

Sinh học phân tử màng tế bào tập 2

GS. TS. Đỗ Ngọc Liên



NXB Đại học quốc gia Hà Nội 2007, 87 Tr.

Từ khoá: Cấu trúc thụ thể, phối tử, Thụ thể insulin, phân tử PPAR, Thiazolidinedione, Thụ thể acetylcholin, Quang thụ thể rhodopsin, tế bào miễn dịch.

Tài liệu trong Thư viện điện tử ĐH Khoa học Tự nhiên có thể được sử dụng cho mục đích học tập và nghiên cứu cá nhân. Nghiêm cấm mọi hình thức sao chép, in ấn phục vụ các mục đích khác nếu không được sự chấp thuận của nhà xuất bản và tác giả.

Mục lục

Chương 7	Cấu trúc và chức năng thụ thể β_3AR	9
7.1	Tách dòng gen và cADN của β_3 AR	9
7.2	Cấu trúc thụ thể β_3 adrenergic	9
7.3	So sánh β_3 AR với β_1 AR và β_2 AR	10
7.4	So sánh cấu trúc β_3 AR giữa các loài	11
7.5	Đặc điểm β_3 AR ở người và hiện tượng đa hình	12
7.6	Vị trí liên kết các phối tử của β_3 AR	12
7.7	Vị trí tương tác với protein Gs của β_3 AR	13
7.8	Nghiên cứu về phát sinh đột biến điểm và đột biến mất đoạn	14
7.9	Sự phân bố của β_3 AR	14
7.10	Phân bố và vai trò của β_3 AR ở người	15
7.11	Điều trị bệnh béo phì trên cơ sở β_3 AR	18
7.12	Điều khiển sự biểu hiện chức năng in vitro và in vivo của thụ thể β_3 AR	20
7.12.1	Sự điều chỉnh đồng dạng của chất kích thích β_3 AR	20
7.12.2	Sự điều chỉnh không đồng dạng	21
7.13	Chức năng sinh lý của β_3 AR	21
7.13.1	Ở các tế bào tạo mỡ	21

7.13.2	Chất kích thích β_3 AR và sự tăng nhanh tế bào mỡ nâu.....	22
7.13.3	Vai trò sinh lý của β_3 AR.....	22
7.14	Hiệu quả bệnh lý của sự biến đổi về hoạt động và các mức độ biểu hiện β_3 AR	23
7.14.1	Sự đa hình của β_3 AR ở người và sự tác động tới bệnh béo phì và tiểu đường	23
7.14.2	β_3 AR và leptin	23
Tóm tắt chương 7		24
Chương 8 Thụ thể insulin và sự điều hòa lượng đường trong máu		26
8.1	Khái niệm về thụ thể insulin	26
8.2	Điều hoà lượng đường trong máu	27
8.2.1	Điều hoà phân giải glycogen.....	28
8.2.2	Sự điều hoà tổng hợp glycogen.....	30
8.3	Insulin và các protein vận chuyển glucose.....	31
Tóm tắt chương 8		33
Chương 9 Receptor được hoạt hoá bằng chất tăng sinh peroxisom (PPAR)		34
9.1	Cấu tạo phân tử PPAR	34
9.2	Các gen mã hoá cho PPAR	35
9.3	Vùng chức năng điều hoà trên ADN.....	36
9.4	Tương tác của PPAR với các protein điều hoà khác.....	38
9.5	Chức năng sinh học của PPAR	39
9.6	PPAR giữ vai trò điều hoà chuyển hóa lipid.....	39
9.7	Vai trò của PPAR γ	41
9.8	Những vai trò sinh học khác của PPAR.....	42
9.9	PPAR và tính nhạy cảm insulin.....	42
9.10	PPAR và phản ứng viêm	42
9.11	PPAR với khả năng sinh ung thư và kiểm soát phân bào	43
9.12	Một số dược phẩm tác dụng lên PPAR	43
9.12.1	Dẫn chất của Fibrate.....	43
9.12.2	Các dẫn chất của Thiazolidinedione.....	44
9.13	PPAR γ tăng quá trình tích lũy tế bào mỡ	45
Tóm tắt chương 9		45
Chương 10 Thụ thể acetylcholin và sự truyền xung thần kinh.....		46
10.1	Màng synap thần kinh neurotransmitter.....	46
10.2	Cấu trúc thụ thể acetylcholin.....	47
10.3	Cơ chế mở kênh thụ thể acetylcholin nhờ acetylcholin	50
10.4	Điện thế màng tế bào thần kinh trong các synap.....	51
10.5	Sự truyền dẫn các xung thần kinh	51
10.6	Cơ chế gây độc tế bào thần kinh của các độc tố cá nóc	52
Tóm tắt chương 10		56
Chương 11 Thụ thể hoá học truyền tín hiệu vận động		57
11.1	Mở đầu	57
11.2	Các hóa thụ thể của vi khuẩn nhận biết các chất dẫn dụ và các chất xua đuổi (chemoreceptors)	58
11.3	Sự định hướng của của bộ máy vận động vi khuẩn	58
11.4	Vi khuẩn phát hiện nồng độ chất dẫn dụ và chất độc như thế nào?	58
11.5	Bốn loại hóa thụ thể truyền tín hiệu xuyên qua màng sinh chất	59

11.6	Sự methyl hóa thuận nghịch của các hóa thụ thể tạo thích ứng chuyển động.....	61
Tóm tắt chương 11		63
Chương 12 Quang thụ thể rhodopsin		64
12.1	Tế bào võng mạc hình que có thể bị kích thích bởi một photon đơn lẻ	64
12.2	Rhodopsin, một thụ thể ánh sáng của võng mạc mắt	65
12.3	Sự kích thích thị giác do quang isomer hoá của 11 – cis – retinal	65
12.4	Ánh sáng giúp Rhodopsin hoạt hoá protein G làm thủy phân GMP vòng.....	66
12.5	Sự thủy phân cGMP giúp đóng các kênh đặc hiệu cation để sinh ra một tín hiệu thần kinh	67
12.6	Cảm ứng ánh sáng làm giảm nồng độ Ca ²⁺ điều biến sự phục hồi và thích ứng	67
12.7	Cảm giác nhìn nhận màu sắc thực hiện nhờ ba loại thụ thể giống rhodopsin của tế bào hình nón	68
Tóm tắt chương 12		70
Chương 13 Một số thụ thể của các tế bào miễn dịch		71
13.1	Thụ thể màng tế bào lympho T	71
13.2	Phức hệ TCR/CD3	71
13.3	Sự tổng hợp các thụ thể của lympho T	73
13.4	Cấu trúc phân tử CD4.....	73
13.4.1	Sự đa dạng của phân tử CD ₄ ở một số loài động vật khác nhau	74
13.4.2	Tương tác giữa phân tử CD4 và phức hợp Ag - MHC lớp II.....	75
13.5	Vai trò của tế bào T- CD4	76
13.6	Những nguyên nhân dẫn đến sự giảm số lượng tế bào T-CD4 khi cơ thể nhiễm HIV	77
13.7	Sự tương tác của HIV với phân tử CD4	78
13.8	Sự kết hợp giữa thụ thể CD4 và các co-receptor trong quá trình tương tác với HIV	81
13.9	Các co-receptor chủ yếu của HIV	81
13.10	Sự tương tác của HIV, CD4 và các đồng thụ thể CXCR4 và CCR5	82
Tóm tắt chương 13		85
Chương 14 Các bệnh phát sinh liên quan đến thụ thể màng		86
14.1	Thụ thể tyrosine kinase đối với bệnh ung thư	86
14.2	Cơ chế hoạt hoá các thụ thể tyrosine kinase bằng ligand.....	86
14.3	Thụ thể tyrosine kinase hoạt hoá các protein truyền tín hiệu.....	87
14.4	Nhiều gen gây ung thư (oncogene) mã hoá cho các protein truyền dẫn tín hiệu	88
14.5	Các đột biến protein ras gây bất hoạt GTPase sẽ dẫn đến ung thư	88
14.6	Ras đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát số phận tế bào.....	89
Tóm tắt chương 14		90

Chương 7

Cấu trúc và chức năng thụ thể β_3 AR

Như chúng ta biết, đã có nhiều nghiên cứu trước đây trong những năm 80 của thế kỷ 20, về thụ thể tiếp nhận adrenalin được gọi chung là các thụ thể Adrenergic. Trước đây người ta chia các thụ thể này làm bốn kiểu là α_1 , α_2 , β_1 , β_2 tùy thuộc vào việc phát hiện chúng ở những mô tế bào đích và tùy thuộc vào sự trả lời khác nhau đối với các ligand kích thích, (agonists) và những ligand kìm hãm (antagonists) khi chúng liên kết với các thụ thể này. Nhìn chung các nghiên cứu này đều tập trung vào cơ chế ảnh hưởng của sự liên kết giữa adrenalin với các thụ thể trên. Trong những năm 90 của thế kỷ 20, khi sử dụng các phối tử đối kháng (antagonist ligand) đối với thụ thể nhận biết adrenalin người ta đã phát hiện ra một dạng thụ thể mới khác biệt so với các thụ thể β_1 , β_2 (β_1 AR, β_2 AR) được đặt tên là thụ thể β_3 (β_3 AR).

7.1 Tách dòng gen và cADN của β_3 AR

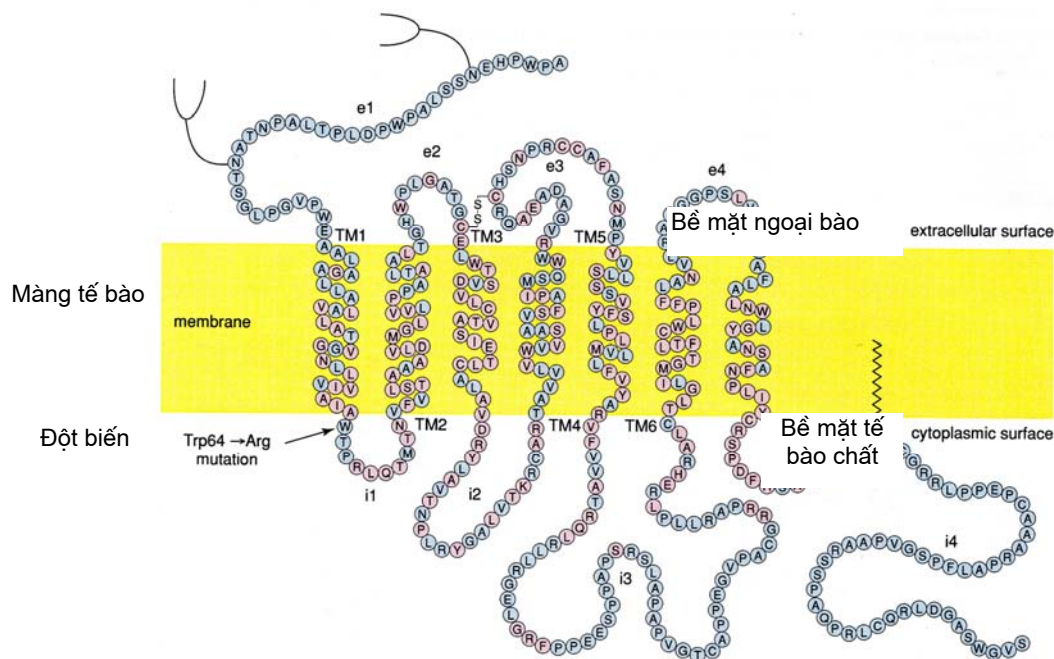
Hiện nay các gen mã hoá sinh tổng hợp β_3 AR đã được nghiên cứu, tách dòng trên các đối tượng như ở người, chuột, chuột cống và chó. Các cADN của β_3 AR đồng thời cũng đã được tách dòng và xác định trình tự từ thư viện gen bổ sung cADN trên mô tế bào mỡ nâu trên các đối tượng chuột cống, người, bò, khỉ, chó và chuột lang.

