NGHIÊN CỨU CẤU TRÚC PROTEIN CYTOCHROME P450C21 (CYP21A2) Ở ĐỘT BIẾN TRÊN NGƯỜI BỆNH TĂNG SẢN THƯỢNG THẬN BẨM SINH

Lê Bắc Việt*; Nguyễn Kim Thoa*; Nguyễn Huy Hoàng*

TÓM TẮT

Cytochrome P450c21 (CYP21A2) là một loại enzym thiết yếu tham gia vào quá trình sinh tổng hợp steroid hormon tuyến thượng thận. Suy giảm hoạt tính CYP21A2 (21-hydroxylase) dẫn đến hiện tượng tích lũy các tiền chất trung gian, từ đó gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (TSTTBS). Hơn 90% trường hợp mắc TSTTBS là do đột biến trên gen *CYP21A2*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phần mềm tin sinh học để phân tích cấu trúc không gian 3D protein nhằm hiểu rõ hơn về ảnh hưởng của đột biến điểm lên cấu trúc và chức năng của CYP21A2. Kết quả góp phần cho hướng nghiên cứu đột biến ảnh hưởng cấu trúc 3D protein liên quan tới người bệnh có biểu hiện TSTTBS.

* Từ khóa: Tăng sản thượng thận bẩm sinh; Protein cytochrome P450C21; Cấu trúc.

MODELING STRUCTURE INVESTIGATION OF CYTOCHROME P450C21 (CYP21A2) PROTEIN IN MISSENSE MUTATIONS ON CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA PATIENTS

SUMMARY

Cytochrome P450c21 (CYP21A2) is an essential enzyme participating in biosynthesis pathway of adrenal gland steroid hormone. 21-hydroxylase deficiency leads to accumulating intermediate precursors, which causes congenital adrenal hyperplasia (TSTTBS) disease. More than 90% cases of TSTTBS originate in CYP21A2 mutations. In this study, we utilized bioinformatic softwares to analyze modelling of three-dimension (3D) structures of CYP21A2 protein in order to understand much more about effects of missense mutations on functional structure of the CYP21A2. The obtained results will contribute in investigation trend of mutation affecting on protein 3D structure relating with patients who have signs of congenital adrenal hyperplasia.

** Key words: Congenital adrenal hyperplasia; Cytochrome P450C21 (CYP21A2) protein; Structure.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tuyến thượng thận tiết ra 3 loại steroid hormon đó là mineralocorticoid, glucocorticoid và androgen. Chúng có vai trò cân bằng nước, muối, từ đó điều tiết chuyển hóa protein, carbonhydrate, lipid và liên quan đến biệt hóa giới tính. CYP21A2 đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa steroid hormon tuyến thượng thận cùng với 5 loại enzym thiết yếu khác là CYP11A1, CYP17, CYP11B1, CYP11B2 và 3β-hydroxylase. Gen *CYP21A2*

** Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: PGS. TS. Trần Văn Khoa

nằm trên nhiễm sắc thể 6q21, gồm 10 exon mã hóa cho 21-hydroxylase có tác dụng xúc tác cho phản ứng chuyển hóa progesterone và 17-hydroxyprogesterone lần lượt thành 11-deoxycorticosterone và 11-deoxycortisol, với sản phẩm cuối cùng là mineralocorticoid và glucocorticoid. Thiếu hụt 21-hydroxylase sẽ dẫn đến hiện tượng các tiền chất không được chuyển hóa hoặc chuyển hóa không hoàn toàn, dẫn đến ứ đọng lại khiến lượng glucocortticoid và mineralocorticoid không được tạo thành hoặc thấp hơn so với bình thường, khi đó lượng androgen tăng cao gây ra TSTTBS. TSTTBS là một bệnh di truyền, bao gồm một nhóm các rối loạn tình trạng lặn trong quá trình sinh tổng hợp steroid hormon tuyến thượng thận. Trong chủng tộc người Tây Âu, 90 - 95% các trường hợp mắc TSTTBS có nguyên nhân bắt nguồn từ thiếu hụt 21-hydroxylase do đột biến trên gen CYP21A2 làm suy giảm hoặc làm mất hoạt tính enzym [1]. Các nghiên cứu về cấu trúc protein của cytochrome P450 đầu tiên từ vi khuẩn như CYP119 từ *Sulfolobus solphataricus* và CYP51 ở *Mycobacterium tuberculosis* [2], tiếp theo nghiên cứu ở động thực vật và người như CYP11B1 và CYP11B2 ở người [3].

