

Chương 2

Sinh tổng hợp protein

Điều hòa sinh tổng hợp protein

1. Mã di truyền

Do chỉ có bốn loại nucleotide khác nhau trong mRNA và có đến 20 loại amino acid trong protein nên sự dịch mã không thể được thực hiện theo kiểu tương ứng một nucleotide-một amino acid được. Người ta đã giải mã toàn bộ các amino acid vào những năm đầu của thập kỷ 1960. Mỗi amino acid được mã hóa bởi ba nucleotide liên tiếp trên DNA (hoặc RNA tương ứng), bộ ba nucleotide này được gọi là một codon. Với 4 loại nucleotide khác nhau sẽ có $4^3 = 64$ codon khác nhau được phân biệt bởi thành phần và trật tự của các nucleotide. Trong số này có 3 codon kết thúc là UAA, UAG và UGA có nhiệm vụ báo hiệu chấm dứt việc tổng hợp chuỗi polypeptide. Trong 61 mã còn lại có nhiều codon cùng mã hóa cho một amino acid.

- Các codon được đọc theo hướng 5'→3'. Vì vậy chuỗi mã hóa cho dipeptide NH₂-Thr-Arg-COOH được viết là 5'-ACGCGA-3'. Các codon không chồng lên nhau và vùng dịch mã của mRNA không chứa các khoảng trống.

2. Các ribosome

Ribosome là bộ máy đại phân tử điều khiển sự tổng hợp protein. Nó được cấu tạo bởi ít nhất là ba phân tử RNA và hơn 50 protein khác nhau, với trọng lượng phân tử là 2,5 MDa (megadalton) đối với ribosome của prokaryote và 4,2 MDa đối với ribosome của eukaryote.

2.1. Thành phần cấu tạo của ribosome

Mỗi ribosome bao gồm một tiểu đơn vị lớn và một tiểu đơn vị nhỏ. Tiểu đơn vị lớn chứa trung tâm peptidyl transferase chịu trách nhiệm cho việc hình thành các cầu nối peptide. Tiểu đơn vị nhỏ chứa trung tâm giải mã, là nơi các tRNA đã được gắn amino acid đọc và giải mã các codon. Ngoài ra còn có trung tâm gắn các yếu tố ở tiểu đơn vị lớn.

Theo quy ước, các tiểu đơn vị được đặt tên theo tốc độ lắng của chúng dưới lực ly tâm. Đơn vị đo tốc độ lắng là Svedberg và được viết tắt là S. Ribosome của prokaryote là ribosome 70S, trong đó tiểu đơn vị lớn là 50S và tiểu đơn vị nhỏ là 30S. Ribosome của eukaryote là 80S, với tiểu đơn vị lớn là 60S và tiểu đơn vị nhỏ là 40S.

Mỗi tiểu đơn vị đều được cấu tạo bởi các RNA ribosome (rRNA) và các protein ribosome. Đơn vị Svedberg lại được sử dụng để phân biệt các rRNA (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Các thành phần cấu tạo của ribosome.

Các thành phần cấu tạo	Prokaryote		Eukaryote	
	Tiểu đơn vị lớn (50S)	Tiểu đơn vị nhỏ (30S)	Tiểu đơn vị lớn (60S)	Tiểu đơn vị nhỏ (40S)
rRNA	rRNA 5S (120 Nu) rRNA 23S (2900 Nu)	rRNA 16S (1540 Nu)	rRNA 5,8S (160 Nu) rRNA 5S (120 Nu) rRNA 28S (4700 Nu)	rRNA 18S (1900 Nu)
Protein	34 protein	21 protein	49 protein	33 protein

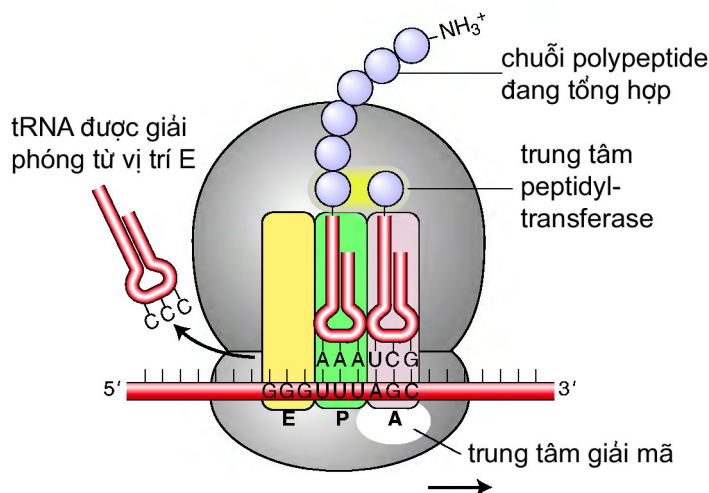
Trong quá trình dịch mã, tiểu đơn vị lớn và tiểu đơn vị nhỏ của mỗi ribosome liên kết với nhau và với mRNA. Sau mỗi vòng tổng hợp protein, chúng lại rời nhau ra.

2.2. Các vị trí gắn tRNA trên ribosome

Trên ribosome chứa ba vị trí gắn tRNA là vị trí A, P và E. Trong đó:

- A là vị trí gắn aminoacyl-tRNA (tRNA có mang amino acid).
- P là vị trí gắn peptidyl-tRNA (tRNA có mang chuỗi polypeptide).
- E là vị trí gắn tRNA mà được phóng thích sau khi chuỗi polypeptide được chuyển sang aminoacyl-tRNA.

Mỗi vị trí gắn tRNA được hình thành tại giao diện giữa tiểu đơn vị lớn và tiểu đơn vị nhỏ. Bằng cách này, các tRNA được gắn vào có thể bắt ngang qua khoảng cách giữa trung tâm peptidyl transferase của tiểu đơn vị lớn và trung tâm giải mã của tiểu đơn vị nhỏ. Đầu 3' của tRNA được nằm gần tiểu đơn vị lớn và vòng đối mã gần tiểu đơn vị nhỏ.



Hình 2.1. Các thành phần chức năng của ribosome.

2.3. Các kênh của ribosome

Đó là các kênh cho phép mRNA đi vào và đi ra khỏi ribosome, và kênh cho phép chuỗi polypeptide mới sinh đi ra khỏi ribosome.

mRNA đi vào và đi ra khỏi trung tâm giải mã của ribosome thông qua hai kênh hẹp tại tiểu đơn vị nhỏ. Trong đó, kênh vào có chiều rộng chỉ đủ cho RNA không bắt cặp đi qua. Đặc điểm này đảm bảo cho mRNA được duỗi thẳng khi nó đi vào trung tâm giải mã, bằng cách loại bỏ mọi tương tác bắt cặp base bổ sung nội phân tử.

Một kênh xuyên qua tiểu đơn vị lớn tạo lối thoát cho chuỗi polypeptide mới được tổng hợp. Kích thước của kênh đã hạn chế được sự gấp của các chuỗi polypeptide đang tổng hợp. Vì vậy, protein chỉ có thể hình thành cấu trúc bậc ba sau khi nó được giải phóng khỏi ribosome.

