

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ ĐA HÌNH ĐƠN VÀ ĐỘT BIẾN TRÊN EXON 4 CỦA GEN ALPHA-SYNUCLEIN Ở BỆNH NHÂN PARKINSON

Trần Thị Thu Hà¹, Nguyễn Duy Bắc²,
Lê Văn Sơn², Trần Hải Anh²

¹Đại học Quốc gia Hà Nội, ²Học viện Quân y

Parkinson là bệnh thoái hoá thần kinh gây rối loạn vận động, ảnh hưởng tới chất lượng cuộc sống. Nguyên nhân gây bệnh phức tạp, bao gồm nhiều yếu tố, trong đó phải kể đến hai yếu tố quan trọng là môi trường và di truyền. Nghiên cứu phát hiện ra các gen gây bệnh nhằm hiểu rõ hơn về cơ chế phân tử bệnh Parkinson là một trong những thách thức với khoa học. Cho tới nay, có 13 locus gen được tìm thấy với phương thức gây bệnh khác nhau, hình thành dạng bệnh Parkinson khởi phát sớm, khởi phát muộn và Parkinson gia đình. Chúng tôi lựa chọn exon 4 của gen alpha-synuclein để nghiên cứu nhằm mục đích xác định các đa hình và đột biến trên bệnh nhân Parkinson người Việt Nam. Chúng tôi tìm thấy một đột biến mới thay thế nucleotid (C → G) ở bệnh nhân, 1 đa hình dị hợp tử C/G và 1 đột biến dịch khung ở nhóm chúng. Kết quả của nghiên cứu góp phần vào kho dữ liệu về đột biến và đa hình trong bệnh Parkinson.

Từ khóa: Bệnh Parkinson, gen alpha-synuclein, đột biến và đa hình

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Parkinson (Parkinson's disease, PD) là một bệnh thoái hoá thần kinh và gây rối loạn vận động, có thể dẫn đến liệt nếu không được chẩn đoán, điều trị kịp thời. Các triệu chứng của bệnh bao gồm: run tay, chân khi nghỉ ngơi, cứng cơ và vận động chậm chạp [1], [2], [9]. Bệnh xảy ra ở hai giới nhưng tỉ lệ mắc bệnh ở nam thường cao hơn ở nữ [9]. Nhiều triệu chứng trên thế giới bị mắc căn bệnh này [7]. Bệnh Parkinson phát sinh do nhiều nguyên nhân, nhưng bản chất vẫn là sự thoái hoá liềm đen vùng trung não dẫn tới suy giảm hàm lượng dopamin (một chất dẫn truyền thần kinh thuộc nhóm catecholamin) [9]. Các tác nhân môi trường như phơi nhiễm chất trừ sâu diệt cỏ (MTPT, paraquat, rotenone...),

cùng với nhân tố di truyền là những nguyên nhân chính gây nên PD [3], [9], [10]. Cho tới nay, 13 locus gen được phát hiện có liên quan tới bệnh Parkinson như PARK1 (alpha – synuclein), PARK2 (*parkin*), cho tới PARK13 [3], [4], [10]. Trong số đó, gen alpha – synuclein nằm trên nhiễm sắc thể số 4 (4q21 – q23) là một trong những gen có tần suất xảy ra đột biến tương đối cao trong bệnh Parkinson và được nghiên cứu nhiều.

Gen alpha-synuclein thuộc họ gen synuclein bao gồm alpha-, beta- và gamma-synuclein [4], [5], [6]. Có 3 đột biến ở vùng mã hoá thuộc gen alpha-synuclein (SCNA) là A30P, E46K và A53T [3], [6], [8], nhưng chưa có nghiên cứu nào công bố về

đa hình tìm thấy ở vùng mã hoá của gen này.

