

# Xây dựng quy trình phát hiện đột biến điểm trên gen MECP2 ở bệnh nhi Việt Nam mắc hội chứng Rett

Lê Thị Khánh Vân<sup>1</sup>, Lê Duy Thái Dương<sup>2</sup>, Đỗ Thị Thu Hằng<sup>3</sup>, Huỳnh Thị Thuý Kiều<sup>1</sup>, Nguyễn Lê Trung Hiếu<sup>1</sup>, Bùi Thị Thùy Dung<sup>4</sup>, Nguyễn Thanh Vũ<sup>3</sup>, Nguyễn Quốc Dũng<sup>3</sup>, Huỳnh Thị Diệu Hiền<sup>3,\*</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

<sup>1</sup>Bệnh viện Nhi Đồng 2 TP HCM, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Tôn Đức Thắng, Việt Nam

<sup>3</sup>Khoa Y, ĐHQG-HCM, Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Nông Lâm, Việt Nam

## Liên hệ

**Huỳnh Thị Diệu Hiền**, Khoa Y, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: htddien@medvnu.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 23-06-2020
- Ngày chấp nhận: 22-9-2020
- Ngày đăng: 10-11-2020

## DOI:



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## TÓM TẮT

**Tổng quan:** Hội chứng Rett là một bệnh lý rối loạn chức năng não bộ tuy hiếm gặp nhưng ảnh hưởng rất nghiêm trọng lên sự phát triển bình thường của trẻ; bệnh chủ yếu gặp ở nữ với tỷ lệ 1 trên 10,000 - 15,000 trẻ em gái. Nguyên nhân gây bệnh chủ yếu do các biến thể *de novo* trên gen MECP2. Trên 80% bệnh nhân mắc hội chứng Rett mang đột biến điểm trên gen này. Nghiên cứu mối tương quan kiểu gen-kiểu hình trong hội chứng Rett mang lại cơ hội điều trị cho bệnh nhi. Ở Việt Nam, việc chẩn đoán chủ yếu dựa trên các tiêu chuẩn lâm sàng, chưa chú trọng đến xét nghiệm gen. Vì vậy, xây dựng một quy trình xét nghiệm và soát đột biến điểm gen MECP2 cung cấp bằng chứng cho chẩn đoán lâm sàng là cần thiết, đặc biệt hỗ trợ chẩn đoán trong giai đoạn sớm của bệnh nhi.

**Đối tượng và phương pháp:** Chuẩn hoá quy trình xét nghiệm gen MECP2 trên mẫu đối chứng bao gồm tối ưu hoá phản ứng PCR và giải trình tự Sanger. Đọc biến thể bằng phần mềm CLC workbench. Phân tích các biến thể được tìm thấy; đánh giá khả năng gây bệnh của biến thể bằng tiêu chuẩn ACMG. Quy trình hoàn thiện được ứng dụng lên 4 mẫu bệnh nhi mắc hội chứng Rett điều trị tại bệnh viện Nhi đồng II từ 01/2019 đến 12/2019.

**Kết quả:** Chúng tôi đã thiết kế mỗi và khuếch đại thành công cả 4 exon cùng các vùng lân cận đầu exon-intron của gen MECP2, đặc biệt exon 1 là vùng gen giàu GC (trên 65%). Kết quả giải trình tự cho tin hiệu tốt. Tìm thấy hai biến thể gây bệnh (p.R294X, p.K29X), trong đó có 1 biến thể mới chưa từng được công bố.

**Kết luận:** Quy trình giải trình gen MECP2 bằng kỹ thuật PCR-giải trình tự Sanger được tối ưu hoá thành công; đồng thời bổ sung 1 đột biến mới vào cơ sở dữ liệu biến thể gen MECP2.

**Từ khoá:** Hội chứng Rett, gen MECP2, giải trình tự Sanger

## GIỚI THIỆU

Hội chứng Rett (RTT, OMIM # 312750) là một bệnh lý ở não gây ra các rối loạn về phát triển thể chất và thần kinh nghiêm trọng được miêu tả lần đầu vào năm 1966 bởi bác sĩ Rett<sup>1</sup>. Bệnh nhân được sinh ra trong thai kỳ khỏe mạnh, tiền căn gia đình bình thường, trẻ phát triển bình thường sau sinh. Sau đó, khoảng 6-18 tháng tuổi trở đi trẻ bắt đầu xuất hiện các triệu chứng chậm phát triển, hạn chế giao tiếp bằng cử chỉ và ngôn ngữ, đặc biệt bằng mắt, giảm khả năng trí tuệ và có biểu hiện tự kỷ. Ngôn ngữ của trẻ bị mất một phần hoặc toàn bộ. Trẻ mắc hội chứng Rett giảm khả năng vận động, mất dần khả năng sử dụng bàn tay có chủ đích, có những cử động tự động như xoắn vặn bàn tay và các ngón tay. Ở giai đoạn muộn sau 3 tuổi, các rối loạn vận động, loạn trương lực cơ tiến triển nặng hơn gây bất thường dáng đi và cong vẹo cột sống, giảm sức cơ và tư thế bất thường. Các bệnh nhân thiếu đi một hoặc một số đặc điểm lâm sàng chính của hội chứng Rett điển hình<sup>2,3</sup> được gọi là mắc hội chứng

Rett không điển hình<sup>2</sup>. Ngoài ra, trẻ còn có các biểu hiện bệnh khác như co giật, khởi phát động kinh sau 3 tuổi, đầu nhỏ, tăng trưởng chậm, bất thường kiểu thở, rối loạn nhịp mạch, khó nuốt, rối loạn giấc ngủ và hành vi,...<sup>2</sup>. Việc chẩn đoán lâm sàng hội chứng Rett thường rơi vào giai đoạn muộn và dễ nhầm với các rối loạn phổ tự kỷ hay chậm phát triển<sup>4</sup>.

