

Tạp chí Công nghệ Sinh học **14**(1): 15-21, 2016

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN TRÊN GEN *KCNJ5* Ở BỆNH NHÂN MANG KHỐI U TUYẾN TỔNG HỢP ALDOSTERONE Ở VỎ THƯỢNG THẬN

Lê Bắc Việt¹, Hoàng Thị Lan¹, Lương Thị Lan Anh², Nguyễn Huy Hoàng¹

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

²Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài: 03.6.2015

Ngày nhận đăng: 30.12.2015

TÓM TẮT

Aldosterone là một loại nội tiết tố (hormone) quan trọng trong tuyến thượng thận của cơ thể người. Nó tham gia vào quá trình điều tiết muối và nước trong cơ thể, do đó đồng thời kiểm soát huyết áp. Cường aldosterone (sự sản sinh aldosterone khi renin bị kìm hãm) đóng một vai trò lớn trong sinh lý bệnh của tăng huyết áp. Đột biến trên gen *KCNJ5* tạo ra khối u tuyến sản sinh aldosterone là nguyên nhân chủ yếu gây ra hiện tượng cường aldosterone. Trong nghiên cứu này, toàn bộ trình tự hai exon của gen *KCNJ5* được khuếch đại và giải trình tự trực tiếp để xác định đột biến. Kết quả là hai đột biến đã được tìm thấy trên hai bệnh nhân có biểu hiện tăng huyết áp và xuất hiện khối u trên tuyến thượng thận. Trong đó, đột biến dị hợp tử D223V là một đột biến hoàn toàn mới còn đột biến đồng hợp tử Q282E đã chứng minh là một đa hình có ảnh hưởng rất đáng kể lên sự sống của dòng tế bào H295R và kênh dẫn truyền K^+ . Nghiên cứu trên mô hình cấu trúc 3D protein của các đột biến càng làm sáng tỏ mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của hai bệnh nhân. Những kết quả này đã phần nào chỉ ra được nguyên nhân gây khối u tuyến thượng thận và những rối loạn nội tiết trong cơ thể các bệnh nhân.

Từ khóa: Aldosterone, đột biến gen, gen *KCNJ5*, tăng huyết áp, tuyến thượng thận

GIỚI THIỆU

Aldosterone là một steroid hormone được tổng hợp trong vùng glomerulosa ở tuyến thượng thận. Thông thường, aldosterone được tổng hợp đồng thời trong cả điều kiện kali huyết trong màng sinh chất giảm xuống mức rất thấp và tăng lên cao (Spat and Hunyady, 2004). Ở điều kiện hàm lượng kali thấp, hệ thống renin-angiotensin sẽ được kích hoạt, sản sinh ra hormone angiotensin II (AII). Trong vùng glomerulosa, hormone này sẽ phát tín hiệu thông qua G-protein receptor (GPCR) và tiềm năng còn lại của nó được xây dựng từ hoạt tính của ion K^+ (Spat, 2004). Tín hiệu AII và sự tăng cao kali gây ra sự khử màng và kích hoạt kênh dẫn truyền điện tử Ca^{2+} . Sự tăng cao của ion Ca^{2+} nội bào đưa đến những tín hiệu cho việc sản sinh ra aldosterone một cách bình thường, và sự tăng cường kéo dài này dẫn đến sự gia tăng nhanh chóng của tế bào glomerulosa (McEwan *et al.*, 1996; Pawlikowski *et al.*, 2001; Spat and Hunyady, 2004; Tanabe *et al.*, 1998). Tín hiệu aldosterone trong thận làm tăng cao sự tái hấp thụ điện tích Na^+ , chống xơ vữa động mạch và tăng cao sự tiết ion K^+ .

Ở hiện tượng cường aldosterone, tuyến thượng

thận vẫn tiếp tục sản sinh aldosterone nhưng trong điều kiện không có sự hiện diện của AII hoặc sự tăng cao kali huyết thanh, gây ra hiện tượng tăng huyết áp và hàm lượng ion K^+ trong màng sinh chất thấp. Hiện tượng cường aldosterone này được tìm thấy trong khoảng 10% trường hợp bệnh nhân được chẩn đoán tăng huyết áp. Hơn 1/3 trong số này có mang khối u tuyến tổng hợp aldosterone (aldosterone-producing adenoma-APA) ở vỏ thượng thận (Rossi *et al.*, 2006). Số nhỏ còn lại do những đột biến ảnh hưởng đến sự biểu hiện của aldosterone synthase (CYP11B2) (Lifton *et al.*, 1992).

