

# XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN GAA VÀ ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN CỦA BỆNH POMPE

Nguyễn Thị Phương Thảo<sup>1,✉</sup>, Vũ Chí Dũng<sup>2</sup>

Nguyễn Ngọc Khánh<sup>2</sup>, Lê Thị Phương<sup>3</sup>, Trần Văn Khánh<sup>3</sup>

Hoàng Thị Ngọc Lan<sup>3</sup>, Tạ Thành Văn<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

<sup>2</sup>Bệnh viện Nhi Trung ương

<sup>3</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

*Pompe là bệnh di truyền hiếm gặp thuộc nhóm các bệnh rối loạn dự trữ trong tiêu thể. Nguyên nhân của bệnh được xác định là do đột biến gen GAA, dẫn đến thiếu hụt enzyme alpha glucosidase A trong tiêu thể tế bào, từ đó gây ứ đọng glycogen trong tế bào. Cho đến nay đã có gần 700 đột biến gen GAA gây bệnh Pompe được báo cáo. Xác định đột biến gen GAA và phát hiện người lành mang gen có ý nghĩa rất lớn trong tư vấn di truyền, hạn chế sinh ra những đứa trẻ bị bệnh. Mục tiêu của nghiên cứu này là phát hiện đột biến gen GAA trên các đối tượng nguy cơ cao và phát hiện người lành mang gen trên các thành viên gia đình có bệnh nhân Pompe. Chúng tôi tiến hành đo hoạt độ enzyme GAA cho 14 bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng gợi ý Pompe, giải trình tự gen GAA cho các bệnh nhân có hoạt độ enzyme thấp và 02 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con Pompe tìm đột biến. Sau khi xác định đột biến gen sẽ tiến hành lấy mẫu của các thành viên trong gia đình và giải trình tự gen tại vị trí có đột biến gen để phát hiện người lành mang gen. Sau khi tiến hành nghiên cứu, chúng tôi phát hiện 10 đột biến gen GAA trong đó có 02 đột biến chưa được công bố, phát hiện 50/70 thành viên trong 08 gia đình có bệnh nhân Pompe là người lành mang gen bệnh.*

**Từ khóa:** Pompe, đột biến, alphaglucosidase A (GAA).

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Pompe là bệnh di truyền hiếm gặp thuộc nhóm các bệnh rối loạn dự trữ trong tiêu thể tế bào (Lysosomal storage diseases – LSDs). Nguyên nhân của bệnh được xác định là do đột biến gen GAA nằm trên nhiễm sắc thể 17, dẫn đến thiếu hụt  $\alpha$ Glucosidase A – enzyme có vai trò thủy phân glycogen trong tiêu thể tế bào, hậu quả là glycogen không được giáng hóa, ứ đọng trong tế bào, trong mô.<sup>1</sup>

Tỷ lệ mắc bệnh Pompe dao động từ 1/40.000 đến 1/300.000 trẻ sống, phụ thuộc vào chủng

tộc hoặc vùng địa lý được nghiên cứu.<sup>1,2</sup>

Theo cập nhật của HGMD đến tháng 4 năm 2021 đã có gần 700 đột biến gen GAA được ghi nhận là nguyên nhân gây bệnh Pompe các đột biến xuất hiện với tỷ lệ khác nhau ở các quốc gia khác nhau, và ngày càng có nhiều đột biến gây bệnh mới được báo cáo.<sup>3</sup>

Triệu chứng của bệnh Pompe rất khác nhau tùy vào thể bệnh, nhưng thường gặp nhất là các triệu chứng về cơ (như yếu cơ, bú kém), về tim (phì đại cơ tim, khó thở khi gắng sức) hoặc suy hô hấp... Nếu được chẩn đoán sớm thì việc điều trị có hiệu quả cao, kéo dài tuổi thọ và nâng cao chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân.<sup>4,5</sup>

Pompe là bệnh di truyền nên có thể chẩn đoán trước sinh, sàng lọc sơ sinh, việc phát

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Phương Thảo

Trường Đại học Y Dược Hải Phòng

Email: thaonguyen11685@gmail.com

Ngày nhận: 06/01/2023

Ngày được chấp nhận: 30/01/2023

hiện người lành mang gen để đưa ra tư vấn di truyền phù hợp có ý nghĩa lớn trong việc hạn chế sinh ra những đứa trẻ bị bệnh.