3. Sự hình thành aminoacyl-tRNA

3.1. Bản chất của sự gắn amino acid vào tRNA

Quá trình gắn amino acid vào tRNA là quá trình hình thành một liên kết acyl giữa nhóm carboxyl của amino acid và nhóm 2'- hoặc 3'-OH của adenine ở đầu 3' của tRNA. Liên kết này được xem là một liên kết giàu năng lượng. Năng lượng giải phóng ra khi liên

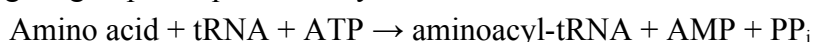
kết bị phá vỡ giúp hình thành cầu nối peptide để liên kết amino acid với chuỗi polypeptide đang được tổng hợp.

3.2. Sự nhận diện và gắn amino acid vào tRNA

Sự nhận diện và gắn amino acid vào tRNA tương ứng được thực hiện bởi một enzyme gọi là aminoacyl-tRNA synthetase.

Quá trình này diễn ra như sau: đầu tiên, amino acid được adenylyl hóa bằng cách phản ứng với ATP, kết quả tạo thành amino acid có gắn adenylic acid qua cầu nối ester giàu năng lượng giữa nhóm COOH của amino acid và nhóm phosphoryl của AMP, đồng thời giải phóng ra pyrophosphate. Sau đó, amino acid được adenylyl hóa này (vẫn đang gắn với synthetase) phản ứng tiếp với tRNA. Phản ứng này chuyển amino acid đến đầu 3' của tRNA để gắn với nhóm OH, đồng thời giải phóng AMP.

Phản ứng tổng hợp của quá trình này như sau:



3.3. Tính đặc hiệu của aminoacyl-tRNA synthetase

Hầu hết các tế bào đều có một enzyme synthetase riêng biệt chịu trách nhiệm cho việc gắn một amino acid vào một tRNA tương ứng (như vậy có tất cả 20 synthetase). Tuy nhiên, nhiều vi khuẩn có dưới 20 synthetase. Trong trường hợp này, cùng một synthetase chịu trách nhiệm cho hơn một loại amino acid.

Sự nhận diện amino acid chính xác là dựa vào kích thước, sự tích điện và gốc R khác nhau của các amino acid. Sự nhận diện tRNA dựa vào các trình tự nucleotide khác nhau của tRNA. Tỷ lệ sai sót trong quá trình gắn amino acid với tRNA tương ứng là khá thấp.

3.4. Phân loại aminoacyl-tRNA synthetase

Có hai loại tRNA synthetase.

- Loại I bao gồm các synthetase gắn các amino acid như Glu, Gln, Arg, Cys, Met, Val, Ile, Leu, Tyr, Trp vào nhóm 2'-OH.

- Loại II gồm các synthetase gắn các amino acid như Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, His, Asp, Asn, Lys, Phe vào nhóm 3'-OH.

4. Các giai đoạn của quá trình dịch mã

Quá trình dịch mã được bắt đầu bằng sự gắn của mRNA và một tRNA khởi đầu với tiểu đơn vị nhỏ tự do của ribosome. Phức hợp tiểu đơn vị nhỏ-mRNA thu hút tiểu đơn vị lớn đến để tạo nên ribosome nguyên vẹn với mRNA được kẹp giữa hai tiểu đơn vị. Sự tổng hợp protein được bắt đầu tại codon khởi đầu ở đầu 5' của mRNA và tiến dần về phía 3'. Khi ribosome dịch mã từ codon này sang codon khác, một tRNA đã gắn amino acid kế tiếp được đưa vào trung tâm giải mã và trung tâm peptidyl transferase của ribosome. Khi ribosome gặp codon kết thúc thì quá trình tổng hợp chuỗi polypeptide kết thúc. Chuỗi này được giải phóng, hai tiểu đơn vị của ribosome rời nhau ra và sẵn sàng đến gặp mRNA mới để thực hiện một chu trình tổng hợp protein mới. Quá trình dịch mã được chia thành ba giai đoạn là khởi đầu, kéo dài và kết thúc.

4.1. Giai đoạn khởi đầu

4.1.1. Ở prokaryote

*Các yếu tố khởi đầu (IF: initiation factor)

Có các yếu tố khởi đầu xúc tác cho tiểu đơn vị nhỏ trong việc hình thành phức hợp khởi đầu. Đó là IF1, IF2, IF3. Mỗi yếu tố khởi đầu có tác dụng như sau:

- IF1 giúp tiểu đơn vị nhỏ gắn vào mRNA và ngăn cản các tRNA gắn vào vùng thuộc vị trí A trên tiểu đơn vị nhỏ.

- IF2 là một protein gắn và thủy phân GTP. IF2 thúc đẩy sự liên kết giữa fMet-tRNA_i^{fMet} và tiểu đơn vị nhỏ, ngăn cản những aminoacyl-tRNA khác đến gắn vào tiểu đơn vị nhỏ.

- IF3 ngăn cản tiểu đơn vị nhỏ tái liên kết với tiểu đơn vị lớn và gắn với các tRNA mang amino acid. IF3 gắn vào tiểu đơn vị nhỏ vào cuối vòng dịch mã trước, nó giúp tách ribosome 70S thành tiểu đơn vị lớn và tiểu đơn vị nhỏ.

Khi tiểu đơn vị nhỏ đã được gắn ba yếu tố khởi đầu, nó sẽ gắn tRNA khởi đầu và mRNA. Sự gắn hai RNA này là hoàn toàn độc lập với nhau.

***Bước 1: Tiểu đơn vị nhỏ gắn vào codon khởi đầu**

Sự liên kết giữa tiểu đơn vị nhỏ với mRNA được thực hiện thông qua sự bắt cặp base bổ sung giữa vị trí gắn ribosome và rRNA 16S. Các mRNA của vi khuẩn có một trình tự nucleotide đặc hiệu gọi là trình tự Shine-Dalgarno (SD) gồm 5-10 nucleotide trước codon khởi đầu. Trình tự này bổ sung với một trình tự nucleotide gần đầu 3' của rRNA 16S. Tiểu đơn vị nhỏ được đặt trên mRNA sao cho codon khởi đầu được đặt đúng vào vị trí P một khi tiểu đơn vị lớn gắn vào phức hợp.

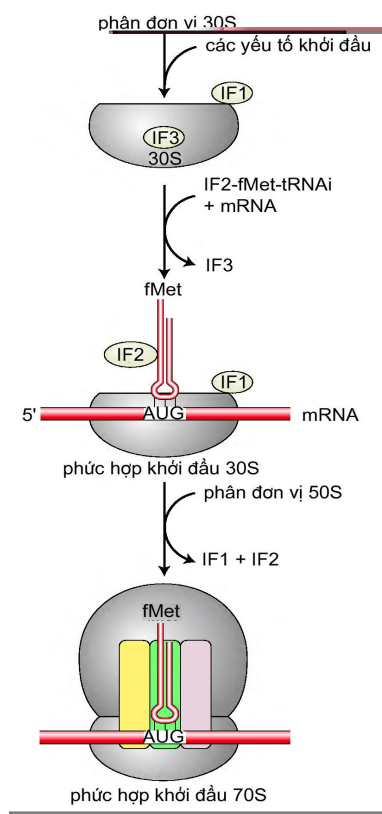
***Bước 2: tRNA đầu tiên có mang methionine biến đổi đến gắn trực tiếp với tiểu đơn vị nhỏ**

Một tRNA đặc biệt được gọi tRNA khởi đầu đến gắn trực tiếp với vị trí P (không qua vị trí A). tRNA có anticodon (bộ ba đối mã) có thể bắt cặp với AUG hoặc GUG. Tuy nhiên tRNA này không mang methionine cũng như valine mà mang một dạng biến đổi của methionine gọi là N-formyl methionine. tRNA khởi đầu này được gọi là fMet-tRNA_i^{fMet}.