Khối u APA có hình tròn, dễ dàng quan sát thấy vì nó luôn nằm đơn lẻ, không lẫn với những tế bào khác và được chẩn đoán khi người bệnh ở độ tuổi từ 30 đến 70 tuổi. Bệnh nhân khi nhập viện có những biểu hiện tăng huyết áp và thường hạ kali huyết. Thông thường, khi hàm lượng aldosterone tăng cao thì hàm lượng renin giảm mạnh (thể hiện qua sự tăng cao của tỷ lệ aldosterone/renin) và khối u trên tuyến thượng thận có thể được quan sát thông qua hệ thống chụp CT (Computerized Tomography). APA hầu như luôn luôn là những khối u lành, không gây ảnh hưởng đến tế bào bình thường và không di căn

(Ghose *et al.*, 1999). Đối với hầu hết các bệnh, liệu pháp hay được áp dụng là phẫu thuật cắt bỏ khối u hoặc dùng thuốc điều trị để đưa huyết áp về mức bình thường (Calvo-Romero and Ramos-Salado, 2000). Tuy nhiên, chúng ta vẫn cần những nghiên cứu sâu rộng hơn về cơ chế di truyền học phân tử/tế bào hay đột biến gen gây ra khối u.

Năm 2011, công trình nghiên cứu của Choi và cộng sự đã chứng minh được rằng đột biến trên gen *KCNJ5* là nguyên nhân chủ yếu gây ra APA, tăng cao aldosterone và hạ kali huyết do đột biến trên gen *KCNJ5* (Choi *et al.*, 2011). Gen *KCNJ5* mã hóa cho protein G kích hoạt kênh thứ 4 dẫn truyền kali vào trong tế bào (G protein – activated inward rectifier potassium channel 4) và là một loại protein (G-protein) dẫn truyền ion kim loại (Kubo *et al.*, 2005). Về mặt hóa sinh, xu hướng của protein này cho phép dòng vận chuyển kali chảy vào trong hơn là đi ra ngoài tế bào. Về mặt phân tử, gen *KCNJ5* nằm trên nhiễm sắc thể 11, có kích thước vào khoảng 31 kb nhưng trình tự mã hóa chỉ gồm hai exon, dài 1260 bp, mã hóa cho 419 amino acid. Trong nghiên cứu này, chúng tôi phát hiện đột biến ở hai bệnh nhân được chẩn đoán mang khối u tuyến tổng hợp aldosterone. Kết quả nghiên cứu những đột biến trên gen *KCNJ5* sẽ góp phần giải thích cho nguyên nhân và cơ chế hình thành khối u vỏ thượng thận cũng như một loạt những rối loạn khác trong quá trình tổng hợp aldosterone ở bệnh nhân.

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm hóa sinh của các bệnh nhân.

Tên xét nghiệm	Bệnh nhân 1	Bệnh nhân 2	Mức bình thường
Aldosterone (pg/mL)	215,45	185,25	40 ÷ 310
Renin (pg/mL)	1,76	0,86	4 ÷ 37,52
K ⁺ (mmol/L)	2,5	2,88	3,4 ÷ 4,5
Na ⁺ (mmol/L)	142	140	133 ÷ 147

Từ những kết quả xét nghiệm như hàm lượng aldosterone và natri ở mức cao trong giới hạn trong khi lượng kali và renin ở mức rất thấp, kết luận ban đầu được đưa ra, đó là có khả năng tuyến thượng thận của hai bệnh nhân đã xuất hiện khối u tuyến sản sinh aldosterone gây cường aldosterone và hạ kali. Ngoài ra, quá trình thu thập mẫu máu bệnh nhân đều đảm bảo những yêu cầu về mặt y đức khi có được sự đồng thuận của bệnh nhân, gia đình bệnh nhân và

Bảng 2. Trình tự các oligonucleotide.