Ở Việt Nam có rất ít nghiên cứu về vấn đề này, dẫn đến chẩn đoán và điều trị muộn, dẫn đến hiệu quả điều trị không cao. Vì những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: *Xác định các đột biến gen GAA và phát hiện người lành mang gen bệnh trong các gia đình có bệnh nhân mắc bệnh Pompe tại Việt Nam.*

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Những bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng gợi ý đến bệnh Pompe hoặc có tiền sử sinh con mắc bệnh Pompe và các thành viên trong gia đình của họ.

### 2. Phương pháp

**Thiết kế nghiên cứu:** Mô tả chùm ca bệnh.

**Cỡ mẫu:** 14 bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng gợi ý của bệnh Pompe và 02 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc bệnh Pompe, và 70 thành viên trong gia đình của họ.

**Chỉ số nghiên cứu:** hoạt độ enzyme GAA, các đột biến gen GAA.

**Quy trình tiến hành nghiên cứu:** đo hoạt độ enzyme GAA trong máu cho 14 bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng gợi ý Pompe bằng phương pháp đo khối phổ song song UHPLC-MS/MS từ giọt máu khô trên giấy thấm. Với những bệnh nhân có hoạt độ enzyme GAA thấp, chúng tôi tiến hành phân tích gen GAA để tìm đột biến: tách chiết DNA từ máu toàn phần bằng kit của Qiagen (Đức), khuếch đại bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu được tham khảo theo nghiên cứu của L.T. Turaca và cộng sự năm 2015, giải trình tự gen trực tiếp sử dụng BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit do Applied Biosystem cung cấp.<sup>6</sup> Kết quả giải

trình tự được so sánh với trình tự tham chiếu NG\_009822.1 trên Genebank bằng phần mềm CLC Workbench 6.0 để phát hiện sự thay đổi trình tự gen của bệnh nhân. Các đột biến mới được dự đoán khả năng gây bệnh bằng các phần mềm tin sinh học: SIFT, PolyPhen-2 và MutationTaster. Khi phát hiện bệnh nhân có đột biến gen GAA, chúng tôi tiến hành lập phả hệ, lấy mẫu của 70 thành viên trong 08 gia đình để phân tích gen GAA tại vị trí đoạn gen mà bệnh nhân mang đột biến.

Mẫu của các bệnh nhi được thu thập tại Bệnh viện Nhi trung ương, với các thành viên trong gia đình, nhóm nghiên cứu đến thu thập mẫu tại gia đình, hoạt độ enzyme được đo tại Bệnh viện đa khoa Cựu chiến binh Đà Bắc, Đà Loan; xét nghiệm giải trình tự gen được tiến hành tại Trung tâm Gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức của Bệnh viện Nhi Trung ương (Số 2177/BVNTW-HĐĐĐ, ngày 22/9/2022), các đối tượng tự nguyện tham gia nghiên cứu.

## III. KẾT QUẢ

### 1. Đặc điểm chung của đối tượng tham gia nghiên cứu

Trong số 14 bệnh nhi có triệu chứng yếu cơ, bú kém tham gia sàng lọc bệnh Pompe, có tuổi khởi phát trung bình là  $5 \pm 4,2$  tháng, trong đó có 12 bệnh nhi dưới 6 tháng tuổi, chiếm 85,7%, bệnh nhân có triệu chứng khởi phát sớm nhất là khi 6 ngày tuổi. Tỷ lệ nam/nữ là 1:1.