Các nghiên cứu về promotor của các gen β_3 AR đã xác định được một số trình tự quan trọng. Các điểm sao chép mã khởi đầu nằm tại vị trí ở giữa các nucleotide 150 và 200 ở đầu 5' của ATG của đoạn dịch mã khởi đầu đã được nhận dạng. Các dạng điều hoà biểu hiện của β_3 AR do các glucocorticoid, butyrate, phorbol ester, hoặc insulin đã được nghiên cứu chuyên sâu. Người ta đã xác định được bốn yếu tố phản ứng với AMP vòng xác định tại đầu 5' (CDEs) ở người, tuy nhiên không xác định được ở gặm nhấm. Ba trong số CDEs được ghi nhận là có vai trò quan trọng đối với điều hoà bởi một số chất kích thích.

So sánh trình tự acid amin dự đoán từ trình tự ADN tổng số và từ trình tự của cADN cho thấy có sự khác biệt về chiều dài và trình tự của đầu C của β_3 AR, thay đổi từ 6 acid amin (ở người) đến 12 acid amin (ở chuột) và được mã hoá bởi các vùng phiên mã. Việc sắp xếp các vùng phiên mã và không phiên mã của gen β_3 AR như sau: Vùng phiên mã lớn nhất có kích thước 1.4 kb mã hoá cho 402 và 388 acid amin tương ứng ở người và chuột/ chuột cống. ở người, vùng phiên mã thứ hai có kích thước 0.7 kb bao gồm trình tự mã hoá 6 acid amin ở đầu C của receptor và toàn bộ đầu 3' không dịch mã của mARN của β_3 AR. Người ta không nhận thấy có sự khác biệt nào giữa các receptor mang 6 gốc acid amin (ở người) và 12 gốc acid amin (ở loài gặm nhấm). Sử dụng luân phiên các chất nhận đã hình thành nên hai dạng của loại vùng mã hoá thứ ba, có kích thước tương ứng là 600 và 700 bp, tạo nên sản phẩm phiên mã có biểu hiện rất khác biệt ở tế bào sinh mỡ trắng và mỡ nâu. Sản phẩm phiên mã của gen β_3 AR ở người với sự khác biệt ở vùng dịch mã ở đầu 3' được hình thành liên tiếp bởi các dấu hiệu kết thúc phiên mã.

7.2 Cấu trúc thụ thể β_3 adrenergic

Giống như $\beta 1AR$ và $\beta 2AR$, $\beta 3AR$ là chuỗi polypeptide dài bao gồm 408 acid amin, thuộc nhóm các receptor liên kết protein G, bao gồm 7 vùng kỵ nước gồm 22- 28 acid amin và được cho rằng nó có thể hình thành nên các vùng xuyên qua màng (hình 8.1). Đầu amin (đầu N) của các receptor này nằm ở phía ngoại bào, có chiều dài acid amin thay đổi và được glycosyl hoá. Còn đầu carbon (đầu C) thì nằm phía trong màng và bao gồm một số gốc đã được phosphoryl hoá bởi hai kinase khác nhau: protein kinase A (PKA) và kinase gắn kết protein G (GRK), được gọi là kinase của receptor tiếp nhận adrenaline (βARK) (hình 7.1).



Hình 7.1

Cấu trúc của thụ thể β_3 tiếp nhận Adrenalin (theo AD. Strosberg. 1996)

7.3 So sánh $\beta 3AR$ với $\beta 1AR$ và $\beta 2AR$

So sánh trình tự của các dạng $\beta 3AR$ cho thấy trình tự và số lượng các acid amin được hạn chế rất nghiêm ngặt, mặc dù cũng bao gồm 7 domain lần lượt chui qua màng. Các nghiên cứu về sự phát sinh đột biến điểm trực tiếp và dạng chimeric $\beta 2/\beta 3AR$ (dạng tái tổ hợp) dẫn đến luận điểm cho rằng đây là các receptor có liên quan đến sự tương tác giữa các liên kết phối tử và các protein G như đã công bố với các nghiên cứu về $\beta 2AR$.

Bảng 7.1 Các đặc tính chung của các thụ thể tiếp nhận adrenalin β			
	β_1 AR	β_2 AR	β_3 AR
Gen và mRNA			
Chromosome locus	10q24 – q26	5q – q 34	8q11.1 – 8p.12
Vùng phiên mã	Không	Không	Có
Kích thước mRNA	2.6	2.2	2.3
Protein			
Chiều dài (acid amin)	477	413	408
Vị trí phosphoryl hoá PKA hoặc β PAR	Có	Có	Không
Dược học			
Protein G	G_s	G_s	G_s
Effector	Adenylate cyclase	Adenylate cyclase	Adenylate cyclase
Đặc hiệu Catecholamine	Noradrenaline	Adrenalin	Noradrenaline
Chất kích chọn lọc (agonist)	Xamoterol	Procaterol	CGP 121177A
Chất đối kháng chọn lọc (antagonist)	CGP 20712A	ICI 118551	CL 316, 243 Bupranolol*
Mô gốc	Tim	Phổi	Mô sinh mỡ
Tác động sinh lý	Giảm áp mạch	Cơ giãn phế quản	Phân giải mỡ
	β_1 AR	β_2 AR	β_3 AR
Gen và mRNA			
Chromosome locus	10q24 – q26	5q – q 34	8q11.1 – 8p.12
Vùng phiên mã	Không	Không	Có
Kích thước mRNA	2.6	2.2	2.3
Protein			
Chiều dài (acid amin)	477	413	408
Vị trí phosphoryl hoá PKA hoặc β PAR	Có	Có	Không
Dược học			
Protein G	G_s	G_s	G_s
Effector	Adenylate cyclase	Adenylate cyclase	Adenylate cyclase
Đặc hiệu Catecholamine	Noradrenaline	Adrenalin	Noradrenaline
Chất kích chọn lọc (agonist)	Xamoterol	Procaterol	CGP 121177A
Chất đối kháng chọn lọc (antagonist)	CGP 20712A	ICI 118551	CL 316, 243 Bupranolol*
Mục gốc	Tim	Phổi	Mục sinh mỡ
Tác động sinh lý	Giảm áp mạch	Cơ giãn phế quản	Phân giải mỡ

* Bupranolol: Có hiệu lực nhưng không phải là chất đối kháng β_3 AR

7.4 So sánh cấu trúc β_3 AR giữa các loài

Mức độ tương đồng về trình tự acid amin – từ 80 đến 90% - giữa các β 3AR của người với bò, chuột, chó canine, chuột cống, chuột lang và chuột đồng, thường cao hơn hẳn so với các loài phụ. Nghiên cứu cho thấy có một số acid amin đặc hiệu của β 3AR đều có mặt ở hầu hết các trình tự β 3AR, tuy nhiên lại không đặc hiệu đối với các trình tự (acid amin) của các β 1 và β 2AR. Tuy nhiên trình tự acid amin của β 3AR ở người, khỉ và bò tương đối gần gũi hơn so với trình tự acid amin của các loài gặm nhấm (chuột cống, chuột nhà và chuột đồng), đặc biệt là ở đoạn xuyên màng TM1 (Transmembrane) mà tại đó, sự mất đoạn (Valine – Alanin - Leucine) thường thấy có ở chuột nhưng không thấy xuất hiện ở các loài động vật có vú có kích thước lớn hơn. Phần mất đoạn mở đầu cho β 3AR ở người không tạo ra sự giống nhau giữa người với các loài gặm nhấm. Nghiên cứu các trình tự của β 3AR cho thấy trình tự β 3 ở người khác hẳn so với các loài khác tại một vài vị trí trên chuỗi polypeptide của người và ở một vài vị trí khác ở một số loài khác. Ví dụ về các domain TM4 và TM6 người ta thấy có Cystein trên β 3AR ở người và Arginine ở khỉ, bò, chuột nhà, chuột cống, chuột lang và chuột đồng. Để chứng minh cystein đóng vai trò hoạt hoá β 3AR ở người so với các loài khác người ta đã làm thí nghiệm với chất DTT có hay không có sử dụng các cấu tử. Kết quả cho thấy trái với các loại β 1AR và β 3AR, việc liên kết các cấu tử có vẻ như không bảo vệ receptor β 3 của người chống lại sự giảm cầu nối disulfide và sau đó lại bị bất hoạt.

7.5 Đặc điểm β 3AR ở người và hiện tượng đa hình

Tại một vị trí đặc biệt (acid amin số 64 của β 3AR), Tryptophan (ở người) được thay thế cho Arginine của β 3AR ở các loài khác. Sự đa dạng (mang tính chất tự nhiên) là 80% ở người Châu Âu và Bắc Mỹ. Để đánh giá tác động của sự thay thế này đối với chức năng của receptor, người ta đã tiến hành nghiên cứu biểu hiện ở mức độ gen trên tế bào trứng (CHO và HEK 293) của β 3AR ở chuột đồng ở Trung Quốc (CHO). Khi so sánh trình tự của β 3AR với các dạng khác, người ta không nhận thấy có sự khác biệt giữa các phối tử (ligand) hay hệ số hoạt hoá adenylate cyclase nhưng lại nhận thấy có sự giảm hoạt tính ban đầu và hoạt tính kích thích vòng hoá của chất kích thích β 3AR, dường như sự thay thế này hơi làm biến đổi liên kết giữa các receptor khác nhau và chất tác động trước khi chất kích thích này hoạt động.

Sự thay thế acid amin ở vị trí 64 của β 3AR ở người bằng một gốc tryptophan và bằng gốc arginin của β 3AR ở tất cả các loài khác đã gây ra sự quan tâm đặc biệt của nhiều nhà nghiên cứu. Sự biến đổi này xảy ra một cách tự nhiên được thấy ở khoảng 8% người châu Âu và Bắc Mỹ và thậm chí xuất hiện gốc arginin ở người cũng xuất hiện ở các động vật. Để đánh giá hiệu quả của sự thay thế này đối với chức năng thụ thể, người ta đã thí nghiệm tác động biến đổi này được biểu hiện ở nhiều mức độ ở buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và các tế bào HEK 293. So sánh với dạng ưu thế, không thấy có sự khác biệt trong liên kết phối tử hay các hằng số hoạt hoá adenylate cyclase, nhưng sự biến đổi phù hợp đã được quan sát ở cả chất đối kháng và chất kích thích – hoạt lực cyclase đã được kích thích, như là sự thay thế bằng cách biến đổi sự kết hợp đã tồn tại từ trước giữa thụ thể biến thể và cơ quan phản ứng lại kích thích trước khi sự có mặt của chất thích động. Chúng ta sẽ thảo luận về những tác động rõ ràng của sự biến đổi trên bệnh lý học người.

7.6 Vị trí liên kết các phối tử của β 3AR

Hiện nay, người ta đã mô hình hoá trên máy tính về vị trí của phối tử gắn với $\beta 3AR$, dựa vào vị trí giành cho phối tử của $\beta 2AR$, có ít nhất bốn trong số bảy domain TM có vai trò quan trọng đối với các liên kết phối tử. Các acid amin có liên quan đến liên kết các phối tử được nhận dạng bằng cách đánh dấu đột biến điểm và đánh dấu miễn dịch huỳnh quang gần tương tự giữa $\beta 2AR$ hoặc $\beta 3AR$. Từ đó đã xác định là:

- a. Asp¹¹⁷ ở TM3 là một acid amin được cho là có vai trò quan trọng trong liên kết các amin của sinh vật.
- b. Ser169 ở TM4, được cho là hình thành lên các cầu nối hydro với các hydroxyl của chuỗi ethanolamin.
- c. Ser209 và Ser212 ở TM5 cũng được thấy nhiều ở các receptor β khác hình thành lên cầu nối hydro với hydroxyl của chuỗi catechol.
- d. Phe309 ở TM6 có liên quan đến tương tác kỵ nước với vòng thơm của catecholamine. Hiện nay người ta vẫn chưa biết liệu các tương tác với các phối tử xảy ra đồng thời hay chưa. Hai trong số ba domain TM còn lại có liên quan đến quá trình hoạt hoá protein Gs, đó là TM2 chứa Asp83 và TM7 chứa Tyr336.

