

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN *WASP* TRÊN BỆNH NHÂN MẮC HỘI CHỨNG WISKOTT-ALDRICH

Lương Thị Lan Anh^{1,2}, Nguyễn Thị Thanh Hoa^{3,4}, Nguyễn Hải Hà^{3,4}, Nguyễn Đăng Tôn^{1,3,4,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trung tâm Tư vấn di truyền, Bệnh viện Trường Đại học Y Hà Nội

³Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 06.12.2019

Ngày nhận đăng: 09.9.2020

TÓM TẮT

Hội chứng Wiskott-Aldrich (WAS) là một bệnh hiếm gặp gây suy giảm miễn dịch nguyên phát liên kết với nhiễm sắc thể X, đặc trưng bởi sự giảm tiểu cầu và tiểu cầu kích thước nhỏ, bệnh chàm, tăng các nguy cơ ác tính, nhiễm trùng tái phát và nhiễm virus. Bệnh nhân có những triệu chứng lâm sàng nghiêm trọng có thể dẫn đến tử vong nếu không được chẩn đoán và điều trị sớm. Hội chứng WAS xảy ra do có sự đột biến hoặc bị mất gen trên nhiễm sắc thể X là *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP)*, nằm trên nhánh ngắn của NST X tại vị trí Xp11.22-p11.23. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định các đột biến có trên gen *WASP* ở một số gia đình có con mắc WAS. Toàn bộ vùng gen mã hóa *WASP* và các vùng biên intron-exon của gen được giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Hai đột biến trên gen *WASP* đã được phát hiện ở hai trẻ bị WAS gồm một đột biến c.702insAC gây lệch khung đọc từ amino acid 236 và tạo mã kết thúc tại vị trí codon 262 được xác định ở bệnh nhân WA007 và một đột biến c.91G>A gây biến đổi acid glutamic thành lysine tại vị trí codon 31 được xác định ở bệnh nhân WA010. Nghiên cứu này cung cấp dữ liệu của các đột biến trong gen *WASP* ở bệnh nhân WAS Việt Nam. Sàng lọc đột biến trên gen *WASP* có thể giúp xác định nguyên nhân di truyền và góp phần quan trọng trong chẩn đoán sớm, quản lý lâm sàng và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và các gia đình bị ảnh hưởng.

Từ khóa: Wiskott-Aldrich, *WASP*, giải trình tự, tư vấn di truyền.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng Wiskott-Aldrich (WAS) gây rối loạn suy giảm miễn dịch dẫn đến giảm tiểu cầu và tiểu cầu kích thước nhỏ, bệnh chàm, nhiễm trùng tái phát và nhiễm virus, cũng như tăng các nguy cơ mắc các bệnh tự miễn và ác tính (Sullivan *et al.*, 1994). Các đặc điểm bất thường về miễn dịch đối với bệnh nhân mắc WAS bao gồm suy giảm chức năng các tế bào B và tế bào T, bạch cầu khiếm khuyết bị hóa hướng động (defective monocyte chemotaxis) dẫn đến tăng nguy cơ nhiễm trùng và hình thái bất thường của các tế bào đuôi gai (Badolato *et al.*, 1998; Binks

et al., 1998; Ochs *et al.*, 1980). Trẻ bị WAS có số lượng tế bào lympho bình thường khi sinh nhưng bị giảm từ 6 đến 8 tuổi (Rawlings *et al.*, 1999; Rengan, Ochs, 2000). Đặc điểm của bệnh nhân WAS là không phản ứng lại với polysaccharide và kháng nguyên protein (Ochs *et al.*, 1980). Ước tính tỷ lệ mắc hội chứng WAS là khoảng 1/1,000,000 bé trai, với độ tuổi trung bình được chẩn đoán là 24 tháng tuổi trong các gia đình đã từng có tiền sử bệnh (Sullivan *et al.*, 1994).

