

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

BỘ Y TẾ



VŨ CHÍ DŨNG

**NGHIÊN CỨU CÁC DẠNG ĐỘT BIẾN GEN
GÂY BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM
SINH THIỂU 21-HYDROXYLASE**

Chuyên ngành : Nhi khoa

Mã số : 62720135

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2017

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS. TS. Tạ Thành Văn**
- 2. GS. TS. Nguyễn Thanh Liêm**

Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Phú Đạt

Phản biện 2: PGS. TS. Trần Văn Khoa

Phản biện 3: PGS. TS. Nông Văn Hải

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án Tiến sĩ cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm 2017

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Thông tin Y học Trung ương

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết của đề tài

Tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS) (Congenital adrenal hyperplasia - CAH) là một nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, do thiếu một trong các enzym cần thiết cho quá trình tổng hợp cortisol từ cholesterol của vỏ thượng thận. Khoảng 95% các trường hợp là do thiếu hụt 21-hydroxylase (21-OH) do đột biến gen *CYP21A2*, dẫn đến thiếu cortisol kèm theo (hoặc không) thiếu hụt aldosterone và tăng tiết androgen thượng thận. Thể cổ điển (thể nặng) có tỷ lệ mới mắc là $1:10\ 000 \div 1:16\ 000$ trẻ đẻ sống đối với hầu hết các chủng tộc. Từ 60 năm qua, y học đã đạt được những thành tựu quan trọng về cơ sở phân tử, chẩn đoán trong đó có tiến bộ về mặt kỹ thuật phát hiện đột biến gen *CYP21A2* và điều trị bệnh.

Ở Việt Nam, mỗi năm có khoảng 40 - 60 bệnh nhân mới được chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương (BVNTU). Trong số 842 bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị trong 17 năm thì thể thiếu 21-OH chiếm 98,3% (828 bệnh nhân). Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về đột biến gen *CYP21A2* sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như giải trình tự và khuếch đại đầu dò đa mồi dựa vào phản ứng nối (multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA) trên số lượng lớn bệnh nhân Việt Nam mắc TSTTBS thiếu 21-OH.

2. Mục tiêu của đề tài:

Mục tiêu 1. Phát hiện các đột biến của gen *CYP21A2* và mô tả bản đồ đột biến gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân mắc TSTTBS thể thiếu 21-OH.

Mục tiêu 2: Phân tích mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh nhân TSTTBS thể thiếu 21-OH.

3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Những năm gần đây, các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại như giải trình tự trực tiếp để phát hiện đột biến điểm, MLPA đã được ứng dụng để phát hiện đột biến xóa đoạn lớn của gen *CYP21A2*. Các kỹ thuật này đã khắc phục được các nhược điểm của nhiều phương pháp trước đó. Những nghiên cứu trước đây về phát hiện đột biến gen *CYP21A2* ở bệnh nhân người Việt nam mắc TSTTBS thiếu 21-OH có cỡ mẫu hạn chế và chỉ sử dụng kỹ thuật PCR để sàng lọc một số đột biến phổ biến. Như vậy, chúng ta hoàn toàn không có dữ liệu về đột biến gen *CYP21A2* với số lượng bệnh nhân đủ lớn. Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu lớn nhất cho đến nay về các dạng đột biến gen

CYP21A2 ở bệnh nhân người Việt Nam thiếu 21-OH. Các dữ liệu bao gồm các dạng đột biến, tần suất, phân bố, kiểu gen góp phần bổ xung cho dữ liệu đột biến gen người ở Việt Nam và trên thế giới.

Hơn nữa, trong thực hành lâm sàng, phân tích đột biến gen *CYP21A2* giúp khẳng định chẩn đoán khi xét nghiệm hormon không rõ ràng, giúp điều trị sớm phòng tử vong do suy thượng thận cấp. Nghiên cứu cung cấp dữ liệu về tương quan kiểu gen - kiểu hình trên số lượng lớn bệnh nhân có ý nghĩa thực tiễn giúp dự báo kiểu hình, cá thể hóa điều trị hormon thay thế nhằm tối ưu hiệu quả điều trị và phòng tránh tác dụng phụ do quá liều thuốc, phòng bệnh qua xác định dị hợp tử, chẩn đoán và điều trị trước sinh phòng nam hóa bộ phận sinh dục ngoài ở thai nhi gái mắc TSTTBS thiếu 21-OH.

4. Cấu trúc luận án:

- Luận án được trình bày trong 142 trang (không kể tài liệu tham khảo và phần phụ lục). Luận án được chia làm 7 phần:

- + Đặt vấn đề: 2,5 trang
- + Chương 1: Tổng quan tài liệu 37 trang
- + Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 18 trang
- + Chương 3: Kết quả nghiên cứu 45 trang
- + Chương 4: Bàn luận 37 trang
- + Kết luận: 1,5 trang
- + Kiến nghị và hướng nghiên cứu tiếp theo: 1 trang

Luận án gồm 20 bảng, 7 biểu đồ và 41 hình. Sử dụng 190 tài liệu tham khảo gồm tiếng Việt, tiếng Anh và một số trang Web. Phần phụ lục gồm nồng độ DNA của các bệnh nhân nghiên cứu, phân loại mức độ nam hóa Prader, danh sách 212 bệnh nhân nghiên cứu bao gồm các thông tin về kiểu gen và kiểu hình, và mẫu bệnh án nghiên cứu.

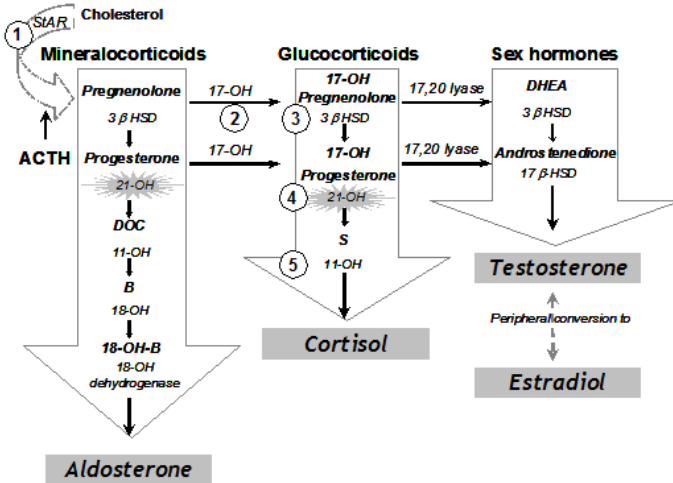
Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Định nghĩa tăng sản thượng thận bẩm sinh, các enzym tham gia tổng hợp cortisol và sinh lý bệnh của thiếu 21-OH

TSTTBS bao gồm một nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, do khiếm khuyết một trong số các enzym tham gia tổng hợp cortisol từ cholesterol ở tuyến thượng thận.

Các enzym sau đây tham gia tổng hợp cortisol ở thượng thận: P450_{scc} (*CYP11A1*), P450_{c17} (*CYP17A1*), P450_{c21} (*CYP21A2*), P450_{c11} (*CYP11B1*), 3 β HSD (*HSD3B2*). Ngoài ra cholesterol đi vào trong ty thể là nhờ một protein vận chuyển tên là StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (*STAR*). Hơn nữa, đột biến bất hoạt gen *POR*

mã hóa enzym cho điện tử P450 oxidoreductase cũng gây ra các biểu hiện của TSTTBS (hình 1.1).



Hình 1. Tổng hợp steroid vỏ thượng thận bình thường và khi thiếu 21-OH.

Hơn 95% các bệnh nhân TSTTBS là do thiếu steroid 21-hydroxylase (21-OH, OMIM +201910). Steroid 21-OH còn có tên P450c21 là một enzym cytochrome P450 có mặt ở lưới nội bào. 21-OH xúc tác chuyển 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) thành 11-deoxycortisol, một tiền chất của cortisol, và chuyển progesterone thành deoxycorticosterone, một tiền chất của aldosterone. Thiếu hụt 21-OH gây thiếu hụt tổng hợp cortisol và thêm vào là thiếu hụt mineralocorticoids trong các ca nặng. Các tiền chất steroid ngay phía trước vị trí enzym bị thiếu hụt (progesterone và 17-OHP) bị tích tụ và chuyển hướng sang tổng hợp androgen của thượng thận (hình 1.1).

1.2. Kiểu hình lâm sàng của TSTTBS thiếu 21-OH

Kiểu hình lâm sàng được chia ra thành thể cổ điển hay thể nặng và thể không cổ điển (non classic) hay thể nhẹ của bệnh. Thể cổ điển lại được chia ra thành thể cổ điển mất muối (MM) (salt wasting - SW) và nam hóa đơn thuần (NHĐT) (simple virilizing - SV) phản ánh mức độ thiếu hụt aldosterone. Thiếu hụt hoàn toàn hoạt độ enzym gây nguy hiểm đến tính mạng và tử vong do mất nước, hạ natri máu (thể MM), và các trẻ gái mắc thể nặng thiếu 21-OH có biểu hiện nam hoá bộ phận sinh dục ngoài từ thời kỳ bào thai và được phát hiện sau sinh. Đây cũng là nguyên nhân phổ biến nhất của mơ hồ giới tính ở trẻ sơ sinh (bảng 1.1).

Bảng 1.1. Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân TSTTBS thiếu 21-OH

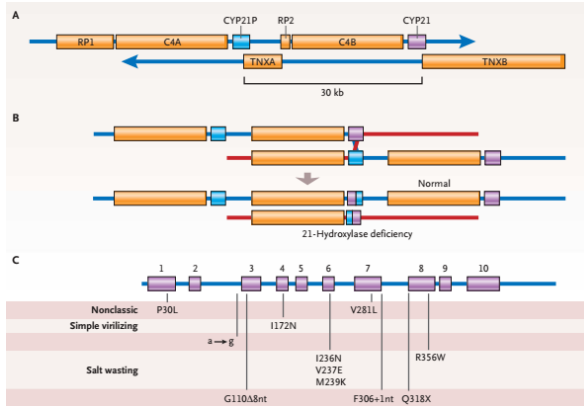
Biểu hiện lâm sàng	Thể bệnh thiếu 21-OH	
	Thể cổ điển	Thể không cổ điển
Nam hóa trước sinh	Biểu hiện ở trẻ gái	Không có
Nam hóa sau sinh	Cả trẻ gái và trẻ trai	Mức độ khác nhau
Mất muối	75% các bệnh nhân	Không
Thiếu cortisol	100% các bệnh nhân	Hiếm

1.3. Cơ sở di truyền phân tử của thiếu 21-OH, các đột biến gen và tiến bộ của các kỹ thuật phát hiện đột biến gen *CYP21A2*

Gen mã hóa cho 21-OH (*CYP21* hay *CYP21A2*) cùng với giả gen (*CYP21P* hay *CYP21A1P*) nằm trên cánh ngắn nhiễm sắc thể số 6 (6p21.3) và trong phức hợp kháng nguyên bạch cầu người, cách nhau khoảng 30 kb, gần kề và xen kẽ với các gen C4A và C4B mã hóa thành phần C4 bổ thể. Gen *CYP21A2* và *CYP21A1P* gồm 10 exon, có kích thước 3,4 kb. Hai gen này có trình tự nucleotid tương đồng nhau đến 98% ở vùng exon và 96% ở vùng intron. Các đột biến phổ biến của gen *CYP21A2* được phát hiện trên 95% các bệnh nhân thiếu 21-OH. Khoảng 20-25% các allele đột biến là xóa đoạn gen *CYP21A2* và trạng thái kết hợp gen *CYP21A1P/CYP21A2* (thuật ngữ cũ là hoán vị lớn của gen) gây nên do sự bất chéo không cân xứng khi giảm phân. Các đột biến (phổ biến) của giả gen *CYP21A1P* chuyển sang gen chức năng *CYP21A2* chiếm khoảng 70-75% các đột biến gây bệnh của gen *CYP21A2* bao gồm: 7 đột biến điểm, đột biến mất đoạn 8 bp của exon 3, và một nhóm gồm 3 đột biến điểm trên exon 6 (hình 1.2). Hơn nữa, có khoảng hơn 100 các đột biến hiếm của gen *CYP21A2* không phụ thuộc vào giả gen đã được liệt kê tại dữ liệu của uỷ ban danh pháp Cytochrome P450 allele người.

(<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>).

Các kỹ thuật đã được sử dụng để phát hiện các đột biến xóa đoạn lớn gồm Southern blot (SB), PCR-based restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP), multiplex mini-sequencing and conversion-specific PCR (MMCP) và MLPA. Những năm gần đây MLPA được sử dụng rộng rãi vì có những ưu điểm là tiện lợi, nhanh và cần lượng nhỏ DNA.



Hình 1.2. Vùng nhiễm sắc thể (NST) số 6 (6p21.3) bao gồm gen *CYP21* (*CYP21A2*) mã hóa cho 21-OH và giả gen *CYP21A* (*CYP21A1P*) (A); các gen bất chéo không cân xứng trong quá trình giảm phân (B); các đột biến phổ biến gây TSTTBS thiếu 21-OH (C).

Có nhiều tiếp cận để phát hiện hầu hết các đột biến phổ biến đã được nghiên cứu và ứng dụng: “allele specific oligonucleotide hybridization” (ASO); “allele specific PCR amplification” (ARMS); “ligation detection reaction” (LDR); “Real-time PCR”; “phân tích DHPLC” và “multiplex minisequencing”. Tuy nhiên, giải trình tự trực tiếp gen *CYP21A2* là cách tiếp cận tốt nhất để đảm bảo các đột biến hiếm gặp và đột biến mới không bị bỏ sót và cho phép phát hiện 100% các đột biến hiếm.

1.4. Nghiên cứu vai trò của phân tích đột biến gen *CYP21A2*

1.4.1. Dự báo kiểu hình dựa trên kiểu gen

Kiểu hình của các bệnh nhân thiếu 21-OH liên quan chặt chẽ với hoạt độ enzym, các đột biến gây thiếu 21-OH là tiêu chuẩn chính để dự báo mức độ nặng của bệnh, chỉ ít là khả năng giữ muối. Phương pháp có tính thực hành để đánh giá tương quan kiểu gen - kiểu hình đã được đề xuất bởi Krone và cộng sự (2000), tác giả phân kiểu gen làm 4 nhóm đột biến (“null” hay 0, A, B, và C) dựa trên hậu quả về chức năng được dự đoán và tính giá trị dự báo dương tính (predictive positive value - PPV) cho 4 nhóm. Kiểu hình được dự báo kết hợp với các nhóm “null” và A là thể cổ điển MM, với nhóm B là cổ điển NHĐT, và nhóm C là thể không cổ điển. Thể cổ điển MM kết hợp với các allele đột biến xóa đoạn/hoán vị gen hoặc các đột biến điểm có hoạt độ enzym <1% so với

bình thường (nhóm “null” và A); các thể lâm sàng khác phụ thuộc vào sự có mặt của các allele đột biến có hoạt độ enzym tăng dần: khoảng 1-5% đối với thể cổ điển NHĐT (đột biến nhóm B) và 15-60% đối với thể không cổ điển (đột biến nhóm C) (hình 1.2).

1.4.2. Chẩn đoán và điều trị trước sinh, chẩn đoán sớm, sàng lọc sơ sinh TSTTBS thiếu 21-OH

Kiểu gen xóa đoạn hoặc hoán vị gen hoặc các đột biến nặng là chỉ định để chẩn đoán trước sinh và có thể điều trị trước sinh. Thai nhi gái mắc thể cổ điển thiếu 21-OH biểu hiện mức độ khác nhau của nam hóa bộ phận sinh dục ngoài. Quá trình nam hóa bắt đầu từ tuần thứ 8 của thời kỳ bào thai. Việc sử dụng dexamethasone ở các bà mẹ mang thai có nguy cơ cao sinh con mắc thể cổ điển thiếu 21-OH được tiến hành từ những năm 1980, và có hiệu quả ngăn ngừa mơ hồ giới tính đến 85% các thai nhi gái thiếu 21-OH.