Trong hoặc sau quá trình tổng hợp polypeptide, gốc formyl được loại bỏ bởi enzyme deformylase. Ngoài ra, aminopeptidase sẽ loại bỏ methionine cũng như một hoặc hai amino acid kế tiếp ở đầu chuỗi polypeptide.

***Bước 3: Hình thành phức hợp khởi đầu 70S**

Bước gắn thêm tiểu đơn vị lớn để tạo thành phức hợp khởi đầu 70S diễn ra như sau: khi codon khởi đầu và fMet-tRNA_i^{fMet} bắt cặp với nhau, tiểu đơn vị nhỏ thay đổi hình dạng làm giải phóng IF3. Sự vắng mặt IF3 cho phép tiểu đơn vị lớn gắn vào tiểu đơn vị nhỏ đang mang các thành phần trên. Nhờ có tiểu đơn vị lớn gắn vào, hoạt tính GTPase của IF2-GTP được kích thích để thủy phân GTP. IF2-GDP tạo thành có ái lực thấp đối với ribosome và tRNA khởi đầu dẫn đến sự giải phóng IF2-GDP cũng như IF1. Như vậy phức hợp khởi đầu cuối cùng được tạo thành bao gồm ribosome 70S được gắn tại codon khởi đầu của mRNA, với fMet-tRNA_i^{fMet} tại vị trí P, còn vị trí A đang trống. Phức hợp này sẵn sàng tiếp nhận một tRNA mang amino acid vào vị trí A để bắt đầu tổng hợp polypeptide

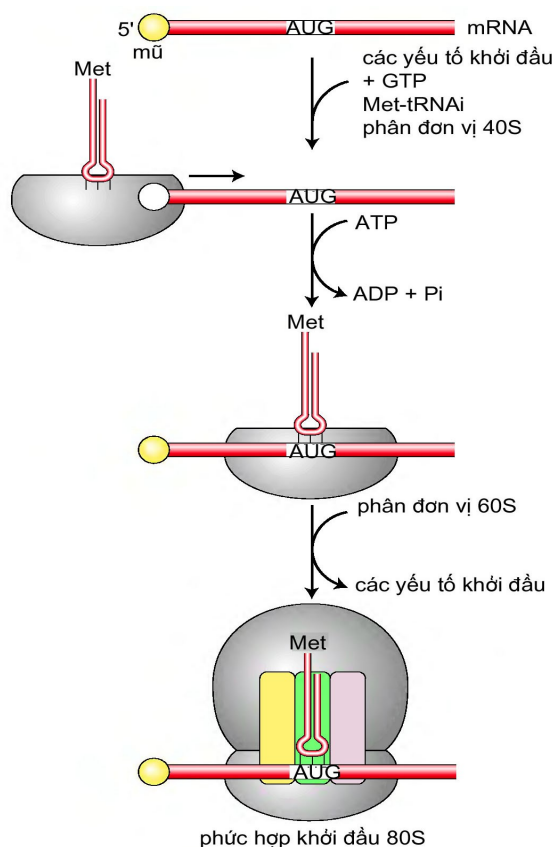


Hình 2.2. Khởi đầu dịch mã ở prokaryote.

4.1.2. Ở Eukaryote

* Bước 1: Sự hình thành phức hợp tiền khởi đầu 43S

Giai đoạn khởi đầu đòi hỏi sự hỗ trợ của hơn 30 protein khác nhau, mặc dù eukaryote cũng có những yếu tố khởi đầu tương ứng với prokaryote. Các yếu tố khởi đầu này được ký hiệu là eIF.



Hình 2.3. Khởi đầu dịch mã ở eukaryote.

Khi ribosome của eukaryote hoàn thành một chu trình dịch mã, nó tách rời ra thành tiểu đơn vị lớn và tiểu đơn vị nhỏ tự do thông qua tác động của các yếu tố eIF3 và eIF1A (tương tự với IF3 ở prokaryote). Hai protein gắn GTP là eIF2 và eIF5B làm trung gian thu hút tRNA khởi đầu đã gắn methionine (chứ không phải N-formyl methionine như ở prokaryote) đến tiểu đơn vị nhỏ. Chính yếu tố eIF5B-GTP là tương đồng với IF2-GTP của prokaryote. Yếu tố này liên kết với tiểu đơn vị nhỏ theo phương thức phụ thuộc eIF1A. Rồi eIF5B-GTP giúp thu hút phức hợp eIF2-GTP và Met-tRNA_i^{Met} đến tiểu đơn vị nhỏ. Hai protein gắn GTP này cùng nhau đưa Met-tRNA_i^{Met} vào vùng thuộc vị trí P của tiểu đơn vị nhỏ. Kết quả, hình thành phức hợp tiền khởi đầu 43S.

*Bước 2: Sự nhận dạng mũ 5' của mRNA

Quá trình này được thực hiện thông qua eIF4F. Yếu tố này có ba tiểu đơn vị, một tiểu đơn vị gắn vào mũ 5', hai tiểu đơn vị khác gắn với RNA. Phức hợp này lại được gắn với eIF4B làm hoạt hóa một enzyme RNA helicase của một trong những tiểu đơn vị của eIF4F. Helicase này tháo xoắn tất cả các cấu trúc bậc hai được hình thành ở đầu tận cùng của mRNA. Phức hợp eIF4F/B và mRNA lại thu hút phức hợp tiền khởi đầu 43S đến thông qua tương tác giữa eIF4F và eIF3.

*Bước 3: Tiểu đơn vị nhỏ tìm thấy codon khởi đầu bằng cách quét xuôi dòng từ đầu 5' của mRNA và sự hình thành phức hợp khởi đầu 80S

Một khi được gắn vào đầu 5' của mRNA, tiểu đơn vị nhỏ và các yếu tố liên kết với nó di chuyển dọc theo mRNA theo hướng 5' → 3' cho đến khi gặp trình tự 5'-AUG-3' đầu tiên mà nó nhận dạng là codon khởi đầu. Codon được nhận dạng bằng sự bắt cặp base bổ sung giữa anticodon (bộ ba đối mã) của tRNA khởi đầu và codon khởi đầu. Sự bắt cặp này thúc đẩy phóng thích eIF2 và eIF3 cho phép tiểu đơn vị lớn gắn được vào tiểu đơn vị nhỏ. Sự gắn này dẫn đến phóng thích các yếu tố khởi đầu còn lại thông qua sự thủy phân GTP dưới tác dụng của eIF5B. Cuối cùng, Met-tRNA^{Met} được đưa vào vị trí P của phức hợp khởi đầu 80S. Lúc này, ribosome ở trong tư thế sẵn sàng tiếp nhận aminoacyl-tRNA vào vị trí A.