Ở Việt Nam, do điều kiện kinh tế còn khó khăn nên khi bệnh thường tiến triển ở mức độ nhất định, các triệu chứng biểu hiện rõ ràng thì người bệnh mới đi khám. Vì vậy, hầu hết các bệnh nhân đều thuộc dạng Parkinson rải rác, khởi phát muộn. Thêm vào đó, các nghiên cứu tại Việt Nam từ trước tới nay thường quan tâm về mặt dịch tễ học, các đặc điểm lâm sàng và kĩ thuật chẩn đoán [1], [2]. Nghiên cứu phân tử bệnh Parkinson còn ở mức độ khiêm tốn. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài với mục tiêu nhân đoạn exon 4 gen SCNA, và xác định đa hình và đột biến trên exon này.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chất liệu nghiên cứu

Mẫu máu toàn phần của 15 bệnh nhân Parkinson (được chẩn đoán chắc chắn) và của 15 người khoẻ mạnh cùng độ tuổi được viện Lão Khoa Quốc Gia cung cấp. Các mẫu máu được chống đông bằng heparin và bảo quản ở -20°C cho tới khi sử dụng.

2.2. Tách chiết ADN tổng số

E4 SCNA F (5'- 3')	gct aat cag caa ttt aag gct ag
E4 SCNA R (5' – 3')	gat atg ttc tta gat gct ag

Phần ứng PCR được tối ưu hoá các thành phần và chu trình nhiệt nhằm thu được băng đặc hiệu (bảng 1). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, sau đó nhuộm ethidium bromide và chụp dưới tia cực tím để quan sát băng ADN đặc

Sử dụng bộ Kit của hãng QIAGEN (QIAGEN, Đức), chúng tôi thực hiện quy trình tách chiết ADN tổng số từ máu toàn phần. 20 μl proteinK được lấy vào ống effendort rồi thêm 200 μl máu và bổ sung 200 μl đệm AL. Tiếp đó đồng nhất hóa hỗn hợp trên. Ủ hỗn hợp trên ở 56°C trong 10 phút rồi tiến hành ly tâm ngắn. Thêm 200 μl cồn ethanol 100%, lắc trộn 15 giây để đồng nhất dung dịch. Bước tiếp theo, lấy toàn bộ hỗn hợp trên cho vào cột QIAmp Spin Column, đóng nắp chặt và ly tâm 8000 vòng/1 phút. Cột được rửa hai lần bằng dung dịch AW1 và AW2 kết hợp ly tâm 14.000 vòng/phút trong 3 phút. Cuối cùng, cột được chuyển sang ống effendort mới. Thêm 200 μl nước tinh sạch rồi ly tâm 8000 vòng /1 phút để thu ADN genome. Mẫu được bảo quản -20°C cho đến khi sử dụng.

2.3. Nhân exon 4 bằng kĩ thuật PCR, điện di và giải trình tự

Chúng tôi thiết kế cặp mồi nhân exon 4 gen SCNA có trình tự như sau:

hiệu. Khi thu được băng mong muốn, chúng tôi sử dụng bộ Kit của hãng Accuprep để tinh sạch, rồi đưa sản phẩm PCR vào máy đọc trình tự tự động ABI 3130xl. Sử dụng phần mềm "Data collection" xử lý kết quả. Trình tự các mẫu

được đối chiếu với của ngân hàng gen và so sánh với trình tự chuẩn exon 4 đã được công bố.

ADN tổng số thu được từ các mẫu được đo mật độ quang và đánh giá ở bước sóng A260/280.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