Sàng lọc sơ sinh được coi là phương pháp hữu ích để chẩn đoán thể cổ điển của TSTTBS. Nhưng đôi khi gặp khó khăn khi nhận định kết quả dương tính với việc định lượng 17-OHP đơn thuần ở trẻ sơ sinh chưa có triệu chứng. Hơn nữa, sơ sinh đẻ non khỏe mạnh cũng có nồng độ các hormon cao hơn bình thường, và có khoảng 1-1,2% có dương tính giả. Để cải thiện giá trị dự báo dương tính của xét nghiệm sàng lọc thì 2 tiếp cận khác nhau gần đây đã được đề xuất như bước sàng lọc thứ 2 ở những trường hợp sàng lọc sơ sinh dương tính: sử dụng phổ khối rộng (tandem mass spectrometry - TMS) và phân tích phân tử đối với gen *CYP21A2*.

1.5. Nghiên cứu về di truyền phân tử TSTTBS trên các bệnh nhân Việt Nam

Những nghiên cứu về đột biến gen *CYP21A2* trên các bệnh nhân thiếu 21-OH ở Việt Nam được bắt đầu từ những năm 2000 nhưng hạn chế lớn là: chỉ sử dụng kỹ thuật PCR sàng lọc một số đột biến phổ biến và tiến hành trên cỡ mẫu nhỏ. Nghiên cứu chẩn đoán trước sinh TSTTBS được tiến hành từ năm 2008 với việc ứng dụng các kỹ thuật MLPA và giải trình tự trực tiếp gen *CYP21A2*. Các nghiên cứu di truyền phân tử và kiểu hình cũng được tiến hành đối với các thể hiếm của TSTTBS như thiếu 11 β -hydroxylase; và thiếu 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase typ 2. Những nghiên cứu này cho biết các thể bệnh TSTTBS do thiếu các enzym khác nhau đang lưu hành ở Việt Nam. Hơn nữa, cũng bổ sung cho dữ liệu ngân hàng gen đặc biệt với các bệnh hiếm bởi cho đến nay chỉ khoảng 60 bệnh nhân mắc thể TSTTBS hiếm do đột biến *HSD3B2* được báo cáo trên y văn thế giới.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu gồm 212 bệnh nhân từ 204 gia đình (8 cặp anh chị em ruột mắc bệnh), tuổi từ 3 giờ đến 31 tuổi được chẩn đoán, điều trị và theo dõi tại khoa Nội tiết - Chuyển hóa - Di truyền, BVNTU từ 01/1/2011 đến 31/10/2016. Chọn mẫu theo phương thức thuận tiện với các tiêu chuẩn chẩn đoán thiếu 21-OH của New MI và cộng sự (2016): nam hóa, tăng chiều cao và tuổi xương sớm ở trẻ gái; dậy thì sớm giả, tăng chiều cao và tuổi xương sớm ở trẻ trai; mất nước và mất muối (hạ Na^+ và tăng K^+ huyết thanh) ở cả hai giới; tăng 17-OHP huyết thanh $\geq 1\text{ng/ml}$ ở tuổi sơ sinh và $\geq 2\text{ng/ml}$ sau tuổi sơ sinh. Các tiêu chuẩn loại trừ bao gồm các thể thiếu enzym khác của TSTTBS, suy thượng thận và nam hóa do các nguyên nhân khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu một loạt các ca bệnh bao gồm phát hiện đột biến gen *CYP21A2*, phân tích kiểu gen, đánh giá kiểu hình và tương quan kiểu gen - kiểu hình. Mỗi bệnh nhân có hồ sơ nghiên cứu riêng.

2.2.1 Phát hiện đột biến gen *CYP21A2* và phân tích kiểu gen

Được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại Học Y Hà Nội và BVNTU.

Bệnh phẩm là 2 ml máu tĩnh mạch bệnh nhân, bố, mẹ và đối chứng được chống đông bằng EDTA. DNA tổng số được chiết tách theo phương pháp phenol/chloroform, được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch theo phương pháp đo mật độ quang.

Phản ứng PCR được tiến hành với các cặp môi đặc hiệu (P1-P10; P3-P5; P6-P4) để khuếch đại toàn bộ 10 exon, các vùng gắn nối exon - intron và promoter của gen *CYP21A2*. Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 1% (90V trong 30 phút). Sản phẩm PCR sau điện di được tinh sạch bằng “gel kit purification” trước khi giải trình tự gen.

Giải trình tự gen *CYP21A2* theo phương pháp BigDye terminator sequencing (Applied Biosystems, Foster city, USA), phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench. Trình tự gen *CYP21A2* từ mẫu DNA của bệnh nhân được so sánh với mẫu DNA đối chứng và trình tự của *CYP21A2* trên GeneBank (Accession number NM_0005002).

MLPA được tiến hành với kit P050B2 (MRC - Holland) gồm 5 probe cho gen *CYP21A2* (Ex1, Ex3, Ex4, Ex6, Ex8) tương đương với các đột biến xóa đoạn đoạn 8 bp, I172N, E6 cluster và Q318X; 3 probe đặc hiệu cho gen *CYP21A1P* (E1P, I2P, E10P); 2 probe cho bộ thể

C4A, C4B (C4A, C4B); 22 probe đặc trưng cho gen của người để làm đối chứng và 2 probe cho nhiễm sắc thể X và Y để xác định giới tính. Các bước tiến hành gồm: lai probe vào gen đích, khuếch đại sản phẩm lai sử dụng primer có gắn huỳnh quang. Sản phẩm khuếch đại probe được điện di mao quản huỳnh quang trên máy giải trình tự và được phân tích. Số lượng sản phẩm khuếch đại của mỗi probe sẽ tỷ lệ thuận với số bản copy của đoạn DNA đích đặc hiệu với probe đó.

Các đột biến của *CYP21A2* phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu sẽ được so sánh với dữ liệu từ Human Gene Mutation database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CYP21A2> và so sánh với dữ liệu của uỷ ban danh pháp Cytochrome P450 allele người. Gen *CYP21A2* tại <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>

Đối với các đột biến chưa được báo cáo tại các cơ sở dữ liệu trên đây sẽ được kiểm tra đối chiếu với dữ liệu tại 1000 genomes database tại "MutationTaster". <http://www.mutationtaster.org>.

Di truyền tế bào: phân tích Karyotype khi có mơ hồ giới tính ở trẻ gái được tiến hành tại BVNTU.

2.2.2. Nghiên cứu kiểu hình

Kiểu hình lâm sàng, hóa sinh, chẩn đoán hình ảnh được tiến hành tại BVNTU: lập phả hệ, khai thác tiền sử, bệnh sử, khám lâm sàng toàn diện gồm chiều cao, cân nặng, các mức độ mất nước, xạm da. Đánh giá mức độ nam hóa ở trẻ gái theo Prader, các giai đoạn dậy thì theo Tanner (lông mu ở cả 2 giới; phát triển tuyến vú ở trẻ gái; chiều dài, chu vi dương vật, thể tích tinh hoàn ở trẻ trai). Các biểu hiện giọng ồm, trứng cá, ria mép, phát triển cơ bắp. Theo dõi diễn biến lâm sàng đối với các bệnh nhân được chẩn đoán và điều trị sớm.

Xét nghiệm hóa sinh: bệnh phẩm huyết thanh: điện giải đồ bằng phương pháp điện cực chọn lọc ion giáp tiếp; sử dụng máy tự động Beckman Coulter AU2700/ AU 680. Định lượng các hormon: 17-OHP trước & sau kích thích ACTH; testosterone; progesterone; cortisol; ACTH; FSH; LH bằng phương pháp ELISA sử dụng kit của hãng DRG, máy đọc Elx808. Siêu âm thượng thận và tiêu khung xác định từ cung, buồng trứng khi có mơ hồ giới tính, Xquang tuổi xương với trẻ > 3 tuổi và so sánh với Atlas của Greulich và Pyle.

Phân loại kiểu hình (tiêu chuẩn của Pang S.1993; Speiser PW. 2010).

Kiểu hình cổ điển MM: chậm tăng cân, nôn, mất nước, $\text{Na}^+ < 130$; hoặc $130-135$ kết hợp $\text{K}^+ > 5,5$ mmol/l;

Kiểu hình cổ điển NHĐT: không có triệu chứng mất muối, điện giải đồ bình thường;

Kiểu hình thể không cổ điển: không có hoặc nam hóa nhẹ bộ phận sinh dục ngoài sau sinh, triệu chứng tăng androgen sau sinh. 17-OHP trước kích thích ACTH 2-100 ng/ml; sau kích thích 10-100 ng/ml.

2.2.3. Phân tích tương quan kiểu gen - kiểu hình

Để đánh giá tương quan kiểu gen - kiểu hình, các bệnh nhân được chia thành 4 nhóm kiểu gen (Krone N. 2000 có bổ xung):

Nhóm “null” (0): các đột biến gây mất toàn bộ hoạt độ enzym: xóa đoạn, exon 6 cluster, p.L307FfsX6, p.Q318X, p.R356X, và các đột biến mới gây lệch khung dịch mã trên cả 2 allele.

Nhóm A: đồng hợp tử đột biến trên intron 2 (I2g), hoặc có một allele là I2g và allele khác là đột biến trong nhóm “null”. Đột biến I2g được biết là còn lượng hoạt độ enzym rất nhỏ.

Nhóm B: đột biến p.I172N (hoạt độ enzym còn khoảng 2%) đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép với các đột biến của nhóm “null” hoặc A, hoặc hoán vị gen promoter + p.P30L.

Nhóm C: đột biến p.P30L, p.V281L (còn khoảng 20-60% hoạt độ enzym) đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép với các đột biến của nhóm “null”, hoặc A, hoặc B.

Nhóm D: các đột biến chưa đánh giá được ảnh hưởng của đột biến trên hoạt độ enzym và các bệnh nhân chưa xác định được đột biến.

Kiểu hình dự báo kết hợp với các nhóm kiểu gen “null” và A là thể cổ điển MM, nhóm kiểu gen B là cổ điển NHĐT, và nhóm kiểu gen C là thể không cổ điển. Giá trị dự báo dương tính (positive predictive value - PPV) được tính bằng số bệnh nhân có kiểu hình đúng như dự báo của mỗi nhóm kiểu gen chia cho tổng số bệnh nhân của nhóm đó và nhân với 100.

2.2.4. Xử lý số liệu thống kê

Sử dụng phần mềm SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Các số liệu được diễn tả dưới dạng các phân bố về tần số hoặc các tham số thống kê mô tả và được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm, hoặc trị số trung bình \pm SD và trung vị.

2.2.5. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành với sự tuân thủ về mặt y đức, được chấp thuận của hội đồng đạo đức, BVNTU, được sự đồng ý của đối tượng nghiên cứu.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm của các đối tượng nghiên cứu

212 bệnh nhân (97 nam, 115 nữ) từ 204 gia đình bao gồm 205 bệnh nhân thể cổ điển (96,7%) (MM 161/205; 78,5%. NHĐT 44/205; 21,5%), 4 /212 bệnh nhân thể không cổ điển (1,9%) và 3 bệnh nhân chưa rõ kiểu hình.

Bảng 3.1: Đặc điểm về giới, tuổi chẩn đoán của các thể lâm sàng

Các đặc điểm	Các thể bệnh					
	Mất muối n = 161		Nam hóa đơn thuần n = 44		Không cổ điển n = 4	
Giới (n; %)	Nam (86; 54,4%)	Nữ (75; 46,6%)	Nam (8; 18,2%)	Nữ (36; 81,8%)	Nam (3; 75%)	Nữ (1; 25%)
<i>p</i> (test binomial)	0,4		0,000025		0,6	
Tuổi chẩn đoán (ngày); trung vị (Min - Max)	32 (1 - 4740)		1590 (4 - 11220)		18,5 (1 - 570)	
<i>p</i> (test Kruskal-Wallis)	<i>p</i> = 0,0001					
Tuổi chẩn đoán theo giới (ngày); trung vị (Min - Max)	40 (3 - 3450)	25 (1 - 4740)	1710 (1170 - 2700)	1545 (4-11220)	6 (1 - 31)	570
<i>p</i> (test Wilcoxon ranksum)	0,0001		0,27		0,18	

Nhận xét: Trẻ gái được chẩn đoán nhiều hơn trẻ trai ở thể NHĐT. Trẻ gái được chẩn đoán sớm hơn trẻ trai ở thể MM.

3.2. Kết quả phát hiện đột biến gen CYP21A2

Trong số 204 bệnh nhân chỉ điểm (bệnh nhân đầu tiên trong mỗi gia đình) đại diện cho 204 gia đình (8 cặp anh chị em ruột có cùng kiểu gen đối với mỗi cặp) thì 202 phát hiện được đột biến gen CYP21A2 (99%).

3.2.1. Các đột biến gen CYP21A2, tần số và tỷ lệ các đột biến

Bảng 3.2. Các đột biến gen CYP21A2 và tần số

Exon/ intron	Các đột biến gen CYP21A2		Tần số	Tỷ lệ %
	c.DNA (hoặc g.DNA)	Protein		
exon 1	Xóa đoạn exon 1 (exon 1 del)		2	0,49
exon 1-2	Xóa đoạn exon 1-2 (exon 1-2 del)		2	0,49
exon 1-3	Xóa đoạn exon 1-3 (exon 1-3 del)		23	5,67
exon 1-6	Xóa đoạn exon 1-6 (exon 1-6 del)		2	0,49
exon 1-8	Xóa đoạn exon 1-8 (exon 1-8 del)		4	0,99
exon 4-6	Xóa đoạn exon 4-6 (exon 4-6 del)		2	0,49
exon 8	Xóa đoạn exon 8 (exon 8 del)		2	0,49
CYP21A2 - gen	Xóa toàn bộ gen (del)		103	25,37
Promoter	g.-113G>A; g.-110T>C; g.-103A>G		3	0,74
exon 1	c.3G>A	p.M1I	1	0,25
exon 1	c.56G>A	p.W19X	1	0,25
exon 1	c.89C>T	p.P30L	2	0,49
exon 1	c.185A>T	p. H62L	1	0,25
Intron 2	g.665A/C>G (I2g)		116	28,57
exon 3	c.336C>G	p.Y112X	1	0,25
exon 3	c.368C>T	p.T123I	2	0,49
exon 3	c.374C>G	p.S125X	1	0,25
exon 4	c.515T>A	p.I172N	43	10,59
exon 6	c.707T>A; c.710T>A; c.716T>A (Cluster 6 hay E6)	p.I236N; p.V237E; p.M239K	1	0,25
exon 7	c.737delA	p.E246GfsX11	3	0,74
exon 7	c.841G>T	p.V281L	3	0,74
exon 7	c.920_921insT	p.L307FfsX6	9	2,21
exon 8	c.952C>T	p.Q318X	12	2,95
exon 8	c.del1054-1261insCGGCA	p.V352RfsX103	1	0,25
exon 8	c.1066C>T	p.R356W	50	12,31
exon 9	c.1202C>T	p.P401L	1	0,25
exon 10	c.1276C>T	p.R426C	7	1,72
exon 10	c.1375_1392dupCCCTCCCTGCAGCCCCTG	p.P459_L464dup	2	0,49
exon 10	c.1447_1448delGGinsC	p.R483PfsX58	5	1,23
exon 10	c.1447_1448insC	p.R483PfsX40	1	0,25
Tổng: 34			406	100

Ghi chú: các chữ màu đỏ là các đột biến mới

Nhận xét: Phân bố tần suất từ cao đến thấp theo từng dạng đột biến gen: xóa đoạn lớn (34,48%); sai nghĩa (27,34%); vùng không mã hóa gen (Intron/Promoter) (29,31%); gây lệch khung dịch mã (4,68%), vô nghĩa (3,7%) và lặp đoạn gen (0,69%). 30 đột biến khác nhau đã được xác định, các đột biến phổ biến nhất (> 10%) gồm: (I2g) (28,57%), xóa toàn bộ gen (25,37%), p.R356W (12,31%) và p.I172N (10,59%).

