

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN c.199-10T>G TRÊN GEN *SLC25A20* Ở BỆNH NHÂN BỊ RỐI LOẠN CHUYỂN HÓA ACID BÉO Ở VIỆT NAM

Nguyễn Huy Hoàng^{1,2,✉}, Dương Chí Thành¹, Vũ Chí Dũng³

¹Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bệnh viện Nhi Trung ương

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nhhoang@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.7.2019

Ngày nhận đăng: 31.12.2019

TÓM TẮT

Rối loạn chuyển hóa acid béo (Fatty acid oxidation disorders -FAODs) là một tập hợp các bệnh hiếm gặp ảnh hưởng đến việc sản xuất năng lượng của ty thể do quá trình oxy hóa của acid béo (β -oxidation) bị gián đoạn, khiến cho cơ thể người bệnh bị thiếu hụt năng lượng và nhiễm độc. Đột biến xảy ra ở các gen khác nhau trong quá trình chuyển hóa acid béo ở ty thể có thể dẫn đến các dạng rối loạn chuyển hóa acid béo khác nhau. Mục tiêu của nghiên cứu này là sàng lọc và xác định đột biến liên quan đến rối loạn chuyển hóa acid béo trên bệnh nhân Việt Nam thông qua phương pháp giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa. Kết quả đã phát hiện một đột biến gây bệnh đã biết c.199-10T>G dạng đồng hợp tử ở vùng intron 2 của gen *SLC25A20*. Đột biến trên gen *SLC25A20* thường dẫn đến thiếu hụt enzyme điều hòa vận chuyển acylcarnitine và carnitine (CACTD) – một dạng hiếm gặp của FAODs. Phân tích “*in silico*” đã dự đoán sự thay đổi từ T sang G gây ra bởi đột biến c.199-10T>G có ảnh hưởng đến vị trí cắt gắn tiền mRNA và dẫn tới sự bỏ qua vùng mã hóa trong quá trình cắt gắn tiền mRNA của gen *SLC25A20*. Phân tích di truyền trong gia đình cho thấy bố và mẹ của bệnh nhân đều mang đột biến c.199-10T>G dạng dị hợp tử. Kết quả này không chỉ giúp cho việc chẩn đoán và xây dựng phương hướng điều trị cho bệnh nhân thêm hiệu quả mà còn cung cấp thông tin quan trọng phục vụ việc nghiên cứu và tư vấn di truyền cho những bệnh nhân người Việt Nam mắc FAODs trong tương lai.

Từ khóa: β -oxidation, giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa, *in silico*, rối loạn chuyển hóa acid béo, *SLC25A20*

GIỚI THIỆU

Rối loạn chuyển hóa acid béo (Fatty acid oxidation disorders - FAODs) là tình trạng bệnh lý hiếm gặp ở trẻ mới sinh ảnh hưởng đến việc chuyển hóa acid béo trong cơ thể. Thông thường cơ thể chuyển hóa đường glucose thành năng lượng, khi lượng glucose trong cơ thể được dùng hết, các acid béo dự trữ trong cơ thể sẽ được dùng thay thế (Houten *et al.*, 2015). Cơ thể người mắc rối loạn chuyển hóa acid béo sẽ không thể chuyển hóa acid béo thành năng lượng dẫn đến tình trạng

hạ đường huyết và tích tụ chất độc trong cơ thể kéo theo rối loạn chức năng gan (Rinaldo *et al.*, 2002). Các biến chứng về não dẫn đến tử vong ở trẻ mới sinh có thể xảy ra ngay sau vài giờ và ở người lớn sau hai ngày (Li *et al.*, 2018). Rối loạn chuyển hóa acid béo bao gồm 4 nhóm chính: (1) rối loạn vận chuyển của các acid béo chuỗi dài vào ty thể, (2) khiếm khuyết oxy hóa nội bào của các acid béo chuỗi dài ảnh hưởng đến các enzyme liên kết màng, (3) khiếm khuyết oxy hóa của các acid béo chuỗi ngắn và trung bình ảnh hưởng tới các enzyme liên kết màng ty thể (4) rối

loạn ở chuỗi truyền điện tử trong quá trình oxy hóa ở ty thể (Vishwanath, 2016). Triệu chứng điển hình của FAODs có thể kể đến: hạ đường huyết, rối loạn cơ và nhịp tim, bệnh cơ xương và tiêu cơ vân (Houten *et al.*, 2015). Tần suất xuất hiện của bệnh này dao động từ 1/5.000 đến 1/10.000 ở quần thể người Bắc Âu và Bắc Mỹ (Li *et al.*, 2018). Hầu hết các dạng của FAODs được di truyền từ bố mẹ sang con theo cơ chế di truyền lặn, do đó với mỗi trẻ mới sinh sẽ có $\frac{1}{4}$ xác suất mang $\frac{1}{2}$ suất mang 1 allele gây bệnh và $\frac{1}{4}$ xác suất không mang bệnh (Li *et al.*, 2018).