Mặc dù $\beta 3AR$ đã được mô hình hoá trên máy tính, người ta vẫn chưa giải thích được tại sao một số chất kích thích $\beta 2$ lại đóng vai trò giống như đối với $\beta 3AR$. Trái với $\beta 2$, vị trí của $\beta 3AR$ có vẻ như chứa ít các acid amin cồng kênh nên nó dễ dàng điều tiết hơn so với các chất kích thích $\beta 1/\beta 2$ hơn, do vậy nghiên cứu về phát sinh đột biến được sử dụng, trong đó Glycine (có trọng lượng phân tử nhỏ) được thay thế bởi Phenylalanine (có trọng lượng phân tử lớn thước to, cồng kênh) tại vị trí số 53 của $\beta 3AR$. Tuy nhiên sự thay đổi này không đủ để chuyển hoá chất kích thích $\beta 3AR$ thành chất kìm hãm nó ($\beta 3AR$).

7.7 Vị trí tương tác với protein Gs của $\beta 3AR$

Những nghiên cứu sự mất đoạn và sự biến đổi có hướng: Sự mất các đoạn nhỏ ở vùng đầu amino (8 góc) và đầu cacboxyl (13 góc) ở i3 của $\beta 3AR$ đã tách thụ thể ở người khỏi adenylate cyclase nhờ sự kích thích cả ligand kích thích. Kết quả này hoàn toàn giống với những kết quả thu được trên $\beta 2AR$, chúng tỏ ở cả hai kiểu phụ, những xác định phân tử về tương tác protein G với thụ thể $\beta 3AR$ là đã được khoanh vùng trong các đoạn của vòng i3 gần với màng. Phát hiện này, ở mức độ nào đó, là đáng ngạc nhiên cho thấy sự tương đồng của chuỗi chỉ ở mức vừa phải giữa $\beta 2AR$ và $\beta 3AR$: 63% ở các vị trí đầu amino và 31% ở đầu cacboxyl.

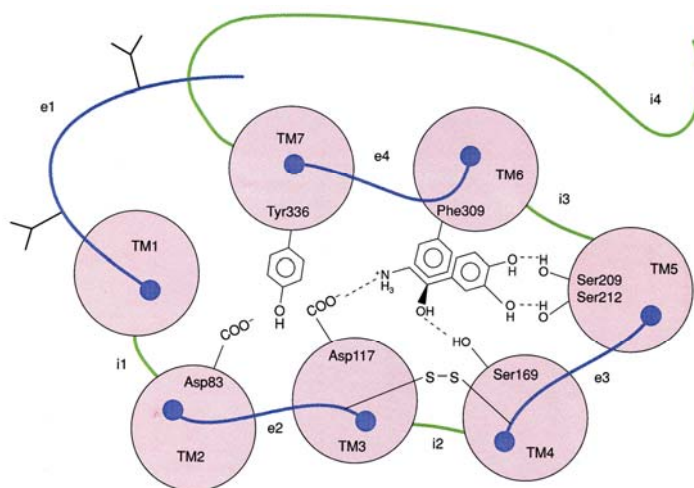
Sự kết hợp của $\beta 3AR$ với các tổ hợp Gs $\alpha\beta\gamma$ khác nhau: Mặc dù ba kiểu phụ thụ thể β -adrenergic có thể gắn với các protein Gs và kích thích adenylate cyclase, một hay mỗi thụ thể thực tế có thể tương tác với các tổ hợp khác nhau của tiểu đơn vị αs và với bất kỳ một trong năm hay bảy sản phẩm gen mã hoá, thứ tự với các tiểu đơn vị β và γ . Xác minh sự kết hợp ưu tiên này đòi hỏi sự nỗ lực lớn mà tới nay chưa có nhóm nghiên cứu nào tiến hành.

Adenylate cyclase tự nó xuất hiện ở ít nhất tám dạng và thụ thể $\beta 3$ -adrenergic có thể kích thích một isozym khác hơn là các kiểu phụ khác: Các tế bào tạo mỡ, nơi mà hầu hết $\beta 3AR$ được thấy, chủ yếu là adenylate cyclase kiểu III, có thể là cơ quan phản ứng lại kích thích được ưu tiên gắn với kiểu phụ $\beta 3$.

Vị trí tương tác trên β_3AR chủ yếu nằm ở các phần phía trong màng tế bào là giống với vị trí tương tác của β_2 với protein Gs, chủ yếu ở vùng chính giữa màng của phần cuộn lại thứ hai và thứ ba trong màng và domain có đầu C tận cùng.

Một số báo cáo cho rằng thụ thể β_3 có thể gắn với hơn một chất truyền tin thứ hai. Hơn nữa, Chaudry và cộng sự đã chỉ ra rằng ở tế bào tạo mỡ chuột, β_3AR tương tác với cả protein Gs và Gi. Gần đây, Gauthier và cộng sự đã báo cáo sự kết cặp của thụ thể β_3 -adrenergic trong vách ngăn của tim người với một protein Gi, kết quả là đã phủ định vai trò tác động tới sự co thắt của tim, ngược lại hoàn toàn với sự quan sát trước đó của Kaumann, luôn khẳng định có sự tác động tới sự co thắt ở tim.

Ở các mô tế bào có chứa β_3AR của người và của CHO, không quan sát thấy hiệu quả của sự kết hợp giữa các độc tố với thụ thể có liên quan với bệnh ho lâu ngày, mặc dù độc tố thường kim hãm cả ba protein Gi. Sự khác biệt này có thể do sự biến đổi từ một loài này sang loài khác hay từ một loại tế bào này sang loại tế bào khác.



Hình 7.2
Mô hình vị trí liên kết các phối tử của β_3AR (Theo AD. Strosberg. 1996)

7.8 Nghiên cứu về phát sinh đột biến điểm và đột biến mất đoạn

Đột biến mất đoạn của vùng i3 có đầu N (gồm 8 acid amin) và ở đầu C (13 acid amin) của β_3AR ở người không cho thụ thể nối với adenylate cyclase thông qua quá trình kích thích chất kích hoạt. Kết quả đạt được của nghiên cứu này hoàn toàn tương tự với kết quả đạt được khi nghiên cứu với β_2AR , khẳng định cả hai dạng receptor tương tác với protein G đều nằm ở vị trí chính giữa màng của phần cuộn i3 trong cytosol của màng tế bào. Phát hiện này hơi khác so với các nghiên cứu trước đây về mức độ tương đồng về trình tự acid amin giữa β_2 và β_3AR : 63% ở đầu N và 31% ở đầu C tận cùng.

7.9 Sự phân bố của β_3AR

- Thứ nhất là phân bố theo vị trí mô khác nhau.

Cả ba dạng của β AR đều có sự phân bố rất điển hình tại các mô khác nhau. Trong khi β 1 AR thấy chủ yếu ở tế bào cơ tim và là đối tượng cho các nghiên cứu sản xuất dược phẩm và có tác dụng ngăn chặn β ; β 2 AR thấy ở tử cung, cơ xương, và phổi và là đối tượng cho nghiên cứu sử dụng các chất kích thích β 2 trong quá trình giãn phế quản, β 3 AR chủ yếu thấy ở tế bào mỡ nâu (BAT- Brown Adipose Tissue) và tế bào mỡ trắng (WAT- White Adipose Tissue) là nơi điều hoà thay đổi noradrenaline trong quá trình chuyển hoá năng lượng, sinh nhiệt và là đối tượng nghiên cứu sử dụng của các loại dược phẩm chống béo phì và chống bệnh tiểu đường. Một vài nóng bộ gần đây đã nhắc nhiều đến sự có mặt của receptor β 3 ở một số mô khác nhau và có thể có chức năng khác nhau, thấy chủ yếu ở ống ruột- là nơi β 3 có vai trò thúc đẩy tính linh động của ruột trong quá trình co/giãn cơ hoặc là có vai trò bảo vệ bề mặt của màng nhầy ruột. Về phương diện dược học, các thuộc tính của β 1AR ở mô tim cũng đã được nghiên cứu rất kỹ lưỡng.

- Thứ hai là phân bố theo thời gian phát triển cá thể

Động vật có vú có hai loại mô sinh mỡ, đó là mô sinh tế bào mỡ trắng và mô sinh tế bào mỡ nâu. Tế bào mỡ trắng chịu trách nhiệm dự trữ chất béo còn tế bào mỡ nâu ngoài chức năng dự trữ chất béo còn có chức năng sử dụng chất béo để chuyển hoá thành acid béo tự do và tạo thành nhiệt. Cả hai dạng tế bào mỡ trắng và mỡ nâu có thể phân biệt (về mặt hình thái) như sau: Tế bào mỡ trắng chứa một giọt mỡ duy nhất còn tế bào mỡ nâu có nhiều giọt mỡ nhỏ. Mỡ nâu của nó là do nó chứa quá nhiều ty thể. Tế bào sinh mỡ nâu có biểu hiện của UCP (uncoupling protein tức là một dạng protein không liên kết) mà không thấy trên bất kỳ một tế bào nào khác của cơ thể. Protein này đóng vai trò trong quá trình chuyển hoá các acid béo tự do thành CO_2 , nước và giải phóng năng lượng. Biểu hiện rõ ràng nhất của thụ thể β 3 là có ở tế bào mô mỡ nâu (BAT) của tất cả các loài, từ các loại gặm nhấm nhỏ cho đến vượn và người, trừ chuột lang. Do sự phân bố của BAT có vẻ rất khác nhau nên mỗi một thay đổi đáng kể nào cũng đều được quan sát và được nghiên cứu kỹ lưỡng trong quá trình phát triển của cơ thể. Ví dụ ở bê non mới sinh có rất nhiều BAT, sau khi sinh được vài tuần BAT này sẽ biến mất. Cũng như vậy ở trẻ sơ sinh người ra thấy BAT rất rõ sau đó biến mất sau khi trẻ sinh được vài tuần tuổi. Tuy nhiên đôi khi người ta cũng quan sát thấy BAT ở người trưởng thành, chủ yếu có ở thợ rừng làm việc lâu ngày trong điều kiện khí hậu cực kỳ lạnh và khắc nghiệt hoặc ở bệnh nhân pheochromocytoma. Đối với những người công nhân làm việc ngoài trời, người ta quan sát thấy BAT có ở vùng quanh thận. BAT còn thấy ở phía trong nang thận và trên trục của thận ở cơ thể mới sinh. Các nghiên cứu này chứng tỏ mô tế bào mỡ nâu đóng vai trò là “tế bào ghi nhớ” tồn tại từ khi sinh ra cho đến lúc trưởng thành ngay cả ở những động vật có vú có kích thước lớn.

Ở gặm nhấm, người ta không nhận thấy có sự sai khác đáng kể nào giữa BAT ở cơ thể mới sinh và BAT của cơ thể trưởng thành. β 3 (ở chuột cống, chuột nhà, và chuột đồng) chủ yếu biểu hiện ở mô tế bào mỡ trắng từ khi sinh ra cho đến khi trưởng thành. Người ta cho rằng lượng tế bào mỡ nâu tồn tại phụ thuộc vào kích thước của cơ thể, kích thước càng lớn thì năng lượng tiêu hao càng nhiều do vậy mô tế bào mỡ nâu càng xuất hiện nhiều.

