

Chương 5

Phiên mã

Phiên mã là quá trình tổng hợp RNA từ khuôn mẫu DNA. Quá trình này về phương diện hóa học và enzyme rất giống với quá trình tái bản DNA. Cả hai đều liên quan đến các enzyme tổng hợp một chuỗi nucleic acid mới bổ sung với khuôn mẫu DNA. Tất nhiên, hai quá trình này có những khác biệt quan trọng, mà đáng chú ý nhất là chuỗi mới trong quá trình phiên mã được tạo thành từ các ribonucleotide thay vì các deoxyribonucleotide. Các nguyên tắc cơ bản của quá trình phiên mã được thiết lập dựa vào nghiên cứu trên prokaryote (*E. coli*) nhưng dường như các nguyên tắc này cũng có tính phổ biến cho cả eukaryote. Tuy nhiên, do sự khác biệt về cấu trúc genome và hệ thống enzyme nên sự phiên mã ở prokaryote và eukaryote cũng có những đặc trưng nhất định.

I. Các đặc điểm cơ bản của quá trình phiên mã

1. Sự phiên mã tạo ra RNA bổ sung với một sợi DNA

Các ribonucleotide nối tiếp của RNA được xác định dựa trên nguyên tắc bổ sung với các nucleotide trên DNA khuôn mẫu. Khi sự bắt cặp chính xác xảy ra, ribonucleotide tiếp theo được liên kết đồng hóa trị với chuỗi RNA đang hình thành nhờ phản ứng có enzyme xúc tác. Như vậy, sản phẩm phiên mã được kéo dài từng ribonucleotide một và bổ sung chính xác với sợi DNA được dùng làm khuôn mẫu.

Quá trình phiên mã dù có tính chính xác cao nhưng vẫn kém hơn nhiều so với quá trình tái bản DNA (tỷ lệ mắc lỗi là 1/10.000 nucleotide so với 1/10.000.000 trong tái bản). Đó là do sự thiếu một cơ chế sửa sai hữu hiệu, mặc dù trong quá trình tổng hợp RNA cũng có hai dạng sửa sai tồn tại. Tuy nhiên, vì các RNA được phiên mã không bao giờ được sao chép lại nên các sai sót xảy ra không ảnh hưởng đến việc truyền đạt thông tin cho thế hệ sau.

2. Sự phiên mã là một phản ứng enzyme

Những enzyme chịu trách nhiệm cho quá trình phiên mã ở cả tế bào prokaryote và eukaryote đều được gọi là RNA polymerase phụ thuộc DNA (DNA-dependent RNA polymerase), gọi tắt là RNA polymerase.

RNA polymerase xúc tác hình thành các cầu nối phospho-diester để nối các ribonucleotide thành một chuỗi thẳng. Enzyme dịch chuyển từng bước dọc theo DNA khuôn mẫu và kéo dài chuỗi RNA theo hướng từ 5'→3', nghĩa là các ribonucleotide được thêm vào đầu 3' của chuỗi RNA đang hình thành. Các cơ chất được sử dụng để tổng hợp RNA là ATP, GTP, CTP và UTP. Cũng giống như trong sự tái bản DNA, năng lượng cho phản ứng được cung cấp từ sự thủy phân các cầu nối giàu năng lượng của các cơ chất nói trên.

3. Sự phiên mã chỉ sao chép chọn lọc một số phần của genome và tạo ra nhiều bản sao

Sự lựa chọn vùng nào để phiên mã không phải xảy ra ngẫu nhiên. Mỗi vùng phiên mã điển hình bao gồm một hoặc nhiều gen, có những trình tự DNA đặc hiệu hướng dẫn khởi đầu và kết thúc phiên mã.

Đối với một vùng được chọn phiên mã, có thể có một đến hàng trăm thậm chí cả nghìn bản sao RNA được tạo ra. Sự tổng hợp phân tử RNA sau được bắt đầu trước khi phân tử RNA trước hoàn thành. Từ một gen đơn độc, trong vòng một giờ có thể tổng hợp được hơn một nghìn phân tử RNA (đối với eukaryote).