3.2.2. Kiểu gen của các bệnh nhân có đột biến gen *CYP21A2*

55 kiểu gen khác nhau đã được xác định ở 202 bệnh nhân thiếu 21-OH. 102 bệnh nhân (50,5%) có 1 đột biến ở dạng đồng hợp tử; 75 bệnh nhân (37,2%) có 2 đột biến dạng dị hợp tử kép; 12 bệnh nhân (5,9%) có hơn 2 đột biến và 13 bệnh nhân (6,4%) chỉ phát hiện được 1 đột biến ở dạng dị hợp tử.

Các kiểu gen có tỷ lệ cao (> 5%) bao gồm: I2g/I2g (31/202; 15,35%); Del/Del (29/202; 14,36%); Del/I2g (22/202; 10,89%); p.R356W/p.R356W (13/202; 6,44%) và exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/202; 5,44%).

Đồng hợp tử xuất hiện ở 13 kiểu gen khác nhau, các kiểu gen có tỷ lệ cao (> 5%) trong nhóm đồng hợp tử bao gồm: I2g/I2g (31/102; 30,4%); Del/Del (29/102; 28,4%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/102; 10,8%); p.I172N/p.I172N (9/102 ca; 8,8%) và p.R356W/p.R356W (13/202; 6,4%).

3.2.3. Bản đồ đột biến gen *CYP21A2* ở các bệnh nhân nghiên cứu

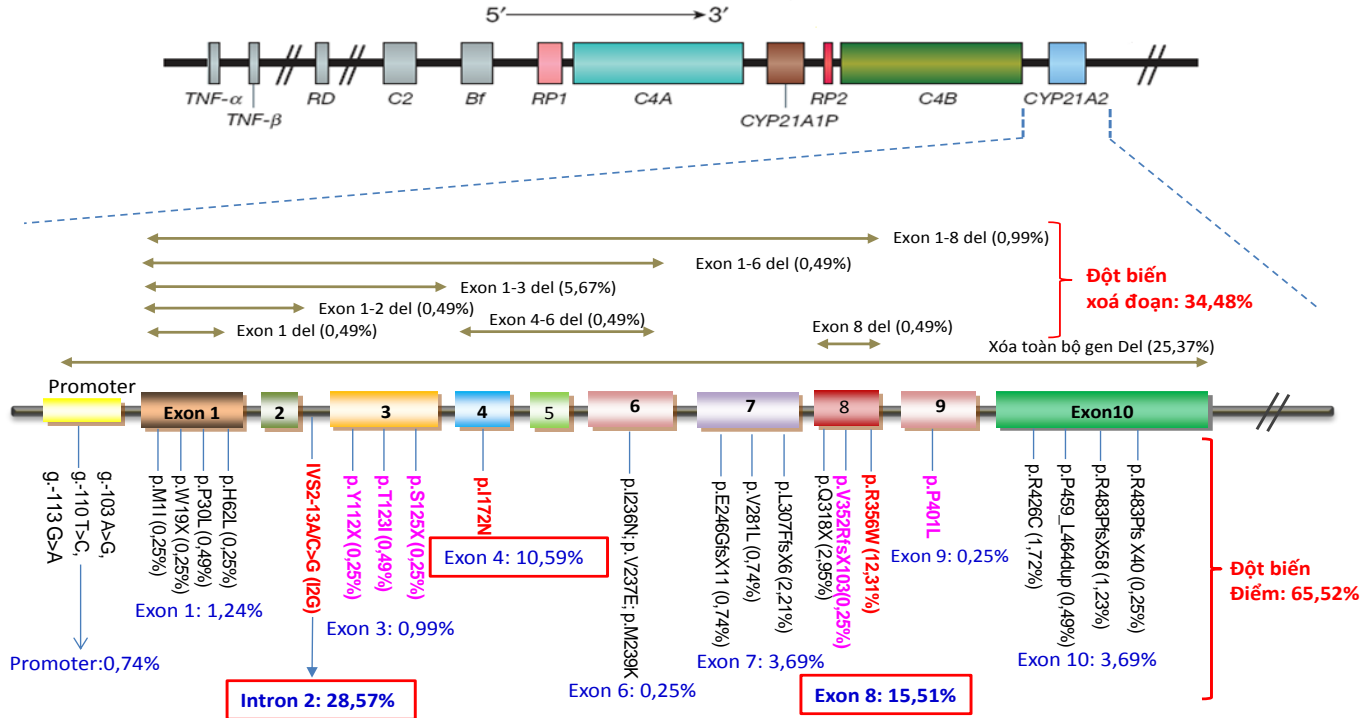
Các đột biến phân bố ở hầu hết các vùng gen: vùng promoter, vùng intron 2 và 8/10 exon (trừ exon 2 và exon 5). Tỷ lệ gặp đột biến điểm cao ở vùng intron 2 (28,57%), exon 8 (15,51%) và exon 4 (10,59%).

Đột biến điểm chiếm tỉ lệ cao 65,52%; còn lại là đột biến xóa đoạn lớn chiếm tỉ lệ 34,48%.

Phát hiện được 6 đột biến mới (2%) gồm: p.112X; p.T123I; p.S125X; p.V352RfsX103; p.401L và p.P459_L464dup

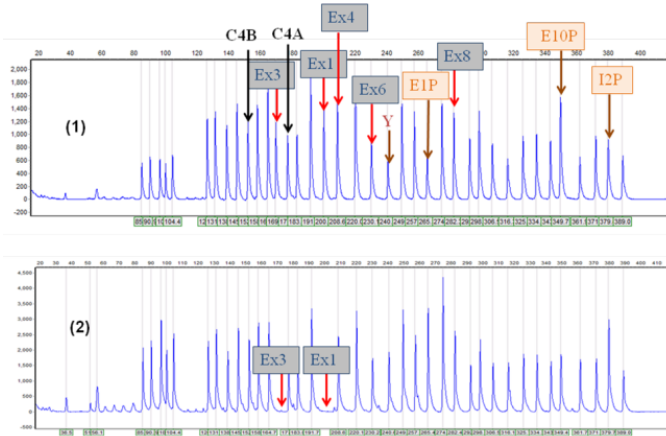
Tổng các allele có các đột biến điểm do hoán vị nhỏ của gen chiếm 58,85%; tổng các đột biến xóa đoạn lớn và các đột biến điểm do hoán vị gen chiếm 93,33%; 13 đột biến hiếm phát sinh tại gen chức năng trong đó có 6 đột biến mới chiếm 6,67%.

Phân bố về vị trí, tần suất của các đột biến trên bản đồ đột biến gen *CYP21A2* được trình bày tại hình 3.1.

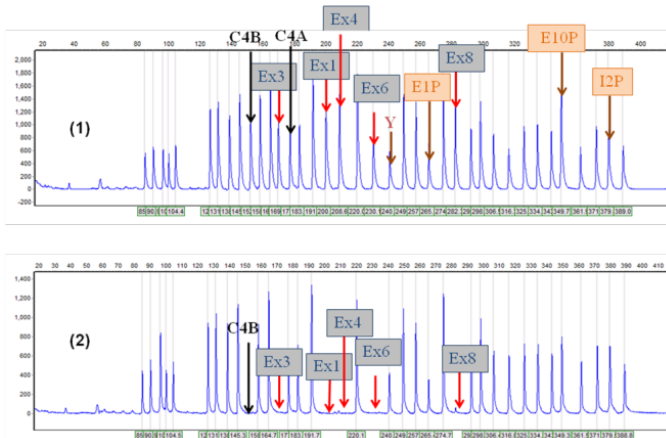


Hình 3.1. Bản đồ đột biến gen CYP21A2

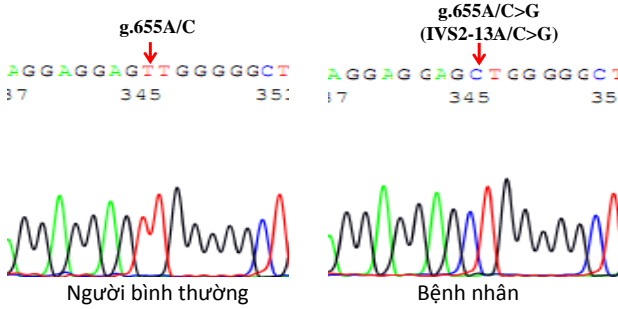
(Chữ màu đỏ chỉ đột biến phổ biến, chữ màu tím đỏ chỉ đột biến mới, chữ viền khung đỏ chỉ exon và intron với tỷ lệ đột biến cao)



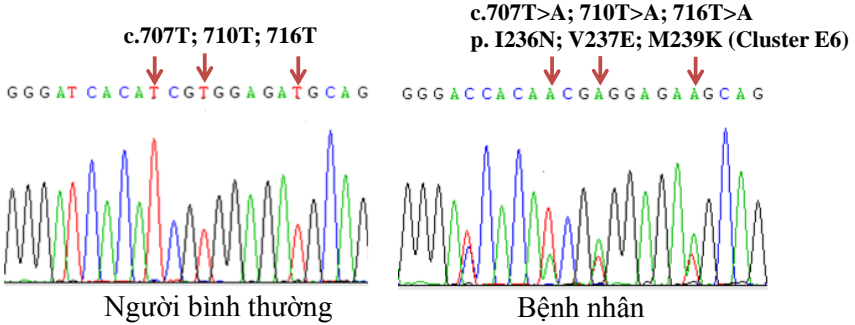
Hình 3.2. Hình ảnh MLPA của bệnh nhân có xóa đoạn đồng hợp từ exon 1-3 (exon 1-3 del) gen *CYP21A2*: (1) mẫu bình thường, (2) bệnh nhân nghiên cứu có xóa đoạn đồng hợp từ exon 1-3 do không xuất hiện các đỉnh tương ứng với các exon 1 và 3 so với bình thường.



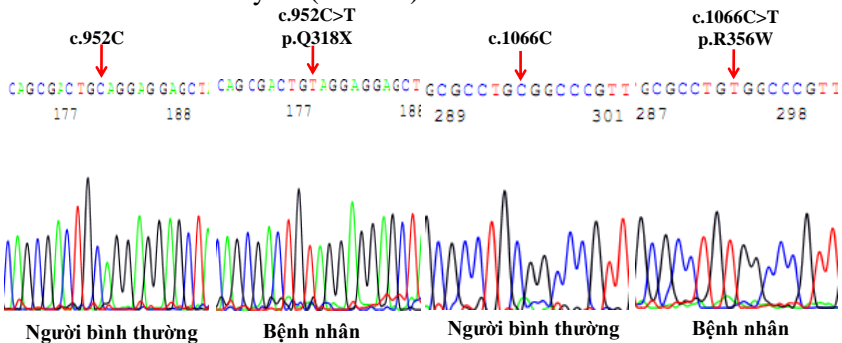
Hình 3.3. Hình ảnh MLPA của bệnh nhân có xóa đoạn từ gen *C4B* đến exon 8 của gen *CYP21A2*: (1) mẫu bình thường; (2) mẫu của bệnh nhân không xuất hiện các đỉnh tương ứng với gen *C4B* và các exon 1, 3, 4, 6 và 8 của gen *CYP21A2* so với mẫu chứng bình thường.



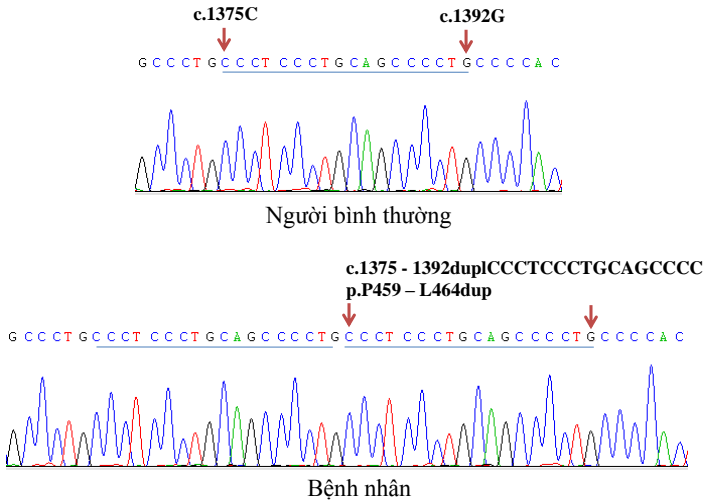
Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự gen của bệnh nhân có đột biến đồng hợp tử g.655A/C>G (I2g/I2g).



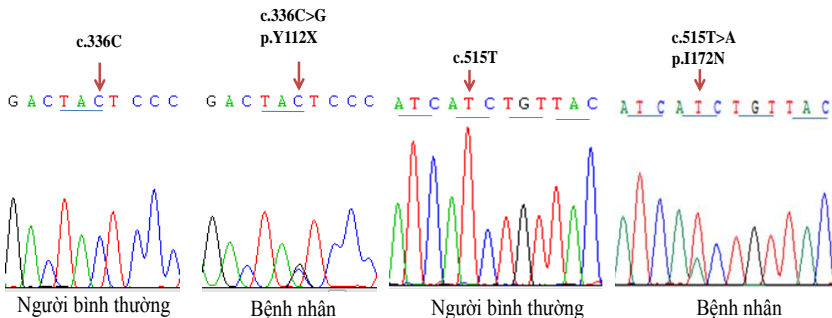
Hình 3.5. Hình ảnh đột biến p.I236N, p.V237E, p.M239K cluster E6 ở bệnh nhân nghiên cứu, thay thế nucleotid tại 3 vị trí: c.707T>A làm cho bộ ba thứ 236 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I236N); c.710T>A làm cho bộ ba thứ 237 GTG mã hóa Valin chuyển thành GAG mã hóa Glutamic acid (V237E); c.716T>A làm cho bộ ba thứ 239 ATG mã hóa Methionin chuyển thành AAG mã hóa Lysin (M239K).



Hình 3.6. Hình ảnh đột biến đồng hợp tử p.Q318X và p.R356W ở bệnh nhân nghiên cứu: thay thế nucleotid 952C> T làm cho bộ ba thứ 318 CAG mã hóa Glutamin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Q318X); thay thế nucleotid 1066C>T làm cho bộ ba thứ 356 CGG mã hóa Arginin chuyển thành TGG mã hóa Tryptophan (R356W).



Hình 3.7 Hình ảnh đột biến mới lặp đoạn p.P459_L464dup của bệnh nhân nghiên cứu: tại vị trí nucleotid từ 1375-1392 (CCCTCCCTGCAGCCCC) xuất hiện thêm một trình tự lặp lại tương tự 1375-1392 (CCCTCCCTGCAGCCCC).



Hình 3.8. Hình ảnh đột biến dị hợp tử p.Y112X (đột biến mới) và p.I172N: đột biến thay thế nucleotid c.336C>G làm cho bộ ba thứ 112 TAC mã hóa Tyrosin chuyển thành TAG là bộ ba kết thúc (Stop Codon) (Y112X); đột biến thay thế nucleotid c.515T>A dẫn đến bộ ba

thứ 172 ATC mã hóa Isoleucin chuyển thành AAC mã hóa Asparagin (I172N).