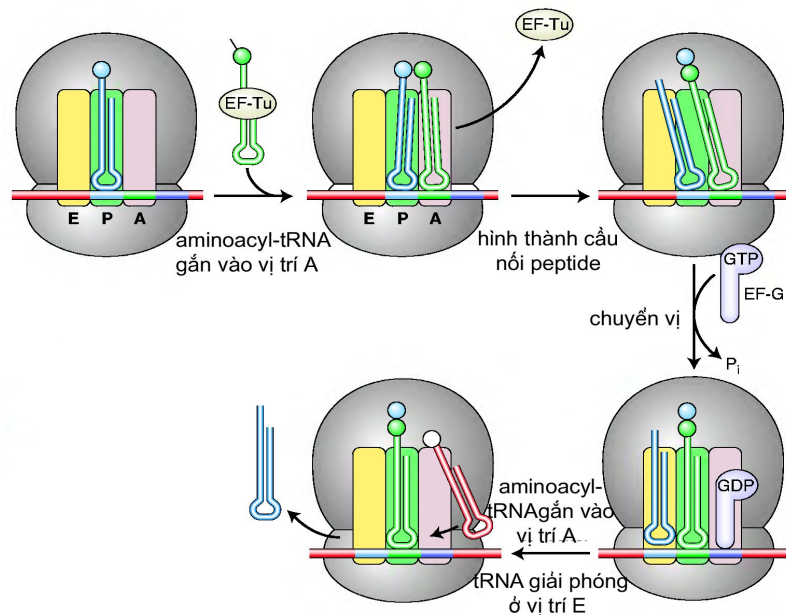
*Những yếu tố khởi đầu dịch mã giữ mRNA eukaryote ở dạng vòng

Ngoài việc gắn vào đầu 5' của mRNA, các yếu tố khởi đầu còn liên kết chặt chẽ với đầu 3' thông qua đuôi poly(A). Điều này được thực hiện bởi sự tương tác giữa eIF4F và protein gắn poly(A) bọc bên ngoài đuôi poly(A). Việc tìm thấy các yếu tố khởi đầu dịch mã có vai trò "vòng hóa" mRNA theo phương thức phụ thuộc đuôi poly(A) đã giải thích được quan sát trước đây là một khi ribosome kết thúc sự dịch mã một mRNA mà được vòng hóa thông qua đuôi poly(A) thì ribosome mới được phóng thích này là ribosome lý tưởng để tái khởi đầu dịch mã trên cùng mRNA.

4.2. Giai đoạn kéo dài

4.2.1. Bước 1: Aminoacyl-tRNA được đưa đến vị trí A nhờ yếu tố kéo dài EF-Tu

Một khi tRNA đã gắn amino acid thì EF-Tu đến gắn vào đầu 3' của aminoacyl-tRNA. EF-Tu chỉ có thể gắn với aminoacyl-tRNA khi nó liên kết với GTP. EF-Tu-GTP đưa aminoacyl-tRNA vào vị trí A của ribosome. Chỉ phức hợp aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP nào có anticodon bổ sung với codon của mRNA tại vị trí A thì mới được giữ lại trên ribosome. Sau đó, EF-Tu tương tác với trung tâm gắn yếu tố của ribosome nằm trên tiểu đơn vị lớn và thủy phân GTP, rồi EF-Tu được phóng thích khỏi tRNA và ribosome, để aminoacyl-tRNA nằm lại tại vị trí A.



Hình 2.4. Kéo dài dịch mã.

4.2.2. Bước 2: Hình thành cầu nối peptide

Aminoacyl-tRNA tại vị trí A được quay vào trung tâm peptidyl transferase và cầu nối peptide được hình thành. Phản ứng này được xúc tác bởi peptidyl transferase, ngày nay nó được xác định là rRNA, đặc biệt là rRNA 23S của tiểu đơn vị lớn. Vì vậy, peptidyl transferase còn được gọi là ribozyme.

Trong quá trình hình thành cầu nối peptide, cầu nối giữa amino acid và tRNA ở vị trí A không bị phá vỡ. Đầu 3' của cả hai tRNA được đưa đến gần nhau và nhóm amine của amino acid ở vị trí A tấn công nhóm carboxyl của amino acid ở vị trí P. Kết quả là tRNA ở vị trí A mang một dipeptide, trong khi tRNA ở vị trí P đã bị khử acyl.

Sau đó xảy ra sự chuyển dịch (xem bước 3): peptidyl-tRNA (đang mang dipeptide) chuyển sang vị trí P, và vị trí A sẵn sàng tiếp nhận một aminoacyl-tRNA mới. Cầu nối peptide tiếp theo được hình thành theo cách giống hệt trên, trong đó nhóm amine của amino acid mới liên kết với nhóm carboxyl ở đầu C tận cùng của chuỗi polypeptide đang tổng hợp. Thực chất, đây là quá trình chuyển chuỗi polypeptide đang tổng hợp từ peptidyl-tRNA ở vị trí P sang aminoacyl-tRNA ở vị trí A. Vì vậy, phản ứng tạo cầu nối peptide được gọi là phản ứng peptidyl transferase.

Như vậy, chuỗi polypeptide được tổng hợp theo chiều từ đầu N đến đầu C.

Trong quá trình này, không có sự thủy phân nucleoside triphosphate. Năng lượng được cung cấp từ sự phá vỡ cầu nối acyl giàu năng lượng giữa chuỗi polypeptide đang tổng hợp và tRNA.

4.2.3. Bước 3: Sự chuyển dịch (translocation)

Một khi phản ứng peptidyl transferase xảy ra thì tRNA trong vị trí P không gắn với amino acid nữa, và chuỗi polypeptide đang hình thành được liên kết với tRNA trong vị trí A. Để một vòng kéo dài polypeptide mới xảy ra, tRNA ở vị trí P phải chuyển đến vị trí E và tRNA ở vị trí A chuyển đến vị trí P. Đồng thời, mRNA phải di chuyển qua 3 nucleotide để ribosome tiếp xúc với codon tiếp theo. Những sự di chuyển này được gọi là sự chuyển dịch.

Bước đầu tiên trong chuyển dịch được song hành với phản ứng peptidyl transferase. Khi chuỗi peptide được chuyển sang tRNA ở vị trí A, đầu 3' của tRNA này hướng đến vùng vị trí P của tiểu đơn vị lớn, trong khi đầu anticodon vẫn còn nằm ở vị trí A. Tương tự, tRNA ở vị trí P (mà không còn gắn chuỗi polypeptide nữa) nằm ở vị trí E của tiểu đơn vị lớn và vị trí P của tiểu đơn vị nhỏ.

Để hoàn thành sự chuyển dịch phải có sự tác động của một yếu tố kéo dài gọi là EF-G. EF-G chỉ gắn vào ribosome khi được liên kết với GTP. Sau khi phản ứng peptidyl transferase xảy ra, sự thay đổi vị trí của tRNA ở vị trí A đã để lộ vị trí gắn cho EF-G. Khi EF-G-GTP gắn vào vị trí này, nó tiếp xúc với trung tâm gắn yếu tố và kích thích thủy phân GTP. Sự thủy phân này làm thay đổi hình dạng của EF-G-GDP và cho phép nó với tới tiểu đơn vị nhỏ để thúc đẩy sự chuyển dịch của tRNA ở vị trí A. Khi sự chuyển dịch được hoàn thành, cấu trúc của ribosome giảm đáng kể ái lực với EF-G-GDP, điều này cho phép yếu tố kéo dài được phóng thích khỏi ribosome. Cùng với việc tRNA ở vị trí A chuyển đến vị trí P, tRNA ở vị trí P chuyển đến vị trí E và mRNA dịch chuyển ba nucleotide. Từ vị trí E, tRNA được phóng thích khỏi ribosome.

