

Phát hiện đột biến mất đoạn lớn trên gen *EDA* gây loạn sản ngoại bì ở gia đình bệnh nhân Việt Nam bằng giải trình tự hệ gen mã hóa

Nguyễn Phương Anh¹, Nguyễn Thùy Dương^{1,2*}, Nông Văn Hải^{1,2}

¹Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 15/6/2021; ngày chuyển phản biện 18/6/2021; ngày nhận phản biện 19/7/2021; ngày chấp nhận đăng 22/7/2021

Tóm tắt:

Loạn sản ngoại bì (Hypohidrotic ectodermal dysplasia - HED) (OMIM # 305100) là bệnh di truyền hiếm gặp do đột biến gen *EDA* (NM_001399) nằm trên nhiễm sắc thể X gây nên. Trẻ mắc bệnh này có các biểu hiện bất thường ở các cấu trúc biểu bì như da, tóc, móng tay, răng và tuyến mồ hôi. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành xác định đột biến trong gen *EDA* từ các thành viên của một gia đình người Việt Nam có con trai có 5 răng và không có tuyến mồ hôi bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen mã hóa (Whole exome sequencing - WES) và multiplex PCR. Kết quả cho thấy, bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (c.2_396del) được di truyền từ mẹ. Kết quả này đóng góp cho nghiên cứu về hội chứng loạn sản ngoại bì ở mức độ phân tử, hỗ trợ công tác điều trị và tư vấn di truyền y học.

Từ khóa: đột biến, *EDA*, giải trình tự hệ gen mã hóa, loạn sản ngoại bì, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

HED (OMIM # 305100) là một nhóm các rối loạn bẩm sinh đặc trưng bởi sự suy giảm phát triển của tóc, răng, móng tay hoặc tuyến mồ hôi [1]. Cho đến nay, hơn 200 loại loạn sản ngoại bì (Ectodermal Dysplasia - ED) đã được miêu tả, trong đó dạng phổ biến nhất là loạn sản ngoại bì HED với tần suất xuất hiện là 1/17.000 trên toàn thế giới [1, 2]. Hội chứng HED được chứng minh là có liên quan đến đột biến trên một số gen gồm *EDA*, *EDAR*, *EDARADD*, *WNT10A*, *TRAF6*, *NEMO* và *IKBKKG*. Trong đó, các đột biến trên gen *EDA* nằm trên nhiễm sắc thể X gây bệnh dạng XLHED được tìm thấy ở 95% bệnh nhân HED [3]. Theo thống kê của Trzeciak và cs [4], tính đến năm 2016, có 345 trường hợp mắc HED được ghi nhận, trong đó 206 trường hợp là do đột biến ở gen *EDA* gây ra.

Gen *EDA* (NM_001399) có kích thước khoảng 425 kb nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể X (Xq12-13.1), bao gồm 12 exon nhưng chỉ có 8 exon mã hóa cho protein xuyên màng ectodysplasin-A. Quá trình phiên mã và dịch mã của *EDA* tạo ra 13 dạng RNA (tất cả đều chứa exon 1) và 8 loại protein khác nhau. Hai protein dài nhất của gen *EDA* là EDA-A1 có 391 axit amin và EDA-A2 có 389 axit amin. Chúng là các thành viên của họ yếu tố hoại tử khối u (Tumor necrosis factor family - TNF) và là các protein xuyên màng trimeric loại II. Các protein này đều chứa 7 vùng, gồm vùng nội bào nhỏ ở đầu N-terminal, vùng protein xuyên màng, vùng cuống có chức năng chưa được xác định, vùng trình tự phân cắt đồng thuận furin cho quá trình phân giải protein của EDA, vùng trình tự ngắn mang