3.3. Tương quan kiểu gen - kiểu hình

3.3.1. Kiểu gen phổ biến của các kiểu hình khác nhau

Kiểu gen phổ biến của thể cổ điển MM là Del/Del (29/153; 18,9%); I2g/I2g (27/153; 17,6%); Del/I2g (22/153; 14,4%); p.R356W/p.R356W (12/153; 7,8%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/153; 7,2%) và Del/p.R356W (10/153; 6,5%). Kiểu gen phổ biến của thể NHĐT là Del/p.I172N (10/42; 23,8%); p.I172N/p.I172N (8/42; 19,1%) và I2g/p.I172N (4/42; 9,5%). Kiểu gen phổ biến của thể không cổ điển là p.V281L/p.L307FfsX6 (3/4; 75%).

3.3.2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình của một số đột biến phổ biến

Tỷ lệ bệnh nhân có ít nhất 1 allele đột biến I2g, hoặc p.R356W, hoặc p.I172N tương ứng là 74/202 (36,6%); 35/202 (17,3%) và 34/202 (16,8%).

Tỷ lệ kiểu hình MM và NHĐT của các bệnh nhân có ít nhất 1 allele đột biến I2g tương ứng là 83,8% (62/74) và 13,5% (10/74).

Tỷ lệ kiểu hình NHĐT và MM của các bệnh nhân có ít nhất 1 allele đột biến p.I172N tương ứng là 94,1% (32/34) và 5,9% (2/34).

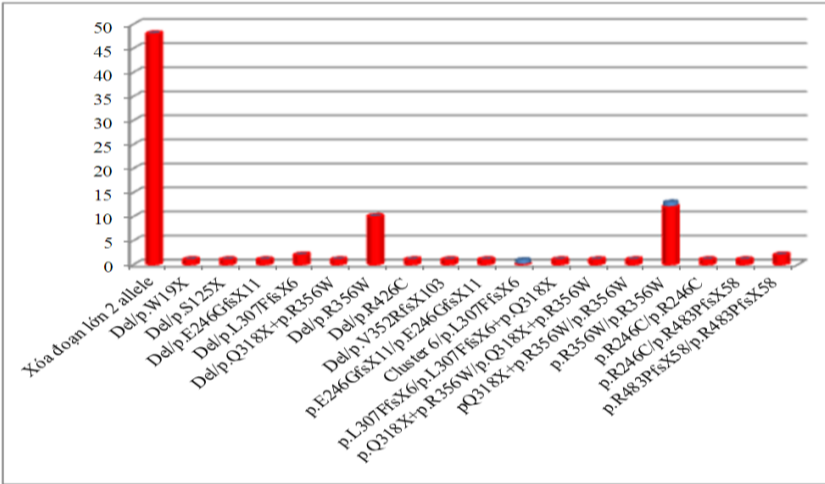
Tỷ lệ kiểu hình MM và NHĐT của các bệnh nhân có ít nhất 1 allele đột biến p.R356W tương ứng là 88,6% (31/35) và 11,4% (4/35).

3.3.3. Kiểu hình của các nhóm kiểu gen “null”, A, B, C và giá trị dự báo dương tính.

Bảng 3.3. Các nhóm kiểu gen và kiểu hình của các nhóm kiểu gen

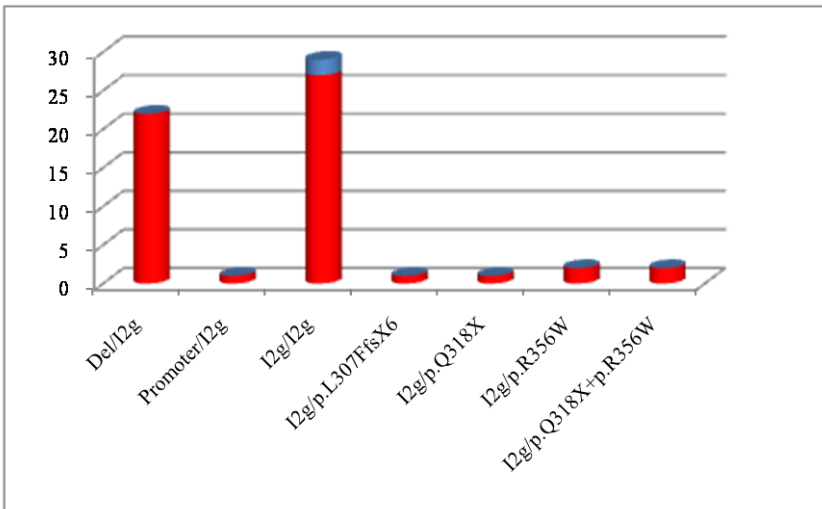
Nhóm đột biến			Kiểu hình dự báo	Kiểu hình của các bệnh nhân nghiên cứu			Tổng số	Tỷ lệ dự báo dương tính
Nhóm	Allele 1	Allele 2		MM	NHĐT	Không cổ điển		
Null (0)	0	0	MM	88	2		90	99,8% (88/90)
A	A	0	MM	28			57	96,5% (55/57)
	A	A	MM	27	2			
	Cộng			55	2			
B	B	0	NHĐT		17		32	90,6% (29/32)
	B	A	NHĐT	1	4			
	B	B	NHĐT	2	8			
	Cộng			3	29			
C	C	0	Không cổ điển			4	4	100% (4/4)

Nhận xét: Giá trị dự báo kiểu hình dương tính của các nhóm kiểu gen đều cao: 99,8%; 96,5%; 90,6% và 100% tương ứng với các nhóm kiểu gen “null”, A, B và C.



Biểu đồ 3.1. Phân bố kiểu hình của các kiểu gen nhóm “null”: trục hoành là các kiểu gen; trục tung là số lượng bệnh nhân có kiểu hình MM (màu đỏ) và NHĐT (màu xanh).

Nhận xét: 88/90 bệnh nhân có kiểu hình MM và chỉ 2/90 bệnh nhân (kiểu gen p.R356W/p.R356W và cluster 6/p.L307FfsX6) có kiểu gen nhóm “null” nhưng kiểu hình NHĐT.

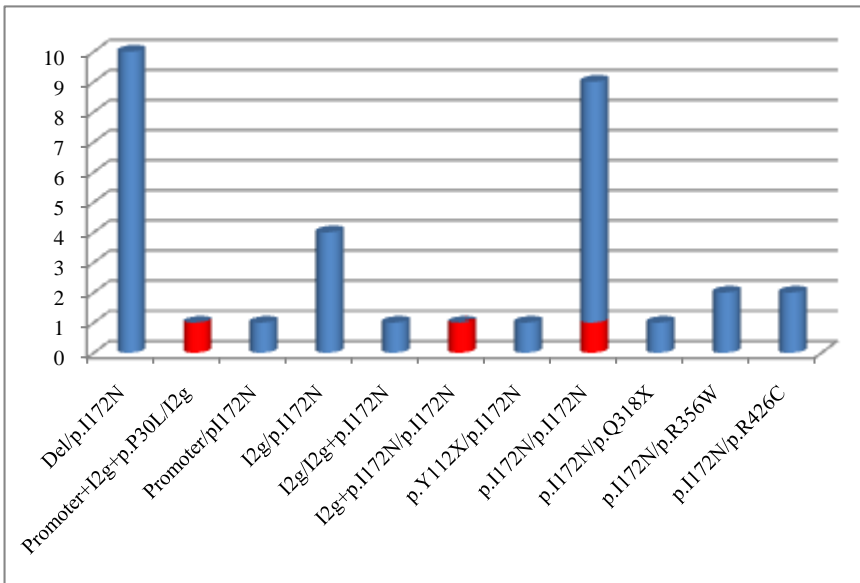


Biểu đồ 3.2. Phân bố kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen nhóm A: trục hoành là các kiểu gen, trục tung là số lượng bệnh nhân có kiểu hình MM (màu đỏ) và NHĐT (màu xanh).

Nhận xét: 2/57 bệnh nhân kiểu gen I2g/I2g có kiểu hình NHĐT trong số các bệnh nhân có kiểu gen nhóm A.

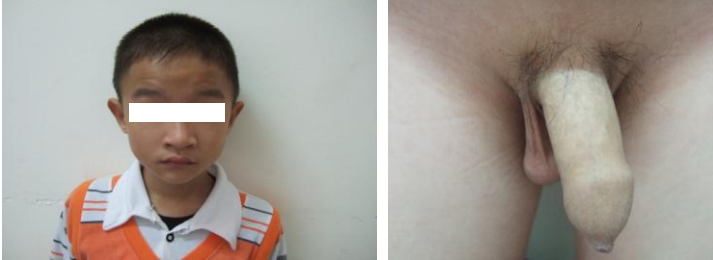


Hình 9. Kiểu hình bộ phận sinh dục ngoài thể MM của bệnh nhân nữ có kiểu gen gồm 3 đột biến khác nhau (nhóm A kết hợp với nhóm “null”): I2g/p.Q318X+p.R356W. Chẩn đoán lúc 22 giờ tuổi vì mơ hồ giới tính (Prader IV), xạm da toàn thân và bộ phận sinh dục ngoài, diễn biến có xuất hiện mất muối, tăng kali huyết thanh lúc 5 tháng tuổi (Na 122; K 6,9; Cl 92 mmol/l).



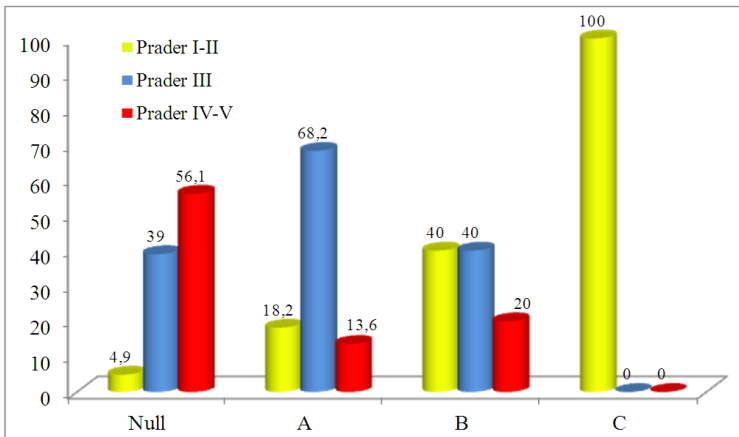
Biểu đồ 3.3. Phân bố kiểu hình của các bệnh nhân có kiểu gen nhóm B: trục hoành là các kiểu gen, trục tung là số lượng bệnh nhân có kiểu hình NHĐT (màu xanh) và MM (màu đỏ).

Nhận xét: 29/32 bệnh nhân có kiểu hình NHĐT; 3/32 bệnh nhân có kiểu hình MM trong số các bệnh nhân có kiểu gen nhóm B.



Hình 3.10. Kiểu hình NHĐT của bệnh nhân nam 4,5 tuổi có kiểu gen I2g/I2g: dậy thì sớm giả: lông mu P2-3, dương vật 6 cm, thể tích tinh hoàn 3 ml, trứng cá, giọng ồm, cao 123 cm (+3SD so với biểu đồ TCYTTG), 17-OHP huyết thanh tăng cao (821 ng/ml), ACTH tăng (20,7 pg/ml), tuổi xương 11 tuổi.

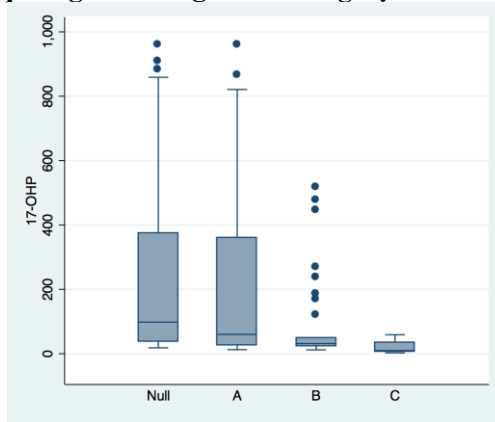
3.3.4. Tương quan giữa kiểu gen và mức độ nam hóa ở trẻ gái



Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ (%) của các mức độ nam hóa theo phân loại Prader của từng nhóm kiểu gen khác nhau

Nhận xét: Nhóm kiểu gen nặng có tỷ lệ mức độ nam hóa Prader nặng cao hơn ($p = 0,0001$).

3.3.5. Tương quan giữa kiểu gen với nồng độ 17-OHP huyết thanh



Biểu đồ 3.5. Nồng độ 17-OHP huyết thanh của các bệnh nhân có kiểu gen khác nhau: trục hoành là nhóm kiểu gen, trục tung là nồng độ 17-OHP huyết thanh (ng/ml).

Nhận xét: Nồng độ 17-OHP cao hơn ở các nhóm bệnh nhân có kiểu gen đột biến nặng ('null' và A) so với các bệnh nhân có kiểu gen đột biến nhẹ hơn (B và C) ($p = 0,0001$).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. Các đột biến và bản đồ đột biến gen *CYP21A2*

Tỷ lệ phát hiện được đột biến trong nghiên cứu của chúng tôi là 99%. Kết quả cũng cho thấy 202 bệnh nhân thiếu 21-OH có nhiều dạng đột biến gây bệnh khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với dữ liệu đột biến gen người trên thế giới (HGMD) (<http://www.hgmd.org>), cập nhật đến 2/2016 thì có 285 đột biến (229 đã được báo cáo) của gen *CYP21A2*.

Các đột biến chúng tôi phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu bao gồm: i/ nhóm các đột biến phổ biến: các đột biến xóa đoạn lớn của gen (34,48%); và các đột biến điểm khác nhau trong đó 13 đột biến phổ biến có nguồn gốc từ giả gen (tổng cộng là 58,85%) với tỷ lệ gặp cao nhất bao gồm: I2g (28,57%); p.R356W (12,31%); p.I172N (10,59%); ii/ nhóm 7 đột biến hiếm gặp khác nhau đã được báo cáo bao gồm: p.R426C (1,72%); p.R483PfsX58 (1,23%); p.E246GfsX11 (0,74%); p.M1I (0,25%); p.W19X (0,25%); p.H62L (0,25%); c.1447_1448insC (p.R483PfsX40) (0,25%); iii/ hơn nữa, chúng tôi cũng phát hiện được 6 đột biến mới (2%) chưa từng được báo cáo ở gen

CYP21A2. Tổng số các đột biến xóa đoạn lớn và các đột biến điểm có nguồn gốc từ giả gen chiếm tỷ lệ 93,33% và các đột biến hiếm phát sinh tại *CYP21A2* chiếm 6,67%. Sự phân bố về tỷ lệ các đột biến phổ biến (xóa đoạn lớn, I2g, p.I172N) phù hợp với nhiều nghiên cứu trên các chủng tộc khác nhau (bảng 4.1). Sự phù hợp về tỷ lệ cũng được nhận thấy với nhóm các đột biến hiếm trong đó có các đột biến mới.

Bảng 4.1. Phân bố tần suất các đột biến phổ biến của các nghiên cứu

Các đột biến	Xóa đoạn lớn (%)	I2G (%)	I172N (%)	V281L (%)	R356W (%)	Số bệnh nhân (n)	Tác giả
Việt Nam	34,5	28,6	10,6	0,7	12,3	202	Nghiên cứu này
Trung Quốc	19,6	35	14,3	0,2	5,9	230	Wang
Đa chủng tộc	20,0	22,9	8,2	23,9	3,6	1507	New
Mỹ	30,5	23,4	12,6	12,6	3,6	182	Finkelstein
Đông Âu	30,6	31,2	14,5	3,4	2,4	432	Dolzan
Thụy Điển	27,5	27,3	16,9	7,8	3,1	490	Gidlof
Hà Lan	31,9	28,1	12,4	2,2	8,4	198	Stikkelbroeck
Đức	27,4	30,3	19,7	2,9	4,5	155	Krone

Vị trí của các đột biến trên bản đồ gen *CYP21A2* (hình 3.1) phát hiện được ở các bệnh nhân nghiên cứu phân bố ở 8/10 exon (trừ exon 2 và 5), intron 2 và vùng promoter (3 đột biến vùng promoter). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wang R và cộng sự trên 230 bệnh nhân Trung Quốc thì không gặp đột biến nào trên exon 5.

