

## ĐẶT VẤN ĐỀ

### \* Tính cấp thiết của đề tài

Bệnh Wilson là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do đột biến gen ATP7B, gen ATP7B nằm trên nhiễm sắc thể 13(13q14.3). Gen ATP7B mã hóa cho enzym P-type ATPase có chức năng điều hòa hấp thu và thải trừ đồng của cơ thể, đột biến gen gây nên tình trạng ứ đọng đồng. Đồng ứ đọng trong các mô, cơ quan, gây nên nhiều biến chứng phức tạp, tổn thương gan, thận, mắt, não, xương, khớp.... Đặc biệt bệnh Wilson di truyền qua các thế hệ và có nhiều người mắc bệnh trong cùng gia đình, từ cha mẹ mang gen gây bệnh, di truyền cho con cháu. Bệnh ảnh hưởng đến sức khỏe, thể chất, trí tuệ và là gánh nặng cho gia đình, xã hội. Ở Việt Nam, ước tính có khoảng 3000 người bị bệnh Wilson và khoảng 100.000 người mang gen bệnh Wilson. Nhiều nghiên cứu về lâm sàng, cận lâm sàng, cùng với tiến bộ trong công tác điều trị nhằm chẩn đoán sớm, chính xác, ngăn ngừa các biến chứng và duy trì chức năng bình thường của các cơ quan trong cơ thể. Tuy nhiên đa số bệnh nhân và người mang gen chưa được chẩn đoán đột biến gen. Chính vì vậy việc áp dụng các kỹ thuật sinh học hiện đại để xác định chính xác các đột biến gen gây bệnh Wilson là cần thiết, đặc biệt ở nhóm bệnh nhân có tiền sử gia đình, hoặc bệnh nhân có các triệu chứng không điển hình. Chẩn đoán đột biến gen cho kết quả chính xác và có thể chẩn đoán sớm khi bệnh nhân chưa có các triệu chứng hay biến chứng thể hiện rõ trên lâm sàng, đồng thời từ kết quả xác định đột biến gen sẽ đưa ra những

tư vấn di truyền, hôn nhân góp phần làm giảm tỷ lệ mắc bệnh trong cộng đồng.

**\* Mục tiêu của đề tài:**

- 1. Phát hiện đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson.***
- 2. Thiết lập bản đồ đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson trên bệnh nhân Wilson Việt Nam.***

**\* Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:**

Phát hiện bệnh Wilson trên thực tế có nhiều khó khăn, do các triệu chứng không điển hình, bệnh nhân đến khám ở nhiều chuyên khoa khác nhau, các xét nghiệm thông thường GOT, GPT, ceruloplasmin vv... Ở giai đoạn đầu của bệnh chưa có thay đổi hoặc thay đổi không đáng kể. Áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại, đã phát hiện nhiều đột biến gen trên bệnh nhân Wilson, Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu toàn diện đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson Việt Nam.

Sử dụng phương pháp phát hiện trực tiếp (bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen), đề tài đã xác định chính xác các đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson, thiết lập bản đồ những đột biến gen trên bệnh nhân nghiên cứu, tạo cơ sở khoa học cho công tác tư vấn hôn nhân, di truyền và chẩn đoán, nhằm mục đích cuối cùng là ngăn ngừa và làm giảm tỷ lệ mắc bệnh. Do đó đề tài có ý nghĩa khoa học và nhân văn sâu sắc.

**\* Cấu trúc của luận án.**

- Luận án được trình bày trong 93 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 33 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 13 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 21 trang
- + Chương 4: Bàn luận 22 trang
- + Kết luận: 1 trang
- + Kiến nghị: 1 trang

Luận án gồm 4 bảng, 3 biểu đồ và 21 hình. Sử dụng 101 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web, danh sách 61 bệnh nhân, hình ảnh giải trình tự gen của bệnh nhân khi so sánh trên gen bank.

**Chương 1: TỔNG QUAN****1. Đặc điểm bệnh Wilson**

Bệnh Wilson được mô tả lần đầu tiên vào cuối thế kỷ 19 và cho đến nay bệnh đã được phát hiện khá rộng rãi ở hầu hết quốc gia và chủng tộc trên thế giới. Tần suất mắc bệnh vào khoảng ~ 1/350000 trẻ sinh ra. Theo tỷ lệ này, ước lượng ở nước ta hiện nay có khoảng 3000 người mắc bệnh Wilson. Đây là một bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể số 13, gây nên bởi đột biến gen ATP7B. Gen này có

vai trò quan trọng trong quá trình điều hòa sự hấp thu, phân phối và thải trừ đồng của cơ thể. Do đó khi đột biến gen, sẽ gây rối loạn quá trình chuyển hóa đồng, giảm bài xuất đồng qua đường mật, lượng đồng ứ đọng dần trong các tổ chức như: Gan, não, mắt, da, thận, xương, khớp... và gây ra các triệu chứng đa dạng trên lâm sàng, các triệu chứng này tiến triển nặng dần cùng với quá trình lắng đọng đồng theo thời gian

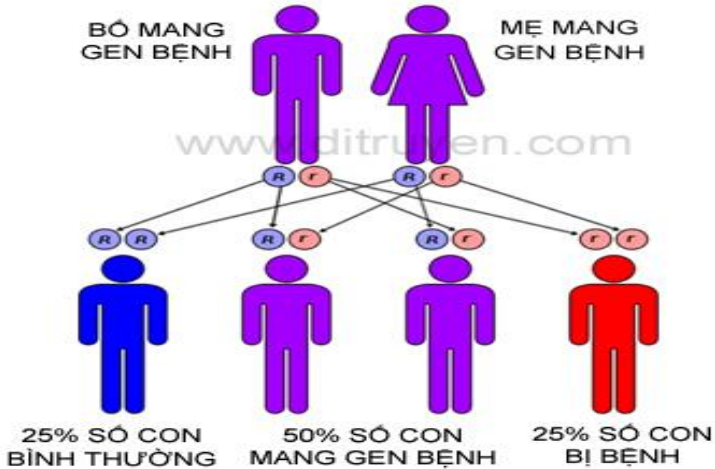
## **2. Di truyền học bệnh Wilson**

Bệnh Wilson là di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường. Nghĩa là để có thể biểu hiện ra bệnh, phải được thừa hưởng hai gen *ATP7B* bất thường, một gen từ bố và một gen từ mẹ. Nếu chỉ mang duy nhất một gen bất thường được gọi là người mang gen bệnh. Người mang gen bệnh có thể truyền lại gen bất thường này cho con cháu. Khi hai người cùng mang một gen bất thường, các trường hợp mà con họ sinh ra có thể gặp là:

- \* 25% trẻ bị bệnh Wilson vì nhận cả hai gen bất thường từ bố và mẹ

- \* 50% trẻ không bị bệnh Wilson nhưng sẽ là người mang gen bệnh vì nhận một gen bất thường từ bố hoặc mẹ và một gen bình thường từ người còn lại.

- \* 25% trẻ không bị bệnh Wilson và sẽ không phải là người mang gen bệnh vì nhận cả hai gen bình thường từ bố và mẹ.



**Hình 1.1. Kiểu gen của bố mẹ và tỷ lệ bị bệnh ở thế hệ con**

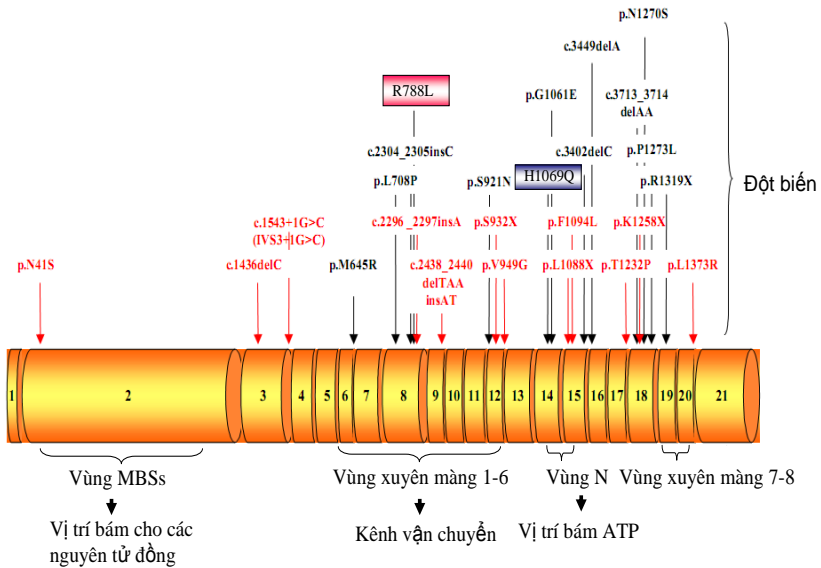
(<http://ditruyen.com>)

### 3. Cơ chế phân tử bệnh Wilson

Năm 1985, Frydman và cộng sự đã phát hiện ra gen đột biến của bệnh Wilson nằm trên nhiễm sắc thể 13. Gen mang bệnh này được khẳng định là ATP7B vào năm 1993 bởi hai nhóm tác giả Bull và Tanzi nghiên cứu độc lập với nhau. Năm 1994, Thomas và cộng sự xác định gen mang bệnh ở vị trí 13q14.3.