điện tích dương cần thiết cho các tương tác với heparan-sulfat proteoglycan, vùng collagen ở giữa có 19 lần lặp lại Gly-X-Y và vùng cấu trúc tương đồng TNF ở đầu C dài 150 gốc axit amin (TNF homology domain - THD) [5]. Để có thể liên kết với thụ thể EDAR, EDA-A1 phải được xử lý bằng sự phân cắt protein tại vị trí furin gần vùng collagen, từ đó giải phóng phối tử EDA vào khoang ngoại bào dưới dạng một protein hòa tan [6]. Protein EDA-A1 và EDA-A2 liên kết với các thụ thể TNFR (The tumor necrosis factor receptor) thông qua motif TNF, trong đó protein EDA1 (EDA-A1) liên kết với thụ thể EDAR, còn EDA2 (EDA-A2) liên kết với thụ thể XEDAR. Mặc dù cả 2 thụ thể này đều kích hoạt các yếu tố NF- κ B nhưng có thể chỉ có tương tác EDA1-EDAR là có liên quan tới sự hình thành, phát triển và biệt hóa của các cơ quan có nguồn gốc ngoại bì [7]. Các đột biến gen *EDA1* và *EDAR* dẫn đến các sai hỏng trong quá trình phát triển ngoại bì và gây nên hội chứng HED, tuy nhiên các đột biến ở gen *XEDAR* vẫn chưa được tìm thấy ở bệnh nhân HED [7].

Đột biến đầu tiên trên gen *EDA*, mất đoạn trên locus DXS732, gây bệnh HED đã được miêu tả năm 1993 [8]. Tiếp theo đó, nhiều nghiên cứu phát hiện đột biến gây bệnh HED đã được thực hiện [9-11]. Nghiên cứu xác định đột biến ở gen *EDA* trên 1 ca bệnh nhi người Trung Quốc đã phát hiện một đột biến điểm c.896G>A (p.G299D) trên gen *EDA* sử dụng kỹ thuật giải trình tự hệ gen mã hóa WES [9]. Nghiên cứu khác ở 10 bệnh nhân HED Việt Nam sử dụng giải trình tự Sanger cho thấy, đã phát hiện được 2 đột biến điểm 1133C>T (p.T378 M)

*Tác giả liên hệ: Email: tnguyen@igr.ac.vn

Whole exome sequencing revealed a large deletion in *EDA* of a Vietnamese patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia

Phuong Anh Nguyen¹, Thuy Duong Nguyen^{1,2*},
Van Hai Nong^{1,2}

¹Institute of Genome Research, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 15 June 2021; accepted 22 July 2021

Abstract:

Hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED) (OMIM # 305100) is a congenital genetic disorder caused by mutations in *EDA* (NM_001399) on chromosome X. Children with HED have the abnormal development of epidermal structures such as skin, hair, nails, teeth, and sweat glands. The present study aimed to detect mutations in *EDA* of a Vietnamese family with a son having only five teeth and no sweat glands, using whole exome sequencing (WES) and multiplex PCR. The results showed that patient had a deletion of exon 1 in *EDA* (c.2_396del), which is likely to be inherited from the healthy mother. The results will partly contribute to molecular studies on HED, helping in genetic counseling and disease treatment.

Keywords: *EDA*, hypohidrotic ectodermal dysplasia, mutation, Vietnam, whole exome sequencing.

Classification number: 3.1

và c.1045G>A (p.A349T) trên 8 bệnh nhân [10]. Nghiên cứu trên 2 bệnh nhân HED người Trung Quốc đã tìm được 2 đột biến là c.1127C>T (p.T376M) và mất đoạn c.648_683del ở gen *EDA* sử dụng WES [11]. Cho tới nay, theo thống kê của Cơ sở dữ liệu đột biến gen người đã ghi nhận có 357 đột biến được tìm thấy trên gen *EDA*, trong đó hơn 50% là các đột biến sai nghĩa và vô nghĩa, khoảng 25% là các đột biến mất đoạn lớn và nhỏ (www.hgmd.cf.ac.uk). Các đột biến còn lại là các chèn đoạn lớn nhỏ và các đột biến có ảnh hưởng tới quá trình cắt nối exon và intron [1]. Hầu hết các đột biến tìm thấy cho tới nay được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger và WES.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hoá để tìm hiểu các đột biến gen *EDA* ở một bệnh nhi mắc hội chứng loạn sản ngoại bì. Kết quả phát hiện đột biến mất toàn bộ exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA* ở

bệnh nhân. Đột biến này đã được kiểm tra lại trên các thành viên gia đình bằng kỹ thuật multiplex PCR. Kết quả này sẽ góp phần cho những nghiên cứu hội chứng loạn sản ngoại bì ở mức độ phân tử tiếp theo.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu của bố mẹ và bệnh nhân loạn sản ngoại bì được lấy, đựng trong ống chống đông EDTA và bảo quản ở -20°C. Việc tiến hành lấy mẫu và nghiên cứu trên người bệnh đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu Hệ gen đồng ý thông qua (Số: 2-2019/NCHG-HĐĐĐ).