Cho đến nay, đã có 11 dạng rối loạn chính được phát hiện và nghiên cứu (Bảng 1). Thiếu hụt enzyme điều hòa vận chuyển acylcarnitine và carnitine (CACTD) và thiếu hụt carnitine palmitoyltransferase loại 2 (carnitine palmitoyltransferase type 2 deficiency – CPT2D) là 2 dạng hiếm gặp nhưng nghiêm trọng nhất trong các dạng rối loạn chuyển hóa acid béo kể trên (Wilcken, 2010; Yang *et al.*, 2001). Bệnh nhi khởi phát CACTD thường mang bệnh cơ tim nặng, rối loạn nhịp thất, hạ đường huyết, tăng kali máu và có thể dẫn đến đột tử (Yang *et al.*, 2001). Triệu chứng lâm sàng khởi phát của CACTD thường trùng lặp với CPT2D, do đó việc chẩn đoán di truyền dựa vào đột biến trên gen gây bệnh là cần thiết để phân biệt hai dạng rối loạn chuyển hóa acid béo này (Wieser *et al.*, 2003). Nguyên nhân gây CACTD được xác định là do đột biến trên gen *SLC25A20*, gen mã hóa protein CACT có vai trò vận chuyển acylcarnitine và carnitine vào ra màng ty thể sau khi quá trình tổng hợp lại Acyl-CoA hoàn tất. Các đột biến đã được phát hiện trên gen *SLC25A20* đều dẫn đến sự tổng hợp không hoàn chỉnh của protein CACT. Do đó bệnh nhân mắc CACTD sẽ không thể chuyển hóa acid béo thành năng lượng một cách hiệu quả dẫn đến thiếu hụt năng lượng, đồng thời tích tụ acylcarnitines không phân giải được gây độc cho cơ thể (Korman *et al.*, 2006). Đối với CPT2D, đây là một dạng FAODs với các triệu chứng như không dung nạp vận động dẫn đến tiêu cơ vân và nguy cơ suy thận (Longo *et al.*, 2006). Một số triệu chứng nặng hơn của CPT2D có thể kể đến như dị dạng khuôn mặt, rối loạn chức năng thận và rối loạn dẫn truyền thần kinh

có thể dẫn tới tử vong (Longo *et al.*, 2006). Đột biến trên gen *CPT2* là nguyên nhân gây CPT2D (Wieser *et al.*, 2003).

Như đã đề cập ở trên, FAODs được chia thành nhiều dạng, mỗi dạng lại liên quan tới những đột biến khác nhau trên những gen khác nhau. Với số lượng đột biến đa dạng như vậy, việc tiếp cận nghiên cứu bằng phương pháp giải trình tự truyền thống như Sanger trở nên kém hiệu quả. Gần đây, nghiên cứu các bệnh có số lượng đột biến lớn thường áp dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới để giải trình tự toàn bộ hệ gen (WGS) hoặc giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES) (Fedurco *et al.*, 2006; Turcatti *et al.*, 2008). Thay vì giải trình tự một đoạn đơn lẻ, kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới cho phép giải trình tự nhiều đoạn cùng một lúc, từ đó đẩy nhanh tiến độ và hiệu quả.

Nghiên cứu của chúng tôi ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới để giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES) của bệnh nhân Việt Nam mắc rối loạn chuyển hóa acid béo nhằm tìm ra đột biến liên quan đến FAODs.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bệnh nhân

Nghiên cứu này tuân thủ các nguyên tắc đạo đức chung được nêu trong Tuyên bố Helsinki. Nghiên cứu cũng đã được thông qua bởi Hội đồng đạo đức trong Nghiên cứu Y sinh của Viện Nghiên cứu hệ gen thông qua cho phép tiến hành (quyết định số 18/QĐ-NCHG) cũng như được sự đồng ý từ gia đình bệnh nhân.

Bệnh nhân số hiệu ACB1 được chẩn đoán lâm sàng mắc rối loạn chuyển hóa acid béo tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Bệnh nhân sinh ngày 06/11/2017 với cân nặng 2,6 kg, là con đầu lòng của gia đình. Sau 1 tháng phát triển bình thường, bệnh nhân bắt đầu có các triệu chứng bao gồm kém ăn, quấy khóc rồi sau đó hôn mê. Các xét nghiệm cho thấy bệnh nhân có huyết áp tăng cao, tăng amoniac huyết (293,3 Mg/dl), bù nhiễm toan chuyển hóa (pH = 7,35, $[HCO_3^-]$ = 12 mmol/l, BE = -9,9 mmol/l, tăng transaminase (AST/ALT: 323,3/296,4 UI/l). Chỉ số sinh hóa

