasuhiro Takeshima 2009 and 2010. For patients with nonsense mutation, the protein dystrophin synthesis process will be stopped when the third appearance this end. Thus, the protein structure will be shortened and altered functional loss, causing DMD. In this study, mutations replaced with T nucleotide C is the most common. This result is similar to the study of Takeshima et al (2010) with 33/40 nonsense mutations case. These mutations are scattered all exons. Particularly in exon 43 encountered 3 cases include deletion mutants and add the small section. Suddenly disappeared and more small section majority deflect translational frame caused DMD.

These mutations deflect translational frame and generate code ending (stop codons). For example, mutations in patients c.6274 Insta MS121, this mutation is mutated by 2 nucleotides TA at nucleotide position 6274 in the cDNA. This mutation deflect translational frame when converting the amino acid coding 3 TAC Tyrosine (Y) of the amino acid coding 3 TTA Leucine (L). Not only that, this mutation also creates a stop codon at amino acid position in 2114 (after position 22 amino acid mutations). This mutation completely replace the structure and function of the protein dystrophin causes to DMD. In other mutations in patients with mutant MS146 c.4186InsA, mutations make up the spot stop codon mutations. Regarding the rate of point mutations. Mutations early stop codon (stop codon) dominated with 20/201 (10%) cases, add or delete nucleotide mutation percentage less with 10/201 (5%) cases. The rate was similar to findings of the author Takeshima (2010). The study also detected one patient with mutations in splicing site location to affect gene transcription. The study found 90% of patients with Duchenne muscular dystrophy have dystrophin gene mutation and 10% of patients with DMD / BMD have not found mutated dystrophin gene, which can be caused by a number of mutations located in the introns but this study has not found.

4.3 Some applications of mutation map in treatment and diagnosis of people carry the gene

Duchenne muscular dystrophy is a genetic disease causing severe consequences to the patients themselves, their families and society. Do not have radical treatment, treatment by gene therapy, genetic diagnostics carriers and genetic counseling will help improve quality of life for patients and families. In this study the mutation results obtained from the patient. We carried out the appropriate techniques to determine the gene carriers for the patients' relatives. With foreknowledge of mutations, identifying gene carriers for the patients easier and more convenient. The discovery of large numbers of patients with mutated dystrophin gene is the source of genetic data important for determining the carriers and diagnose diseases before birth, on that basis, will have the genetic counseling appropriate to reduce the rate of infection in the community. Moreover, with the development of gene therapy, genetic data source will make preconditions for the application of proper treatment for individual cases. This really has great significance in our country where today the new treatment method stops at medical therapy.

CONCLUDE

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi đưa ra kết luận sau:

1. Determining the genetic mutation of dystrophin in patients with DMD / BMD

Detected by 182/201 patients DMD / BMD dystrophin gene mutations account for 91% ratio.

The mutation was discovered include: Mutation delete paragraphs highest percentage with 75.3%, second is point mutation percentage 17%, duplication mutation lowest percentage with 7, 7%.

2. Mapping dystrophin gene mutations in patients with DMD / BMD Vietnam

Initially built successfully map gene mutations in patients with DMD dystrophin / BMD Vietnam.

Mutations delete paragraph mainly concentrated in the center (70.8%) and region 5 'end (18.2%).

Duplication mutation primarily concentrated in the 5 'end, 57% proportion.

Not concentrate point mutations in the key mutations that are scattered on the exons from exon 3-51. In particular, mutations create codes ending highest proportion (65%), followed by additional mutations and loss of nucleotides (32%), detecting a mutation at position splicing (3%).

REQUEST

1. Establish and manage a database of dystrophin gene mutations in patients with DMD / BMD Vietnam
2. Establish and manage a database of gene carriers of DMD / BMD.
3. Genetic counseling before marriage and prenatal diagnosis for the gene carriers before - during pregnancy.