7.10 Phân bố và vai trò của β 3AR ở người

Sự phân bố ARNm của β 3AR người đã được nghiên cứu nhờ sử dụng một số kỹ thuật nhạy cảm: sự lai AND/ARN (Northern blot), thử nghiệm khả năng bảo vệ RNaza và

transcriptaza ngược/phản ứng chuỗi polymeraza (RT-PCR). Kết quả được tổng hợp trên bảng 7.2.

Bảng 7.2		
Sự phân bố ARN _m thụ thể β_3 -adrenergic ở mô người		
	Khả năng bảo vệ ARNase	RT-PCR
CNS		
Vỏ não	-	-
Tiểu não	-	-
GI		
Gan	-	-
Túi mật	++++	++++
Tụy	-	
Dạ dày	++	
Ruột	+++	++
Cơ xương		
Cơ bắp chân	-	-
Gan bàn chân	-	-
Chất béo		
Trung thất	+	++
Tiểu da	+ tới +++++	+ (có thể thay đổi)
Đùi	+ tới +++++	+
Màng treo ruột	+ tới +++++	++++
Tim mạch		
Tâm nhĩ trái	+/-	++ (với UCP)
Tâm thất trái	-	-
Phổi		
Niệu sinh dục		
Thể hang	-	
Tuyến tiền liệt	++	
Thận	-	
Bàng quang		+
	Khả năng bảo vệ ARNase	RT-PCR
CNS		
Vỏ não	-	-
Tiểu não	-	-
GI		
Gan	-	-
Túi mật	++++	++++
Tụy	-	
Dạ dày	++	
Ruột	+++	++
Cơ xương		
Cơ bắp chân	-	-
Gan bàn chân	-	-
Chất béo		

Trung thất	+	++
Tiểu da	+ tới +++++	+ (có thể thay đổi)
Đùi	+ tới +++++	+
Màng treo ruột	+ tới +++++	++++
Tim mạch		
Tâm nhĩ trái	+/-	++ (với UCP)
Tâm thất trái	-	-
Phổi	-	-
Niệu sinh dục		
Thể hang	-	
Tuyến tiền liệt	++	
Thận	-	
Bàng quang		+

Những kết luận chính là ARNm β 3AR được tìm thấy ở chất béo trắng và nâu ở người từ một số vị trí, ở một số mô không sinh mỡ khác, bao gồm túi mật, ruột non, dạ dày, tuyến tiền liệt và chỉ ở tâm nhĩ trái, hầu hết dường như gắn liền với chất béo nâu, khi UCP được thấy ở cùng mẫu và không thấy ở bất cứ vùng lớn nào của não và cơ.

Các kháng thể đa clon tăng lên kháng lại peptit tổng hợp ở đầu cuối cacboxyl 25 thu được β 3AR người được tinh sạch bằng sắc ký ái lực và đưa ra để nhuộm bề mặt tế bào CHO được chuyển nhiễm với β 3AR. Các kháng thể cũng có thể được dùng để nhận biết thụ thể bằng phép thấm miễn dịch và tinh sạch thụ thể bằng sắc ký ái lực miễn dịch. Các kháng thể kháng β 3AR được thấy phản ứng với vật chất có trong các tế bào mô trơn từ túi mật, phù hợp với những kết quả nghiên cứu sự phân bố của ARNm β 3 bằng thực nghiệm bảo vệ RNaza và RT-PCR. Các kháng thể cũng được thấy phản ứng yếu với BAT ở người.

Người ta đã tìm thấy cả ba dạng β AR phân bố trong các mô khác nhau của cơ thể, trong đó β 1 AR chủ yếu ở tim, là receptor được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các chất kháng β AR. β 2AR được tìm thấy ở tế bào tử cung, cơ xương, phổi, là receptor dùng cho nghiên cứu các chất kích thích (agonist) của β AR và gây kích thích giãn phế quản. Còn β 3AR chủ yếu được tìm thấy trong các tế bào tạo mỡ có chức năng điều hoà các thay đổi trong quá trình chuyển hoá năng lượng và sinh nhiệt. Người ta chưa biết đến vai trò của β 3AR đối với cơ trơn của ống ruột- dạ dày, túi mật và tim. Các bằng chứng về vai trò của β 3AR trong quá trình điều biến chuyển hoá năng lượng và sinh nhiệt xuất phát từ một số điểm sau:

1. Các nghiên cứu trên gặm nhấm có β 3AR là thành phần chính của β AR. Ở tế bào tạo mỡ trắng và mỡ nâu do điều trị dài ngày bằng chất đồng vận kích thích β 3AR đã làm giảm bệnh béo phì.
2. Điều trị kéo dài bằng ligand đồng vận kích thích β 3AR trên chó trưởng thành, người ta thấy trọng lượng của chó giảm xuống đồng thời xuất hiện tế bào sinh mỡ nâu, là dạng tế bào làm nhiệm vụ oxy hoá tạo nhiệt và thường không thấy có ở động vật không sử dụng chất kích thích đồng vận.
3. Hiện nay các nghiên cứu về biểu hiện của β 3AR ở người được tìm thấy trong tuyến sữa và tế bào tạo mỡ nâu đã được phân hoá tồn tại trong suốt đời người là nơi điều hoà sự phân giải mỡ.

Enocksson và cộng sự (1996) cho rằng β 3AR có vai trò trên màng nổi của tế bào mỡ trắng, trong khi Sinnitt và cộng sự (1996) lại khẳng định hoạt tính của β 3AR của tế bào mỡ trắng trên tuyến sữa ở người. Bằng phương pháp xác định nhạy hơn so với các phương pháp nghiên cứu trước đây. Tavernier và cộng sự (1997) cũng đã chứng minh được hoạt tính trung gian của β 3AR trên màng tế bào mỡ trắng.

Nói chung, vai trò sinh lý của β 3AR vẫn chưa xác định hoàn toàn, tuy nhiên người ta đã xác định có sự phân bố của nó trên mỡ nâu cao hơn rất nhiều lần so với tế bào mỡ trắng. Tuy nhiên β 3AR ở tế bào mỡ nâu chỉ có thể có ở các mô, tổ chức ở cơ thể mới sinh và rất khó phát hiện sau khi sinh được vài tuần, trừ loại gặm nhấm. Các tế bào sinh mỡ nâu tồn tại suốt thời gian sống của người và động vật, đóng vai trò là “các tế bào ghi nhớ” và chỉ tăng sinh trong một số trường hợp đặc biệt như khi bị cảm lạnh hoặc khi một lượng lớn catecholamin tiết ra hoặc do khối u của tuyến thận (pheochromatocytoma). Tuy nhiên người ta đã đưa ra bằng chứng chứng tỏ vai trò trung tâm của các β 3AR trong quá trình điều hoà các chất béo của cơ thể khi nghiên cứu về gen mã hoá một trong số các tiểu đơn vị của protein kinase A (PKA) phụ thuộc cAMP ở chuột. Hoạt tính PKA ở tế bào mỡ nâu ở loài động vật này ngày càng tăng, và việc điều trị bởi chất kích thích β 3AR đã thúc đẩy sự tiêu hao năng lượng, làm cơ thể bị gầy đi và giảm rõ rệt bệnh béo phì do chế độ ăn uống.

7.11 Điều trị bệnh béo phì trên cơ sở β 3AR

Nghiên cứu các thụ thể sẽ không nên giới hạn với các hệ thống mẫu, đặc biệt là khi β 3 được công nhận là trung gian của sự phân giải lipid trong các tế bào tạo mỡ. Do đó, một số nhóm nghiên cứu gần đây đã mở rộng phân tích chất kích động β 3 gây ra sự phân giải lipid ở tế bào tạo mỡ nguyên thủy hay được làm bất diệt cũng như ở mô mỡ. Ở người, tế bào tạo mỡ nâu rất khó phân tách khỏi chất béo trắng cho thấy sự biến đổi các mức độ thụ thể β 3 rất rộng, phụ thuộc nguồn gốc mô hay thậm chí của cá thể. Một số nghiên cứu được lý gần đây tập trung ngay vào mô mỡ màng nổi. Chúng ta có thể tạo mô hình bất tử hoá các tế bào tạo mỡ nâu ở người và đã sử dụng chúng để mô tả liên kết phối tử, sự hoạt động của adenylate cyclase và hoạt tính phân giải lipid của các chất kích thích β 3. Kết luận chính của những nghiên cứu này là thụ thể β 3 là kết quả của kiểu thụ thể isoform có vai trò chính được kết hợp để phân giải lipid ở các tế bào tạo mỡ ở người.

Hầu hết chất kích thích β 3AR đều gây ra sự giảm trọng lượng ở loài gặm nhấm mà không làm giảm lượng thực phẩm đưa vào nghĩa là khẩu phần ăn vẫn bình thường. Sự giảm trọng lượng được đo bằng sự giảm lượng lipid; lượng protein cũng không thay đổi hoặc tăng lên, phụ thuộc vào loại chất kích thích và phương thức tiến hành.

Sự giảm trọng lượng là do sự kích thích của tỷ số chuyển hoá tăng lên trong quá trình điều trị. β 3AR gây nên sự sinh nhiệt được cho là xảy ra chủ yếu ở tế bào mỡ (BAT), khi các β 3AR chưa được dò tìm trong mô xương, sự sinh nhiệt của cơ thể được cho là ở một vị trí khác. Chuột non thiếu hụt một phần đáng kể BAT biểu hiện ở sự giảm 50% trong phản ứng sinh nhiệt với chất kích thích β 3 chọn lọc CL 316,243. Kết quả sinh nhiệt từ sự oxy hoá các chất béo tự do dư thừa; do đó loài gặm nhấm gầy bị mất ít chất béo khi điều trị với các chất kích thích β 3.

Các kết quả hứa hẹn về việc điều trị cho các động vật béo phì với các chất kích thích β 3AR để tăng phân giải mỡ đã hướng các nhóm nghiên cứu đánh giá những chất này như

những tác nhân chống béo phì và tiểu đường. Thật không may, các thuốc mới phát triển ở mức sử dụng cho loài gặm nhấm có hiệu quả nhưng lại không thành công đối với người. Ví dụ, BRL 26830 thật sự làm giảm trọng lượng chuột béo phì nhưng một số kết quả đã tạo ra lại kích thích cả $\beta 1$ và $\beta 2AR$ (đại diện là BRL 26830 và BRL 35135 cũng là chất kích thích). Các thuốc này cũng làm tăng sự nhạy cảm insulin và sự dung nạp glucose nhưng không làm giảm nhanh glucose máu. Chất RO - 16-8714 kích thích sự sinh nhiệt nhưng cũng có một tác động rõ ràng lên tần số tim đập. ZD 7114 (trước là ICI D7114) đã làm giảm trọng lượng rất hiệu quả ở chó nhưng không có tác dụng ở người, hay ZD 2079, sinh nhiệt sau một liều nhưng không duy trì hiệu quả sau hai tuần. CL 316,243 là chất kích thích $\beta 3AR$ chọn lọc tiên tiến ở mức hiệu lực trên $\beta 3$ người kém hơn 97 lần so với $\beta 3$ chuột biểu hiện ở các tế bào CHO. Vì ít có giá trị sinh học nên thuốc phải được cung cấp ở những liều rất cao. Ở một thử nghiệm lâm sàng gần đây về những đối tượng mắc bệnh béo phì, tiểu đường và không tiểu đường, ba tháng điều trị với một phần của chất kích thích từng phần này làm tăng tốc độ trao đổi chất nghỉ và ít làm giảm trọng lượng cơ thể, nhưng không làm tăng sự nhạy cảm với insulin. Những hiệu quả điều trị thuốc này cũng được xác định bởi sự phân giải lipid tăng(6).