### 2. Kết quả đo hoạt độ enzyme

Kết quả đo hoạt độ enzyme GAA của 14 bệnh nhi có triệu chứng lâm sàng gợi ý tham gia nghiên cứu nằm trong khoảng 0,01 - 6,8  $\mu\text{mol/h/L}$ , trung bình là  $0,91 \pm 1,26 \mu\text{mol/h/L}$ , tất

cả các bệnh nhân đều có hoạt độ enzyme thấp hơn giá trị tham chiếu ( $19,92 \pm 8,49 \mu\text{mol/h/L}$ ), trong đó có 5 bệnh nhân có hoạt độ enzyme còn lại nhỏ hơn 10% so với giá trị tham chiếu, chiếm 35,7%, cá biệt có trường hợp hoạt độ enzyme còn lại rất thấp, là  $0,01 \mu\text{mol/h/L}$ .

### 3. Kết quả giải trình tự gen

Chúng tôi tiến hành phân tích GAA cho 14 bệnh nhi có triệu chứng lâm sàng gợi ý và 02 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con Pompe. Kết quả giải trình tự gen GAA được thể hiện qua bảng 1:

**Bảng 1. Kết quả giải trình tự gen GAA của các bệnh nhân**

STT	Thay đổi nucleotid	Thay đổi acid amin	Vị trí	Loại đột biến	Tần suất
1	c.625T>C	p.Tyr209His	E3	Sai nghĩa	4
2	c736delT	p.Leu246fs	E4	Dịch khung	1
3	c. 1411_1414del	p.E471Pfs	E9	Dịch khung	1
4	c.2040+1G>T		Intron 14	Chỗ nối	3
5	c.1933G>C	p.Asp645His	E14	Sai nghĩa	7
6	c.1933G>A	p.Asp645Asn	E14	Sai nghĩa	1
7	c.1735G>A	p.Glu579Lys	E14	Sai nghĩa	1
8	c.2173C>T	p.Arg725Asn	E15	Sai nghĩa	1
9	c.2563 G>C	p.Gly855Arg	E18	Sai nghĩa	2
10	c.2818-2819delTinsCAG	p.Ser940fs	E20	Dịch khung	2

Chúng tôi thu được 10 đột biến, bao gồm 06 đột biến sai nghĩa, 03 đột biến dịch khung và 01 đột biến tại vị trí nối, phần lớn các đột biến đều đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó về Pompe, nhưng chúng tôi cũng ghi nhận 02 đột biến chưa từng được báo cáo trước đây

là đột biến c.625T>C, p.Tyr209His và c.2818-2819delTCinsCAG, p.Ser940fs.<sup>4,7-10</sup>

Khi dùng phần mềm tin sinh để dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến sai nghĩa c.625T>C, p. Tyr209His, chúng tôi thu được kết quả như sau:

**Bảng 2. Kết quả dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến c.625T>C, p. Tyr209His bằng các phần mềm tin sinh**

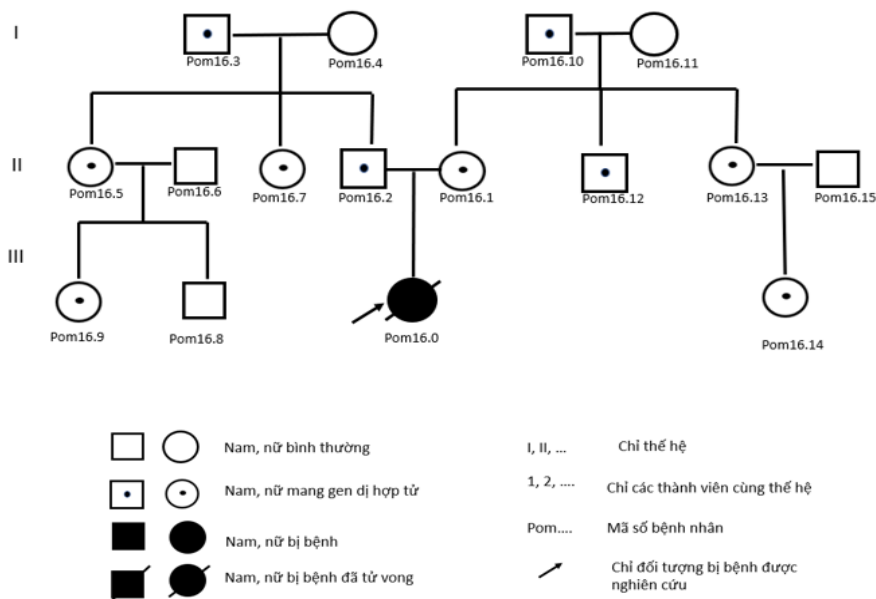
	SIFT	PolyPhen 2	Mutation Taster
<b>Điểm</b>	0,14	1,0	
<b>Dự đoán</b>	Khả năng gây bệnh ở mức độ thấp	Khả năng gây bệnh rất cao	Gây bệnh