Các phát hiện đột biến trên gen *CYP21* ở người bệnh TSTTBS đã được nghiên cứu nhiều. Tuy nhiên, nghiên cứu về cấu trúc 3D của đột biến này vẫn còn hạn chế. Chính vì vậy, chúng tôi đưa ra mô hình mô phỏng cấu trúc không gian 3D của CYP21A2 và ảnh hưởng của đột biến điểm tới cấu trúc và chức năng của CYP21A2.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu nghiên cứu.

Chuỗi trình tự amino axít của 21-hydroxylase được lấy trực tiếp về từ website http://www.ensembl.org và.http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do. Tiến hành nghiên cứu các trình tự amino axit CYP21A2 của người và bò (PDB id 3QZ1) [4].

Đầu tiên, trình tự amino axít của CYP2B4 từ thỏ (PDB id 1SU0) được sử dụng làm khuôn mẫu cho việc xây dựng mô hình không gian 3D CYP21A2 ở người [5]. Thêm vào đó, tiến hành phân tích những vùng bảo thủ và nhận biết cơ chất của P450 dựa trên trình tự của 2 loại P450 ở người đã được công bố từ trước là CYP2C8 và CYP2C9 (PDB id 1PQ2 và 1OG5). CYP17 cũng được sử dụng so sánh với lý do P450 này đã được nghiên cứu về liên kết giữa cấu trúc và chức năng.

2. Phương pháp nghiên cứu.

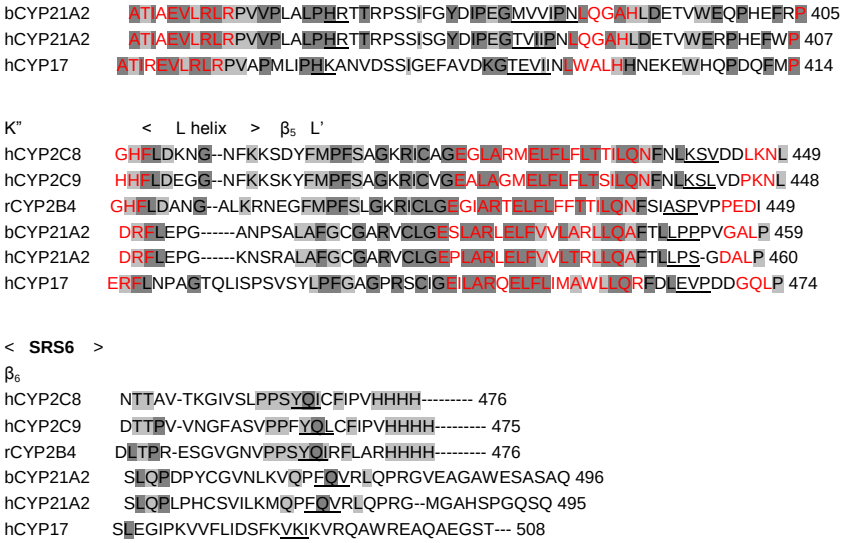
Để tiến hành so sánh, trình tự amino axit của loại P450 đã nêu ở trên được đưa lên phần mềm so sánh trình tự trực tuyến ClustalW2.(http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Tiếp theo, dựa vào kết quả xác định các dạng cấu trúc (motif) đã biết từ trước của CYP2B4 [5] để dự đoán vùng cấu trúc α-helix và β-sheet của CYP21A2. Các vùng nhận biết cơ chất (subtrate recognized site-SRS) được công bố trước từ CYP2C8 và CYP2C9 để dự đoán vùng SRS của CYP21A2 ở người và bò. Cuối cùng, dựa vào kết quả từ những bước làm ở trên, tìm thấy vùng bảo thủ trên trình tự amino axít của P450, các vùng bảo thủ này phải đảm bảo độ tương đồng cao giữa những P450 với nhau.