amino acid nội bào cho thấy có sự gia tăng histidine, asparagine, serine, arginine, glutamate, citrulline, threonine, alanine, cystathione, ornithine, cystine, tyrosine và methionine. Các xét nghiệm chụp não, siêu âm tim, sinh thiết thận và gan cho kết quả bình thường. Kết quả Trắc nghiệm Đánh giá sự phát triển tâm lý – vận động cho trẻ nhỏ (Denver Developmental Screening Test) cho thấy bệnh nhân có dấu hiệu chậm phát triển nặng do có chỉ số phát triển là 65% (< 69%). Sau 7 ngày theo dõi và điều trị tại bệnh viện, bệnh nhân đã qua khỏi đợt khởi phát đầu tiên và được xuất viện. Bệnh nhân khởi phát bệnh lần 2 vào tháng tuổi thứ 2 và cũng thuyên giảm sau 10 ngày theo dõi và điều trị và được xuất viện. Tuy nhiên bệnh nhân đã đột tử tại nhà vào tháng tuổi thứ 3. Đáng chú ý, phân tích dữ liệu acylcarnitine của bệnh nhân cho thấy giảm lượng carnitine tự do (C0), acetylcarnitine (C2), propionylcarnitine (C3) và piglylcarnitine (C5:1); tăng lượng methylglutaryl carnitine (C6DC), octanoylcarnitine (C8) và decadienoylcarnitine (C10:2). Từ các bất thường trong xét nghiệm hóa sinh, đặc biệt là xét nghiệm acylcarnitine, các bác sĩ chẩn đoán bệnh nhân ACB1 mắc rối loạn chuyển hóa acid béo.

Tách chiết DNA

Mẫu máu của bệnh nhân ACB1 và bố mẹ được cung cấp bởi Khoa Nội tiết – Chuyển hóa – Di truyền, Bệnh viện Nhi Trung ương. DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu toàn phần sử dụng kit QIAamp DNA Blood Mini Kit – QIAGEN (Đức). DNA tổng số sau khi tách được lưu trữ ở nhiệt độ -20°C trước khi thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

Giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa

Thư viện DNA sử dụng trong quá trình giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES) được xây dựng từ DNA tổng số của bệnh nhân ACB1 theo quy trình của kit SureSelect Target Enrichment (Aligent). Quá trình giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa của bệnh nhân ACB1 được thực hiện trên máy Illumina Nextseq500 của hãng ILLUMINA (Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phân tích dữ liệu đọc trình tự và lọc các đột biến trên các gen đã biết liên quan đến rối loạn chuyển hóa acid béo

Sau khi giải trình tự trên máy Illumina, chất lượng đọc được kiểm tra bằng phần mềm FastQC. Sau đó dữ liệu sẽ được gióng hàng trên hệ gen tham chiếu hg19 bằng phần mềm Burrows-Wheeler Alignment Tool (Li, Durbin, 2009). Các biến thể được xác định bằng công cụ Genome Analysis Toolkit (GATK) và được chú giải chức năng bằng phần mềm SnpEff (Cingolani *et al.*, 2012; McKenna *et al.*, 2010).

Dựa trên danh sách các gen liên quan tới rối loạn chuyển hóa acid béo (Bảng 1), chúng tôi tiến hành sàng lọc lấy các đột biến theo các bước sau:

- (i) Sàng lọc các biến thể trên gen đã được công bố là gây bệnh;
- (ii) Sàng lọc các biến thể có tần suất allele <0,01
- (iii) Sàng lọc các đột biến có khả năng gây bệnh theo một trong những tiêu chí sau:

+ Các đột biến có ảnh hưởng lớn như đột biến thêm bớt trên vùng mã hóa protein, đột biến dịch khung (frameshift variant) và đột biến làm thay đổi vị trí cắt gắn tiền mRNA (splice site variant).

+ Các đột biến sai nghĩa có tiềm năng gây bệnh: đánh giá dựa trên các phần mềm SIFT và Polyphen-2.

+ Clinvar: dựa trên cơ sở dữ liệu Clinvar, lựa chọn đột biến được đánh giá là “Gây bệnh”.

Phân tích các đột biến thuộc vùng gen không mã hóa

Các đột biến nằm trên vùng không mã hóa (intron) có khả năng ảnh hưởng tới vị trí cắt gắn tiền mRNA. Đột biến đã sàng lọc nếu thuộc vùng intron sẽ được đánh giá bằng công cụ Human Splicing Finder (Desmet *et al.*, 2009) cùng các phần mềm/công cụ HSF Matrices, MaxEnt (Yeo, Burge, 2004), ASSP (Wang, Marín, 2006), NetGene2 (Hebsgaard, 1996) và Spliceman (Lim, Fairbrother, 2012). Đây đều là những phần mềm/công cụ dùng cho mục đích dự đoán tác động của đột biến tới sự cắt gắn tiền mRNA và nhận diện mô típ cắt gắn trên trình tự DNA của loài người.

Bảng 1. Các gen đã công bố gây ra hội chứng rối loạn chuyển hóa acid béo trong phân tích dữ liệu WES.

