

ĐỘT BIẾN GEN GIGYF2 Ở NGƯỜI BỆNH MẮC BỆNH PARKINSON

Nguyễn Thị Tư, Nguyễn Hoàng Việt, Phạm Lê Anh Tuấn, Trần Tín Nghĩa
Trần Huy Thịnh và Trần Văn Khánh✉

Trường Đại học Y Hà Nội

Gen *GIGYF2* (*GRB10 Interacting GYF Protein 2 – Protein GYF2 tương tác GRB10*) mã hóa ra protein cùng tên đóng vai trò quan trọng quá trình điều hòa tín hiệu của các thụ thể tyrosin kinase trên các tế bào thần kinh. Gen được xác định nằm trong vùng nhiễm sắc thể có nhiều ý nghĩa về mặt di truyền với bệnh Parkinson và các đột biến trên gen cũng liên quan trực tiếp tới thể bệnh Parkinson 11. Bởi vậy, việc xác định đột biến gen *GIGYF2* có ý nghĩa quan trọng trong việc xác định tình trạng bệnh cũng như cơ sở để các bác sỹ lâm sàng đưa ra tiên lượng bệnh và tư vấn di truyền. Nghiên cứu được thực hiện trên 50 bệnh nhân Parkinson với độ tuổi trung bình là $53,6 \pm 8,9$ tuổi, tỷ lệ nam/nữ bằng 1,63. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger, nghiên cứu đã phát hiện được 4/50 bệnh nhân mang đột biến trên gen *GIGYF2* (chiếm 8%), tất cả đều ở dạng dị hợp tử.

Từ khóa: Parkinson, đột biến gen, *GIGYF2*.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Parkinson (PD) là rối loạn thần kinh cơ phổ biến thứ hai trên thế giới chỉ sau bệnh Alzheimer's. Bệnh gây nên do sự thoái hóa của các tế bào thần kinh trong vùng chất đen, một khu vực nhỏ ở trung não. Giảm sắc tố chất đen (SNpc) do mất tế bào thần kinh dopaminergic là phát hiện bệnh lý phổ biến nhất của PD.¹ Sự thoái hóa của các tế bào thần kinh là kết quả cộng gộp của nhiều bất thường trong tế bào do sự nhạy cảm mang tính chất di truyền, những tác động xấu gây ra bởi môi trường xung quanh hoặc do đột biến gen.

Gần đây, với sự phát triển về y sinh học di truyền ở mức độ phân tử đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng có ít nhất 20 gen liên quan đến bệnh Parkinson, một trong số đó phải kể đến gen *GIGYF2*.¹ *GIGYF2* là viết tắt của protein GYF2 tương tác GRB10. Gen này đặc trưng

bởi số lượng lớn các đoạn lặp lại trinucleotide CAG, do vậy mã hóa ra protein chứa rất nhiều gốc glutamine. Protein *GIGYF2* tham gia vào quá trình điều hòa tín hiệu của thụ thể tyrosin kinase, điều khiển sự hoạt hóa ATP để kích hoạt các con đường tín hiệu. Gen *GIGYF2* nằm trên nhiễm sắc thể số 2 vị trí 2q 37.1 có 35 exon mã hóa 1299 acid amin, đột biến trên gen *GIGYF2* có đặc điểm di truyền trội trên nhiễm sắc thể thường.² Mặc dù trong hai thập kỷ qua đã có những tiến bộ đáng kể trong việc tìm hiểu cơ sở di truyền của bệnh PD, phần lớn bệnh PD là lẻ tẻ và nguyên nhân di truyền của nó phần lớn chưa biết rõ.³ Tại Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu về PD mới chỉ tập trung vào mức độ lâm sàng, các nghiên cứu về cấp độ gen và phân tử còn khá khiêm tốn. Chính vì vậy, tình hình đột biến gen *GIGYF2* trên bệnh nhân mắc PD ở Việt Nam chưa có báo cáo số liệu chính thức. Việc xác định các đột biến gen *GIGYF2* sẽ khám phá những tác động tiềm năng của di truyền học và chức năng của *GIGYF2* đối với nguyên nhân gây bệnh, đồng thời tạo tiền đề cho những nghiên cứu quan trọng phía sau như xây dựng sơ đồ