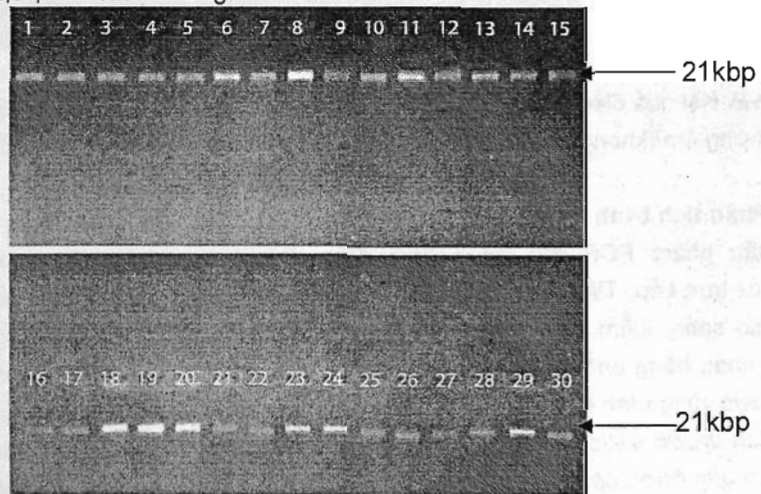
3.1. Tách chiết và tinh sạch ADN tổng số

Bảng 1. Thành phần và điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR nhân exon 4 gen SCNA

Thành phần phản ứng	Thể tích (μ l)	Điều kiện
ADN genome	4,0	Biến tính: 94°C trong 45 giây Gắn mồi: 56°C trong 45 giây Tổng hợp: 72°C trong 45 giây Chu trình trên được lặp lại 30 lần
Mồi xuôi E4 SCNAF(10 μ M)	0,5	
Mồi ngược E4 SCNAR(10 μ M)	0,5	
dNTP mix (25 mM mỗi loại)	0,4	
MgCl ₂ (25 mM)	2,0	
Buffer 10X	2,5	
Taq polymerase (5 u/ μ l)	0,2	
H ₂ O	14,9	

Kết quả cho thấy khả năng hấp phụ ở bước sóng trên của mẫu ADN của nhóm bệnh và nhóm chứng là tương đương (nhóm bệnh: $1,83 \pm 0,03$;

$1,82 \pm 0,02$, $p > 0,05$). ADN tinh sạch được hòa tan trong TBE, sau đó cho điện di trên gel agarose 1% (hình 1).

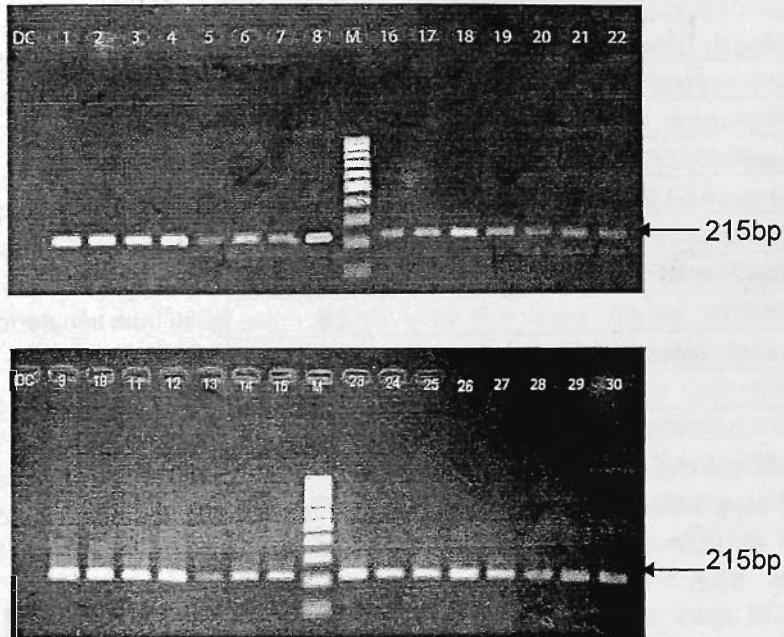


Hình 1. Kết quả điện di ADN tổng số trên gel agarose 1%. Mẫu 1 – 15: nhóm bệnh; mẫu 16 – 30: nhóm chứng.

