

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *RB1* Ở TRẺ EM UNG THƯ NGUYÊN BÀO VÔNG MẠC

Nguyễn Hải Hà¹, Đỗ Mạnh Hưng¹, Lê Thúy Quỳnh², Nguyễn Thùy Dương¹, Nguyễn Đăng Tôn¹

¹ Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Bệnh Viện Mắt Trung ương, Bộ Y tế

Ngày nhận bài: 25.02.2014

Ngày nhận đăng: 18.3.2014

TÓM TẮT

Ung thư nguyên bào võng mạc (UTNBVM) là bệnh u võng mạc ác tính ở trẻ em thường được phát hiện trước 5 tuổi. Bệnh này phát triển khi cả hai allele của gen *RB1* nằm trên nhiễm sắc thể số 13q14.2 bị đột biến. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định các đột biến trên gen *RB1* của hai trẻ em mắc UTNBVM ở Việt Nam. Mẫu máu ngoại vi của các bệnh nhi đã được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu. Vùng điều khiển và toàn bộ vùng mã hóa gen *RB1* được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Hai đột biến dị hợp tử gây dịch khung trên gen *RB1* đã được phát hiện ở hai trẻ UTNBVM. Một đột biến 1337-1338insTA được xác định ở mẫu RB6 và 1 đột biến còn lại 1450-1451delTA được tìm thấy ở mẫu RB7. Đột biến 1337-1338insTA gây dịch khung đọc mở tại amino acid số 447 và mã kết thúc sớm sau amino acid số 450 trong khi đột biến 1450-1451delTA làm dịch khung đọc mở tại acid amin 484 và mã kết thúc sau amino acid 490. Đây là các đột biến gây bệnh, có tính di truyền và là cơ sở quan trọng cho công tác tư vấn di truyền và quản lý lâm sàng.

Từ khóa: Đột biến tế bào dòng, gen *RB1*, giải trình tự, tư vấn di truyền, ung thư nguyên bào võng mạc, Germline

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư nguyên bào võng mạc (retinoblastoma, UTNBVM) là bệnh u ác tính mắt thường gặp ở trẻ em dưới 5 tuổi. UTNBVM xuất hiện với tỷ lệ khoảng 1/200000 ở Mỹ (Young *et al.* 1999) và ở nhiều khu vực trên thế giới. Bệnh xảy ra cân bằng ở cả hai giới tính nam và nữ, không phụ thuộc nguồn gốc chủng tộc. UTNBVM có thể xuất hiện ở dạng di truyền (~40%) hoặc không di truyền (~60%) (Balmer *et al.*, 2006). Dạng di truyền thường xảy ra ở hai mắt và nhiều ở trong khi dạng không di truyền chỉ xảy ra ở 1 mắt và 1 khối u. Cả hai dạng này của UTNBVM đều liên quan đến sự mất chức năng của cả hai alen của gen áp chế khối u *RB1* (retinoblastoma 1) nằm trên nhiễm sắc thể 13. Dạng di truyền do một alen của *RB1* bị bất hoạt có nguồn gốc từ dòng mầm (germline) và một alen bị bất hoạt sinh dưỡng (Knudson, 1971; Cavenee *et al.*, 1983; Friend *et al.*, 1986). *RB1* protein có vai trò quan trọng đối với sự điều khiển chu kỳ tế bào và quá trình biệt hóa tế bào, tham gia vào sự chuyển pha G1/S bằng cách ức chế yếu tố phiên mã E2F cần thiết cho sự khởi đầu của pha S. Sự bất hoạt của *RB1* có tác động lớn nhất đến một quần thể nhỏ các tế bào tiền thân của tế bào non trong quá trình phát triển võng mạc. Sự biểu hiện cao của *RB* trong nhóm tế bào này chứng tỏ nó có vai trò

rất lớn trong việc hạn chế phân chia và tăng sinh tế bào (Xu *et al.*, 2009).