Tác giả liên hệ: Trần Văn Khánh

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 17/08/2023

Ngày được chấp nhận: 08/09/2023

phả hệ trong dòng họ có cùng quan hệ huyết thống với bệnh nhân và giúp các bác sĩ lâm sàng tư vấn trước hôn nhân, giúp ngăn ngừa và giảm tỷ lệ mắc bệnh, cải thiện chất lượng cuộc sống cho bệnh nhân. Còn phải kể đến, các đột biến trên *GIGYF2* có thể ảnh hưởng đến tiến triển của PD và giúp xác định ảnh hưởng đến chẩn đoán cũng như độ nhạy cảm với các phương pháp điều trị. Vì những lý do trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: *Xác định đột biến của gen GIGYF2 ở bệnh nhân Parkinson bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger.*

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn lựa chọn

50 bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc PD ở thể khởi phát sớm và thể khởi phát muộn tại Bệnh viện Lão khoa Trung ương theo tiêu chuẩn chuẩn của Ngân hàng Não Hội Parkinson Vương Quốc Anh, hồ sơ bệnh án cung cấp đầy đủ thông tin.

Tiêu chuẩn loại trừ

Bệnh nhân có bệnh tâm thần kèm theo, đang điều trị bằng thuốc an thần, suy giáp...

2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 09/2022 đến tháng 05/2023.

Địa điểm nghiên cứu

Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Một số quy trình thực hiện

- Thu thập mẫu:

+ Người thu thập bệnh nhân và lấy mẫu: Nhóm nghiên cứu.

+ Người thực hiện phân tích gen: Nhóm nghiên cứu.

+ Phương pháp lấy mẫu thuận tiện, 2mL máu tĩnh mạch của bệnh nhân mắc PD được thu thập vào ống chống đông EDTA.

- **Quy trình tách chiết DNA:** DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu toàn phần của bệnh nhân PD bằng kit The Wizard Genomic DNA purification Kit của hãng Promega (USE). Tất cả các mẫu sau tách chiết được tiến hành đo độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ Nanodrop 2000c. Mẫu đạt tiêu chuẩn $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8 - 2,0$ được sử dụng để phân tích gen.

- **Kỹ thuật PCR:** Sử dụng những cặp mồi đặc hiệu có trình tự được công bố trong nghiên cứu của Lautier và cộng sự (2008) để khuếch đại 35 exon của gen *GIGYF2*.⁴ Thành phần phản ứng PCR: tổng thể tích 10μl gồm 1μl DNA, 2μl Primer (F/R), 5μl Gotaq 2X, 2μl nước cất. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 95°C/5 phút, [95°C/ 30 giây, 58°C/ 30 giây, 72°C/ 30 giây] x 35 chu kỳ, 72°C/ 5 phút, giữ ở 15°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose 1,5%, 120V trong 30 phút.

- **Kỹ thuật giải trình tự gen trực tiếp (Sanger Sequencing):** Sản phẩm PCR được tinh sạch và được giải trình tự trên máy ABI-3500 tại trung tâm nghiên cứu Gen- Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

Xử lý số liệu

Kết quả đột biến được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench (Qiagen) và được so sánh với dữ liệu từ Gene Bank (Accession number MN_198578).

3. Đạo đức nghiên cứu

Đây là nghiên cứu mô tả cắt ngang mọi thông tin của cá nhân được mã hóa và giữ bảo mật an toàn. Thu thập số liệu được tiến hành một cách trung thực, chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu. Đã được hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội cấp chứng nhận chấp thuận đạo đức nghiên cứu y sinh học (số 665/GCN-HĐĐĐNCYSH-ĐYHN).