4.2.4. Các yếu tố kéo dài có gắn GDP (EF-Tu-GDP và EF-G-GDP) được đổi GDP thành GTP trước khi tham gia vào vòng kéo dài mới

EF-Tu và EF-G là những protein xúc tác mà chỉ được sử dụng một lần đối với một vòng kéo dài bao gồm đưa tRNA vào ribosome, hình thành cầu nối peptide, và chuyển dịch. Sau khi GTP được thủy phân, hai protein trên phải giải phóng GDP và gắn với một GTP mới.

Đối với EF-G, do GDP có ái lực thấp với EF-G hơn GTP nên GDP nhanh chóng được giải phóng và GTP mới được gắn vào.

Đối với EF-Tu, cần có sự tham gia của yếu tố hoán đổi GTP gọi là EF-Ts. Sau khi EF-Tu-GDP được phóng thích khỏi ribosome, EF-Ts được gắn vào EF-Tu và thế chỗ của GDP. Sau đó GTP đến gắn vào phức hợp EF-Tu-EF-Ts. Phức hợp sau cùng được tách thành EF-Ts tự do và EF-Tu-GTP.

4.3. Giai đoạn kết thúc

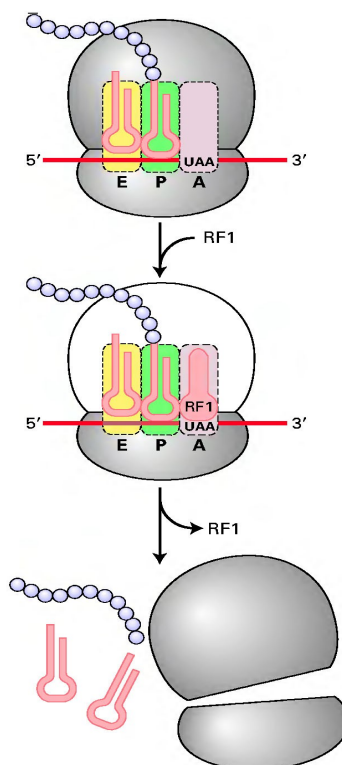
4.3.1. Các yếu tố giải phóng kết thúc dịch mã

Chu kỳ gắn aminoacyl-tRNA của ribosome, sự hình thành cầu nối peptide, và sự chuyển dịch xảy ra liên tục cho đến khi một trong ba codon kết thúc vào vị trí A. Các codon này được nhận diện bởi các yếu tố giải phóng (RF: release factor) (Hình 6.5).

Có hai loại yếu tố giải phóng:

- Các yếu tố giải phóng loại I nhận diện codon kết thúc và thúc đẩy sự thủy phân để tách chuỗi polypeptide ra khỏi peptidyl-tRNA tại vị trí P. Prokaryote có hai yếu tố giải phóng loại I là RF1 và RF2, trong đó RF1 nhận diện codon kết thúc UAG và RF2 nhận diện UGA, còn UAA được nhận diện bởi cả RF1 và RF2. Eukaryote chỉ có một yếu tố giải phóng gọi là eRF1 nhận diện được cả ba loại codon kết thúc.

- Các yếu tố giải phóng loại II kích thích sự tách yếu tố giải phóng loại I ra khỏi ribosome sau khi chuỗi polypeptide được giải phóng. Chỉ có một yếu tố giải phóng loại II, được gọi là RF3 ở prokaryote và eRF3 ở eukaryote. Yếu tố giải phóng loại II được điều hòa bởi GTP.



Hình 2.5. Kết thúc dịch mã.

4.3.2. Sự hoán đổi GDP/GTP và thủy phân GTP điều khiển hoạt động của yếu tố giải phóng loại II

Yếu tố giải phóng loại II là một protein gắn GTP nhưng có ái lực với GDP cao hơn GTP. Vì vậy, phần lớn RF3 được gắn với GDP. RF3-GDP gắn với ribosome theo một phương thức phụ thuộc sự hiện diện của yếu tố giải phóng loại I. Sau khi yếu tố giải phóng loại I kích thích sự phóng thích chuỗi polypeptide, xảy ra một sự thay đổi hình dạng ribosome, và yếu tố giải phóng loại I kích thích RF3 hoán đổi GDP thành GTP. Sự gắn GTP vào RF3 dẫn đến sự hình thành tương tác ái lực cao với ribosome và đẩy yếu tố giải phóng loại I ra khỏi ribosome. Sự thay đổi này cho phép RF3 liên kết với trung tâm gắn yếu tố của tiểu đơn vị lớn. Sự tương tác này kích thích thủy phân GTP. Vì không còn yếu tố loại I nữa nên RF3-GDP có ái lực thấp với ribosome và bị phóng thích ra ngoài.

4.3.3. Sự tái tuần hoàn của ribosome

Sau khi phóng thích chuỗi polypeptide và các yếu tố giải phóng, ribosome vẫn còn gắn với mRNA cùng với hai tRNA tại vị trí P và vị trí E. Để ribosome tham gia vào quá trình tổng hợp polypeptide mới, tRNA và mRNA phải đi khỏi ribosome và hai tiểu đơn vị của ribosome phải rời nhau ra. Tập hợp những sự kiện như vậy gọi là sự tái tuần hoàn ribosome (ribosome recycling).

Ở prokaryote, có một yếu tố gọi là yếu tố tái tuần hoàn ribosome (RRF: ribosome recycling factor). RRF gắn vào vị trí A, nó bắt chước tRNA. RRF lôi kéo EF-G đến ribosome và EF-G kích thích giải phóng những tRNA tại vị trí P và E. Sau đó, EF-G và RRF được phóng thích khỏi ribosome cùng với mRNA. IF3 có thể tham gia vào sự giải phóng mRNA đồng thời nó cũng cần cho sự tách rời hai tiểu đơn vị của ribosome. Kết quả tạo ra tiểu đơn vị nhỏ gắn IF3 và tiểu đơn vị lớn tự do. Ribosome bây giờ có thể tham gia vào vòng dịch mã mới.

5. Điều hòa biểu hiện gen ở prokaryote

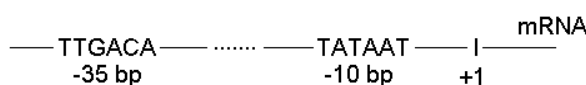
Các gen được phiên mã tạo RNA, được gọi là các gen cấu trúc. Các protein được dịch mã từ mRNA có thể là enzyme hoặc không phải enzyme. Trong số các protein không phải enzyme có các protein điều hòa (regulatory protein), chúng tương tác với các trình tự DNA đặc hiệu để kiểm soát hoạt tính phiên mã của các gen cấu trúc. Các gen tổng hợp các protein điều hòa được gọi là các gen điều hòa (regulatory gen). Phía trước mỗi gen cấu trúc (hoặc một nhóm gen) có một trình tự promoter, nơi RNA polymerase nhận biết. Cơ chế điều hòa ở prokaryote chủ yếu được thực hiện thông qua operon. Đây là khái niệm chỉ tồn tại ở prokaryote.