Hiện nay đã có các bằng chứng khoa học cho rằng leptin và glucagon giống peptide-1 (GLP-1) có tác dụng trong điều trị bệnh béo phì bằng cách tác động đến sự chán ăn làm giảm sự thèm ăn hoặc là gây kích thích quá trình trao đổi chất và sự phân giải mỡ. Một phân tích sâu sắc về sử dụng dược phẩm gần đây đã chỉ ra rằng chỉ có các loại chất điều biến receptor nhận biết kiểu cytokin đã được nghiên cứu. Chất này là một peptide có 14 axit amin liên kết với thụ thể và hoạt hóa receptor dành cho erythropoietin. Các triển vọng về việc sử dụng chất đối kháng đối với receptor leptin vẫn còn rất ít. Hiệu quả của việc điều trị bằng peptid giống glycagon (GLP - 1) đã được ghi nhận bằng cách GLP-1 được tiêm trực tiếp vào não, khác với các cách điều trị theo đường uống thông thường. Tuy nhiên rất nhiều các phối tử của $\beta 2 AR$ và $\beta 1-AR$ dùng đường uống đã được nghiên cứu trong sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh béo phì. Tuy vậy, người ta đã thiết kế các dược phẩm dạng phối tử chọn lọc đối với $\beta 3AR$ để tạo ra một phương pháp hữu ích chữa bệnh béo phì cho người.

Do vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hoá năng lượng ở mô sinh mỡ của một số loài gặm nhấm và ở người, các nghiên cứu chuyên sâu về thụ thể $\beta 3$ ngày càng được sử dụng rộng rãi trong sản xuất dược phẩm để điều trị bệnh béo phì. Tuy nhiên các nghiên cứu sản xuất và ứng dụng các chất kích thích thụ thể $\beta 3$ chọn lọc vẫn đang là vấn đề cần phải giải quyết theo các hướng để làm sáng tỏ các vấn đề sau:

- a. Cơ sở phân tử chứng minh sự khác biệt giữa vị trí liên kết các phối tử đối với $\beta 3AR$ đóng vai trò là chất kích thích $\beta 3AR$ nhưng lại có vai trò là chất kìm hãm $\beta 1/\beta 2 AR$.
- b. Vai trò điều hoà ngắn hạn khác nhau của các chất kích thích (agonist) gây nên sự mất nhạy cảm của các thụ thể $\beta 1$ và $\beta 2$ mà không gây ảnh hưởng đến thụ thể $\beta 3$ trên hệ thống mô hình hoá bằng máy tính.
- c. Cơ sở biểu hiện có chọn lọc của thụ thể $\beta 3$ ở tế bào mỡ và ở các tế bào đường ruột.
- d. Cần phải có các công trình nghiên cứu giải thích hoạt tính gần tương tự của thụ thể $\beta 3$ có sức thuyết phục nhất ở tế bào cơ xương và ở tim.

Vì những lý do trên, vai trò chính có triển vọng của thụ thể β_3 và những nghiên cứu hiện có về thụ thể β_1 (ở gặm nhấm) và β_2 ở người trong quá trình điều hoà chuyển hoá năng lượng và sinh nhiệt vẫn tiếp tục là hướng nghiên cứu chủ đạo về mặt sinh lý học trong tương lai. Mô hình hoá trên máy tính về thụ thể β_3 AR ở gặm nhấm sẽ làm sáng tỏ những hạn chế trên. Các nghiên cứu mô hình hoá cho đối tượng nghiên cứu ở người sẽ tiếp tục được triển khai. Các nghiên cứu về chuyển gen β_3 AR từ chuột sang người, xác định sự tồn tại vĩnh cửu của tế bào mô mỡ và các bệnh nhân mắc bệnh béo phì và tiểu đường đang tiếp tục được triển khai theo kỹ thuật vi thẩm tích in situ (in situ microdialysis) để xác định sự phân giải mỡ.

Việc mô tả các đặc điểm của leptin và các thụ thể của nó cũng như chứng minh rằng leptin gây chán ăn đang lại tiếp tục mở đầu cuộc tranh luận mới về liệu pháp chữa bệnh béo phì theo hướng gây chán ăn, làm giảm ăn hoặc là gây kích thích quá trình trao đổi chất và phân giải mỡ. Tác động của việc dùng GLP-1 đã được ghi nhận bằng cách tiêm trực tiếp vào não, trong khi rất nhiều chất kích thích β_3 AR thương mại dùng đường uống vẫn được sử dụng rộng rãi cho các liệu pháp điều trị bệnh béo phì. Hiện nay, nghiên cứu sản xuất và ứng dụng một số phối tử có chọn lọc của β_3 AR đã được triển khai và mở ra các triển vọng rất lớn trong điều trị bệnh béo phì ở người.

7.12 Điều khiển sự biểu hiện chức năng in vitro và in vivo của thụ thể β_3 AR

Sự biểu hiện và chức năng thụ thể β -adrenergic được điều chỉnh hoàn toàn ở cả mức độ phiên mã (làm mất ổn định, hoặc làm phong phú mức ARNm) và ở mật độ protein bề mặt. Việc làm mất mức độ mRNA, nghĩa là giảm phản ứng của thụ thể với sự có mặt của chất kích thích (agonist), sự truyền dấu hiệu giới hạn, ngược lại sự tái mRNA sẽ khôi phục hệ thống về mức cơ bản ban đầu.

7.12.1 Sự điều chỉnh đồng dạng của chất kích thích β_3 AR

In vitro: Những nghiên cứu ban đầu đã chỉ ra rằng ở các tế bào CHO, β_3 AR không bị mất sự mRNA trong thời gian ngắn (một vài phút) ở nồng độ chất kích thích thấp hay cao. Điều này có thể được giải thích bởi sự vắng mặt các chuỗi đích vẫn được phosphoryl hoá bởi kinase đặc hiệu ở thụ thể β_3 -adrenergic, ngược lại ở các thụ thể β_1 và β_2 -adrenergic. Sự gắn lại của các chuỗi này ở thụ thể β_1/β_2 đã khôi phục từng phần sự mất mRNA. Sự mất mRNA trong thời gian dài kèm theo sự mất ổn định ARNm khác nhau ở mỗi loại tế bào: được quan sát rõ ở những tế bào được xử lý với chất kích thích β_3 , trong khi không thấy ở các tế bào CHO.

Hiện tượng đặc hiệu tế bào này cũng được thông báo bởi Chaudry & Granneman về SK-N-MC và các tế bào HEK 293 được biến nạp. Các tác giả đã gợi ý rằng hiện tượng này không liên quan tới sự cô lập hay sự điều hoà xuôi chiều.

In vivo: Những thông báo ngược lại đã công bố về những tác động của các chất kích thích lên sự biểu hiện thụ thể β_3 -adrenergic ở một vài mẫu động vật, bao gồm chuột, chuột đồng, chó và thỏ. Theo một số tác giả, việc xử lý với chất kích thích thụ thể β ngoại sinh gây ra điều chỉnh xuôi ARNm của thụ thể β_3 AR, trong khi một số các tác giả khác có kết quả ngược lại.

7.12.2 Sự điều chỉnh không đồng dạng

Mặc dù có sự điều chỉnh không đồng dạng, các nhân tố ngoài catecholamin có thể ảnh hưởng tới sự biểu hiện thụ thể β -adrenergic. Sự ức chế tổng hợp ARNm của β 3AR do isoproterenol trong các tế bào tạo mỡ được nuôi cấy có thể giống như 8-bromo-cAMP. Việc cắt dây thần kinh giao cảm ở chuột làm tăng sự tổng hợp ARNm của thụ thể β 3AR. Ngược lại glucocorticoid tác động lên sự điều chỉnh phân biệt đối với ba thụ thể β -adrenergic ở mức độ phiên mã ở các tế bào 3T3-F442A chuột. Trong khi những chất này làm tăng sự biểu hiện thụ thể β 2-adrenergic, nhưng lại ức chế mạnh thụ thể β 1- và β 3-adrenergic. Acid béo chuỗi ngắn, butyric, điều chỉnh ngược sự biểu hiện gen thụ thể của β 1 và β 2-adrenergic và tăng mạnh sự biểu hiện thụ thể β 3-adrenergic. Gần đây, Fève và cộng sự đã chứng minh rằng insulin kìm hãm một cách chuyên biệt sự biểu hiện gen thụ thể β 3-adrenergic ở tế bào 3T3-F442A và protein kinaza C (PKC) một phần có liên quan đến sự điều chỉnh phiên mã đặc hiệu của ARNm của thụ thể β 3-adrenergic bởi insulin. Thụ thể được điều chỉnh xuôi bởi BAT của động vật bị béo phì mang tính di truyền (thông qua gen fa/fa và ob/ob ở chuột). Hiệu quả của hormon thyroid T3 đã được nghiên cứu ở BAT và tế bào mỡ trắng (WAT) của chuột. Ở chuột có thyroid cao, thụ thể β 3-adrenergic BAT được tăng lên theo mức độ ARNm và số lượng thụ thể giảm khi T3 giảm nhanh. Tuy nhiên, các thực nghiệm phiên mã ở nhân đã cho thấy rằng T3 không làm thay đổi đáng kể tốc độ phiên mã của gen β 3AR, thay vào đó người ta giả thiết rằng hormon chỉ điều chỉnh sự tổng hợp ARNm của β 3AR ở mức độ thấp.

7.13 Chức năng sinh lý của β 3AR

7.13.1 Ở các tế bào tạo mỡ

Bằng chứng về vai trò sinh lý của thụ thể β 3-adrenergic trong điều chỉnh sự trao đổi năng lượng và sự sinh nhiệt có một số nguồn gốc: 1) Những nghiên cứu trên loài gặm nhấm đã xác minh rằng thụ thể β 3-adrenergic là kiểu phụ thụ thể β -adrenergic chiếm ưu thế biểu hiện ở các tế bào tạo mỡ nâu và trắng và các chất kích thích β 3 làm giảm đáng kể chế độ ăn gây nên sự béo phì. 2) Champigny và cộng sự đã chỉ ra rằng ở chó trưởng thành, điều trị trong vòng hai tháng với chất kích thích thụ thể β 3-adrenergic ICI D7114 đã giảm trọng lượng và làm xuất hiện lại BAT là mô có vai trò quan trọng nhất trong sự sinh nhiệt và thường không thể phát hiện ở động vật có vú trưởng thành ngoài loài gặm nhấm. 3) Ở người, sự biểu hiện chức năng của β 3AR hiện nay đã được ghi chép nhiều ở tế bào tạo mỡ trắng, ở tuyến vú và được phân biệt với tế bào tạo mỡ nâu, nơi xảy ra điều chỉnh sự phân giải lipid.

Vai trò của β 3AR trong tế bào tạo mỡ ngày nay đã được chứng minh rõ ràng ở loài gặm nhấm mà chúng là thụ thể kiểu phụ ưu thế ở cả tế bào tạo mỡ nâu và trắng. Ở những tế bào này, β 3AR được gắn với Gs và adenylate cyclase III, do đó tạo ra cAMP, và một lipoprotein nhạy cảm có vai trò trong sự phân giải lipid của triglycerit. Ở các tế bào tạo mỡ trắng, kết quả là các acid béo tự do không giải phóng vào huyết thanh hay tập hợp ở triglycerit của các tế bào tạo mỡ nâu, mà chúng được oxy hoá thành CO₂ và nước, giải phóng năng lượng dạng nhiệt. Giảm sự biểu hiện của β 3AR ở mô tạo mỡ có thể góp phần với kiểu hình kháng insulin ở chuột chứa nhiều mỡ.