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi gồm 50 bệnh nhân được chẩn đoán mắc PD. Thông tin về đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm về tuổi và giới của nhóm đối tượng nghiên cứu

Nhóm tuổi	Nam		Nữ		Tổng số	
	Số lượng	Tỷ lệ	Số lượng	Tỷ lệ	Số lượng	Tỷ lệ
< 45 tuổi	06	12,0%	0	0,0%	06	12,0%
≥ 45 tuổi	25	50,0%	19	38,0%	44	88,0%
Tổng	31	62,0%	19	38,0%	50	100%

Tỷ lệ nam/ nữ = 1,63

Tỷ lệ bệnh nhân ở nhóm tuổi ≥ 45 tuổi cao hơn với tỷ lệ 88%, còn nhóm tuổi < 45 tuổi chiếm tỷ lệ 12%. Tuổi trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu là $53,6 \pm 8,9$. Tuổi nhỏ nhất là 33 tuổi, tuổi cao nhất ghi nhận là 73 tuổi. Nam dưới 45 tuổi chiếm 12%; trên 45 tuổi 50%. Nữ toàn bộ là trên 45 tuổi chiếm 38%. Những bệnh nhân phát bệnh sau 45 tuổi được coi là nhóm bệnh nhân khởi phát bệnh muộn theo hiệp hội PD Hoa Kỳ (APDA – American Parkinson Disease Association). Về giới tính, tỷ lệ nam/nữ có là 1,63.

2. Kết quả giải trình tự phát hiện đột biến GIGYF2 ở bệnh nhân Parkinson

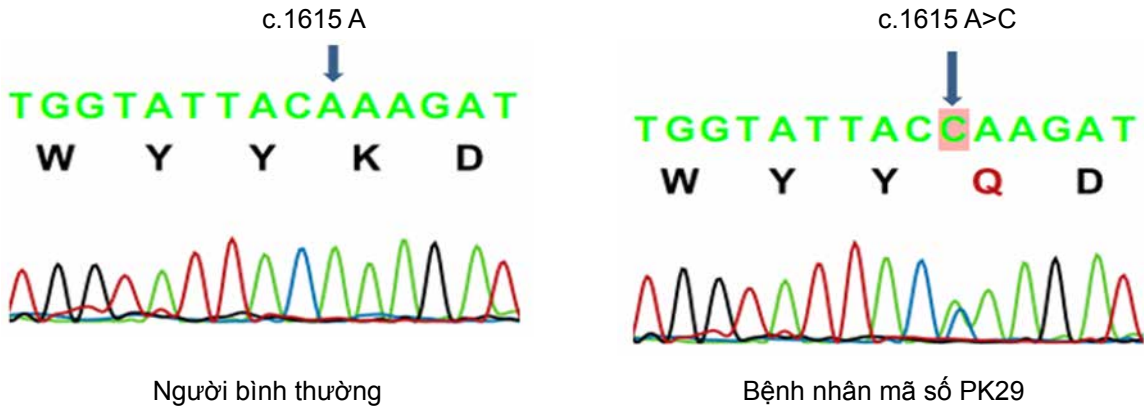
Cả 50 bệnh nhân nghiên cứu đã được xác định đột biến trên gen *GIGYF2* bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger. Kết quả thu được cho thấy có 4/50 bệnh nhân mang đột biến *GIGYF2* và tìm thấy 2 loại đột biến gen khác nhau trên 4 bệnh nhân mang đột biến. Thông tin các bệnh nhân mang đột biến được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm các đột biến được tìm thấy

STT	Mã số bệnh nhân	Giới	Tuổi	Đột biến thay thế	Thay đổi acid amin	Mô tả đột biến
1	PK48	Nữ	55	1615A>C	Lys539Gln	Dị hợp
2	PK29	Nữ	58	1615A>C	Lys539Gln	Dị hợp
3	PK28	Nam	49	3648_3649insAGCAGC	Gln1216_ Pro1217insSerSer	Dị hợp
4	PK23	Nam	61	3648_3649insAGCAGC	Gln1216_ Pro1217insSerSer	Dị hợp

