

Chương XV

CHUYỂN HÓA ACID NUCLEIC

MỤC TIÊU HỌC TẬP

1. Mô tả được các quá trình tổng hợp nucleotid purin và pyrimidin.
2. Trình bày sơ đồ quá trình thoái hóa nucleotid purin và pyrimidin.
3. Nêu được các đặc điểm chính của quá trình nhân đôi ADN và quá trình tổng hợp ARN. Nêu được sự khác biệt của 2 quá trình này ở tế bào nhân sơ và tế bào nhân thật.

1. CHUYỂN HÓA NUCLEOTID

1.1. Tổng hợp nucleotid

Các nucleotid trong tế bào đến từ 2 nguồn: tổng hợp mới từ các tiền chất acid amin, ribose 5-phosphat, CO_2 và NH_3 ; và tái sử dụng các base nitơ và nucleosid từ quá trình thoái hóa acid nucleic.

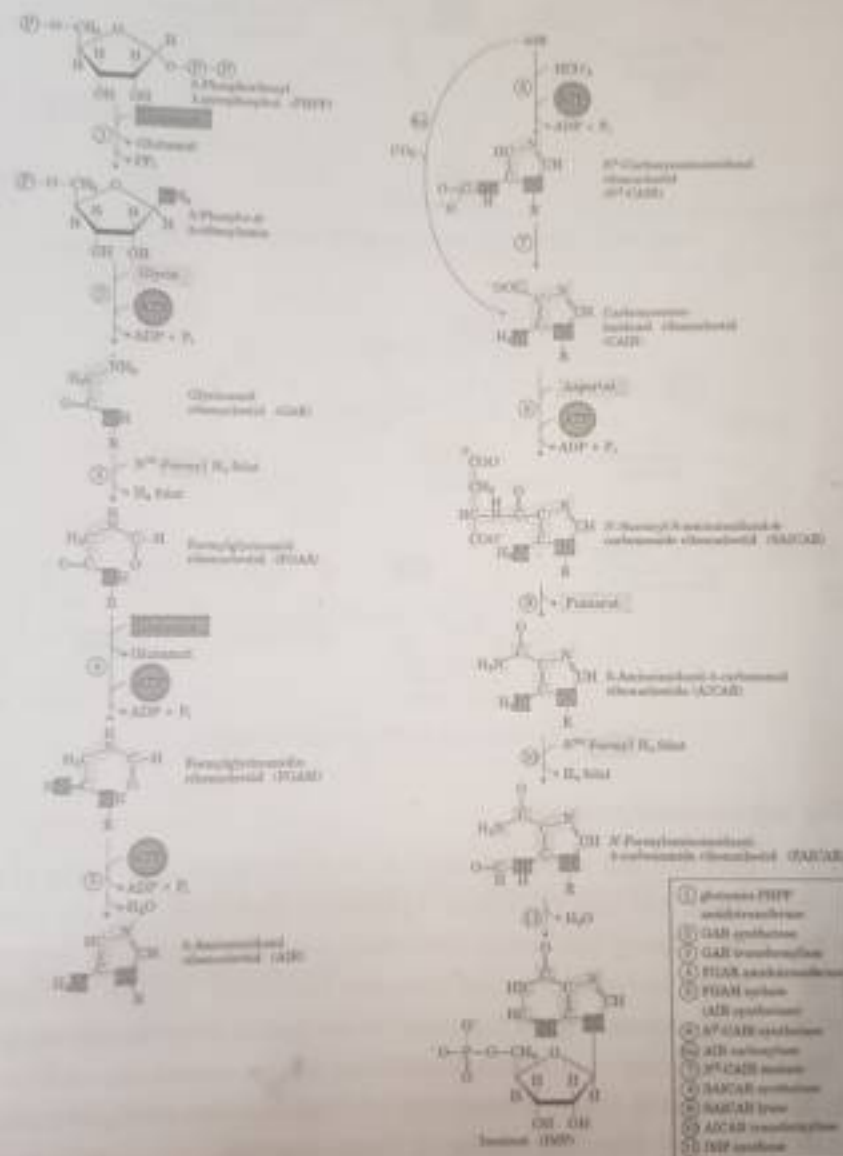
1.1.1. Tổng hợp nucleotid purin

Hình 15.1 trình bày quá trình tổng hợp chất trung gian inosinat (IMP) có vòng purin hoàn chỉnh. Ở bước đầu tiên, cũng là bước quy định quá trình tổng hợp, glutamin cung cấp nhóm amin tại C-1 của phosphoribosyl pyrophosphat (PRPP). Tiếp theo, glycine cung cấp 3 nguyên tử (gồm 2 C và 1 nhóm amin) ở bước 2. Nhóm amin từ glycine được formyl hóa ở bước 3. Glutamin cung cấp một nitơ ở bước 4. Bước 5 xảy ra phản ứng khử nước và đóng vòng imidazol. Phản ứng carboxyl hóa xảy ra thành 2 bước 6 và 7 ở vi khuẩn và nấm men, nhưng tế bào nhân thật bậc cao hơn chỉ cần 1 bước 6a. Aspartat cung cấp nhóm amin theo 2 bước 8 và 9. Carbon cuối cùng được N^{10} -formyltetrahydrofolat cung cấp ở bước 10 trước khi đóng vòng thứ 2 ở bước 11 để tạo nhân purin. Nguồn gốc các nguyên tử của vòng purin được tóm tắt ở Hình 15.2. Các enzym tham gia tổng hợp IMP được tổ chức thành các phức hợp đa enzym lớn.

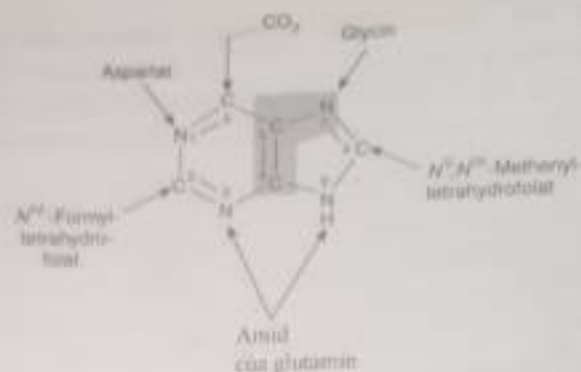
Để chuyển inosinat thành adenylat cần thêm 1 nhóm amin có nguồn gốc từ aspartat, phản ứng xảy ra theo 2 bước và cần năng lượng từ GTP (Hình 15.1). Guanylat được tạo thành từ quá trình oxy hóa IMP và nhận nhóm amin từ glutamin. Ở bước cuối, GTP bị cắt thành AMP và PP_i.

Quá trình tổng hợp nucleotid purin được điều hòa theo 3 cơ chế chính: (1) IMP, AMP và GMP ức chế enzym glutamin-PRPP aminotransferase theo cơ chế dị lập thể;

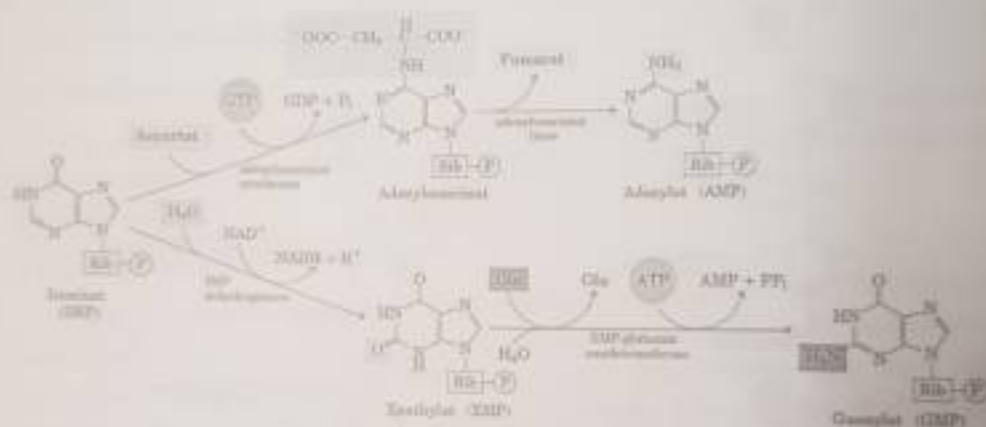
(2) GMP ức chế IMP dehydrogenase, trong khi AMP ức chế adenylosuccinat synthetase; (3) chuyển IMP thành AMP cần GTP, chuyển IMP thành GMP cần ATP, từ đó giúp cân bằng tổng hợp 2 ribonucleotid này. Ngoài ra, ADP và GDP còn ức chế enzym tổng hợp PRPP từ ribose 5-phosphat là ribose phosphat pyrophosphokinase.



Hình 15.1. Hình thành vòng purin của inosinat trong tổng hợp mới nucleotid purin.
R: nhóm 5-phospho-D-ribose



Hình 15.2. Nguồn gốc các nguyên tử trên nhân purin

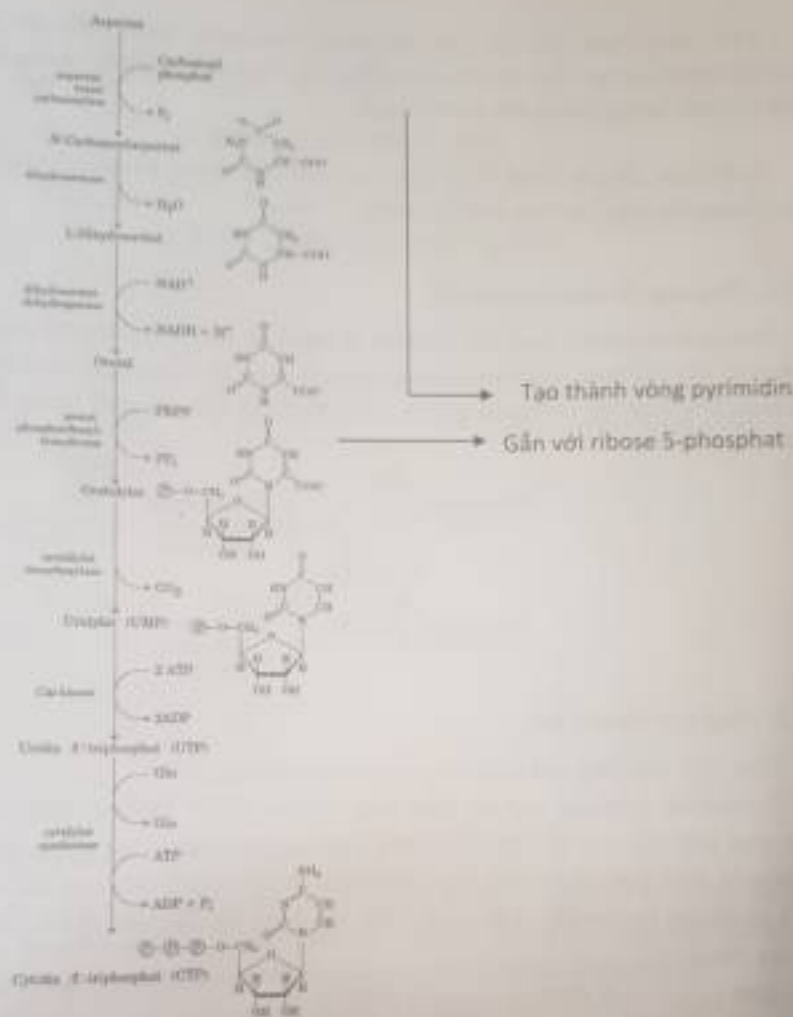


Hình 15.3. Tổng hợp AMP và GMP từ IMP

1.1.2. Tổng hợp nucleotid pyrimidin

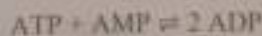
Hình 15.4 trình bày quá trình tổng hợp các nucleotid pyrimidin. Vòng pyrimidin được tạo thành trước khi gắn với ribose 5-phosphat. Quá trình này cần carbamoyl phosphat bão tương. Trong bão tương, carbamoyl phosphat được tổng hợp từ CO_2 , glutamin và ATP nhờ enzym carbamoyl phosphat synthetase II. Ở tế bào nhân thật, carbamoyl phosphat synthetase II, và 2 enzym xúc tác 2 phản ứng đầu tiên trong hình 4 (aspartat transcarbamoylase và dihydroorotase) thuộc về một protein duy nhất có 3 chức năng khác nhau (gọi tắt là CAD). Protein này có 3 chuỗi polypeptid giống nhau, mỗi chuỗi đều có những vị trí hoạt động xúc tác cả 3 phản ứng trên.

Sản phẩm cuối CTP ức chế aspartat transcarbamoylase (ATCase), từ đó điều hòa tốc độ tổng hợp nucleotid pyrimidin.



1.1.3. Tổng hợp nucleotid triphosphat

AMP được phosphoryl hóa thành ADP thông qua enzym adenylat kinase:



ADP tiếp tục được phosphoryl hóa thành ATP trong đường phân hoặc qua phosphoryl oxy hóa.