Hội chứng WAS là một bệnh hiếm gặp, di truyền lặn và xảy ra do có sự đột biến gen

Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP), nằm trên nhánh ngắn của nhiễm sắc thể (NST) X tại vị trí Xp11.22–p11.23. Gen *WASP* có 12 exon dài 1823 bp, mã hóa cho polypeptide có kích thước 502 amino acid, được biểu hiện trong tế bào chất của các tế bào tạo máu không hồng cầu (Massaad *et al.*, 2013) (Hình 2). Protein WASP có vai trò quan trọng trong việc cấu trúc khung actin và tín hiệu tế bào.

Protein WASP chứa một số vùng đặc trưng, bao gồm vùng tương đồng pleckstrin (PH), vùng liên kết với guanosine triphosphatase (GTPase) (GBD), vùng giàu proline với các mô típ liên kết SH3, vùng tương đồng verprolin và cofilin và vùng axit C-terminal có liên quan đến việc tái tổ chức các tế bào sợi actin, khung xương tế bào bằng cách kích hoạt trùng hợp actin qua trung gian phức hợp Arp2/3 (Machesky, Insall, 1998; Ochs *et al.*, 2001). Protein WASP có cấu trúc phức tạp, đa chức năng và kiểu hình lâm sàng gây ra bởi các đột biến trên gen này cũng rất đa dạng. Bởi vậy, có rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã quan tâm mối tương quan giữa kiểu hình và kiểu gen *WASP* (Jin *et al.*, 2004).

Các đột biến trên gen *WASP* làm thay đổi chức năng hoặc biểu hiện của protein nội bào, phân bố rải rác trên toàn bộ gen. Ảnh hưởng của một đột biến nhất định có tương quan với phổ phát hiện lâm sàng, các triệu chứng cũng như mức độ nghiêm trọng của bệnh. Các đột biến làm giảm mức độ biểu hiện của protein WASP gây giảm tiểu cầu liên kết X (XLT), trong khi các đột biến làm mất sự biểu hiện của *WASP* hoặc làm ngừng trình tự protein WASP sẽ liên quan đến WAS (Massaad *et al.*, 2013). Hiện nay, có khoảng 300 đột biến trên toàn bộ gen *WASP* đã được mô tả (trích từ: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases). Đột biến xảy ra nhiều nhất là đột biến *sai nghĩa*, sau đó là các đột biến tại vị trí cắt nối gen (splicing), đột biến *thêm/mất* nucleotide, đột biến *vô nghĩa* và các đột biến *phức tạp* (Albert *et al.*, 2011). Hầu hết các đột biến *sai nghĩa* nằm ở exon 1 đến exon 4, các đột biến tại vị trí cắt nối gen chủ yếu là ở intron 6 đến 10, trong khi các đột biến *vô nghĩa*, *thêm/mất* và các đột biến *phức tạp* được phân bố

trên toàn bộ gen *WASP* (Albert *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2004).

Đối với những trường hợp chẩn đoán WAS vẫn chưa được kết luận, giải trình tự gen *WASP* được xem là cần thiết, bao gồm giải trình tự các vùng mã hóa cũng như vùng biên intron và exon của gen *WASP*. Cách tiếp cận này sẽ xác định phần lớn các đột biến ở nam giới; tuy nhiên, các đột biến ảnh hưởng đến các yếu tố điều hòa upstream, các vùng chưa được dịch mã hoặc các đột biến *thêm/mất* đoạn lớn có thể không xác định được. Gần đây, chúng cũng đã được sử dụng trong việc thiết lập xét nghiệm sàng lọc di truyền trước sinh cho các cặp vợ chồng có nguy cơ để đảm bảo sinh ra một đứa trẻ không mang bệnh (Siminovitch, 2003; Simpson *et al.*, 2005).