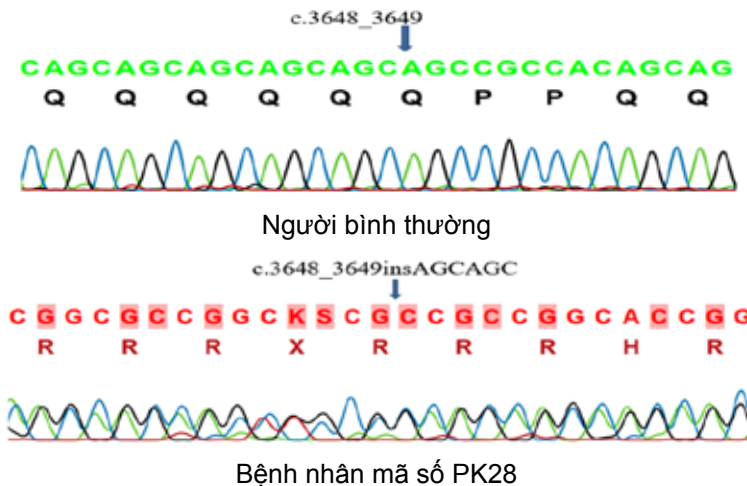
Nghiên cứu đã chỉ ra cả 4 bệnh nhân mang đột biến *GIGYF2* đều có kiểu gen dị hợp tử. Trong đó, 2 bệnh nhân mang đột biến thay đổi 1 acid

amin và 2 bệnh nhân mang đột biến chèn đoạn. Hình ảnh cụ thể kết quả giải trình tự gen của các bệnh nhân có đột biến được trình bày dưới đây.



Hình 1. Hình ảnh kết quả giải trình tự đột biến c.1615A>C ở bệnh nhân PK29 so với đối chứng

Kết quả giải trình tự cho thấy bệnh nhân PK29 tại vị trí 1615 trên gen *GIGYF2* tương ứng với nucleotid A ở người bình thường đã được thay thế bằng nucleotid C dẫn đến codon thứ 539 mã hóa acid amin Lysin thành Glutamine. Bệnh nhân PK48 mang đột biến tương tự.



Hình 2. Hình ảnh kết quả giải trình tự đột biến c.3648_3649insAGCAGC ở bệnh nhân PK28 so với đối chứng

Kết quả giải trình tự gen cho thấy bệnh nhân PK28 giữa vị trí 3648 và 3649 trên gen *GIGYF2* đã được chèn thêm 6 nucleotide AGCAGC, tương ứng mã hóa ra 2 acid amin Serine chèn trực tiếp vào khung dịch mã. Bệnh nhân PK23 mang đột biến tương tự.

IV. BÀN LUẬN

Bệnh Parkinson còn được gọi là bệnh của người già, là một rối loạn thoái hóa thần kinh

đặc trưng bởi sự suy giảm chức năng vận động. Lão hóa là yếu tố rủi ro lớn nhất dẫn đến phát triển PD, sau đó là tới các yếu tố môi trường. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây đã chứng minh được rằng các yếu tố di truyền đóng vai trò không nhỏ trong sự phát triển của bệnh. Nghiên cứu lựa chọn 50 bệnh nhân đã được chẩn đoán PD bởi các chuyên gia lâm sàng. Tuổi trung bình của nhóm nghiên cứu là $53,06 \pm 9,76$ tuổi, tuổi dao động từ 33 đến 73 tuổi, tương đồng với

ngiên cứu của tác giả Nhĩ Đình Sơn (2012) với độ tuổi trung bình là $56,69 \pm 10,54$.⁵ Chúng tôi nhận thấy đa phần bệnh nhân khởi phát muộn đều trên 45 tuổi, khá ít bệnh nhân khởi phát trước 45 tuổi. Những bệnh nhân phát bệnh sau 45 tuổi được coi là nhóm bệnh nhân khởi phát muộn theo hiệp hội PD Hoa Kỳ (APDA – American Parkinson Disease Association). Sự khác biệt này có thể do sự khác biệt về lối sống, thổ nhưỡng, tình trạng ô nhiễm môi trường và một số tác động ngoại cảnh khác.