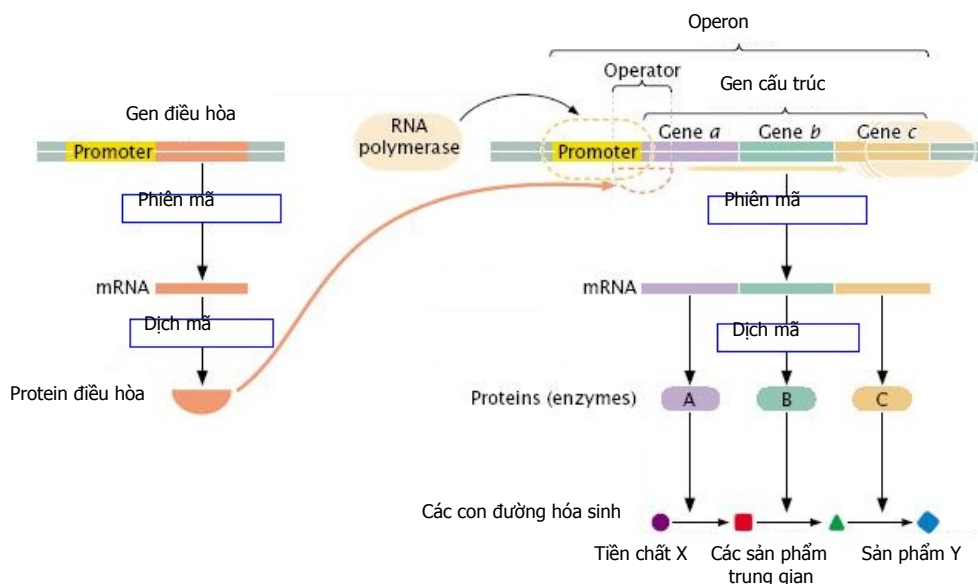
5.1. Cấu trúc của promoter

Thực chất của khởi sự phiên mã là quan hệ trực tiếp giữa RNA polymerase và promoter. Khi RNA polymerase gắn vào promoter, nó sẽ phiên mã tạo phân tử RNA.

Phần lớn promoter ở *E. coli* về căn bản có cùng cấu trúc:

Nếu base đầu tiên được phiên mã thành mRNA (luôn là purine, thường là adenin) được đánh số +1, thì tất cả các base phía 5' hay "phía trước" so với nó không được phiên mã là số trừ (-). Ngay phía trước +1 có 6 base thường với trình tự TATAAT ở xung quanh -10, và trình tự TTGACA (trình tự liên ứng-consensus sequence) ở xung quanh -35. Cả hai trình tự phối hợp nhau cho phép RNA polymerase gắn vào và khởi sự dịch mã, trình tự -35 tạo điều kiện đầu tiên cho việc gắn vào.





Hình 2.6. Phương thức chung điều hòa biểu hiện gen ở prokaryote.

5.2. Cấu trúc của operon

Operon là đơn vị phiên mã gồm ít nhất một promoter và mRNA ở bước tiếp theo để mã hóa cho các trình tự của một hay nhiều chuỗi polypeptide. Tuy nhiên, operon có thể có một hay nhiều điểm điều hòa khác với promoter. Các gen không chịu sự điều hòa do tác động môi trường, tạo sản phẩm thường xuyên, được gọi là các gen cấu trúc. Số lượng sản phẩm của các gen này có thể dao động phụ thuộc vào ái lực tương đối của các promoter của chúng đối với RNA polymerase. Các promoter có ái lực mạnh (strong promoter) tạo ra nhiều sản phẩm của gen hơn các promoter có ái lực yếu. Các gen mà sản phẩm protein của chúng được tổng hợp đáp lại với các nhân tố môi trường, thường được điều khiển bởi một hay nhiều protein điều hòa. Trình tự DNA bên trong operon, nơi mà protein ức chế gắn vào, được gọi là operator (điểm điều hành). Việc gắn protein ức chế lên operator ngăn cản sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc trên cùng một operon. Sự kiểm soát như vậy đối với với gen gọi là kiểm soát âm. Các operon của vi khuẩn thường tạo ra các mRNA đa gen, nhưng mRNA của eukaryote chỉ một gen.

Các protein cần thiết biểu hiện gen được gọi là chất hoạt hóa. Chúng có thể gắn với các điểm khởi sự nằm bên trong của promoter của operon hay điểm tăng cường hoặc có thể gắn ở những trình tự xa operon. Việc gắn của protein điều hòa vào điểm khởi đầu (initiator) hay enhancer, kích thích sự phiên mã của các gen cấu trúc, được gọi là cơ chế kiểm soát dương. Sự kích thích để các gen điều hòa phản ứng có thể là từ các phân tử tương đối nhỏ như đường, amino acid đến các phân tử lớn hơn như các phức hợp hormone steroid và các protein thể nhận (receptor). Chất làm cho gen phiên mã được gọi là chất cảm ứng, có tác động ngược với chất kìm hãm. Các gen cảm ứng thường tham gia vào các phản ứng thoái dưỡng (catabolic reaction), như phân hủy các polysacaride thành đường đơn. Các gen ức chế thường tham gia vào các phản ứng biến dưỡng thực hiện việc tổng hợp các chất như amino acid từ các tiền chất đơn giản hơn.

5.3. Điều hòa thoái dưỡng: Kiểm soát âm-cảm ứng

Trong thoái dưỡng, các chất thức ăn được phân hủy để tạo năng lượng hoặc các chất cần thiết cho quá trình tổng hợp. Cơ chế điều hòa ở đây là sự có mặt của cơ chất (ví dụ lactose) dẫn tới tổng hợp các enzyme phân hủy.

Ví dụ điển hình cho trường hợp này là operon lactose của *E. coli*. β -galactosidase là enzyme có chức năng đôi. Chức năng đầu tiên của nó là thoái dưỡng lactose thành glucose

và galactose. Chức năng thứ hai của nó là chuyển liên kết 1-4 của glucose và galactose thành liên kết 1-5 của allolactose. Bình thường enzyme này không hiện diện ở nồng độ cao trong tế bào, khi vắng mặt lactose trong môi trường. Ngay sau khi cho lactose vào môi trường nuôi khi không có glucose, enzyme này bắt đầu được tạo ra. Sự vận chuyển lactose xuyên qua màng tế bào có hiệu quả nhờ protein vận chuyển galactoside permease. Protein cũng xuất hiện với nồng độ cao khi có lactose trong môi trường.

Sự điều hòa của operon lactose còn phụ thuộc vào nồng độ glucose trong môi trường. Mức glucose này lại kiểm soát mức nội bào phân tử nhỏ c-AMP (cyclic adenosine monophosphat), là chất bắt nguồn từ ATP và làm tín hiệu báo động cho tế bào. Tế bào có xu hướng sử dụng glucose hơn là lactose để làm nguồn carbon vì glucose được biến dưỡng trực tiếp cung cấp carbon và tạo năng lượng. Các enzyme biến dưỡng glucose thuộc loại cấu trúc và tế bào tăng trưởng tối đa với nguồn glucose. Khi nguồn glucose cạn, tế bào phản ứng lại bằng cách tạo ra c-AMP. Việc tăng nồng độ c-AMP trong tế bào gây nên hàng loạt sự kiện, trong sự hiện diện của lactose, dẫn đến sự phiên mã các gen cấu trúc của operon lactose.

5.3.1. Cấu trúc của operon lactose

Hệ thống lactose (lactose system) bình thường gồm có gen điều hòa (*i* hoặc *R*) và operon mang trình tự promoter (*P*) locus operator (*O*) và 3 gen cấu trúc cho β -galactosidase (*Z*), permease (*Y*) và transacetylase (*A*). Nhiều đột biến ở các locus này đã được phát hiện.