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu đông lạnh, sử dụng kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, USA) theo hướng dẫn của hãng. Nồng độ và chất lượng của DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% và phương pháp quang phổ trên máy Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific, USA).

Phân tích WES

DNA tổng số của gia đình bệnh nhân sau khi phân cắt thành các đoạn ngắn 150-200 bp bằng sóng siêu âm được sử dụng cho chuẩn bị thư viện DNA với bộ kit SureSelectXT Human All Exon V6 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đến, thư viện hệ gen mã hoá được giải trình tự trên máy HiSeq 4000, Illumina, USA. Các đoạn đọc trình tự ngắn được đóng hàng vào bộ gen tham chiếu của người hg19 (Build 37.1) sử dụng Novoalign (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>). Các bản sao PCR được đánh dấu và lọc ra bởi Picard V.2.18.7 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Biến thể gen được phát hiện bằng GATK UnifiedGenotyper (<https://www.broadinstitute.org/gatk/index.php>). Tất cả các biến thể nucleotide đơn (SNV) hoặc indels có tần suất lớn hơn 1% xuất hiện ở IGS và gnomAD được loại bỏ. Sau đó, các biến thể còn lại được chú giải bằng phần mềm ANNOVAR

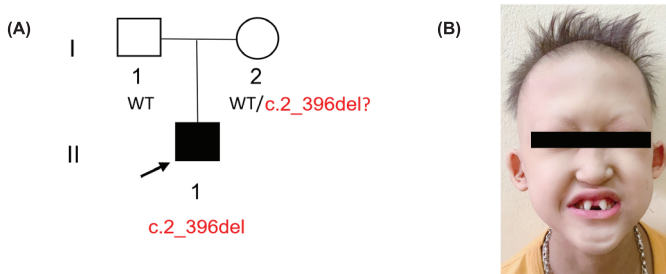
Phương pháp PCR và giải trình tự Sanger

DNA tổng số của bố mẹ và bệnh nhân được sử dụng khuếch đại toàn bộ 8 exon của gen *EDA* bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Phản ứng multiplex PCR cũng được thực hiện sử dụng đồng thời 2 cặp mồi đặc hiệu nhân exon 1 của gen *EDA* và exon 4 của gen *ACTB*. Các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen *EDA* và *ACTB* đã được công bố trên GenBank với mã số tương ứng là NM_001399 và NG_007992.1. Sản phẩm PCR được đánh giá chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,2%. Sản phẩm nhân gen *EDA* sau đó được tinh sạch và giải trình tự Sanger bằng kit đọc trình tự ABI Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, CA) trên máy đọc trình tự ABI 3500 (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự Sanger được phân tích bằng phần mềm BioEdit.

Kết quả

Bệnh nhân loạn sản ngoại bì

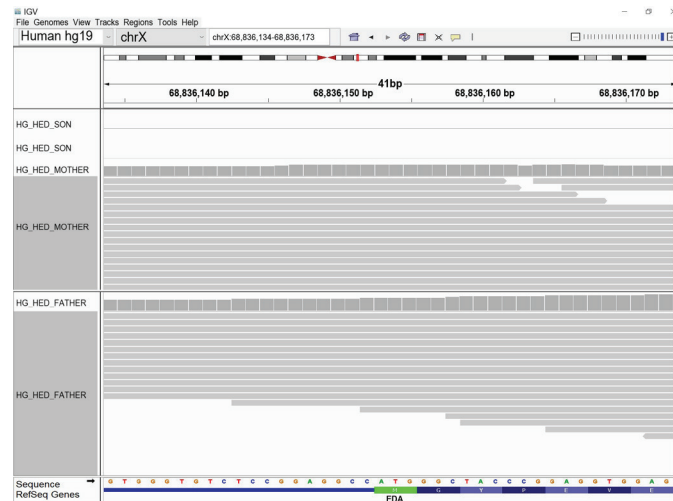
Bệnh nhân nhi sinh năm 2012 là con trai của một gia đình có bố mẹ khoẻ mạnh (hình 1A). Bệnh nhân có 4 răng ở hàm trên và 1 răng ở hàm dưới, các răng nhọn và có hình nón, không có tuyến mồ hôi, tóc mọc rất thưa thớt, trên da đầu bệnh nhân có các mảng hói bất thường (hình 1B). Lông mày và lông mi của bệnh nhân hoàn toàn không phát triển. Những đặc điểm này của bệnh nhân đều là những biểu hiện lâm sàng điển hình của hội chứng loạn sản ngoại bì thiếu tuyến mồ hôi.