Hội chứng Rett chủ yếu ảnh hưởng đến nữ giới. Theo thống kê, tỉ lệ mắc bệnh là 1:10,000 đến 1:15,000 không phân biệt chủng tộc, sắc tộc, vị trí địa lý. Hiếm ca bệnh Rett được ghi nhận ở nam giới, do những tổn hại quá lớn gây ra bởi những bất thường của yếu tố di truyền trước khi trẻ chào đời hoặc chết rất non<sup>3,5</sup>.

Cho đến nay, nguyên nhân di truyền gây ra Hội chứng Rett có liên quan nhất và được các nhà di truyền học đặc biệt quan tâm nghiên cứu là các biến thể *de novo* trên gen Methyl-CpG-binding Protein 2 hay gọi tắt là MECP2<sup>6,7</sup>. Biến thể ở gen này là nguyên nhân gây hội chứng Rett với tỉ lệ rất cao khoảng trên 92% trong hội chứng Rett điển hình và 50-70% ở hội chứng Rett

**Trích dẫn bài báo này:** Vân L T K, Dương L D T, Hằng D T T, Kiều H T T, Hiếu N L T, Dung B T T, Vũ N T, Dũng N Q, Hiền H T D. **Xây dựng quy trình phát hiện đột biến điểm trên gen MECP2 ở bệnh nhi Việt Nam mắc hội chứng Rett**. *Sci. Tech. Dev. J. - Health Sci*; 1(1):27-34.

không điển hình<sup>8,9</sup>. Một số bệnh nhân Rett không tìm thấy biến thể trên gen *MECP2* có biến thể rải rác trên các gen khác như *CDKL5*, *FOXG1*<sup>10,11</sup>. Các nghiên cứu trên thế giới vẫn đang tiếp tục giải thích và làm rõ các bất thường gen gây ra hội chứng Rett. Xét nghiệm *MECP2* được xem như một tiêu chuẩn cận lâm sàng tin cậy hỗ trợ trong chẩn đoán hội chứng Rett trên thế giới.

*MECP2* là một protein có vai trò quan trọng trong tất cả các tế bào của người, nhất là các tế bào thần kinh. Sự thiếu hụt hay dư thừa của *MECP2* đều dẫn đến các rối loạn bệnh lý. Thiếu hụt *MECP2* được ghi nhận trong các hội chứng Rett, hội chứng Angelman, tự kỷ, thiếu năng, bệnh não sơ sinh, hội chứng Down, hội chứng Prader Willi, rối loạn tăng động giảm chú ý<sup>4</sup>. ... Sự nhân lên của gen *MECP2* được phát hiện gây nên chứng thiếu năng, kém hoạt động, nhiễm trùng đường hô hấp, không phát triển khả năng giao tiếp bằng lời nói, động kinh và liệt cứng ở nam giới<sup>5</sup>. Bởi vì, *MECP2* được biết đến như protein đa chức năng, ảnh hưởng đến quá trình điều hòa biểu hiện gen và quá trình trao đổi chất<sup>12</sup>.

Gen *MECP2* mã hóa cho protein *MECP2* (*Methyl CpG binding Protein 2*) chuyên bám vào DNA đã được methyl hóa nhằm điều hòa biểu hiện của gen. Quá trình methyl hoá cho phép tắt mở phiên mã các gen đó. Vì vậy, những biến đổi trên gen *MECP2* sẽ gây ảnh hưởng lên chức năng của các gen khác<sup>13</sup>. Đặc biệt, gen *MECP2* liên kết với nhiễm sắc thể (NST) giới tính X ở vị trí q28 do đó có thể làm bất hoạt NST này. Gen trải dài trên 76 kb của bộ gen và có 4 exon. Gen *MECP2* mã hóa cho nhiều đồng phân protein, quan trọng nhất là 2 đồng phân *MECP2e1* và *MECP2e2*<sup>14</sup>. Nghiên cứu ảnh hưởng của yếu tố di truyền đầu tiên tiến hành trên đồng phân *MECP2e2*. Tuy nhiên, các nghiên cứu gần đây tìm thấy đột biến trên exon 1 mã hoá cho đồng phân *MECP2e1* cũng là nguyên nhân gây ra hội chứng Rett<sup>15-17</sup>.