Tên mỗi	Chiều xuôi	Chiều ngược	Exon	Trình tự 5' → 3'	Sản phẩm PCR
KC1-F	X		1	AGTGAATCAGAACAGCCCCTTCAC	1100 bp
KC1-R		X		ACAGACCTGCATCTTCTGGAGTCAC	
KC2-F	X		2	GCATGTAACCTCCGTTTCCCAGG	500 bp
KC2-R		X		GGAGCTGTGAGGGCTGGGTTTATG	

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Bệnh nhân

Bệnh nhân 1

Bệnh nhân có giới tính nữ, vào viện khám khi 35 tuổi với những biểu hiện lâm sàng ban đầu là rối loạn nội tiết tố trong cơ thể và tăng huyết áp. Hình ảnh chụp cộng hưởng từ và CT (Computerized Tomography) ổ bụng cho thấy tuyến thượng thận bên trái có khối kích thước khoảng 13x18 mm. Bên cạnh đó, xét nghiệm hóa sinh cho thấy hàm lượng aldosterone và natri đạt ngưỡng cao trong khi hàm lượng renin và kali giảm mạnh dưới mức giới hạn thông thường (Bảng 1).

Bệnh nhân 2

Bệnh nhân nam, 41 tuổi, có những biểu hiện tăng huyết áp khi vào viện khám. Kết quả chụp cộng hưởng từ và CT ổ bụng cho thấy tuyến thượng thận bên trái hai cạnh thanh mảnh, cân đối, không thấy khối; tuy nhiên, tuyến thượng thận bên phải có nốt tổn thương đường kính 11 mm, giảm nhẹ tỷ trọng trước tiêm và sau khi tiêm có ngấm thuốc. Bên cạnh đó, tổn thương có bờ đều, ranh giới rõ, không xâm lấn. Về chỉ số hóa sinh, các xét nghiệm cho kết quả tương tự như bệnh nhân 1 (Bảng 1).

danh tính bệnh nhân được hoàn toàn giữ bí mật.

Khuếch đại trình tự exome và giải trình tự gen *KCNJ5*

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu của hai bệnh nhân kể trên bằng bộ kit tách chiết DNA từ máu của hãng Thermo Scientific dựa theo phương pháp của Sambrook và đồng tác giả để tạo khuôn mẫu cho PCR nhân gen (Sambrook *et al.*, 1989).

Toàn bộ trình tự mã hóa của gen *KCNJ5* gồm 2 exon và một phần nhỏ vùng intron bao quanh được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR bởi 2 cặp mồi đặc hiệu cho 2 vùng exon (Bảng 2). Hai cặp mồi này được thiết kế dựa theo trình tự gen *KCNJ5* tham chiếu của người trên hệ thống ensembl (www.ensembl.org) với mã số ENSG00000120457. Thí nghiệm PCR được thực hiện trong tổng thể tích 50 µl với các thành phần có nồng độ ban đầu bao gồm 10x Dream *Taq* Buffer, 10 mM dNTP, 10 pmol/µl mỗi mồi, 2U Dream *Taq* DNA polymerase và 40 ÷ 100 ng/µl DNA khuôn. Chu trình nhiệt được tối ưu hóa: 95°C/3 phút; (95°C/30 giây; 59°C/45 giây; 72°C/1 phút 30 giây) x 30 chu kỳ; 72°C/ 10 phút và sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Để chuẩn bị cho việc giải trình tự gen, sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ GeneJet Gel Extraction Kit của hãng Thermo Scientific. Sản phẩm PCR tinh sạch sẽ được tiến hành đọc trình tự hai chiều trực tiếp trên máy giải trình tự ABI 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, Hoa Kỳ). Kết quả đọc trình tự được phân tích trên phần mềm ClustalX2 và BioEdit 7.0 để phát hiện các đột biến.

Phân tích, dự đoán ảnh hưởng của đột biến/đa hình lên cấu trúc protein

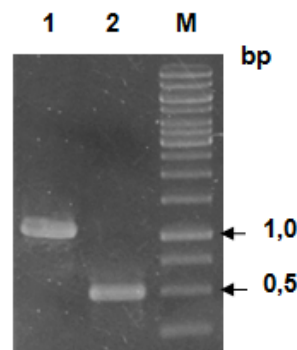
Trình tự amino acid của protein KCNJ1, KCNJ2, KCNJ3, KCNJ5, KCNJ8, KCNJ10 và KCNJ12 ở người được tải về từ website <http://www.ensembl.org>. Ngoài ra, trình tự amino acid KCNJ5 ở một số loài động vật có vú khác như chuột, thỏ, ếch, lợn, gà được thu thập từ website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=kcnj5>. Các trình tự amino acid này được tiến hành so sánh với nhau để tìm ra những amino acid có độ tương đồng cao giữa các loài với nhau cũng như các amino acid có tính bảo thủ cao trong họ protein KCNJ.