Sự lựa chọn vùng nào để phiên mã và mức độ phiên mã đều được điều hòa. Vì vậy, trong những tế bào khác nhau hoặc trong cùng một tế bào nhưng ở những thời điểm khác nhau sẽ có những nhóm gen khác nhau được phiên mã.

4. Chỉ một trong hai sợi đơn của phân tử DNA được dùng làm khuôn mẫu

Việc gắn của RNA polymerase vào promoter của gen sẽ quyết định việc lựa chọn sợi nào trong hai sợi đơn của DNA làm khuôn mẫu. Promoter, ngoài việc mang vị trí gắn RNA polymerase còn chứa đựng thông tin xác định sợi nào trong hai sợi đơn của DNA được phiên mã và xác định vị trí bắt đầu phiên mã.

5. Sự phiên mã được khởi phát không cần môi

RNA polymerase có thể khởi đầu sự tổng hợp RNA trên khuôn mẫu DNA mà không cần môi như DNA polymerase. Điều này đòi hỏi ribonucleotide đầu tiên được mang đến vị trí bắt đầu phiên mã phải được giữ ổn định trên DNA khuôn mẫu trong khi ribonucleotide thứ hai đang được đưa đến để xảy ra phản ứng trùng hợp.

II. Các giai đoạn của quá trình phiên mã

RNA polymerase tiến hành quá trình phiên mã một gen thông qua nhiều bước và được chia thành ba giai đoạn: khởi đầu, kéo dài, và kết thúc.

1. Giai đoạn khởi đầu

Đầu tiên, RNA polymerase gắn với promoter của gen (cùng với các yếu tố khởi đầu) để tạo thành phức hợp promoter-polymerase. Một khi được hình thành, phức hợp này sẽ có sự thay đổi cấu trúc cần thiết cho việc tiến hành giai đoạn khởi đầu.

Giai đoạn khởi đầu này bao gồm ba bước như sau:

1.1. Phức hợp đóng (closed complex)

Khi RNA polymerase vừa mới gắn với promoter thì phức hợp tạo thành ở trạng thái đóng. Ở trạng thái này, DNA vẫn là chuỗi kép và enzyme gắn vào một phía của vòng xoắn.

1.2. Phức hợp mở (open complex)

Lúc này DNA xung quanh điểm bắt đầu phiên mã được mở xoắn và liên kết giữa các cặp base bổ sung bị phá vỡ. Hai sợi DNA với độ dài khoảng 14 bp xung quanh vị trí bắt đầu phiên mã tách rời nhau ra và tạo nên vòng phiên mã. Việc mở DNA đã giải phóng sợi khuôn mẫu. Hai nucleotide đầu tiên được mang đến vị trí bắt đầu đã được hoạt hóa, chúng xếp hàng trên khuôn mẫu và được nối với nhau. RNA polymerase bắt đầu chuyển dịch dọc theo sợi khuôn mẫu, mở xoắn phía trước vị trí trùng hợp và tái gắn hai sợi DNA phía sau. Bằng cách này, các ribonucleotide tiếp theo được gắn

vào chuỗi RNA đang phát triển. Đoạn RNA ban đầu với số lượng ribonucleotide ít hơn 10 sẽ bị loại bỏ và enzyme bắt đầu tổng hợp lại.

1.3. Phức hợp tam nguyên bền (stable ternary complex)

Một khi enzyme đi được khoảng hơn 10 bp, nó được xem là “thoát” khỏi promoter. Lúc này một phức hợp gồm ba thành phần là enzyme, DNA và RNA được hình thành và quá trình phiên mã chuyển sang giai đoạn kéo dài.

2. Giai đoạn kéo dài

Một khi RNA polymerase tổng hợp được một đoạn RNA khoảng 10 base, nó chuyển sang giai đoạn kéo dài. Sự chuyển giai đoạn này đòi hỏi những biến đổi hơn nữa về cấu hình của RNA polymerase làm cho nó càng giữ chặt khuôn mẫu hơn nữa. Trong quá trình kéo dài, enzyme này thực hiện một loạt nhiều nhiệm vụ rất quan trọng ngoài việc tổng hợp RNA. Nó mở xoắn DNA trước mặt và tái gắn DNA phía sau, nó tách dần chuỗi RNA đang hình thành ra khỏi khuôn mẫu khi đang di chuyển dọc theo gen, và nó còn thực hiện chức năng đọc sửa sai (ở quá trình tái bản DNA, các chức năng này do nhiều enzyme khác nhau thực hiện).