Khoảng 1000 biến thể trên gen *MECP2* đã được công bố cho tới nay<sup>18</sup>. Trong đó, có 8 vị trí hot-spot được tìm thấy trong hội chứng này. Hiện tại, ở nước ta nghiên cứu trên hội chứng Rett còn khá hạn chế, trong đó mới chỉ có 1 nghiên cứu phân tích biến thể gen *MECP2* trên bệnh nhân Rett. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã bỏ qua việc phân tích đột biến trên exon 1 trong khi nhiều nghiên cứu gần đây trên thế giới cho thấy rằng đột biến trên exon 1 được ghi nhận trong nhiều bệnh nhân mắc hội chứng Rett. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tối ưu hoá quy trình PCR- Sanger sequencing để giải toàn bộ 4 exon gen *MECP2*. Từ đó, nghiên cứu này tạo tiền đề cho việc chẩn đoán sớm và tư vấn di truyền; đồng thời xây dựng dữ liệu dịch tế học phân tử về hội chứng Rett liên quan đến biến thể gen *MECP2* trên dân số Việt Nam.

## ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Thiết kế nghiên cứu

Nguyên cứu cắt ngang mô tả.

### Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu bao gồm xây dựng và tối ưu quy trình trên mẫu đối chứng người bình thường. Sau đó áp dụng quy trình đã tối ưu lên 4 bệnh nhi mắc hội chứng Rett. Tất cả bệnh nhi được chẩn đoán bởi bác sĩ chuyên khoa thần kinh theo tiêu chuẩn chẩn đoán sửa đổi và bổ sung năm 2010<sup>2</sup> (phụ lục 1). Tất cả bệnh nhi là nữ và được điều trị tại bệnh viện Nhi đồng 2 Tp. Hồ Chí Minh từ tháng 1/2019 đến tháng 12/2019.

Đề tài được thông qua bởi hội đồng Y Đức Bệnh viện Nhi Đồng II, mã số CS/N2/18/01HT.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Tách chiết DNA từ máu ngoại vi

200 $\mu$ l máu tĩnh mạch đựng trong các tube có chứa EDTA chống đông được tách và trữ đúng quy cách. Quy trình tách chiết được thực hiện bằng bộ kit QI-Aamp DNA Blood Mini Kit của QIAGEN theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### Khảo sát và tối ưu hóa phản ứng PCR

Sáu cặp mồi được thiết kế bằng phần mềm CLC main workbench (CLC bio) kết hợp với phần mềm thiết kế mồi Primer3 Plus dựa trên trình tự NG\_0071072 và được kiểm tra độ đặc hiệu bằng phần mềm PrimerBlast. Sử dụng phần mềm Oligo analyzer (Integrated DNA Technologies, Inc.) kiểm tra các thông số hoạt động và độ nhạy của mồi.

Phản ứng PCR được thực hiện bởi 2 bộ kit là QI-AGEN Multiplex PCR Kit cho exon 1 giàu GC và Q5<sup>®</sup> High-Fidelity 2X Master Mix, bao gồm các thành phần dNTP, Mg<sup>2+</sup>, DNA polymerase và các hóa chất đệm, ...

Chúng tôi tiến hành tối ưu hoá nhiệt độ bắt cặp của mồi, thành phần phản ứng cũng như dung dịch đệm để đạt hiệu quả tốt nhất của phản ứng.

#### Giải trình tự và phân tích kết quả

Mẫu sau được khuếch đại sẽ đem giải trình tự trên máy 3130 AB Biosystems. Hoá chất sử dụng BigDye<sup>™</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (hãng Thermo FirsherScientific).

Phân tích kết quả giải trình tự bằng phần mềm CLC Mainworkbench (CLC bio) với trình tự tham khảo cDNA đầy đủ của gen *MECP2* được lấy từ GenBank

(mã số cho biến thể *MECP2e2*: NM\_004992; mã số cho biến thể *MECP2e1*: NM\_001110792).

Sử dụng tiêu chuẩn phân loại và đánh giá khả năng gây bệnh của biến thể theo Hiệp Hội Di truyền Y học và Hệ Gen Hoa Kỳ (American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)<sup>19</sup>.

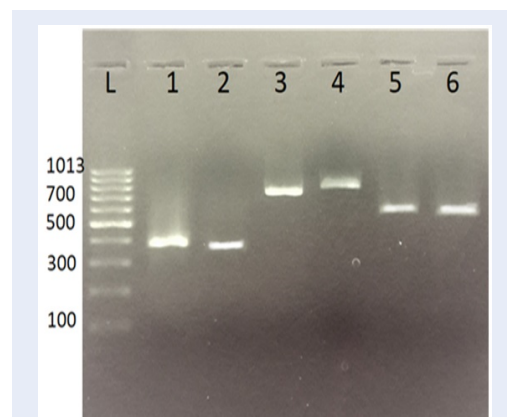
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Thu thập mẫu bệnh phẩm và tách chiết DNA

Nghiên cứu này bao gồm 4 bệnh nhi nữ mắc hội chứng Rett được chuẩn đoán và điều trị tại bệnh viện Nhi Đồng 2 Tp HCM. Kết quả tách chiết DNA cho thấy tất cả các mẫu tách chiết đều đạt nồng độ từ 40 – 60  $\mu\text{g/ml}$  và độ tinh sạch cao ( $\text{OD}_{260}/280 = 1,8-1,9$ ).

