

CHƯƠNG VI.

**SỰ PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI GIAI ĐOẠN SỚM:
NHỮNG VẤN ĐỀ VỀ DI TRUYỀN VÀ THƯỢNG DI TRUYỀN**

Bài 1.**SỰ PHÁT TRIỂN PHÔI GIAI ĐOẠN SỚM: VẤN ĐỀ THUỘC DI TRUYỀN**

Bùi Võ Minh Hoàng

© Bộ môn Phụ Sản, Khoa Y, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Bộ môn Mô Phôi - Di truyền, e-mail: bvminhhoang@ump.edu.vn.

Mục tiêu bài giảng

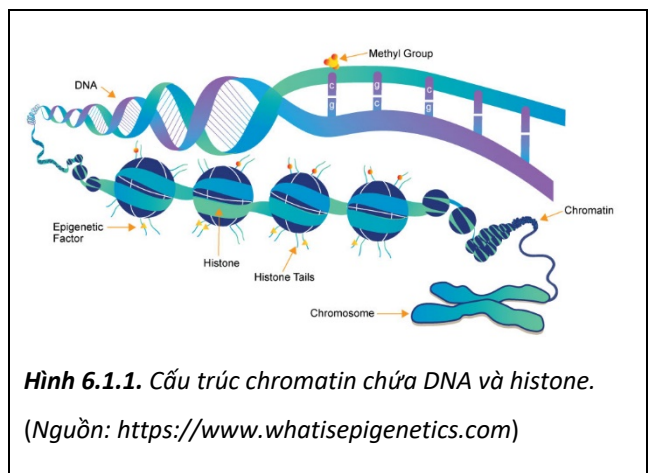
1. Trình bày các cơ chế tác động của thuộc di truyền.
2. Trình bày sự tác động của thuộc di truyền lên sự phát triển phôi ở giai đoạn phôi tiền làm tổ.

1. CÁC CƠ CHẾ TÁC ĐỘNG CỦA THUỘC DI TRUYỀN

Thuộc di truyền (epigenetics) là khoa học nghiên cứu những thay đổi trong biểu hiện gene và những chức năng khác của gene, những thay đổi này có thể di truyền được nhưng không liên quan đến trình tự của DNA.

Hầu hết các tế bào trong cơ thể đều cùng chia sẻ vật liệu di truyền được mã hóa từ trình tự DNA, nhưng lại khác biệt về hình thái và chức năng. Quá trình tạo ra những khác biệt này được gọi là thuộc di truyền. Các biến đổi thuộc di truyền phân bố ở các vùng chuyên biệt của DNA nhằm thu hút hoặc né tránh các protein kích hoạt gene. Nhờ vậy những biến đổi này dần dần hình thành nên những khuôn mẫu điển hình cho vùng DNA hoạt động và vùng DNA bất hoạt ở mỗi loại tế bào. Ngoài ra, trái ngược với trình tự cố định của chuỗi DNA, những ghi dấu thuộc di truyền có thể thay đổi trong suốt cuộc đời để đáp ứng với môi trường hoặc lối sống của mỗi cá thể. Những biến đổi thuộc di truyền trong một số trường hợp có thể truyền lại cho thế hệ sau.

Thuộc di truyền có nhiều cơ chế phân tử khác nhau có thể làm thay đổi hình thái hoặc chức năng của một tế bào hay của một sinh vật mà không làm thay đổi trình tự DNA của tế bào hay sinh vật đó. Các cơ chế phân tử này bao gồm methyl hóa DNA, các biến đổi histone và những phân tử RNA không mã hóa.

**Hình 6.1.1. Cấu trúc chromatin chứa DNA và histone.**(Nguồn: <https://www.whatisepigenetics.com>)**1.1. Methyl hóa DNA**

Sự methyl hóa DNA xảy ra khi những nhóm methyl được gắn thêm vào phân tử DNA. Quá trình này có thể làm thay đổi hoạt động của một phần DNA mà không làm thay đổi trình tự. Khi sự methyl hóa DNA xảy ra ở vùng khởi động gene (gene promoter) sẽ gây ức chế quá trình phiên mã. Sự methyl hóa DNA là cần thiết cho sự phát triển bình thường ở các loài động vật có vú và thường gắn liền với một số tiến trình quan trọng như in dấu hệ gene (genomic imprinting), bất hoạt nhiễm sắc thể X, sự lão hóa và sự sinh ung.