ATP cũng tham gia tạo các nucleosid diphosphat khác nhờ các nucleosid monophosphat kinase. Các enzym này thường đặc hiệu cho base nito nhưng không đặc hiệu cho loại đường ribose hay deoxyribose:



NDP được chuyển thành NTP nhờ nucleosid diphosphat kinase có nhiều trong tế bào, không đặc hiệu cho base nito và đường:



1.1.4. Tổng hợp deoxyribonucleotid

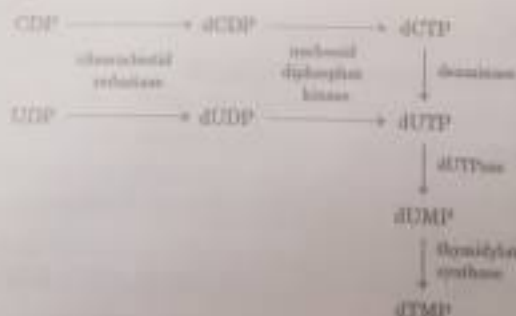
Deoxyribonucleotid được tạo thành từ sự khử trực tiếp ribonucleotid tương ứng tại carbon-2' của D-ribose do ribonucleotid reductase xúc tác. Cấp nguyên tử hydro tham gia phản ứng khử này có nguồn gốc từ NADPH thông qua các chất mang thioredoxin hoặc glutaredoxin.



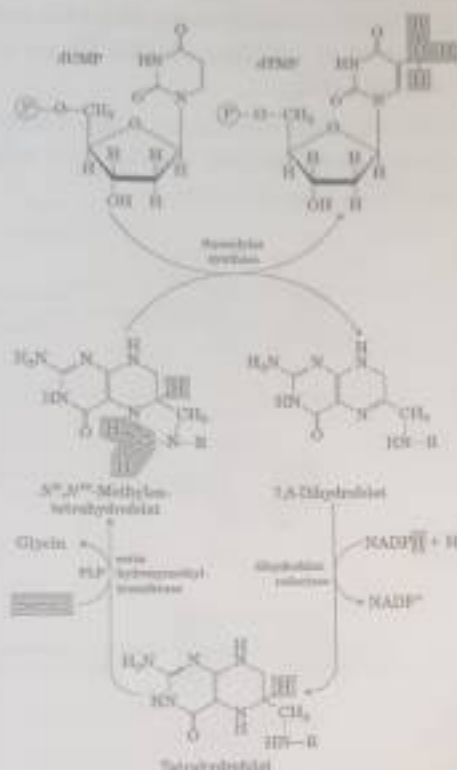
1.1.5. Tổng hợp thymidylat

Hình 15.5 trình bày quá trình tổng hợp thymidylat (dTMP).

Thymidylat synthase xúc tác phản ứng chuyển dUMP thành dTMP (Hình 15.5). Phản ứng khử này xảy ra kèm phản ứng oxy hóa tetrahydrofolat thành dihydrofolat. Thiếu acid folic làm giảm tổng hợp thymidylat, khiến uracil tích hợp bất thường vào ADN, từ đó ảnh hưởng đến chức năng ADN, tác động lên tim, não và làm tăng đột biến gây ung thư.



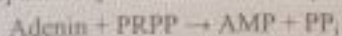
Hình 15.5. Tổng hợp thymidylat (dTMP)



Hình 15.6. Phản ứng chuyển dUMP thành dTMP

1.1.6. Tái sử dụng base purin và pyrimidin

Các base purin và pyrimidin liên tục được giải phóng từ quá trình thoái hóa nucleotid. Purin tự do được tái sử dụng để tạo nucleotid theo con đường đơn giản hơn nhiều so với tổng hợp mới. Adenosin phosphoribosyltransferase xúc tác phản ứng tạo AMP:



Hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferase (HGPRT) xúc tác phản ứng tái sử dụng guanin và hypoxanthin theo cách trên. Base pyrimidin cũng được tái sử dụng theo con đường tương tự, gặp ở vi sinh vật và có thể ở cả động vật có vú.

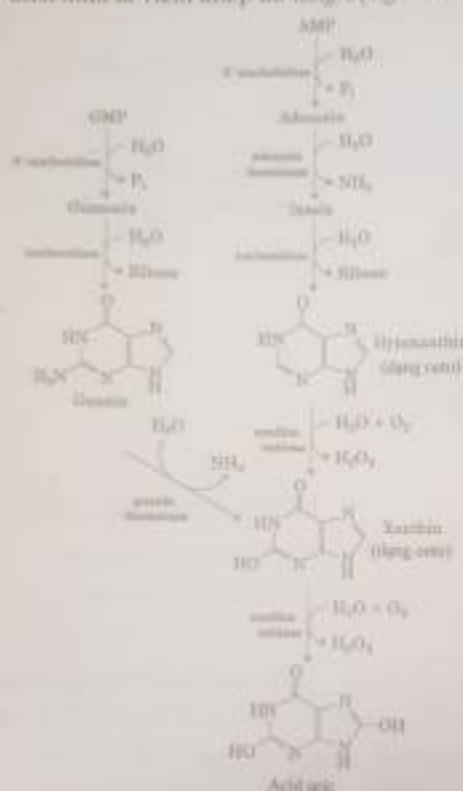
1.2. Thoái hóa nucleotid

1.2.1. Thoái hóa nucleotid purin

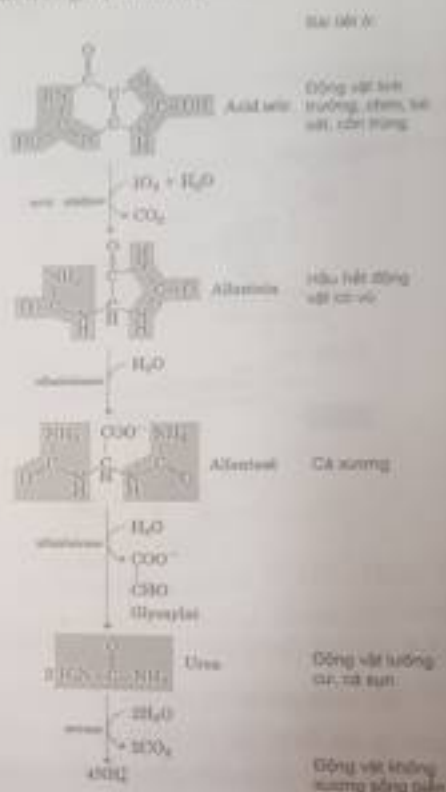
Ở động vật linh trưởng, chim và một số động vật khác, acid uric là sản phẩm bài tiết cuối cùng của quá trình dị hóa purin có nguồn gốc từ thức ăn hoặc từ thoái hóa acid

nucleic (Hình 15.7). Ở hầu hết động vật có vú và các loài có xương sống khác, acid uric tiếp tục được thoái hóa thành allantoin (Hình 15.8). Các động vật khác tiếp tục kéo dài con đường thoái hóa này tạo allantoin, urea, hoặc NH_4^+ .

Acid uric được bài tiết trong nước tiểu. Tốc độ bài tiết acid uric ở người khỏe mạnh khoảng 0,6 g/24 giờ. Dư thừa acid uric trong cơ thể dẫn đến bệnh gout với biểu hiện điển hình là viêm khớp do lắng đọng tinh thể urat trong dịch khớp.



Hình 15.7. Di hóa nucleotid purin

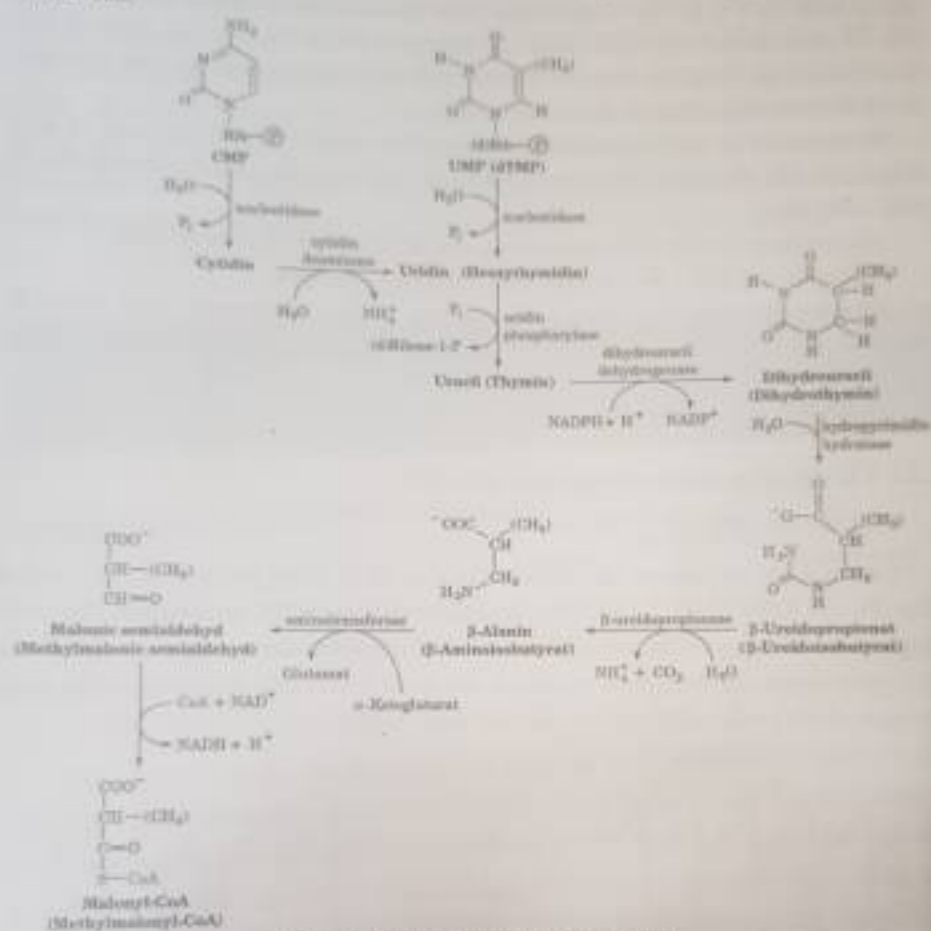


Hình 15.8. Các sản phẩm thoái hóa tiếp theo của acid uric

1.2.2. Thoái hóa nucleotid pyrimidin

Nucleotid pyrimidin ở tế bào được thoái hóa thành các base uracil và thymine (Hình 9). Uracil và thymine tiếp tục được chuyển hóa ở gan thông qua phản ứng khử. Sản phẩm cuối của di hóa pyrimidin ngoài NH_3 , CO_2 là β -alanin và β -aminoisobutyrate tiếp tục được chuyển hóa như các acid amin khác. Chúng tạo thành malonyl-CoA (tiền chất tổng hợp acid béo) và methylmalonyl-CoA (chuyển thành succinyl-CoA đi vào chu trình acid

citric). Như vậy, ở mức độ giới hạn, dị hóa nucleosid pyrimidin đóng góp năng lượng cho tế bào.



Hình 15.9. Thoái hóa nucleotid pyrimidin.

2. CHUYỂN HÓA ADN

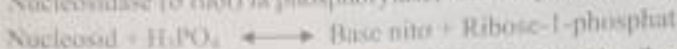
2.1. Thoái hóa ADN

Phần tử ADN được phân cắt bởi các enzym nuclease (hay DNase nếu đặc hiệu cho ADN) thành các mononucleotid (hay nucleotid). Nuclease (tuy) là một phosphodiesterase, gồm 2 nhóm: exonuclease và endonuclease. Exonuclease phân cắt acid nucleic từ một đầu của phân tử, thường hoạt động chỉ theo chiều 5'→3' hoặc 3'→5'

của một sợi trong phân tử acid nucleic sợi kép hoặc của ADN sợi đơn. Endonuclease bắt đầu sự phân cắt ở vị trí bên trong sợi hay phân tử ADN, tạo các mảnh ADN nhỏ hơn. Một số exonuclease và endonuclease chỉ tác dụng lên ADN sợi đơn. Một số loại endonuclease chỉ cắt tại các trình tự nucleotid nhất định (như các endonuclease giới hạn, có vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học).

Nucleotidase (ở ruột) là phosphatase, thủy phân nucleotid thành nucleosid và acid phosphoric. Các phosphat vô cơ được dùng trong phản ứng phosphoryl hóa hoặc thải ra phân, nước tiểu.

Nucleosidase (ở ruột) là phosphorylase, xúc tác phản ứng phosphoryl phân:



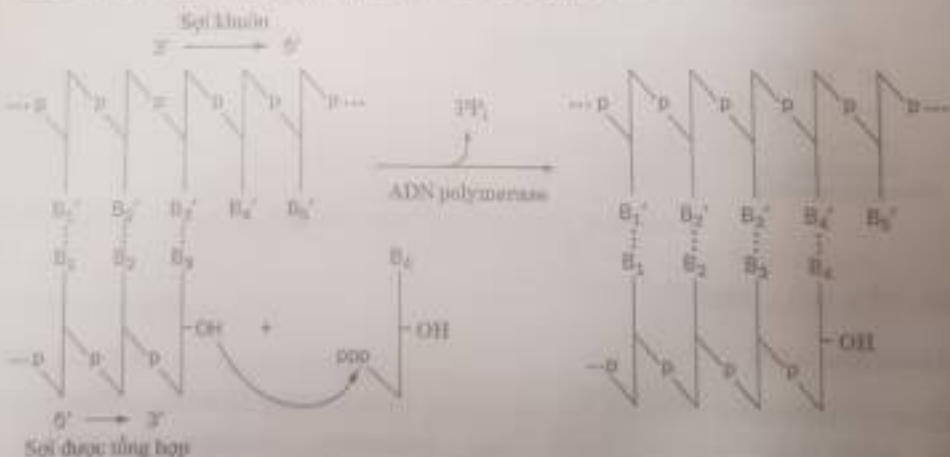
Ribose-1-phosphat được đồng phân hóa nhờ phosphoribomutase thành ribose-5-phosphat, một tiền chất của nucleotid. Một phần base nito được tái sử dụng trở lại để tạo thành nucleotid.