### Kết quả tối ưu phản ứng PCR

Chúng tôi khảo sát nhiệt độ bắt cặp ( $55^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$ ) dựa vào nhiệt độ nóng chảy của mỗi và các thành phần của phản ứng. Kết quả thu nhận nhiệt độ tối ưu của các cặp mỗi tương ứng với exon 2, 3, 4C là  $63^{\circ}\text{C}$ , exon 4A là  $62^{\circ}\text{C}$ , exon 4B là  $67^{\circ}\text{C}$ , exon 1 là  $59^{\circ}\text{C}$ . Thành phần của phản ứng đạt nồng độ cuối khuếch đại exon 1, 2, 3, 4A, 4B, 4C bao gồm mỗi ngược và mỗi xuôi: 0,5mM; MasterMix: 1X; DNA: 1,5ng/ $\mu\text{L}$ ; nước denuclease đến thể tích cần thiết của phản ứng. Trong đó, exon 1 giàu GC, để thực hiện phản ứng PCR chúng tôi sử dụng thêm dung dịch đệm Q-solution của QIAGEN (chứa DMSO). Kết quả khuếch đại gen sau PCR được kiểm tra bằng điện di (Hình 1), cho thấy cả 6 cặp mỗi đều khuếch đại đặc hiệu và sản phẩm PCR đủ điều kiện để sử dụng cho quy trình giải trình tự. Danh sách 6 cặp mỗi đã tối ưu như Bảng 1.



**Hình 1:** Kết quả điện di 6 sản phẩm PCR của gen *MECP2*. L: thang 1kb; 1: exon 1; 2: exon 2; 3: exon 3; 4,5,6: exon 4

### Kết quả giải trình tự và phân tích gene

Gen *MECP2* được giải trình tự toàn bộ 4 exon bằng kỹ thuật Sanger tự động cho kết quả tin hiệu tốt và ổn định được ghi nhận trên mẫu đối chứng. Sau đó chúng tôi áp dụng quy trình lên 04 mẫu bệnh nhi tìm thấy các biến thể trên gen *MECP2* (Hình 2, 3, 4 và 5). Chúng tôi tìm thấy 2 biến thể dừng phiên mã, bao gồm: c.880C>T (hình 2) (NM\_004992) và c.85A>T (hình 3) (NM\_004992) ở bệnh nhi số 1 và số 2. Biến thể c.880C>T trên exon 4 làm thay đổi trình tự acid amin thứ 294 trong chuỗi polypeptide từ Arginine thành codon dừng phiên mã (p.R294X). Biến thể c.85A>T, làm thay đổi amino acid tại vị trí 29 amino acid Lysine thành codon dừng phiên mã (p.K29X).

Áp dụng tiêu chuẩn ACMG để phân loại biến thể, kết quả cho thấy 2 biến thể vùng exon đều là biến thể gây bệnh. Đột biến c.880C>T là đột biến có tần số cao chiếm gần 5% trong tổng số đột biến tìm thấy trên gen *MECP2* đã được công bố gây hội chứng Rett<sup>18</sup>. Cơ sở dữ liệu ClinVar ghi nhận biến thể với mã rs61751362, và thống kê cho thấy hầu hết các nghiên cứu đều phân tích đây là biến thể gây bệnh. Riêng đột biến dừng phiên mã sớm c.85A>T là đột biến gây bệnh mới nằm trên domain N-term và chưa từng được công bố.

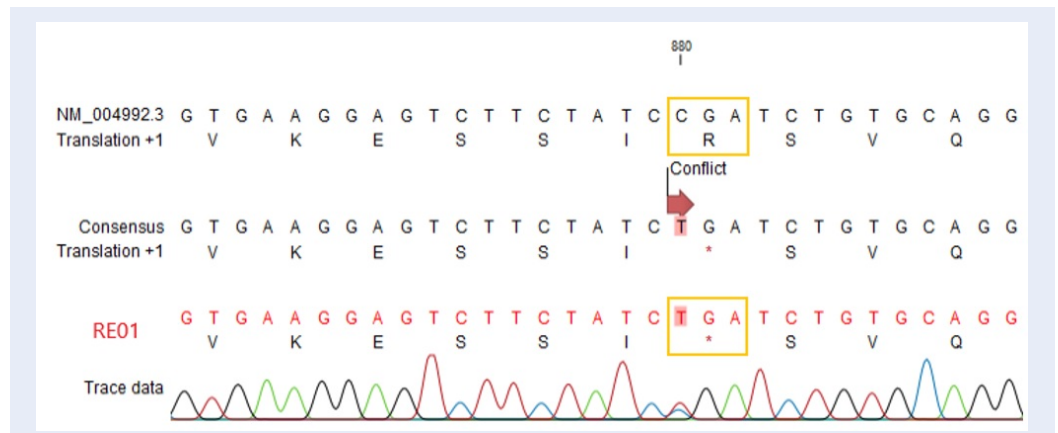
Ngoài ra, chúng tôi tìm thấy 4 biến thể không gây bệnh (SNV) trên 3 bệnh nhi nữ bao gồm: c.602C>T trên bệnh nhi số 2, biến thể vùng intron: c.377+13A>C (hình 4), c.377+22C>G (hình 4), c.378-74C>T (hình 5) trên bệnh nhân 3 và bệnh nhân 4.