Gen	Kiểu hình liên quan	Gen	Kiểu hình liên quan
<i>ACAD8</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa Isobutyryl-CoA	<i>HMGCL</i>	Thiếu hụt 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase
<i>ACAD9</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa Acyl-CoA	<i>HMGCS2</i>	Thiếu hụt 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2
<i>ACADL</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi dài acyl-CoA	<i>HSD17B10</i>	Hội chứng thiếu hụt 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase X và chậm phát triển tâm thần
<i>ACADM</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi trung bình acyl-CoA	<i>LPIN1</i>	Tăng sinh moglobin niệu, cấp tính, tái phát
<i>ACADS</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi ngắn acyl-CoA	<i>PPARG</i>	Kháng insulin, loạn dưỡng mỡ
<i>ACADSB</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa 2-methylbutyryl-CoA	<i>SLC22A5</i>	Thiếu hụt carnitine khởi phát
<i>ACADVL</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi rất dài acyl-CoA	<i>SLC25A20</i>	Thiếu hụt carnitine-acylcarnitine translocase
<i>ALDH5A1</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa succinic semialdehyde	<i>TAZ</i>	3-Methylglutaconic aciduria, (Hội chứng Barth)
<i>CPT1A</i>	Thiếu hụt enzyme carnitine palmitoyltransferase	<i>MCAD</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi trung bình acil-CoA
<i>CPT2</i>	Thiếu hụt enzyme carnitine palmitoyltransferase II	<i>LCHAD</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi dài 3-hydroxyacyl-CoA
<i>ECHS1</i>	Thiếu hụt enzyme Mitochondrial short-chain enoyl-CoA hydratase 1	<i>CPT2</i>	Thiếu hụt Carnitine Palmitoyltransferase II
<i>ETFA</i>	Thiếu hụt glutaric aciduria, multiple acyl-CoA dehydrogenase	<i>SCAD</i>	Thiếu hụt chuỗi ngắn acyl-CoA
<i>ETFB</i>	Thiếu hụt glutaric aciduria, multiple acyl-CoA dehydrogenase	<i>DECR1</i>	Thiếu hụt 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase
<i>ETFDH</i>	Thiếu hụt glutaric aciduria, multiple acyl-CoA dehydrogenase	<i>MLYCD</i>	Thiếu hụt malonyl-CoA decarboxylase
<i>GLUD1</i>	Tăng kali máu, tăng insulin máu, hạ đường huyết	<i>NADK2</i>	Thiếu hụt enzyme NAD Kinase 2
<i>HADH</i>	Thiếu hụt enzyme dehydro hóa 3-hydroxyacyl-CoA	<i>SLC52A1</i>	Thiếu hụt riboflavin
<i>HADHA</i>	Thiếu hụt protein tam chức, thiếu hụt enzyme dehydro hóa chuỗi dài 3-hydroxyacyl-CoA	<i>SLC52A2</i>	Thiếu hụt riboflavin
<i>HADHB</i>	Thiếu hụt protein tam chức	<i>SLC52A3</i>	Thiếu hụt riboflavin

Kiểm chứng đột biến phát hiện được

Để khuếch đại đoạn gen có chứa đột biến c.199-10T>G trên vùng intron 2 của gen

SLC25A20, cặp mồi *SLC25A20-2F*: 5'-AGAAGAGGTGAAGGAAGCCAC-3' và *SLC25A20-2R*: 5'-

CAAGTGCTCCTGACCTGTAAGT -3' được thiết kế bằng công cụ Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Đoạn sản phẩm có độ dài 265bp được khuếch đại lên với chu trình: 5 phút ở 95°C; biến tính ở 95°C trong 45 giây, bắt cặp mỗi ở 60°C trong 45 giây, kéo dài ở 72°C trong 45 giây trong 35 chu kỳ nhiệt lặp lại; và kéo dài 8 phút ở 72°C. Sản phẩm khuếch đại sau đó được giải trình tự bằng kỹ thuật Sanger trên máy ABI 3500 sử dụng bộ kit BigDye® Terminator (BDT) v1.1 SequencingStandards (ThermoFisher). Dữ liệu đầu ra của quá trình giải trình tự Sanger được phân tích bằng phần mềm MEGA X.