3.2. Khuếch đại exon 4 bằng kĩ thuật PCR

Chúng tôi sử dụng phản ứng PCR nhằm khuếch đại đặc hiệu exon 4 với kích thước sản phẩm PCR mong muốn là

215bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân exon trên gel agarose 1% được trình bày trên hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân exon 4 gen SCNA trên gel agarose 1%. DC: chứng âm (không có ADN); mẫu 1 – 15: nhóm bệnh Parkinson; mẫu 16 – 30: nhóm chứng; M: thang độ 100 bp

3.3. Phân tích trình tự exon 4

Sản phẩm PCR thu được đem đọc trình tự trực tiếp. Tiếp theo, chúng tôi thực hiện so sánh, kiểm tra và xử lý các vùng trùng nhau bằng phần mềm SeqScape, để thu được vùng trình tự exon 4 trên các mẫu với kích thước 42bp. So sánh với trình tự exon chuẩn được công bố trong ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi thấy xuất hiện 1 đột biến thay thế nucleotid C → G (ở nhóm bệnh Parkinson), 1 đa hình dị hợp tử C/G

làm thay thế acid amin Val bằng Asp. Ngoài ra, chúng tôi còn tìm thấy một đột biến dịch khung khi xuất hiện thêm nucleotid G ở mẫu chứng (hình 3).

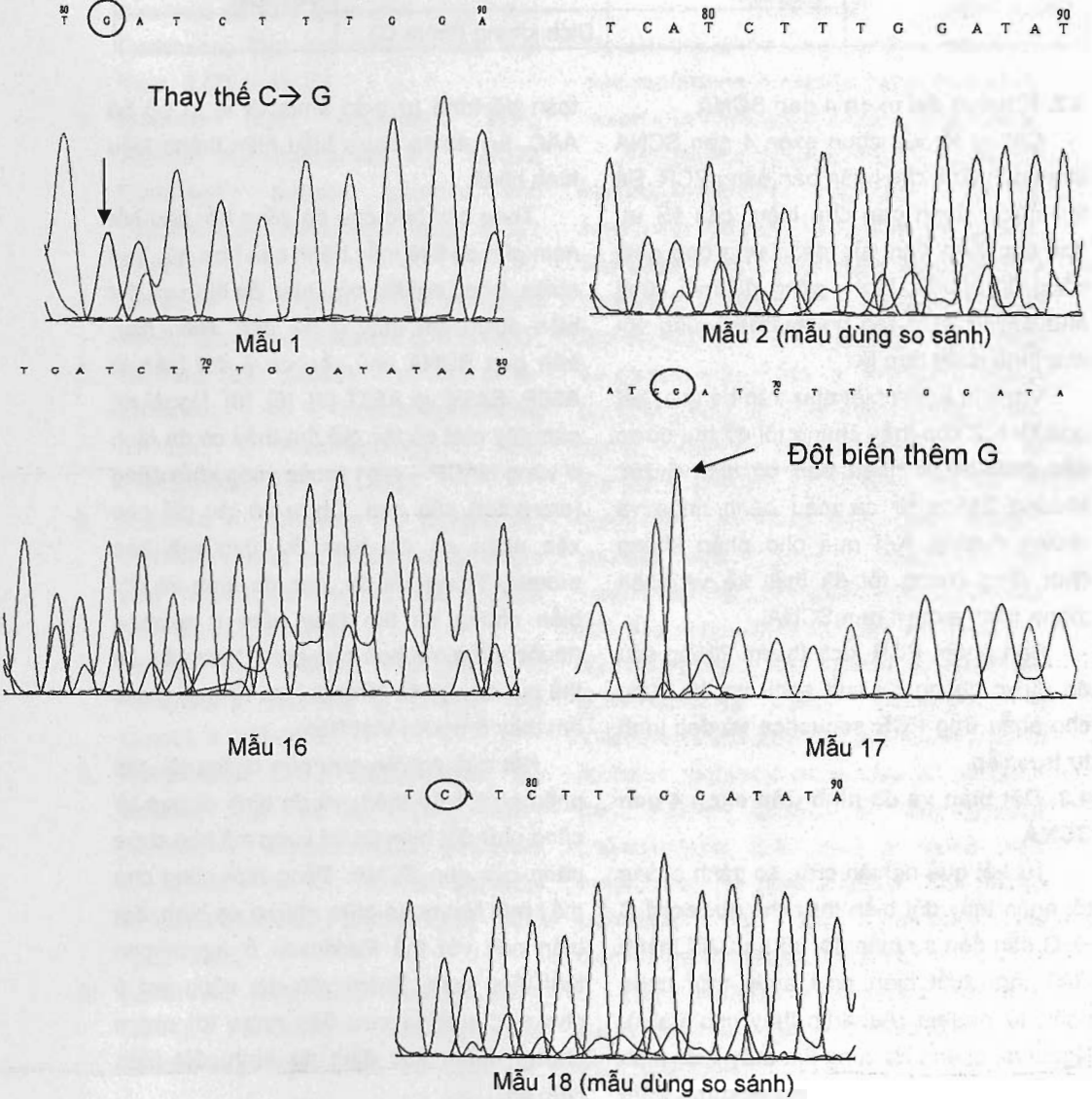
Những thay đổi này được tìm thấy ở các mẫu từ nữ giới cao tuổi, không có tiền sử gia đình mắc bệnh Parkinson. Các kết quả về đa hình và đột biến tìm thấy trên được trình bày tổng hợp ở bảng 2.