Các vị trí SNV c.602C>T, c.377+22C>G, c.378-74C>T đã được ghi nhận trên thế giới<sup>18</sup>. Riêng biến thể c.377+13A>C là biến thể lành tính lần đầu tiên được ghi nhận trong nghiên cứu này. Khảo sát đặc tính di truyền cho thấy tất cả các biến thể này được di truyền từ người bố. Sử dụng công cụ InterVar (phân loại biến thể theo tiêu chuẩn ACMG) để dự đoán ảnh hưởng của các biến thể, kết quả cho thấy đây là các biến thể không gây bệnh. Trong đó, các biến thể xuất hiện trên chủng người Việt với tần số như sau c.602 C>T (rs61748381<sup>20</sup> là 0.03; c.377+22 C>G (rs2075597<sup>20</sup> là 0,128; c.378-74C>T (rs2071569<sup>20</sup>). Các biến thể này được ghi nhận trước đó cho thấy chúng xuất hiện trong hội chứng Rett, tự kỷ, và các hội chứng rối loạn nhận thức không thường xuyên.

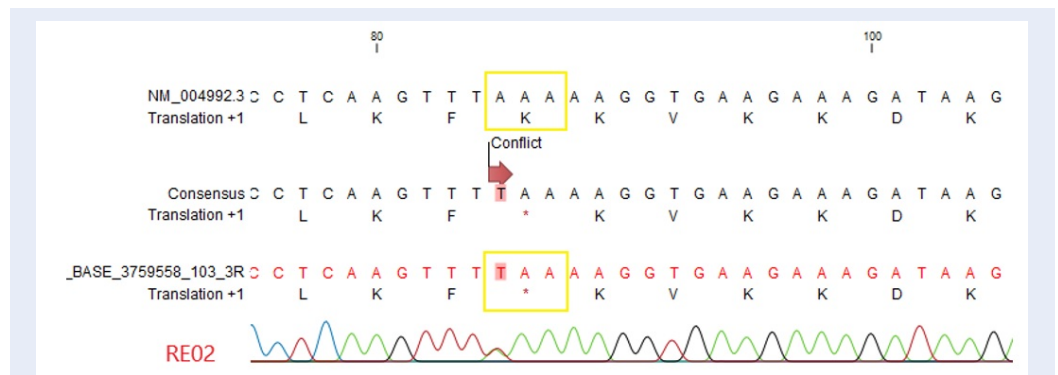
Biến thể trên gen *MECP2* đã được báo cáo là nguyên nhân gây ra khoảng hơn 92% các trường hợp mắc hội chứng Rett điển hình và khoảng 50 -70% hội chứng Rett không điển hình<sup>18</sup>. Hiện nay, khoảng 1000 biến thể *MECP2* đã được phát hiện và phần lớn là đột biến điểm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã ghi nhận hai biến thể p.R294X (cắt cụt gần 45% protein), p.K29R (cắt cụt gần 95% protein) làm mất chức năng

**Bảng 1:** Danh sách 6 cặp mỗi khuếch đại gen MECP2

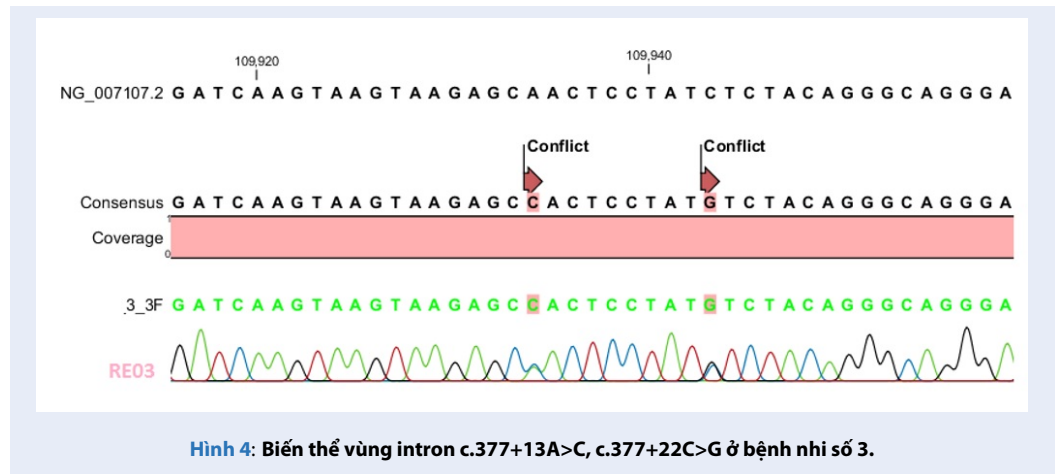
TÊN	TRÌNH TỰ	ĐỘ DÀI ĐOẠN MỖI (bp)	ĐỘ DÀI KHUẾCH ĐẠI ĐOẠN GEN (bp)	NGUỒN THAM KHẢO
Exon 1	CCATCACAGCCAATGACG	18	385	7
	AGGGGGAGGGTAGAGAGGAG	20		
Exon 2	TCAAAATGTCCCAAATAGCCCT	22	350	
	TGTCTTTAGTCTTTGGGGTACTT	23		
Exon 3	ACCCACAGCCCAAATTCCTA	20	697	
	ACGGTCATTTCAAGCACACC	20		
Exon 4A	GAGTGAGTGGCTTTGGTGAC	20	691	
	TACGGTCTCCTGCACAGATC	20		
Exon 4B	ACCACATCCACCCAGGTCAT	20	532	7
	TCTCCTCTTTGCAGACGCTG	20		
Exon 4C	ACCACCATCACCACCACTCAGA	22	518	
	CCCTGAAGCCACGAAACTCTAA	22		