Ở các tế bào 3T3-F442A của chuột, sự biểu hiện của kiểu thụ thể phụ β 3 sau sự biến đổi của tiền tế bào tạo mỡ thành tế bào tạo mỡ sẽ làm giảm đáng kể kiểu thụ thể phụ β 3AR, với

mức độ thấp và không làm thay đổi $\beta 2AR$. Hoàn cảnh đó có thể hoàn toàn khác ở người: các tiền tế bào tạo mỡ ở người biểu hiện ở cả $\beta 1$ và $\beta 2AR$ ở các mức độ như nhau. Tế bào tạo mỡ trắng biểu hiện mức độ $\beta 3AR$ phụ thuộc vào nguồn gốc mô và phụ thuộc từng cá thể: Điều này đã được miêu tả bởi một số nhóm nghiên cứu, khi sử dụng kỹ thuật PCR rất nhạy, hay bằng thực nghiệm bảo vệ RNase hay để tìm hiểu biểu hiện chức năng $\beta 3AR$, hoặc sử dụng kỹ thuật vi thấm tách nhạy.

Ở các vị trí khác trong cơ thể người ta cũng có thể phát hiện chức năng $\beta 3AR$ nhanh chóng hơn, như thông báo của Lengvist và cộng sự (hay Enockson và cộng sự) khi họ sử dụng kỹ thuật vi thấm tách tại chỗ. Tuy vậy, vẫn còn thiếu những thông báo nói rõ về chức năng $\beta 3AR$ có thể do các phương pháp hay kỹ thuật kém nhạy.

7.13.2 Chất kích thích $\beta 3AR$ và sự tăng nhanh tế bào mỡ nâu

Một trường phái đã giải thích một cách có lý về việc sử dụng chất kích thích $\beta 3$ để giảm chất béo qua sự phân giải lipid và sự sinh nhiệt đòi hỏi các chất này kích hoạt cả $\beta 3AR$ và sự tăng nhanh tế bào mỡ nâu. Thụ thể càng được kích thích thì UCP càng được tạo nhiều và càng tăng sự sinh nhiệt do khử chất béo.

Thomas và cộng sự đã đưa ra sự giải thích cơ chế cho những phát hiện này. Các tác giả đã chỉ ra rằng ba trong bốn chuỗi yếu tố phản ứng với cAMP (CRE) ở promoter của $\beta 3AR$ của người xuất hiện để tăng sự phiên mã của $\beta 3AR$ biểu hiện trong các tế bào CHO đáp ứng với cAMP, hơn nữa hiệu quả của quá trình là cơ chế phản hồi dương tính làm tăng hoạt động của $\beta 3AR$. Dù cơ chế tương tự thực hiện ở các tế bào tạo mỡ (trắng hoặc nâu) ở người chưa được biết nhưng điều này thực ra sẽ cung cấp một phương tiện để làm tăng đáng kể hiệu quả của các chất kích thích và bằng cách này hay cách khác bù lại cho hiện tượng mật độ thấp $\beta 3AR$ và số lượng thấp các tế bào tạo mỡ nâu ở động vật không thuộc loài gặm nhấm.

Tiếp đó, Bronnikov và cộng sự đã trình bày một quan điểm cho rằng, ít nhất ở loài gặm nhấm, sự tăng nhanh các tế bào tạo mỡ được khởi đầu bởi một chất khởi động $\beta 3AR$, ngược lại, chất kích thích $\beta 3$ không có hiệu lực. Theo quan điểm về sự khác nhau giữa các loài về đặc tính sinh lý, hiển nhiên những thực nghiệm này cần được lặp lại với các chất khác nữa. Nếu các thí nghiệm được kiểm chứng, chúng có thể cho phép đánh giá đúng mức những ý tưởng lạc quan về các kết quả nghiên cứu của Champigny và cộng sự và cho dự kiến sử dụng các chất kích thích $\beta 3AR$ gây nên sự sinh nhiệt để chữa bệnh béo phì ở người cần được nghiên cứu kỹ càng hơn.

7.13.3 Vai trò sinh lý của $\beta 3AR$

Vai trò của thụ thể $\beta 3$ -adrenergic trong chức năng sinh lý bình thường chuyển hoá chất béo vẫn chưa được xác định hoàn toàn. Gần đây Susulic và cộng sự đã tạo chuột chuyển gen với đoạn đứt có chủ đích ở trình tự gen thụ thể $\beta 3$ -adrenergic. Ở chuột cái bị gây thiếu thụ thể $\beta 3$ -adrenergic đã tăng không đáng kể sự tích lũy chất béo có thể gợi ý rằng thụ thể $\beta 3$ -adrenergic đóng vai trò trong sự điều chỉnh cân bằng năng lượng. Ở WAT và BAT của những động vật này, các mức độ ARNm của $\beta 1AR$ được điều chỉnh ngược một cách đặc biệt, hơn nữa ở mức độ nào đó bù cho sự thiếu hụt $\beta 3AR$.

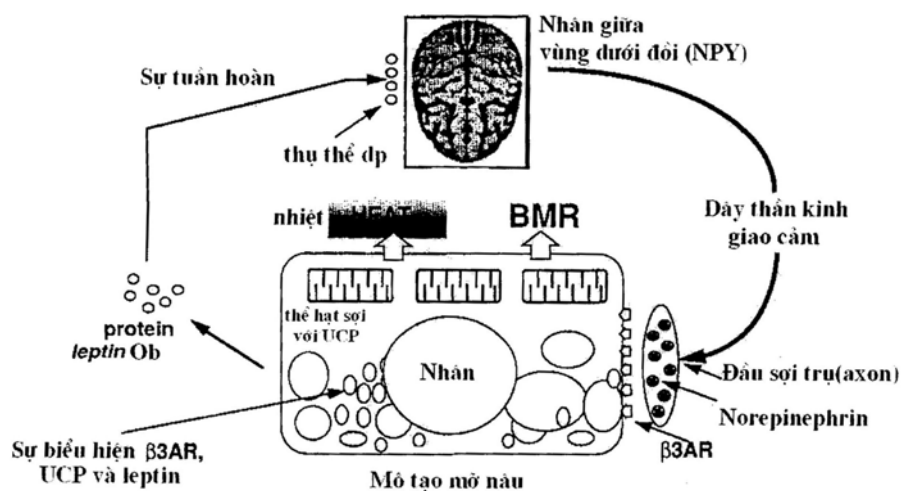
7.14 Hiệu quả bệnh lý của sự biến đổi về hoạt động và các mức độ biểu hiện β_3 AR

7.14.1 Sự đa hình của β_3 AR ở người và sự tác động tới bệnh béo phì và tiểu đường

Sự tăng lên một cách khiêm tốn chất béo của cơ thể chuột thiếu thụ thể β_3 -adrenergic phù hợp với việc giảm các mức độ ARNm của thụ thể β_3 -adrenergic ở chuột bị béo phì (do các gen ob/ob và fa/fa). Ở người, bằng chứng về tầm quan trọng của thụ thể β_3 -adrenergic trong sự cân bằng năng lượng và tính nội cân bằng glucose từ việc quan sát tần số biến đổi di truyền của tryptophan ở vị trí 64 bị thay thế bởi arginin. Trên 50% người ấn độ từ Arizona có biểu hiện béo phì do di truyền bộc lộ thực sự dạng biến đổi, điều này cũng thấy ở 25% người Mỹ gốc Phi và ở 8-10% dân số chung ở Mỹ và Châu Âu. Tỷ lệ này gấp đôi ở các bệnh nhân béo phì ở Nhật, ngược lại, là mức trung bình ở những người mắc bệnh béo phì ở Pháp. Tuy nhiên, những bệnh nhân béo phì ở Phương Tây, sự tạo thành arginin gắn với khả năng tăng động lực để thêm trọng lượng, sự tăng trọng lượng tối đa và tăng xu hướng phát triển bệnh đái đường NIDDM. Trong năm theo những quan sát này, hơn 20 báo cáo đã xác minh hầu hết những nghiên cứu ban đầu này và đã mở rộng các kiểu biến đổi gắn với hiện tượng đa hình Trp64Arg. Một số ít những nghiên cứu đã không thành công để tìm ra những liên quan, nhưng những trái ngược này hầu hết có thể được cho là sự khác nhau nhiều về tiêu chuẩn để chọn lựa bệnh nhân (ví dụ như chỉ số trọng lượng cơ thể, giống, tuổi, nguồn gốc và các dấu chuẩn di truyền khác).

7.14.2 β_3 AR và leptin

Bệnh béo phì là bệnh do nhiều gen và nhiều nhân tố khác nhau, trong đó người ta cũng thấy rằng một sự thay đổi acid amin đơn lẻ ở thụ thể β_3 -adrenergic cụ thể là đột biến điểm Trp64 được thay cho Arg ở β_3 AR, đủ để giải thích sự khởi phát bệnh, có thể góp phần vào sự tiến triển của bệnh. ở chuột, leptin là sản phẩm của gen được biến đổi ở chuột bị béo phì ob/ob, cũng được cho rằng đóng vai trò trong điều chỉnh sự trao đổi năng lượng, có thể bằng tương tác với thụ thể leptin vô tính.



Hình 7.3

Vòng liên hệ ngược leptin và sự điều chỉnh trọng lượng của cơ thể

Bệnh nhân có condon 105 (CGG bình thường mã hóa cho Arg đã bị thay thế ở dạng đột biến TGG mã hóa cho Trp. Do sự đột biến gen leptin (LEP) gây ra bệnh béo phì ở bệnh nhân đồng hợp tử theo đột biến này, đồng thời đột biến ở trẻ sẽ dẫn đến hậu quả chậm hoặc ngừng chín sinh dục.

Protein của thụ thể leptin được mã hoá bởi gen *db*, được biến đổi ở chuột bị béo phì mang gen *db/db* và *fa/fa* và được bộc lộ ở nhiều mô khác như não, tuyến dưới đồi.v.v... Hơn nữa, trong năm dạng thụ thể leptin được mô tả, dạng có vùng nội bào dài nhất được bộc lộ ở vùng dưới đồi và có thể xuất hiện để kích thích quá trình hình thành tín hiệu JAK-STAT (là tín hiệu hoạt hoá các tyrosine kinase và các chất hoạt hoá phiên mã) đáp lại với liên kết của leptin. Điều này sẽ gây kết quả giải phóng noradrenalin, chất này kích hoạt thụ thể β 3-adrenergic. Ngược lại, chất kích thích β 3AR làm giảm mạnh ở mức độ ARNm của leptin. Những điều kiện để làm tăng tổng hợp leptin thật ra liên quan với việc làm giảm hoạt động của thụ thể β 3-adrenergic. Tuy nhiên, ngược lại với những quan sát ở loài gặm nhấm, chưa có leptin hay thụ thể leptin nào được thấy là gắn với bệnh béo phì ở người. Điều này gợi ý rằng vai trò tác động của leptin có thể ít quan trọng hơn đối với người.

Tóm tắt chương 7

Thụ thể β 3AR là một dạng thụ thể thuộc họ thụ thể β .adrenergic có bảy vòng xoắn xuyên màng gồm 408 acid amin, thuộc nhóm thụ thể liên kết với protein G phổ biến ở các tế bào động vật bao gồm cả người. Khác biệt với các β 1, β 2AR, thụ thể β 3AR không có vị trí phosphoryl hóa ở vùng tận cùng C trong nội bào. So sánh giữa các loài, thụ thể β 3AR của người đã được chứng minh là giống với các loài động vật khác từ 80 – 90%. Vị trí gắn với các phối tử (ligand) của thụ thể β 3AR đã xác định có ít nhất bốn trong số bảy vùng domain có vai trò trong việc liên kết với ligand. Đó là Asp117 của TM3, Ser169 của TM4, Ser209 và Ser212 của TM5 và Phe309 của TM6.