4.2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình và ứng dụng

Nghiên cứu của chúng tôi cung cấp dữ liệu lớn nhất về tương quan kiểu gen – kiểu hình của thiếu 21-OH ở các bệnh nhân Việt Nam cho đến thời điểm hiện tại. Trước hết chúng tôi nhận thấy ở mỗi kiểu hình MM, NHĐT và không cổ điển thì đều có các kiểu gen phổ biến tương ứng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trên số lượng lớn bệnh nhân đa chủng tộc gồm 606 bệnh nhân thể MM, 187 bệnh nhân thể NHĐT của New MI và cộng sự (2013).

Chúng tôi nhận thấy rằng kiểu gen của một số đột biến có thể gây nên các kiểu hình khác nhau như I2g; kiểu gen đồng hợp tử nhóm “null” p.R356W/p.R356W nhưng lại có kiểu hình NHĐT (1 bệnh nhân). Ngược lại đột biến p.I172N thường gây ra kiểu hình thể NHĐT nhưng có 2 bệnh nhân mang kiểu hình thể MM. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên các chủng tộc da trắng ở châu Âu, Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ La tinh.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về giá trị dự báo dương tính

của kiểu gen với kiểu hình (ppv) ở các nhóm kiểu gen “null”, “A”, “B” và C tương ứng là 99,8%; 96,5%; 90,6% và 100%. Như vậy, nhìn chung có thể dự báo mức độ nặng của bệnh dựa trên kiểu gen đối với các thể MM và NHĐT, điều này đặc biệt quan trọng trong việc quyết định liệu pháp hormon thay thế đối với các bệnh nhân được chẩn đoán nhờ sàng lọc sơ sinh, hoặc được chẩn đoán sớm khi chưa có triệu chứng lâm sàng của mất muối. Hơn nữa dự báo kiểu hình dựa trên kiểu gen cũng được ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị trước sinh. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nhiều nghiên cứu về giá trị dự báo dương tính với thể MM, nhưng cao hơn một số nghiên cứu khác ở thể NHĐT, còn đối với thể không cổ điển vì cỡ mẫu còn nhỏ và cần tiếp tục có các nghiên cứu khác trong tương lai. Nhìn chung các nghiên cứu công bố trên y văn đều nhận định là giá trị dự báo dương tính cao đối với thể MM và thể không cổ điển, còn đối với thể NHĐT thì kiểu hình có sự khác nhau lớn và giá trị dự báo dương tính kém hơn (bảng 4.2).

Tương quan giữa kiểu gen với mức độ nam hóa bộ phận sinh dục ngoài ở trẻ gái và với nồng độ 17-OHP được ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu trên chủng tộc Bra-xin (De Carvalho. 2016) và Thụy Điển (Nordenstrom A. 1999).

Bảng 4.2. Giá trị dự báo dương tính kiểu hình của các nhóm kiểu gen

Nhóm đột biến	“null”	A	B	C
Thể lâm sàng	Mất muối		NHĐT	Không cổ điển
Nghiên cứu này. 2016	99,8%	96,5%	90,6%	100%
de Carvalho DF. 2016	88%	70%	98%	100%
Wang R và cs. 2016	88,9%	89,4%	88,9%	
Balraj P và cs. 2013	95,7%	90,9%	66,7%	
Choi và cs. 2012	100%	96,2%	94,1%	
Rabbani B và cs. 2012	92,3%	85,7%	100%	
Marino R và cs. 2011	100%	83,8%	87,2%	100%
Balsamo và cs. 2010	100%	91,5%	83,7%	86,4%
Finkielstain và cs. 2011	88,9%	91,5%	85,1%	97,8%
Speiser và cs. 1992	96%	85%	73%	63%
Krone và cs. 2000	100%	90%	74%	65%
Stikkelbroeck và cs. 2003	97%	96%	53%	100%

KẾT LUẬN

1. Phát hiện đột biến gen *CYP21A2* và mô tả bản đồ đột biến gen *CYP21A2*

Tỷ lệ phát hiện được đột biến gen *CYP21A2* là 99% (202/204). Đã phát hiện được 8 đột biến xóa đoạn lớn, 13 đột biến điểm phổ biến và 13 đột biến hiếm bao gồm 6 đột biến mới của gen *CYP21A2*. Các đột biến phân bố tại các vùng không mã hóa (promoter, intron 2) và 8/10 exon (trừ exon 2 và 5) của gen *CYP21A2*. Tỷ lệ xuất hiện các đột biến cao nhất gặp ở intron 2 (28,6%); exon 8 (15,5%) và exon 4 (10,6%). 55 kiểu gen khác nhau đã được xác định. Các kiểu gen phổ biến bao gồm: Ig2/I2g (15,4%); Del/Del (14,4%) và Del/I2g (10,9%).

2. Tương quan kiểu gen - kiểu hình

Giá trị dự báo dương tính kiểu hình dựa trên kết quả kiểu gen là 99,8%; 96,5%; 90,6%; và 100% ở các nhóm kiểu gen tương ứng là “null”, A, B và C. Kiểu gen I2g/I2g; p.I172N/p.I172N và p.R356W/p.R356W gây nên cả hai kiểu hình MM và NHĐT. Các kiểu hình MM, NHĐT và không cổ điển có các kiểu gen phổ biến khác nhau.

Tỷ lệ cao của mức độ nam hóa Prader nặng (III; IV-V) gặp ở các bệnh nhân nữ có kiểu gen nhóm “null” và A. Nồng độ của 17-OHP huyết thanh tăng cao hơn ở các bệnh nhân có kiểu gen nặng so với các bệnh nhân có kiểu gen nhẹ hơn.

KHUYẾN NGHỊ

1. Chỉ định phân tích đột biến gen *CYP21A2* cho các bệnh nhân thiếu 21-OH được chẩn đoán sớm qua sàng lọc sơ sinh hoặc sàng lọc lâm sàng, hóa sinh;
2. Chỉ định điều trị mineralocorticoid thay thế sớm cho các bệnh nhân có chẩn đoán và đã biết kiểu gen trong gia đình là thuộc nhóm “null” và A;

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Registry of congenital adrenal hyperplasia in Vietnam. Hormone research in pediatrics. 2011; 76(suppl 2): 300.
2. Tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase và u vô thượng thận. Tạp chí y học Việt nam. 2011; 383(2): 21-25.
3. Đột biến gen *CYP21A2* và mối tương quan giữa kiểu gen - kiểu hình của bệnh nhân tăng sản thượng thận bẩm sinh do thiếu 21-hydroxylase. Tạp chí nghiên cứu y học. 2012; 80(3): 1-8.
4. Adrenocortical tumor in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P51. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P51
5. Phenotype & genotype of congenital adrenal hyperplasia due to mutation in the type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase gene: a report of two Vietnamese families. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P50. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P50.
6. Registry of congenital adrenal hyperplasia at the north pediatric referral centre of Vietnam during 15 years. Annals of translational medicine. 2015; 3(S2): S48.
7. Phát hiện đột biến xóa đoạn gen *CYP21A2* gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh thể thiếu 21-hydroxylase. Tạp chí nghiên cứu y học. 2016; 99(1): 8-15.

MINISTRY OF EDUCATION & TRAINING

MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



VU CHI DUNG

**STUDY OF GENE MUTATION SPECTRUM IN
CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE
TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY**

Speciality : Pediatrics

Code : 62720135

SUMMARY OF MEDICAL PhD THESIS

HANOI - 2017

**THE STUDAY HAS BEEN COMPLETED AT
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

Scientific Supervisors:

- 1. PROF. Ta Thanh Van. M.D, PhD**
- 2. PROF. Nguyen Thanh Liem. M.D, PhD**

Reviewer 1: A/Prof. Nguyen Phu Dat. M.D, PhD

Reviewer 2: A/Prof. Tran Van Khoa. M.D, PhD

Reviewer 3: A/Prof. Nong Van Hai. PhD

The thesis will be defending to the council for evaluating PhD thesis at
the Hanoi Medical University

At hour date month 2017

The thesis can be found at:

- Vietnam National Library
- Library of Hanoi Medical University
- National Library of Medical Information

INTRODUCTION

1. Imperativeness of the study

Congenital adrenal hyperplasia – CAH comprises a group of autosomal recessive disorders caused by defects in one of several steroidogenic enzymes involved in the synthesis of cortisol from cholesterol in the adrenal glands. More than 95% of all cases of CAH are caused by 21-hydroxylase deficiency (21-OHD), which in addition to cortisol impairs synthesis of aldosterone. The incidence of classic CAH worldwide ranges from 1:10,000 to 1:15,000 live births.

In Vietnam, 40–60 new cases with 21-OHD were diagnosed and managed at the National Children’s Hospital, Hanoi. CAH due to 21-OHD accounted 98.3% (828/842) of accumulated cases from 17 years. Identification of mutations in *CYP21A2* for large cohort of Vietnamese patients with 21-OHD has not been conducted using directed sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).

2. Aims of study

1. To identify mutations of *CYP21A2* gene and to describe spectrum of mutations on mutated map of *CYP21A2* in patients with 21-OHD.

2. To analyze correlation between genotype and phenotype of patients with 21-OHD.

3. Contributions for science and clinical practice of thesis

Recently, MLPA has been increasingly used for identification of *CYP21A2* gene deletion and duplication, suggesting that MLPA may replace Southern blot (SB) analysis as efficient strategy to identify gene copy number. Former studies of molecular genetics for small number of Vietnamese patients with 21-OHD was conducted using only PCR for screening of several common mutations. Therefore, database of spectrum of mutations of *CYP21A2* gene of Vietnamese has been not available. Our study will provide valuable database of mutations of *CYP21A2* gene in Vietnamese patients with 21-OHD. The database includes specific causative mutations, frequencies, distribution, genotype for Gene Bank.

Moreover, identification of mutations will help to confirm diagnosis in difficult cases with hormonal profiles and help early treatment to avoid mortality due to adrenal crisis. The study also provide database of genotype-phenotype correlation to predict phenotype based on genotype, to decide steroid replacement therapy in personality, to detect carriers, prenatal diagnosis and treatment.

4. Structure of thesis:

- Thesis has 142 pages (without references and appendix) including 7 parts:

- + Introduction: 2.5 pages
- + Chapter 1: overview 37 pages
- + Chapter 2: participants, materials and methods 18 pages
- + Chapter 3: results 45 pages
- + Chapter 4: discussion 37 pages
- + Conclusion: 1.5 pages
- + Recommendations and further studies in the future: 1 page

The thesis contains 20 tables, 7 graphs and 41 figures. References contain 190 papers in English and Vietnamese and several websites. Appendix contains DNA concentrations, Prader scale, and list of 212 patients including genotype and phenotype, and questionnaire.

Chapter 1: OVERVIEW

1.1. Definition, enzymes for synthesis of cortisol and pathophysiology of 21-OHD

CAH is a group of autosomal recessive disorders characterized by impaired cortisol synthesis from cholesterol in the adrenal glands. There are at least six effected enzymes P450_{scc} (*CYP11A1*), P450_{c17} (*CYP17A1*), P450_{c21} (*CYP21A2*), P450_{c11} (*CYP11B1*), 3 β HSD (*HSD3B2*) and electron donor enzyme P450 oxidoreductase (*POR*). Besides, in the first step of adrenal steroidogenesis, cholesterol enters mitochondrial via a carrier protein called StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (*STAR*). (figure 1.1).

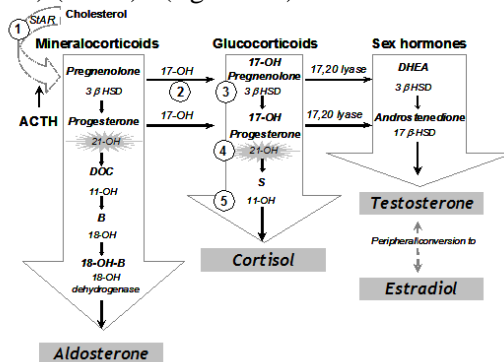


Figure 1. Normal fetal adrenal steroidogenesis and in the absence of the 21-OH

More than 95% of all cases of CAH are caused by 21-OH deficiency (21-OHD, OMIM +201910), which in addition to cortisol impairs synthesis of mineralocorticoids. The decreased adrenal secretion of cortisol gives rise, because of the absence of negative feedback to hypothalamus and pituitary, to an increased secretion of CRH and ACTH. The steroid precursors prior to this enzymatic deficiency (progesterone and 17-hydroxyprogesterone) are accumulated and shunted through the adrenal androgen biosynthetic pathway. The increased secretion of adrenal androgens from eighth week of gestation and the resulting production of high levels of testosterone and dihydrotestosterone, particularly affects sexual differentiation in females, and causes advance somatic development in both sexes during childhood (figure 1.1).

1.2. Clinical phenotype of CAH due to 21-OHD

In 21-OHD CAH, excessive adrenal androgen biosynthesis results in virilization in all individuals and salt wasting in some individuals. The severity of the clinical symptoms varies according to the level of residual 21-OH activity. A classic form with severe enzyme deficiency and prenatal onset of virilization is distinguished from a non-classic (NC) form with mild enzyme deficiency and postnatal onset. The classic form is further divided into the simple virilizing form (SV) (~25% of affected individuals) and the salt-wasting (SW) form, in which aldosterone production is inadequate ($\geq 75\%$ of individuals). Newborns with salt-wasting 21-OHD CAH are at risk for life-threatening salt-wasting crises. Individuals with the non-classic form of 21-OHD CAH present postnatally with signs of hyperandrogenism; females with the non-classic form are not virilized at birth.

Table 1.1. Clinical features in Individuals with 21-OHD

Feature	21-OH Deficiency	
	Classic	Nonclassic
Prenatal virilization	Present in females	Absent
Postnatal virilization	Males and females	variable
Salt wasting	75% of all individuals	Absent
Cortisol deficiency	100%	Rare

1.3. Molecular genetics of 21-OHD, mutations and advances in molecular testing for *CYP21A2* gene mutations

The *CYP21A2* gene encodes 21-OH is located in the HLA class III region between the HLA-B and HLA-DR chromosome 6p21.3. This is a highly complicated region including a highly homologous pseudogene, *CYP21A1P*. These two genes share about 98% homology in their ten exons and about 96% in the introns, but *CYP21A1P* is inactive because of several deleterious mutations. The functional gene (*CYP21A2*) and a nonfunctional pseudogene (*CYP21A1P*) are located closely adjacent to each other in tandem arrangement with the *C4A* and *C4B* genes encoding for the fourth component of the serum complement. Moreover, these units are located between a telomeric *RP* gene and a centromeric *TNX* gene, comprising the *RCCX* modules (*RP-C4-CYP21-TNX*). These genes are located in tandem and in an array (*C4A*, *CYP21A1P*, *TNXA*, *C4B*, *CYP21A2*, and *TNXB*). Genes *C4A*, *C4B*, *CYP21A2*, and *TNXB* all encode functional proteins, while *CYP21A1P*, *TNXA*, and *RP2* genes are pseudogenes that do not encode proteins (figure 1.2).

To date, more than 200 *CYP21A2* mutations have been discovered (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>), and about 10 common mutations account for approximately 90% of cases. More than 90% of *CYP21A2* gene mutations are caused by gene conversion or unequal crossing over. Approximately 70%–75% of 21OHD cases are the result of the micro conversion of the mutations in *CYP21A1P* to *CYP21A2*. About 20% are caused by unequal crossing over during meiosis, resulting in the deletion of a 30-kb gene segment, encompassing the 3' end of the *CYP21A1P*, all of the adjacent *C4B*, and the 5' end of *CYP21A2*, producing the nonfunctioning chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* and chimeric *TNXA/TNXB* genes. The remaining 1%–2% of affected alleles is spontaneous mutations not carried by either parent.