Cho đến nay cấu trúc gen, cơ chế bệnh học phân tử đã được nghiên cứu đầy đủ và rõ ràng. Gen ATP7B gồm 21 exon, mã hóa 1465 acid amin cấu thành một protein có chức năng vận chuyển đồng trong tế bào và sử dụng ATP làm năng lượng. Protein ATP7B mang đầy đủ các đặc điểm đặc trưng cho một protein thuộc họ protein P - typ APTase với các vùng chức năng như sau: Vùng xuyên màng,

vùng N- đóng vai trò là vị trí bám nucleotid, vùng P- có chức năng phosphoryl hóa, vùng A - có chức năng khử phosphoryl hóa, vùng MBSs với chức năng là vị trí bám cho các nguyên tử đồng - đặc điểm đặc thù của protein thuộc nhóm vận chuyển kim loại trong tế bào. Về mặt bệnh học phân tử, nguyên nhân gây bệnh Wilson là do thiếu hụt enzyme ATPase typ P (P-ATPase), được mã hóa bởi gen ATP7B trên NST 13q14.3. Enzym P-ATPase đóng vai trò vận chuyển đồng qua màng tế bào. Sự thiếu hụt hoặc giảm chức năng của enzym dẫn đến giảm sự bài tiết đồng từ tế bào gan vào mật và gây ứ đọng đồng tại gan. Khi lượng đồng trong gan tăng quá mức, đồng sẽ theo hệ thống tuần hoàn tới các cơ quan như: Não, mắt, thận...và gây ra các tổn thương cho các cơ quan này.



**Hình 1.2. Cấu trúc gen ATP7B và một số dạng đột biến hay gặp**

#### 4. Chẩn đoán bệnh

Dựa theo các tiêu chuẩn của Sternlieb (1978). Bao gồm:

+ Có các dấu hiệu của tổn thương gan và các dấu hiệu tổn thương khác

+ Có các triệu chứng thần kinh

+ Định lượng ceruloplasmin huyết thanh giảm dưới 20mg/dl

+ Có vòng Kayser - Fleischer

+ Tiền sử gia đình

- Tiêu chuẩn loại trừ:

+ Bệnh nhân không tự nguyện tham gia, bệnh nhân mắc các bệnh di truyền khác.

#### 5. Các phương pháp phát hiện bệnh Wilson

- *Các chỉ số cận lâm sàng*

- Nồng độ đồng huyết tương dưới 80mg/dl, đồng trong nước tiểu có thể tăng trên 100mg/ 24giờ hoặc trên 1mmol/24 giờ, lượng đồng trong 100 gram gan trên 250mg.

- Định lượng nồng độ ceruloplasmin máu luôn luôn giảm dưới 20mg/dl, có thể tới mức 0mg/dl hoặc chỉ còn dạng vết. Tăng ALT và AST, có protein nước niệu. Các xét nghiệm công thức máu, rối loạn đông máu.

- Xét nghiệm vi thể về gan viêm gan cấp, viêm gan mạn, xơ gan, hoại tử gan

- Chụp cắt lớp vi tính sọ não, chụp cộng hưởng , có thể thấy các tổn thương vùng đồi thị, nhân bèo, teo vỏ não, giãn não thất, giảm tín hiệu trên thì T1W, tăng tín hiệu trên thì T2W , hình ảnh giãn não thất, teo vỏ não.

## 6. Phát hiện đột biến gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Bằng việc sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen ATP7B, các nhóm nghiên cứu của Tanzi, Caca, Ferenci đã phát hiện ra dạng đột biến **H1069Q** (exon 14) phổ biến nhất trên bệnh nhân Wilson ở các nước Trung, bắc và Đông Âu. Khoảng 50-80% bệnh nhân Wilson ở các nước này có ít nhất một alen mang đột biến H1069Q. Một số các đột biến khác như 2299insC, G710S (exon 8); 3400 delC (exon 15) và R969Q (exon 13) chiếm tỷ lệ khoảng 10%. Nghiên cứu của Loudianos và cộng sự cho thấy đột biến mất 15 bp (-441/-427 del) nằm trong vùng promoter gen ATP7B là dạng đột biến đặc trưng cho nhóm bệnh nhân Wilson ở quốc đảo Sardinia thuộc vùng Địa Trung Hải. Một nghiên cứu khác của Oru S và cộng sự cho thấy đột biến mất 24 bp và Ala1278Val trong gia đình bệnh nhân Wilson cũng là một đột biến của quốc đảo này.

Bằng việc sử dụng kỹ thuật PCR kết hợp với dHPLC trước khi giải trình tự gen, Curtist và cộng sự năm 1999 đã cho thấy các đột biến ở exon 8, 14 và 18 chiếm đến 60% tỷ lệ các alen đột biến ở bệnh nhân Wilson nước Anh. Ở các quốc gia có sự đa dạng sắc tộc như Hoa Kỳ, Canada (khu vực Bắc Mỹ) việc thiết lập các dữ liệu về đột biến gen đặc trưng gặp nhiều khó khăn, Shah và cộng sự năm 1997 đã tiến hành nghiên cứu trên nhóm 118 bệnh nhân Wilson Hoa Kỳ có



gốc là người Cáp-ca (Bắc Âu) cũng cho thấy đột biến phổ biến nhất là đột biến H1069Q, tỷ lệ alen mang đột biến là 35,2%. Tại Brazil và Chi Lê đột biến chiếm tỷ lệ cao nhất là đột biến 3400delC. Cho đến nay dữ liệu về tỷ lệ đột biến gen ATP7B ở các nước châu Á hầu hết mới chỉ có ở 3 quốc gia là Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc. Năm 1995, Kim và cộng sự tìm thấy 3 dạng đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson người Hàn Quốc, trong đó đột biến hay gặp nhất là R778L trên exon 8, acid amin Arginine chuyển thành Leucin (CGG → CTG), ở vị trí codon 2333. Đột biến này chiếm tỷ lệ cao nhất ở Nhật Bản (35%) và Đài Loan (43,1%). Trong số 29 bệnh nhân Đài Loan được Lee Wan và cộng sự nghiên cứu bằng phương pháp PCR, sau đó xử lý sản phẩm PCR với enzym cắt giới hạn, giải trình tự gen đã phát hiện thấy 21 bệnh nhân mang đột biến R778L dạng dị hợp và 2 bệnh nhân mang đột biến dạng đồng hợp. Khi nghiên cứu 75 bệnh nhân Wilson người Trung Quốc, Liu và cộng sự đã phát hiện 49 trường hợp đột biến R778L, trong đó có 16 đồng hợp lặn và 33 trường hợp dị hợp.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về gen gây bệnh và phát hiện đột biến gen gây bệnh Wilson vẫn chưa có nghiên cứu nào toàn diện, những nghiên cứu trước đây tập trung chủ yếu về đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng. Năm 2011 Tạ Thành Văn và cộng sự đã xây dựng thành công qui trình phát hiện đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở Việt Nam.

## 7. Điều trị bệnh Wilson

Điều trị nhằm lập lại cân bằng lượng đồng trong các mô của cơ thể, bao gồm biện pháp làm giảm lượng đồng hấp thu ở ruột và tăng bài tiết đồng qua nước tiểu. Kiêng ăn một số loại thức ăn có hàm lượng đồng cao như đồ hải sản có vỏ, các loại hạt, gan, sôcôla, sản phẩm từ đậu nành, gelatin, quả khô và nấm. Nước uống nên dùng nước tinh khiết thay thế. Không uống bia, rượu và các chất kích thích. Thuốc điều trị bệnh Wilson D-penicillamine, dicaptol, trientine. Kẽm acetat hoặc kẽm sulphat, tetrathiomolybdate, thuốc chống oxy hóa. Bệnh Wilson có tiên lượng rất đáng ngại nếu không được chẩn đoán đúng. Một số trường hợp tuy được điều trị nhưng vẫn có thể tiến triển nặng lên, thậm chí có nguy cơ tử vong.

## Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Gồm 61 bệnh nhân Wilson đã được xác định đột biến gen ATP7B (tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội) bao gồm:

- 10 người khỏe mạnh, tiền sử gia đình không có người mắc bệnh di truyền dùng để chuẩn hóa kỹ thuật và làm mẫu đối chứng cùng với mẫu nghiên cứu khi thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích gen.

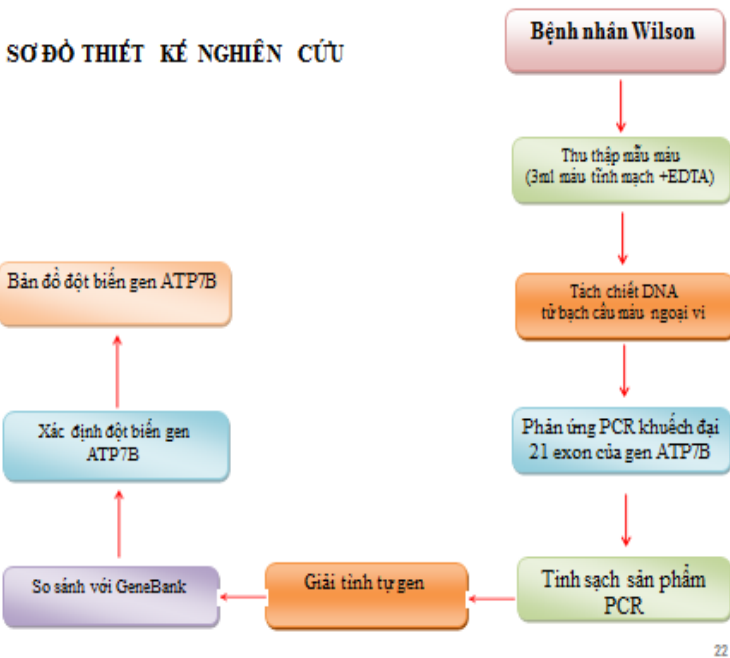
Các đối tượng nghiên cứu được lấy mẫu nghiên cứu: Máu tĩnh mạch có chống đông EDTA

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu:

Sử dụng phương pháp nghiên cứu tiền cứu và mô tả cắt ngang

## 2.3. Địa điểm nghiên cứu

- + Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, trường Đại học Y Hà Nội.
- + Thời gian từ 1/2012 – 6/2014.