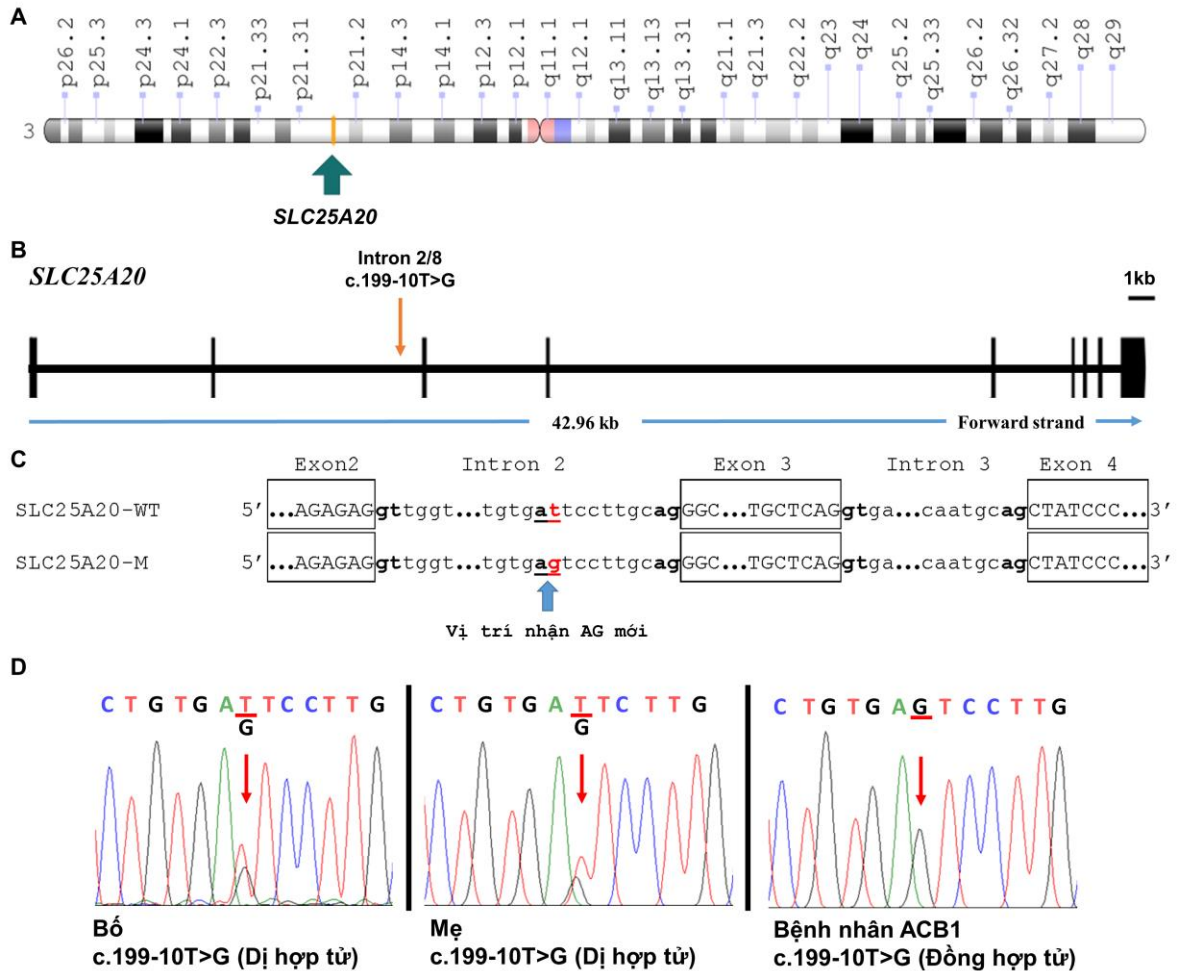
KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

Theo tiêu chí sàng lọc đột biến như trình bày ở phần phương pháp, có 3 biến thể thỏa mãn điều kiện này gồm biến thể c.199-10T>G (*rs541208710*) trên gen *SLC25A20* với tần suất trên 1000 hệ gen là 0,0002, biến thể c.497+101G>A (*rs149896468*) trên gen *SLC22A5* với tần suất 0,0022 và c.282-46G>A (*rs17848446*) trên gen *CPT1A* với tần suất 0,008. Cả 3 gen này đều nằm trong nhóm các gen điều hòa và vận chuyển carnitine (Vishwanath, 2016). Các nghiên cứu trước đây cho thấy 3 gen này đều di truyền theo cơ chế di truyền lặn (Iacobazzi *et al.*, 2004; Korman *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2017). Như vậy nếu biểu hiện bệnh, bệnh nhân phải mang kiểu gen đồng hợp. Tuy nhiên theo kết quả WES trong 3 gen kể trên, chỉ có gen *SLC25A20* có kiểu gen đồng hợp. Đột biến này được đánh giá là “Gây bệnh” trên cơ sở dữ liệu ClinVar (<https://preview.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/12137>). Cụ thể, những nghiên cứu đã được công bố đều đánh giá đột biến này có liên quan đến vùng intron bảo thủ với vai trò quan trọng trong quá trình cắt gắn tiền mRNA (Ogawa *et al.*, 2000; Fukushima *et al.*, 2013; Vatanavicharn *et al.*, 2015). Trong một nghiên cứu khác, kết quả phiên mã ngược và khuếch đại mRNA tách từ tế bào cơ vân của bệnh nhân mang đột biến tạo thành 3 băng khác nhau trên gel điện di cho thấy có sự bỏ qua vùng mã hóa trong quá trình cắt gắn tiền mRNA (Hsu *et al.*, 2001).