Phần mềm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) được sử dụng để tiến hành so sánh các trình tự amino acid. Phần mềm tin sinh học *spdbv* 4.10 và *ViewerLite* 4.2 được sử dụng để mô phỏng cấu trúc và phân tích ảnh hưởng của các đột biến thay thế amino acid trên gen *KCNJ5*.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định đột biến gen *KCNJ5*

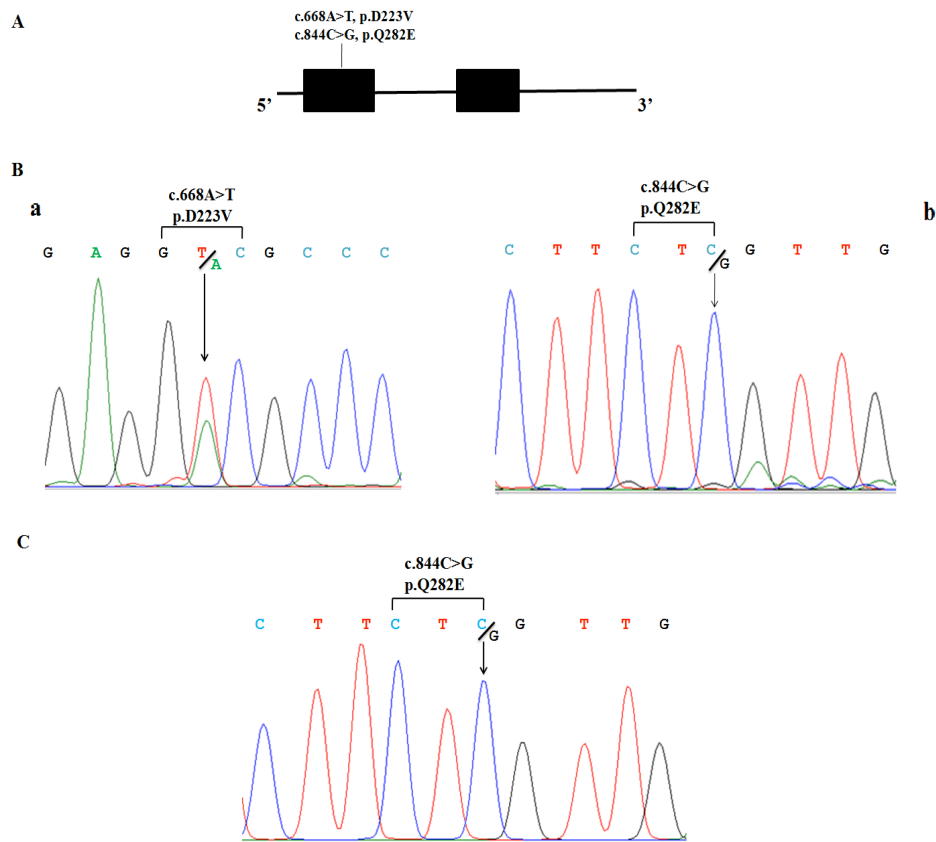
Hai exon của gen *KCNJ5* được khuếch đại bằng PCR lần lượt có kích thước là khoảng 1,1 kb với exon 1 và 0,5 kb với exon 2. Hình ảnh điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy hình ảnh các băng DNA hoàn toàn đặc hiệu và có kích thước phù hợp với tính toán ban đầu khi thiết kế mồi, hoàn toàn đủ điều kiện để tiến hành giải trình tự gen (Hình 1).



Hình 1. Điện di đồ khuếch đại trình tự exome gen *KCNJ5*. 1: Exon 1; 2: Exon 2; M: Marker DNA 1 kb (Thermo Scientific).