**Hình 2:** Biến thể c.880C>T ở bệnh nhi số 1 thay đổi protein Arginine thành codon dừng phiên mã.



**Hình 3:** Biến thể c.85A>T ở bệnh nhi số 2 thay đổi protein Lysine thành codon dừng phiên mã.



của protein *MECP2*. Về mặt lâm sàng, hai bệnh nhi Rett mang hai biến thể này có những đặc điểm kiểu hình Rett điển hình, xét nghiệm gen khi đã ở giai đoạn muộn khi bệnh nhân số 1 mười tuổi và bệnh nhân số 2 sáu tuổi. Hai bệnh nhân này mất ngôn ngữ và mất khả năng giao tiếp; mất khả năng điều khiển tay, không thực hiện được các hoạt động tay phối hợp. Có các cử động tay bất thường không chủ đích: đưa tay vào miệng, thực hiện thao tác xoắn vặn bàn tay ngón tay; khó khăn và không thể đi đứng bình thường được, hay té ngã do rối loạn trương cơ; bất thường kiểu thở với đặc điểm thở mạnh và chảy nhiều nước bọt; phát triển thể chất bất thường đặc biệt là gù lưng và một số biểu hiện không đặc hiệu khác như gầy ốm, hay la hét, dễ kích động...

Gần đây, nghiên cứu về biến thể gen *MECP2* trên hội chứng Rett ở nước ta chỉ còn rất hạn chế và chỉ mới tập trung vào các exon 2, 3 và 4<sup>21</sup>. Do vậy, nghiên cứu này là bước đầu để phân tích thay đổi trên toàn bộ 4 exon của gen *MECP2* ở các bệnh nhân mắc hội chứng Rett; từ đó, thiết lập được quy trình xét nghiệm gen

*MECP2* nhanh, tiết kiệm và đáng tin cậy, góp phần phát hiện và tầm soát biến thể gen liên quan đến hội chứng Rett, giảm bớt gánh nặng cho các gia đình có bệnh nhân mắc bệnh. Nghiên cứu được thực hiện trên số mẫu khá hạn chế, do vậy đây chỉ là nghiên cứu khởi đầu cho bước tiếp theo thực hiện nghiên cứu trên số lượng mẫu lớn để ứng dụng triển khai trên lâm sàng. Tuy vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã bổ sung được 1 biến thể gây bệnh (c.85A>T) và 1 SNV (c.377+13A>C) mới vào ngân hàng dữ liệu biến thể gen *MECP2* thế giới.

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng thành công và hoàn thiện quy trình phát hiện đột biến điểm trên gen *MECP2* bằng kỹ thuật PCR-sequencing trên các bệnh nhi mắc hội chứng Rett. Nghiên cứu này là cơ sở để triển khai khảo sát biến thể gen *MECP2* trên bệnh nhân hội chứng Rett.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP.HCM (Mã số đề tài C2018-44-02).

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

**MECP2:** Methyl CpG binding Protein 2

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**ACMG:** American College of Medical Genetics and Genomics

**SNV:** Single Nucleotide Variant

**c.880C>T:** Biến thể tại vị trí 880 trên vùng mã hoá gen làm thay đổi nucleotide C thành T so với gen tham chiếu

**c.85A>T:** Biến thể tại vị trí 85 trên vùng mã hoá gen làm thay đổi nucleotide C thành T so với gen tham chiếu

**c.602C>T:** Biến thể tại vị trí 602 trên vùng mã hoá gen làm thay đổi nucleotide C thành T so với gen tham chiếu

**c.377+13A>C:** Biến thể tại vùng intron trên cách vùng mã hoá 13 nucleotide tại vị trí 377 làm thay đổi nucleotide A thành C so với gen tham chiếu

**c.377+22C>G:** Biến thể tại vùng intron trên cách vùng mã hoá 22 nucleotide tại vị trí 377 làm thay đổi nucleotide A thành T so với gen tham chiếu

**c.378-74C>T:** Biến thể tại vùng intron trên cách vùng mã hoá 74 nucleotide tại vị trí 378 làm thay đổi nucleotide A thành T so với gen tham chiếu

**p.R294X:** Acid amin Arginine tại vị trí 294 bị thay đổi thành codon dừng phiên mã so với protein tham chiếu

**p.K29R:** Acid amin Lysin tại vị trí 29 bị thay đổi thành codon dừng phiên mã so với protein tham chiếu

## XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết rằng không có xung đột lợi ích khi thực hiện nghiên cứu này.

## ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Tất cả tác giả đã đóng góp vào việc thiết kế nghiên cứu, giải thích kết quả nghiên cứu, viết và chỉnh sửa bản thảo của bài báo, xem xét cẩn thận đồng ý nộp bản thảo hoàn chỉnh này.

## ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH

Nghiên cứu thuộc đề tài C2018-44-02 ĐHQG TPCHM của KHOA Y ĐHQG TPCHM đã được phê duyệt về các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học, chấp thuận số CS/N2/18/01HT của Hội đồng khoa học/Y đức Bệnh Viện Nhi Đồng II.

## PHỤ LỤC 1

**Tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh nhân mắc hội chứng Rett thu mẫu cho nghiên cứu này<sup>2</sup>.**

**Chỉ tiêu đánh giá**

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:

Bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng Rett cả điển hình hoặc Rett không điển hình.

A. Bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng Rett điển hình khi:

(1) Bệnh nhân tồn tại một giai đoạn phục hồi (hồi quy)

(2) Có tất cả các tiêu chuẩn chính (bảng bên dưới) và không bao gồm các tiêu chuẩn loại trừ (bảng bên dưới).

(3) Có các tiêu chuẩn phụ trợ đi kèm, điều này là không bắt buộc tuy nhiên trẻ thường sẽ có hầu hết các đặc điểm trong tiêu chuẩn phụ trợ.

B. Bệnh nhân được chẩn đoán mắc hội chứng Rett không điển hình khi:

(1) Bệnh nhân tồn tại một giai đoạn phục hồi (hồi quy)

(2) Ít nhất 2 trong số 4 tiêu chuẩn chính

(3) 5 trên 11 tiêu chuẩn phụ trợ

Ngoài ra tiêu chuẩn: giảm kích thước vòng đầu của trẻ chưa được xem xét trong bảng tiêu chuẩn này. Ở đây, chúng tôi tạm đánh giá tiêu chuẩn này là 1 tiêu chuẩn phụ trợ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rett A. On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. Wiener Medizinische Wochenschrift. 1966;116(37):723-726.
2. Jeffrey LN, Walter EK, Daniel GG, John C, Angus JC, Alan KP, et al. RettSearch 'Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature'. Ann Neurol. 2010;68:944-950. PMID: 21154482. Available from: <https://doi.org/10.1002/ana.22124>.
3. Rett A. Rett Syndrome. History and General Overview. Am J Med Genet Suppl. 1986;1:21-25. PMID: 3087183. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320250503>.
4. Matthew JL, Adrian B, Rett Syndrome: A Complex Disorder with Simple Roots. Nat Rev Genet. 2015;16:261-275. PMID: 25732612. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg3897>.
5. Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C, Scurlock J, Percy AK, et al. Early Progressive Encephalopathy in Boys and MECP2 Mutations. Neurology. 2006;67:164-166. PMID: 16832102. Available from: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223318.28938.45>.
6. Amir RE, Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett Syndrome Is Caused by Mutations in X-Linked MECP2, Encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2. Nat Genet. 1999;23:185-188. PMID: 10508514. Available from: <https://doi.org/10.1038/13810>.
7. Webb T, Latif F. Rett Syndrome and the MECP2 Gene. J Med Genet. 2001;31:217-223. PMID: 11283201. Available from: <https://doi.org/10.1136/jmg.38.4.217>.
8. Percy AK, Lane JB, et al. Rett Syndrome: Clinical and Molecular Update. Curr Opin Pediatr. 2004;16:670-677. PMID: 15548931. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.mop.0000143693.59408.ce>.
9. Percy AK, Lane JB, Childers J, Skinner S, Annese F, MacLeod P. Rett Syndrome: North American Database. J Child Neurol. 2007;22:1338-1341. PMID: 18174548. Available from: <https://doi.org/10.1177/0883073807308715>.
10. Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Renieri A, et al. Foxg1 Is Responsible for the Congenital Variant of Rett Syndrome. Am J Hum Genet. 2008;83:89-93. PMID: 18571142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.015>.

**Bảng 2:**

Tiêu chuẩn chính	
1	Mất một phần hoặc toàn bộ các kỹ năng tay có chủ đích.
2	Mất một phần hoặc toàn bộ kỹ năng ngôn ngữ.
3	Bất thường vận động đi đứng: khiếm khuyết hoặc không đi lại.
4	Cử động tay đơn giản: xoắn vặn bàn tay, vỗ tay, rửa tay hay cử động đưa tay vào miệng.
Tiêu chuẩn phụ trợ	
1	Thở khó khi thức
2	Nghiến răng khi thức
3	Rối loạn giấc ngủ
4	Đặc điểm cơ bất thường
5	Rối loạn nhịp mạch
6	Chứng cong vẹo cột sống/gù.
7	Chậm phát triển thể chất: giảm cân
8	Bàn tay nhỏ và lạnh
9	Rối loạn hành vi: Cười hoặc la hét
10	Giảm phản ứng với cơn đau
11	Trẻ biểu hiện tự kỷ: giảm giao tiếp bằng mắt
Tiêu chuẩn loại trừ Rett điển hình/không điển hình	
1	Chấn thương não do chấn thương sọ não (peri hoặc hậu sản), bệnh thần kinh, hoặc nhiễm trùng nặng gây ra các vấn đề thần kinh.
2	Sự phát triển thần kinh bất thường trước 6 tháng đầu đời.

- Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Bienvenu T, et al. Key Clinical Features to Identify Girls with Cdk15 Mutations. *Brain*. 2008;131:2647–2661. PMID: 18790821. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awn197>.
- Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, Lubs H, Stevenson RE, et al. Recurrent Infections, Hypotonia, and Mental Retardation Caused by Duplication of MECP2 and Adjacent Region in Xq28. *Pediatrics*. 2006;118:e1687–e1695. PMID: 17088400. Available from: <https://doi.org/10.1542/peds.2006-0395>.
- Nagarajan RB, Hogart AR, Gwyne Y, Martin MR, LaSalle JM. Reduced MECP2 Expression Is Frequent in Autism Frontal Cortex and Correlates with Aberrant MECP2 Promoter Methylation. *Epigenetics*. 2006;1:e1–e11. PMID: 17486179. Available from: <https://doi.org/10.4161/epi.1.4.3514>.
- Reichwald K, Thiesen J, Wiehe T, Weitzel A, Platzer M, et al. Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mammalian Genome*. 2000;11:182–190. PMID: 10723722. Available from: <https://doi.org/10.1007/s003350010035>.
- Aline Q, Saliha Y, Hervé F, Thierry B, Anne M, Christophe P, et al. Deleterious mutations in exon 1 of MECP2 in Rett syndrome. *European Journal of Medical Genetics*. 2006;49(4):313–322. PMID: 16829352. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2005.11.002>.
- Carol JS, Berge EM, Eva WCC, Weiwei Z, John BV. Novel exon 1 mutations in MECP2 implicate isoform MeCP2\_e1 in classical Rett syndrome. *Am J Med Genet*. 2009;149A:1019–1023. PMID: 19365833. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32776>.
- Bartholdi D, Klein A, Weissert M, Koenig N, Mátyás G, et al. Clinical profiles of four patients with Rett syndrome carrying a novel exon 1 mutation or genomic rearrangement in the MECP2 gene. *Clin Genet*. 2006;69(4):319–326. PMID: 16630165. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00604.x>.
- Krishnaraj R, Ho G, Christodoulou J. RettBASE: Rett syndrome database update. *Hum Mutat [RettBASE: RettSyndromeorg Variation Database mecp2chweduau]*. 2017; PMID: 28544139. Available from: <https://doi.org/10.1002/humu.23263>.
- Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–424. PMID: 25741868. Available from: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- ; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
- Huong LTT, Trinh DTD, Chinh VD, Ha LTT, Hoa BTP, and Liem NT. Spectrum of MECP2 mutations in Vietnamese patients with RETT syndrome. *BMC Med Genet*. 2018;19:137. PMID: 30081849. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0658-x>.

# An optimized method for detection of MECP2 point mutations in Vietnamese children with rett syndrome

Le Thi Khanh Van<sup>1</sup>, Le Duy Thai Duong<sup>2</sup>, Do Thi Thu Hang<sup>3</sup>, Huynh Thi Thuy Kieu<sup>1</sup>, Nguyen Le Trung Hieu<sup>1</sup>, Bui Thi Thuy Dung<sup>4</sup>, Nguyen Thanh Vu<sup>3</sup>, Nguyen Quoc Dung<sup>3</sup>, Huynh Thi Dieu Hien<sup>3</sup>



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

**Background:** Rett syndrome is a rare disease but affecting severe brain dysfunction. The rate of the syndrome is estimated to be 1/10,000–1/15,000 female births. This disorder is knowledge caused by de novo mutations in the MECP2 gene. More than 80% of patients with Rett syndrome have a point mutations in MECP2. The study correlation genotype-phenotype open to therapeutic opportunities for patients. In Vietnam, to validate the diagnosis, the doctors are mainly clinical diagnostic standards, not include genetics testing. Therefore, optimize the producer to determine MECP2 variations is necessary that provides evidence for clinical diagnosis, supporting the early-stage diagnosis of pediatric patients.

**Methods:** Standardization of the MECP2 gene testing sequence used the healthy control blood samples includes PCR optimization and Sanger sequencing. Read raw sequence data by CLC workbench software. Analysis variations; evaluate the pathogenic of the variants with ACMG standard. After that, the process was applied to 4 pediatric patients with Rett syndrome treated at Children's Hospital II from 01/2019 to 12/2019.

**Result:** We successfully optimized PCR-Sanger sequencing for the testing MECP2 variants gene, especially in exon 1 had high GC-percent (>65%). The quality sequencing result was quite reliable. We found two pathogenic mutations (p.R294X, p.K29X); and a novel mutation (p.K29X).

**Conclusion:** The process of the test gene MECP2 by PCR technique-Sanger sequencing was optimized completely, and add a novel mutation to the MECP2 variation database.

**Key words:** Rett syndrome, MECP2, Sanger sequencing

<sup>1</sup>Children's Hospital II HCM, Vietnam

<sup>2</sup>Ton Duc Thang University, Vietnam

<sup>3</sup>School of Medicine-VNU HCM, Vietnam

<sup>4</sup>Nong Lam University HCM, Vietnam

## History

- Received: 23-06-2020
- Accepted: 22-9-2020 •
- Published: 10-11-2020

DOI :



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article :** Van L T K, Duong L D T, Hang D T T, Kieu H T T, Hieu N L T, Dung B T T, Vu N T, Dung N Q, Hien H T D. **An optimized method for detection of MECP2 point mutations in Vietnamese children with rett syndrome.** *Sci. Tech. Dev. J. - Health Sci.*; 1(1):27-34.