Ở Việt Nam, chẩn đoán phân tử hội chứng WAS đã bắt đầu phát triển và đã đạt được một số thành tựu. Năm 2013, Đỗ Hoàng Cúc và đồng tác giả báo cáo 3 trường hợp bệnh nhi mắc WAS tại Bệnh viện Nhi đồng 1. Cả 3 trường hợp đều là nam, được xét nghiệm chẩn đoán PCR và xác định có đột biến gen *WASP*. Tuy nhiên trong báo cáo này, tác giả chỉ tập trung mô tả đặc điểm dịch tễ lâm sàng của bệnh nhân mà chưa chỉ rõ phương pháp sinh học phân tử được sử dụng nhằm phát hiện đột biến gen *WASP* (Đỗ Hoàng Cúc *et al.*, 2013). Năm 2015, Phan Thị Xinh và đồng tác giả đã tiến hành nghiên cứu xác định đột biến gen bằng phương pháp giải trình tự trên 7 bệnh nhân mắc WAS. Kết quả giải trình tự DNA đã phát hiện được 5 đột biến khác nhau, bao gồm ba đột biến trên exon 4, một đột biến trên exon 7 và một đột biến trên exon 10. Nghiên cứu đã phát hiện được các kiểu đột biến đa dạng của gen *WASP*, qua đó góp phần hỗ trợ cho chẩn đoán xác định hội chứng WAS ở trẻ em Việt Nam (Phan Thị Xinh, Vũ, 2015).

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác lập và ứng dụng quy trình kỹ thuật giải trình tự toàn bộ vùng mang mã hóa của gen *WASP* để phát hiện các đột biến ở bệnh nhân mắc WAS tại Việt Nam. Các kết quả thu được có thể sử dụng làm cơ sở cho chẩn đoán chính xác và sớm hơn tránh nằm viện kéo dài; đồng thời hỗ trợ công tác điều trị và

tư vấn di truyền cho các bệnh nhân và gia đình người bệnh WAS.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc di truyền cho 4 gia đình có con trai mắc

WAS đã được chẩn đoán dựa trên các kết quả lâm sàng và cận lâm sàng điển hình. Các mẫu được tiến hành thu thập tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các đối tượng nghiên cứu đồng ý tham gia tự nguyện. Nghiên cứu này đã được thông qua bởi Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, số 2-2019/NCHG-HĐĐĐ.

Bảng 1. Tóm tắt thông tin lâm sàng của đối tượng nghiên cứu.

STT	Mã bệnh nhân	Mối Quan hệ
1	WA.001	Bệnh nhân-Con
2	WA.002	Bố
3	WA.003	Mẹ
4	WA.004	Bệnh nhân-Con
5	WA.005	Bố
6	WA.006	Mẹ
7	WA.007	Bệnh nhân-Con
8	WA.008	Bố
9	WA.009	Mẹ
10	WA.010	Bệnh nhân-Con
11	WA.011	Mẹ

Tách chiết DNA tổng số

Mẫu máu ngoại vi của các bệnh nhân và các thành viên trong gia đình được lưu trữ trong ống chứa mẫu có EDTA và được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng. Chúng tôi dùng kit ExgeneTM Blood SV(GeneAll) để tách chiết DNA tổng số 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 lưu trữ ở -20°C .

Thiết kế mồi cho PCR và giải trình tự gen

Cặp mồi nhân vùng mã hóa được thiết kế dựa trên trình tự chuẩn của gen *WASP* mang mã số NG_007877.1 trong Ngân hàng gen (GenBank). Các cặp mồi được thiết kế để nhân

toàn bộ vùng exon đích và 100–150 bp của hai intron liền kề.