Hình 1. Phả hệ và ảnh bệnh nhân loạn sản ngoại bì. (A) Phả hệ gia đình bệnh nhân. I.1: bố bệnh nhân không mang đột biến c.2_396del; I.2: mẹ bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử c.2_396del; II.1: bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử c.2_396del; (B) Ảnh chụp mặt bệnh nhân mắc loạn sản ngoại bì.

Kết quả WES

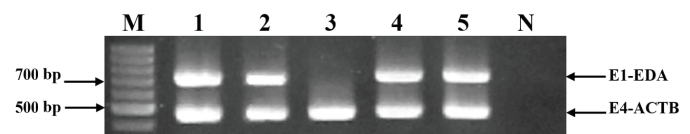
8 đoạn exon của gen *EDA* ở bệnh nhân và bố mẹ bệnh nhân được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Ở cả 3 lần khuếch đại gen, đều không thu được sản phẩm khuếch đại vùng exon 1 từ mẫu DNA của bệnh nhân. Kết quả giải trình tự các sản phẩm khuếch đại thu được bằng giải trình tự Sanger không phát hiện được đột biến nào ở cả bố mẹ và bệnh nhân. Do đó, tiến hành kỹ thuật WES của cả gia đình để xác định đột biến gây bệnh. Thông tin trình tự các đoạn đọc ngắn của toàn bộ các đoạn exon nhận được ở dạng file BAM của cả gia đình bệnh nhân sau khi được so sánh với hệ gen tham chiếu hg19 được sử dụng để kiểm tra số lượng đoạn đọc trên các mẫu. Kết quả hiển thị trên công cụ trực quan hoá dữ liệu hệ gen (Integrative genomics viewer - IGV) cho thấy, không có thông tin các đoạn đọc ngắn ở vùng exon 1 của gen *EDA* (chrX: 68,836,134-68,836,173) ở bệnh nhân, trong khi vùng gen này ở bố mẹ bệnh nhân vẫn có kết quả đọc (hình 2). Do đó, kết quả phân tích WES cho thấy, bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử mất đoạn toàn bộ vùng exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA*. Ngoài ra, kết quả còn cho thấy, số lượng đoạn đọc ngắn ở vùng exon 1 của gen *EDA* ở mẫu bố và mẹ là tương đối như nhau. Vì vậy, mẹ bệnh nhân có mang đột biến dị hợp tử c.2_396del trên gen *EDA*, do gen này nằm trên nhiễm sắc thể X. Bố bệnh nhân không mang đột biến. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác mẹ mang đột biến dị hợp tử c.2_396del, cần thực hiện thêm phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen hay phương pháp MLPA.



Hình 2. Kết quả WES của bệnh nhân, bố và mẹ được phân tích bằng công cụ IGV. HD_HED_SON: mẫu bệnh nhân, HD_HED_MOTHER: mẫu mẹ bệnh nhân, HD_HED_FATHER: mẫu bố bệnh nhân.

Kết quả multiplex PCR

Để kiểm tra lại kết quả WES, tiến hành phản ứng nhân gen sử dụng đồng thời 2 cặp mồi đặc hiệu, một cặp nhân exon 1 của gen *EDA* và 1 cặp mồi nội chuẩn nhân gen exon 4 của gen *ACTB*. Kết quả phản ứng multiplex PCR cho thấy thu được 2 băng đặc hiệu ở cả mẫu bố mẹ bệnh nhân, mẫu đối chứng nam và nữ khoẻ mạnh. Đây là sản phẩm khuếch đại của exon 1 gen *EDA* và exon 4 gen *ACTB* với kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết tương ứng khoảng 700 và 500 bp. Tuy nhiên, kết quả PCR chỉ thu được một băng khuếch đại exon 4 gen *ACTB* ở mẫu bệnh nhân, chứng tỏ bệnh nhân mang đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (hình 3).