22

## 2.4. Quy trình và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Tách chiết DNA tổng số từ mẫu nghiên cứu.
- Phản ứng PCR khuếch đại 21exon gen ATP7B.
- Kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến điểm .

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

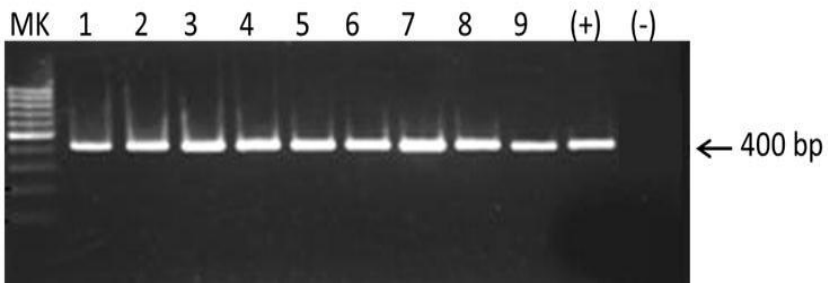
### Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả tách chiết DNA

DNA tổng số từ máu toàn phần được tách theo phương pháp phenol/chloroform. Nồng độ DNA tổng số tách được có giá trị từ 150 – 1200 ng/ $\mu$ l và độ tinh sạch của các mẫu đạt yêu cầu với tỷ lệ mật độ quang đo được ở bước sóng 260/280 nm luôn nằm trong khoảng 1,8-2,0.

#### 3.2. Kết quả chạy PCR khuếch đại các vùng exon của gen ATP7B

Sử dụng 21 cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ 21 exon của gen ATP7B. Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 250÷550 bp. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5%. Hình 3.1. hình ảnh kết quả PCR khuếch đại exon 3 của gen ATP7B.



**Hình 3.1. Hình ảnh kết quả PCR khuếch đại exon 3 của gen ATP7B.** (+) mẫu đối chứng dương; (-) mẫu chứng âm; (1-9) mẫu bệnh nhân; (MK) Marker  $\Phi$ 174.

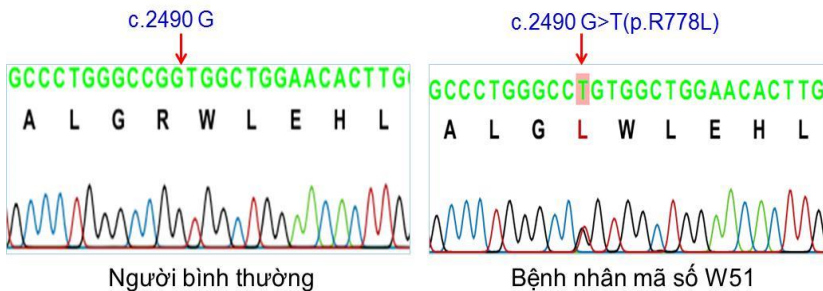
**Nhận xét:** Sản phẩm PCR thu được chỉ có 1 băng đặc hiệu, rõ nét, không có sản phẩm phụ. Sản phẩm khuếch đại PCR đảm bảo cho phản ứng giải trình tự tiếp theo để phát hiện đột biến điểm

### 3.3. Kết quả phát hiện đột biến gen *ATP7B*

Sản phẩm PCR tiếp tục được giải trình tự gen để phát hiện đột biến. Kết quả cho thấy có nhiều kiểu gen khác nhau được phát hiện trên bệnh nhân Wilson bao gồm: kiểu gen đột biến dị hợp tử, kiểu gen đột biến đồng hợp tử tại 1 vị trí trên gen và các kiểu gen khác do sự kết hợp của 2 dạng đột biến dị hợp tử, đồng hợp tử hoặc kết hợp với các SNP.

#### 3.3.1. Bệnh nhân Wilson với các dạng đột biến khác nhau trên gen *ATP7B*

**Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (missense mutation)**

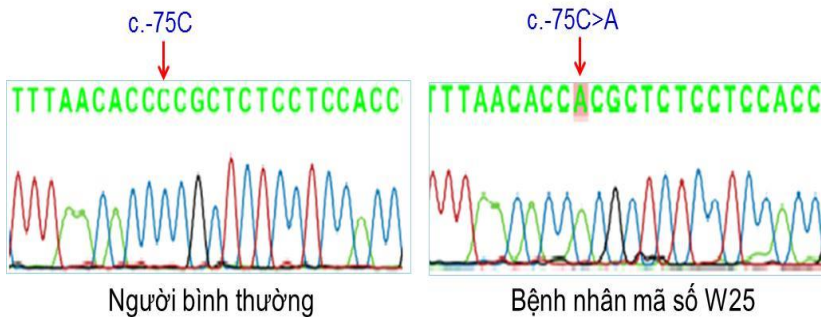


**Hình 3.2. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W51**

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi.

**Nhận xét:** Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W51 có đột biến sai nghĩa dị hợp tử, thay thế nucleotid 2490G>T dẫn đến bộ ba thứ 778 CGG mã hóa Arginine chuyển thành CTG mã hóa Leucine (R778L).

### Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử ở vùng 5' UTR

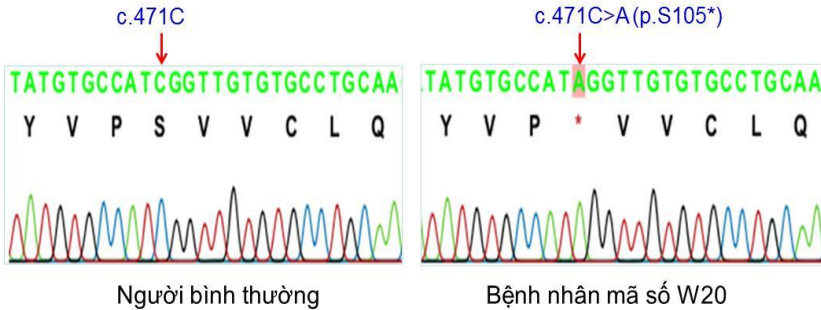


### Hình 3.3. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W25

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid thay đổi.

**Nhận xét:** Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W25 có đột biến đồng hợp tử C thay thế thành A ở vùng 5'UTR cách vị trí mã khởi đầu 75 bp

**Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử tạo mã kết thúc sớm (stop codon)**

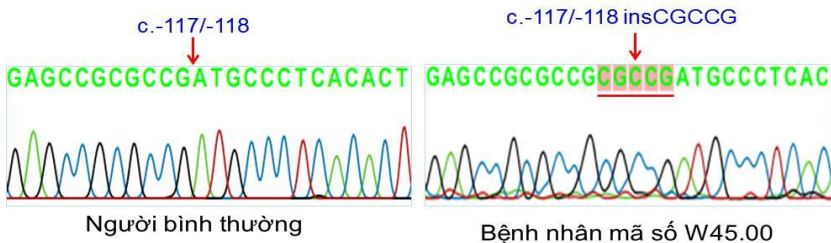


**Hình 3.4. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W20**

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí nucleotid và acid amin thay đổi.

**Nhận xét:** Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W20 có đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*).

#### Bệnh nhân có đột biến thêm nucleotid (insertion mutation)



**Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen của bệnh nhân mã số W45**

Mũi tên thẳng đứng chỉ vị trí đột biến, các chữ số trên mũi tên chỉ vị trí thêm nucleotid.

**Nhận xét:**

Giải trình tự gen ATP7B phát hiện bệnh nhân mã số W45 có đột biến đồng hợp tử thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa -117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp).