Hai sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được tiến hành đọc trình tự hai chiều bằng các mồi tại bảng 2. Từ kết quả so sánh trình tự gen, một đột biến đã được phát hiện ở trên cả hai bệnh nhân và một đột biến ở bệnh nhân 1, cả hai đột biến này đều xảy ra trên exon 1 của gen *KCNJ5* (Hình 2A). Cụ thể, ở đột biến xảy ra trên cả hai bệnh nhân, một nucleotide C đã bị thay thế thành G ở vị trí thứ 844 trên cDNA. Sự thay thế nucleotide này đã chuyển đổi glutamine acid (Q) thành glutamic acid (E) tại vị trí amino acid thứ 282 trên trình tự protein (p.Q282E) (Hình 2B.b và 2C). Dựa trên biểu đồ kết quả giải trình tự gen, đột biến này được xác định ở dạng đồng hợp tử.

Bên cạnh đó, đột biến còn lại chỉ xảy ra trên bệnh nhân 1, ở dạng dị hợp tử: nucleotide A bị thay đổi thành T gây ra sự chuyển đổi một amino acid từ aspartic acid (D) thành valine (V) (p.D223V) (Hình 2B.a). Trong hai đột biến này, đột biến p.Q282E được coi như là một đa hình (SNP) đã tìm thấy và công bố trong nghiên cứu của Murthy cùng cộng sự (Murthy *et al.*, 2014) và điểm đa hình đã được đăng lên ngân hàng SNP trên trang NCBI (National Center Biology Information) với số hiệu là rs7102584.



Hình 2. Kết quả giải trình tự gen *KCNJ5*. A: Vị trí các đột biến; hình hộp thể hiện các exon, đường thẳng thể hiện các intron và vùng không mã hóa. B: Biểu đồ đọc trình tự theo chiều ngược 3'-5' của bệnh nhân 1; a: đột biến D223V; b: đột biến Q282E. C: Biểu đồ đọc trình tự theo chiều ngược 3'-5' của bệnh nhân 2.

Trong nghiên cứu của Murthy, đột biến Q282E được chứng minh là một điểm đa hình khi tần số xuất hiện đạt 5% trong cộng đồng người Australia da trắng trong nghiên cứu nói trên và 2% trong cộng đồng tại dự án 1000 genomes (Funder *et al.*, 2008). Do đó, đây hoàn toàn có thể là một đa hình trong cộng đồng người dân Việt Nam cũng như Châu Á. Bên cạnh đó, khi được tiến hành biểu hiện trên tế bào trứng ếch Châu Phi (*Xenopus*) và dòng tế bào đặc trưng cho vùng glomerulosa ở người H295R, đa hình Q282E đều cho thấy kết quả gây sự giảm mạnh ion K^+ khiến tế bào trứng ếch chỉ có thể phát triển trong điều kiện nồng độ Na^+ tăng cao và làm giảm sự sống của tế bào H295R sau 48 giờ kích hoạt điện sinh trong môi trường nuôi cấy (Murthy *et al.*, 2014). Từ đây, có thể nhận thấy rằng đa hình Q282E là nguyên nhân chủ yếu gây ra khối u tuyến sản sinh aldosterone ở hai bệnh nhân với mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình hoàn toàn phù hợp. Trong

khi đó, đột biến còn lại là một điểm đột biến hoàn toàn mới, chưa được tìm thấy hay công bố trên bất cứ công trình nào. Do đó, rất cần có nghiên cứu sâu rộng hơn về đột biến này trên mô hình *in vitro* ở dòng tế bào động vật để xác định chính xác ảnh hưởng của đột biến lên sự sống của tế bào và các kênh dẫn truyền K^+ .

Phân tích đột biến trên mô hình cấu trúc không gian 3D protein

Để phân tích và xác định ảnh hưởng của đột biến lên cấu trúc và sự ổn định của protein *KCNJ5*, trước tiên trình tự amino acid của protein *KCNJ5* ở người sẽ được so sánh với trình tự amino acid của một số loài động vật có khác và trình tự amino acid của một số protein khác trong họ *KCNJ* để xác định tính bảo thủ của các vị trí xảy ra đột biến (Hình 3). Kết quả so sánh trình tự đã cho thấy hai vị trí xảy ra đột biến là D223 và Q282 có sự tương đồng tuyệt đối khi so

sánh với trình tự amino acid của chuột, thỏ, ếch, lợn và gà. Đồng thời, chuỗi amino acid của các loài tại khu vực có hai điểm đột biến này đạt độ giống nhau