Gen *RB1* nằm tại vị trí 13q14.2, gồm 27 exon và 26 intron. Cho đến nay, hơn 900 đột biến đã được phát hiện trên gen *RB1* ở các bệnh nhân UTNBVM (Valverde *et al.* 2005). Các phương pháp tiếp cận kết hợp giữa multiplex PCR định lượng và giải trình tự, sắc ký lỏng cao áp biến tính (DHPLC) với multiplex PCR định lượng cho các đoạn huỳnh quang ngắn (QMPSF) hay PCR-RFLP với multiplex PCR định lượng và giải trình tự gen cho phép phát hiện được các đột biến tái phát, các mất đoạn/thêm đoạn lớn và các đột biến điểm trên vùng promoter, trên các exon và cả vùng nối intron-exon của gen *RB1* (Fernandez *et al.*, 2007; Abouzeid *et al.*, 2009; Parsam *et al.*, 2009; Abidi *et al.*, 2011). Việc xác định đột biến gen *RB1* trên các bệnh nhân UTNBVM và gia đình mang lại các thông tin cần thiết để thực hiện điều trị hiệu quả và bảo tồn thị lực cho bệnh nhân. Ngoài ra, đây cũng là cơ sở để thực hiện tư vấn di truyền cho thân nhân các bệnh nhân.

Hàng năm ở bệnh Viện Mắt trung ương phát hiện khoảng 40 ca ung thư võng mạc mới. Phần lớn các bệnh nhân nhập viện ở giai đoạn muộn nên bị lỗ mắt cơ hội điều trị bảo tồn mắt. Trong số đó, nhiều bệnh nhân được sinh trong các gia đình có tiền sử bệnh

UTNBVM đã cho thấy vai trò của yếu tố di truyền đối với khả năng sinh bệnh. Năm 2005, Nguyễn Công Kiệt và Nguyễn Trí Dũng đã nghiên cứu đặc điểm di truyền trên 30 ca ung thư võng mạc ở Việt Nam. Tuy nhiên, do những hạn chế về phương pháp nghiên cứu, các tác giả mới chỉ xác định được 1 trường hợp bệnh nhân có mất đoạn ở vị trí NST 13q14 (Nguyễn Công Kiệt và Nguyễn Trí Dũng, 2005). Mặc dù rất nhiều kinh phí đã được đầu tư cho việc phát triển các kỹ thuật điều trị lâm sàng nhưng phần phát triển các kỹ thuật sinh học phân tử phục vụ chẩn đoán sớm của bệnh UTNBVM hầu như còn bỏ ngỏ.

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác lập và ứng dụng quy trình kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA vùng điều khiển và toàn bộ vùng mã của *RB1* để phát hiện các đột biến ở bệnh nhân UTNBVM tại Việt Nam. Các kết quả thu được có thể sử dụng làm cơ sở cho công tác chẩn đoán, chữa trị và tư vấn di truyền cho các bệnh nhân và gia đình người bệnh UTNBVM.

ĐỐI TƯỢNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là hai bệnh nhi đã được chẩn đoán UTNBVM trên lâm sàng và cận lâm sàng tại Bệnh viện Mắt Trung ương. Bệnh nhi nữ, ký hiệu RB6, 3 tháng tuổi tại thời điểm thu mẫu, có u ở mắt trái, tiền sử gia đình không có UTNBVM (Bảng 1). Bệnh nhi nam, ký hiệu RB7, 2 tuổi tại thời điểm thu mẫu, có u ở cả hai mắt, anh trai của bệnh nhi đã chết vì UTNBVM (Bảng 1). Cha mẹ các bệnh nhi đồng ý tham gia nghiên cứu tự nguyện. Nghiên cứu được tiến hành tại Viện Nghiên cứu hệ gen thuộc Viện Hàn lâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia trong năm 2013.

Tách chiết genomic DNA

Mẫu máu ngoại vi của hai bệnh nhi sau khi lấy vô trùng được đưa vào ống chứa mẫu tiêu chuẩn có EDTA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Chúng tôi dùng kit EZNA blood DNA mini

(Promega) để tách chiết genomic DNA từ máu ngoại vi theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA sau khi tách chiết đã được điện di kiểm tra trên gel agarose và đo nồng độ để kiểm tra chất lượng trước khi giữ ở -20°C.

Thiết kế mồi cho PCR và sequencing

Cặp mồi nhân vùng điều khiển gen được thiết kế dựa trên trình tự chuẩn của *RB1* mang accession number NM_000321.2 trong ngân hàng GenBank. Các cặp mồi này đều được thiết kế để nhân được toàn bộ exon đích và 50-100 bp thuộc hai intron liền kề. Thông tin về các đoạn mồi sẽ được cung cấp nếu độc giả có yêu cầu.