2.2. Nhân đôi ADN

2.2.1. Các đặc điểm cơ bản của sự nhân đôi ADN

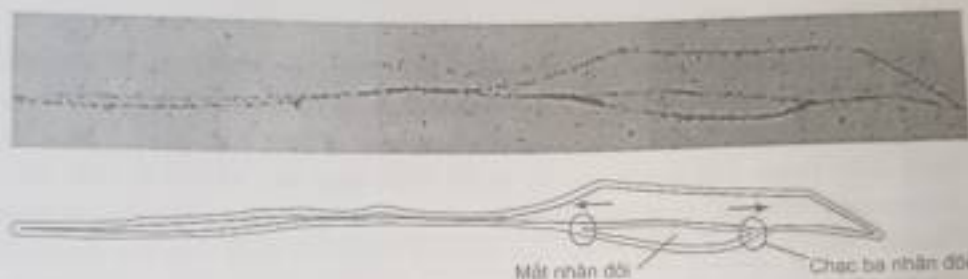
2.2.1.1. Chạc ba nhân đôi

Enzym ADN polymerase phụ thuộc ADN (gọi tắt là ADN polymerase) xúc tác sự nhân đôi của ADN (Hình 15.10). Các enzym này sử dụng ADN sợi đơn làm khuôn để tổng hợp sợi bổ sung từ các deoxyribonucleosid triphosphat tương ứng. Gần như tất cả ADN polymerase chỉ thêm được nucleotid vào nhóm 3'-OH trên polynucleotid đã ghép cặp base; do đó chuỗi ADN chỉ được kéo dài theo chiều 5'→3'.



Hình 15.10. Hoạt động của ADN polymerase.

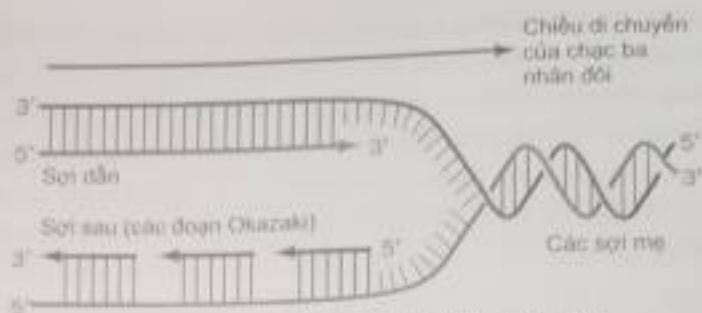
Bằng kỹ thuật chụp ảnh phóng xạ tự ghi của quá trình nhân đôi ADN (Hình 15.11), người ta thấy xuất hiện cấu trúc "bong bóng" nhân đôi (còn gọi là "mắt" nhân đôi, cấu trúc θ). Điều này cho thấy ADN sợi kép (dsADN) nhân đôi xảy ra bằng cách tách dần dần 2 sợi của phân tử ADN mẹ kèm theo tổng hợp các sợi bổ sung để cho ra 2 phân tử ADN con sợi kép hoàn hảo. Điểm phân nhánh ở mắt nhân đôi xảy ra sự tổng hợp ADN được gọi là chạc ba nhân đôi. Hầu hết quá trình nhân đôi ADN xảy ra theo 2 hướng (có 2 chạc ba nhân đôi ở bong bóng nhân đôi). Người ta cũng nhận thấy vị trí khởi đầu cho quá trình nhân đôi là các trình tự giàu A-T một cách bất thường.



Hình 15.11. Mắt nhân đôi và chạc ba nhân đôi trên ảnh phóng xạ tự ghi của quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể *E. coli*.

2.2.1.2. Nhân đôi nửa gián đoạn

Ảnh phóng xạ tự ghi cho thấy 2 sợi đối song của ADN sợi kép được nhân đôi đồng thời với nhau khi chạc ba nhân đôi di chuyển nhưng người ta chỉ tìm thấy được các ADN polymerase kéo dài sợi ADN theo chiều $5' \rightarrow 3'$. Như vậy, bằng cách nào ADN polymerase sao chép sợi mẹ mới theo chiều $5' \rightarrow 3'$ ở chạc ba nhân đôi? Năm 1968, trong thí nghiệm nuôi cấy *E. coli* với [^3H]thymidin, R. Okazaki nhận thấy ADN vừa mới được tổng hợp có hệ số lắng 7S đến 11S trong môi trường kiềm. Các đoạn này được gọi là đoạn Okazaki, chỉ gồm 1.000 đến 2.000 nucleotid (100–200 nucleotid ở tế bào nhân thật). Nhờ đó, cơ chế nhân đôi của ADN được làm sáng tỏ. Sợi ADN mới được tổng hợp liên tục theo chiều $5' \rightarrow 3'$ cùng với chiều di chuyển của chạc ba nhân đôi được gọi là *sợi dẫn*. Sợi mới tổng hợp còn lại, được gọi là *sợi sau*, cũng được tổng hợp theo chiều $5' \rightarrow 3'$ nhưng không liên tục mà ở dạng các đoạn Okazaki (Hình 15.12). Các đoạn Okazaki sau đó được nối cộng hóa trị với nhau dưới sự xúc tác của ADN ligase.



Hình 15.12. Cơ chế nhân đôi ADN nửa gián đoạn.

2.2.1.3. Đoạn mồi ARN

ADN polymerase cần nhóm 3'-OH tự do để kéo dài chuỗi ADN. Vậy sự tổng hợp ADN được khởi đầu như thế nào? Phân tích kỹ các đoạn Okazaki cho thấy đầu 5' của chúng chứa các đoạn ARN gồm 1 đến 60 nucleotid (tùy theo loài) gắn bổ sung với chuỗi ADN khuôn. Hai enzym xúc tác sự tạo thành đoạn mồi ARN ở *E. coli*: ARN polymerase (~459 kDa) và primase (60 kDa). Primase tổng hợp đoạn mồi cho các đoạn Okazaki; ARN polymerase và primase có tác dụng hiệp đồng trong tổng hợp đoạn mồi cho sợi dẫn. Tổng hợp sợi sau cần nhiều đoạn mồi trong khi tổng hợp đoạn dẫn chỉ cần 1 đoạn mồi. ADN trưởng thành không chứa ARN; các đoạn mồi ARN được cắt bỏ và khoảng trống được thay thế bằng ADN.

2.2.2. Nhân đôi ADN ở tế bào nhân sơ

2.2.2.1. ADN polymerase

ADN polymerase I (Pol I) là polypeptid monome gồm 928 acid amin. Pol I gắn dNTP vào khuôn ADN theo cơ chế 3'-OH của chuỗi ADN đang kéo dài tấn công ái nhân vào α -phosphoryl của dNTP mới. Phản ứng này giải phóng pyrophosphat vô cơ.

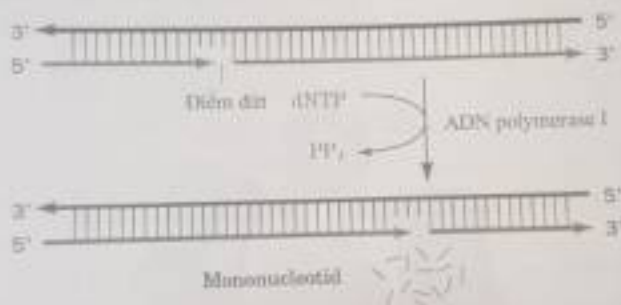


Biến thiên năng lượng của phản ứng này gần bằng 0; nhưng phản ứng xảy ra theo chiều tổng hợp ADN là nhờ sản phẩm ADN được ổn định hóa bởi sự kết cặp và có cụm base, cũng như sự thủy phân của sản phẩm pyrophosphat.

Pol I lựa chọn dNTP chủ yếu dựa vào hình dạng của base nitơ để tạo cặp với base nitơ sợi khuôn, mà không dựa vào tính chất tạo liên kết hydro của base đó. Ngoài hoạt tính polymerase, Pol I còn có hoạt tính thủy phân: nó có thể hoạt động như là 3'→5' exonuclease và 5'→3' exonuclease. Các hoạt tính này nằm ở những vị trí khác nhau trên chuỗi polypeptid của Pol I. Khi cắt bỏ đoạn 5'→3' exonuclease, phần còn lại có cả hai

hoạt tính polymerase và $3' \rightarrow 5'$ exonuclease được gọi là đoạn Klenow, có vai trò polyme hóa và đọc sửa. Khi Pol I gắn nhằm 1 nucleotid (không ghép cặp được) ở đầu của chuỗi ADN đang kéo dài, hoạt tính polymerase bị ức chế và nucleotid gần sai bị cắt bỏ. Quá trình này được gọi là *đọc sửa*. Phản ứng $3' \rightarrow 5'$ exonuclease khác với chiều nghịch của phản ứng polyme hóa ở chỗ nó giải phóng nước thay vì pyrophosphat. Nhờ cơ chế đọc sửa mà quá trình nhân đôi ADN do Pol I xúc tác có độ chính xác cao.

$5' \rightarrow 3'$ Exonuclease của Pol I gắn vào điểm đứt trên một sợi của ADN sợi đôi, từ đó cắt đầu $5'$ sợi ADN bị đứt đó thành những mononucleotid hay oligonucleotid (đến 10 đơn vị). Phối hợp với hoạt tính polymerase, các nucleotid mới bổ sung đối base với sợi khuôn được lắp vào chỗ bị cắt, kết quả là điểm đứt được dịch chuyển về phía đầu $3'$, gọi là quá trình *dịch chuyển điểm đứt*. Cơ chế này được ứng dụng để tổng hợp ADN có hoạt tính phòng xạ. Sự phối hợp giữa $5' \rightarrow 3'$ exonuclease và polymerase cũng đóng vai trò trong cắt bỏ đoạn mồi ARN ở đầu $5'$ của ADN mồi tổng hợp (đoạn Okazaki). Khi đoạn mồi ARN được cắt bỏ hoàn toàn, điểm đứt được nối lại bởi ADN ligase.



Hình 15.13. Dịch chuyển điểm đứt do Pol I xúc tác.

Cơ chế xúc tác của ADN polymerase cần sự tham gia của 2 ion kim loại, thường là Mg^{2+} . Một ion hoạt hóa $3'-OH$ để tấn công ái nhân vào nhóm α -phosphoryl. Ion còn lại định hướng nhóm triphosphat dẫn đến giải phóng ion PP_i .

E. coli có ít nhất 5 ADN polymerase, được đặt tên theo trình tự phát hiện. Mặc dù chiếm hơn 90% hoạt tính ADN polymerase ở *E. coli*, Pol I không phải là enzym nhân đôi chính mà có vai trò dọn dẹp trong quá trình nhân đôi, tái tổ hợp và sửa chữa. ADN polymerase II (Pol II) tham gia vào một dạng sửa chữa ADN. ADN polymerase III (Pol III) là enzym nhân đôi chính của *E. coli*. Đặc điểm của 3 enzym này được so sánh ở Bảng 15.1. ADN polymerase IV và V tham gia vào một dạng sửa chữa ADN ít gặp.

Bảng 15.1. So sánh 3 loại ADN polymerase ở *E. coli*

	Pol I	Pol II	Pol III
Gen cấu trúc (mã hóa hoạt tính polymerase)	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC (dnaE)</i>
Tiểu đơn vị (số loại)	1	88	≥ 10
Khối lượng (kDa)	+	+	791,5
3'→5' exonuclease	+	-	-
5'→3' exonuclease	16-20	40	250-1000
Tốc độ polyme hóa (nucleotit/giây)	3-200	1500	≥ 500.000

Lỗi xúc tác của Pol III gồm 3 tiểu đơn vị: α (mang hoạt tính ADN polymerase), ϵ (3'→5' exonuclease) và θ (Hình 15.14). Hai polymerase lõi nối với một nhóm các tiểu đơn vị, gọi là phức hợp tải kẹp, hay phức hợp γ , gồm 4 loại $\tau, \gamma, \delta, \delta'$, trong đó τ đóng vai trò liên kết các polymerase lõi. Ngoài ra, hai tiểu đơn vị χ và ψ cũng gắn vào phức hợp tải kẹp. Toàn bộ 13 tiểu đơn vị trên (thuộc 9 loại) được gọi là Pol III*. Pol III* tổng hợp ADN với tốc độ chậm. Bốn tiểu đơn vị β gắn thành cặp ở mỗi polymerase lõi, trượt dọc theo sợi ADN và ngăn cản Pol III tách khỏi ADN, từ đó làm tăng tốc độ nhân đôi một cách đáng kể. Pol III với tất cả 10 loại tiểu đơn vị được gọi là holoenzym Pol III.



Hình 15.14. Holoenzym Pol III (các tiểu đơn vị χ và ψ không có trong hình này).

2.2.2.2. Các giai đoạn nhân đôi ADN ở *E. coli*

Quá trình nhân đôi ADN ở *E. coli* có sự tham gia của hơn 20 loại enzym và protein khác nhau. Toàn bộ phức hợp được gọi là hệ thống ADN replicase hay replisom. Các enzym chính gồm:

1. Helicase: tách các sợi ADN ở chạc ba nhân đôi.
2. ADN topoisomerase: Ở tế bào nhân sơ, ADN gyrase (topoisomerase loại IIa) tạo siêu xoắn âm, cần thiết cho quá trình nhân đôi của ADN.