Sự methyl hóa xảy ra chủ yếu trên cytosine trong dinucleotide CG, hay còn gọi là CpG (5'-C-phosphate-G-3'), với ba pha: thiết lập (de novo), duy trì và khử methyl hóa.

1.1.1. De novo methyl hóa DNA

Methyl hóa cytosine xảy ra do tương tác giữa các DNA methyltransferases (DNMT3A, DNMT3B và DNMT3L) chuyển nhóm methyl của S-adenosyl-L-methionine sang vị trí carbon số 5 trên vòng pyrimidine của cytosine trong dinucleotide CpG để hình thành 5-methylcytosine (5mC).

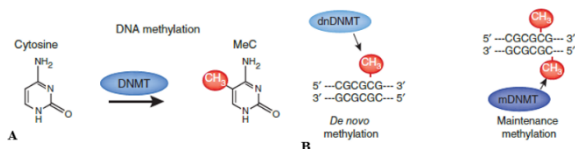
Trong chuỗi DNA người, chỉ khoảng 1,5% DNA có sự hiện diện của 5mC. Ở các tế bào sinh dưỡng, 5mC hầu như ở các dinucleotide CpG, ngoại trừ ở các tế bào mầm sinh dục có thể ghi nhận 5mC hiện diện ở các dinucleotide không phải CpG.

Sự methyl hóa có thể ảnh hưởng đến quá trình phiên mã của gene do ức chế sự gắn thêm các protein phiên mã vào gene, hoặc do gắn thêm nhóm protein methyl-CpG-binding domain (MBD), các MBD thu hút các protein khác như các enzyme khử acetyl của histone hay những protein tái cấu trúc chất nhiễm sắc (chromatin remodeling) gây ra biến đổi histone, hậu quả hình thành nên chất nhiễm sắc bất hoạt.

Hầu hết các vị trí CpG của chuỗi DNA đều bị methyl hóa, ngoại trừ các đảo CpG (vùng DNA dài hơn 200 bp và có dinucleotide CpG chiếm hơn 50%) trong các mô dòng mầm và các đảo CpG gần vùng khởi động gene ở các tế bào sinh dưỡng vẫn chưa bị methyl hóa. Điều này giúp cho biểu hiện gene vẫn bình thường. Chỉ khi đảo CpG gần vùng khởi động gene bị methyl hóa sẽ làm gián đoạn biểu hiện gene.

1.1.2. Duy trì methyl hóa DNA

Khác với DNMT3A và DNMT3B có vai trò trong de novo methyl hóa DNA, DNMT1 chỉ thực hiện methyl hóa trên DNA có 1 mạch đơn đã được methyl hóa. DNMT1 định vị ở chẻ ba sao chép DNA (replication fork) để gắn vào DNA mới tổng hợp và tiến hành methyl hóa y như kiểu methyl hóa trên bản DNA gốc trước khi hoàn tất nhân bản DNA. Ngoài ra DNMT1 cũng có khả năng sửa chữa lỗi trong quá trình methyl hóa DNA. Như vậy DNMT1 giúp duy trì kiểu methyl hóa DNA trong một dòng tế bào.



Hình 6.1.2. Sự methyl hóa DNA.
A. Methyl hóa DNA xảy ra ở base cytosine. **B.** Hai loại DNMTs trong methyl hóa DNA (Nguồn: Day JJ và cộng sự, 2010)

1.1.3. Khử methyl hóa DNA

Tiến trình loại nhóm methyl khỏi DNA là cần thiết cho quá trình khởi tạo thượng di truyền của gene và cũng trực