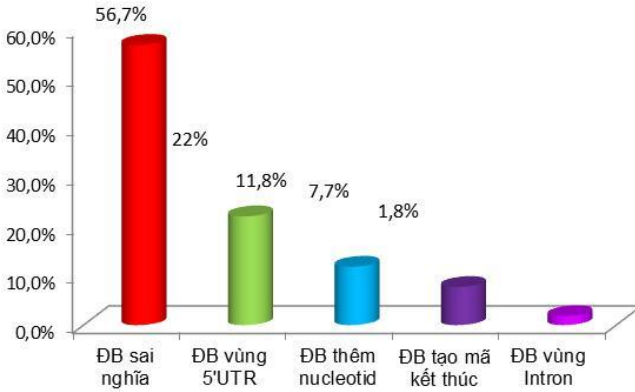
**Bảng 3.1. Các loại đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson**

| STT | Đột biến           |                    | Vùng /exon | Số lượng |
|-----|--------------------|--------------------|------------|----------|
|     | Thay đổi nucleotid | Thay đổi acid amin |            |          |
| 1.  | c.-75C>A           |                    | 5'UTR      | 12       |
|     | c.117/118CGCCG     |                    |            | 13       |
|     | c.-128A>C          |                    |            | 1        |
| 2.  | Ins 47/48 CGGCG    |                    | Exon 1     | 14       |
| 3.  | c.471C>A           | p.S105*            | Exon 2     | 9        |
|     | c.305G>A           | p.G50S             |            | 1        |
| 4.  | c.1523G>C          | p.V456L            | Exon 3     | 23       |
| 5.  | c.1810G>C          | p.A604P            | Exon 5     | 2        |
| 6.  | c.2490G>T          | p.R778L            | Exon 8     | 5        |
|     | c.2147T>G          | p.T715A            |            | 1        |
| 7.  | c.2652 A>G         | p.K832R            | Exon 10    | 13       |
|     | c.2706C>T          | p.T850I            |            | 3        |
| 8.  | c.2862T>C          | p.L902P            | Exon 11    | 1        |
| 9.  | c.2974G>C          | p.W939C            | Exon 12    | 1        |



|             |             |           |           |            |
|-------------|-------------|-----------|-----------|------------|
|             | c.2982 G>A  | p.G943D   |           | 1          |
|             | c.3012G>A   | p.R952K   |           | 1          |
| 10.         | c.3106 G>C  | p.C980S   | Exon 13   | 1          |
|             | c.3107C>A   | p.C980S   |           | 1          |
|             | c.2954G>A   | p.C985T   |           | 1          |
| 11.         | c.2892G>A   | p.G943D   | Exon 14   | 1          |
|             | c.3079G>C   | p.D1027H  |           | 1          |
| 12.         | c.3577T>C   | p.V1140A  | Exon 16   | 5          |
|             | c.3587T>A   | p.F1144I  |           | 1          |
|             | c.3600T>C   | p.P1148L  |           | 1          |
| 13.         | c.3966C>A   | p.F1240I  | Exon 18   | 1          |
|             | c.3976A>T   | p.N1270I  |           | 1          |
| 14.         | c.4060+6C>T |           | IVS18     | 2          |
| 15.         | c.4112T>C   | p.L1371P  | Exon 20   | 1          |
| <b>Tổng</b> | <b>28</b>   | <b>28</b> | <b>15</b> | <b>117</b> |

**Nhận xét:** 28 loại đột biến và SNP khác nhau đã được phát hiện trên 14 exon và vùng 5'UTR của gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson Việt Nam. Đột biến ở vùng exon chiếm tỉ lệ cao nhất (76%), tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ cao thứ 2 (22%), đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp nhất (2%).



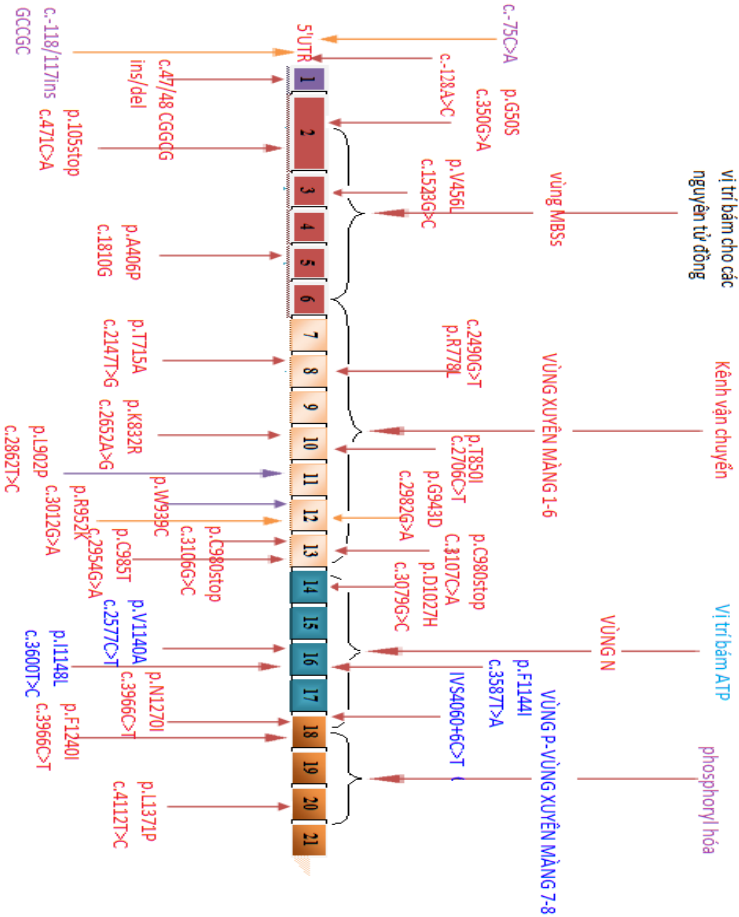
**Hình 3.6. Các dạng đột biến phát hiện được trên bệnh nhân Wilson (ĐB: đột biến)**

**Nhận xét:**

Trong 5 dạng đột biến đã được phát hiện trên gen ATP7B ở 48 bệnh nhân Wilson Việt Nam, đột biến sai nghĩa (missense mutation) chiếm tỉ lệ cao nhất với 56,7%, tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ 22%, đột biến thêm nucleotid chiếm tỉ lệ 11,8%, đột biến tạo mã kết thúc sớm và đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp với 7,7% và 1,8%.

**3.5. Thiết lập bản đồ đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở Việt Nam**

xây dựng bản đồ gen gây bệnh Wilson dựa trên các đột biến xuất hiện trong nghiên cứu, các đột biến được công bố gây bệnh trực tiếp, hoặc các đột biến có tác động cộng hưởng gây bệnh. Đột biến xuất hiện trên toàn bộ exon và các vùng chức năng của gen ATP7B. Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, 28 kiểu đột biến được tìm thấy trên 48 bệnh nhân nghiên cứu, đột biến phát hiện được ở vùng 5' UTR, ở 13 exon của gen và vùng intron 18.



**Hình 3.7. Bản đồ vị trí đột biến gen ATP7B gây bệnh Wilson ở bệnh nhân Wilson Việt Nam**

**Nhận xét: 3 kiểu đột biến vùng 5'UTR, 24 kiểu đột biến trên exon, 1 kiểu đột biến trên intron**

## Chương 4

### BÀN LUẬN

Bệnh Wilson và những bệnh lý di truyền trên gen lặn trên nhiễm sắc thể thường, biểu hiện lâm sàng phức tạp, bệnh cảnh đa dạng, phong phú, chẩn đoán gặp nhiều khó khăn. Chẩn đoán bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử, giúp cho chẩn đoán sớm và chính xác bệnh. Xác định vị trí các đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson cung cấp nhiều lợi ích cho khoa học cơ bản và ứng dụng lâm sàng. là một tiêu chuẩn vàng để khẳng định chính xác chẩn đoán bệnh, giúp phát hiện người lành mang gen bệnh, tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho những bà mẹ có nguy cơ cao giúp ngăn ngừa và làm giảm tỉ lệ mắc bệnh.

#### **KẾT QUẢ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN ATP7B**

Để tiến hành xác định đột biến trên gen ATP7B, tách chiết DNA là bước đầu tiên quan trọng của quy trình thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử. Trong nghiên cứu này, tất cả mẫu DNA được đo trên máy quang phổ kế Nano-drop ở bước sóng 260/280nm đều có độ tinh sạch nằm trong khoảng  $1,8 \div 2,0$ .

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR và giải trình tự gen trực tiếp đã được áp dụng để xác định đột biến. Kết quả cho thấy đã phát hiện được 48/61 (78,6%) bệnh nhân được phát hiện có đột biến trên gen ATP7B gồm các đột biến sai nghĩa, đột biến thêm nucleotid, đột biến ở vùng 5' tận và đột biến ở vùng intron.

## **Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa (missense mutation)**

### *Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa dị hợp tử*

Đột biến sai nghĩa dị hợp tử trên exon 8 thay thế nucleotid tại vị trí 2490 G>T, làm cho bộ ba mã hóa arginine chuyển thành leucine. Đây là đột biến được công bố gây bệnh. Hai kiểu đột biến trên exon 8, p.T715A và p.R788L được tìm thấy. Đột biến p.T715A là một đột biến mới. Tại cùng vị trí này, đã có một nghiên cứu của Hungary công bố đột biến p.T715H gây bệnh Wilson và một nghiên cứu của Ấn độ công bố đột biến tạo mã kết thúc p.T715Stop . Ở bệnh nhân mang đột biến p.T715A xuất hiện thêm một đột biến dị hợp tử trên cùng exon 8, đó là đột biến p.N765G (c.2295C>G). Đột biến này cũng đã được công bố gây bệnh trong một nghiên cứu của Trung Quốc . Arginin (R) là một acid amin phân cực mang tính kiềm giữ vai trò quan trọng cho quá trình cân bằng điện tích của màng tế bào, cho nên sự thay đổi tính chất acid amin tại vị trí này, ảnh hưởng lớn đến quá trình chuyển hoá  $\text{Cu}^{2+}$

### *Bệnh nhân có đột biến sai nghĩa đồng hợp tử*

\* Đột biến c.-75C>A là đột biến sai nghĩa do thay thế nucleotid C thành A tại vị trí nằm cách mã khởi đầu 75 bp: 12 bệnh nhân mang đột biến kiểu này, bao gồm 7 bệnh nhân mang đột biến đồng hợp tử và 5 bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử. Đột biến đồng hợp tử kết hợp với các đột biến dị hợp tử hoặc giữa đột biến đồng hợp tử với đột biến đồng hợp tử khác, làm cho cấu trúc và chức năng của protein ATP7B thay đổi, dẫn đến giảm một phần

khả năng vận chuyển đồng hoặc mất hoàn toàn khả năng vận chuyển đồng của protein ATP7B.