3. Protein ngăn cản các sợi ADN mẹ tái kết hợp trước khi chúng được nhân đôi.
4. Enzym tổng hợp đoạn mồi ARN.
5. ADN polymerase.
6. Enzym cắt bỏ ARN mồi và thay thế bằng ADN. Ở *E. coli*, đây là một trong các chức năng của Pol I.
7. Enzym nối cộng hòa trị các đoạn Okazaki kế tiếp nhau.

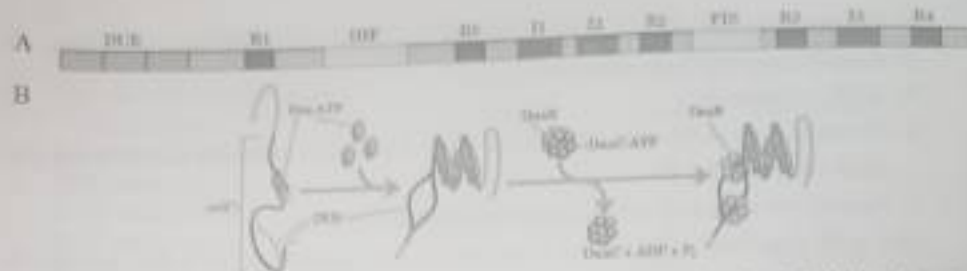
Quá trình tổng hợp ADN có thể được chia thành 3 giai đoạn: khởi đầu, kéo dài và kết thúc.

a. Giai đoạn khởi đầu

Vị trí khởi đầu nhân đôi của *E. coli* được gọi là *oriC*, gồm 245 bp và chứa các trình tự ADN được bảo tồn cao (Hình 15.15A). Trong số các trình tự trên vị trí khởi đầu có 2 loại trình tự đáng chú ý: đoạn R gồm 9 bp lặp lại 5 lần có vai trò làm vị trí gắn cho protein khởi đầu DnaA, và một vùng giàu cặp base A-T được gọi là yếu tố tháo xoắn ADN (DUE, DNA unwinding element). Ngoài ra, *oriC* còn có 3 vị trí 1 cũng để gắn DnaA, và các vị trí gắn IHF (integration host factor), FIS (factor for inversion stimulation). Protein HU (protein giống histon) cũng gắn lên ADN nhưng ở vị trí không đặc hiệu.

Protein DnaA là thành viên thuộc họ protein AAA⁺ ATPase (ATPase liên quan đến các hoạt động đa dạng của tế bào). Nhiều AAA⁺ ATPase tạo các oligomer và thủy phân ATP tương đối chậm. Phản ứng thủy phân ATP đóng vai trò như công tắc chuyển đổi qua lại dựa trên trạng thái hoạt động (gắn ATP đối với DnaA) và không hoạt động (gắn ADP đối với DnaA).

Tám phân tử DnaA gắn ATP nhận biết trình tự khởi đầu, tạo phức hợp bao quanh các vị trí R và I (R gắn được DnaA ở dạng kết hợp ATP và ADP, I chỉ gắn được DnaA ở dạng kết hợp ATP) (Hình 15.15B). Quá trình này hình thành siêu xoắn dương, khiến vùng DUE giàu A-T gần đó bị biến tính. Phức hợp này cũng chứa một số protein gắn ADN như HU, IHF, FIS. Tiếp theo, một protein khác cũng thuộc họ AAA⁺ ATPase là DnaC tải protein DnaB (helicase) vào các sợi ADN đã bị tách ở vùng biến tính. Hai hexamer dạng vòng của DnaB gắn lên 2 sợi ADN. Sau đó DnaC tách khỏi DnaB. DnaB di chuyển dọc theo sợi đơn ADN theo chiều 5'→3', đồng thời mở xoắn ADN. Như vậy, các DnaB helicase này di chuyển ngược chiều nhau, tạo 2 chạc ba nhân đôi. Tất cả các protein khác tại chạc ba nhân đôi liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với DnaB. Holoenzym Pol III liên kết với DnaB thông qua tiểu đơn vị τ . Khi sự nhân đôi bắt đầu, nhiều phân tử protein gắn ADN sợi đơn (SSB) gắn và làm ổn định các sợi đã được tách; ADN gyrase (ADN topoisomerase II) làm giảm sức căng cấu hình ở phía trước chạc ba do phản ứng tháo xoắn gây ra.



Giai đoạn khởi đầu được điều hòa để xảy ra chỉ một lần trong chu kỳ tế bào. Trong quá trình nhân đôi ADN, đây là giai đoạn được điều hòa duy nhất được biết đến cho đến nay. Mặc dù chưa rõ hoàn toàn, nhưng các nghiên cứu cho thấy có một vài cơ chế điều hòa riêng biệt.

Khi Pol III đã được tải lên ADN, protein Hda (cũng là một AAA+ ATPase) gắn vào tiểu đơn vị β của enzym này, kích hoạt quá trình thủy phân ATP của DnaA, từ đó phân rã phức hợp gắn ở vị trí khởi đầu. Thời gian cần cho chu trình giải phóng ADP và gắn lại ATP của DnaA là 20 đến 40 phút.

Thời gian cho sự khởi đầu nhân đôi còn bị chi phối bởi quá trình methyl hóa ADN và tương tác với màng bảo tương vi khuẩn. Enzyme methylase xúc tác phản ứng methyl hóa N⁶ của adenin trong trình tự GATC có trên *oriC*. *oriC* là vùng giàu trình tự GATC (có 11 trình tự này trong số 245 bp, so với tần suất trung bình ở *E. coli* là 1 trình tự GATC trong mỗi 256 bp). Ngay sau khi nhân đôi, các sợi mẹ chứa vùng *oriC* được methyl hóa, trong khi vùng này trên các sợi mới tổng hợp thì không được methyl hóa. Vùng *oriC* bán methyl hóa này được cô lập bằng cách tương tác với màng bảo tương (cơ chế chưa rõ) và gắn với protein SepA. Sau một thời gian, *oriC* được giải phóng khỏi màng bảo tương và SepA, ADN cần được methyl hóa hoàn toàn trước khi có thể gắn lại với DnaA để khởi đầu lần nhân đôi mới.

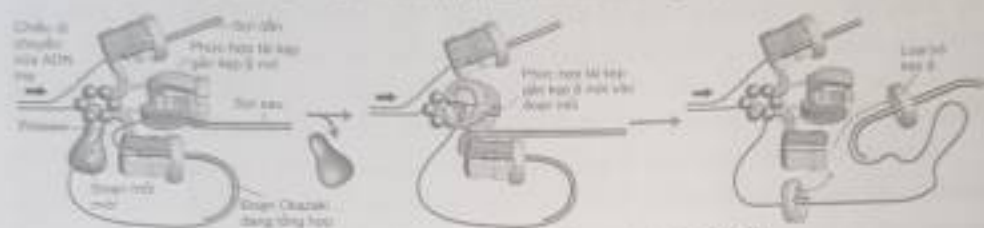
b. Giai đoạn kéo dài

Giai đoạn kéo dài gồm 2 hoạt động khác biệt nhưng có liên hệ với nhau: tổng hợp sợi dẫn và tổng hợp sợi sau.

Tổng hợp sợi dẫn ít phức tạp hơn, bắt đầu bằng sự tổng hợp đoạn mồi ARN ngắn (10 đến 60 bp) bởi primase (protein DnaG) theo hướng ngược với hướng di chuyển của DnaB helicase. Khi DnaB di chuyển trên khuôn sợi sau, nó tương tác với DnaG để tổng hợp đoạn mồi cho sợi dẫn. Sau đó, Pol III (liên kết với DnaB helicase ở sợi đối diện) thêm các dNTP vào đoạn mồi để tổng hợp sợi dẫn.

Tổng hợp sợi sau cần các đoạn Okazaki ngắn. Đầu tiên, primase tổng hợp đoạn mồi ARN như ở sợi dẫn. Pol III gắn vào đoạn mồi ARN và thêm các dNTP vào. DnaB helicase và DnaG primase tạo thành một đơn vị chức năng bên trong phức hợp nhân đôi, gọi là primosome. Pol III sử dụng một bộ các tiểu đơn vị lõi để tổng hợp sợi dẫn, bỏ các tiểu đơn vị lõi còn lại di chuyển trên các đoạn Okazaki của sợi sau (Hình 15.16).

Khi DnaB helicase di chuyển dọc trên khuôn của sợi sau theo chiều 5'→3', DnaG primase từng lúc gắn vào DnaB helicase và tổng hợp một đoạn mồi ARN. Phức hợp tải kẹp (cũng là một AAA+ ATPase) của Pol III gắn kẹp β mới vào đoạn mồi. Khi tổng hợp xong đoạn Okazaki trước, quá trình nhân đôi tạm ngưng, các tiểu đơn vị lõi của Pol III loại bỏ kẹp β đang mang và gắn vào kẹp β mới, bắt đầu tổng hợp đoạn Okazaki mới.



Hình 15.16. Giai đoạn kéo dài trong nhân đôi ADN

Sau khi một đoạn Okazaki đã được tổng hợp xong, Pol I cắt bỏ đoạn mồi và thay thế bằng ADN. Điểm nút được nối lại bằng ADN ligase. ADN ligase xúc tác sự tạo thành liên kết phosphodiester giữa đầu 3'-OH của một sợi ADN với đầu 5' phosphat của sợi khác. Nhóm phosphat cần được hoạt hóa bằng phản ứng adenyl hóa, bằng cách sử dụng ATP (ở vi rút và tế bào nhân thật) hay NAD⁺ (ở vi khuẩn).

c. Giai đoạn kết thúc

Hai chạc ba nhân đôi của nhiễm sắc thể vòng của *E. coli* gấp nhau tại vùng tận chứa nhiều đoạn Ter gồm 20 bp lặp lại. Các trình tự Ter làm vị trí gắn cho protein Tus (terminus utilization substance). Chỉ có 1 phức hợp Ter-Tus hoạt động cho 1 chu kỳ nhân đôi. Chạc ba nhân đôi nào gặp phức hợp Ter-Tus trước, nó ngưng lại. Chạc ba kia ngưng khi gặp chạc ba thứ nhất. Sau đó, vài trăm cặp nucleotid còn lại giữa các phức hợp protein lớn này được nhân đôi (cơ chế chưa rõ). Hai vòng nhiễm sắc thể được cắt ra bởi enzyme topoisomerase IV (topoisomerase loại II).

2.2.3. Nhân đôi ADN ở tế bào nhân thật

Các phân tử ADN ở tế bào nhân thật lớn hơn nhiều so với ở vi khuẩn và được tổ chức thành nucleoprotein phức tạp. Các đặc điểm chính của quá trình nhân đôi ADN ở tế bào nhân thật tương tự như vi khuẩn với nhiều phức hợp protein được bảo tồn cầu

trúc và chức năng. Tuy nhiên, sự nhân đôi ở tế bào nhân thật được điều hòa và phối hợp với chu kỳ tế bào, cũng khiến quá trình này phức tạp hơn.

Vị trí khởi đầu được xác định rõ ở tế bào nhân thật bậc thấp, nhưng ở tế bào nhân thật bậc cao, vị trí này khó được xác định hơn. Ở động vật có xương sống, nhiều trình tự giàu A=T được dùng khởi đầu sự nhân đôi. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có vùng khởi đầu được xác định rõ, gọi là replicator, kích thước ~150 bp.

Sự nhân đôi ADN được điều hòa để mỗi chu kỳ tế bào chỉ xảy ra một lần với sự tham gia của phức hợp protein cyclin và kinase phụ thuộc cyclin (CDK). Vào cuối pha M (nguyên phân), phân ứng ly giải protein phụ thuộc ubiquitin nhanh chóng phá hủy cyclin dẫn đến thành lập phức hợp tiền nhân đôi ở vị trí khởi đầu nhân đôi. Quá trình này được gọi là "cấp phép" cho tế bào nhân đôi. Tuy nhiên, phức hợp tiền nhân đôi được cấp phép không tự khởi động quá trình nhân đôi mà nó cần được hoạt hóa trong pha S. Các phức hợp cyclin-CDK (như cyclin E-CDK2) và CDC7-DBF4 gắn và phosphoryl hóa một số protein trên phức hợp tiền nhân đôi, từ đó hoạt hóa sự nhân đôi.

Helicase ở tế bào nhân thật là phức hợp heterohexamer gồm các protein MCM2-7 (mini-chromosome maintenance). MCM2-7 helicase được tải lên ADN nhờ ORC (origin recognition complex, phức hợp nhận biết vị trí khởi đầu, gồm 6 protein). ORC có 5 vùng AAA+ ATPase, chức năng tương tự DnaA vi khuẩn. Các protein CDC6 (cell division cycle) và CDT1 (CDC10-dependent transcript 1) cũng tham gia tải MCM2-7.

Tốc độ di chuyển của chạc ba nhân đôi ở tế bào nhân thật khoảng 50 nucleotid/giây, chỉ bằng 1/20 ở *E. coli*. Với tốc độ này, sao chép một nhiễm sắc thể ở người cần hơn 500 giờ nếu chỉ có 1 vị trí khởi đầu. Thực tế, quá trình nhân đôi nhiễm sắc thể người xảy ra theo 2 hướng từ nhiều vị trí khởi đầu cách nhau 30 đến 300 kbp.