Thực hiện PCR

Mỗi phản ứng (25 µl) bao gồm các thành phần: 0,125 µl Taq DNA polymerase (5U) của Fermentas; 2,5 µl đệm 10X; 0,5 µl dNTPs (100 mM); 1 µl mỗi loại mồi (10 pM); 1,5 µl DNA tổng số (100 ng/µl) và 18,375 µl H₂O. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt (MJ Research) với chu trình nhiệt như sau: 95°C 2 phút, 35 chu kỳ (95°C 30s, 55 hoặc 60°C 30 giây, 72°C 30-60 giây), 72°C 10 phút; giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 1,2% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng UV. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng kit Gene JET™ PCR purification (Thermo Scientific) theo phương pháp của nhà sản xuất.

Thực hiện giải trình tự chuỗi DNA

Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với BigDye Terminator V3.1 từ Applied Biosystems, theo 2 chiều xuôi và ngược cho mỗi đoạn cần đọc. Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, hòa tan trong Hi-Di formamide, biến tính ở 95°C trong 2 phút trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự DNA được đọc bằng máy ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Kết quả được phân tích bằng phần mềm sinh học BioEdit. Số thứ tự của các nucleotide được tính theo chuỗi cDNA bình thường của *RB1* với accession number NM_000231.2 trong GenBank.

Bảng 1. Tóm tắt tình trạng bệnh của đối tượng nghiên cứu

Ký hiệu bệnh nhân	Tuổi	Giới tính	Vị trí khối u		Tiền sử gia đình
			mắt trái	mắt phải	
RB6	3 tháng	Nữ	có	không	
RB7	2 tuổi	Nam	có	có	Anh trai bị u mắt đã chết

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

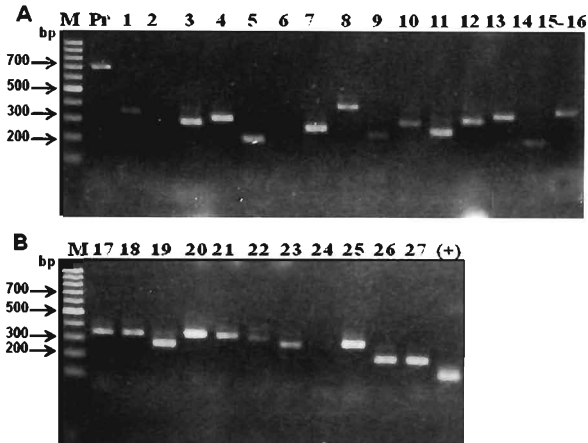
Kết quả xác lập quy trình giải trình tự gen *RB1*

Chúng tôi dùng kỹ thuật giải trình tự gen Sanger để xác định đột biến gen *RB1* cho hai bệnh nhi UTNBVM.

DNA tổng số tinh sạch từ máu của hai bệnh nhi UTNBVM được sử dụng làm khuôn cho PCR. Điều kiện PCR đã được xác lập để khuếch đại vùng điều khiển và 27 exon của gen *RB1* bằng 27 phản ứng với các cặp mồi đặc hiệu trong đó exon 15 và 16 được sử dụng chung một cặp mồi. Các exon 2, 6 và 24 được khuếch đại riêng với các exon còn lại do cần điều

chỉnh nhiệt độ bám mồi cao hơn. Các phản ứng PCR cho bằng đặc hiệu tương ứng với các sản phẩm có kích thước từ 194 bp đến 694 bp (Hình1). Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch cho các phản ứng giải trình tự gen tiếp theo.

Vùng điều khiển gen, toàn bộ 27 exon mã hóa của gen *RB1* và các vùng biên exon-intron đã được giải trình tự thành công trên cả hai mẫu bệnh. Hầu hết các đoạn gen đã được giải trình tự trên cả hai chiều xuôi và ngược. Riêng đoạn chứa 2 exon 15-16 chỉ trình tự được đọc theo chiều ngược cho kết quả tốt nên đã được thực hiện lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.



Hình 1. Ảnh minh họa kết quả điện di các sản phẩm PCR. (A) M: thang DNA chuẩn (marker 100 bp), Pr: sản phẩm PCR vùng điều khiển, 1-16: sản phẩm PCR của các exon 1 đến 16. (B) M:thang DNA chuẩn (marker 100 bp), 17-27: sản phẩm PCR của các exon 17 đến 27. "+" Đối chứng dương beta actin.