3. Giai đoạn kết thúc

Khi RNA polymerase phiên mã hết chiều dài của gen (hoặc các gen), nó dừng lại và giải phóng sản phẩm RNA. Trong một số tế bào, có những trình tự đặc hiệu thúc đẩy giai đoạn kết thúc. Trong một số tế bào khác, người ta vẫn chưa rõ yếu tố nào điều khiển enzyme ngừng phiên mã và giải phóng RNA khỏi khuôn mẫu.

III. Phiên mã ở prokaryote

1. Enzyme RNA polymerase ở prokaryote

Tế bào prokaryote chỉ chứa một loại RNA polymerase. Enzyme này được cấu tạo bởi năm tiểu đơn vị, gồm hai tiểu đơn vị α và các tiểu đơn vị β , β' , ω . Các tiểu đơn vị này liên kết với nhau để tạo thành enzyme lõi.

Người ta làm thí nghiệm tinh sạch enzyme lõi từ tế bào vi khuẩn rồi cho vào dung dịch chứa DNA vi khuẩn và ribonucleotide thì enzyme sẽ gắn với DNA và tổng hợp RNA. Tuy nhiên, RNA thu được trong thí nghiệm này không giống với RNA trong tế bào vì enzyme đã gắn vào các vị trí không thích hợp trên DNA. Nếu cho thêm một loại polypeptide tinh sạch được gọi là yếu tố σ trước khi enzyme gắn với DNA thì sự phiên mã sẽ bắt đầu tại những vị trí chính xác như trong tế bào.

Việc gắn yếu tố σ vào enzyme lõi làm tăng ái lực của enzyme với vị trí khởi động trên DNA, đồng thời làm giảm ái lực đối với các vùng khác. Khi enzyme lõi được gắn thêm yếu tố σ sẽ trở thành dạng holoenzyme.

2. Promoter của gen ở prokaryote

Promoter của gen vi khuẩn nằm ngay trước vị trí khởi đầu phiên mã. Bằng cách phân tích các trình tự DNA này của một số lượng lớn các gen vi khuẩn người ta nhận thấy có hai đoạn ngắn tương đối giống nhau giữa gen này và gen khác, mỗi đoạn gồm sáu nucleotide. Đoạn thứ nhất nằm cách vị trí khởi đầu khoảng 35 bp, là sự biến đổi của trình tự TTGACA. Đoạn thứ hai nằm cách vị trí khởi đầu khoảng 10 bp, là sự biến đổi của trình tự TATAAT. Chúng lần lượt được gọi là vùng -35 và vùng -10 (hộp Pribnow).

Đối với các promoter mạnh (ví dụ ở gen mã hóa rRNA), người ta còn tìm thấy yếu tố UP làm tăng sự gắn của RNA polymerase vào DNA. Có một số promoter thiếu vùng -35 và được thay bằng yếu tố -10 mở rộng, bao gồm vùng -10 chuẩn và thêm một đoạn ngắn ở đầu 5' của nó (ví dụ ở gen *gal* của *E. coli*).