Tế bào nhân thật cũng có một số loại ADN polymerase. ADN polymerase α cùng với ADN polymerase δ tham gia vào sự nhân đôi nhiễm sắc thể ở nhân tế bào, ADN polymerase α gồm nhiều tiểu đơn vị, có cấu trúc và chức năng giống nhau ở tất cả các tế bào nhân thật. Một tiểu đơn vị của nó có hoạt tính primase. Tiểu đơn vị lớn nhất (~180.000 Da) chứa hoạt tính polyme hóa. Enzym này không có hoạt tính dọc sợi 3'→5' exonuclease. ADN polymerase α được cho là chỉ có chức năng tổng hợp các đoạn mới ngắn (ARN hoặc ADN) cho các đoạn Okazaki trên sợi sau. ADN polymerase δ có hoạt tính 3'→5' exonuclease và dường như thực hiện tổng hợp sợi dẫn và sợi sau, tương đương Pol III ở vi khuẩn. Một protein có nhiều trong nhân tế bào đang tăng sinh là PCNA (kháng thể nhân tế bào tăng sinh, proliferating cell nuclear antigen) có cấu trúc tương tự tiểu đơn vị β của Pol III, tạo kẹp vòng làm tăng tốc độ polymerase. ADN polymerase ϵ thay thế ADN polymerase δ trong một số trường hợp như trong sửa chữa

ADN. ADN polymerase ϵ cũng hoạt động tại chạc ba nhân đôi, có lẽ có vai trò tương tự Pol I ở vi khuẩn, cắt bỏ đoạn mới khỏi các đoạn Okazaki.

Ngoài ra, RPA (protein nhân đôi A) là protein gắn ADN sợi đơn ở tế bào nhân thật, tương đương protein SSB ở *E. coli*. RFC (yếu tố nhân đôi C) là chất sai lệch đối với PCNA, tương tự phức hợp tại kẹp (γ) ở vi khuẩn.

Telomere tại các đầu của nhiễm sắc thể có vai trò chấm dứt sự nhân đôi ở tế bào nhân thật.

2.2.4. Sửa chữa ADN

ADN có thể bị tổn thương do nhiều nguyên nhân, tự phát hoặc do tác nhân môi trường. Bản thân quá trình nhân đôi cũng dẫn đến tổn thương thông tin trong ADN do bất cặp base sai. Hệ thống sửa chữa ADN trong tế bào có nhiều về số lượng và chủng loại, cho thấy tầm quan trọng của việc sửa chữa phân tử ADN khi đang nhân đôi. Nhiều quá trình sửa chữa ADN rất không hiệu quả về mặt năng lượng—một ngoại lệ trong chuyển hóa—cũng cho thấy tầm quan trọng của việc giữ toàn vẹn thông tin. Có nhiều cơ chế sửa chữa ADN, phần lớn sự sửa chữa ADN được thực hiện là nhờ phân tử ADN gồm 2 sợi bổ sung nhau.

2.2.4.1. Sửa chữa bất cặp sai

Bất cặp base sai (không tạo cặp base Watson-Crick bình thường) được hệ thống sửa chữa bất cặp sai nhận biết. Ở vi khuẩn, sợi ADN mẹ chứa nhóm methyl trên trình tự GATC. Trong quá trình nhân đôi, sợi mới được tổng hợp không được methyl hóa ngay, nhờ đó các protein tham gia sửa chữa nhận biết được sợi con và thay thế base bất cặp sai. Cơ chế nhận biết sợi con ở tế bào nhân thật chưa được biết rõ ràng.

2.2.4.2. Sửa chữa cắt bỏ base

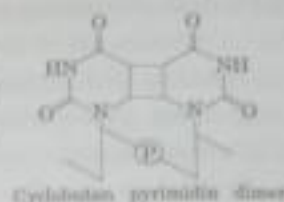
ADN glycosylase nhận biết các biến dạng nhỏ của ADN do tổn thương ở 1 base. Glycosylase cắt liên kết N-glycosyl để loại bỏ base bị ảnh hưởng. Nơi bị cắt base được gọi là vị trí không purin (apurinic) hay không pyrimidin (apyrimidinic), viết tắt là AP. Sau đó AP endonuclease cắt mạch đường-phosphat tại vị trí này. Khoảng trống được lấp đầy bởi Pol I và ADN ligase.

2.2.4.3. Sửa chữa cắt bỏ nucleotid

Cơ chế sửa chữa cắt bỏ nucleotid nhận biết sự biến dạng cục bộ của cấu trúc xoắn ADN do pyrimidin dimer hoặc nhóm thể công kênh trên base. Các endonuclease đặc hiệu (gọi là excinuclease vì cắt mạch ADN tại 2 điểm) cắt bỏ đoạn bất thường. Khoảng trống được lấp đầy bởi ADN polymerase và ADN ligase.

2.2.4.4. Sửa chữa trực tiếp

Một số tổn thương được sửa chữa mà không cần cắt bỏ base hay nucleotid. Thí dụ, phản ứng quang phục hoạt nhờ enzym ADN photolyase sửa chữa cyclobutan pyrimidin dimer do tia cực tím gây ra.



2.2.4.5. Đáp ứng SOS

Khi gặp các tổn thương tại vị trí AP hay thymine dimer, Pol III ở *E. coli* không tiếp tục quá trình nhân đôi được và replisome phân rã. Tế bào có 2 cách giải quyết: sửa chữa tái tổ hợp và sửa chữa SOS. Sửa chữa tái tổ hợp né tránh tổn thương bằng cách dùng nhiễm sắc thể tương đồng làm khuôn (tái tổ hợp tương đồng). Đối với sửa chữa SOS, Pol III được thay thế bằng một trong hai ADN polymerase: Pol IV hoặc Pol V. Cả 2 enzym này đều không có hoạt tính 3'→5' exonuclease đọc sửa, và thực hiện nhân đôi ADN với độ tin cậy và tốc độ thấp, nên được gọi là các ADN polymerase dễ mắc lỗi. Tổng hợp qua đoạn bị tổn thương (translesion synthesis) được Pol V thực hiện kéo dài ~7 nucleotid và được thay thế trở lại bằng holoenzym Pol III. Pol IV cũng tham gia tổng hợp qua đoạn bị tổn thương ở một số trường hợp.

2.2.4.6. Sửa chữa đứt gãy mạch đôi

Đứt gãy mạch đôi gặp khi chạc ba nhân đôi gặp điểm đứt, hoặc do các gốc oxy hoạt động có nguồn gốc từ chuyển hóa oxy hóa hoặc phóng xạ ion hóa. Tế bào có 2 cơ chế sửa chữa: sửa chữa tái tổ hợp, xảy ra cuối pha S và G2; và nối đầu tận không tương đồng, xảy ra xuyên suốt chu kỳ tế bào.

3. CHUYỂN HÓA ARN

3.1. Phiên mã ở tế bào nhân sơ

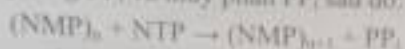
Bình thường, sự tổng hợp ARN chỉ bắt đầu tại một vị trí đặc hiệu trên khuôn ADN. Khác với nhân đôi ADN, chỉ có một vùng nhỏ trên sợi đơn ADN tham gia tổng hợp ARN. Sợi ADN làm sợi khuôn phiên mã được gọi là *sợi đối nghĩa* hay *sợi không mã hóa* (vì có trình tự bổ sung với trình tự của ARN). Sợi ADN còn lại gọi là *sợi có nghĩa* hay *sợi mã hóa*, có cấu trúc giống ARN được tổng hợp (trừ U thay cho T). Vì vậy, 2 sợi ADN trên một nhiễm sắc thể có thể chứa các gen khác nhau.

Hầu hết các gen mã hóa protein (gen cấu trúc) ở tế bào nhân thật được phiên mã riêng rẽ nhau. Ở bộ gen tế bào nhân sơ, các gen thường xếp thành nhóm dọc trên sợi đơn ADN và được phiên mã cùng lúc. Các đơn vị gen này được gọi là operon, thường

chứa các gen có chức năng liên quan với nhau. Operon được phiên mã thành một đơn vị, tạo ARNm polycistron, từ đó tổng hợp gần như đồng thời các polypeptid được mã hóa. Ngược lại, gen cấu trúc của tế bào nhân thật tạo ARNm monocistron.

3.1.1. ARN polymerase

ARN polymerase phụ thuộc ADN là enzym chịu trách nhiệm tổng hợp ARN dưới sự hướng dẫn của ADN. Enzym này gắn các ribonucleosid triphosphat ATP, CTP, GTP và UTP vào đầu 3'-hydroxyl, từ đó phân tử ARN được tổng hợp theo chiều 5'→3'. Phản ứng này xảy ra với sự giải phóng PP_i và thủy phân PP_i sau đó:



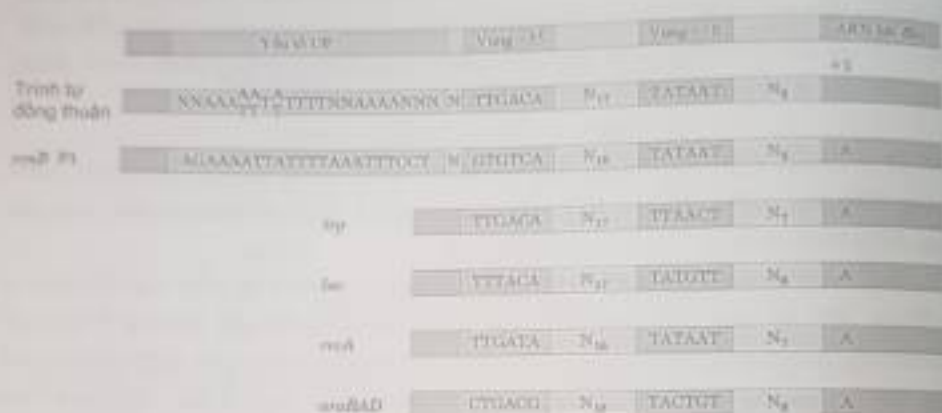
Ở vi khuẩn, một enzym tổng hợp tất cả các ARN của tế bào (trừ đoạn mồi ARN trong nhân đôi ADN). Tế bào nhân thật chứa 4 đến 5 ARN polymerase tổng hợp các loại ARN khác nhau.

Ở *E. coli*, holoenzym ARN polymerase là protein 449 kDa gồm các tiểu đơn vị $\alpha_2\beta\beta'\omega$. Khi sự tổng hợp ARN đã được khởi đầu (sợi ARN dài khoảng 9 hoặc 10 nucleotid), tiểu đơn vị ω (còn gọi là yếu tố σ) tách ra khỏi enzym lõi $\alpha_2\beta\beta'$ và có thể gắn vào enzym lõi khác. Do đó, enzym lõi là thành phần thực tế thực hiện quá trình polyme hóa. ARN polymerase không có hoạt tính 3'→5' exonuclease nên tỷ lệ lỗi phiên mã cao hơn nhân đôi ADN, khoảng 10^{-5} đến 10^{-4} . Do một gen cho ra nhiều bản ARN và ARN cuối cùng cũng bị thoái hóa và thay thế nên lỗi ở phân tử ARN ít gây hậu quả hơn lỗi thông tin được lưu trữ vĩnh viễn trong ADN. Phản ứng tổng hợp ARN cần sự tham gia của Mg^{2+} .

3.1.2. Giai đoạn khởi đầu

ARN polymerase gắn vào các trình tự đặc hiệu trên ADN được gọi là đoạn khởi động, được nhận biết bởi yếu tố σ . Theo quy ước, trình tự của đoạn ADN được thể hiện bằng sợi mã hóa (để có cùng trình tự và cùng hướng với ARN được phiên mã). Vị trí các cặp base trên phân tử ADN kể từ nơi bắt đầu được phiên mã thành ARN và theo chiều di chuyển của ARN polymerase được đánh số dương. Vị trí các cặp base trên phân tử ADN trước nơi bắt đầu tổng hợp ARN được đánh số âm (không có vị trí 0). Vùng khởi động nằm ở -70 đến +30. Phân tích vùng khởi động người ta nhận thấy có 2 đoạn trình tự "đồng thuận" ở vùng -10 và -35 (Hình 15.17). Các trình tự này không hoàn toàn giống nhau ở tất cả các đoạn khởi động nhưng rất hay gặp những đoạn nucleotid chung ở một số vị trí. Trình tự đồng thuận ở vùng -10 là (5')TATAAT(3') (còn gọi là hộp Pribnow), ở vùng -35 là (5')TTGACA(3'). Ngoài ra, những gen được biểu hiện cao còn có yếu tố nhận biết giàu AT được gọi là yếu tố UP (upstream promoter), nằm giữa -40 và -60. Tiêu

đơn vị σ của ARN polymerase gắn vào yếu tố UP. Nucleotid đầu tiên (1^o) gắn như luôn luôn là nucleotid có base nitơ là A hay G, nằm giữa trình tự CAT hay CGT kèm bảo tồn. Thay đổi trên trình tự bảo tồn ảnh hưởng đến hiệu quả gắn ARN polymerase và sự khởi đầu phiên mã. Do đó, trình tự đoạn khởi động quy định mức độ biểu hiện cơ bản của gen và sự khác nhau giữa gen này với gen kia.



Hình 15.17. Trình tự một số đoạn khởi động trên sợi mã hóa ở *E. coli*.

Holoenzym gắn với đoạn khởi động chủ yếu ở các vùng -10 và -35, làm "chạy" (tách 2 sợi ADN) đoạn 17 bp từ giữa vùng -10 đến quá vị trí khởi đầu, tạo thành phức hợp mở. *E. coli* có 7 yếu tố σ khác nhau nhận biết một số loại trình tự đoạn khởi động trên ADN. Yếu tố σ chính có khối lượng 70 kDa, còn được gọi là σ^{70} .

ARN polymerase không cần đoạn mở để khởi đầu quá trình tổng hợp ARN. Nhóm 5'-triphosphat của nucleotid đầu tiên ở phân tử ARN mới được giữ nguyên trong suốt quá trình phiên mã.