Technics have been used to identify large deletions of *CYP21A2* include Southern blot (SB), PCR-based restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP), multiplex mini-sequencing and conversion-specific PCR (MMCP). Recently, MLPA) analysis for the diagnosis of 21OHD has been increasingly used as an easy, simple, rapid, and sensitive tool to detect deletions or duplications of the *CYP21A2* gene. MLPA allows easy and rapid detection of gene copy number variations and the identification of chimerical genes in patients

with 21OHD without using radioactive probes and is thought to be a valid alternative to Southern blotting.

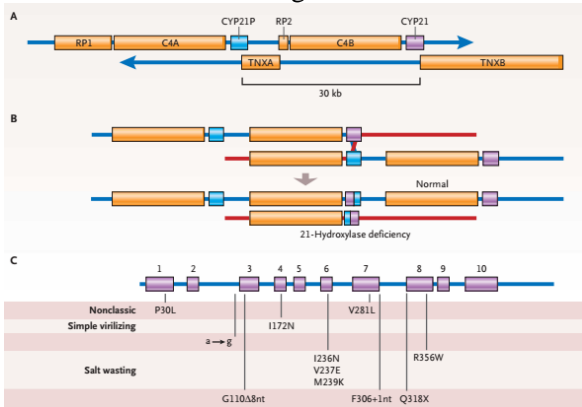


Figure 1.2. The chromosomal region of 6p21.3 containing the 21-OH genes (A), 21-OH genes undergoing an unequal crossover during meiosis (B), and mutations in steroid 21-OH causing CAH (C).

A variety of rapid methods to detect common and rare point mutation have been developed thus far, such as “allele specific oligonucleotide hybridization” (ASO); “allele specific PCR amplification” (ARMS); “ligation detection reaction” (LDR); “Real-time PCR”; “DHPLC analysis” and “multiplex minisequencing”. Sanger sequencing is the gold standard for detecting point mutations and small sequence variations and can detect 100% of rare mutations.

1.4. Roles of mutation analysis of *CYP21A2* gene

1.4.1. Prediction of clinical phenotype according to genotype

The phenotypic is strictly related to the total residual enzymatic activity, although the mutation determining the lower enzymatic deficiency is the main predictor of its severity, at least in term of salt retention capacity. A practical way to correlate genotype to phenotype was suggested by Krone et al (2000) who categorised the genotypes in 4 mutations groups (null, A, B, and C) according to their predicted functional consequences and calculated the predicted positive value (PPV) for these 4 groups. The SW forms result from the association of alleles with deletions/conversions or point mutations with < 1% residual enzymatic activity (null and A mutation groups); the other clinical forms depend on the presence of alleles with mutations with progressively increasing residual enzymatic activity (about 1-5% for

SV) (mutation group B) and about 15-60% for NC form (mutation group C), respectively (figure 1.2).

1.4.2. Contribution of molecular genetics in prenatal diagnosis and treatment, early diagnosis and CAH neonatal screening programs

Prenatal genetic counseling is advised for all families affected by CAH. Genotypes of deletion/gene conversion or severe mutations motivate prenatal diagnosis and eventual treatment of affected female fetuses, while genotypes of less severe mutations (whether homozygous or heterozygous) do not. Female fetuses with classic 21-OHD exhibit varying degrees of genital virilisation depending on the excessive adrenal androgen production. This problem begins as early as at 8 weeks of gestation, when the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis starts to function. Maternal dexamethasone in pregnancies at risk for classic 21-OHD has been administered since 1980 and has been able to prevent genital ambiguity in about 85% of female 21-OHD affected fetuses.

Neonatal screening for CAH is a useful tool for diagnosing the classic forms of the disease. However, sometime there are difficulties in interpreting positive results with a single determination of blood 17-OHP in asymptomatic newborns. Furthermore, healthy preterm babies present higher levels of the hormonal marker and even with gestational age and/or neonatal weight-adapted cut off levels, about 1-1.2% of newborns result false positive to screening and need to be followed up for several months. In order to improve the PPV of the screening test, 2 different approaches have recently been suggested as second-tier screening in positively tested newborns: tandem mass spectrometry (TMS) and *CYP21A2* genotyping.

1.5. Molecular study in Vietnamese CAH patients

Molecular genetic studies using only PCR for screening several common mutations in small number of Vietnamese patients with 21-OHD have been started since 2000. Prenatal diagnosis in families at risk for 21-OHD using MLPA and direct sequencing of *CYP21A2* has been conducted since 2008. Molecular genetics and phenotype studies for CAH due to rare enzymatic deficiency were also performed as 11 β -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency. These studies provided evidence of existing rare types of CAH in Vietnam and provided for mutation databases of *CYP11B1* and *HSD3B2* because only 60 cases with CAH due to mutations of *HSD3B2* have been reported worldwide so far.

Chapter 2: PARTICIPANTS AND METHODS

2.1. Participants

From 01/1/2011 to 31/10/2016, 212 patients (aged 3 hours – 31 years) from 204 unrelated families were enrolled at the Department of Endocrinology, Metabolism and Genetics, National Children's Hospital (NCH), Hanoi. Included criteria based on clinical and hormonal characteristics (New MI et al. 2016 updated): females with virilization at birth & become virilization postnatally, advanced maturation, growth; males with masculinization in childhood; infant with a salt-losing crisis ($\text{Na}^+ \downarrow$; $\text{K}^+ \uparrow$); serum elevated 17-OHP ($\geq 1\text{ng/ml}$ in newborns and $\geq 2\text{ng/ml}$ post neonatal periods). Excluded criteria were adrenal insufficiency, or virilization due to other causes.

2.2. Methods

This is a case series study including: identification of mutations in *CYP21A2* gene, genotype analysis, phenotype evaluation and correlation between genotype – phenotype.

2.2.1. Identification of *CYP21A2* mutations and genotype analysis

Mutation analysis was performed at the Center of Gene and Protein Research, Hanoi Medical University and Genetic Department of National Children's Hospital.

Blood samples were taken when informed consent was obtained from the patients and their parents. Genomic DNA was extracted from peripheral blood using phenol/chloroform methods.

PCR reaction was performed using specific primer pairs (P1-P10; P3-P5; P6-P4) to amplify all 10 exons, exon - intron and promoter of *CYP21A2* gene. All PCR products were fractionated by electrophoresis on agarose gel 1% (90V during 30mn). All PCR products were purified by “gel kit purification” before direct sequencing.

Purified PCR products were sequenced by using BigDye terminator cycling conditions in ABI PRISM 310-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, USA), analysed using CLC Main Workbench software. Sequences of *CYP21A2* gene from CAH patients were compared with normal control DNA and sequence of *CYP21A2* in GeneBank (Accession number NM_0005002).

MLPA was performed using SALSA MLPA kit P050-B2 CAH (MRC Holland, Amsterdam) with probes specific for 6p21.3. The kit was used for *CYP21A2* gene dosage analysis comprising reference probes,

specific probes. The specific probes detect sequences in, or near, exon 1, 3, 4, 6, and 8 of the *CYP21A2* gene; in, or near, exons 1, 2, and 10 of the *CYP21A1P* pseudogene; two probes for C4A and C4B; and X and Y-chromosome specific probes that provide differentiate between sexes. MLPA was conducted according to manufacturer's protocol including DNA denaturation and hybridization of the probes, ligation reaction, PCR amplification, capillary electrophoresis, and, finally, data analysis. Since a normal individual had two copies of the *CYP21A2* gene, MLPA analysis with one copy or less identified from the peak ratio proves a deletion; thus, three and four copies establish duplication and triplication of the probed, respectively.

Identified mutations of *CYP21A2* were compared with Human Gene Mutation database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=CYP21A2> and Human Cytochrome P450 allele. Gen *CYP21A2* at <http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>. Unreported identified variants were compared with 1000 genomes database at "Mutation Taster". <http://www.mutationtaster.org>.

Cytogenetic: Karyotype was performed for females with ambiguous genitalia at NCH.

2.2.2. Identification of phenotype

Clinical phenotype, biochemistry tests, pelvic ultrasound for females with ambiguous genitalia, adrenal gland ultrasound were performed at NCH: pedigree, natural history, examination including weight, height, dehydration, hyperpigmentation. Virilization severity was evaluated using Prader grading, puberty stages were evaluated using Tanner criteria (pubic hair; breast development stages in girls; penis length of penis). Other presentations as deepening voice, facial hair, acne and muscle development. Clinical course was followed for cases who were diagnosed and given hormonal replacement therapy before salt wasting.

Biochemistry testing: serum electrolyte using automated Beckman Coulter AU2700/ AU 680 system, hormonal profile: 17-OHP before and after stimulation by ACTH; testosterone; progesterone; cortisol; ACTH; FSH; LH by ELISA using DRG kits, and Elx808 reader system. Bone age was obtained for children > 3 years and compared with Atlat of Greulich and Pyle.

Phenotype classification using criteria of Pang S.1993; Speiser PW. 2010.

SW phenotype: failure to thrive, vomiting, signs of dehydration, serum $\text{Na}^+ < 130$; or 130-135 associated with $\text{K}^+ > 5,5$ mmol/l;

SV phenotype: no symptoms of salt wasting, normal serum electrolyte, sexual precocity and marked acceleration of height/bone age development.

NC phenotype: girls with absence of genital virilisation and, in both sexes, presence of precocious pubarche and adrenarche. Serum 17-OHP before and after stimulation of ACTH is 2-100 and 10-100 ng/ml, respectively.

2.2.3. Analysis of correlation between genotype - phenotype

The patients were divided into five different genotype groups according to the reported residual enzymatic activity of the mutated *CYP21A2* (Krone N et al. 2000):

Group “null” (0): mutations result in completely inactive enzyme: deletions, E6 cluster, p.L307FfsX6, p.Q318X, p.R356X, and novel frameshift mutation in both 2 alleles.

Group A: homozygous I2g (known to have minimal residual enzymatic activity) or heterozygous I2g *in trans* with null mutations.

Group B: homozygous p.I172N mutation (2% of the enzymatic activity) or heterozygous p.I172N mutation *in trans* with mutation from group “null” or A; and promoter + p.P30L.

Group C: homozygous p.P30L, p.V281L mutations (resulting in 20-60% residual enzymatic activity) or heterozygous state *in trans* with mutations from the group “null”, or A, or B.

Group D: patients carrying mutations with unknown *in vitro* influence on enzymatic activity.

The expected phenotype associated with groups null or A were SW-CAH; group B was predicted as SV CAH; group C was predicted as NC CAH. Positive predictive value – PPV was calculated to evaluate the genotype-phenotype correlation using number of patients with expected phenotype (SW, SV or NC CAH) for each group divided by the total number of patients in that group, multiplex by 100.

2.2.4. Statistical analysis

Data were expressed as rates, median and range. Continuous variables were analyzed using ANOVA or Kruskal-Wallis tests. Rates were compared using Fisher’s exact tests. These analyses were performed using SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). With $P < 0.05$ or the corresponding Bonferroni-adjusted P value when multiple comparisons are made, deemed significant.

2.2.5. Ethical approval: protocol was approved by Ethical committee of NCH. Informed consent was obtained from all participants.

Chapter 3: RESULTS

3.1. Characteristics of participants

212 patients (97 males, 115 females) from 204 unrelated 204 families including 205 classic cases (96.7%) (SW 161/205; 78.5%. SV 44/205; 21.5%), 4 /212 cases with NC (1.9%) and 3 cases without identified phenotype.

Table 3.1: Age at diagnosis, gender characteristics

Characteristics	Forms					
	SW n = 161		SV n = 44		NC n = 4	
Gender (n; %)	Male (86; 54.4%)	Female (75; 46.6%)	Male (8; 18.2%)	Female (36; 81.8%)	Male (3; 75%)	Female (1; 25%)
<i>p</i> (test binomial)	0.4		0.000025		0.6	
Diagnosis age (day); Median (Min - Max)	32 (1 - 4740)		1590 (4 - 11220)		18.5 (1 - 570)	
<i>p</i> (test Kruskal-Wallis)	<i>p</i> = 0.0001					
Diagnosis age by gender (day); Median (Min - Max)	40 (3 - 3450)	25 (1 - 4740)	1710 (1170 - 2700)	1545 (4-11220)	6 (1 - 31)	570
<i>p</i> (test Wilcoxon ranksum)	0.0001		0.27		0.18	

Comments: Number of girls was diagnosed greater than numbers of boys in SV phenotype. Median age of diagnosis in girls was significantly younger than that in boys in SW phenotype.

3.2. Mutation spectrum of *CYP21A2* gene

Mutations were identified in 202/204 (99%) probands from 204 unrelated families (8 affected sibling were analysed and identified mutations).

3.2.1. Identified mutations and frequencies of specific mutations

The list of identified mutations, frequencies and rates of each specific mutations were indicated at the table 3.2

Table 3.2. Mutations of CYP21A2 and frequencies

Exon/ intron	Mutations of <i>CYP21A2</i>		n	%
	c.DNA (or g.DNA)	Protein		
exon 1	exon 1 deletion (exon 1 del)		2	0.49
exon 1-2	exon 1-2 deletion (exon 1-2 del)		2	0.49
exon 1-3	exon 1-3 deletion (exon 1-3 del)		23	5.67
exon 1-6	exon 1-6 deletion (exon 1-6 del)		2	0.49
exon 1-8	exon 1-8 deletion (exon 1-8 del)		4	0.99
exon 4-6	exon 4-6 deletion (exon 4-6 del)		2	0.49
exon 8	exon 8 deletion (exon 8 del)		2	0.49
<i>CYP21A2</i> - gene	Total gene deletion (del)		103	25.37
Promoter	g.-113G>A; g.-110T>C; g.-103A>G		3	0.74
exon 1	c.3G>A	p.M1I	1	0.25
exon 1	c.56G>A	p.W19X	1	0.25
exon 1	c.89C>T	p.P30L	2	0.49
exon 1	c.185A>T	p. H62L	1	0.25
Intron 2	g.665A/C>G (I2g)		116	28.57
exon 3	c.336C>G	p.Y112X	1	0.25
exon 3	c.368C>T	p.T123I	2	0.49
exon 3	c.374C>G	p.S125X	1	0.25
exon 4	c.515T>A	p.I172N	43	10.59
exon 6	c.707T>A; c.710T>A; c.716T>A (Cluster 6 or E6)	p.I236N; p.V237E; p.M239K	1	0.25
exon 7	c.737delA	p.E246GfsX11	3	0.74
exon 7	c.841G>T	p.V281L	3	0.74
exon 7	c.920_921insT	p.L307FfsX6	9	2.21
exon 8	c.952C>T	p.Q318X	12	2.95
exon 8	c.del1054-1261insCGGCA	p.V352RfsX103	1	0.25
exon 8	c.1066C>T	p.R356W	50	12.31
exon 9	c.1202C>T	p.P401L	1	0.25
exon 10	c.1276C>T	p.R426C	7	1.72
exon 10	c.1375_1392dupCCCTCCCTGCAGCCCCTG	p.P459_L464dup	2	0.49
exon 10	c.1447_1448delGGinsC	p.R483PfsX58	5	1.23
exon 10	c.1447_1448insC	p.R483PfsX40	1	0.25
Total: 34			406	100

Comments: distributions of mutations from more to less common according mutation forms: large deletions (34.48%); missense (27.34%); non-coding regions (intron and promoter) (29.1%); frameshift mutations (4.68%), nonsense (3.7%) and duplication (0.69%). 30 specific mutations were identified, most common mutations: (I2g) (28.57%), total gene deletion (25.37%), p.R356W (12.31%), p.I172N (10.59%).