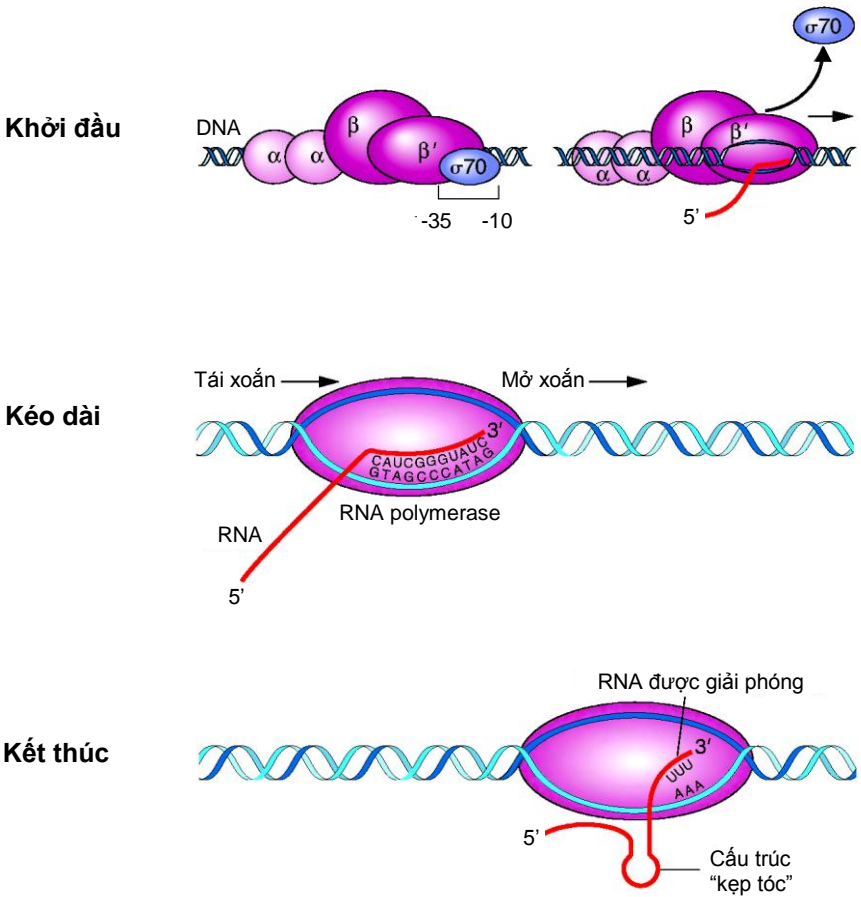
Yếu tố σ nhận dạng các vùng -35 và -10 hoặc yếu tố -10 mở rộng nhờ các cấu trúc đặc biệt của chúng. Riêng yếu tố UP không được nhận dạng bởi σ mà được nhận dạng bởi một vùng ở đầu C tận cùng của tiểu đơn vị α , gọi là α CTD (carboxyl terminal domain).

3. Vai trò của enzyme RNA polymerase và promoter trong quá trình phiên mã

Khi khởi đầu sự phiên mã, RNA polymerase gắn với DNA ở vùng -35 một cách lỏng lẻo tạo thành phức hợp đóng. Sau đó, enzyme gắn vào

promoter chặt hơn và phức hợp chuyển sang trạng thái mở. Một vùng DNA được mở xoắn nằm giữa hai vị trí -11 và +3, nghĩa là bao gồm cả vị trí bắt đầu phiên mã +1. Sợi đơn DNA làm khuôn mẫu được bộc lộ để sinh tổng hợp RNA.

Một khi RNA polymerase tổng hợp được 10 nucleotide (sau lần khởi đầu) thì yếu tố σ rời khỏi enzyme và có thể đến gắn vào promoter khác để khởi đầu một quá trình phiên mã mới. Sự tách rời yếu tố σ cho phép hình thành một kênh thoát mà thông qua đó phần RNA đã được tổng hợp chui ra khỏi enzyme và được kéo dài (Hình 5.1).



Hình 5.1. Các giai đoạn phiên mã ở prokaryote

4. Tín hiệu kết thúc

Tín hiệu kết thúc là những trình tự trên DNA có vai trò thúc đẩy sự tách RNA polymerase ra khỏi DNA và giải phóng chuỗi RNA mới được tổng hợp. Ở vi khuẩn, có hai loại tín hiệu kết thúc là tín hiệu kết thúc không phụ thuộc Rho và tín hiệu kết thúc phụ thuộc Rho.