Sau khi so sánh trình tự amino axít nhằm xác định vùng cấu trúc của CYP21A2, sử dụng phần mềm tin sinh học *spdbv* 4.10 và *ViewerLite* 4.2 để mô phỏng cấu trúc và phân tích ảnh hưởng của đột biến lên 21-hydroxylase.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1.So sánh trình tự amino axit

```
                                                    <  A helix >
hCYP2C8    ------------------------------------MAKKTSSKGKLPPGPTPLPIIG-NMLQIDVKDICKSFTNFSKVY 43
hCYP2C9    ------------------------------------MAKKTSSKGR-PPGPTPLPVIG-NILQIGIKDISKSLTNLSKVY 42
rCYP2B4    ----------------------------------MAKKTSSKGKLPPGPSPLPVLG-NLLQMDRKGLLRSFLRLREKY 43
bCYP21A2   ----------MVLAGLLLLLLTLLAGAHLLWGRWKLRNLHLPPLVPGFLHLLQPNLPIHLLSLTQKL 56
hCYP21A2   ----------MLLLGLLLLLPLLAGARLLWNWWKLRSLHLPPLAPGFLHLLQPDLPIYLLGLTQKF 56
hCYP17     MWELVALLLLTLAYLFWPKRRCPGAKYPKSLLSLPLVGSLPFLPRHGHMHNNFFKLQKKY 60


<       SRS1        >
β1      β2  B helix           B'          <
hCYP2C8      GPVFTVYFGMNPIVVFHGYEAVKEALIDNGEEFSGRGNSPISQRITKGLGIISS--NGKR 101
hCYP2C9      GPVFTLYFGLKPIVVLHGYEAVKEALIDLGEEFSGRGIFPLAERANRGFGIVFS--NGKK 100
rCYP2B4     GDVFTVYLGSRPVVVLCGTDAIREALVDQAEAFSGRGKIAVVDPIFQGYGVIFA--NGER 101
bCYP21A2     GPVYRLRLGLQEVVVLNSKRTIEEAMIRKWVDFAGRPQIPSYKLVSQRCQDISLGDYSLL 116
hCYP21A2     GPIYRLHLGLQDVVVLNSKRTIEEAMVKKWADFAGRPEPLTYKLVSRNYPDLSLGDYSLL 116
hCYP17      GPIYSVRMGTKTTVIVGHHQLAKEVLIKKGKDFSGRPQMATLDIASNNRKGIAFADSGAH 120

C helix  >   <     D helix     >      <  E helix
hCYP2C8      WKEIRRFSLTTLRNFGMGKRSIEDRVQEEAHCLVEELRKTKASPCDPTFILGCAPCNVIC 161
hCYP2C9      WKEIRRFSLMTLRNFGMGKRSIEDRVQEEARCLVEELRKTKASPCDPTFILGCAPCNVIC 160
rCYP2B4     WRALRRFSLATMRDFGMGKRSVEERIQEEARCLVEELRKSKGALLDNTLLFHSITSNIIC 161
bCYP21A2     WKAHKKLTRSALLLG--TRSSMEPWVDQLTQEFCERMRVQAGAPVTIQKEFSLLTCSIIC 174
hCYP21A2     WKAHKKLTRSALLLG--IRDSMEPVVEQLTQEFCERMRAQPGTPVAIEEEFSLLTCSIIC 174
hCYP17      WQLHRRLAMATFALFKDGDQKLEKIICQEISTLCDMLATHNGQSIDISFPVFVAVTNVIS 180

<   SRS2   >                  < SRS3
>      <   F helix  >     F'helix G'helix   <
hCYP2C8      SVVFQKRFDYKDQNFLTLMKRFNENFRILNSPWIQVCNNFPLLIDCFPG-THNKVLKNVA 220
hCYP2C9      SIIFHKRFDYKDQQFLNLMEKLNENIEILSSPWIQVYNNFPALLDYFPG-THNKLLKNVA 219
rCYP2B4     SIVFGKRFDYKDPVFLRLLDLFFQSFSLISSFSSQVFELFSGFLKYFPG-THRQIYRNLQ 220
bCYP21A2     YLTFGN----KEDTLVHAFHDCVQDLMKTWDHWSIQILDMVPFLRFFPNPGLWRLKQAIE 230
hCYP21A2     YLTFGDKI--KDDNLMPAYYKCIQEVLKTWSHWSIQIVDVIPFLRFFPNPGLRRLKQAIE 232
hCYP17      LICFNTSYKNGDPELNVIQN---YNEGIIDNLSKDSLVDLVPWLKIFPNKTLEKLKSHVK 237

>                                 < SRS4
G helix  >      <  H helix  >         <
hCYP2C8      LTRSYIREKVKEHQASLDVNNPRDFIDCFLIKMEQE-----KDNQ-KSEFNIENLVGTVA 274
hCYP2C9      FMKSYILEKVKEHQESMDMNNPQDFIDCFLMKMEKE-----KHNQ-PSEFTIESLENTAV 273
rCYP2B4     EINTFIGQSVEKHRATLDPSNPRDFIDVYLLRMEKD-----KSDP-SSEFHHQNLILTVL 274
bCYP21A2 NRDHMVEKQLRRHKESMVAGQWRDMTDYMLQGVGRQ-----RVEEGPGQLLEGHVHMSVV 285
hCYP21A2     KRDHIVEMQLRQHKESLVAGQWRDMMDYMLQGVAQP-----SMEEGSGQLLEGHVHMAAV 287
hCYP17      IRNDLLNKILENYKEKFRSDSITNMLDTLMQAKMNSDNGNAGPDQDSELLSDNHILTIIG 297

I helix       ><  J helix  >          J'  <
hCYP2C8      DLFVAGTETTSTTLRYGLLLLKHPEVTAKVQEEIDHVIGRHRSP---CMQDRSHMPYTD 331
hCYP2C9      DLFGAGTETTSTTLRYALLLLKHPEVTAKVQEEIERVIGRNRSP---CMQDRSHMPYTD 330
rCYP2B4     SLFFAGTETTSTTLRYGFLLMLKYPHVTERVQKEIEQVIGSHRPP---ALDDRAKMPYTD 331
bCYP21A2     DLFIGGTETTASTLSWAVAFLLHHPEIQRRLQEELDRELGPGASCSRVTYKDRARLPLLN 345
hCYP21A2     DLLIGGTETTANTLSWAVVFLLHHPEIQQRLQEELDHELGPGASSSRVPYKDRARLPLLN 347
hCYP17      DIFGAGVETTTSVVKWTLAFLLHNPQVKKKLYEEIDQNVGFSRTP---TISDRNRLLLLE 354

<  SRS5  >
K helix >     β3          β4   K'
hCYP2C8      AVVHEIQRYSDLVPTGVPHAVTTDTKFRNYLIPKGTTIMALLTSVLHDKEFPNPNIFDP 391
hCYP2C9      AVVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFRNYLIPKGTTILISLTSVLHDNKEFPNPEMFDP 390
rCYP2B4     AVIHEIQRLGDLIPFGVPHTVTKDTQFRGYVIPKNTEVFPVLSSALHDPRYFETPNTFNP 391
```