4. BÀN LUẬN VÀ KẾT LUẬN

4.1. Tách chiết và tinh sạch ADN tổng số

Nguyên liệu đầu tiên, cần thiết cho phản ứng PCR chính là ADN tổng số đủ nồng độ, độ tinh sạch và không bị phân huỷ bởi nuclease. Kết quả điện di ADN tổng số cho thấy cho thấy các băng ADN sáng, sắc

nét và không có vệt kéo dài ở dưới. Điều đó khẳng định, ADN của chúng tôi tách chiết ổn định và đủ tiêu chuẩn thực hiện thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Kết quả giải trình tự các mẫu

Bảng 2. Tổng hợp các đa hình và đột biến trên exon 4 gen SCNA trong nghiên cứu này

Nhóm	Đa hình	Đột biến	Thay đổi protein
Nhóm bệnh	0	CAT → GAT	Val → Asp
Nhóm chứng	CAT/GAT		Val/ Asp
		Dịch khung (thêm G)	

4.2. Khuếch đại exon 4 gen SCNA

Chúng tôi lựa chọn exon 4 gen SCNA làm đoạn đích cho nhân bản bằng PCR. Để thu được đoạn gen đặc hiệu, cần tối ưu hoá các điều kiện của phản ứng bao gồm nồng độ khuôn, Mg^{2+} , nồng độ muối cũng như lượng ADN taq polymerase cùng với chu trình nhiệt hợp lý.

Với chu trình nhiệt như trên bảng 1, kết quả hình 2 cho thấy chúng tôi đã thu được các đoạn ADN nhân bản có kích thước khoảng 215bp từ cả mẫu bệnh nhân và chứng dương. Kết quả cho phép khẳng định rằng chúng tôi đã thiết kế và nhân thành công exon 4 gen SCNA.

Sản phẩm PCR kích thước 215bp sau đó được chúng tôi tinh sạch và sử dụng cho phản ứng PCR sequence và đọc trình tự trực tiếp.

4.3. Đột biến và đa hình trên exon 4 gen SCNA

Từ kết quả nghiên cứu, so sánh chúng tôi nhận thấy đột biến thay thế nucleotid C → G dẫn đến sự biến đổi bộ ba CAT thành GAT làm xuất hiện acid amin mới trong phân tử protein (Aspartic thay cho Valin). Ngoài ra, chúng tôi cũng tìm thấy 1 đa hình dị hợp tử G/C ở nhóm chứng dương chiếm tỉ lệ 6,67 % và một đột biến dịch khung đọc do thêm G. Loại đột biến này làm thay đổi

toàn bộ trình tự acid amin từ vị trí bộ ba AAC, tuy nhiên chưa biểu hiện thành kiểu hình bệnh.