Thực hiện PCR

Mỗi phản ứng (20 μL) bao gồm các thành phần: 10 μL Taq 2X master mix của New England BioLabs; 0,5 μL mỗi loại mồi (10pM); 1 μL DNA (20 ng/ μL) và 8 μL nước. Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt với chu trình nhiệt như sau: 95°C trong 2 phút; 38 chu kỳ (95°C trong 30 giây, 58°C hoặc 60°C trong 30 giây, 68°C trong 30-45 giây), 68°C trong 5 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

JETTM PCR purification (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

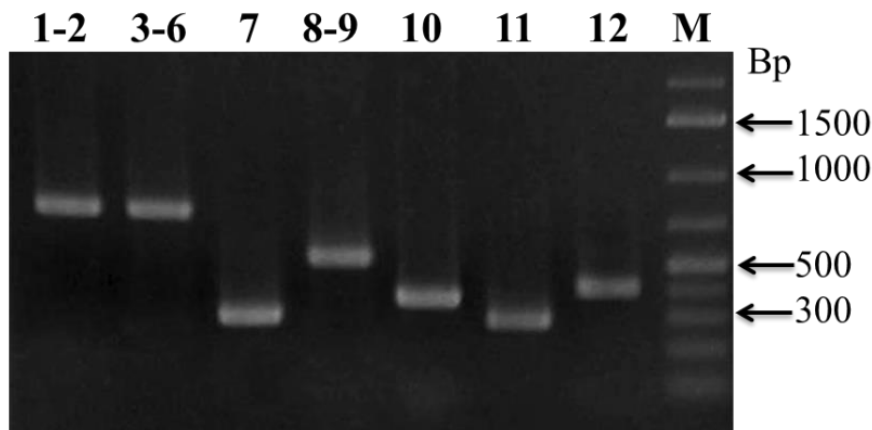
Giải trình tự DNA

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được đọc trình tự cả hai chiều bằng bộ sinh phẩm BigDye Terminator V3.1 trên máy ABI PRISM 3500 Genetics Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ).

Kết quả được phân tích bằng phần mềm BioEdit, SeqScape và các phần mềm dự đoán chức năng như SIFT/Provean, Polyphen-2, Human Splicing Finder.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân các đoạn exon của gen *WASP*



Hình 1. Kết quả điện di các sản phẩm PCR. M: thang marker chuẩn (1kb plus ladder); E1-2: sản phẩm PCR của các exon từ 1 đến 2; E3-6: sản phẩm PCR của các exon từ 3 đến 6; E7: sản phẩm PCR của exon7; E8-9: sản phẩm PCR của các exon từ 8 đến 9; E10, E11, E12: sản phẩm PCR của các exon từ 10 đến 12, tương ứng.

Xác định trình tự các exon của gen *WASP*

Toàn bộ 12 exon mã hóa của gen *WASP* và các vùng biên intron-exon đã được giải trình tự thành công trên các mẫu bệnh nhân. Tất cả các đoạn gen được giải trình tự trên cả hai chiều xuôi và ngược. Trình tự DNA nhận được của 4 mẫu bệnh nhân mắc WAS được so sánh với trình tự chuẩn của gen *WASP* lưu trong Ngân hàng gen với mã số NG_007877.1. Kết quả xác định tại vùng biên exon-intron không có bất thường về trình tự nucleotide trên gen *WASP*. Khi phân tích trình tự trên các exon, chúng tôi