Hình 3. Ảnh PCR exon 1 gen *EDA* và exon 4 gen *ACTB* trên gel agarose 1,2%. M: marker 100 bp; 1: sản phẩm PCR của bố bệnh nhân; 2: sản phẩm PCR của mẹ bệnh nhân; 3: sản phẩm PCR của bệnh nhân; 4: sản phẩm PCR của mẫu nam khoẻ mạnh; 5: sản phẩm PCR của mẫu nữ khoẻ mạnh; N: chứng âm.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, bệnh nhân nam có các triệu chứng điển hình của loạn sản ngoại bì như thiếu tuyến mồ hôi, tóc thưa, thiếu nhiều răng. Phân tích kết quả giải trình tự hệ gen mã hoá đã phát hiện được đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA* bắt đầu từ vị trí g.68836154 trên nhiễm sắc thể X ở bệnh nhân. Vị trí này tương ứng với vị trí nucleotide T trong bộ ba khởi đầu dịch mã ATG trên gen *EDA*. Đột biến mất đoạn này làm mã mở đầu không được nhận biết

và ảnh hưởng đến quá trình dịch mã bình thường của gen. Quá trình dịch mã có thể sẽ không xảy ra, hoặc được bắt đầu tại bộ ba ATG đầu tiên được tìm thấy trên exon 2. Đột biến mất toàn bộ exon 1 (c.2_396del) làm mất đoạn trình tự axit amin của chuỗi polipeptid (132 amino acid), ảnh hưởng lớn đến chức năng của protein. Đột biến này cũng đã được tìm thấy ở các bệnh nhân mắc bệnh không răng khác trên thế giới. Năm 2001, nghiên cứu của nhóm Pääkkönen và cs [12] trên 16 gia đình có bệnh nhân mắc HED, sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger đã phát hiện ra 13 đột biến gồm cả đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1. Năm 2011, Schneider và cs [13] đã nghiên cứu về khả năng tiết mồ hôi và kiểu gen của 31 bệnh nhân nam mắc hội chứng XLHED. Kết quả là đã phát hiện được 25 đột biến trên *EDA*, trong đó có 15 đột biến gồm đột biến điểm, mất đoạn lớn và nhỏ và 1 đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 trên 1 bệnh nhân. Những bệnh nhân XLHED mang đột biến mất đoạn trong nghiên cứu của Schneider đều không có khả năng tiết mồ hôi, giống như triệu chứng lâm sàng trên bệnh nhân trong nghiên cứu này. Điều đó cho thấy mối liên quan giữa đột biến mất đoạn lớn trên gen *EDA* với tổn thương chức năng của tuyến mồ hôi, một trong những yếu tố chính gây bệnh và tử vong của bệnh nhân XLHED. Năm 2019, nghiên cứu xác định đột biến gây bệnh ở 4 gen *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* và *WNT10A* trên 63 bệnh nhân HED người Tây Ban Nha cũng tìm thấy đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* trên 2 bệnh nhân [14]. Trong 63 bệnh nhân mắc hội chứng HED được nghiên cứu, sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger và kỹ thuật khuếch đại đa đoạn dò MLPA, đã phát hiện đột biến trên 47 bệnh nhân với 36 trường hợp đột biến nằm trên gen *EDA*. Các đột biến được tìm thấy trên gen *EDA* đều nằm trong các vùng được bảo tồn và có chức năng.

Trong nhiều nghiên cứu trước đây, ảnh hưởng của đột biến trên gen *EDA* tới các bệnh nhân không răng cũng đã được nghiên cứu. Các đột biến trên gen *EDA* chủ yếu nằm ở 4 vùng chức năng quan trọng, bao gồm vùng protein xuyên màng (Transmembrane domain - TM) có liên quan đến sự phân cực của các amino acid, vùng trình tự phân cắt đồng thuận furin tham gia vào quá trình phân cắt và giải phóng dạng hòa tan của các protein *EDA*, vùng collagen giúp liên kết nhiều chuỗi protein *EDA* với nhau kích thích con đường tín hiệu xuôi dòng và vùng tương đồng TNF ở đầu C-terminal (C-terminal THD) có vai trò trong việc hình thành trimer và liên kết đặc hiệu với các thụ thể [15]. Bất kỳ đột biến gen *EDA* nào được tìm thấy trong vùng cấu trúc THD, collagen, furin hay miền protein xuyên màng đều có thể gây ra hội chứng HED [1]. Theo các nghiên cứu trước đây, exon 1 là nơi chứa vùng nội bào nhỏ ở đầu N-terminal và miền protein xuyên màng TM [5, 12]. Do đó, đột biến mất đoạn exon 1 (c.2_396del) sẽ làm mất đi vùng chức năng quan trọng của gen, từ đó ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein. Hiện nay, các bệnh nhân HED được chẩn đoán dựa trên các đặc điểm lâm sàng biểu hiện ngay từ giai đoạn sơ sinh. Các xét nghiệm chẩn đoán đột biến trên các gen *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* hoặc *WNT10A* được tiến hành để kiểm chứng các chẩn đoán lâm sàng và sử dụng cho sàng lọc trước sinh cho các gia đình có tiền sử mắc bệnh. Hiện nay, chưa có cách điều trị cụ thể cho bệnh nhân