Theo các báo cáo đã công bố, hầu hết nam giới có tỉ lệ mắc bệnh cao hơn nữ. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, đa hình và đột biến được tìm thấy ở nữ giới. Hiện nay, trên gen SCNA chủ yếu có 3 đột biến là A30P, E46K và A53T [3], [6], [8]. Ngoài ra, gần đây một số tác giả tìm thấy có đa hình ở vùng NACP – rep1 thuộc vùng khởi động (promoter) của gen. Chưa có tác giả nào xác nhận có đa hình ở vùng mã hoá protein. Trong khi đó, các đa hình và đột biến chúng tôi tìm thấy nằm ở exon 4 (thuộc vùng mã hoá của gen). Như vậy, có thể nói đây là đa hình dị hợp tử mới được tìm thấy ở người Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi góp phần phát hiện thêm về đa hình dị hợp tử cũng như đột biến thuộc vùng mã hoá chức năng của gen SCNA. Đồng thời cũng cho thấy mối liên quan giữa những đa hình, đột biến này với thể Parkinson ở người cao tuổi Việt Nam. Thêm vào đó, cũng gợi ý cho việc nghiên cứu liên quan tới nhóm chứng nhằm xác định đa hình, đột biến tiềm ẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Chương, (2005), Thực hành lâm sàng thần kinh học, NXB Y học, số 3, tr 137–160.
2. Trần Nguyên Hồng, (2005), Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng bệnh Parkinson, Tạp chí Sinh lý học Việt Nam, 9 (2), tr 49–53.
3. Inamdar N.N., Arulmozhi D.K., Tandon A., Bodhankar S.L. (2007), Parkinson's disease: genetics and beyond, Curr Neuropharmacol, 5 (2): 99–113.
4. Lavedan C. (1998), The synuclein family, Genome Research, 8: 871–880.
5. Bennett M.C. (2005), The role of α -synuclein in neurodegenerative disease, Pharmacology and Therapeutics, 105: 311–331.
6. Recchia A., Debetto P., Nergro A., Guidolin D. et al. (2004), α -synuclein and Parkinson's disease, The FASEB Journal, 18: 617–626.
7. Rocca W.A. (2005), Prevalence of Parkinson's disease in China, The Lancet, 4: 328–329.
8. Rospigliosi C.C., McCelendon S., Schmid A.W. et al. (2009), E46K parkinson's - linked mutation enhances C - terminal- to - N - Terminal contacts in alpha-synuclein, J Mol Biol, 388: 1022–1032.
9. Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R. (2004), Parkinson's disease, The Lancet, 363: 1783–1793.
10. Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Wood N.W. (2006), Understanding the molecular causes of Parkinson's disease, Trends Mol Med, 12(11): 521–528.

SUMMARY

Determine some single polymorphisms and mutations on alpha-synuclein gene exon 4 in Parkinson's disease patients

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder causing movement disorder, affecting life quality. The cause of PD is complex that include a number of factors, in which two important factors, environment and genetics, should be mentioned. Study to find out disease-causing genes to understand more clearly about molecular mechanisms in PD is among challenges of science. So far, 13 gene loci have been found with different disease causing patterns, which form the early-onset PD, late-onset PD, and familial PD. We opted to investigate on exon 4 of alpha-synuclein gene in order to determine polymorphisms and mutations in Vietnamese PD patients. We found a novel mutation replacing nucleotide (C → G) in the patient group, a heterozygous polymorphism C/G and a frame shift mutation in the control group. The results contribute to the database of mutations/polymorphisms in PD.

Key words: Parkinson's disease, alpha-synuclein gene, mutations and polymorphisms