Đột biến c.199-10T>G làm biến đổi một nucleotide từ thymine (T) thành guanine (G) ở vị trí 199-10 của vùng không mã hóa thứ 2 (intron 2) trên tổng số 8 vùng không mã hóa (intron) của gen *SLC25A20*, gen mã hóa protein CACT, nằm ở vị trí 21.31 trên cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể số 3 (Hình 1A và 1B). Đột biến c.199-10T>G đã được công bố trên cơ sở dữ liệu dbSNP142 với số hiệu *rs541208710* (Fukushima *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2017). Tuy những vùng intron không trực tiếp mã hóa protein, những đột biến trên những vùng này vẫn có thể ảnh hưởng tới sự tạo thành protein nếu như chúng ảnh hưởng tới vị trí cắt gắn tiền mRNA (Benhabiles *et al.*, 2016; Burset, 2000; Burset *et al.*, 2001). Do đó, nhóm nghiên cứu đặt ra giả thuyết rằng đột biến c.199-10T>G là một đột biến liên quan đến các vị trí cắt (Hình 1C). Để kiểm chứng giả thuyết đó, đột biến trên được phân tích bằng công cụ Human Splicing Finder bao gồm 2 thuật toán là HSF matrices và MaxEnt (Bảng 2). Sử dụng thuật toán MaxEnt, sự thay đổi từ T sang G được dự đoán là sẽ làm gián đoạn vị trí cắt gắn ở mô típ vị trí nhận 3' cũ “gcttctgtgattccttgcagGGC” do có chỉ số WT = 9,97 > 3 và có % biến dị = -61,28% < -30%. Phân tích theo thuật toán HSF matrices cho thấy đột biến c.199-10T>G tạo thành trình tự nhận 3' AG mới tại vị trí đột biến đúng như giả thuyết của nhóm nghiên cứu do có chỉ số WT = 45,7 < 65 và % biến dị = 63,35% > 10% (Bảng 2). Nếu quá trình phân cắt đoạn intron xảy ra ở vị trí AG mới này, 9 nucleotide của đoạn intron có khả năng ở lại chuỗi mRNA trưởng thành sau quá trình cắt gắn và có thể ảnh hưởng đến quá trình dịch mã tạo thành chuỗi protein (Bảng 2). Khi phân tích bằng 2 công cụ ASSP và NetGene2, chỉ số đột biến trong cả 2 phép phân tích đều nhỏ hơn chỉ số WT. Như vậy có thể dự đoán rằng đột biến làm gián đoạn vị trí cắt gắn tại mô típ cắt gắn “AG” cũ tương đồng với kết luận từ kết quả của thuật toán MaxEnt. Kết quả phân tích bằng công cụ Spliceman cũng chỉ ra rằng đột biến c.199-10T>G có 77% khả năng làm gián đoạn vị trí cắt gắn tiền mRNA cũ và tạo ra vị trí cắt mới (Bảng 2). Như vậy có một sự tương đồng nhất định giữa kết quả phân tích từ các công cụ trên. Không chỉ vậy, nghiên cứu trước đây còn dự đoán rằng sự thay đổi vị trí cắt từ đột biến này

còn có thể gây ra sự bỏ qua vùng mã hóa 3 (exon 3) hoặc cả 2 vùng mã hóa 3 và 4 (exon 3 và 4) (Fukushima *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2001). Như vậy đột biến c.199-10T>G dạng đồng hợp tử trên gen *SLC25A20* gây ra tình trạng rối loạn chuyển hóa acid béo dạng thiếu hụt enzyme điều hòa vận

chuyển acylcarnitine và carnitine (CACTD) ở bệnh nhân ACB1. Kết quả kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger cho thấy bệnh nhân ACB1 được di truyền đột biến c.199-10T>G từ bố và mẹ do bố và mẹ của bệnh nhân đều mang đột biến c.199-10T>G dạng dị hợp tử (Hình 1D).



Hình 1. Kết quả xác định đột biến trên gen *SCL25A20*. (A) Gen *SCL25A20* nằm ở vị trí 21.31 trên cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể số 3. (B) Sơ đồ vùng mã hóa (exon) và vùng không mã hóa (intron) của gen *SCL25A20* và vị trí của đột biến c.199-10T>G trên intron 2 của gen *SCL25A20*. (C) Kết quả giống hàng giữa đoạn trình tự mang đột biến c.199-10T>G (*SCL25A20*-M) với đoạn trình tự bình thường (*SCL25A20*-WT) của gen *SCL25A20*. Trình tự các vùng mã hóa (exon) được in hoa và đóng khung, trình tự các vùng không mã hóa được in thường. Các vị trí nhận 3' (3'acceptor site) AG và vị trí cho 5' (5' donor site) bình thường được bôi đen. Đột biến c.199-10T>G biến đổi T thành G, tạo ra đoạn AG mới được ký hiệu với màu đỏ và gạch chân ở vị trí 10 nucleotide trước đoạn exon 3. (D) Hình ảnh giải trình tự đoạn gen xác định được đột biến điểm c.199-10T>G thuộc intron 2 trên mẫu bệnh nhân ACB1 ở dạng đồng hợp tử, mẫu bố mẹ bệnh nhân ở dạng dị hợp tử.

Bảng 2. Kết quả dự đoán ảnh hưởng của đột biến c.199-10T>G trên gen *SLC25A20* đến vị trí cắt gắn tiền mRNA bằng các thuật toán/phần mềm HSF Matrices, MaxEnt, ASSP, NetGene2, Spliceman.