3.2.2. Genotype of patients with 21-OH

55 different genotypes were identified in 202 patients with 21-OHD. 102 cases (50.5%) were homozygous mutation; 75 cases (37.2%) were compound heterozygous; 12 cases (5.9%) have over 2 mutations and 13 cases (6.4%) have only one identified mutated allele.

Common genotypes were I2g/I2g (31/202; 15.35%); Del/Del (29/202; 14.36%); Del/I2g (22/202; 10.89%); p.R356W/p.R356W (13/202; 6.44%) và exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/202; 5.44%).

Homozygous mutations were identified in 13 different genotypes, most common genotypes in homozygous group were I2g/I2g (31/102; 30.4%); Del/Del (29/102; 28.4%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/102; 10.8%); p.I172N/p.I172N (9/102 ca; 8.8%) và p.R356W/p.R356W (13/202; 6.4%).

3.2.3. Mutations map of *CYP21A2* gene

Mutations distributions in almost regions of *CYP21A2* gene: promoter region, intron 2 and 8 in 10 exons (except exon 2 and exon 5). Point mutations were more common (65.52%); remaining one was large deletions (34.48%). 6 novel mutations were identified: p.I12X; p.T123I; p.S125X; p.V352RfsX103; p.401L and p.P459_L464dup

Total mutated alleles due to small conversion accounted 58.85%; total large deletions and small conversion were 93.33%; 13 rare mutations from function *CYP21A2* gene were identified including 6 novel ones accounted 6.67%.

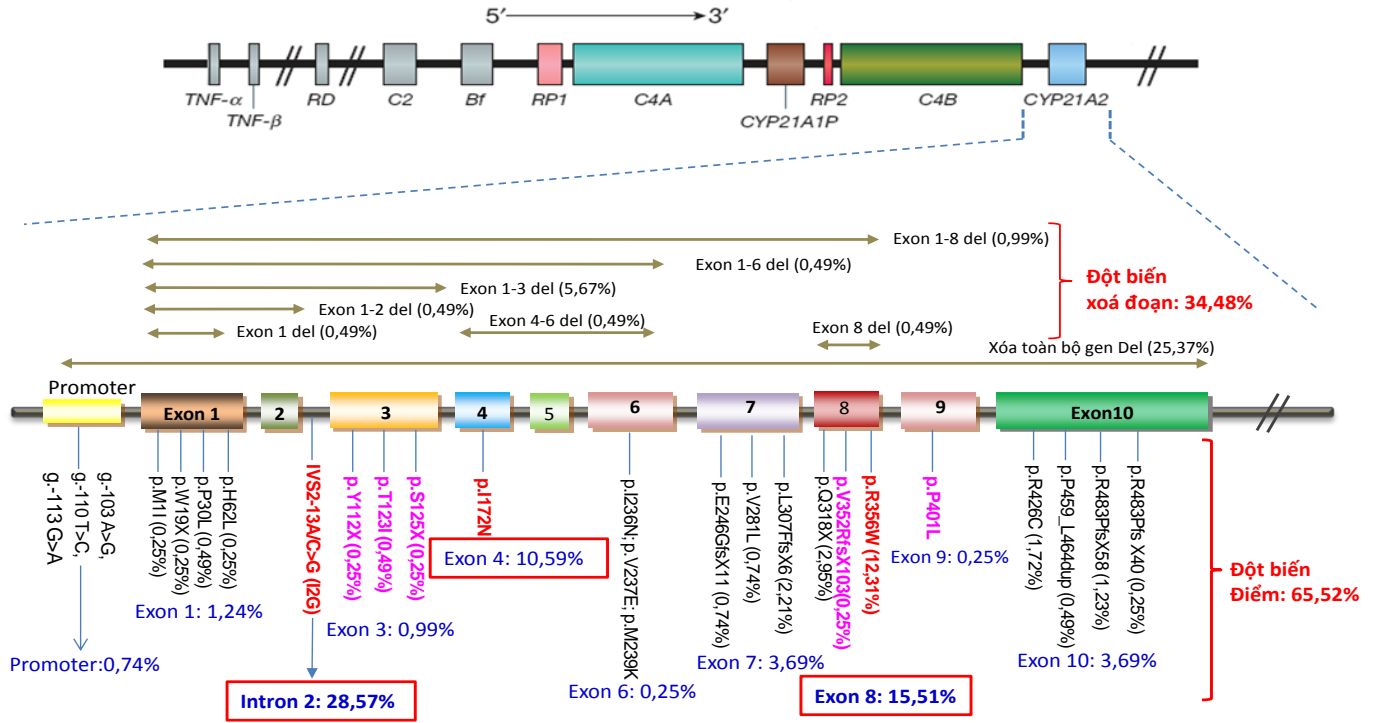


Figure 3.1. map mutation of CYP21A2 gene

(red color is most common mutations, violet is novel mutation, red box was exon and intron which is most common mutation)

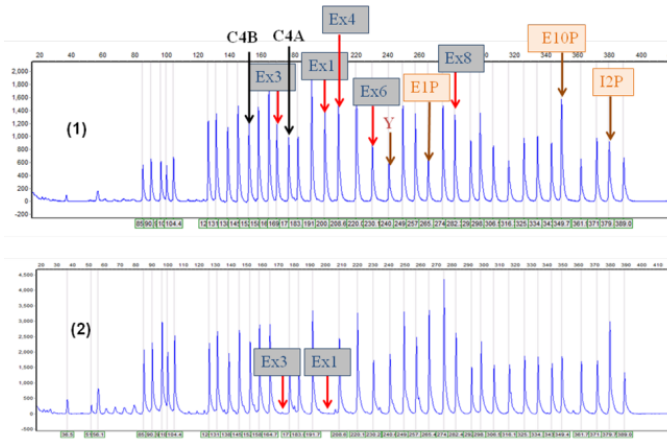


Figure 3.2. MLPA of patient with homozygous deletion of exon 1-3 (exon 1-3 del) of *CYP21A2* gene: (1) normal control, (2) no peaks of exon 1 and 3 of *CYP21A2* gene in patient compared with normal control.

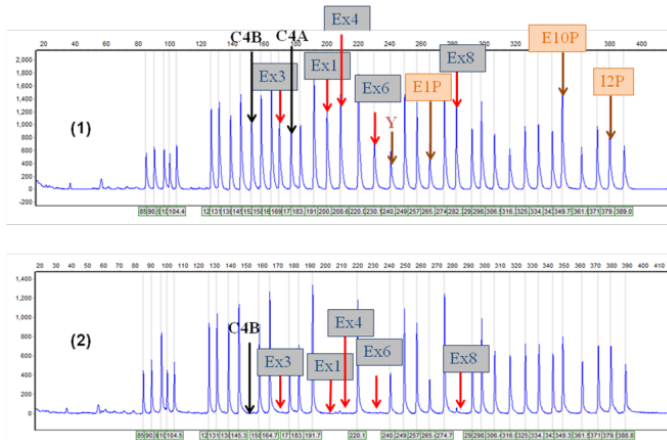


Figure 3.3. MLPA of patient with homozygous deletion from *C4B* gene to exon 8 of *CYP21A2* gene: (1) normal control; (2) patient has no peaks of *C4B* gene and exons 1, 3, 4, 6 and 8 of *CYP21A2* gene compared with normal control.

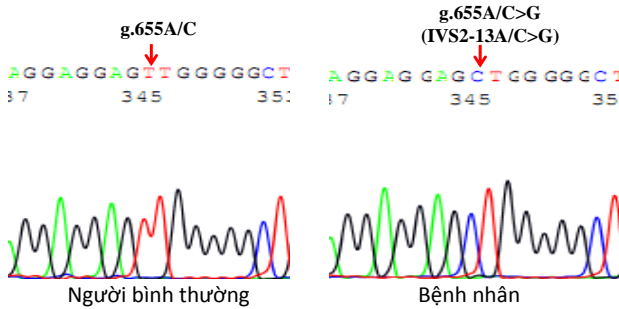


Figure 3.4. DNA sequencing chromatograms showing homozygous mutation g.655A/C>G (I2g/I2g) of *CYP21A2* in a studied patient.

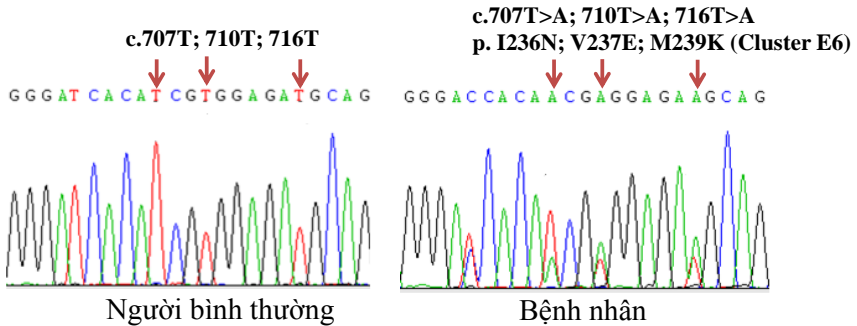


Figure 3.5. DNA sequencing chromatogram showing mutation E6 cluster (p.I236N, p.V237E, p.M239K) of *CYP21A2* in a studied patient.

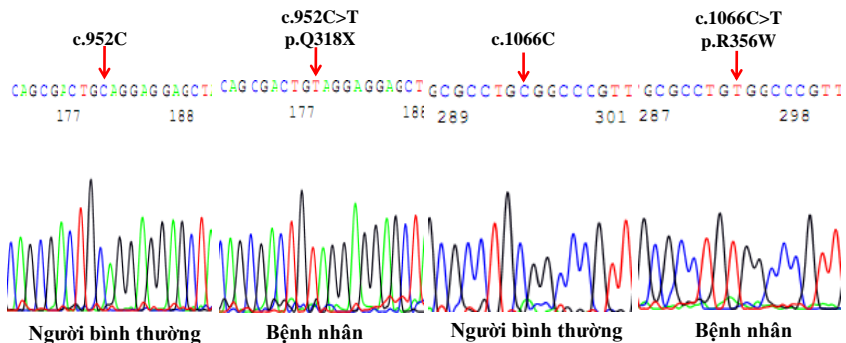


Figure 3.6. DNA sequencing chromatograms showing two homozygous mutations p.Q318X and p.R356W of *CYP21A2* in a studied patient.

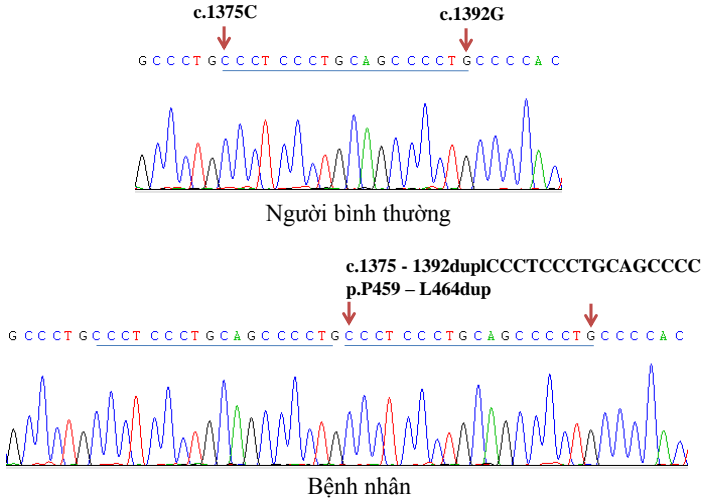


Figure 3.7. DNA sequencing chromatograms showing novel duplication mutation p.P459_L464dup of CYP21A2 gene in a studied patient: a nucleotid fragment 1375-1392 (CCCTCCCTGCAGCCCC) was duplicated 1375-1392 (CCCTCCCTGCAGCCCC).

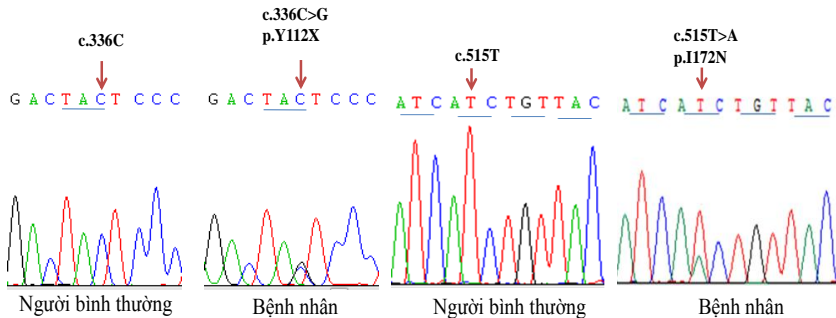


Figure 3.8. DNA sequencing chromatograms showing compound heterozygous a novel nonsense mutation p.Y112X and a common mutation p.I172N in a studied patient.

3.3. Genotype – Phenotype correlation

3.3.1. Common genotypes of different phenotype group

Common genotypes of SW phenotype were Del/Del (29/153; 18.9%); I2g/I2g (27/153; 17.6%); Del/I2g (22/153; 14.4%); p.R356W/p.R356W (12/153; 7.8%); exon 1-3 del/exon 1-3 del (11/153;

7.2%) và Del/p.R356W (10/153; 6.5%). Common genotypes of SV phenotype were Del/p.I172N (10/42; 23.8%); p.I172N/p.I172N (8/42; 19.1%) và I2g/p.I172N (4/42; 9.5%). Common genotypes of NC phenotype were p.V281L/p.L307FfsX6 (3/4; 75%).

3.3.2. Genotype-phenotype correlation of several common mutations

Rates of patients with SW and SV phenotypes who have at least one allele I2g were 83.8% (62/74) and 13.5% (10/74), respectively.

Rates of patients with SV and SW phenotypes who have at least one allele p.I172N were 94.1% (32/34) and 5.9% (2/34), respectively.

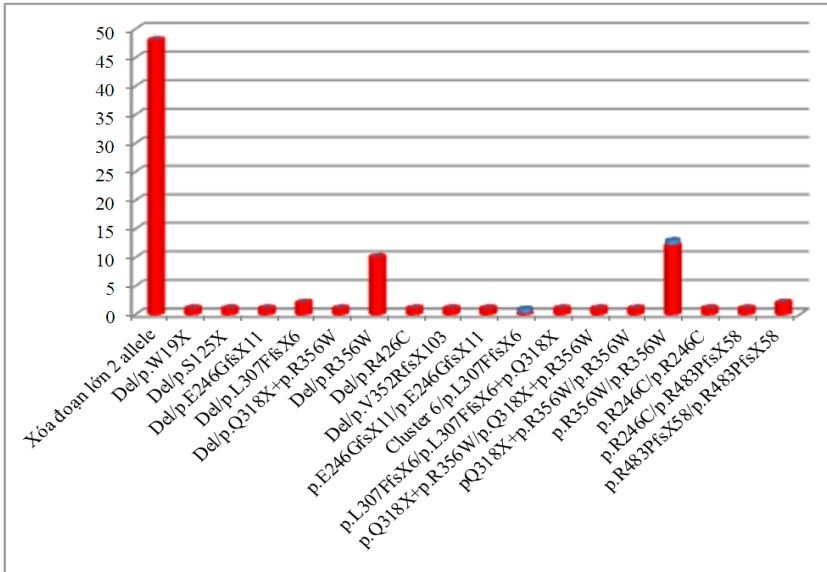
Rates of patients with SV and SW phenotypes who have at least one allele p.R356W were 88.6% (31/35) and 11.4% (4/35), respectively.