### **Bệnh nhân có đột biến ở vùng 5' UTR**

Một số bệnh nhân có đột biến ở vùng 5'UTR như đột biến -75C>A, đột biến c-128A>; đột biến-118/117 ins CGCCG, những đột biến này có thể là dị hợp tử hoặc đồng hợp tử, bệnh nhân có thể có đột biến duy nhất hoặc kết hợp với nhiều đột biến khác. Các đột biến ở vùng 5'UTR đã được chứng minh là nguyên nhân gây bệnh wilson.

### **Bệnh nhân có đột biến tạo mã kết thúc sớm (nonsense mutation)**

Bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử thay thế nucleotid 471C>A dẫn đến bộ ba thứ 105 TCG mã hóa Serine chuyển thành mã kết thúc sớm TAG (S105\*). Đột biến này phát hiện trên exon 2. Đây là vị trí bám cho các nguyên tử đồng gồm 6 MBSs, mỗi một MBSs gồm các trình tự MxCxxC, 1 MBSs sẽ gắn với một nguyên tử đồng. Đột biến tạo nên mã kết thúc sớm, làm mất hoàn toàn chức năng và cấu trúc của protein ATP7B, đột biến p.105Stop được công bố gây bệnh ở các nước Đức, Trung Quốc

### **Bệnh nhân có đột biến thêm nucleotid (insertion mutation)**

Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG ở vị trí giữa - 117/-118 trên vùng 5'UTR (cách vị trí mã khởi đầu 117 bp). Đột biến thêm 5 nucleotid CGCCG đã làm thay đổi trình tự các acid amin phía sau của gen, do đó làm thay đổi chức năng của vùng này, hoặc tạo nên mã kết thúc sớm, là nguyên nhân gây bệnh Wilson, đã được công bố trong nhiều nghiên cứu của Trung Quốc, Nhật Bản, Tây Ban nha, Ý.

## KẾT LUẬN

### 1. Xác định đột biến gen trên bệnh nhân Wilson

48/61 (78,6%) bệnh nhân Wilson Việt Nam có đột biến gen ATP7B, với tổng số 118 được phát hiện, và 13/61 (21,4%) bệnh nhân không phát hiện thấy đột biến gen ATP7B.

Đột biến sai nghĩa chiếm tỉ lệ cao nhất (56,7%), tiếp theo là đột biến ở vùng 5'UTR chiếm tỉ lệ 22%, đột biến thêm nucleotid và đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm tỉ lệ thấp hơn với 11,8% và 7%, đột biến ở vùng intron chiếm tỉ lệ thấp nhất (2%).

### 2. Đã thiết lập thành công bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam

Bước đầu đã thiết lập thành công bản đồ đột biến gen ATP7B trên bệnh nhân Wilson Việt Nam với 28 dạng đột biến gen phân bố trên 13 exon của gen ATP7B, trong đó đột biến ở vùng exon 3, exon 10 chiếm tỉ lệ cao nhất, tiếp theo là ở vùng exon 1, exon 2, exon 16 và exon 8 chiếm tỉ lệ thấp hơn.

## KIẾN NGHỊ

Bệnh Wilson thường được phát hiện muộn. Rất nhiều triệu chứng của bệnh gây nên những chẩn đoán khác nhau. Chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây bệnh, góp phần vào chẩn đoán sớm điều trị sớm, giảm kinh phí cho gia đình người bệnh cũng như

gánh nặng của xã hội. Do đó chúng tôi xin có một số kiến nghị như sau:

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen ATP7B ở bệnh nhân Wilson.
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về người mang gen bệnh Wilson.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những bà mẹ có nguy cơ sinh con bị bệnh trong quá trình mang thai.



24,1,2,23,22,3,4,21,20,5,6,19,18,7,8,17,16,9,10,15,14,11,12,13

## **BACKGROUND**

### **\* Urgency of topics**

Wilson's disease disrupts copper metabolism was described long ago and found in many countries around the world. This is a recessive genetic disease on autosomes (13q14.3). ATP7B gene mutations, gene coding for the enzyme ATP7B P-type ATPase, respectively, with copper transport function in the body. Wilson disease manifestations copper accumulation in the liver and other organs of the body such as the brain, eyes, kidney, skin, bones, joints. If not diagnosed and treated promptly, the copper accumulation in these organs will cause serious complications to the nervous, digestive, psychiatric, metabolic disorders and pigmentation. In Vietnam, an estimated 3000 people and about 100,000 have Wilson's disease Wilson's disease gene carrier. The clinical study showed that patients with the diagnosis determined early treatment measures helped limit the complications and maintain the normal function of organs in the body. Therefore, the application of the techniques of modern molecular biology to determine the exact genetic mutations causing Wilson disease is essential, especially in patients with a family history or the patient has symptoms atypical

\* Objectives of the research

- (1). ATP7B gene mutations detected in patients with Wilson.
- (2). Establishing distribution maps ATP7B gene mutations in patients with wilson research.

\* The meaning of scientific and practical subjects:

This study is the ATP7B gene mutations detected a first comprehensive implementation in Vietnam. Using high techniques of modern molecular biology. The results of the thesis important contribution to the collection of disease-related mutations Wilson, explain the pathogenesis, establishing reliable diagnostic method enables the screening and genetic counseling aims to prevent and reduce disease incidence

Wilson disease detection in fact there are many difficulties, due to atypical symptoms, patients medical examination specialists in many different, Common tests GOT, GPT, ceruloplasmin not accurately detect the disease.

This is the first comprehensive study ATP7B gene mutations of patients Wilson in Vietnam. Using the direct detection method (by PCR and sequenced), the subject has pinpointed the ATP7B gene mutations in patients with Wilson, mapping the genetic mutations in patients studied and create a scientific basis for the marriage counseling, genetics and

diagnostics, aimed ultimately prevent and reduce disease incidence. Therefore the subject of scientific significance and profound humanism.

**\* Thesis structure**

- The thesis is presented in the 93 pages (not including references and appendices). The thesis is divided into 7 sections:

- + Introduction: 2 pages
- + Chapter 1: Overview document 33 pages
- + Chapter 2: Objects and methodology 13 pages
- + Chapter 3: Research Results 21 pages
- + Chapter 4: Discussion 22 pages
- + Conclusion: 1 page
- + Propose: 1 page

The thesis consists of 4 tables, 3 charts and figure 21. Using 101 references, including Vietnamese, English and some Web pages. The appendix includes medical studies, Study subjects : including 61 patients diagnosed by clinical Wilson, defined mutation ATP (Center for Gene - Protein Research, Hanoi Medical University)

## **Chapter 1: OVERVIEW**

### **1.1. Wilson disease**

Wilson's disease was first described in the late 19th century and so far the disease has been detected widely in almost all countries and races around the world. Prevalence of about  $\sim 1/350000$  birth. According to this ratio, estimated in our country today there are about 3,000 people with Wilson's disease. This is a recessive genetic disease on chromosome 13, is caused by genetic mutations ATP7B. Gene is important role in the regulation of the absorption, distribution and excretion of copper in the body. Therefore the mutation, will disrupt copper metabolism, reducing the excretion of copper via bile, the amount of copper accumulation in the organization gradually as : Live, brain, eye, skin, kidneys, bones, joints... and cause a variety of symptoms in clinical practice, these symptoms are progressive with copper deposition process over time)

### **1.2. Genetics Wilson disease:**

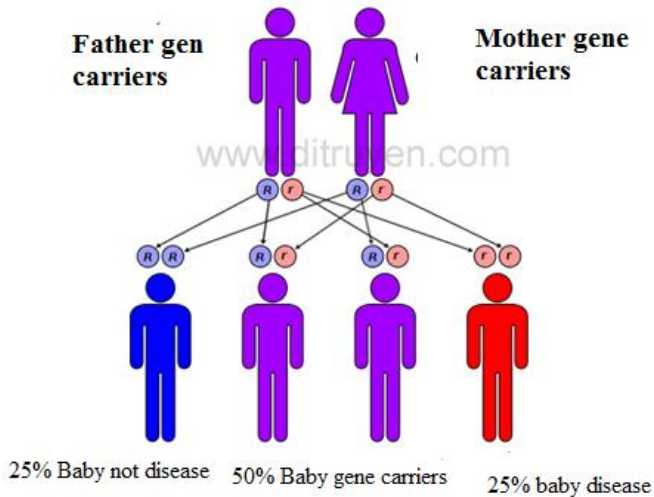
Wilson disease is a genetic recessive often chromosome. Popular disease manifested when carrying both parental genes ATP7B. If only a single abnormal gene are called carriers of the disease gene. The gene carriers can transmit this abnormal gene to their children. When two people who carry an abnormal

gene, the case that their child is born may experience

\* 25% children Wilson disease for abnormal genes from both parents

\* 50% children will be a carrier of the disease gene, not have Wilson's disease

\* 25% children born normal



**Figure1.1.** Genotypes of the parents and the rate of disease in baby

(<http://ditruyen.com>)