Các phần mềm tin sinh đều dự đoán đột biến c.625T>C, p. Tyr209His có khả năng gây bệnh Pompe với các mức độ khác nhau.

### 4. Phát hiện người lành mang gen trên các thành viên gia đình bệnh nhân Pompe

Chúng tôi tiến hành giải trình tự gen cho 70

thành viên trong 08 gia đình có bệnh nhân Pompe, từ đó xác định người lành mang gen bệnh và lập phả hệ của các gia đình.



Hình 1. Phả hệ gia đình mã số Pom 16.0

Trong số 70 thành viên trong 08 gia đình có bệnh nhân Pompe, chúng tôi phát hiện 50 thành viên mang đột biến gen *GAA*, thể dị hợp tử, không có biểu hiện bệnh. Tỷ lệ mang đột biến ở thế hệ I là từ 50 - 100%, các đột biến đều có từ thế hệ I, di truyền cho thế hệ II, rồi từ thế hệ II di truyền cho thế hệ III. Có 5/8 gia đình có tất cả các thành viên trong thế hệ II mang gen bệnh. Không phát hiện đột biến *de-novo* nào trong nghiên cứu này.

#### IV. BÀN LUẬN

##### Về đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Về tuổi khởi phát của bệnh Pompe: có 12/14 bệnh nhân khởi phát trước 1 tuổi, như vậy phần lớn các bệnh nhân trong nghiên cứu này là Pompe thể khởi phát sớm (IOPD). Tuổi khởi phát trung bình là  $5 \pm 4,2$  tháng tuổi, tương tự như trong các nghiên cứu khác về IOPD như nghiên cứu của Marsden năm 2015.<sup>11</sup>

Về giới: tỷ lệ nam : nữ trong nghiên cứu của

chúng tôi là 1:1, phù hợp với quy luật di truyền gen lặn trên NST thường.

##### Về kết quả hoạt độ enzyme *GAA*

14 bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đều có hoạt độ enzyme *GAA* thấp hơn giá trị tham chiếu. Có tới 9/14 bệnh nhân có hoạt độ enzyme còn lại nhỏ hơn 3% so với giá trị tham chiếu. Tất cả các bệnh nhân này đều xuất hiện triệu chứng khởi phát trước 6 tháng tuổi. Điều này phù hợp với mô tả trong các nghiên cứu trước đây về Pompe: trong IOPD, hoạt độ enzyme còn lại nhỏ hơn 3% giá trị tham chiếu, còn trong LOPD hoạt độ enzyme còn lại trong khoảng 3-30% giá trị tham chiếu.

Kết quả hoạt độ enzyme của chúng tôi cao hơn trong nghiên cứu của Lukana và cộng sự năm 2019 ở Thái Lan<sup>9</sup>, có thể là do nghiên cứu của Lukana là trên các bệnh nhân IOPD, còn trong nghiên cứu của chúng tôi có cả bệnh nhân IOPD và LOPD nên làm cho hoạt độ enzyme trung bình cao hơn. Mặt khác, các đột biến *GAA* khác nhau cũng sẽ làm thay đổi hoạt

độ enzyme GAA với các mức độ khác nhau.