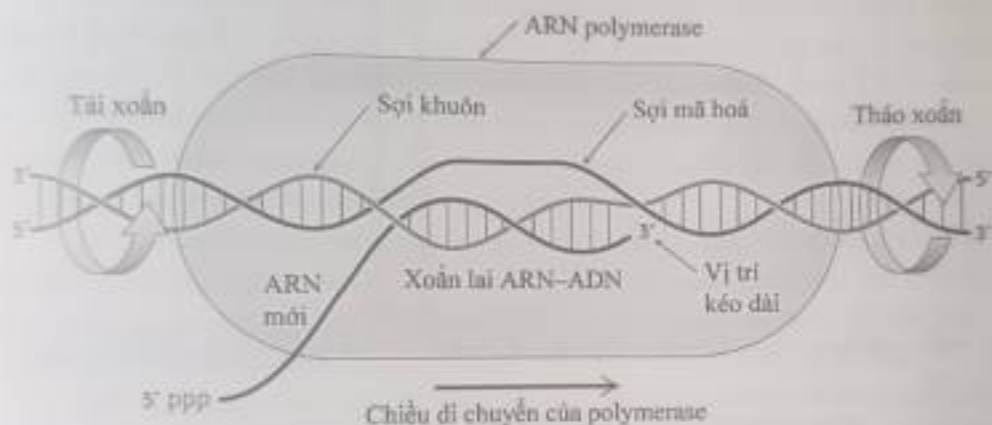
3.1.3. Giải đoạn kéo dài

Cứ mỗi đoạn kéo dài bắt đầu với sự hình thành liên kết phosphodiester đầu tiên. Sau đó, các nucleotid tiếp tục được thêm vào để kéo dài mạch ARN (Hình 15.18). Trong một số trường hợp khi thêm được 10 nucleotid, ARN polymerase giải phóng đoạn ngắn ARN và đoạn này tách khỏi ADN. Nếu vượt qua được điểm này, ARN polymerase tiếp tục gắn với sợi khuôn cho đến khi phiên mã kết thúc. ARN mới được tổng hợp tạo cấu trúc xoắn, lồi với sợi khuôn ADN, dài khoảng 8 bp (gần tương đương với một vòng

xoắn đôi) (Hình 15.19). Bong bóng phiên mã di chuyển với tốc độ 170 Å/s (17 nm/s), tương đương 50 nucleotid/s.



Hình 15.18. Kéo dài mạch ARN



Hình 15.19. Bong bóng phiên mã

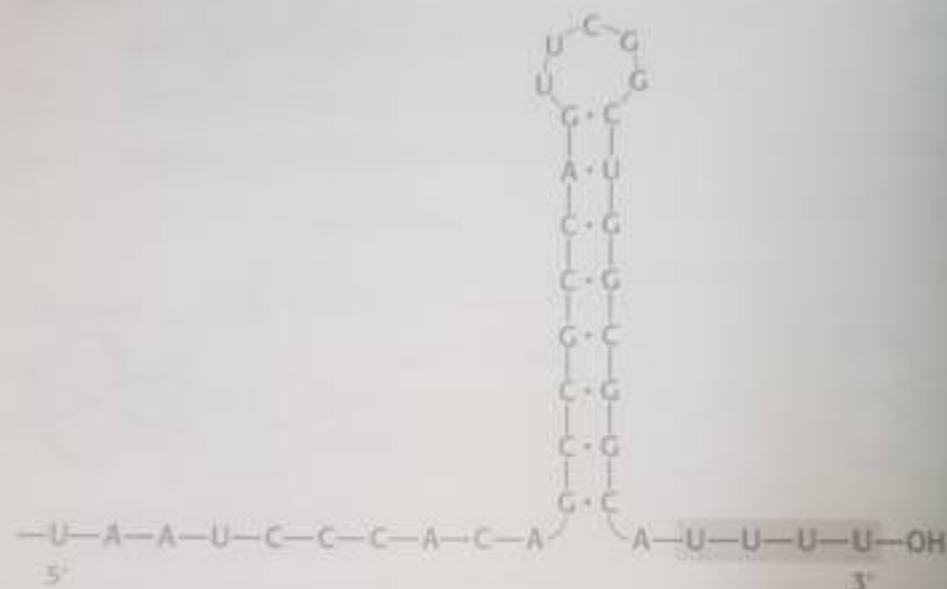
Do ADN có cấu trúc xoắn, để bong bóng phiên mã di chuyển cần phải xoay phần tử acid nucleic. Các protein gắn ADN hạn chế sự xoay của phân tử ADN; do đó, ARN polymerase di chuyển tạo các sóng siêu xoắn dương phía trước bong bóng phiên mã, và siêu xoắn âm phía sau đó.

Khi một phân tử ARN polymerase di chuyển ra khỏi đoạn khởi động, phân tử ARN polymerase khác có thể tiếp tục khởi động tổng hợp một ARN khác.

3.1.4. Giai đoạn kết thúc

E. coli có ít nhất 2 loại tín hiệu kết thúc phiên mã: phụ thuộc protein ρ và không phụ thuộc ρ . Với cơ chế không phụ thuộc ρ , phiên mã kết thúc khi gặp đoạn ADN giàu GC, tiếp theo là vùng giàu AT (4 đến 10 cặp, A trên sợi khuôn). Đoạn ARN được phiên

mã từ đoạn ADN giàu GC có các trình tự tự bổ sung, cho phép tạo cấu trúc kẹp tóc. Cấu trúc kẹp tóc này bền nhờ các cặp base G-C bền. Cấu trúc kẹp tóc hình thành khiến ARN polymerase tạm ngừng di chuyển, xoắn lại ARN-ADN có dạng rU-đA kèm bên nên cho phép sợi ARN mới tách khỏi khuôn ADN và khỏi enzym (Hình 15.20). Sợi khuôn ADN tái ghép với sợi ADN còn lại, bong bóng phiên mã đóng.



Hình 15.20. Tín hiệu kết thúc phiên mã với cấu trúc kẹp tóc-oligo(U) trên sợi ARN mới được tổng hợp

Một cơ chế kết thúc phiên mã khác cần có sự tham gia của protein ρ . Protein ρ có cấu trúc hexamer đồng nhất, nhận biết và gắn vào trình tự giàu C trên sợi ARN mới được tổng hợp, di chuyển theo chiều $5' \rightarrow 3'$ trên sợi ARN cho đến khi gặp bong bóng phiên mã đang đứng ở vị trí kết thúc (chưa rõ thành phần). Tại đó, ρ đóng vai trò là ARN-ADN helicase phụ thuộc ATP, phá vỡ cấu trúc xoắn lại ARN-ADN và giải phóng phân tử ARN.

Một số kháng sinh ức chế hoạt động phiên mã của vi khuẩn. Rifampicin ức chế giai đoạn khởi đầu của phiên mã. Actinomycin D gắn chặt và đặc hiệu vào ADN xoắn đôi, từ đó ngăn cản ADN làm khuôn cho phiên mã. Ở nồng độ thấp, actinomycin D không ảnh hưởng sự nhân đôi ADN và tổng hợp protein.

3.2. Phiên mã ở tế bào nhân thật

3.2.1. *ARN polymerase*

Cơ chế phiên mã ở nhân tế bào nhân thật phức tạp hơn nhiều so với ở vi khuẩn. Tế bào nhân thật có 3 loại ARN polymerase I, II và III. Chúng là những protein lớn, chứa 8 đến 14 tiểu đơn vị và có khối lượng tổng cộng hơn 500 kDa. ARN polymerase I có ở polymerase II có ở nhân tương, tổng hợp các tiền chất ARN_m và một số ARN chuyên biệt. ARN polymerase III cũng có ở nhân tương, tổng hợp tiền chất cho ARN_r 5S, ARN_t và một số ARN chuyên biệt khác.

Ba loại ARN polymerase gắn trên những đoạn khởi động khác nhau (Hình 15.21):

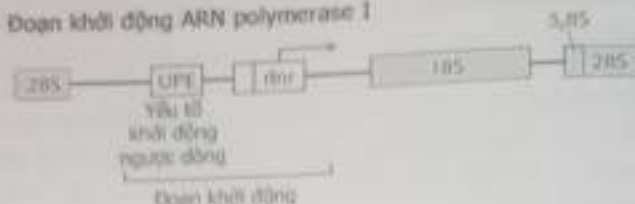
- *ARN polymerase I*: ADN chứa mã cho ribosom (ADN_r) được xếp thành hàng nằm bộ lặp đi lặp lại, mỗi bộ gồm 3 gen ARN_r. Các trình tự khởi động nằm ở từng bộ gen, gồm yếu tố khởi đầu ribosom (rInr, ribosomal initiator element) giống TATA nằm tại vị trí bắt đầu phiên mã, và yếu tố khởi động ngược dòng (UBE, upstream promoter element) nằm ngược dòng cách vị trí bắt đầu phiên mã 150 đến 200 bp. Cả hai yếu tố này gắn với các protein tiếp nhận ARN polymerase I.

- *ARN polymerase II*: Đoạn khởi động có các trình tự đồng thuận quy định vị trí bắt đầu và tiếp nhận polymerase, tương tự như ở tế bào nhân sơ. Tuy nhiên, các trình tự đồng thuận có thể kết hợp với nhau theo nhiều cách trên đoạn khởi động. Tế bào nhân thật có các yếu tố tăng cường phiên mã có thể nằm rất xa (hơn 1 kb) vị trí bắt đầu.

- *ARN polymerase III*: Đoạn khởi động nằm bên trong trình tự được phiên mã, xuôi dòng với vị trí bắt đầu. Có 2 loại đoạn khởi động. Đoạn khởi động loại I gặp ở gen ARN_r 5S chứa 2 trình tự bảo tồn ngắn gọi là khối A và khối C. Đoạn khởi động loại II gặp ở gen ARN_t chứa 2 trình tự 11 bp gọi là khối A và khối B, nằm cách mỗi đầu gen khoảng 15 bp.

ARN polymerase II được phân lập ở nấm men là một enzym lớn gồm 12 tiểu đơn vị. Tiểu đơn vị lớn nhất (RBP1) tương đồng cao với tiểu đơn vị β' của ARN polymerase của vi khuẩn. Tiểu đơn vị RPB2 (RNA polymerase B) có cấu trúc tương tự tiểu đơn vị β của vi khuẩn. Các tiểu đơn vị RPB3 và RPB11 có cấu trúc tương tự 2 tiểu đơn vị α . ARN polymerase II ở tế bào nhân thật hoạt động rất phức tạp nên cần nhiều protein tiếp xúc với các yếu tố protein khác. Ngoài ra, RPB1 có đuôi carboxyl tận (gọi là CTD, carboxyl-terminal domain) chứa trình tự đồng thuận 8 acid amin YSPSPS lặp lại nhiều lần (27 lần ở nấm men, 52 lần ở chuột và người).

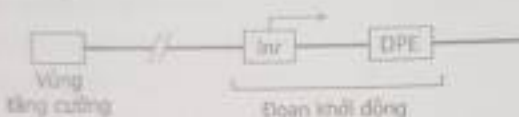
Đoạn khởi động ARN polymerase I



Đoạn khởi động ARN polymerase II



hoặc



Đoạn khởi động ARN polymerase III



Hình 15.21. Các đoạn khởi động thường gặp ở tế bào nhân thật

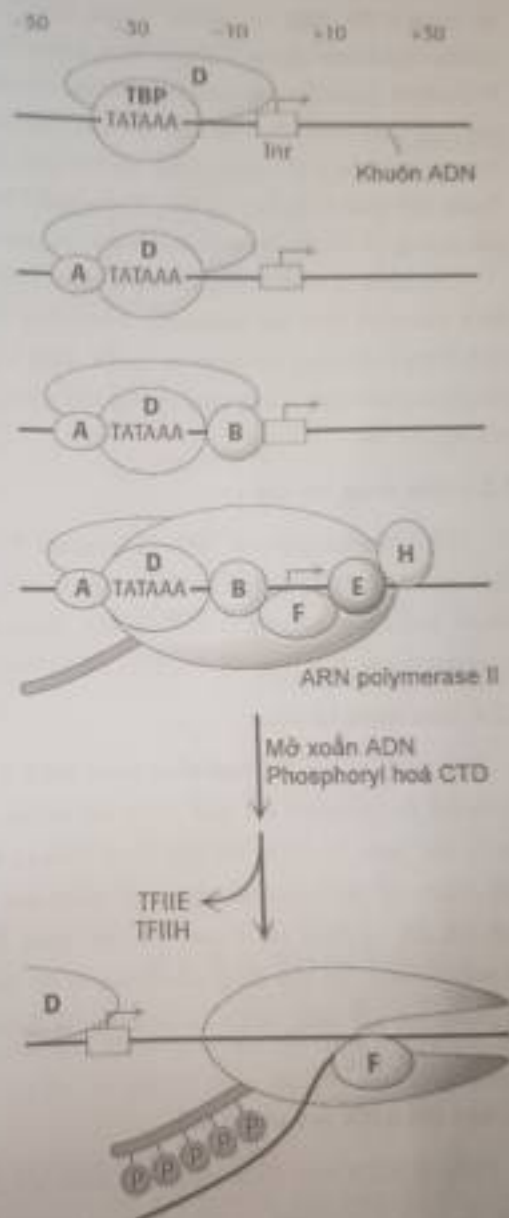
Tương tự ARN polymerase của vi khuẩn, đoạn khởi động của ARN polymerase II thường nằm ở phía 5' của vị trí bắt đầu phiên mã. Do nằm trên cùng phân tử ADN của gen được phiên mã, các trình tự này được gọi là các *yếu tố tác động cis*. Yếu tố tác động cis thường gặp nhất đối với các gen được ARN polymerase II phiên mã là *hộp TATA* (hay *hộp Hogness*) chứa trình tự đồng thuận TATAAA nằm tại vị trí giữa -30 và -100. Hộp TATA ở tế bào nhân thật gần giống với trình tự -10 (TATAAT) ở tế bào nhân sơ nhưng xa vị trí bắt đầu hơn. Hộp TATA thường đi kèm với *yếu tố khởi đầu* (I₀, initiator element) nằm ở vị trí bắt đầu phiên mã, giữa -3 và +5, có vai trò làm tăng hoạt tính phiên mã. Một yếu tố khác được gọi là *yếu tố khởi động lõi xuôi dòng* (DPE, downstream core promoter element) nằm giữa +28 và +32, thường thấy kết hợp với I₀ khi không có hộp TATA. Ngoài ra, còn có các trình tự điều hòa nằm giữa -40 và -150, như *hộp CAAT* và *hộp GC*.