### 1.3. Wilson disease molecular mechanism

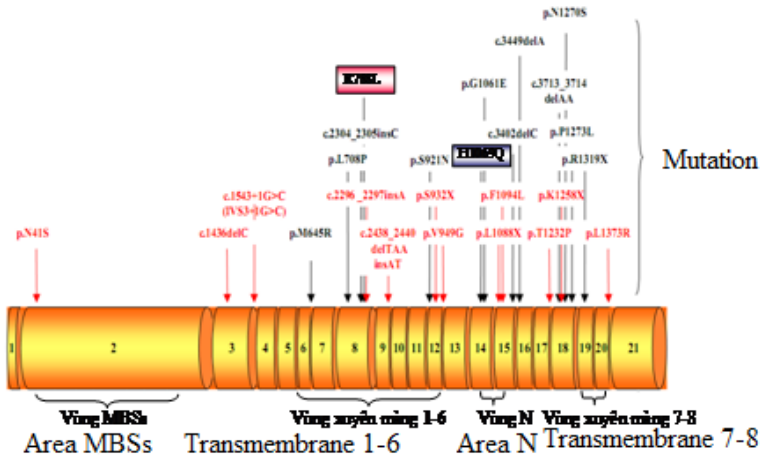
In 1985, Frydman and his colleagues discovered the gene mutation of Wilson disease on chromosome 13. Gene carries the disease was confirmed ATP7B in 1993 by authors Tanzi Bull and independent studies together. In 1994, Thomas and his

colleagues identified the disease gene at position 13q14.3.

Genetic structure molecular pathology mechanisms were investigated fully and clearly. ATP7B gene comprises 21 exons, encoding 1465 amino acids constituting a protein responsible for transporting copper and ATP for energy use. Protein ATP7B the unique characteristics of a protein belonging to a family of proteins P - typ ATPase with the following functional areas. Transmembrane region, the N- act as nucleotide binding site, the phosphorylation function P, the A - reducing phosphorylation function, the function is MBSs positions for copper atoms bind. Wilson's disease is caused by deficiency of the enzyme ATPase typ P (P - ATPase), is encoded by a gene on chromosome 13q14.3 ATP7B. P - ATPase enzyme acts as transport copper through the cell membrane. The lack or reduced function of the enzyme leads to reduced copper excretion into the bile from the liver cells and causing hepatic copper accumulation .

Wilson disease manifestations copper accumulation in the liver and other organs of the body such as the brain, eyes, kidney, skin, bones, joints.If not diagnosed and treated promptly, the copper accumulation in these organs will cause serious complications to the nervous, digestive, psychiatric, metabolic disorders and pigmentation.The clinical study showed that patients

with the diagnosis determined early treatment measures helped limit the complications and maintain the normal function of organs in the body.



**Figure1.2.** *ATP7B* gene structure and mutations

#### 1.4. Diagnose

- \* The standards of Sternlieb (1978).
- + Liver damage symptom
- + Neurological symptoms
- + Serum ceruloplasmin <20mg/dl
- + Within Kayser - Fleischer
- + Family history
- Exclusion :



+ Patients with other neurodegenerative diseases.

### **1.5. The detection method Wilson**

- Subclinical indices
- Copper in plasma < 80mg / dl, increased copper in urinary > 100mg/24hours or > 1mmol/24hours, 100 grams in the liver over 250mg copper
- Quantification of blood ceruloplasmin concentrations decrease below 20mg / dl, may be to the extent 0mg / dl or only trace. Increased ALT and AST, urinary protein. Tests of blood count, blood coagulation disorders
- Microscopic tests on liver acute hepatitis, chronic hepatitis, cirrhosis, liver necrosis
- Computed tomography brain, MRI, we can see the damage the hippocampus, the dirt, cortical atrophy, ventricular dilatation, hypointense on T1-weighted images, the increase on the T2-weighted signal, image photo ventricular dilatation, cortical atrophy.

### **1.6. Molecular biology techniques to detection gene mutations .**

Technical use ATP7B gene sequencing, the team of Tanzi, Caca, Ferenci discovered H1069Q mutations (exon 14), most commonly in patients with Wilson in the countries of Central, Northern and Eastern Europe

Approximately 50-80% of patients with Wilson in those countries have at least one mutant allele H1069Q. Several other mutations as 2299insC, G710S (exon 8) ; DelC 3400 (exon 15)

and R969Q (exon 13) percentage of about 10%.

Research Loudianos et al showed a 15 bp mutation (-441 / -427 del) located in the promoter region of the gene is ATP7B mutations specific to patients Wilson in Sardinia island nation located in the Mediterranean. Another study of Oru S et al showed that mutant lost 24 bp and Ala1278Val in patients with Wilson's family is also a mutation of this island nation. Using PCR combined with dHPLC before sequenced, Curtist et al 1999 showed mutations in exon 8, 14 and 18 accounted for 60% the proportion of mutant alleles in patients Wilson in England. In countries with ethnic diversity like USA, Canada (North America) the establishment of data on specific genetic mutations difficult

Shah et al 1997 study conducted on 118 patients with Wilson Group USA is denominated Caucasians (Nordic) also showed that the most common mutations are mutations H1069Q, allele mutation rate is 35.2%. In Brazil and Chile mutations highest proportion 3400delC mutations. So far data on ATP7B gene mutation rates in most Asian countries, only in 3 countries are China, Japan and Korea. In 1995, Kim et al found three gene mutations in patients with Wilson ATP7B Korean people, which is the most common mutation in exon 8 R778L, leucine amino acid Arginine converted (CGG → CTG) at codons 2333.

This mutation accounts for the highest rate in Japan

(35%) and Taiwan (43.1%). 29 Taiwan patient is Lee Wan et al studied by PCR, then PCR products processed with restriction enzymes, genetic sequencing detected 21 patients with heterozygous mutations R778L and 2 types patients homozygous mutant. Wilson studied 75 patients with the Chinese people, Liu and colleagues have discovered 49 cases R778L mutation, while 16 and 33 homozygous recessive heterozygous case. Wilson in Vietnam, the study of disease gene discovery and genetic mutations causing Wilson disease, not comprehensive studies, in 2011 Van Ta Thanh et al, his team build successful detection process ATP7B gene mutations cause Wilson disease in Vietnam.

### **1.7. Treatment of Wilson's disease:**

Treatment to restore balance in the body contrac, including measures to reduce intestinal absorption measure copper and copper increased excretion via urine.

Diet some foods containing high copper shelled seafood, nuts, liver, chocolate, soy products, gelatin, dried fruit and mushrooms use pure drinking instead. Do not drink of beer, alcol and stimulants. Drug treatment of Wilson D - penicillamine, dicaptol, acetate or zinc sulphate trientine zinc, tetrathiomolybdate, antioxidants. Wilson defended very ominous prognosis if not diagnosed properly. In some cases, though treated, but can progress to severe, even fatal risks.

## Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS

### 2.1. Research Subjects

Of 61 patients with Wilson gene mutation (Gen Research Center - Protein Hanoi Medical University)

- 10 people healthy, with no family history of the disease genetic engineering used to standardize and control samples and samples from carrying out research in molecular biology techniques for genetic analysis.

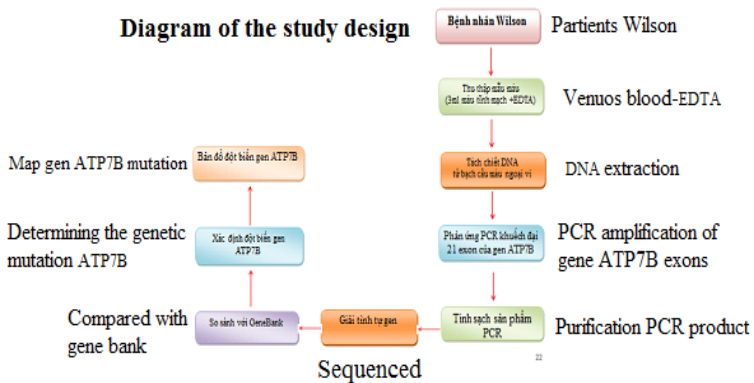
### 2.2. Research Methodology:

Using a prospective study and cross-sectional descriptive

### 2.3. Study sites

+ Center for Gene Research - Protein, Hanoi Medical University.

+ Time from 1/2012 - 6/2014.



### 2.4. The process and techniques used in the study

- DNA extracted from the sample total
- PCR amplification ATP7B gene exon 21
- Technical sequenced

### 2.5. Thread adhere research ethics in medicine.

## Chapter 3: RESULTS

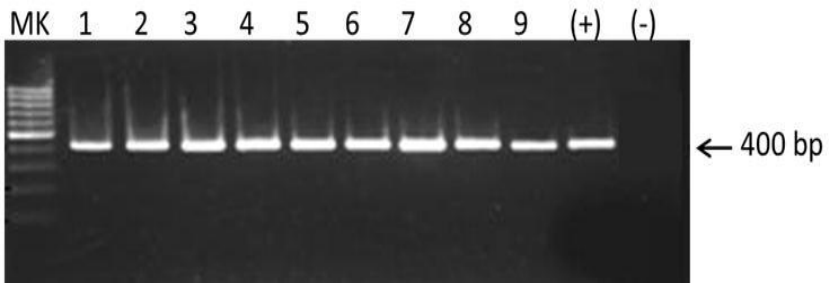
### 3.1. Results DNA extraction

Total DNA from whole blood is separated by the method of phenol / chloroform

The concentration of total DNA extracted value from 150 - 1200 ng / ml and purity of the sample at a rate satisfactory optical density measured at 260/280 nm wavelengths are in the range 1.8 -2.0.