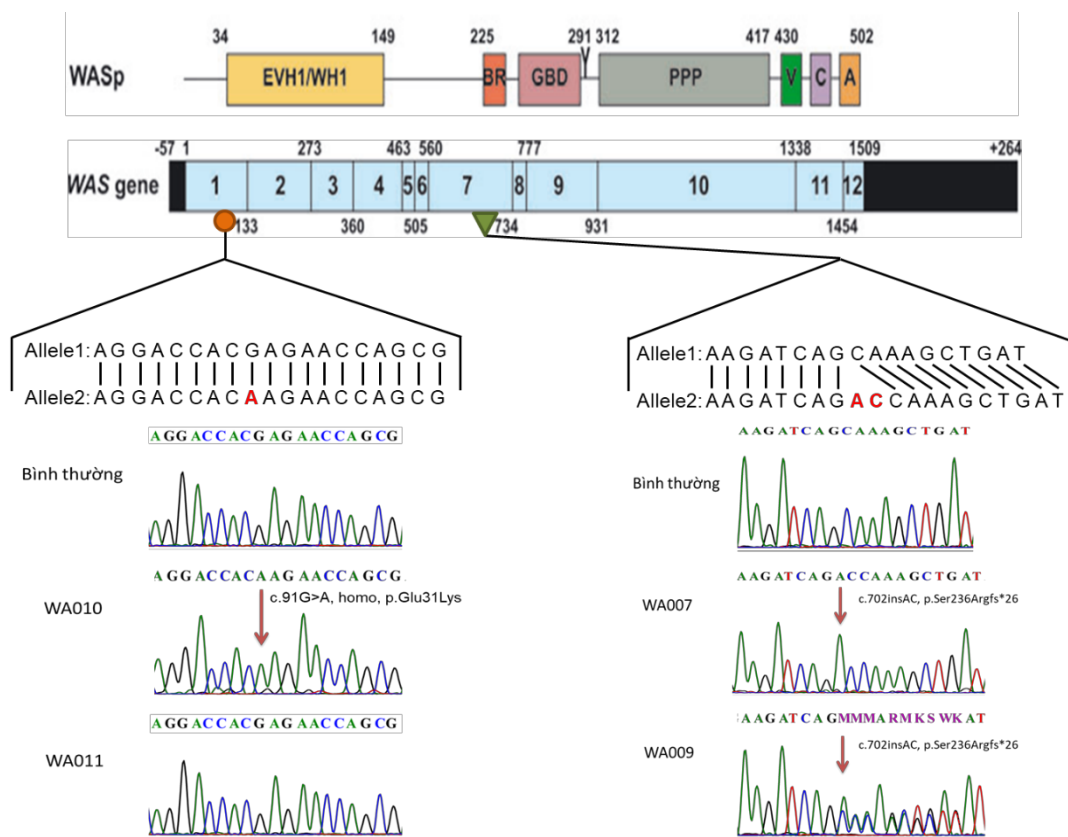
Nồng độ DNA tổng số thu được từ các mẫu bệnh nhân và bố mẹ nằm trong khoảng từ 29,5 đến 37,5 ng/ μ L. DNA tổng số sau đó được điện di trên gel agarose cho thấy các dải rõ ràng và sáng, chỉ ra rằng sản phẩm không bị hỏng và đạt mức độ tinh khiết cho thí nghiệm tiếp theo.

DNA tổng số được tách từ máu ngoại vi được sử dụng làm khuôn cho PCR. Điều kiện PCR đã được xác lập để khuếch đại toàn bộ 12 exon của gen *WASP* với các cặp mồi đặc hiệu. Trong đó exon 1 và 2; exon 3,4,5 và 6; exon 8 và 9 được sử dụng chung một cặp mồi. Các phản ứng PCR cho băng đặc hiệu tương ứng với các sản phẩm có kích thước từ 274 bp đến 746 bp (Hình 1). Các sản phẩm PCR này sẽ được tinh sạch để làm khuôn cho các phản ứng giải trình tự tiếp theo.

phát hiện thấy có 2 đột biến trên 2 mẫu bệnh nhân khác nhau. Trong đó, trường hợp đầu tiên là một bé trai kí hiệu là WA007 phát hiện có một đột biến tại exon 7. Đây là dạng đột biến thêm 2 nucleotide, trong đó 2 nucleotide AC được thêm vào vị trí giữa nucleotide 702 và 703, đột biến này được kí hiệu là 702insAC. Phân tích dịch mã cho thấy đột biến này làm lệch khung đọc từ codon số 230 và sớm tạo mã kết thúc tại codon số 262 của protein WASP. Trong gia đình thứ hai phát hiện có một đột biến thay thế nucleotide G thành A trên exon 1 tại vị trí nucleotide 91 ở bệnh nhân WA010,

đột biến này được kí hiệu là c.91G>A. Phân tích trình tự dịch mã cho thấy đột biến này làm

thay đổi amino acid Glutamic thành amino acid Lysine tại vị trí codon 31. (Hình 2).