4.1. Tín hiệu kết thúc không phụ thuộc Rho

Đó là một cấu trúc đặc biệt bao gồm hai trình tự đối xứng bổ sung nhau giàu GC, tiếp theo sau là một loạt 8 adenine (chúng sẽ được phiên mã thành 8 uracil). Những trình tự này không ảnh hưởng đến RNA polymerase cho đến sau khi chúng được phiên mã. Khi đó các trình tự đối xứng bổ sung trên RNA sẽ bắt cặp với nhau và tạo nên cấu trúc hình chiếc kẹp tóc (Hình 5.2). Cấu trúc kẹp tóc này đã phá vỡ phức hợp kéo dài hoặc bằng cách thúc đẩy mở kênh thoát cho RNA trên RNA polymerase hoặc bằng cách phá vỡ mối tương tác RNA-khuôn mẫu DNA



Hình 5.2. Cấu trúc kẹp tóc

Cấu trúc kẹp tóc này chỉ hoạt động hiệu quả khi nó được theo sau bởi một loạt U. Tại thời điểm cấu trúc kẹp tóc được hình thành, chuỗi RNA đang phát triển vẫn được giữ trên khuôn mẫu chỉ bằng các liên kết giữa A-U. Vì liên kết A-U yếu hơn G-C nên chúng dễ dàng bị phá vỡ bởi hiệu quả của cấu trúc kẹp tóc, và vì thế RNA dễ dàng được giải phóng.

4.2. Tín hiệu kết thúc phụ thuộc Rho

Tín hiệu này là những thành phần RNA mà muốn hoạt động, đòi hỏi phải có yếu tố Rho. Yếu tố Rho là một protein hình nhẵn (ở *E. coli* có khối

lượng phân tử khoảng 50 kDa) gồm sáu tiểu đơn vị giống hệt nhau. Yếu tố này có hoạt tính ATPase: khi gắn vào sản phẩm phiên mã, nó sẽ sử dụng năng lượng từ sự thủy phân ATP để kéo RNA ra khỏi khuôn mẫu và polymerase.

Yếu tố Rho điều khiển phân tử RNA đặc biệt nhờ tính đặc hiệu. Thứ nhất là tính đặc hiệu tại những vị trí nó gắn, đó là những đoạn khoảng 40 nucleotide mà không gấp lại thành cấu trúc bậc hai, chúng thường giàu C. Tính đặc hiệu thứ hai là yếu tố Rho gắn với bất kỳ sản phẩm phiên mã nào đang được dịch mã (nghĩa là những sản phẩm đang gắn ribosome). Ở vi khuẩn, phiên mã và dịch mã được song hành chặt chẽ: dịch mã khởi phát ngay trên RNA đang được tổng hợp kể từ khi RNA bắt đầu chui ra khỏi RNA polymerase. Vì vậy Rho chỉ kết thúc những sản phẩm vẫn đang được phiên mã ở quá đầu tận cùng của gen hoặc operon.

IV. Quá trình phiên mã ở eukaryote

1. Cấu trúc gen ở eukaryote

Cấu trúc một gen mã hóa cho protein của eukaryote bao gồm các vùng sau:

1.1. Vùng 5' kiểm soát biểu hiện gen

Vùng này bao gồm các trình tự nucleotide điều hòa biểu hiện gen và hoạt hóa sự phiên mã, bao gồm:

- **Promoter.** Là những trình tự định vị ở đầu 5' không dịch mã của gen có chức năng xác định vị trí bắt đầu phiên mã, kiểm soát số lượng mRNA và đôi khi cả tính đặc hiệu mô (tissue-specific). Promoter có thể dài đến vài nghìn bp. Vùng này thường chứa một trình tự bảo thủ gọi là hộp TATA nằm cách vị trí phiên mã khoảng 25-30 bp. Hộp này giúp xác định chính xác vị trí bắt đầu phiên mã. Ngoài ra, còn có hộp CCAAT nằm cách vị trí bắt đầu phiên mã khoảng 75-80 bp. Hộp này ít phổ biến hơn hộp TATA, nó có chức năng tăng hiệu quả phiên mã. Một số gen “quản gia” mã hóa cho các enzyme hiện diện ở tất cả các tế bào thường thiếu cả hai hộp này và promoter rất giàu GC. Ngoài ra, còn có các thành phần đặc hiệu khác.

- **Vị trí gắn vùng đặc hiệu mô.** Là trình tự DNA tương tác với protein đặc hiệu mô để chỉ huy gen cấu trúc sản xuất ra từng protein đặc hiệu của từng mô.