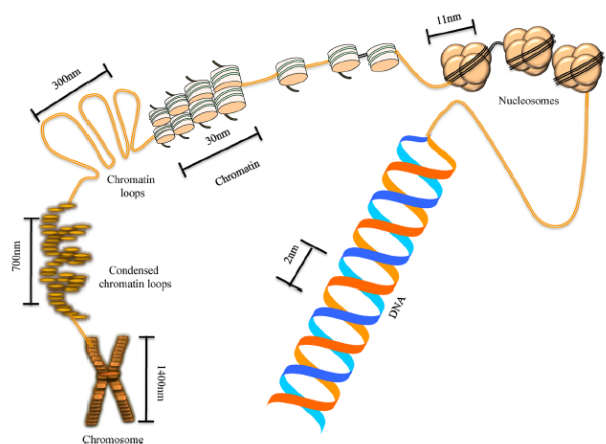
tiếp liên quan đến nhiều cơ chế bệnh sinh quan trọng như trong tiến triển của khối u.

Khử methyl hóa có thể chủ động hay thụ động, hoặc kết hợp cả hai. Khử methyl hóa DNA thụ động diễn ra ở những tế bào đang phân chia. Ở những tế bào này, DNMT1 đóng vai trò duy trì methyl hóa DNA trong quá trình nhân bản DNA. Khi DNMT1 bị ức chế hoặc bị mất chức năng sẽ dẫn đến các cytosine mới chưa được methyl hóa tích hợp vào chuỗi DNA mới tổng hợp. Kết quả sẽ dẫn đến giảm lượng CpG được methyl hóa ở những lần phân bào sau.

Khử methyl hóa DNA chủ động có thể ở cả tế bào đang phân chia cũng như tế bào không phân chia, và để khử methyl cần những phản ứng enzyme của các protein TET để chuyển 5mC trở lại dạng cytosine nguyên bản.

1.2. Các biến đổi histone

Ở các tế bào có nhân, chuỗi DNA được đóng gói vào chất nhiễm sắc trong nhân. Nucleosome (đơn vị cấu tạo cơ bản của chất nhiễm sắc) bao gồm một đoạn DNA (147 bp) quấn hai lần quanh một bộ tám protein histone (hai phiên bản của mỗi loại H2A, H2B, H3 và H4). Các đầu N tận cùng của các protein histone vẫn còn ở ngoài nucleosome, và đây sẽ là những phần được biến đổi sau dịch mã. Hai nucleosome sẽ được nối với nhau bởi một đoạn DNA 20 bp qua tương tác với protein histone H1.



Hình 6.1.3. Nhiễm sắc thể cấu tạo từ DNA quấn quanh các histone (Nguồn: Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling, 2017)

Các biến đổi histone bao gồm acetyl hóa, methyl hóa, phosphoryl hóa, ubiquitination, SUMOylation và ADP-ribosylation. Các biến đổi histone không hoạt động đơn lẻ mà tương tác với nhau và với những cơ chế khác như methyl hóa DNA và những phân tử RNA không mã hóa.

Trong các loại biến đổi histone đã được mô tả, acetyl hóa và methyl hóa là những biến đổi đã được nghiên cứu nhiều và có liên quan về chức năng với điều hòa biểu hiện gene và cấu trúc chất nhiễm sắc.

1.2.1. Acetyl hóa histone

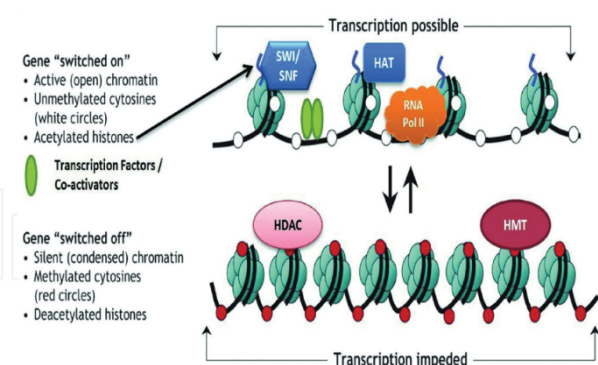
Acetyl hóa histone xảy ra ở vị trí của lysine trên phần đuôi N của histone. Việc thêm nhóm acetyl vào lysine làm mất đặc tính tích điện dương của lysine, qua đó làm lỏng liên kết giữa histone và DNA. Kết quả là DNA dễ được các yếu tố phiên mã tiếp cận và tăng hoạt động phiên mã. Ngược lại, loại nhóm acetyl khỏi lysine sẽ tăng cường liên kết giữa histone và DNA, dẫn đến ức chế hoạt động phiên mã.