Hình 1: So sánh trình tự liên kết amino axít của các loại cytochrome P450.

Màu đen bôi đậm là amino axít giống nhau tuyệt đối giữa các cytochrome P450. Màu đen bôi nhạt là amino axít có độ tương đồng thấp hơn. Các amino axít in đậm thuộc cấu trúc xoắn α-helix. Phần gạch chân là cấu trúc gấp nếp β-sheet. H: người (human), B: bò (bovine), R: thỏ (rabbit). SRS: vùng nhận biết cơ chất (subtrate recognition site).

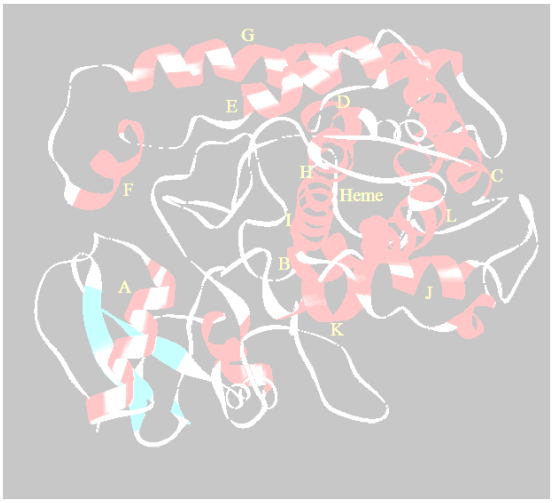
Chúng tôi biểu diễn liên kết trình tự cấu trúc amino axít của CYP21A2 ở người và bò với 3 loại protein P450 có độ tương đồng về trình tự và sẵn có trên dữ liệu PBD. Ngoài ra, đưa thêm CYP17 vào trong phần so sánh trình tự liên kết amino axít với lý do một vài thông tin về cấu trúc chức năng của enzym này đã được công bố từ trước đó [6]. So sánh trình tự amino axít của 6 loại protein hCYP2C8, hCYP2C9, hCY17, rCYP2B4, bCYP21 và hCYP21A2 nói trên (*hình 1)*. Mô hình của protein CYP21 có đôi nét giống với cấu trúc của P450 khác, đặc biệt CYP2B4 có độ tương đồng gần với CYP21A2 nhất. Chính vì vậy, cấu trúc mô phỏng của CYP21A2 dựa vào cấu trúc CYP2B4 để đưa ra các vùng cấu trúc xoắn α, gấp nếp β, vùng bảo thủ và vùng nhận biết cơ chất.