Thuật toán/ Phần mềm	Vị trí trên chuỗi	Vị trí trên cDNA	Mô típ	Vị trí cắt mới	Wild Type	Đột biến	Khác biệt ở độ dài vùng mã hóa khi cắt ở vị trí mới	% biến dị
HSF Matrices	80	(-21)	tgcttctgtg attc	tgcttctgtgagT C	45,7	74,65	(+9)	Vị trí mới + 63.35
	89	(-12)	gattccttg cagGG	gagtccttg cagGG	91,05	87,97	0	(-3,38)
MaxEnt	81	(-20)	gcttctgtg attccttgc agGGC	gcttctgtgagtc cttgacgGGC	9,97	3,86	-	(-61,28)
ASSP	101	(-40)	ttccttgca gGGCAT CACGG	gtccttgcaG GCATCACG G	8,41	6,322	-	-
NetGene2	100	(-39)	ttccttgca gGGCAT CACGG	gtccttgcaG GCATCACG G	1	0,97	-	-
Spliceman	Đột biến điểm tgtga(t/g)tcctt		ttcctt	gtcctt	Ranking L1 = 77%			

Chú thích: Dữ liệu đầu vào là trình tự DNA bao gồm vùng mã hóa thứ 3 (exon3) cùng 100 nucleotide trước và sau exon3 của gen *SLC25A20*. Vị trí trên chuỗi và vị trí trên cDNA được tính tương đối theo số lượng nucleotide ở trình tự DNA đầu vào.

Rối loạn chuyển hóa acid béo dạng CACTD gây ra bởi các đột biến trên gen *SLC2520* cần được chẩn đoán sớm nhất có thể vì bệnh nhân có thể tử vong trong thời kỳ sơ sinh. Bên cạnh đó, các xét nghiệm về enzyme CACT có thể chưa được phổ biến rộng rãi trong khi việc đưa ra phác đồ điều trị cần được thực hiện ngay sau khi chẩn đoán. Ngoài ra sự khác biệt giữa hai dạng CACTD và CPT2D của hội chứng rối loạn chuyển hóa acid béo chỉ có thể được phát hiện nhờ biểu hiện về di truyền do có triệu chứng lâm sàng giống nhau. Việc chẩn đoán dựa vào đột biến trên gen *SLC2520* cũng giúp phân biệt CACTD với các bệnh khác có triệu chứng lâm sàng giống CACTD nhưng không gây ra bởi đột biến trên gen này. Chính vì vậy chẩn đoán bằng việc sàng lọc đột biến trên gen gây bệnh bằng các

kỹ thuật sinh học phân tử tiên tiến càng trở nên quan trọng và cấp thiết. Kết quả xác định được đột biến c.199-10T>G trên gen *SLC2520* ở bệnh nhân người Việt Nam của chúng tôi góp một phần xác nhận ảnh hưởng gây bệnh của đột biến này cũng như cung cấp thông tin quan trọng hỗ trợ việc chẩn đoán và điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa acid béo.

KẾT LUẬN

Bằng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới và kiểm chứng bằng giải trình tự Sanger trên toàn bộ vùng gen phiên mã chúng tôi đã sàng lọc được đột biến c.199-10T>G trên gen *SLC25A20* ở bệnh nhân gây rối loạn chuyển hóa acid béo dạng CACTD. Đây có thể coi là một trong những

nghiên cứu chuyên sâu đầu tiên ở Việt Nam về bệnh rối loạn chuyển hóa acid béo dạng CACTD ứng dụng công nghệ giải trình tự toàn bộ vùng mã hóa (WES). Kết quả nghiên cứu sẽ là một đóng góp quan trọng trong việc chẩn đoán và tư vấn di truyền cũng như điều trị bệnh rối loạn chuyển hóa acid béo ở bệnh nhân người Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình này được Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tài trợ kinh phí với mã số: KHCBSS.02/18-20. Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn tới bệnh nhân ACB1 và gia đình tham gia trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benhabiles H, Jia J, Lejeune F (2016) *General Aspects Related to Nonsense Mutations*. In Benhabiles H, Jia J, Lejeune F. *Nonsense Mutation Correction in Human Diseases*. Elsevier Science, Lille: 1-76.
- Burset M (2000) Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 28:4364–4375.
- Burset M, Seledtsov I, Solovyev V (2001) SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res* 29:255–259.
- Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang, L, Land SJ, Lu X, Ruden DM (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly(Austin)* 2:80–92.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-B eroud G, Claustres M, B eroud C (2009) Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:e67.
- Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G (2006) BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res* 34: e22.
- Fukushima T, Kaneoka H, Yasuno T, Sasaguri Y, Tokuyasu T, Tokoro K, Fukao T, Saito T (2013) Three novel mutations in the carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) gene in patients with CACT deficiency and in healthy individuals. *J Hum Genet* 58:788–793.
- Hebsgaard S (1996) Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res* 24: 3439–3452.
- Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJA (2015) The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu Rev Physiol* 78:23–44.
- Hsu BY, Iacobazzi V, Wang Z, Harvie H, Chalmers, RA, Saudubray JM, Palmieri F, Ganguly A, Stanley CA (2001) Aberrant mRNA splicing associated with coding region mutations in children with carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Mol Genet Metab* 74:248–255.
- Iacobazzi V, Invernizzi F, Baratta S, Pons R, Chung W, Garavaglia B, Dionisi-Vici C, Ribes A, Parini R, Huertas MD, Roldan S, Lauria G, Palmieri F, Taroni F (2004) Molecular and functional analysis of SLC25A20 mutations causing carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *Hum Mutat* 24:312–320.
- Korman SH, Pitt JJ, Boneh A, Dweikat I, Zater M, Meiner V, Gutman A, Brivet M (2006) A novel SLC25A20 splicing mutation in patients of different ethnic origin with neonatally lethal carnitine-acylcarnitine translocase (CACT) deficiency. *Mol Genet Metab* 89:332–338.
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
- Lim KH, Fairbrother WG (2012) Spliceman-A computational web server that predicts sequence variations in pre-mRNA splicing. *Bioinformatics* 28:1031–1032.
- Longo N, Amat Di San Filippo C, Pasquali M (2006) Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142 C:77–85.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010) The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303.
- Merritt II J, Norris M, Kanungo S (2018) Fatty acid oxidation disorders. *Ann Transl Med* 6:473.
- Ogawa A, Yamamoto S, Kanazawa M, Takayanagi M,