- **Vị trí gắn với vùng tăng cường phiên mã (enhancer).** Còn gọi là gen tăng cường, là những trình tự DNA được gắn với các tác nhân hoạt hóa để kích thích phiên mã của các gen kề bên, chúng có thể tác động qua một khoảng cách xa và có thể tác động theo hai phía (từ 5' hoặc 3' tới).

1.2. Vùng được phiên mã

Bao gồm các exon và intron nằm xen kẽ. Đây là một đặc điểm để phân biệt với gen của prokaryote. Các exon và intron đều được phiên mã nhưng chỉ có các exon là được dịch mã. Các intron được bắt đầu bằng GT và kết thúc bằng AG. Các intron chiếm phần lớn trong mỗi gen và chúng sẽ được loại bỏ khỏi RNA mới được tổng hợp, còn các exon được nối với nhau để tạo nên mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA).

Ở hai đầu của vùng được phiên mã (coding region) còn có vùng 5' không dịch mã (5' untranslation region) và vùng 3' không dịch mã (3' untranslation region). Vùng 5' không dịch mã được tính từ vị trí bắt đầu phiên mã cho đến codon khởi đầu ATG. Vùng 3' không dịch mã bắt đầu từ codon kết thúc đến vị trí gắn đuôi poly(A).

1.3. Vùng 3' không dịch mã

Chức năng chưa rõ, ở một số gen vùng này mang các trình tự điều hòa chuyên biệt.

2. *Enzyme RNA polymerase của eukaryote*

Tế bào eukaryote có đến ba loại RNA polymerase là RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II), và RNA polymerase III (pol III). Trong đó, RNA polymerase II đảm nhận việc phiên mã cho hầu hết các gen, chủ yếu là gen mã hóa cho protein. RNA polymerase I phiên mã các gen tiền thân của rRNA lớn và RNA polymerase III phiên mã các gen tRNA, một số gen RNA kích thước nhỏ của nhân (small nuclear, snRNA) và RNA 5S. Các RNA polymerase của eukaryote cũng bao gồm nhiều tiểu đơn vị,

trong đó có những tiểu đơn vị tương ứng với các tiểu đơn vị trong enzyme của vi khuẩn.

Bảng 5.1. Các tiểu đơn vị của RNA polymerase

Prokaryote		Eukaryote		
Vi khuẩn	Archaea	RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III
β'	A'/A''	RPA1	RPB1	RPC1
β	B	RPA2	RPB2	RPC2
α'	D	RPC5	RPB3	RPC5
α''	L	RPC9	RPB11	RPC9
ω	K	RPB6	RPB6	RPB6
	(+6)	(+9)	(+7)	(+11)

3. Các yếu tố giúp RNA polymerase khởi đầu phiên mã

Trong khi RNA polymerase của prokaryote chỉ cần thêm một yếu tố khởi đầu là σ để khởi động phiên mã thì RNA polymerase của eukaryote phải cần nhiều yếu tố khởi đầu, các yếu tố này được gọi là các yếu tố phiên mã tổng quát. Mặt khác, sự khởi đầu phiên mã ở eukaryote còn phải đối mặt với hiện tượng các DNA được đóng gói trong nucleosome và các dạng cao hơn của cấu trúc chromatin. Điều này đòi hỏi phải có nhiều yếu tố khác thêm vào để giúp khởi động quá trình phiên mã.

3.1. Vai trò của các yếu tố phiên mã tổng quát

Các yếu tố phiên mã tổng quát giúp RNA polymerase vào đúng vị trí trên promoter, giúp tách hai sợi đơn của DNA ra để phiên mã được bắt đầu, và giải phóng RNA polymerase khỏi promoter một khi phiên mã đã được khởi động xong để đi vào giai đoạn kéo dài.

Các yếu tố này được gọi là “tổng quát” vì chúng gắn trên tất cả các promoter được sử dụng bởi RNA polymerase II. Do đó, chúng được viết tắt là TFII (transcription factor for polymerase II), bao gồm TFIIA, TFIIB...