HED, người bệnh chỉ có thể khắc phục các triệu chứng lâm sàng như sinh sống trong môi trường mát mẻ để tránh thời tiết nóng và tăng thân nhiệt, chăm sóc nha khoa từ nhỏ và cấy ghép răng. Chính vì vậy, việc chẩn đoán và xác định đột biến có thể giúp tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình, từ đó có những phương pháp cải thiện sức khỏe và chất lượng cuộc sống [16].

Kết luận

Nghiên cứu đã phát hiện một đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (c.2_396del) gây hội chứng loạn sản ngoại bì HED ở một bệnh nhân nam. Đột biến này được di truyền từ mẹ của bệnh nhân. Kết quả nghiên cứu cho thấy tính ứng dụng cao của kỹ thuật WES trong xác định nguyên nhân gây bệnh di truyền. Kết quả này cũng cung cấp thông tin hữu ích cho việc điều trị bệnh nhân và tư vấn di truyền trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Reyes-Real, et al. (2018), "Hypohidrotic ectodermal dysplasia: clinical and molecular review", *Int. J. Dermatol.*, **57**(8), pp.965-972.
- [2] M. Mikkola (2009), "Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia", *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, pp.2031-2036.
- [3] S. Deshmukh, S. Prashanth (2012), "Ectodermal dysplasia: a genetic review", *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.*, **5**(3), pp.197-202.
- [4] W. Trzeciak, R. Koczorowski (2016), "Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update", *J. Appl. Genet.*, **57**, pp.51-61.
- [5] C. Kowalczyk-Quintas, P. Schneider (2014), "Ectodysplasin A (EDA) - EDA receptor signalling and its pharmacological modulation", *Cytokine Growth Factor Reviews*, **25**, pp.195-203.
- [6] F. Andreoni, et al. (2021), "Missense mutations in EDA and EDAR genes cause dominant syndromic tooth agenesis", *Mol. Genet. Genomic Med.*, **9**, DOI: 10.1002/mgg3.1555.
- [7] G. Mues, et al. (2010), "Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis", *Eur. J. Hum. Genet.*, **18**, pp.19-25.
- [8] J. Zonana, et al. (1993), "Detection of a molecular deletion at the DXS732 locus in a patient with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA), with the identification of a unique junctional fragment", *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, pp.78-84.
- [9] S. Huang, et al. (2015), "EDA mutation as a cause of hypohidrotic ectodermal dysplasia: a case report and review of the literature", *Genet. Mol. Res.*, **14**, pp.10344-10351.
- [10] V. Ngoc, et al. (2018), "Clinical, radiographic, and genetic characteristics of hypohidrotic ectodermal dysplasia: a cross-sectional study", *Clin. Genet.*, **94**, pp.484-486.
- [11] Y. Han, et al. (2020), "Pathogenic EDA mutations in Chinese han families with hypohidrotic ectodermal dysplasia and genotype-phenotype: a correlation analysis", *Front. Genet.*, **11**, p.21.
- [12] K. Pääkkönen, et al. (2001), "The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia", *Hum. Mutat.*, **17**, p.349.
- [13] H. Schneider, et al. (2011), "Sweating ability and genotype in individuals with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia", *J. Med. Genet.*, **48**, pp.426-432.
- [14] M. Martinez-Romero, et al. (2019), "EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population", *Orphanet. J. Rare Dis.*, **14**, p.281.
- [15] F. He, et al. (2018), "Conservation analysis and pathogenicity prediction of mutant genes of ectodysplasin A", *BMC Med. Genet.*, **19**, p.209.
- [16] J. Wright, et al. (1993), "Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia", *GeneReviews*, Seattle (WA), <http://europepmc.org/article/nbk1112>.