Dựa vào so sánh trình tự amino axít như trên, chúng tôi thấy CYP21 cũng có cấu trúc như một P450 điển hình, bao gồm cấu trúc xoắn α-helix và gấp nếp β-sheet. Cụ thể, CYP21A2 bao gồm 12 vùng xoắn α-helix giống như hầu hết các loại P450 đã được nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, protein này chỉ gồm 2 nhóm gấp nếp β-sheet với 6 chuỗi gấp nếp thay vì 4 nhóm gấp nếp β-sheet với 10 chuỗi gấp nếp như những loại P450 khác. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng xác định được 6 vùng nhận biết cơ chất cùng với vùng bảo thủ bao gồm cấu trúc xoắn α sau: D, E, I, L, J và K. Việc tìm ra chính xác những vùng cấu trúc của CYP21 có ý nghĩa rất quan trọng trong dự đoán ảnh hưởng của đột biến với lý do

điểm đột biến xảy ra ở mỗi vùng cấu trúc khác nhau sẽ có những ảnh hưởng khác nhau lên hoạt tính của enzym.

2. Mô hình cấu trúc CYP21A2 ở người.

Sau khi đã so sánh trình tự amino axít của P450 khác nhau, tiến hành phân tích mô hình không gian 3D của CYP21 với khuôn mẫu (template) là mô hình CYP21A2 ở bò đã được Zhao và CS xây dựng thành công [4]. Mô hình cấu trúc cơ bản của protein này được thể hiện ở hình 2.A.



A

B

Hình 2: Hình mẫu cấu trúc phân tử protein CYP21A2. Cấu trúc không gian của CYP21 ở bò có tương đồng giữa trình tự amino axít lên đến 79% so với cấu trúc ở người. A. Protein gồm 12 đoạn xoắn α-helix ký hiệu từ A đến L, dạng gấp nếp β-sheet (phần sáng góc dưới bên trái). B. Sự thay đổi về cấu trúc của amino axít khi xảy ra đột biến. Nhân heme nhằm ở chính giữa hình.

Dựa theo cấu trúc bậc hai này, những đột biến thay đổi amino axít nằm ở vị trí codon tương đồng giữa protein của người và bò đã được tìm thấy trên gen *CYP21A2*. Sử dụng phần mềm spdbv 4.10, những điểm đột biến trực tiếp tạo ra bằng cách thay đổi amino axít mong muốn trên cấu trúc không gian 3D *(hình 2B)*. Từ đây, những thay đổi về liên kết cấu trúc giữa amino axít sẽ được tổng hợp lại để đ□a ra dự đoán ban đầu về ảnh hưởng của đột biến lên hoạt tính 21-hydroxylase. Bênh cạnh đó, protein P450 đều chứa một nhân heme ở chính giữa có liên kết cộng hóa trị với cystein. Nhóm cystein này có tính bảo thủ rất cao trong P450, trong đó, Cys428 đóng vai trò liên kết với nhân heme trong CYP21A2.

Trong nghiên cứu này, tìm thấy 14 đột biến điểm thay đổi amino axít từ những công bố trước đây được đưa vào nghiên cứu. Trong đó, đột biến G291S, Q481P, P482S, T295N và L167P tìm thấy ở bệnh nhân ở thể bệnh nặng, có biểu hiện mất muối [7]. Nguyên nhân là G291 và T295 nằm trên xoắn I-helix thuộc vùng SRS4, còn P167 nằm ở E-helix, đều nằm trong vùng bảo thủ của CYP21 nên rất dễ ảnh hưởng đến cấu trúc và làm giảm hoặc mất hoạt tính enzym. Trong khi Q481P và P482S có cấu trúc liên kết cầu nối hydro thay đổi hoàn toàn so với bình thường, có thể gây ảnh