3.3.3. Phenotype of genotype groups “null”, A, B, C and PPV.

Table 3.3. Genotype groups and phenotype

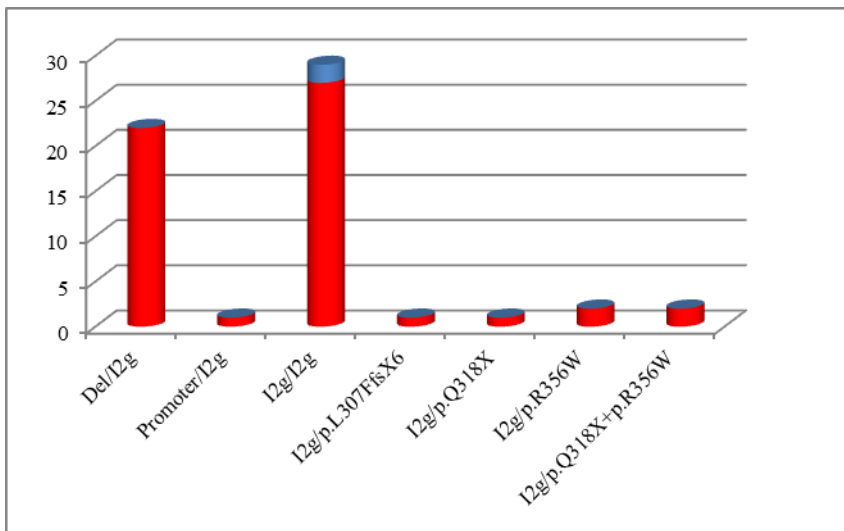
Mutation group			Predict Phenotype	Phenotype			Total	PPV
Group	Allele 1	Allele 2		SW	SV	NC		
Null (0)	0	0	SW	88	2		90	99.8% (88/90)
A	A	0	SW	28			57	96.5% (55/57)
	A	A	SW	27	2			
	Total			55	2			
B	B	0	SV		17		32	90.6% (29/32)
	B	A	SV	1	4			
	B	B	SV	2	8			
	Total			3	29			
C	C	0	NC			4	4	100% (4/4)

Comments: High PPVs were 99.8%; 96.5%; 90./6% and 100% in genotype group “null”, A, B and C, respectively.



Graph 3.1. Phenotype distribution of genotype group “null”: x-axis is genotypes; y-axis is SW phenotype (red) and SV phenotype (green).

Comments: 88/90 patients were SW and only 2/90 patients (genotype group “null” p.R356W/p.R356W and E6 cluster/p.L307FfsX6) were SV.

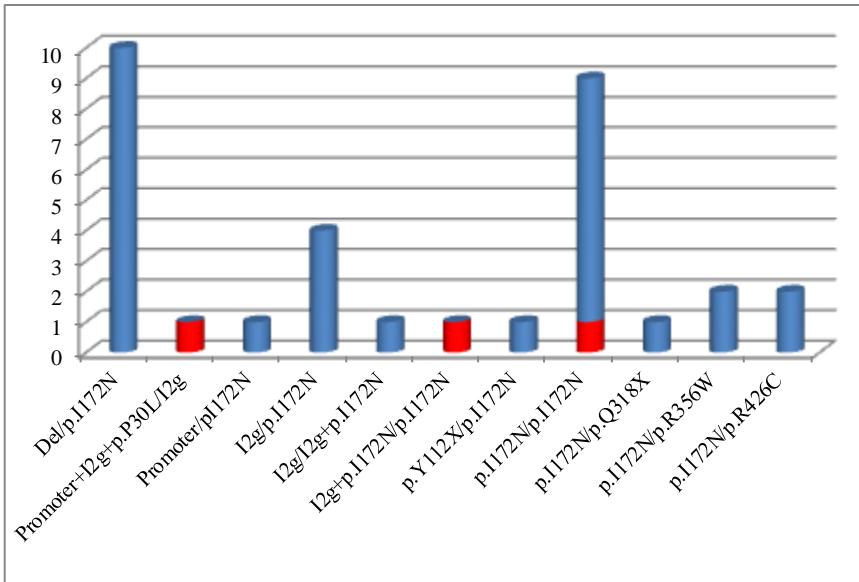


Graph 3.2. Phenotype distribution of genotype group A: x-axis was genotype, y-axis was SW phenotype (red) and SV phenotype (green).

Comments: 2/57 cases with genotype group A (I2g/I2g) were SV phenotype.



Figure 3.9. Virilisation in a girl with SW phenotype, genotype has 3 different mutations (group A associated with group “null”): I2g/p.Q318X+p.R356W. Diagnosis at 22 hours because ambiguous genitalia (Prader IV), hyperpigmentation, salt wasting at 5 months of (serum Na^+ 122; K^+ 6.9; Cl^- 92 mmol/l).



Graph 3.3. Phenotype distribution of genotype group B: x-axis is genotype, y axis is SV phenotype (green) and SW (red).

Comments: 29/32 cases were SV; 3/32 cases were SW in genotype group B.

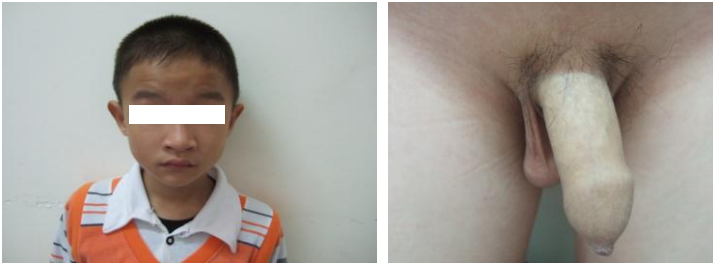
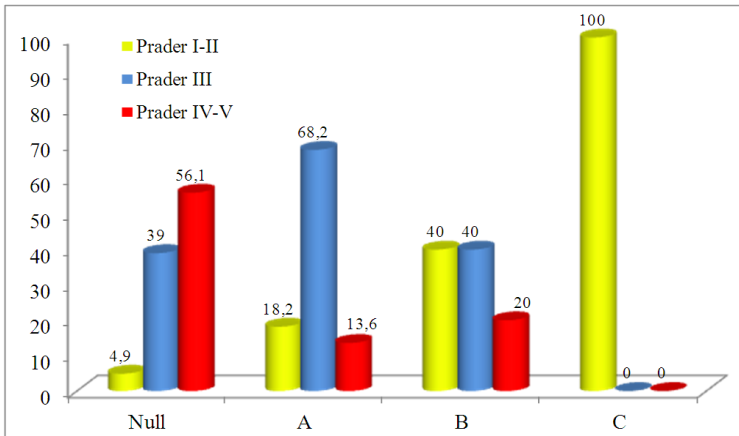


Figure 3.10. SV phenotype in a boy who has genotype group A (I2g/I2g): peripheral precocious puberty: pubic hair P2-3, penis length was 6 cm, testis volume 3 ml, acne, deepening voice, height was 123 cm (+3SD).

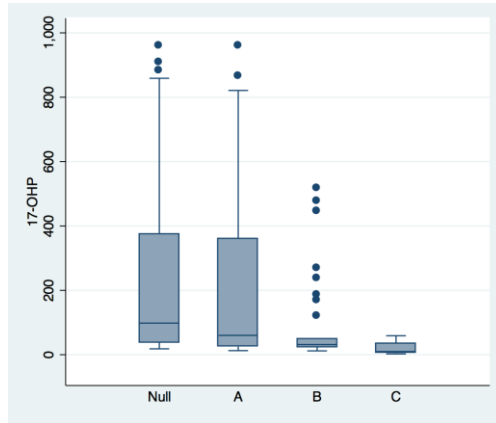
3.3.4. Correlation between genotype and severity of virilisation



Graph 3.4. rates (%) of virilisation severity according Prader grading in each genotype group.

Comments: Rate of severe Prader grading in severe genotype group was significantly higher in than that in milder genotype ($p = 0.0001$).

3.3.5. Correlation between genotype and serum 17-OHP levels



Graph 3.5. Serum 17-OHP levels of genotype group: x-axis is genotype, y-axis is serum 17-OHP levels (ng/ml).

Comments: Serum 17-OHP levels in patients with severe genotype (“null” and A group) were significantly higher in than that in milder genotype group (B and C group) ($p = 0.0001$).

Chapter 4: DISCUSSIONS

4.1. Mutation spectrum and mutation map of *CYP21A2* gene

In our comprehensive mutation analysis of a large cohort of patients with CAH due to 21-OHD enrolled at NCH, we identified mutations of *CYP21A2* in 99% of patients with 21-OHD. Our data showed major types of mutations in 202 probands. This is consistent with Human Gene Mutation Database - HGMD) (<http://www.hgmd.org>), updated in February.2016 finding 285 different mutations (229 reported mutations) of *CYP21A2* gene.

Spectrum mutations identified in our cohort included: i/ common mutation group: large gene deletions (34.48%); 13 different common mutations due to small conversion accounted 58.85%, most common point mutations were I2g (28.57%), p.R356W (12.31%), and p.I172N (10.59%); ii/ 7 rare reported mutations including p.R426C (1.72%); p.R483PfsX58 (1.23%); p.E246GfsX11 (0.74%); p.M1I (0.25%); p.W19X (0.25%); p.H62L (0.25%) and c.1447_1448insC (p.R483PfsX40) (0.25%); iii/ moreover, we identified 6 novel mutations in *CYP21A2* (2%) which have not been reported to date in HGMD, the Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee

and 1000 genome database. All large deletions and common point mutations from pseudogene origin accounted 93.33% and rare mutations from *CYP21A2* function gene accounted 6.67%. Similar to other populations, the most frequent mutations of *CYP21A2* gene in Vietnamese patients are large deletions and I2g (table 4.1). The finding of rare and novel mutations is consistent with well-known other studies.

Table 4.1. Frequency distributions of common mutations in different studies.

Common mutation	Del (%)	I2G (%)	I172N (%)	V281L (%)	R356W (%)	n	Authors
Vietnamese	34.5	28.6	10.6	0.7	12.3	202	This study
Chinese	19.6	35	14.3	0.2	5.9	230	Wang
Multiple race	20.0	22.9	8.2	23.9	3.6	1507	New
American	30.5	23.4	12.6	12.6	3.6	182	Finkelstein
Eastern Europe	30.6	31.2	14.5	3.4	2.4	432	Dolzan
Sweden	27.5	27.3	16.9	7.8	3.1	490	Gidlof
Dutch	31.9	28.1	12.4	2.2	8.4	198	Stikkelbroeck
German	27.4	30.3	19.7	2.9	4.5	155	Krone

Distribution of identified mutations were located in non-coding regions (3 mutations of promoter and 1 mutation in intron 2) and in 8/10 exons (figure 3.1). This is consistent with finding in 230 Chinese with 21-OH. In this study, Wang R et al have not been identified any mutation in exon 5 of *CYP21A2* gene.

4.2. Correlation between genotype-phenotype and applying

In this study, we have also characterized the correlation between genotype and phenotype in a largest cohort of CAH patients in Vietnam to date. First, we recognized that several specifically common genotype for each different phenotype as SW, SV and non-classic type. This is consistent with the finding of New MI et al (2013) in a large cohort and multiple races of CAH patients (606 cases with SW phenotype, 187 cases with SV phenotype).

Second, we found that certain mutations can cause different CAH phenotype. For example, althout in most cases in intron 2 (I2g/I2g) and p.R356W/p.R356W genotype are associated with the SW phenotype, some patients present with the SV form, in most cases in exon 4 (p.I172N) is associated with the SV phenotype, 2 patients present with the SW phenotype. This is consistent with the finding in other cohorts of Caucasian, Chinese, Korean and Latin American.

Genotype and phenotype correlation analysis showed high concordance in mutation groups “null”, “A”, “B” and C (99.8%; 96.5%;

90.6% and 100%, respectively). However, discordance still existed. Overall we can predict severity of phenotype according finding genotype. This finding is similar to that found in other ethnic groups (figure 4.2). The salt-waster frequency was higher in the Null group than in group A, which is also important for clinical decisions in asymptomatic patients during the neonatal period and in prenatal diagnosis and treatment. When the most frequent mutation I2g was present in the less severe allele (group A), carriers has an increased chance to develop the SW form. Its presence in some SV patients can be explained by alternative splicing, which leads to a minimal residual enzyme activity, thus avoiding salt loss.

Data available regarding genotype correlation with the degree of external genitalia virilisation reveal conflicting results. We observed severe genitalia virilisation more frequently in genotypes Null and A than in B; due to the wide overlap of this manifestation, genotype could not be used as a predictor. This is similar to that found in Brazilian patients (de Carvalho DF et al. 2016). Median basal 17-OHP levels were significantly different among genotypes Null, A, B, and C; however, a overlap among genotype groups has been observed. These finding are in accordance with other series that included a significant number of NC patients.

Table 4.2. Phenotype PPV of genotype in different studies

Genotype group	“null”	A	B	C
Phenotype	SW		SV	NC
This study. 2016	99.8%	96.5%	90.6%	100%
de Carvalho DF. 2016	88%	70%	98%	100%
Wang R et al. 2016	88.9%	89.4%	88.9%	
Balraj P et al 2013	95.7%	90.9%	66.7%	
Choi et al. 2012	100%	96.2%	94.1%	
Rabbani B et al. 2012	92.3%	85.7%	100%	
Marino R et al. 2011	100%	83.8%	87.2%	100%
Balsamo et al. 2010	100%	91.5%	83.7%	86.4%
Finkielstain et al. 2011	88.9%	91.5%	85.1%	97.8%
Speiser et al. 1992	96%	85%	73%	63%
Krone et al. 2000	100%	90%	74%	65%
Stikkelbroeck et al. 2003	97%	96%	53%	100%

CONCLUSIONS

1. Mutation analysis and description of mutation map of *CYP21A2* gene

Mutations of *CYP21A2* gene were identified 202/204 patients with 21-OHD (99%). We identified 8 large deletions, 13 common point mutations and 13 rare mutations including 6 novel ones in *CYP21A2* gene. Mutations were located in non-coding regions (promoter, intron 2) and 8/10 exon (except exon 2 and 5) of *CYP21A2* gene. Most common mutations were located in intron 2 (28.6%); exon 8 (15.5%) and exon 4 (10.6%). 55 different genotypes were identified. Most common genotypes were Ig2/I2g (15.4%); Del/Del (14.4%) and Del/I2g (10.9%).

2. Genotype-phenotype correlation

The ppv for four mutation groups were 99.8% for group null; 96.5% for group A; 90.6% for group B; and 100% for group C. Genotype I2g/I2g; p.I172N/p.I172N and p.R356W/p.R356W cause SW and SV phenotype. SW, SV and NC phenotypes have different common genotypes.

Severe genitalia virilisation more frequently in genotypes Null and A. Serum 17-OHP levels in patients with severe genotypes were higher than that in patients with milder genotypes.

RECOMMENDATIONS

1. Indication of mutation analysis of *CYP21A2* for patients with 21-OHD who were diagnosed early (salt wasting asymptomatic) by newborn screening or clinical, biochemistry tests;
2. Indication of mineralocorticoid replacement therapy early for patients who were know genotype as group “null” and A in family;

LIST OF PUBLICATIONS RELATED WITH THESIS

1. Registry of congenital adrenal hyperplasia in Vietnam. Hormone research in pediatrics. 2011; 76(suppl 2): 300.
2. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase and adrenocortical tumor. Journal of Vietnam Medicine. 2011; 383(2): 21-25.
3. Identification of mutations in *CYP21A2* and genotype – phenotype correlation of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Journal of Medical Research. 2012; 80(3): 1-8.
4. Adrenocortical tumor in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P51. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P51
5. Phenotype & genotype of congenital adrenal hyperplasia due to mutation in the type II 3β -hydroxysteroid dehydrogenase gene: a report of two Vietnamese families. International Journal of Pediatric Endocrinology 2015, 2015(Suppl 1):P50. doi:10.1186/1687-9856-2015-S1-P50.
6. Registry of congenital adrenal hyperplasia at the north pediatric referral center of Vietnam during 15 years. Annals of translational medicine. 2015; 3(S2): S48.
7. Detection of *CYP21A2* gene deletion in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Journal of Medical Research. 2016; 99(1): 8-15.