Với tỷ lệ giới tính, nam cao gấp 1,63 lần so với nữ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Tamara Pringsheim (2014) là 1,56:1 ở nam Mỹ và 1.21:1 ở Châu Âu, Bắc Mỹ, Úc và Châu Á.⁶ Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Roohani và cộng sự (năm 2011) báo cáo tỷ lệ 2:1 trong số 1656 bệnh nhân Iran.⁷ Sự khác biệt giữa các nghiên cứu có thể do cỡ mẫu của từng nghiên cứu và đối tượng nghiên cứu khác nhau.

Gen *GIGYF2* có khả năng tham gia vào cơ chế bệnh sinh của PD do tác dụng của IGF (Insulin-like Growth Factor – Yếu tố tăng trưởng giống Insulin) trong việc truyền tín hiệu insulin ở hệ thống thần kinh trung ương. IGF ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ thống thần kinh bằng cách ngăn chặn quá trình chết theo chương trình của tế bào thần kinh và các tế bào có nguồn gốc từ não.⁸ Bởi khả năng hoạt động điều hòa insulin để sử dụng năng lượng trong các tế bào, IGF và IR (Insulin receptor - thụ thể insulin) cũng được chứng minh có tác dụng quan trọng trong hệ thống thần kinh trung ương và khả năng cao liên quan đến PD.⁹ Mà các protein Grb10 – protein tương tác với *GIGYF2* – lại là đối tác liên kết của một số thụ thể tyrosine-kinase xuyên màng, bao gồm cả IGF-1 và IR (Insulin receptor - thụ thể insulin).⁸

Nghiên cứu xác định được 4 bệnh nhân có đột biến trên gen *GIGYF2* trong tổng số 50 bệnh nhân PD (chiếm tỷ lệ 8%). Tất cả các đột