Vị trí tương tác của β 3AR đối với protein G nằm ở vùng nội bào, ở vị trí của domain i3 chứa khoảng 13 gốc acid amin. Ở người β 3AR được phân bố chủ yếu trên màng tế bào của mô mỡ nâu (BAT) và một phần ở các mô mỡ trắng (WAT) và ở các tế bào mô đường ruột. Điều này cũng thể hiện ở tất cả các động vật từ gặm nhấm, động vật có vú, linh trưởng, trừ chuột lang. Sự biểu hiện của β 3AR cũng thể hiện theo vòng đời phát triển của cơ thể, đặc biệt mật độ cao ở các tế bào mô mỡ nâu ở tuổi trẻ và những người lao động chân tay nặng nhọc và β 3AR kém biểu hiện ở người già.

Vai trò trung tâm của β 3AR là điều hòa sự trao đổi lipid liên quan đến biểu hiện hoạt động của các protein kinase (PKA) liên quan đến biểu hiện của các gen leptin, và protein thúc đẩy quá trình oxy hoá acid béo tự do (UCP được gọi là protein không kết cặp – uncoupling protein), có thể được điều hòa hoạt động bằng cơ chế thần kinh nội tiết hormon ở vùng dưới đồi (hypothalamus).

Việc điều trị các bệnh tiểu đường và béo phì hiện đang được nghiên cứu có liên quan đến việc thiết kế các loại thuốc tương tự cấu tử gắn (ligand) hoạt hóa (agonist) của β 3AR cũng là

một trong những phương hướng trị liệu đối với các bệnh đa gen và do nhiều nhân tố gây nên ở trên.

Chương 8

Thụ thể insulin và sự điều hòa lượng đường trong máu

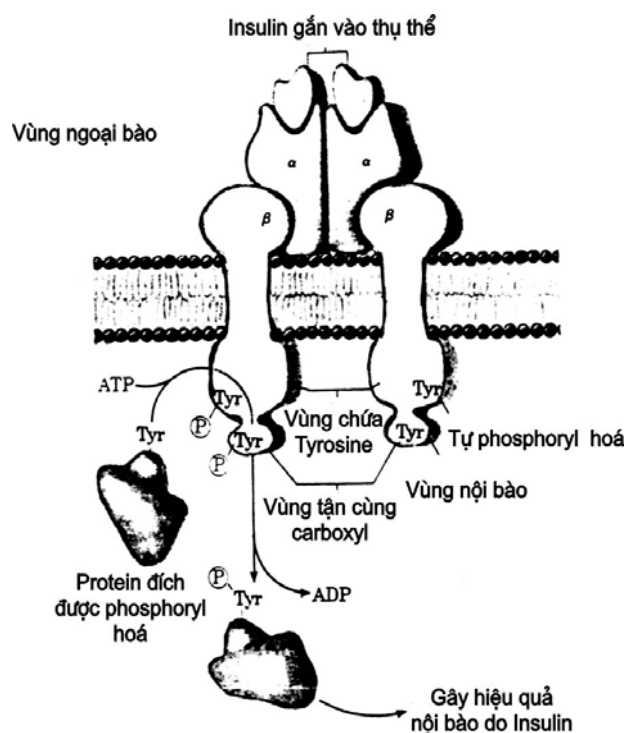
8.1 Khái niệm về thụ thể insulin

Receptor dành cho insulin chính là một protein kinase chuyển nhóm phosphat từ ATP đến cho nhóm hydroxyl của gốc tyrosine (không phải cho Ser hoặc Thr). Thụ thể insulin gồm có hai chuỗi α giống nhau nhô ra phía mặt ngoài của màng sinh chất và hai tiểu đơn vị β xuyên màng có tận cùng C nằm ở phía nội bào. Các chuỗi α chứa các vùng liên kết với insulin và các chuỗi β có vùng hoạt tính tyrosine kinase.

Insulin liên kết với các chuỗi α , hoạt hoá hoạt động tyrosine kinase của các chuỗi β . Trước tiên enzym phosphoryl hoá các gốc tyrosine của chính bản thân chuỗi β và sự tự phosphoryl hoá này tạo cho enzym tiếp tục phosphoryl hoá các protein khác của màng hoặc của tế bào chất (cytosol). Mặc dù trình tự chi tiết của các sự kiện cho phép hiểu biết sâu sắc sự kích thích của insulin đối với quá trình hoạt hoá chưa được đầy đủ nhưng dường như sự liên kết của insulin với thụ thể của nó sẽ khởi đầu một dòng thác (cascade) phosphoryl hoá, trong đó thụ thể hoạt hoá protein kinase thứ hai, tiếp theo protein lại hoạt hoá protein thứ ba hoặc serine kinase hoặc threonine kinase. Cuối cùng sự phosphoryl hoá các gốc Ser hoặc Thr làm biến đổi hoạt tính của một hoặc nhiều enzym quan trọng đối với chức năng của tế bào. Như vậy, insulin đã tác động trúng đích của nó.

Các bệnh nhân bị bệnh tiểu đường typ II đối kháng insulin vẫn tiết insulin bình thường nhưng các mô của chúng không trả lời đối với insulin của bản thân hoặc đối với insulin được tiêm vào cơ thể. Ở những người mắc bệnh này vùng hoạt tính tyrosine kinase của thụ thể insulin đã bị đột biến. Insulin vẫn liên kết bình thường với thụ thể đã đột biến nhưng vùng tyrosine kinase của thụ thể bị bất hoạt và hậu quả liên kết của insulin không xảy ra theo hướng bình thường.

Thụ thể insulin có dạng cấu trúc phân tử giống với hàng loạt thụ thể hormon khác và cũng tương tự như cấu trúc của thụ thể nhận biết yếu tố sinh trưởng. Tất cả chúng đều giống nhau về cấu trúc và đều có hoạt tính tyrosine kinase. Chẳng hạn các thụ thể EGF (yếu tố tăng trưởng biểu bì) và PDGF (yếu tố tăng trưởng bắt nguồn từ tiểu cầu) đều có cấu trúc và trình tự acid amin gần giống nhau và đều có hoạt tính tyrosine kinase ở vùng tận cùng C nằm trong tế bào.



Hình 8.1
Cấu tạo thụ thể Insulin và cơ chế tác động của Insulin điều hoà nồng độ glucose trong máu (theo A.L. Lehninger - 2005)

8.2 Điều hoà lượng đường trong máu

Cơ thể hấp thụ glucose theo 2 con đường: trực tiếp từ thức ăn và gián tiếp từ các acid amin và lactate thông qua quá trình tân tạo glucose. Glucose cung cấp năng lượng có thể oxy hoá cho các mô để duy trì sự sống. Lượng glucose được tiêu thụ hàng ngày chủ yếu là do các hoạt động của bộ não (75%) thông qua con đường hiếu khí. Còn lại là do hồng cầu, cơ xương và cơ tim tiêu thụ.

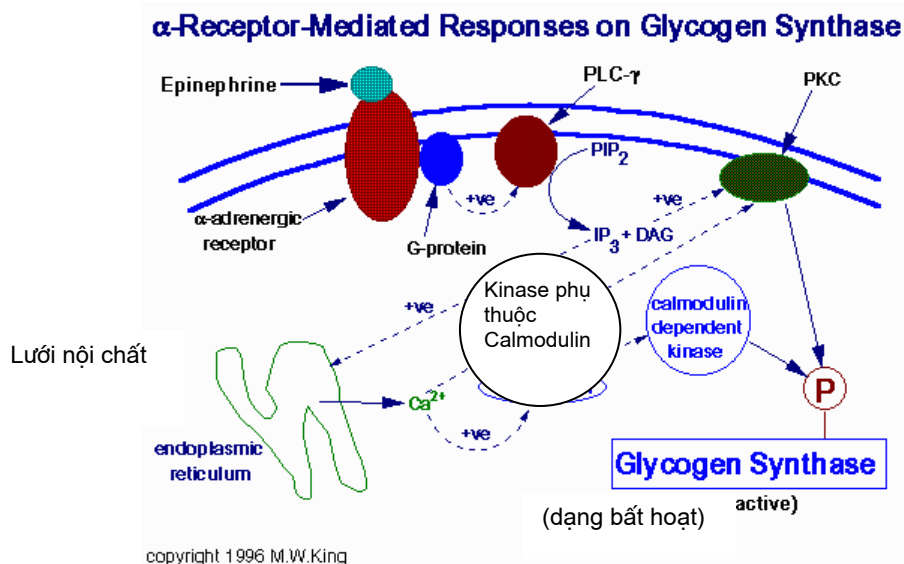
Lượng glucose bình thường trong cơ thể là 12 mg/l (khoảng 6mM). Khi lượng glucose trong máu tăng lên thì nó được tích trữ dưới dạng glycogen, nằm chủ yếu trong gan, cơ và một phần trong thận và ruột. Glycogen ở cơ gấp 2 lần ở thận. Glycogen ở cơ không thể có sẵn

để cung cấp cho các mô vì cơ thiếu enzyme glucose-6-phosphatase. Glycogen tích lũy ở gan được xem là chất dự trữ chính của đường trong máu.

Khi cơ thể mệt mỏi, dấu hiệu của sự thiếu glucose, thì glycogen sẽ bị phân giải. Sự điều hoà lượng đường trong máu được thực hiện thông qua 2 con đường chính là phân giải và tổng hợp glycogen.

8.2.1 Điều hoà phân giải glycogen

Quá trình phân giải glycogen được thực hiện nhờ enzyme glycogen phosphorylase. Nó là một enzyme đồng nhị chuỗi, có 2 dạng đồng phân là mạch thẳng T và dạng hoạt động R. Khi ở dạng R, chúng có thể liên kết với glycogen. Cấu trúc R này được tăng cường nhờ sự liên kết của ATP và bị ức chế bởi việc liên kết với ATP hoặc glucose-6-phosphate. Nhờ quá trình phosphoryl hoá mà enzyme này thực hiện quá trình biến đổi hoá trị như một cách để điều hoà hoạt tính của nó. Hoạt tính tương đối của enzyme phosphorylase không bị cải biến tạo ra glucose-1-phosphate, xâm nhập vào quá trình phân giải glycogen, cung cấp ATP để duy trì sự sống. Khi lượng đường trong máu thấp, tuyến tụy tiết ra glucagon, một polypeptit dài 29 acid amin, liên kết với các thụ thể bề mặt tế bào gan và một vài tế bào khác, làm hoạt hoá adenylate cyclase. Việc hoạt hoá này đã dẫn tới việc tăng cường sự hình thành cAMP. Khi cAMP liên kết với các tiểu đơn vị điều hoà của PKA sẽ dẫn tới việc giải phóng và hoạt hoá tiếp của các tiểu đơn vị có chức năng xúc tác. Các tiểu đơn vị sau đó sẽ bị phosphoryl hoá một số protein chứa gốc Serine và Threonine. Sự phosphoryl hoá của enzyme PKA sẽ hoạt hoá enzyme này rồi bản thân nó sẽ phosphoryl hoá enzyme phosphorylase-a bất hoạt thành dạng phosphorylase -b. Enzyme phosphorylase b sau đó tăng hoạt tính và tiến hành phân huỷ glycogen. Cùng lúc đó, quá trình phosphoryl hóa glycogen synthase lại kìm hãm hoạt động của enzym này. Dạng bất hoạt của glycogensynthase chính là dạng đã bị phosphoryl hoá.



Hình 8.2
Cơ chế điều hoà phân giải glycogen thông qua con đường bất hoạt glycogen synthase

PKA: Protein kinase phụ thuộc vào cAMP.