### 3.2. Results PCR amplification exon regions of gene ATP7B

Using 21 primers of specific primers to amplify all 21 exons of the gene ATP7B. The size of the PCR products in the range of 250-550 bp. Amplification products by agarose gel electrophoresis on 1.5%.



*Figure 3.1. PCR amplification results of exon 3 of the ATP7B gene.*

MK: Marker  $\Phi 174$ .

1-9 : Patient's

(-): Negative control

(+): positive control

*Comment: PCR products obtained clear, no byproducts.*

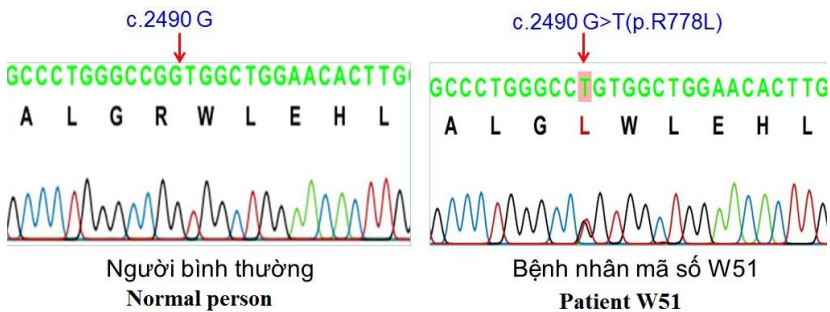
*PCR amplification products guaranteed response next sequenced to detect point mutations*

### 3.3. Results detected gene mutations ATP7B

PCR products continue to be sequenced to detect mutations. The results showed that many different genotypes were detected in patients with Wilson include mutant genotype heterozygote genotype homozygous mutation in one location on the gene and the other genotype combinations of 2 heterozygous mutation, homozygous or combined with the SNP.

### 3.4. Wilson patients with the mutation form of the gene ATP7B

\* missense mutation

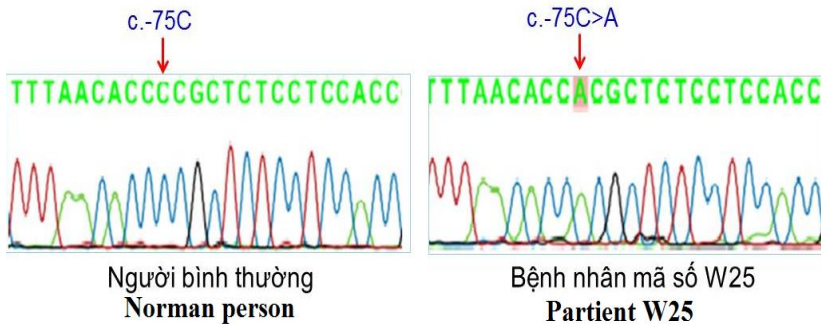


*Figure 3.2. Gene sequencing results of patient identification number W51*

Vertical arrow indicating the location mutations, the digits on the arrow pointing nucleotide and amino acid position changes.

**Comment:** ATP7B gene sequencing to detect patients with mutation code W51 heterozygous missense, replacing nucleotide 2490G > T leads to 778 CGG triplet coding things turn into CTG encoding Arginine Leucine (R778L).

\* **Patients homozygous mutation 5' UTR**

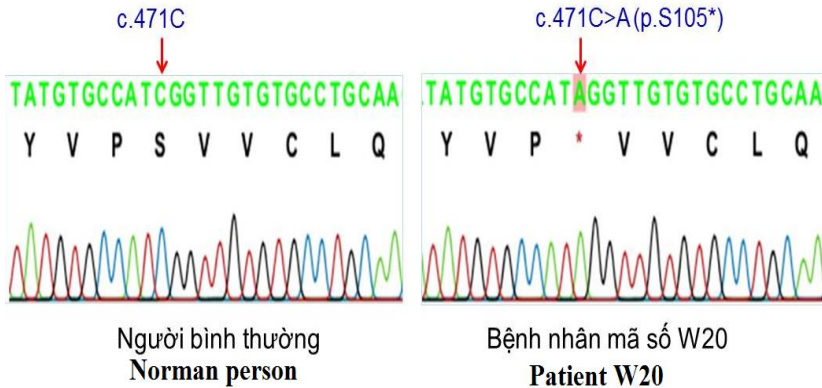


*Figure 3.3. Gene sequencing results of patient identification number W25*

Vertical arrow indicating the location mutations, the digits on the arrow indicating the location of nucleotide changes.

**Comment:** ATP7B gene sequencing detects code W25 patients homozygous mutation into C replacement at 5'UTR area code starting from position 75 bp

**\*Patients with homozygous mutations stop codon**



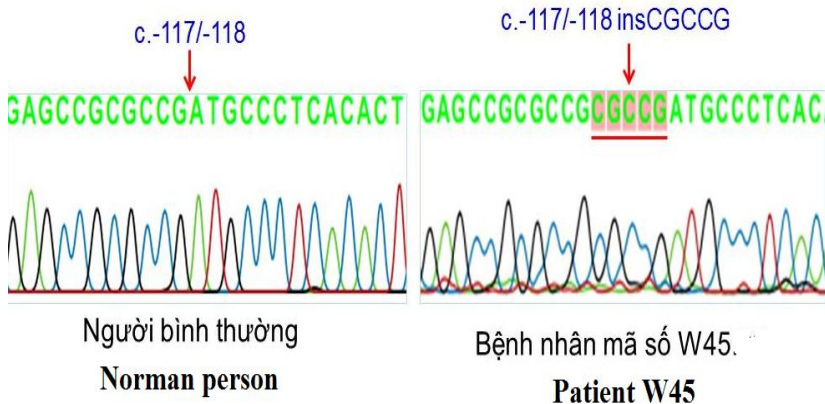
*Figure 3.4. Gene sequencing results of patient identification number W20*

Vertical arrow indicating the location mutations, the digits on the arrow indicating the location of nucleotide changes.

**Comment:** ATP7B gene sequencing detects code W20 patients homozygous mutations of nucleotide substitution 471C > A guide to the three 105 TCG Serine converted encryption codes ending TAG (S105 \*)



**\*Patients with mutation *insertion mutation***



*Figure 3.5. Gene sequencing results of patient identification number W20*

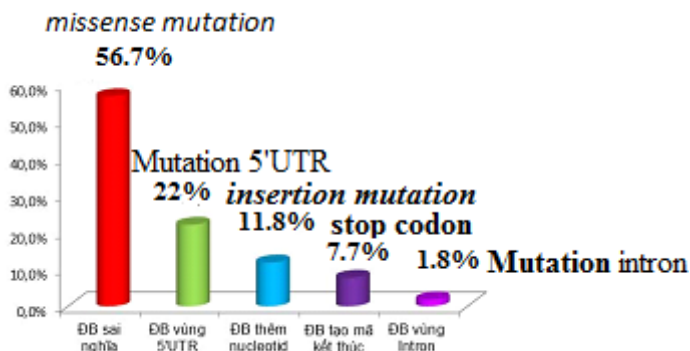
Vertical arrow indicating the location mutations, the digits on the arrow indicating the location of nucleotide changes.

**Comment:** ATP7B gene sequencing detects code W45 patients homozygous mutations CGCCG 5 nucleotides at positions between -117 / -118 on the 5'UTR (code starting from position 117 bp).