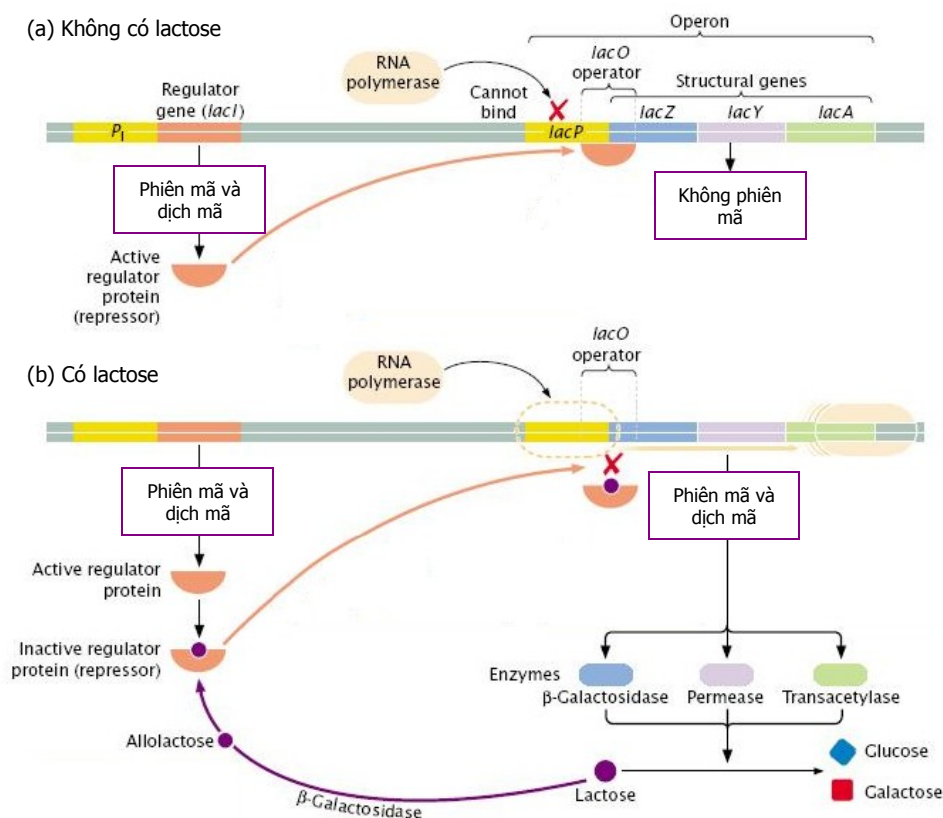
5.3.2. Hoạt động của hệ thống

- Điều kiện cảm ứng (có lactose). Lactose được chuyển vào tế bào rất yếu vì chỉ có vài phân tử permease làm việc. Khi vào trong tế bào, một số lactose (liên kết β -1,4) được chuyển thành allolactose (liên kết β -1,6) nhờ β -galactosidase. Allolactose là chất cảm ứng, nó gắn vào protein kim hãm và gây biến đổi cấu hình tạo phức hợp allolactose-repressor. Phức hợp này mất khả năng gắn operator. Lúc này operon được mở, RNA polymerase bắt đầu phiên mã các gen cấu trúc. Toàn bộ sự kiện diễn ra như trên hình 2.7.

- Điều kiện không cảm ứng (không có lactose). Gen điều hòa của operon thường xuyên tổng hợp protein ức chế (repressor protein) ở mức thấp, vì nó có promoter ít hiệu quả. Sự tổng hợp các protein này bị tác động do nồng độ lactose trong tế bào. Ngược lại, promoter bình thường của operon lac gắn với RNA polymerase rất có hiệu quả. Khi không có đường lactose protein kim hãm có hoạt tính (tạo ra do i^+ hay *R*) gắn vào promoter hay “đọc” trình tự operator vì protein kim hãm chiếm đoạn này. Như vậy, sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc của operon lac bị dừng.

Số lượng permease tăng nên lactose vào tế bào với số lượng lớn và được phân hủy bởi β -galactosidase. Khi lactose được sử dụng cạn, các protein repressor gắn trở lại vào operator làm operon bị đóng; sự phiên mã các gen cấu trúc bị dừng.

Bản thân gen điều hòa *R* chỉ có một promoter (P_i) và gen cấu trúc của protein kim hãm. Promoter này yếu, khi các protein kim hãm có số lượng cao, nó bị các protein này gắn vào làm dừng phiên mã.



Hình 2.7. Operon lactose và hoạt động của nó.

6. Đột biến gene

Đột biến gene là những biến đổi xảy ra bên trong cấu trúc gene. Mỗi đột biến gene dẫn đến sự thay đổi trình tự nucleotide tạo ra các allele khác nhau. Đột biến gene có thể xảy ra do biến đổi của trình tự nucleotide trong gene. Đột biến gene không phát hiện được khi quan sát tế bào học.

Trong tự nhiên, tất cả các gene đều có đột biến được gọi là đột biến tự nhiên hay ngẫu phát (spontaneous mutation). Các đột biến tự nhiên thường xuất hiện rất ít.

1. Các kiểu đột biến gene

Đột biến gene hay đột biến điểm: là các biến đổi rất nhỏ trên một đoạn DNA, thường liên quan đến một cặp base đơn của DNA hoặc một số ít cặp base kề nhau. Đột biến điểm làm thay đổi gene kiểu dại (wild-type gene). Thực tế đột biến điểm hầu như làm giảm hoặc làm mất chức năng của gene hơn là làm tăng cường chức năng của gene.

Về nguồn gốc, đột biến điểm được phân ra làm đột biến ngẫu nhiên (spontaneous) và đột biến cảm ứng (induced).

Đột biến cảm ứng: là dạng đột biến xuất hiện với tần số đột biến tăng lên khi xử lý có mục đích bằng tác nhân đột biến hoặc tác nhân môi trường đã được biết. Đột biến ngẫu nhiên là đột biến xuất hiện khi không có sự xử lý của tác nhân đột biến. Đột biến ngẫu nhiên được tính là tỉ lệ cơ sở của đột biến và được dùng để ước chừng nguồn biến dị di truyền tự nhiên trong quần thể. Tần số đột biến ngẫu nhiên thấp nằm trong khoảng 10^{-5} - 10^{-8} , vì vậy đột biến cảm ứng là nguồn đột biến quan trọng cho phân tích di truyền.

Tác nhân đột biến được sử dụng phổ biến là nguồn chiếu xạ năng lượng cao (high-energy radiation) hoặc các hóa chất đặc biệt.

Các dạng đột biến điểm: có hai dạng đột biến điểm chính trong phân tử DNA:

- + Đột biến thay thế cặp base (base substitution)
- + Đột biến thêm bớt cặp base (base insertion - base deletion)

Các đột biến này có thể phát sinh do ảnh hưởng của môi trường như ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến.

1.1. Đột biến thay thế cặp base

Kiểu đột biến đơn giản nhất là thay thế một base, trong đó một cặp nucleotide trong gene được thay thế bằng một cặp nucleotide khác.

Ví dụ: A được thay thế bằng G trong sợi DNA. Sự thay thế này tạo ra sự cặp base G-T. Ở lần sao chép tiếp theo tạo ra cặp G-C trong một phân tử DNA con và cặp A-T ở phân tử DNA con kia.