Acetyl hóa và khử acetyl hóa histone được duy trì cân bằng bởi các nhóm enzyme histone acetyl transferases (HATs) và histone deacetylases (HDACs).

1.2.2. Methyl hóa histone

Methyl hóa histone xảy ra ở vị trí của lysine và arginine.

Methyl hóa histone có thể làm hoạt hóa gene hoặc ức chế gene tùy vào vị trí và mức độ methyl hóa trên nhóm amino của lysine (đơn, đôi hay tam), arginine (đơn hay đôi). Khác với acetyl hóa histone, methyl hóa không thay đổi tính tích điện của histone mà đóng vai trò thu hút các yếu tố hoạt hóa gene, ức chế gene hay điều hòa chất nhiễm sắc đến gắn vào bề mặt chất nhiễm sắc.



Hình 6.1.4. Hoạt động của gene được điều khiển qua trạng thái “đóng-mở” của chất nhiễm sắc (Nguồn: DNA repair, 2019)

1.3. Những phân tử RNA không mã hóa

Đây là những phân tử RNA chức năng được phiên mã từ DNA nhưng không dịch mã thành protein. Do vậy, các phân tử RNA không mã hóa chỉ đóng vai trò điều hòa biểu hiện gene ở mức độ phiên mã và hậu phiên mã.

Những phân tử RNA không mã hóa được xem như những yếu tố thượng di truyền có thể được chia thành hai nhóm chính: nhóm phân tử RNA không mã hóa có kích thước ngắn (< 30 nucleotides) và nhóm có kích thước dài (lncRNA, > 200 nts). Cả hai nhóm đều có vai trò trong hình thành vùng dị nhiễm sắc chất, biến đổi histone, methyl hóa DNA và ức chế gene.

Những phân tử RNA không mã hóa có kích thước ngắn gồm có 3 nhóm chính: microRNAs (miRNAs), RNA can thiệp kích thước ngắn (siRNAs), RNA kích thước ngắn tương tác protein piwi (piRNAs).

1.3.1. miRNAs

miRNAs là những phân tử RNA không mã hóa có kích thước khoảng 22 nucleotides, được hình thành từ các tiền miRNA đã được phiên mã từ DNA bởi RNA polymerase II. Các miRNAs kiểm soát biểu hiện của những gene mã hóa protein bằng cách làm mất chức năng của RNA thông tin (mRNA) hoặc cản trở dịch mã. Mỗi miRNAs có thể chi phối nhiều mRNA, qua đó có thể điều hòa lên đến 30% gene mã hóa protein và định dạng sự tạo protein từ hàng trăm đến hàng nghìn gene.

1.3.2. siRNAs

siRNAs cũng có chức năng tương tự miRNAs gây ngăn cản sau phiên mã bằng việc làm mất chức năng mRNA. Ngoài ra, siRNAs tham gia hình thành vùng dị nhiễm sắc chất bằng gắn với phức hợp RITS thúc đẩy methyl hóa histone H3 ở vị trí lysine K9 (H3K9) và cô đặc chất nhiễm sắc.

1.3.3. piRNAs

piRNAs là những phân tử RNA tương tác với các protein piwi. piRNAs chủ yếu liên quan đến điều hòa chất nhiễm sắc và ức chế các hoạt động chuyển vị trong các tế bào sinh dưỡng và tế bào mầm.