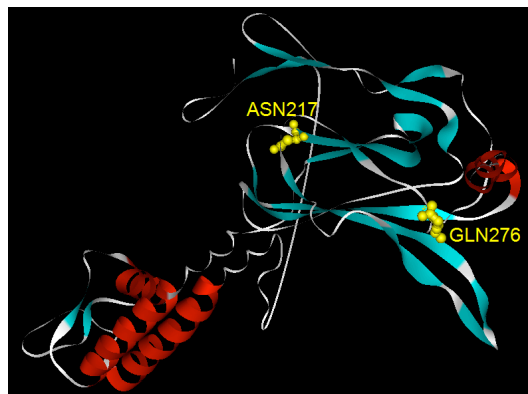
đến gần 100%. Từ đó, có thể nhận định đây là khu vực có sự bảo thủ rất cao về cấu trúc bậc I protein KCNJ5 giữa các loài động vật bậc cao.

	↓		↓
hKCNJ5	SMRDEKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS
pKCNJ5	SMRDEKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS
rKCNJ5	SMRDEKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS
mKCNJ5	SMRDEKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS
cKCNJ5	SMRDEKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS	GFDTGDDRLFLVSPLIISHEINQKS
fKCNJ5	SVRDGKLCLMFRVGDLRNSHIVEASIR	GFDTGDDRLFLVSPLIICHEFNQKS	
	↓		↓
KCNJ5	NAVISMREKLCLMFRVGDLRNSHIV	DDRLFLVSPLIISHEINQKSPFWEMS	ADQLFLVSPLTICHVIDAKSPFYDLS
KCNJ3	HAVISMRDGLTLMFRVGNLRNSHMV	LDRIFLVSPITILHEIDQASPLFGIS	LDRIFLVSPITILHEIDQASPLFGIS
KCNJ12	NAVVALRDGKLCLMWRVGNLRKSHIV	LDRIFLVSPITIVHEIDQDSPLYDLS	LDRIFLVSPITIVHEIDQDSPLYDLS
cKCNJ12	NAVVALRDGKLCLMWRVGNLRKSHIV	SNNIFLVAPLIICHVIDKRSPLYDIS	NENLFFISPLTIYHVIDHNSPEFHMA
KCNJ2	NAVIAMRDGKLCLMWRVGNLRKSHLV	SDSPFLILPLTFYHVVDQTSPLKDLF	
KCNJ8	HAVIAVRNGKLCFMFRVGDLRKSMII		
KCNJ1	NAVISKRGKLCLLIRVANLRKSLLI		
KCNJ10	HAVVASHNGKPLMIRVANMRKSLLI		

Hình 3. So sánh trình tự amino acid của họ protein KCNJ. h: human (người), p: pig (lợn), r: rabbit (thỏ), m: mouse (chuột), c: chicken (gà), f: frog (ếch). In đậm và mũi tên thể hiện vị trí các amino acid bị đột biến. Bối đen thể hiện sự tương đồng của các amino acid.

Bên cạnh đó, khi so sánh với trình tự các protein khác thuộc họ KCNJ, kết quả đã cho thấy vị trí Q282 của KCNJ5 có sự tương đồng cao với các protein còn lại, chứng minh đây là vị trí có tính bảo thủ cao trong họ protein KCNJ. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Murthy et al khi cho rằng đây là một vị trí có tính bảo thủ của protein KCNJ5 (Murthy *et al.*, 2014). Do đó đột biến khi xảy ra tại vị trí này sẽ có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và sự ổn định của protein, điều đã chứng minh trong nghiên cứu trên mô hình tế bào động vật. Đối với vị trí D223, dựa vào kết quả so sánh, có thể dễ dàng nhận thấy đây không phải là vị trí bảo thủ như Q282 tuy