- Hasegawa S, Kohno Y (2000) Identification of two novel mutations of the carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) gene in a patient with CACT deficiency. *J Hum Genet* 45:52–55.
- Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ (2002) Fatty Acid Oxidation Disorders. *Annu Rev Physiol* 64:477–502.
- Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP (2008) A new class of cleavable fluorescent nucleotides: Synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res* 36:e25.
- Vatanavicharn N, Yamada K, Aoyam Y, Fukao T, Densupsoontorn N, Jirapinyo P, Sathienkijkanchai A, Yamaguchi S, Wasant P (2015) Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency: Two neonatal cases with common splicing mutation and in vitro bezafibrate response. *Brain Dev* 37:698–703.
- Vishwanath VA (2016) Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders : A Brief Review. *Ann Neurosci* 23:51–55.
- Wang M, Marín A (2006) Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene* 366:219–227.
- Wieser T, Deschauer M, Olek K, Hermann T, Zierz S (2003) Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: molecular and biochemical analysis of 32 patients. *Neurology* 60:1351–1353.
- Wilcken B (2010) Fatty acid oxidation disorders: Outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis* 33:501–506.
- Yan HM, Hu H, Ahmed A, Feng BB, Liu J, Jia ZJ, Wang H (2017) Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency with c.199-10 T>G and novel c.1A>G mutation: Two case reports and brief literature review. *Med* 96:e8549.
- Yang BZ, Mallory JM, Roe DS, Brivet M, Strobel GD, Jones KM, Ding JH, Roe CR (2001) Carnitine/acylcarnitine translocase deficiency (neonatal phenotype): Successful prenatal and postmortem diagnosis associated with a novel mutation in a single family. *Mol Genet Metab* 73:64–70.
- Yeo G, Burge CB (2004) Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals. *J Comput Biol* 11:377–394.

IDENTIFICATION OF c.199-10T>G MUTATION IN *SLC25A20* GENE RELATED TO FATTY ACID OXIDATION DISORDERS ON A VIETNAMESE PATIENT

Nguyễn Huy Hoàng^{1,2}, Dương Chí Thành¹, Vũ Chí Dũng³

¹Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Vietnam National Children's Hospital

SUMMARY

Fatty acid oxidation disorders (FAODs) consist of rare diseases which affect the energy production of the mitochondria by disrupting the β -oxidation of fatty acid, resulting in energy deficiency and toxic accumulation in the patient's body. Typical clinical symptoms of FAODs include rhabdomyolysis, myoglobinuria, cardiomyopathy, hypoketotic hypoglycemia and liver dysfunction on the newborns and could lead to mortality in most of the cases. Mutations occur in different genes in the enzymatic pathway of the mitochondria may cause different types of FAODs. The objective of this study was to screen and identify genetic mutations associated with fatty acid oxidation disorders in Vietnamese patients through whole exome sequencing analysis. The result revealed a reported homozygous c.199-10T>G mutation in the position of 10 nucleotides before the exon 3 of the *SLC25A20* gene. The *SLC25A20* gene encodes the carnitine acylcarnitine translocase (CACT), which plays an important role in transporting acylcarnitine and carnitine in the mitochondria. Genetic mutations in this gene often lead to carnitine-acylcarnitine translocase deficiency (CACTD) - a rare form of FAODs. By in silico analysis, the c.199-10T>G mutation was predicted as a splice site mutation that could lead to exon skipping during the creation of mature mRNA. Genetic analysis of the patient's family showed that both parents had the mutation c.199-10T>G in heterozygous form.

This result suggests that every mutant allele in the patient is inherited from parents. Our finding not only improved our understanding of the c.199-10T>G mutation in *SLC25A20* gene of our patient but also provides important information for future research, diagnosis and genetic counseling of FAOS in Vietnamese patients.

Keywords: *β -oxidation, FAODs, in silico, SLC25A20, whole exome sequencing*