2. lncRNAs

Tương tự như các gene mã hóa protein, hầu hết lncRNAs cũng được phiên mã bởi RNA polymerase II, gắn mũ ở đầu 5' và bổ sung chuỗi poly A vào đầu 3'. Các lncRNAs đóng vai trò quan trọng nhiều chức năng tế bào khác nhau như đóng gói chất nhiễm sắc, biểu hiện gene, điều hòa gene, tăng trưởng, chuyển hóa, biệt hóa và phát triển. Với những tiến bộ công nghệ về microarray và phân tích trình tự RNA, càng nhiều lncRNAs tiếp tục được phát hiện, tuy nhiên chức năng chuyên biệt cho mỗi lncRNAs vẫn cần được nghiên cứu thêm.

3. VAI TRÒ CỦA THƯỢNG DI TRUYỀN TRONG SỰ PHÁT TRIỂN PHÔI Ở GIAI ĐOẠN TIỀN LÀM TỔ

Tinh trùng và noãn trưởng thành cần những yếu tố thượng di truyền chuyên biệt và khác nhau trong sự hình thành giao tử. Bên cạnh việc in dấu hệ gene, ở tinh trùng còn có sự thay thế các histone bởi protamine (những protein cần thiết cho quá trình cô đặc chất liệu di truyền ở đầu tinh trùng và ổn định DNA), trái lại ở noãn mức độ methyl hóa histone H3 ở vị trí lysine K4 với 3 nhóm amino (H3K4me3) có thể cao hơn vì noãn đã tiến hành giảm phân. Những in dấu hệ gene từ bố mẹ trong quá trình sinh giao tử vẫn được giữ lại trong giao tử cũng như những dấu ấn khác. Tuy nhiên, một số dấu ấn sẽ được lập trình lại để đáp ứng nhu cầu hình thành các tế bào tổng năng. Để đáp ứng nhu cầu phát triển, các dấu ấn thượng di truyền cũng được lập trình lại để giúp phôi thực hiện những biệt hóa.

3.1. Methyl hóa DNA

Sau thụ tinh, trong phôi bào có sự hình thành tiền nhân đực và tiền nhân cái. Sự khử methyl hóa DNA chủ động sẽ diễn ra ở tiền nhân đực, và sau đó sẽ diễn ra sự khử methyl hóa DNA thụ động ở những giai đoạn phân cắt phôi tiếp theo. Phôi sẽ thực hiện quá trình biệt hóa đầu tiên với de novo methyl hóa DNA, nhằm đảm bảo ức chế các gene liên quan đến việc duy trì tính vạn năng. Mức độ methyl hóa DNA ở khối tế bào bên trong (ICM) của phôi nang cao hơn những tế bào ngoại bì lá nuôi. Điều này dẫn đến những biệt hóa khác nhau: các ICM sẽ biệt hóa thành những dòng tế bào sinh dưỡng, còn các tế bào ngoại bì lá nuôi sẽ hình thành bánh nhau.

Methyl hóa DNA là một sự kiện quan trọng và không thể thay thế trong giai đoạn tiền làm tổ. Quá trình methyl hóa DNA thực hiện những thay đổi tổng thể và cả những thay đổi đặc hiệu cho từng vùng. Đặc biệt, những tế bào biệt hóa trong cùng 1 phôi không cùng một phương thức biểu hiện của những gene liên quan đến quá trình methyl hóa. Điều này cho thấy tầm quan trọng của cấu trúc dữ liệu đặc hiệu từng tế bào đơn lẻ so với cấu trúc dữ liệu của toàn thể phôi.

3.2. Biến đổi histone

Sau khi thụ tinh, tiền nhân cái hình thành và có những biến đổi histone gồm acetyl hóa lysine ở đuôi histone H4 (H4ac), methyl hóa lysine ở các đuôi histone H3 và H4 như H3K4me, H3K9me2/3, H3K27me1, H4K20me3.

Những biến đổi histone này được ghi nhận có liên hệ với tình trạng chất nhiễm sắc hoạt động hay bị ức chế.

Trong khi đó, ở tiền nhân đực, các protamine dần bị thay bằng các histone được acetyl hóa. Tuy nhiên, các histone được acetyl hóa này sẽ lại được thay bằng các histone monomethyl hóa như H3K4me1, H3K9me1 và H3K27me1. Tiếp sau đó các dạng di- hay tri-methyl hóa sẽ xuất hiện.