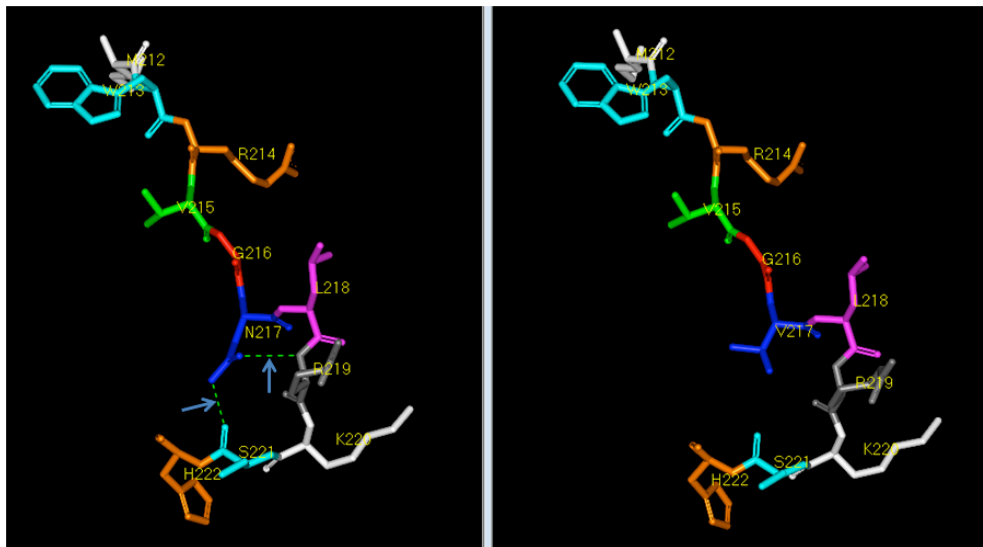
nhien các amino acid xung quanh lại có độ tương đồng cao tạo nên cấu trúc motif. Do đó, có khả năng vị trí amino acid này nằm trên cấu trúc bậc 2 của protein KCNJ5. Khi đưa lên mô hình cấu trúc không gian 3D protein KCNJ12 của gà - mô hình đã được Choi et al sử dụng trong nghiên cứu của mình để mô phỏng protein KCNJ5 ở người (Choi *et al.*, 2011), vị trí D223 ở người ứng với N217 ở gà chính xác nằm trên gập nếp β thứ 3 (Hình 4). Tuy nhiên, để dự đoán chính xác ảnh hưởng của đột biến này lên cấu trúc protein KCNJ5, cần tiến hành tạo đột biến trực tiếp trên mô hình cấu trúc 3D mô phỏng này và so sánh với cấu trúc tham chiếu (Hình 5).



Hình 4. Mô hình mô phỏng cấu trúc protein KCNJ5 ở người từ mô hình KCNJ12 ở gà (Tao *et al.*, 2009). Màu đỏ: xoắn α -helix, màu xanh: gập nếp β -sheet. Màu vàng: vị trí amino acid xảy ra đột biến tương ứng với các vị trí amino acid trên KCNJ5.

Trên mô hình cấu trúc không gian 3D protein mô phỏng KCNJ5 từ protein KCNJ12 ở gà, khi chưa xảy ra đột biến, trong chuỗi liên kết amino acid, vị trí N217 có hai liên kết hydro với R219 và S221. Tuy nhiên, khi xảy ra đột biến điểm thay thế amino acid từ Asparagine (N) thành Valine (V), hai liên kết hydro này đã bị mất đi. Kết quả này cộng với việc N217 thuộc cấu trúc bậc 2 của KCNJ12 đã chứng minh rằng về mặt liên kết amino acid trong protein,

đột biến N217V trên KCNJ12 mô phỏng cho đột biến D223V trên KCNJ5 có ảnh hưởng đến liên kết hydro, sự ổn định cũng chức năng protein KCNJ12 cũng như KCNJ5. Do đó, đột biến hoàn toàn có thể là nguyên nhân gây ra những khối u tuyến sản sinh aldosterone. Tuy vậy, để đánh giá chính xác được ảnh hưởng của đột biến này, nghiên cứu trên mô hình tế bào động vật như tế bào trứng ếch Châu Phi hay tế bào H295R cần được thực hiện.



Hình 5. Phân tích ảnh hưởng của đột biến D223V lên protein KCNJ5 trên mô hình cấu trúc 3D mô phỏng từ đột biến N217V trên KCNJ12. Mũi tên chỉ các liên kết hydro. A. Mô hình bình thường với N217; B. Mô hình đột biến với V217.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã phát hiện được hai đột biến trên gen *KCNJ5* có khả năng lớn gây khối u tuyến sản sinh aldosterone ở người bệnh với biểu hiện tăng huyết áp, hạ kali và tăng cao aldosterone trong tuyến thượng thận. Trong đó, đột biến Q282E, ở nghiên cứu trước đã được chứng minh là một điểm đa hình có ảnh hưởng đến sự sống của tế bào khi nghiên cứu trên mô hình tế bào trứng ếch Châu Phi (*Xenopus*) và tế bào đặc trưng cho vùng glomerulosa ở người H295R. Cuối cùng, đột biến D223V được phân tích trên mô hình cấu trúc mô phỏng không gian 3D protein KCNJ5 cho thấy đột biến D223V có thể ảnh hưởng đến liên kết hydro và cấu trúc của protein.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-YS.02-2013.20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Calvo-Romero JM, Ramos-Salado JL (2000) Recurrence of adrenal aldosterone-producing adenoma. *Postgrad Med J* 76: 160-161.
- Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ (2011) K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331: 768-772.
- Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF, Montori VM, Endocrine S (2008) Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3266-3281.
- Ghose RP, Hall PM, Bravo EL (1999) Medical management of aldosterone-producing adenomas. *Ann Intern Med* 131: 105-108.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A,

- Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57: 509-526.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM (1992) A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: 262-265.
- McEwan PE, Lindop GB, Kenyon CJ (1996) Control of cell proliferation in the rat adrenal gland in vivo by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 271: E192-198.
- Murthy M, Xu S, Massimo G, Wolley M, Gordon RD, Stowasser M, O'Shaughnessy KM (2014) Role for germline mutations and a rare coding single nucleotide polymorphism within the KCNJ5 potassium channel in a large cohort of sporadic cases of primary aldosteronism. *Hypertension* 63: 783-789.
- Pawlikowski M, Gruszka A, Mucha S, Melen-Mucha G (2001) Angiotensins II and IV stimulate the rat adrenocortical cell proliferation acting via different receptors. *Endocr Regul* 35: 139-142.
- Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M (2006) A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 48: 2293-2300.
- Sambrook, Maniatis T, Fritsch EF (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, (New York).
- Scholl UI, Lifton RP (2013) New insights into aldosterone-producing adenomas and hereditary aldosteronism: mutations in the K⁺ channel KCNJ5. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22: 141-147.
- Spat A (2004) Glomerulosa cell--a unique sensor of extracellular K⁺ concentration. *Mol Cell Endocrinol* 217: 23-26.
- Spat A, Hunyady L (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 84: 489-539.
- Tanabe A, Naruse M, Arai K, Naruse K, Yoshimoto T, Seki T, Imaki T, Kobayashi M, Miyazaki H, Demura H (1998) Angiotensin II stimulates both aldosterone secretion and DNA synthesis via type 1 but not type 2 receptors in bovine adrenocortical cells. *J Endocrinol Invest* 21, 668-672.
- Tao X, Avalos JL., Chen J, MacKinnon R (2009) Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 326: 1668-1674.
- Zennaro MC, Jeunemaitre X (2011) Mutations in KCNJ5 gene cause hyperaldosteronism. *Circ Res* 108: 1417-1418.

IDENTIFICATION OF MISSENSE MUTATIONS OF THE *KCNJ5* GENE ON PATIENTS SUFFERING FROM ALDOSTERONE-PRODUCTION ADENOMAS IN ADRENAL CORTEX

Le Bac Viet¹, Hoang Thi Lan¹, Luong Thi Lan Anh², Nguyen Huy Hoang^{1,✉}

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

²Hanoi University of Medical

SUMMARY

Aldosterone is an important hormone in the adrenal gland as well as the human body. It is responsible for regulating salt and water in the body, therefore controlling blood pressure. Primary aldosteronism (also known as aldosterone producing while suppressing renin) plays a significant role in the pathophysiology of hypertension. Mutation in the *KCNJ5* gene which leads to aldosterone-production adenomas is the main cause of primary aldosteronism. In this study, the entire coding sequence of the *KCNJ5* gene including 2 exons was amplified and directly sequenced to detect mutations. The result revealed that two missense mutations were identified in two patients with hypertension and an apparent mass on the adrenal gland. A heterozygous mutation, D223V, is a novel mutation while the homozygous mutation, Q282E, was known as a polymorphism that had a significant effect on viability of the H295R cell line and K⁺ conduction channel. Analysis of the 3D protein structural model of the mutants clarified the relationship between genotype and phenotype of the two patients. These results partially pointed out causes of the adrenal gland adenomas and endocrine disorders in the the patient.

Keywords: Aldosterone, adrenal gland, hypertension, mutation, *KCNJ5* gene

✉ Author for correspondence: E-mail: nhhoang@igr.ac.vn