**Table 3.1. *ATP7B* gene mutations in patients with Wilson**

| ordinal numbers | Mutation        |           | Exon      | Numbers    |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------|------------|
|                 | nucleotid       | acid amin |           |            |
| 1.              | c.-75C>A        |           | 5'UTR     | 12         |
|                 | c.117/118CGCCG  |           |           | 13         |
|                 | c.-128A>C       |           |           | 1          |
| 2.              | Ins 47/48 CGGCG |           | Exon 1    | 14         |
| 3.              | c.471C>A        | p.S105*   | Exon 2    | 9          |
|                 | c.305G>A        | p.G50S    |           | 1          |
| 4.              | c.1523G>C       | p.V456L   | Exon 3    | 23         |
| 5.              | c.1810G>C       | p.A604P   | Exon 5    | 2          |
| 6.              | c.2490G>T       | p.R778L   | Exon 8    | 5          |
|                 | c.2147T>G       | p.T715A   |           | 1          |
| 7.              | c.2652 A>G      | p.K832R   | Exon 10   | 13         |
|                 | c.2706C>T       | p.T850I   |           | 3          |
| 8.              | c.2862T>C       | p.L902P   | Exon 11   | 1          |
| 9.              | c.2974G>C       | p.W939C   | Exon 12   | 1          |
|                 | c.2982 G>A      | p.G943D   |           | 1          |
|                 | c.3012G>A       | p.R952K   |           | 1          |
| 10.             | c.3106 G>C      | p.C980S   | Exon 13   | 1          |
|                 | c.3107C>A       | p.C980S   |           | 1          |
|                 | c.2954G>A       | p.C985T   |           | 1          |
| 11.             | c.2892G>A       | p.G943D   | Exon 14   | 1          |
|                 | c.3079G>C       | p.D1027H  |           | 1          |
| 12.             | c.3577T>C       | p.V1140A  | Exon 16   | 5          |
|                 | c.3587T>A       | p.F1144I  |           | 1          |
|                 | c.3600T>C       | p.P1148L  |           | 1          |
| 13.             | c.3966C>A       | p.F1240I  | Exon 18   | 1          |
|                 | c.3976A>T       | p.N1270I  |           | 1          |
| 14.             | c.4060+6C>T     |           | IVS18     | 2          |
| 15.             | c.4112T>C       | p.L1371P  | Exon 20   | 1          |
| <b>Tổng</b>     | <b>28</b>       | <b>28</b> | <b>15</b> | <b>117</b> |

**Comment:** 28 kinds of different mutations and SNPs were detected in exon 14 of the gene ATP7B and 5'UTR region in patients with Wilson Vietnam. A mutation in exon regions highest proportion (76%), followed by mutations in the 5'UTR 2nd high percentage (22%), mutations in the intron lowest percentage (2%)



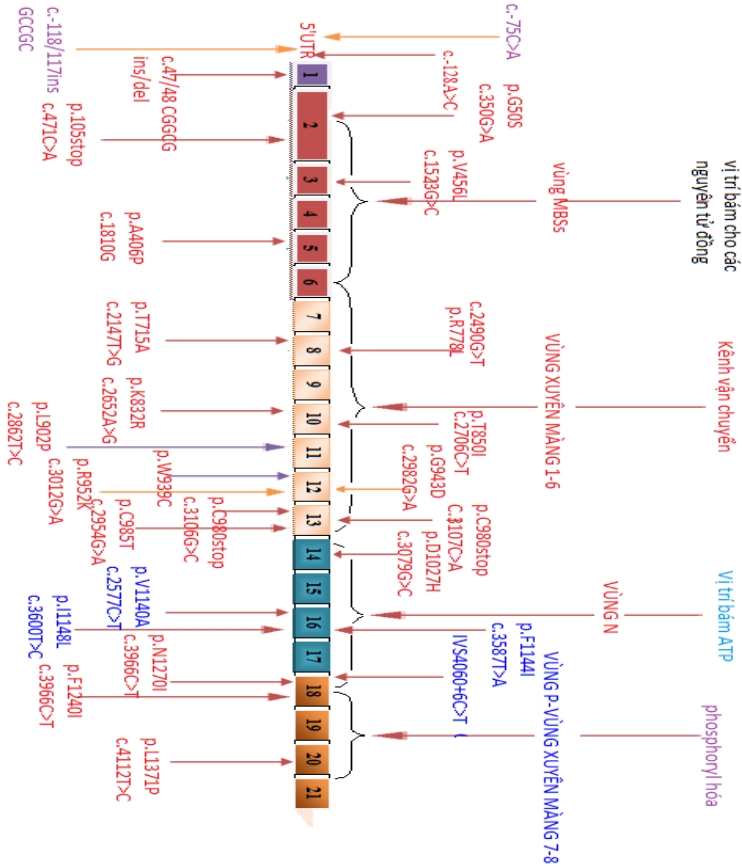
*Figure 3.6. The mutations detected in patients with Wilson*

**Comment:** In five mutations were detected on ATP7B gene in 48 patients with Wilson Vietnam, missense mutations (missense mutation), who accounted for 56.7% the highest, followed by a mutation in the 5'UTR accounts ratio of 22%, more nucleotide mutations accounted for 11.8% rate, sudden premature end code generation and mutation in intron regions were smallest with 7.7% and 1.8%.

### **3.5. Design map ATP7B gene mutations causing Wilson disease in Vietnam**

Designed Wilson disease gene map based on the mutations occur in the study, published mutations cause disease directly, or of mutations causative synergies. The mutation occurs in exon and whole regions ATP7B gene function. According to the

results of our study, 28 type mutation was found on 48 patients studied, mutations detected in the 5' UTR, in exon 13 of the gene and the intron 18.



**Figure 3.7. Map location ATP7B gene mutations in patients with Wilson's disease Wilson Vietnam**

**Comment: 3 type 5'UTR region mutations, mutations in exon 24 type 1 type mutation on intron**

## CHAPTER 4: DISCUSSION

### 4.1. Characteristics of the study subjects

Wilson's disease and other genetic diseases on the recessive gene on chromosome often complex clinical manifestations, disease diverse, rich, difficult diagnosis. Diagnosis by molecular biology techniques, enables early and accurate diagnosis. ATP7B gene mutations in patients with Wilson's offer many benefits to the basic science and clinical applications. is a gold standard for confirming the correct diagnosis, detection of healthy people carry the disease genes, genetic counseling and prenatal diagnosis for high-risk mothers to help prevent and reduce the incidence.

### RESULTS DETECTION ATP7B GENE MUTATIONS

DNA extraction is a critical first step in the process of implementing the techniques of molecular biology. In this study, all DNA samples are measured on the spectrophotometer Nano-drop at a wavelength of 260 / 280nm purity has ranged 1,8-2.0. In this study, PCR and direct gene sequencing was used to identify mutations. Results showed detected 48/61 (78.6%) patients were found to have mutations in the ATP7B gene mutations include missense, more nucleotide mutations, mutations in the 5' end and mutations in the intron.

#### **Patients with missense mutations**

*Patients with missense mutant heterozygous*

Missense mutation in exon 8 heterozygous nucleotide

substitution at position 2490 G> T, make arginine codon changed to leucine. This was published mutations cause diseases. Two types of mutations on exon 8, p.T715A and p.R788L found. P.T715A mutation is a new mutation. At the same location, there was a study of Hungary announced p.T715H pathogenic mutation Wilson and a study of India announced the stop codon mutations create p.T715Stop. In patients with the mutation p.T715A appear more a heterozygous mutation in exon 8 together, which is mutated p.N765G (c.2295C> G). This mutation has also been published in a study pathogenic Chinese. Arginin (R) is polarized amino acid alkaline important role in the process of balancing the charge of the membrane, so that the amino acid change in the nature of this position, affect the metabolism of Cu<sub>2</sub>

+ *Patients with missense mutant homozygous*

\* C-75 mutant C> A missense mutation is due to replace the A nucleotide at position C is a code starting 75 bp: 12 Patients with the mutation type, including 7 patients with homozygous mutations and 5 patients with heterozygous mutations. Homozygous mutation combined with heterozygous mutations or between homozygous mutant with homozygous mutations, making the structure and function of protein ATP7B change, resulting in reduced part performance forward contracts or complete loss of the ability of copper transport protein ATP7B.

### **Patients with mutations in the 5'UTR**

Some patients have mutations in the 5'UTR as mutations -75C> A mutant c-128A>; mutant-118/117 CGCCG ins, these mutations may be heterozygous or homozygous, patients may have unique mutations or mutations associated with many other. The mutation in the 5'UTR proven wilson disease causes.

### **Patients with mutations stop codon**

Patients with homozygous mutations of nucleotide substitution 471C> A guide to the three 105 TCG Serine converted encryption codes ending TAG (S105 \*). This mutation on exon 2. This discovery is the binding site for the copper atoms of 6 MBSs, each one consisting of sequences MxCxxC MBSs, 1 MBSs be tied to a copper atom. Mutations create stop codon, complete loss of function and structure of ATP7B protein, mutations cause disease p.105Stop published in Germany, China.

### **Patients with more nucleotide mutations (insertion mutation)**

5 nucleotide mutations at positions CGCCG between -117 / -118 on the 5'UTR (code starting from position 117 bp). 5 nucleotide mutations CGCCG changed amino acid sequence of the gene behind, thus altering the function of this region, or make stocks ended early, Wilson's disease causes, was announced in many studies of China, Japan, Spain, Italy.

## CONCLUSION

From the research results can offer some conclusions:

### **1. Identifying gene mutations in patients with Wilson**

Research has identified 48/61 patients, accounting for 78.69% ratio, with ATP7B gene mutations. There are 28 different mutations in 118 genes mutations found in the ATP7B, including 12 types of newly discovered mutations in patients with no research material published. Including the mutation: Mutations at the 5'UTR, mutations creating ending stocks, nucleotide substitution mutation, more nucleotide mutations, mutations in non-coding region and on the coding region of gene

### **2. Has established successfully map gene mutations in patients with Wilson ATP7B Vietnam**

Complete design map ATP7B gene mutations in patients of Wilson Vietnam, with a total of 118 mutations of 28 type and 13 exon located on the function of the gene, while 12 new mutations found in patients that have not seen published in any official document.



## RECOMMENDATIONS

Determine the cause of the disease, contributing to diagnosis and effective treatment. Reduced funding for his or her family as well as society's burden. Therefore we would like to have some recommendations as follows:

1. Establish and manage databases on ATP7B gene mutations in patients with Wilson.

2. Establish and manage a database of Wilson disease gene carriers.

3. Genetic counseling before marriage and prenatal diagnosis for women at risk of ill baby during pregnancy.