Hình 2. Sơ đồ biểu diễn các đột biến trên gen *WASP* được phát hiện ở 2 bệnh nhân. Mười hai exon của gen *WASP* được biểu diễn trong các ô vuông tương ứng. ● đột biến sai nghĩa, ▲ đột biến lệch khung. Các số trên và dưới gen *WASP* biểu thị số nucleotide bắt đầu của mỗi exon. Các vùng không được dịch mã của exon đầu tiên và cuối cùng được hiển thị màu đen. Các vùng cấu trúc của protein *WASP* được biểu thị bên dưới các exon tương ứng. Số lượng các amino acid được hiển thị trên các vùng protein (Massaad *et al.*, 2013). Đột biến trên gen *WASP* ở bệnh nhân WA007. Đột biến thêm 2 nucleotide AC tại vị trí nucleotide 702 (c.702insAC). Hậu quả của đột biến c.702insAC gây lệch khung đọc từ amino acid 236 và tạo mã kết thúc tại vị trí codon 262. (*) mã kết thúc được kí hiệu là p.Ser702Argfs*26. Đột biến trên gen *WASP* ở bệnh nhân WA009. Đột biến thay thế nucleotide G thành A tại vị trí nucleotide 91 (c.91G>A). Hậu quả của đột biến c.91G>A gây biến đổi từ acid glutamic thành acid lysine tại vị trí codon 31, kí hiệu là p.Glu31Lys.

Các đột biến mới trên gen *WASP*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện được hai đột biến trên gen *WASP* gây bệnh bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự DNA. Trong số 2 đột biến đã xác định, đột biến c.702insAC trên bệnh nhân WA007 gây dịch khung đọc từ amino acid 236 của protein *WASP* là hoàn toàn mới và chưa từng được công bố trên Ngân hàng cơ sở dữ liệu về đột biến gen *WASP*

(https://research.cchmc.org/LOVD2/home.php?select_db=WAS). Đột biến này nằm trên vùng chức năng BR của protein *WASP* (Hình 2). Khi tiến hành xác định nguyên nhân di truyền, chúng tôi phát hiện thấy ở người mẹ (WA009) có đột biến tại vị trí này ở trạng thái dị hợp tử. Do đó, chúng tôi dự đoán rằng người mẹ mang đột biến c.702insAC và đột biến gây bệnh này được di truyền hoàn toàn sang người con. Đột biến thứ hai là một đột biến gây bệnh thay thế nucleotide G

thành A tại vị trí nucleotide 91 của gen *WASP*(c.91G>A) ở bệnh nhân WA010 làm thay đổi amino acid glutamic thành amino acid lysine đã được công bố trên Ngân hàng cơ sở dữ liệu SNP với mã số đa hình là rs1557006239. Đột biến này được phát sinh trong quá trình hình thành giao tử của bệnh nhân. Năm 2004, nhóm nghiên cứu của trường Đại học Washington (Mỹ) đã tiến hành xác định đột biến gen *WASP* trên 262 bệnh nhân mắc hội chứng WAS từ 227 gia đình có các quốc tịch khác nhau bao gồm Mỹ, Canada, châu Âu, New Zealand, Đông Nam Á. Kết quả xác định được 141 đột biến trong đó có 5 bệnh nhân mang đột biến tại vị trí c.91G>A (Jin *et al.*, 2004). Tuy nhiên đột biến này chưa từng được báo cáo ở bệnh nhân Việt Nam mắc WAS.