Tương tự, đột biến thay thế A bằng T trên một sợi, tạo ra sự kết cặp tạm thời T-T. Kết quả sao chép tạo ra T-A trên một phân tử DNA con và A-T trên phân tử DNA con kia. Trong trường hợp này, cặp base T-A là đột biến và cặp A-T không đột biến. Nếu sợi gốc DNA không đột biến có trình tự 5'-GAC-3', trên sợi đột biến có trình tự 5'-GTC-3' và sợi kia không đột biến có trình tự 5'-GAC-3'.

Đột biến thay thế cặp base được chia làm hai loại:

- + Đột biến đồng hoán (transition mutations): Nếu một đột biến mà bazơ pyrimidine được thay thế bằng một pyrimidine và một purine thay bằng một purine.

Đột biến đồng hoán có thể là:

T → C hoặc C → T

(Pyrimidine → pyrimidine)

A → G hoặc G → A

(purine → purine)

Đột biến đảo hoán (Transversion): Đột biến làm thay một pyrimidine thành một purine hay một purine được thay thế bằng một pyrimidine. Các đột biến đảo hoán:

T → A, T → G, C → A hoặc C → G

(Pyrimidine → purine)

A → T, A → C, G → T hoặc G → C

(Purine → pyrimidine)

Như vậy có thể có 4 thay thế kiểu đột biến đồng hoán và có đến 8 thay thế kiểu đột biến đảo hoán. Nếu các thay thế này xảy ra với ngẫu nhiên xác suất như nhau, sẽ có tỷ lệ đột biến: 1 đồng hoán : 2 đảo hoán. Tuy nhiên trong thực tế, đột biến thay thế base có xu hướng nghiêng về đột biến đồng hoán, cho nên trong số các đột biến thay thế base tự phát thì tỷ lệ xảy ra đột biến là: 2 đồng hoán : 1 đảo hoán

1.2. Đột biến thêm hoặc bớt base (base-pair addition/deletion), còn gọi là indel mutation (insertion-deletion).

Trường hợp đơn giản nhất của đột biến này là thêm hoặc mất một cặp base đơn. Đôi khi đột biến làm thêm hoặc mất đồng thời nhiều cặp base.

Hậu quả của đột biến điểm đến cấu trúc và sự biểu hiện của gene

Đột biến điểm xuất hiện trong vùng mã hóa chuỗi polypeptide của gene (a polypeptide-coding part of a gene), chẳng hạn đột biến thay thế base đơn có thể gây nhiều hậu quả, nhưng tất cả đều có tác động lên mã di truyền theo 2 hướng: làm thoái hóa mã di truyền hoặc xuất hiện mã kết thúc quá trình dịch mã. Có các dạng:

Đột biến đồng nghĩa (synonymous mutations): đột biến thay đổi một codon mã hóa acid amine thành codon mới mã hóa cho cùng acid amin đó. Đột biến đồng nghĩa cũng có thể xem là đột biến im lặng (silent mutations)

Đột biến nhầm nghĩa (missense mutations), đôi khi còn gọi là đột biến không đồng nghĩa (nonsynonymous mutations): codon mã hóa cho một acid amin này bị thay đổi thành codon mã hóa cho một acid amin khác.

Đột biến vô nghĩa (nonsense mutations): codon mã hóa cho một acid amin bị thay đổi thành codon kết thúc dịch mã (translation termination/stop codon).

Mức độ ảnh hưởng của đột biến nhầm nghĩa và vô nghĩa lên chuỗi polypeptide khác nhau tùy trường hợp.

Nếu đột biến nhầm nghĩa thay thế một acid amin này bằng một acid amin khác tương tự về mặt hóa học, được xem là đột biến thay thế bảo thủ (conservative substitution). Sự thay đổi này hầu như ít ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng protein. Ngược lại, nếu thay thế bằng một acid amin khác về phương diện hóa học gọi là nonconservative substitution, hầu hết đều gây ra sự thay đổi lớn ở cấu trúc và chức năng protein.

Đột biến vô nghĩa sẽ dẫn đến sự kết thúc dịch mã sớm. Vì vậy chúng gây ra hậu quả tương ứng trên chức năng protein. Nếu đột biến vô nghĩa xảy ra càng ở gần đầu 3' của khung đọc mã, kết quả ít ảnh hưởng đến protein. Tuy nhiên nhiều đột biến vô nghĩa ở vùng này vẫn tạo ra các sản phẩm hoàn toàn bị mất hoạt tính.

Giống với đột biến vô nghĩa, đột biến thêm bớt base gây hậu quả trên trình tự polypeptide kể từ điểm bị đột biến (hình 8.1). Trình tự trên mRNA được đọc theo từng khung gồm ba base (codon) một lúc. Mất hoặc thêm base sẽ làm thay đổi khung đọc trong quá trình dịch mã từ điểm bị đột biến cho đến kết thúc theo khung mới. Vì vậy loại đột biến này được gọi là đột biến dịch khung (frameshift mutations). Đột biến này tạo ra trình tự acid amin kể từ điểm bị đột biến cho đến kết thúc khác với trình tự acid amin gốc. Đột biến dịch khung gây ra sự mất hoàn toàn cấu trúc và chức năng của protein bình thường.

Trường hợp đột biến xảy ra ở trình tự điều hòa và các trình tự không mã hóa khác (hình 8.1). Những phần đó của gene không trực tiếp mã hóa cho protein mà chứa nhiều điểm bám DNA chủ yếu cho protein xen vào, đó là những trình tự không nhạy cảm cho sự biểu hiện của gene hoặc cho hoạt tính của gene.

Ở mức độ DNA, những điểm mồi đi (docking) gồm những điểm mà RNA polymerase và những nhân tố gắn kết của nó bám vào, cũng như những điểm mà protein điều hòa phiên mã đặc trưng gắn vào. Ở mức độ RNA, những docking quan trọng thêm vào gồm điểm bám của ribosom (ribosome-binding site) trên mRNA vi khuẩn, những điểm nối đầu 5' và 3' để gắn các exon ở eukaryote và các điểm có vai trò cho điều hòa dịch mã và định vị mRNA đến vùng đặc biệt trong tế bào. Nhìn chung hậu quả chức năng của bất kì đột biến điểm nào ở vùng như thế đều phụ thuộc vào việc làm gián đoạn (hoặc tạo ra) một điểm bám. Đột biến làm gián đoạn ở những điểm đó có khả năng làm thay đổi phần biểu hiện của gene dựa vào sự thay đổi số lượng sản phẩm được biểu hiện ở một thời điểm nhất định hoặc ở một mô nhất định. hay bằng sự thay đổi phản ứng với những tín hiệu (cue) của môi trường nhất định. Ngược lại, đột biến ở một vài điểm bám có thể hoàn toàn phá hủy một giai đoạn cần cho sự biểu hiện bình thường của gene, như điểm bám của mRNA polymerase hoặc là nhân tố splicing. Vì vậy nó làm bất hoạt sản phẩm của gene hoặc ngăn cản sự hình thành sản phẩm.

Cần phân biệt giữa những thay đổi xảy ra của một đột biến gene đó là sự thay đổi trình tự DNA của gene với sự thay đổi ở mức độ kiểu hình. Nhiều đột biến điểm trong trình tự không mã hóa làm ít thay đổi hoặc không thay đổi trên kiểu hình như đột biến giữa điểm bám DNA cho protein điều hòa hoặc thay đổi những điểm khác trong gene làm thay đổi chức năng của chúng.