### Về kết quả phân tích gen GAA

Khi giải trình tự gen GAA cho 14 bệnh nhi, chúng tôi thu được 9 đột biến, 7 bệnh nhân ở thể đồng hợp tử và 7 bệnh nhân ở thể dị hợp tử kép. Trong đó, có 2 đột biến chưa từng được công bố trên cơ sở dữ liệu về Pompe, đó là đột biến sai nghĩa c.625T>C, p.Tyr209His và đột biến dịch khung c.2818-2819delTCinsCAG. Đột biến điểm c.625T>C nằm ở miền  $\beta$ sheet của enzyme, là miền chịu trách nhiệm phân giải peptid tín hiệu nên đột biến này có thể ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển tiền chất vào lysosome, do đó ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp enzyme. Nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 04 bệnh nhân có đột biến này, trong đó có 02 bệnh nhân có kiểu gen giống nhau nhưng hoạt độ enzyme và tuổi khởi phát khác nhau. Tương tự, khi dự đoán khả năng gây bệnh của đột biến này bằng các phần mềm tin sinh học cho kết quả khác nhau: phần mềm SIFT dự đoán khả năng gây bệnh thấp trong khi phần mềm PolyPhen-2 và MutationTaster dự đoán khả năng gây bệnh cao, do đó cần có thêm các nghiên cứu thực nghiệm để hiểu rõ hơn cơ chế gây giảm hoạt độ enzyme của đột biến này. Đột biến c.2818-2819delTCinsCAG làm xóa 2 nucleotide là T và C, đồng thời thêm 3 nucleotide (CAG), dẫn đến dịch khung từ vị trí p.940 và kéo dài mã kết thúc, dẫn đến tổng hợp protein dài hơn, do đó cũng không còn chức năng enzyme. Trong nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 03 bệnh nhân có đột biến này ở thể dị hợp tử kép, có biểu hiện lâm sàng khác nhau, cho thấy sự kết hợp các đột biến khác nhau sẽ dẫn đến ảnh hưởng khác nhau về hoạt độ enzyme và từ đó biểu hiện lâm sàng cũng khác nhau.

Đột biến c.1933 G>C; Asp645His là đột biến gặp với tần số cao nhất trong nghiên cứu của chúng tôi (7/14 bệnh nhân). Đột biến này đã được ghi nhận là đột biến gây bệnh ở cả thể

đồng hợp tử và dị hợp tử kép.<sup>9</sup> Ba bệnh nhân mang đột biến này thể dị hợp tử trong nghiên cứu này đều khởi phát sớm và có hoạt độ enzyme rất thấp. Các bệnh nhân mang đột biến này, dị hợp tử kép có biểu hiện lâm sàng rất khác nhau.

Theo các nghiên cứu trước đây, các đột biến GAA được báo cáo thường tập trung ở ba vùng quan trọng là: exon 2- nơi chứa mã mở đầu; exon 10 và 11 - nơi chứa vị trí xúc tác enzyme; và exon 14 - là vùng được bảo tồn cao.<sup>12</sup> Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện được các đột biến ở exon 3, exon 9, exon 14, exon 15, exon 20 và intron 14, trong đó exon 14 là các vùng có tỉ lệ đột biến cao. Chúng tôi không phát hiện được các đột biến ở exon 2, 10 và 11, có thể là do cỡ mẫu quá nhỏ, nên cần có các nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn để lập bản đồ đột biến gen GAA tại Việt Nam.

### Phát hiện người lành mang gen bệnh trên các thành viên gia đình bệnh nhân

Khi phân tích trình tự gen và lập phả hệ cho 08 gia đình chúng tôi nhận thấy các đột biến đều có từ thế hệ I (ông bà), truyền cho thế hệ II, rồi từ thế hệ II truyền cho thế hệ 3. Theo lý thuyết với các bệnh di truyền gen lặn trên NST thường, xác suất sinh ra người lành mang gen là 50% cho mỗi lần mang thai, tuy nhiên, trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rất nhiều gia đình tất cả các con sinh ra từ bố/mẹ bình thường và mẹ/bố mang gen đều mang gen bệnh. Do đó, ý nghĩa của việc phát hiện người lành mang gen để đưa ra tư vấn di truyền hợp lý là rất cần thiết. Chúng tôi đưa ra tư vấn di truyền cho các thành viên mang gen trong gia đình: nên xét nghiệm tiền hôn nhân, sàng lọc tiền làm tổ, chẩn đoán trước sinh và sàng lọc sơ sinh để hạn chế sinh ra những đứa trẻ bị bệnh.