Như vậy, các biến đổi histone thay đổi theo từng giai đoạn và đặc hiệu cho từng loại tế bào. Các biến đổi histone có vai trò như công tắc “bật/tắt” điều khiển biểu hiện gene khi cần. Ở phôi nang, các ICM và ngoại bì lá nuôi có những biến đổi histone khác nhau. Chẳng hạn như acetyl hóa H3K9 và methyl hóa histone ở vùng dị nhiễm sắc chất gấp ở ICM, trong khi đó H3K27me1/2/3 có thể gấp ở cả hai nhóm tế bào nhưng ưu thế ở ICM, còn H3K27me2/3 chỉ gấp ở ngoại bì lá nuôi. Như vậy, mỗi nhóm tế bào ở ICM và ngoại bì lá nuôi có những nhóm yếu tố thượng di truyền khác nhau điều khiển biểu hiện gene chuyên biệt.

Các biến đổi histone như acetyl hóa và khử acetyl hóa cũng liên quan đến tiến trình tái cấu trúc chất nhiễm sắc, qua đó giúp các yếu tố khác tiếp cận DNA.

3.3. Các RNA không mã hóa

microRNAs (miRNAs) là những phân tử RNA không mã hóa có kích thước ngắn (20-24 nt) điều hòa biểu hiện gene bằng cách loại bỏ mRNA đích hay ngăn mRNA dịch mã. Từ khi miRNA đầu tiên, lin-4, được xác định có vai trò điều hòa tiến trình phát triển ấu trùng theo thời gian của *Caenorhabditis elegans*, các miRNAs bắt đầu được ghi nhận có chức năng trong nhiều giai đoạn phát triển, bao gồm cả giai đoạn tiền làm tổ.

Trong sinh tổng hợp miRNAs, Dicer (ribonuclease type III) có chức năng phân cắt các tiền miRNAs (pre-miRNAs) thành các miRNA trưởng thành và tham gia hình thành phức hợp RISC (RNA-induced silencing complex). RISC là một phức hợp có nhiều protein với các vai trò khác nhau như helicase, exonuclease và Argonaut (Ago). RISC có vai trò làm thoái hóa mRNA hoặc ngăn mRNA dịch mã.

Khiếm khuyết Dicer gây chết phôi ở chuột do thiếu tế bào mầm và mất tiềm năng tăng trưởng. Ago2 là yếu tố cần thiết cho sự phát triển trong giai đoạn hoạt hóa gene ở noãn được thụ tinh (ZGA). Trong giai đoạn ZGA này, các sản phẩm phiên mã từ mẹ đều bị tiêu hủy. Điều này gợi ý

rằng các yếu tố liên quan đến RNA can thiệp (RNAi) có thể liên quan đến việc tiêu hủy này. Từ phân tích dữ liệu microarray trên 97 miRNAs đã cho thấy các miRNA có thể tham gia chính trong tiến trình xóa bỏ các thông tin từ mẹ ở giai đoạn ZGA. Trong giai đoạn hình thành phôi đầu, các miRNAs có thể liên quan đến sự kết dính tế bào. Ngoài ra, các miRNA cũng có thể đóng vai trò trong biệt hóa tế bào ở giai đoạn phôi nang, chẳng hạn như miR-290 và miR-295 đặc hiệu ở tế bào mầm phôi với vai trò duy trì tính vạn năng của tế bào.

Ngoài các phân tử RNA không mã hóa có kích thước ngắn, các phân tử RNA không mã hóa có kích thước dài (lnc-RNAs) cũng có những vai trò riêng biệt trong sự phát triển. Trong giai đoạn tiền làm tổ, các lnc-RNAs có thể liên quan đến ức chế phiên mã gene và in dấu gene.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Epigenetics and Assisted Reproduction – An introductory guide, 1st edition. Các tác giả: Cristina Camprubí và Joan Blanco. Nhà xuất bản Taylor & Francis Group 2019.
2. Gene Regulation, Epigenetics and Hormone Signaling 1st edition. Tác giả: Subhrangsu S. Mandal. Nhà xuất bản Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2017.