Phần này chủ yếu trình bày quá trình phiên mã được thực hiện bởi ARN polymerase II.

3.2.2. Giai đoạn khởi đầu

Để khởi động quá trình phiên mã, các yếu tố phiên mã phải được gắn lên các yếu tố tác động cis. Các yếu tố phiên mã đối với ARN polymerase II được gọi chung là TFI (transcription factor), gồm các yếu tố TFIIA, TFIIIB, v.v...

Ở đoạn khởi động có hộp TATA, protein gắn hộp TATA (TBP, TATA-box-binding protein) thuộc phức hợp TFIID nhận biết và gắn lên hộp TATA. Ở đoạn khởi động ngoài hộp TATA, các protein khác của phức hợp TFIID gắn lên yếu tố thụ thể lõi, cơ chế chưa được biết rõ ràng. Sau khi TBP gắn lên hộp TATA, các yếu tố phiên mã khác lần lượt gắn vào phức hợp này (Hình 15.22). TFIIA được tiếp nhận, sau đó là TFIIIB. TFIIA giúp phức hợp TFIIIB-TBP gắn ổn định trên ADN. Tiếp theo, phức hợp TFIIIF và ARN polymerase II gắn lên phức hợp TFIIIB-TBP. TFIIIF giúp ARN polymerase II gắn lên đoạn khởi động bằng cách tương tác với TFIIIB và không gắn kết polymerase vào các vị trí không đặc hiệu trên ADN. Cuối cùng, TFIIIE và TFIIH gắn lên và tạo phức hợp đóng. TFIIH có hoạt tính helicase giúp tháo xoắn ADN gần vị trí bắt đầu ARN (quá trình này cần thủy phân ATP) và tạo phức hợp mở.



Hình 15.22. Khởi đầu phiên mã bởi ARN polymerase II

Một trong các tiểu đơn vị của TFIIF có hoạt tính kinase, phosphoryl hóa nhiều vị trí trong CTD. Một số protein kinase khác, như CDK9 (kinase phụ thuộc cyclin 9, cyclin-dependent kinase 9) thuộc phức hợp pTEFb (yếu tố kéo dài phiên mã dương tính, positive transcription elongation factor b), cũng phosphoryl hóa CTD, chủ yếu ở các gốc Ser. Quá trình này làm thay đổi cấu hình toàn bộ phức hợp và khởi đầu phiên mã. Phosphoryl hóa CTD cũng đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn kéo dài tiếp theo. Trong quá trình tổng hợp 60 đến 70 nucleotid ban đầu của ARN, TFIIE rời TFIIF được giải phóng và ARN polymerase II bước vào giai đoạn kéo dài.

Các trình tự tăng cường không có hoạt tính của đoạn khởi động nhưng có thể kích thích quá trình khởi đầu phiên mã. Vùng tăng cường là yếu tố tác động cis, có thể nằm cách đoạn khởi động vài ngàn bp ngược dòng hoặc xuôi dòng, hoặc nằm ngay bên trong gen được phiên mã. Vùng tăng cường vẫn giữ hiệu lực dù nằm trên sợi ADN khuôn hay trên sợi mã hóa.

3.2.3. Giai đoạn kéo dài

TFIIF tiếp tục gắn với ARN polymerase II trong suốt quá trình kéo dài. Trong giai đoạn này, hoạt tính polymerase được tăng cường đáng kể nhờ một số protein được gọi là yếu tố kéo dài. Các yếu tố kéo dài này, trong đó có một số yếu tố gắn vào CTD bị phosphoryl hóa, làm tăng tốc độ phiên mã và tham gia vào sửa đổi ARNm sau phiên mã.

3.2.4. Giai đoạn kết thúc

Các trình tự báo hiệu kết thúc phiên mã ở tế bào nhân thật chưa được xác định. Lý do có thể do quá trình kết thúc phiên mã không rõ ràng—cùng một gen cấu trúc có thể cho ra các phân tử ARN với đầu 3' có trình tự khác nhau. Tuy nhiên, cũng không cần thiết chấm dứt phiên mã tại một vị trí chính xác vì ARN sau phiên mã còn trải qua quá trình sửa đổi và được cắt ở các vị trí đặc hiệu. Endonuclease có thể hoạt động ngay cả khi polymerase vẫn còn đang phiên mã, từ đó báo hiệu polymerase dừng phiên mã. Sau khi phiên mã kết thúc, ARN polymerase II được khử phosphoryl và tái sử dụng trong lần phiên mã khác.

3.3. Sửa đổi ARN sau phiên mã

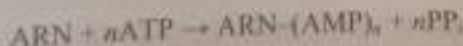
Phân tử ARN mới được tổng hợp được gọi là bản phiên mã sơ cấp. Phần nhiều các phân tử ARN ở vi khuẩn và gần như mọi phân tử ARN ở tế bào nhân thật đều được sửa đổi sau tổng hợp. Một số enzym xúc tác các phản ứng này có cấu tạo từ ARN (ribozym).

3.3.1. Gắn mũ ở đầu 5'

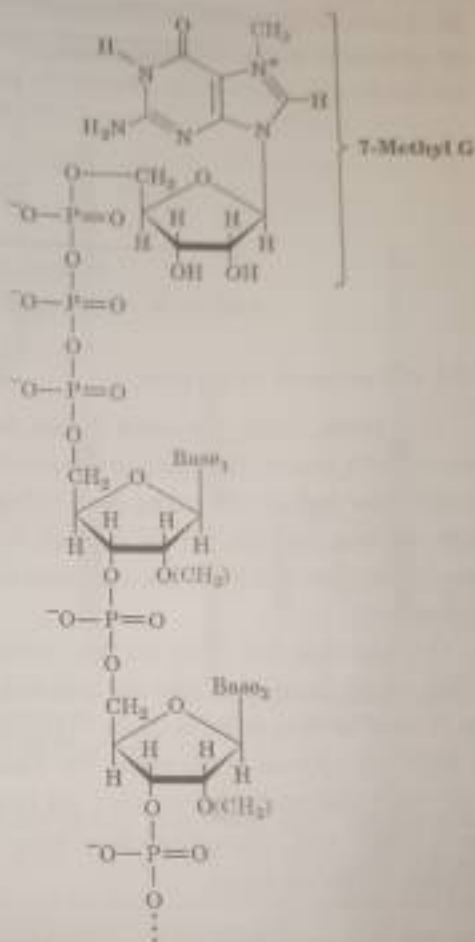
Hầu hết ARNm tế bào nhân thật có mũ ở đầu 5'. Nhóm phosphat đầu tiên ở đầu 5' bị cắt bỏ bởi phosphohydrolase (Hình 15.23). Guanylyltransferase gắn GMP (lấy từ GTP và giải phóng PP_i) vào đầu 5' tạo liên kết 5',5'-triphosphat. Guanin-7-methyltransferase chuyển nhóm methyl từ S-adenosylmethionin (SAM) vào guanin. Các nucleotid thứ nhất và thứ hai của bản phiên mã cũng có thể được O²-methyl hóa bởi 2'-O-methyltransferase (nhóm methyl cũng lấy từ SAM). Mũ 5' bảo vệ ARNm khỏi ribonuclease. Nó cũng gắn vào phức hợp protein gắn mũ và tham gia quá trình gắn ARNm vào ribosom để khởi động giải mã. ARNm được gắn mũ ở giai đoạn rất sớm trong phiên mã (sau 20 đến 30 nucleotid). Các enzym gắn mũ liên kết với CTD của ARN polymerase II.

3.3.2. Gắn đuôi poly(A) ở đầu 3'

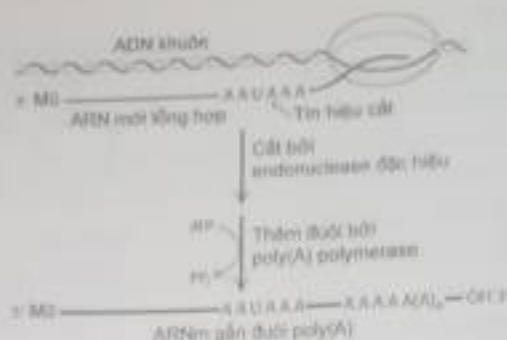
Hầu hết các ARNm tế bào nhân thật có chuỗi 80 đến 250 A ở đầu 3', tạo đuôi poly(A) (Hình 15.24). Endonuclease đặc hiệu, liên kết với CTD của ARN polymerase II, nhận biết trình tự (5')AAUAAA(3'). Các trình tự 10 đến 30 nucleotid trước và 20 đến 40 nucleotid sau đó cũng có vai trò tạo tín hiệu cắt. Phân ứng cắt giải phóng nhóm 3'-hydroxyl tự do, và gắn A ngay lập tức nhờ polyadenylat polymerase:



Đuôi poly(A) đóng vai trò là vị trí gắn cho các protein đặc hiệu, từ đó bảo vệ ARNm khỏi sự phá hủy của enzym. Nhiều vi khuẩn cũng có đuôi poly(A), nhưng lại có vai trò kích hoạt phân hủy hơn là bảo vệ ARN.



Hình 15.23. Gắn mũ ở đầu 5'.

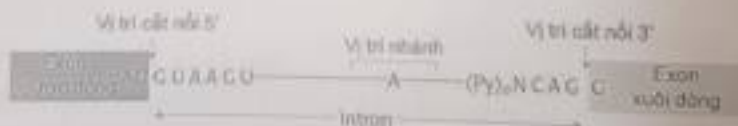


Hình 15.24. Polyadenyl hóa bản phiên mã sơ cấp.

3.3.3. Cắt bỏ intron và nối exon

Ở vi khuẩn, chuỗi polypeptid thường được mã hóa bởi trình tự nucleotid liên tục trên sợi ADN khuôn. Tuy nhiên, ở tế bào nhân thật, trình tự mã hóa (*exon*) của hầu hết các gen nằm xen kẽ với những đoạn không mã hóa (*intron*). Intron trên ADN được phiên mã cùng với phần còn lại của gen. Sau đó, các intron trên bản phiên mã sơ cấp (pre-ARNm) được cắt bỏ và các exon được nối lại tạo thành phân tử ARN trưởng thành, có chức năng.

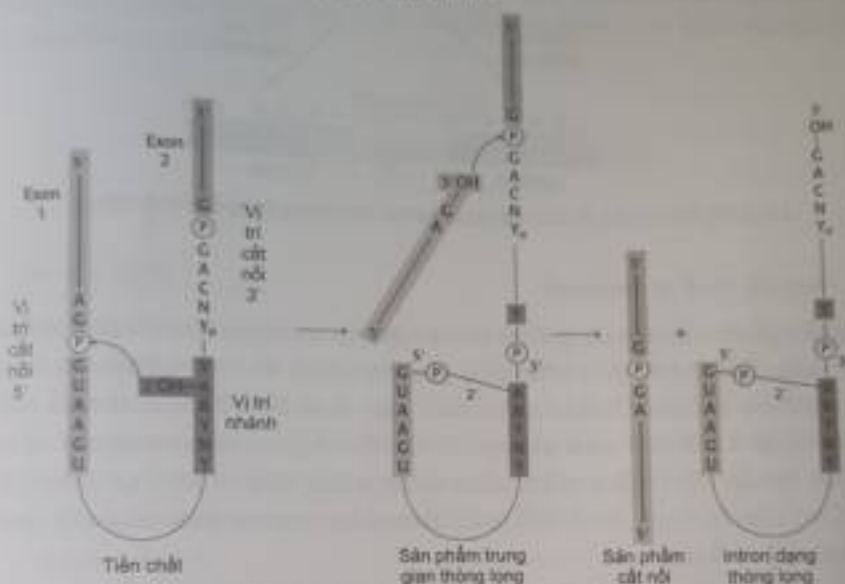
Ở tế bào nhân thật, intron bắt đầu với GU và kết thúc với AG. Trình tự đồng thuận ở động vật có xương sống phía đầu 5' là AGGUAAGU, trong đó GU không thay đổi. Ở đầu 3', trình tự đồng thuận là chuỗi 10 pyrimidin (U hoặc C), tiếp theo là 1 base bất kỳ rồi đến C, và kết thúc là AG không đổi. Khoảng 30 đến 50 nucleotid ngược dòng từ vị trí cắt nối 3' của intron có một vùng gọi là vị trí nhánh, có trình tự đồng thuận ở nấm men là UACUAAC, nhưng thay đổi ở động vật có vú. Đoạn intron thường có chiều dài từ 50 đến 10.000 nucleotid.