biến đều là đột biến dị hợp tử. Điều này tương đồng với nghiên cứu của Lei Wang và cộng sự (2010).¹⁰ Cả 2 dạng đột biến xác định được đều chưa được ghi nhận trên ngân hàng dữ liệu Clinvar. Cụ thể, đột biến c1615A>C (Lys539Gln) ở bệnh nhân PK29 và PK48 có 02 đỉnh trùng lặp tương ứng với 2 nucleotid A và C chứng tỏ bệnh nhân mang đột biến A > C tại vị trí c.1615 dạng dị hợp tử, làm biến đổi bộ ba AAA mã hóa acid amin Lysin ở vị trí codon 539 thành bộ ba CAA mã hóa acid amin Glutamin gây biến đổi acid amin từ Lysin thành Glutamin. Đặc điểm của Lysin có chuỗi nhóm acid amin tích điện dương, có tính phản ứng cao và tham gia vào các phản ứng tại trung tâm hoạt động của các enzyme, khi được thay thế bằng Glutamin một acid amin phân cực trung tính do đó làm ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein. Cuối cùng là đột biến thêm 2 codon vào exon 29 ở 2 bệnh nhân PK23 và PK28, kết quả giải trình tự gen cho thấy có sự chèn 2 acid amin Serine, dẫn tới thay đổi vị trí của các acid amin kế tiếp. Vì số lượng nucleotide được chèn vào là bội của 3 nên đột biến được xếp vào dạng in-frame, không gây ảnh hưởng tới khung dịch mã và có thể được sửa chữa ngay khi exon kết thúc. Tuy nhiên, việc chèn hai acid amin mới và thay đổi vị trí các acid amin phía sau chắc chắn sẽ làm thay đổi cấu trúc không gian của protein, mặc dù mức độ ảnh hưởng chưa thể được đánh giá chính xác trong nghiên cứu này. Cả 4 bệnh nhân có đột biến gen đều thuộc nhóm khởi phát muộn. Đây là báo cáo đầu tiên về đột biến gen *GIGYF2* được xác định ở bệnh nhân PD Việt Nam. Các yếu tố về môi trường sống cũng có thể góp phần vào sự biến đổi kiểu gen và kiểu hình của những bệnh nhân PD. Vì vậy, chúng tôi cần có những nghiên cứu sâu hơn, cỡ mẫu lớn hơn để có thể chứng minh được hết ý nghĩa của các đột biến này và tìm hiểu thêm những đột biến mới trong quần thể người Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger, nghiên cứu đã phát hiện ra được 4/50 bệnh nhân (tỷ lệ 8%) mang đột biến *GIGYF2* với 2 dạng đột biến khác nhau: một thay thế acid amin, và một đột biến chèn đoạn, với kiểu gen đều ở dạng dị hợp tử. Nghiên cứu phát hiện được cả 2 dạng đột biến đều chưa được ghi nhận trên ngân hàng dữ liệu Clinvar và các đột biến còn chưa rõ khả năng gây bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Bộ Y tế “Nghiên cứu xác định đột biến gen liên quan đến bệnh PD ở Việt Nam” số quyết định phê duyệt 5886 QĐ-BYT, thực hiện từ 6/2020 - 6/2022. Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn Bệnh viện Lão khoa Trung ương đã cung cấp mẫu nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Juárez Olgún H, Calderón Guzmán D, Hernández García E, Barragán Mejía G. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016; 2016: 9730467. doi:10.1155/2016/9730467.
2. Gene- NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/GIGYF2> GRB10 interacting GYF protein 2 [Homo sapiens (human).
3. J Hum Genet (2015). *GIGYF2* mutation in late-onset Parkinson's disease with cognitive

impairment, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624020/#SMtitle>, truy cập ngày 02/07/2015. Mutations in the *GIGYF2* (TNRC15) Gene at the PARK11 Locus in Familial Parkinson Disease.

4. Nhữ Đình Sơn. Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng và một số yếu tố nguy cơ của bệnh PD. *Tạp chí Y dược học quân sự* 2004; (2).

5. Roohani M, Ali Shahidi G, Miri S. Demographic study of PD's disease.

6. Roohani M, Ali Shahidi G, Miri S. Demographic study of PD's disease in Iran: Data on 1656 cases. *Iran J Neurol*. 2011; 10(1-2):19-21.

7. Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA and Smith RJ: Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *J Biol Chem* 278: 31564-31573, 2003.

8. Offen, D., Shtatif, B., Hadad, D., Weizman, A., Melamed, E., and Gil-Ad, I. (2001). Protective effect of insulin-like-growthfactor-1 against dopamine-induced neurotoxicity in human and rodent neuronal cultures: possible implications for Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*. 316, 129–132

9. Lei Wang et al. Novel *GIGYF2* gene variants in patients with PD's disease in Chinese population. *Neurosci Lett*. 2010 Apr 5;473(2):131-135.

Summary

DETERMINATION OF THE GIGYF2 MUTATION IN PARKINSON PATIENTS

GIGYF2 (GRB10 Interacting GYF Protein 2) gene encodes a protein deeply involved in the regulation of tyrosine kinase receptor signaling. This gene is located in a chromosomal region that was genetically linked to Parkinson, mutations in the gene are directly related to Parkinson disease type 11. Thus, the identification of GIGYF2 gene mutations is important in determining the disease status as well as the basis for clinicians to make prognosis and genetic counseling. This study was conducted on 50 Parkinson's patients with an average age of 53.6 ± 8.9 years old, male/female ratio of 1.63. Using Sanger sequencing, the study detected 4/50 patients carrying mutations in the GIGYF2 gene (accounting for 8%), mutations are heterozygous.

Keywords: Parkinson's disease, mutation, GIGYF2.