hưởng lớn lên hoạt tính 21-hydroxylase.
thể bệnh nam hóa, đột biến I172N, P463L được ghi nhận [8]. I172 nằm trên E-helix thuộc vùng bảo thủ của P450, còn P463 nằm trong vùng nhận biết cơ chất (SRS6) nên cũng phù hợp với kiểu hình của bệnh nhân. Ở dạng bệnh nhẹ thể không cổ điển, P453S, R483Q và R224Q là ba đột biến gây kiểu hình này [9]. Điều này được lý giải là do cả 2 đột biến P453S, R483Q đều không nằm trên bất kỳ vùng cấu trúc nào của CYP21A2, còn R224Q nằm trên G-helix lại cách xa trung tâm hoạt động nên chúng chỉ có thể gây ảnh hưởng nhỏ đến hoạt tính enzym, gây ra thể bệnh nhẹ. Ngoài ra, trong số những đột biến đã thống kê, 3 đột biến chưa liên kết với kiểu hình của bệnh nhân, đó là G291R, P459H và K121Q [10]. Dựa vào cấu trúc không gian của CYP21A2, chúng tôi đưa ra những dự đoán về kiểu hình và mức độ ảnh hưởng của ba đột biến này. Đầu tiên, K121 nằm trên C-helix, gần với nhân heme nên gây kiểu hình bệnh nặng là mất muối và làm suy giảm đáng kể hoạt tính 21-hydroxylase. Đối với đột biến thứ hai, P459 không nằm trên bất cứ vùng cấu trúc nào nên nó chỉ gây thể bệnh không cổ điển và ảnh hưởng ít đến hoạt tính enzym. Cuối cùng, G291 nằm trên I-helix, nên giống như T295N, sẽ làm giảm nhiều hoạt tính enzym gây thể bệnh nặng là mất muối hoặc nam hóa.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã mô phỏng được cấu trúc CYP21A dựa vào cấu trúc của CYP2C8 ở người, CYP2C9 ở người, CYP2B4 ở thỏ, CYP21 ở bò và CYP17 ở người. Bước đầu đã phân tích được 14 đột biến điểm thay đổi amino axít trên CYP21 liên quan tới bệnh TSTTBS. Các nghiên cứu này nhằm hiểu sâu hơn về cấu trúc của CYP21A2 ở người, từ đó đưa ra hướng phân tích các đột biến dựa trên cấu trúc 3D của bệnh TSTTBS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Merke. DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. Lancet. 2005, 365, pp.2125-2136.

2. Podust. LM, Poulos. TL, Waterman. MR. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha - sterol demethylase (CYP51) from Mycobacterium tuberculosis in complex with azole inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98, pp.3068-3073.

3. Belkina. NV, Lisurek. M, Ivanov. AS, Bernhardt. R. Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. J Inorg Biochem. 2001, 87, pp.197-207.

4. Zhao. B, Lei. L, Kagawa. N, Sundaramoorth.y M, Banerjee. S. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. J Biol Chem. 2012, 287, pp.10613-10622.

5. Scott. EE, White. MA, He. YA, Johnson. EF, Stout. C. Structure of mammalian cytochrome P450 2B4 complexed with 4-(4-chlorophenyl) imidazole at 1.9-A resolution: insight into the range of P450 conformations and the coordination of redox partner binding. J Biol Chem. 2004, 279, pp.27294-27301.

6. Auchus. RJ, Miller. WL. Molecular modeling of human P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. Mol Endocrinol. 1999, 13, pp.1169-1182.

7. Tardy. V, Menassa. R, Sulmont. V, Lienhardt-Roussie. A, Lecointre. C. Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. J Clin Endocrinol Metab. 2010, 95, pp.1288-1300.

8. Krone. N, Riepe. FG, Partsch. CJ, Vorhoff. W, Bramswig. J. Three novel point mutations of the CYP21 gene detected in classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2006, 114, pp.111-117.

9. Concolino. P, Vendittelli. F, Mello. E, Minucci. A, Carrozza. C. Functional analysis of two rare CYP21A2 mutations detected in Italian patients with a mildest form of congenital adrenal hyperplasia. Clin Endocrinol (Oxf). 2009, 71, pp.470-476.

10. Riepe. FG, Hiort. O, Grotzinger. J, Sippell. WG, Krone. N. Functional and structural consequences of a novel point mutation in the CYP21A2 gene causing congenital adrenal hyperplasia: potential relevance of helix C for P450 oxidoreductase-21-hydroxylase interaction. J Clin Endocrinol Metab. 2008, 93, pp.2891-2895.

Ngày *nhận bài: 30/10/2012*

Ngày giao phản biện: 15/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012