Trong các tế bào không hoạt động, WASP/N-WASp tồn tại trong tế bào chất ở trạng thái bị bất hoạt, được duy trì bởi sự tương tác nội phân tử giữa các vùng BR, GBD và VCA, và được ổn định bởi protein tương tác WASP(WIP) (Kim *et al.*, 2000; Martinez-Quiles *et al.*, 2001). Kích thích tế bào dẫn đến sự liên kết mạnh mẽ của phosphatidyl inositol (4,5)-biphosphate (PIP2) với vùng BR, và kích hoạt trạng thái hoạt động của Cdc42 (Cdc42-GTP) với vùng GBD. Do đó giải phóng vùng VCA để kích hoạt phức hợp Arp2/3 (Hemsath *et al.*, 2005; Rohatgi *et al.*, 2000). Việc kích hoạt WASP/N-WASp bởi Cdc42-GTP và PIP2 được duy trì nhờ quá trình phosphoryl của vùng giàu tyrosine ở codon 291 (Y291) trong GBD của WASP (Y253 hoặc Y256 trên N-WASp) bởi protein tyrosine kinase Lyn, Btk, Hck hoặc Fyn (Cai *et al.*, 2012; Cory *et al.*, 2002). Do đó các đột biến trên vùng BR dẫn đến làm ảnh hưởng chức năng của protein WASP.

Sự bất thường chức năng của protein WASP gây nên một kiểu hình lâm sàng nghiêm trọng có thể dẫn đến tử vong nếu không được chẩn đoán và điều trị sớm. Hội chứng WAS từ lâu đã được coi là một trong những tư vấn di truyền cần thiết, xét nghiệm di truyền *WASP* là cơ sở cho xác nhận chẩn đoán, đặc biệt ở những bệnh nhân có biểu hiện thể gây bệnh hoặc có chẩn đoán lâm sàng chưa rõ ràng. Do đó, sàng lọc các đột biến gen *WASP* ở các bệnh nhân mắc WAS có thể giúp xác định các đột biến có tính chất di truyền và cung cấp cơ

sở quan trọng cho chẩn đoán sớm và tư vấn di truyền (Siminovitch, 2003).

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định được 2 trên 4 mẫu bệnh nhi mắc hội chứng Wiskott-Aldrich có đột biến trên gen *WASP*. Với những kết quả đạt được, nghiên cứu này đã góp phần cung cấp dữ liệu của các đột biến dòng mầm trong gen *WASP* ở bệnh nhân WAS Việt Nam. Sàng lọc đột biến ở gen *WASP* có vai trò quan trọng trong việc xác định nguyên nhân di truyền của hội chứng WAS, làm cơ sở cho công tác chẩn đoán, chữa trị và tư vấn di truyền cho các bệnh nhân và gia đình người bệnh WAS.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn các bệnh nhân đã đồng ý tham gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albert M, Notarangelo L, Ochs H (2011) Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 18: 42–48.
- Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD (2010) X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood* 115: 3231–3238.
- Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, Fiorini M, Borsatti A, Albertini A, Mantovani A, Ugazio A, Notarangelo L (1998) Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol* 161: 1026–1033.
- Binks M, Jones G, Brickell P, Kinnon C, Katz D, Thrasher A (1998) Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* 28: 3259–3267.