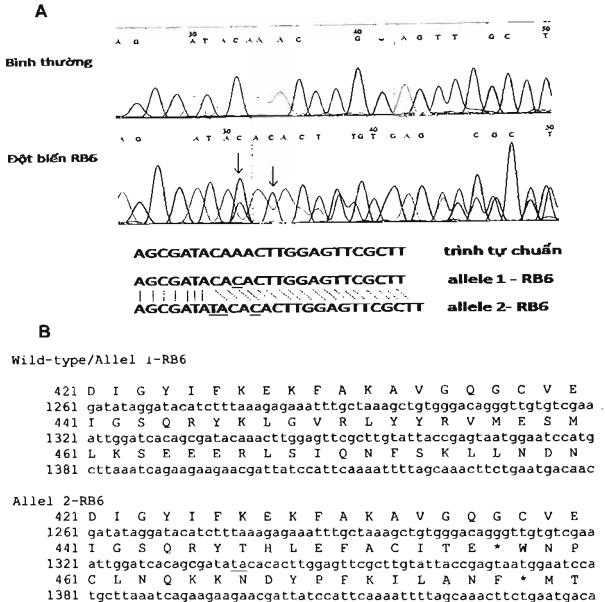
Kết quả phân tích trình tự trên mẫu RB6

Trình tự ADN nhận được của mẫu RB6 đã được so sánh với trình tự cDNA chuẩn của gen *RB1* lưu trong ngân hàng gen với mã số NM_000231.2 và trình tự gen người chuẩn (GRCh37/hg19). Kết

quả xác định tại vùng điều khiển và các vùng biên exon-intron của gen *RB1* không có bất thường về trình tự nucleotide. Khi phân tích trình tự trên các exon chúng tôi đã phát hiện một allele của gen *RB1* bị đột biến tại exon số 14. Đây là dạng đột biến thêm 2 nucleotide trong đó hai nucleotide TA đã

được thêm vào tại vị trí giữa nucleotide số 1337 và số 1338. Đột biến này được ký hiệu là 1337-1338insTA (Hình 2A). Phân tích dịch mã cho thấy đột biến này làm lệch khung đọc từ codon số 447, gây ra sự tổng hợp của 10 amino acid lạ và sớm tạo mã kết thúc tại codon số 457 của protein RB1 (Hình

2B). Ngoài ra, kết quả xác định trình tự theo chiều xuôi cho thấy tại vị trí 1340, nucleotide A bị thay thế thành C trên cả hai allele của RB1. Tuy nhiên, kết quả giải trình tự theo chiều ngược được lặp lại 2 lần lại cho thấy không có sự thay đổi nào chứng tỏ điểm thay thế trên xảy ra do lỗi của máy đọc trình tự.



Hình 2. Đột biến có ý nghĩa lâm sàng của RB1 phát hiện ở mẫu RB6. (A) Đột biến thêm 2 nucleotide TA tại vị trí 1337-1338(1337-1338insTA) trên 1 allele của gen RB1 phát hiện bằng phương pháp giải trình tự Sanger chiều đọc xuôi (B) Hậu quả của đột biến 1337-1338insTA gây lệch khung đọc từ amino acid 447 và tạo mã kết thúc tại vị trí codon 457. (TA, A) vị trí thêm nucleotide (*) mã kết thúc