Hình 15.25. Các vị trí cắt nối 5' và 3'.

Cắt nối ARN là quá trình phức tạp cần sự tham gia của một số ARN nhỏ và protein tạo thành phức hợp lớn gọi là spliceosome. Cơ chế hóa học gồm 2 phản ứng chuyển ester xảy ra liên tiếp (Hình 15.26). Đầu tiên, 2'-OH của adenylat ở vị trí nhánh tấn công vào liên kết phosphodiester giữa exon ngược dòng (exon 1) và đầu 5' của intron, cắt đứt liên kết này và tạo liên kết 2',5'-phosphodiester giữa A và đầu 5' của intron. Do đó, một

nhánh phát sinh tại vị trí adenylat này và tạo sản phẩm trung gian thông lọng. Tiếp theo, đầu 3'-OH của exon 1 tấn công vào liên kết phosphodiester giữa intron và exon 2, cắt đứt liên kết này và nối exon 1 vào exon 2. Intron được giải phóng ở dạng thông lọng. Số bước này được giữ nguyên, nhờ đó phản ứng cắt nối xảy ra mà không cần nguồn năng lượng ATP hay GTP.

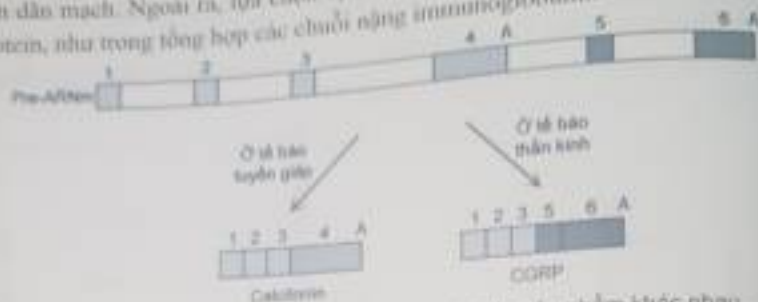


Hình 15.26. Cơ chế cắt nối pre-ARNm.

Nhân tế bào chứa nhiều loại phân tử ARN nhỏ có kích thước dưới 300 nucleotid, gọi là ARNsn (small nuclear RNA). Trong số đó, U1, U2, U4, U5 và U6 cần thiết cho quá trình cắt nối pre-ARNm. Những ARNsn này tạo phức hợp với các protein đặc hiệu, gọi là RNPsn (small nuclear ribonucleoprotein particle). Các spliceosom là tổ hợp gồm các RNPsn, hàng trăm yếu tố cắt nối và phân tử pre-ARNm. Các phân tử ARNsn đóng vai trò chính trong hướng dẫn sắp xếp vị trí cắt nối (nhờ tạo thành các cặp base với vị trí cắt nối) và tiến hành xúc tác. Các helicase sử dụng ATP để tháo xoắn sản phẩm trung gian ARN kép, từ đó hỗ trợ xúc tác và giải phóng RNPsn khỏi ARNm. Một phần của bộ máy cắt nối liên kết với CTD của ARN polymerase II.

Hầu hết các pre-ARNm ở người có thể được cắt nối ở các vị trí khác nhau để tạo các sản phẩm protein khác nhau, từ đó làm tăng tính phong phú của protein. Calcitonin và CGRP (calcitonin-gene-related peptide) đều được mã hóa bởi cùng một gen (Hình 15.27). Ở tuyến giáp, exon 4 được giữ lại và tạo calcitonin, một hormon điều hòa

chuyển hóa calci và phospho. Ở tế bào thần kinh, exon 4 bị loại bỏ và tạo CGRP, một hormon dẫn mạch. Ngoài ra, lựa chọn vị trí poly(A) cũng góp phần tạo tính phong phú của protein, như trong tổng hợp các chuỗi nặng immunoglobulin.



Hình 15.27. Các nối ở các vị trí khác nhau cho các sản phẩm khác nhau.

3.3.4. Thay đổi trình tự nucleotid

Apolipoprotein B (apo B), giữ vai trò vận chuyển triacylglycerol và cholesterol, tồn tại ở 2 dạng: apo B-100 (512 kDa, có ở gan) và apo B-48 (240 kDa, có ở ruột non, không gắn được thụ thể LDL ở bề mặt tế bào). Apo B-48 chứa 2.152 acid amin phía đầu N trên tổng số 4.536 acid amin của apo B-100. Cơ chế của hiện tượng này là do sự phiên mã, cytidin của ARNr bị khử amin thành uridin, khiến codon tại vị trí 2.153 từ CAA (Gln) chuyển thành UAA (kết thúc). Deaminase xúc tác phản ứng này có ở ruột non mà không có ở gan.

3.3.5. Sửa đổi ARNr

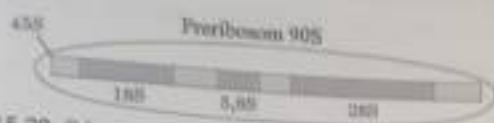
Ở vi khuẩn, các ARNr 16S, 23S và 5S (và một số ARNr) có nguồn gốc từ tiền chất duy nhất là ARN 30S, gồm khoảng 6.500 nucleotid. Các ARNr ở 2 đầu và giữa các ARNr được cắt bỏ trong quá trình sửa đổi. Một số nucleosid trên ARNr 16S và 23S cũng được sửa đổi (tạo pseudouridin, dihydrouridin, methyl hóa).



Hình 15.28. Bản phiên mã sơ cấp pre-ARNr (30S) ở vi khuẩn.

Ở tế bào nhân thật, ARN polymerase I tổng hợp bản phiên mã pre-ARNr 45S mã hóa 3 ARN cấu thành của ribosom, gồm ARNr 18S, 28S và 5.8S. Trong quá trình phiên mã, pre-ARNr 45S được tích hợp vào phức hợp preribosom 90S ở hạch nhân. Trước khi

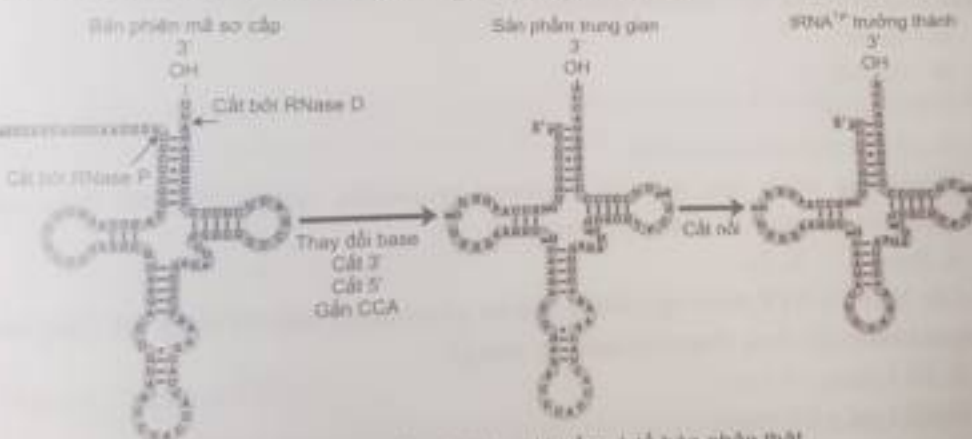
được cắt thành các ARNr, tiền chất 45S trải qua một số thay đổi trên cả ribose và base ribonucleoprotein hạch nhân nhỏ (RNP_{sno}, small nucleolar RNP) chứa một ARNsno và gia cấu tạo tiểu đơn vị nhỏ của ribosom cần được cắt nối. ARN 18S tham gia cấu tạo tiểu đơn vị nhỏ của ribosom (40S). Các ARN 28S, 5.8S và 5S (từ bản phiên xảy ra phần lớn ở hạch nhân.



Hình 15.29. Bản phiên mã sơ cấp pre-ARNr ở tế bào nhân thật.

3.3.6. Sửa đổi ARNr

ARNr ở tế bào nhân sơ và tế bào nhân thật được cắt đầu 5' bởi RNase P (endonuclease chứa protein và ARN, trong đó ARN cần thiết cho hoạt tính), đầu 3' được cắt bởi RNase D (exonuclease), và CCA được gắn vào đầu 3' bởi ARNr nucleotidyltransferase (Hình 15.30). ARNr tế bào nhân thật còn được thay đổi đáng kể trên các base và ribose để trở thành dạng hoạt động. Nhiều pre-ARNr tế bào nhân thật cần được cắt nối bởi endonuclease và ligase để loại bỏ intron.



Hình 15.30. Sửa đổi ARNr ở vi khuẩn và tế bào nhân thật.

3.3.7. Sửa đổi các ARN có chức năng đặc biệt

ARN_{sn} và ARN_{sno} được tổng hợp ở dạng tiền chất lớn hơn. Nhiều ARN_{sno} được mã hóa bên trong intron của các gen khác. Khi intron được cắt khỏi ARNm, RNP_{sno} gắn vào trình tự ARN_{sno} và các ribonuclease cắt bỏ ARN thừa ở các đầu 5' và 3'.

ARNs được ARN polymerase II tổng hợp ở dạng pre-ARNs, sau đó ribonuclease cắt bỏ ARN thừa ở mỗi đầu. Một số nucleosid trên ARNs cũng được sửa đổi như G^{γ} , methyl hóa, chuyển uridin thành pseudouridin.

Micro ARN (ARNmi) là loại ARN đặc biệt tham gia điều hòa gen. Chúng là các ARN không mã hóa, dài khoảng 22 nucleotid, có trình tự bổ sung với một vùng nào đó của ARNm. ARNmi điều hòa chức năng ARNm bằng cách cắt ARNm hoặc ức chế giải mã. ARNmi được tổng hợp từ các tiền chất lớn hơn. Bản phiên mã sơ cấp cho ARNmi (pri-ARNmi) có kích thước thay đổi, đôi khi được mã hóa trong intron của gen khác và được biểu hiện cùng với các gen này.

3.4. Thoái hóa ARN

Tốc độ thoái hóa ARN giúp tế bào kiểm soát sự biểu hiện gen. Đối với các sản phẩm gen chỉ cần ngắn hạn, thời gian bán hủy của ARNm có thể chỉ vài phút hay vài giây. Con các sản phẩm gen cần liên tục thì có ARNm ổn định qua nhiều thế hệ tế bào. Thời gian bán hủy trung bình của ARNm ở động vật có xương sống là 3 giờ, ở vi khuẩn là 1,5 phút. Quá trình thoái hóa ARNm được thực hiện bởi các ribonuclease có ở mọi tế bào.

CÂU HỎI TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Quá trình tổng hợp mới nucleotid purin, chất nào sau đây cung cấp nguyên tử nitơ ở vị trí N3 và N9 của nhân purin?
A. Glycin
B. Aspartat
C. Glutamin
D. N10 formyl tetrahydrofolat
2. Trong quá trình tổng hợp các nucleotid pyrimidin, vòng pyrimidin được tạo thành trước khi gắn với ribose-5-phosphat?
A. Đúng B. Sai
3. Các NDP và NTP được tạo thành nhờ sự phosphoryl hóa (1) dưới tác dụng của enzym kinase (2). Lựa chọn nào sau đây đúng?
A. Vế 1 đúng, vế 2 sai
B. Vế 1 sai, vế 2 đúng
C. Cả 2 đều đúng
D. Cả 2 đều sai
4. Sản phẩm chính của sự thoái hóa base adenin và guanin ở người là gì?
A. Alantoin C. Acid uric
B. Urê D. Amoniac

5. Câu nào sau đây đúng về β -alanin và β -aminoisobutyrate?
- Chúng là sản phẩm của quá trình dị hóa nucleotid purin
 - Chúng là sản phẩm của quá trình dị hóa nucleotid pyrimidin
 - Chúng là chất trung gian trong quá trình tổng hợp nucleotid purin
 - Chúng là chất trung gian trong quá trình tổng hợp nucleotid pyrimidin
6. Trong quá trình nhân đôi ADN ở *E. coli*, enzym nào sau đây có tác dụng xúc tác sự tạo thành đoạn ARN mới?
- ARN polymerase
 - ADN polymerase
 - Primase
 - A và C đúng
7. Enzym nào sau đây là enzym nhân đôi ADN chính ở *E. coli*?
- ADN polymerase I
 - ADN polymerase II
 - ADN polymerase III
 - ADN polymerase IV
8. Về tổng hợp ARN, câu nào sau đây SAI?
- Dựa trên khuôn là một sợi ADN có sẵn
 - Có ARN polymerase xúc tác
 - Dựa vào nguyên lý bổ sung đôi base
 - Xảy ra theo chiều $3' \rightarrow 5'$
9. Tế bào nhân thật có bao nhiêu loại ARN polymerase?
- 1
 - 2
 - 3
 - 4
10. Ở tế bào nhân thật, các tiền ARNt có thể trải qua một số điều chỉnh để chuyển thành ARNt trưởng thành. Câu nào sau đây SAI?
- Cắt một chuỗi ở đầu $5'$
 - Cắt nối loại bỏ intron
 - Thay thế UU ở đầu $3'$ bằng CCA
 - Cắt nối loại bỏ exon

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ môn Hóa sinh (Đại học Y Dược TPHCM). Hóa sinh y học. NXB Y học 2008
- Murray RK (2009), Harper's Illustrated Biochemistry, New York: McGraw-Hill.
- Nelson DL & Cox MM (2008), Lehninger Principles of Biochemistry, New York: W.H. Freeman and Company.