- Cai G, Chou C, Hu M, Zheng A, Reichardt L, Guan J, Fang H, Luckhardt T, Zhou Y, Thannickal V, Ding Q (2012) Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) is critical for formation of α -smooth muscle actin filaments during myofibroblast differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(8): L692–702.
- Cory G, Garg R, Cramer R, Ridley A (2002) Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASP to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem* 277(47): 45115–45121.
- Đỗ Hoàng Cúc, Tăng Kim Hồng, Tuấn NM (2013) Báo cáo 3 trường hợp bệnh nhi có hội chứng Wiskott Aldrich tại Bệnh viện Nhi đồng 1. *Tạp chí Y Học TP Hồ Chí Minh* 17(3): 97–103.
- Hemsath L, Dvorsky R, Fiegen D, Carlier M, Ahmadian M (2005) An electrostatic steering mechanism of Cdc42 recognition by Wiskott-Aldrich syndrome proteins. *Mol Cell* 20(2): 313–324.
- Jin Y, Mazza C, Christie J, Giliani S, Fiorini M, Mella P, Gandellini F, Stewart D, Zhu Q, Nelson D, Notarangelo L, Ochs H (2004) Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 104(13): 4010–4019.
- Kim A, Kakalis L, Abdul-Manan N, Liu G, Rosen M (2000) Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404(6774): 151–158.
- Machesky L, Insall R (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* (8): 1347–1356.
- Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón I, Medina M, Saville S, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig J, Geha R, Ramesh N (2001) WIP regulates N-WASP mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol* 3: 484–491.
- Massaad M, Ramesh N, Geha R (2013) Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review. *Ann N Y Acad Sci* 1285: 26–43.
- Ochs H, Slichter S, Harker L, Von Behrens W, Clark R, Wedgwood R (1980) The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 55: 243–252.
- Ochs H, Slichter S, Harker L, Von Behrens W, Clark R, Wedgwood R (2001) Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* (1): 430–437.
- Phan Thị Xinh, Vũ HA (2015) Đột biến gen WAS trong hội chứng Wiskott-Aldrich. *Y Học TP. Hồ Chí Minh* 19(3): 330–335.
- Rawlings S, Crooks G, Bockstoe D, Barsky L, Parkman R, Weinberg K (1999) Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood* 94: 3872–3882.
- Rengan R, Ochs H (2000) Molecular biology of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Rev Immunogenet* 2: 243–255.
- Rohatgi R, Ho H, Kirschner M (2000) Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Cell Biol* 150: 1299–1310.
- Siminovitch K (2003) Prenatal diagnosis and genetic analysis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Prenat Diagn* 23(12): 1014–1016.
- Simpson J, Carson S, Cisneros P (2005) Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for heritable neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* (34): 87–90.
- Sullivan K, Mullen C, Blaese R, Winkelstein J (1994) A mutliinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 125(6 Pt 1): 876–885.

MUTATIONAL SCREENING OF *WASP* GENE IN PATIENTS WITH WISKOTT-ALDRICH SYNDROME

Luong Thi Lan Anh^{1,2}, Nguyen Thi Thanh Hoa^{3,4}, Nguyen Hai Ha^{3,4}, Nguyen Dang Ton^{1,3,4}

¹*Hanoi Medical University*

²*Genetic Counseling Center, Hanoi Medical University Hospital*

³*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

⁴*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked recessive immunodeficiency disorder characterized by thrombocytopenia and small-sized platelets, eczema, recurrent bacterial and viral infections, higher incidence of autoimmunity and an increased risk of malignancies. WAS occurs due to the mutation or loss of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (*WASP*) gene located on Xp11.22 – p11.23 of the short arm of the X chromosome. The absence of functional WASP leads to severe clinical symptoms that results in the deaths of patients if they are not diagnosed and treated early. The objective of the study was to identify mutations in the *WASP* gene of families with children diagnosed with WAS. The whole coding sequence and the intron-exon flanking regions of the *WASP* were sequenced by Sanger method. Two cases of children who has WAS were found to carry mutations in the *WASP* gene. A c.702insAC mutation led a frameshift at position of codon 236 and terminated the protein at the position of codon 262 was identified in patient WA007 and a c.91G>A mutation that transformed glutamic acid to lysine at codon 31 was determined in patient WA010. This study provides a data set and screening of mutations in the *WASP* gene in Vietnamese patients to further identify the genetic causes and contribute to the clinical management and genetic counseling for the affected families.

Keywords: Wiskott-Aldrich, *WASP*, sequencing, genetic counseling