### III. KẾT LUẬN

Pompe là bệnh di truyền gen lặn trên nhiễm

sắc thể thường, do đột biến gen GAA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phân tích trình tự gen 14 bệnh nhân có hoạt độ GAA thấp và 02 cặp vợ chồng có tiền sử sinh con mắc Pompe, xác định được 2 đột biến mới: c.625T>C (p.Tyr209His) và 2818-2819delTCinsCAG (p.Ser920fs), là các đột biến có khả năng gây bệnh khi dự đoán bằng các phần mềm tin sinh học. Chúng tôi cũng phát hiện 50/70 thành viên trong 08 gia đình có bệnh nhân Pompe là người lành mang gen từ đó đưa ra tư vấn di truyền cho các đối tượng mang gen bệnh.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. ACMG Work Group on Management of Pompe Disease: PSK, Robert D. Steiner, et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006;8(5):267–288. doi: 10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3.
2. Ausems MG VJ, Hermans MP, et al. Frequency of glycogen storage disease type II in The Netherlands: implications for diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet* 1999;7(6):713-716.
3. Cardiff IoMGi. The Human Gene Mutation Database. <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=GAA>.
4. Lara Kohler RPNR. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics*. 2018;15:928-942.
5. Lara Kohler RPaNR. Pompe disease in infants: Improving the prognosis by newborn screening and early treatment. *Pediatrics*. 2018;124(6). doi: 10.1542/peds.2008-3667.
6. LT Turaca DOSdF, SO Kyosen et al. Novel GAA mutations in patients with Pompe disease. *Gene*. 2015;561:124-132.
7. Arnold J J Reuser ATvdP, Yin-Hsiu Chien, et al. GAA variants and phenotypes among 1,079 patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Hum Mutat*. 2019;40(11). doi: 10.1002/humu.23878.
8. Lin C Y SJJ. Identification of a de novo point mutation resulting in infantile form of Pompe's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208(2):886-93. doi: 10.1006/bbrc.1995.1418.
9. Lukana Ngiwsara DW, et al. Clinical course, mutations and its functional characteristics of infantile-onset Pompe disease in Thailand. *BMC Medical article*. 2019;20:156.
10. Nallamilli BRR CS, Kesari A, Tanner A, et al. Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5(12):1574-1587. doi: 10.1002/acn3.649.
11. Marsden D. Infantile onset Pompe disease: A report of physician narratives from an epidemiologic study. *Genetics in Medicine*. 2005;7:147-150.
12. Yasuyuki Fukuhara NF, Narutoshi Yamazaki, et al. A molecular analysis of the GAA gene and clinical spectrum in 38 patients with Pompe disease in Japan. *Mol Genet Metab Rep*. 2019;14:3-9. doi: 10.1016/j.ymgmr.2017.10.009.

## Summary

# DETECTION OF GAA GENE MUTATIONS AND INHERITED TRAIT OF POMPE DISEASE

Pompe is a rare genetic disease that belongs to Lysosomal storage diseases. It began by mutation in the *GAA* gene, leading to a deficiency of the lysosomal alpha glucosidase A enzyme, thereby causing glycogen storage in the cells. To date, close to 700 *GAA* gene mutations have been reported. Detecting *GAA* gene mutation and carriers has great significance in genetic counseling. This study aims to detect *GAA* gene mutations and inherited traits of Pompe disease. We screen 14 patients by measuring *GAA* activity from DBS, then analyzed the gene sequence of 14 patients with low *GAA* activity and 02 parents who have children with Pompe disease to detect mutations. We detected 10 *GAA* gene mutations, including 02 mutations that have not been reported previously, and 50 carriers from 8 families with *GAA* gene mutation.

**Keywords:** Pompe disease, mutation, *GAA*.