Sàng lọc các đột biến gen RB1 ở các bệnh nhân UTNBVM có thể giúp xác định các đột biến có tính di truyền và cung cấp cơ sở quan trọng cho chẩn đoán sớm và tư vấn di truyền. Trong nghiên cứu về đặc điểm di truyền của UTNBVM ở nước ta trước đây, do sử dụng phương pháp xét nghiệm nhiễm sắc thể do nên các tác giả chỉ có thể phát hiện được các đột biến thêm/mất đoạn lớn trên vùng DNA chứa gen RB1 (Nguyễn Công Kiệt và Nguyễn Tri Dũng, 2005). Đây là loại đột biến chiếm tỷ lệ thấp trong số các loại đột biến đã biết của RB1 công bố trên ngân hàng đột biến gen của người. Trong công trình này chúng tôi đã tối ưu hóa thành công các điều kiện kỹ thuật cho phương pháp giải trình tự DNA, vốn được coi là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán các đột biến gen, nhằm phát hiện đột biến gen RB1. Trong số hai đột biến đã xác định, đột biến 1337-1338insTA của bệnh nhân RB6 gây dịch khung đọc từ amino acid 447 của protein RB1 là hoàn toàn mới, chưa được công bố trong cơ sở dữ liệu về đột biến gen của người (www.hgmd.org). Hai đột biến chúng tôi tìm thấy đều là đột biến tế bào dòng (germline mutation), có khả năng di truyền, tồn tại ở dạng dị hợp tử trong mỗi bệnh nhân. Theo giả thuyết hai cú hích đột biến gây bệnh của Knudson (Knudson, 1971), các đột biến này chính là cú hích thứ nhất trong tiến trình hình thành nguyên nhân gây bệnh. Đột biến thứ hai của RB1 có thể xuất hiện muộn hơn trong quá trình phát triển phôi và biệt hóa của các tế bào võng mạc.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được các điều kiện kỹ thuật cho phép xác định các đột biến trên vùng điều khiển, vùng mang mã và các vùng biên exon-intron của gen RB1. Đối với mỗi bệnh nhân nghiên cứu, chúng tôi đã xác định được một đột biến gây bệnh trên một alen của gen RB1 trong đó đột biến xác định ở bệnh nhân ký hiệu RB6 là hoàn toàn mới. Cả hai đột biến là đột biến tế bào dòng, có tính chất di truyền nên kết quả thu được không chỉ có ý nghĩa cho việc xác định nguyên nhân gây bệnh cho các bệnh nhi mà còn là thông tin hữu ích cho công tác tư vấn di truyền đối với các bệnh nhi và gia đình của họ.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở năm 2013 của Viện Nghiên cứu hệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Công Kiệt, Nguyễn Tri Dũng (2005). Đặc điểm di truyền trong ung thư nguyên bào võng mạc. *Tap chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh* 9(1): 99-103.
- Abidi O, Knaar S, Sefri H, Chai M, Senechal A, Hamel C et al (2011) Mutational analysis of the RB1 gene in Moroccan patients with retinoblastoma. *Mol Vis* 17: 3541-3547.
- Abouzeid H, Schorderet DF, Balmer A, Munier FL (2009) Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784.
- Balmer A, Zografos L, Munter F (2006) Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 25: 5341-5349.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779-784.
- Fernández C, Repetto K, Dalamon V, Bergonzi F, Ferreiro V, Szijan I (2007) RB1 germ-line deletions in Argentine retinoblastoma patients. *Mol Diagn Ther.* 11(1):55-61.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-646.
- Knudson AG (1971) Mutation and cancer. statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68: 820-823
- Parsan VL, Kannabiran C, Honavar S, Vemuganti GK and Ali MJ (2009) A comprehensive, sensitive and economical approach for the detection of mutations in the RB1 gene in retinoblastoma. *J Genet* 88(4): 517-527.
- Valverde JR, Alonso J, Palacios I and Pestana A (2005) RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet* 6, 53.
- Xu XL, Fang Y, Lee TC, Forrest D, Gregory-Evans C, Almeida D, Liu A, Jhanwar SC, Abramson DH, Cobrnik D (2009) Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* 137: 1018-1031.
- Young JL., Smidh MA., Roffers SD, Liff JM and Bunin JR (1999) Cancer incidence and survival among children and adolescent. In *Retinoblastoma (ed. L. A. Ries)*. 1975-1995.

DETECTION OF RB1 MUTATIONS IN PEDIATRIC RETINOBLASTOMA

Nguyen Hai Ha^{1,*}, Do Manh Hung¹, Le Thuy Quynh², Nguyễn Thùy Dương¹, Nguyen Dang Ton¹

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

²Hospital of Ophthalmology, Ministry of Health

SUMMARY

Retinoblastoma is a malignant tumor of the retina that occurs in children, usually before age five years. Loss or mutations of both alleles of the retinoblastoma gene *RB1*, localized to chromosome 13q14.2, are required to develop the disease. This study was conducted to determine *RB1* mutations in two Vietnamese children with retinoblastoma. The promoter and whole coding region of *RB1* of two children with retinoblastoma were sequenced by Sanger sequencing. Two germline frameshift mutations in *RB1* gene were detected from two retinoblastoma children. One is 1337-1338insTA heterozygous mutation identified in RB6 sample and another is 1450-1451delTA heterozygous mutation found in RB7 sample. The 1337-1338insTA mutation causes a frameshift at amino acid 447 and an early stop codon at amino acid 451 while the 1450-1451delTA results in a frameshift at amino acid 484 and a stop codon at amino acid 491. They are both pathological, heritable mutations. These findings provide important clues for genetic counseling and clinical management.

Key words: Germline mutation, genetic counseling, *RB1* gene, retinoblastoma, sequencing

* Author for correspondence. E-mail. nguyenhaiha@igr.ac.vn