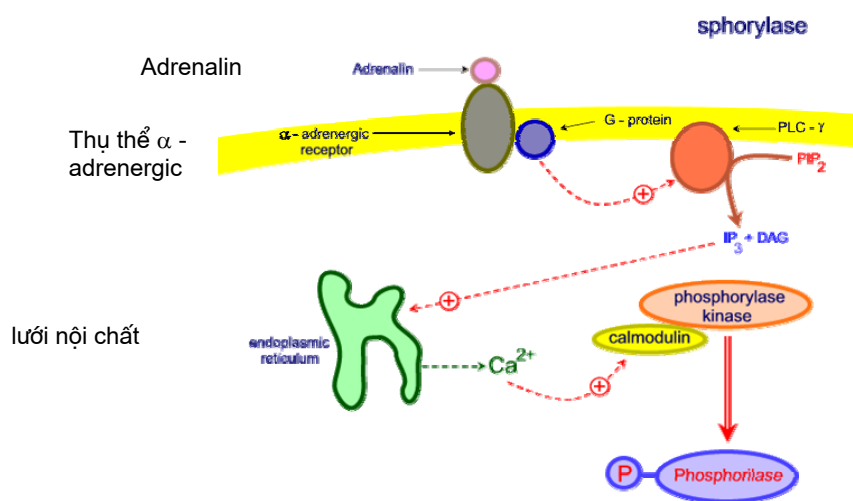
PKC: Protein kinase C, một dạng kinase hoạt động phụ thuộc Ca²⁺ (80kDa)

PPI-1: chất ức chế phosphoprotein phosphatase-1.

- Về: các ảnh hưởng tích cực tới bất cứ enzyme nào.
- PLC γ : Phospholipase C- γ phân giải PIP₂ \rightarrow IP₃ + DAG

Epinephrine (adrenalin) là hormon tuyến thượng thận có tác dụng trả lời lại các tín hiệu thần kinh, cần cho việc tăng cường sử dụng glucose của cơ. Khi hormon này liên kết với các thụ thể trên bề mặt tế bào cơ gây ra quá trình phân huỷ glycogen tương tự, nhưng đồng thời cũng gây ra sự bất hoạt enzym tổng hợp glycogen là glycogen synthase bằng một cơ chế phosphoryl hoá enzym này (hình 8.1).

Sự điều hoà hoạt tính PK (kinase của phosphorylase) còn chịu ảnh hưởng của hai cơ chế khác nhau, liên quan đến ion Ca⁺⁺. Một là thông qua hoạt động chức năng của một tiểu tiểu đơn vị của PK là Calmodulin mà Ca⁺⁺ có thể điều hoà được enzyme này. Khi calmodulin liên kết với Ca⁺⁺, nó có tác dụng làm tăng hoạt tính xúc tác của PK đối với cơ chất của nó, (phosphorylase b). Do sự phân giải glycogen trong các tế bào cơ được tăng cường khi có sự kích thích cơ cơ nhờ acetylcholine. Khi acetylcholine được giải phóng từ các synap cơ thần kinh, nó sẽ khử cực tế bào cơ, dẫn tới việc tăng cường phóng thích Ca⁺⁺ của tế bào cơ, qua đó hoạt hoá PK. Vì vậy, khi Ca⁺⁺ nội bào tăng lên sẽ làm tăng tỷ lệ cơ cơ, tăng sự phân giải glycogen, giải phóng ATP. Con đường thứ hai là con đường trung gian thông qua sự hoạt hoá của adrenalin đối với các thụ thể α -adrenergic (hình 8.2).



Hình 8.3. Điều hoà phân giải glycogen bằng kinase của phosphorylase

Nhờ sự hoạt hoá epinephrine đối với các thụ thể α -adrenergic, các thành viên tham gia vào quá trình phân giải glycogen như sau:

- PLC- γ : phospholipase C- γ .
- PIP₂: phosphatidyl inositol - 4,5- bisphosphate, cơ chất của PLC- γ .
- IP₃: inositol triphosphate.
- DAG: diacyl glycerol.
- PK: Phosphorylase kinase (kinase của phosphorylase)

Thụ thể α -adrenergic ghép cặp thông qua protein G để hoạt hoá PLC- γ , qua đó làm tăng sự thủy phân của PIP2 màng tế bào, tạo ra sản phẩm là IP3 và DAG. DAG liên kết và hoạt hoá PKC (Protein kinase C), một enzyme phosphoryl hoá nhiều cơ chất. Một trong những enzyme được phosphoryl hoá nhờ PKC là glycogen synthase. Khi IP3 liên kết với thụ thể trên bề mặt của lưới nội chất, sẽ giải phóng ra Ca^{++} . Ca^{++} sau đó sẽ tương tác với các tiểu đơn vị calmodulin của PK (kinase của phosphorylase) rồi hoạt hoá PK. Ca^{++} cũng hoạt hoá PKC khi liên kết với DAG. Để kết thúc hoạt động của enzyme hoạt hoá glycogen phosphorylase cần phải có quá trình loại bỏ nhóm phosphate để cho enzyme đã hoạt hoá trở về dạng enzyme bất hoạt. Trong trường hợp Ca^{++} cảm ứng sự hoạt hoá thì nồng độ Ca^{+} giải phóng ra từ tế bào cơ phải được kết thúc khi các tín hiệu thần kinh ngừng lại. Sự loại bỏ nhóm phosphate của PK đối với phosphorylase b được thực hiện nhờ enzym phosphoprotein phosphatase (PP-1). Đây là enzym phân giải tách gốc phosphate của các phospho – protein. Hoạt tính của PP1 cần phải được điều hoà khi các gốc phosphate định vị trên các enzyme đó được loại bỏ ngay. Điều này sẽ được hoàn thành khi PP1 liên kết với chất ức chế PPI-1. PPI chỉ liên kết được với PP1 khi nó bị phosphoryl hoá bởi PKA. Đồng thời, nó cũng bị khử phosphoryl hoá nhờ PP1 (hình 8.3).

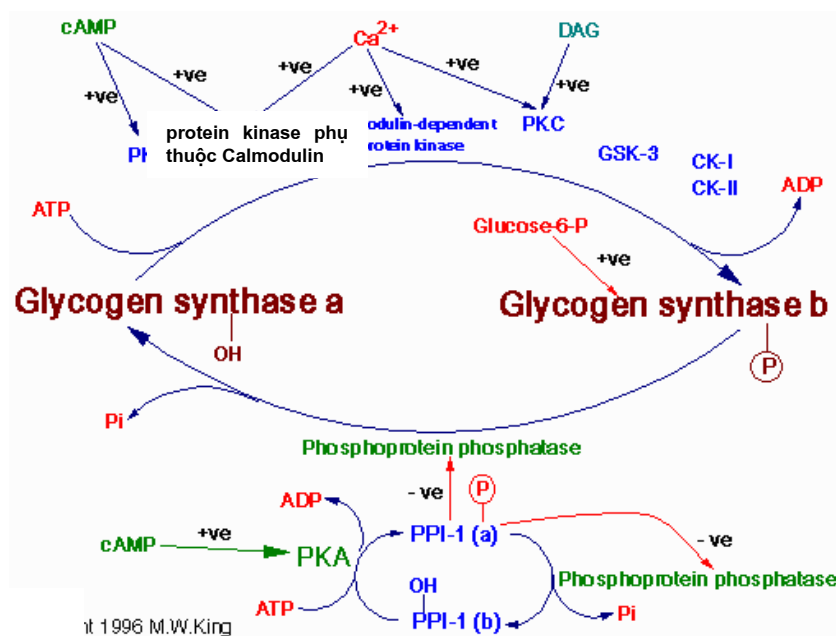
8.2.2 Sự điều hoà tổng hợp glycogen

Glycogen synthase là enzyme tổng hợp glycogen, tồn tại ở dạng tetramer và có 4 tiểu đơn vị giống nhau. Sự phosphoryl hoá các gốc Serine của các tiểu đơn vị này sẽ điều hoà hoạt tính của glycogen synthase. Ở trạng thái không phosphoryl hoá, enzyme có hoạt tính và không cần glucose-6-phosphate như một chất hoạt hoá và ngược lại. Hai dạng enzyme này là đồng nhất bởi cùng một hệ danh pháp khi được sử dụng cho glycogen phosphorylase. Dạng hoạt động không bị phosphoryl hoá là synthase-a, còn dạng phụ thuộc vào glucose-6-phosphate là synthase-b là dạng đã bị phosphoryl hóa (đã gắn phosphat) là dạng bất hoạt. Sự phosphoryl hoá synthase xảy ra để trả lời lại sự hoạt hoá hormon của PKA. Kinase của synthase phosphorylase cũng là enzyme phosphoryl hoá glycogen phosphorylase. Có ít nhất 5 enzyme phosphoryl hoá trực tiếp glycogen synthase. Trong số đó có PKA, một enzyme phosphoryl hoá glycogen synthase quan trọng, hoạt động độc lập với việc tăng nồng độ cAMP là GSK-3. Sự phosphoryl hoá của mỗi enzyme xảy ra ở các gốc Serine khác nhau.

Hoạt tính của glycogen synthase cũng có thể bị ảnh hưởng khi epinephrine liên kết với các thụ thể α -adrenergic thông qua con đường điều hoà glycogen phosphorylase.

Khi thụ thể α -adrenergic bị kích thích thì sự hoạt hoá của PLC-g và sự thủy phân PIP2 tăng lên. Sản phẩm của quá trình thủy phân PIP2 là DAG và IP3. DAG và ion Ca^{++} được giải phóng ra nhờ IP3 hoạt hoá PKC, enzyme phosphoryl hoá và bất hoạt glycogen synthase. Sự phản hồi của Ca^{++} là sự hoạt hoá PKC. Ảnh hưởng của quá trình phosphoryl hoá dẫn tới những hiệu quả sau:

1. Giảm ái lực của synthase đối với UDP-glucose.
2. Giảm ái lực của synthase đối với glucose-6-phosphate.
3. Tăng ái lực của synthase đối với ATP và Pi.



Hình 8.4.

Điều hoà tổng hợp glycogen thông qua con đường phosphoryl hóa và de-phosphoryl hóa (theo King, 1996).

GSK: protein kinase phụ thuộc vào calmodulin, là glycogen synthase kinase (enzym phosphoryl hóa glycogen synthase). CK I, II là 2 dạng Casein kinase.

- Glycogen synthase b dạng bất hoạt (-ve) là dạng đã được phosphoryl hóa.
- Về là ký hiệu khả năng hoạt hoá.

Sự chuyển hoá trở lại của synthase b bất hoạt thành synthase a là dạng hoạt động đòi hỏi sự khử phosphoryl hoá bởi PP1 (Phosphoprotein phosphatase). Hoạt tính của PP1 cũng chịu ảnh hưởng của insulin, một hormon tuyến tụy có tác dụng ngược lại với glucagon và epinephrine.

Insulin là một phân tử protein nhỏ bao gồm một chuỗi α có 30 acid amin liên kết với nhau bằng các cầu disulfide, và một chuỗi β dài 21 acid amin. Khi lượng đường trong máu tăng lên thì các tế bào β ở đảo tụy Langerhan sẽ tiết ra insulin để điều chỉnh. Người ta đã tìm ra tác dụng chính của insulin là:

1. Kích thích các sợi cơ xương hấp thụ glucose từ máu và chuyển hoá chúng thành glycogen, hấp thụ acid amin từ máu rồi chuyển hoá chúng thành các protein.
2. Kích thích các tế bào thận hấp thụ glucose từ máu và chuyển hoá chúng thành glycogen.
3. Ức chế các sản phẩm của enzyme có liên quan đến quá trình phân giải glycogen.
4. Kích thích việc hấp thụ glucose và quá trình tổng hợp của chất béo.

8.3 Insulin và các protein vận chuyển glucose

Hiện nay người ta đã tìm ra 12 loại protein vận chuyển glucose (Glucose Transporters – GLUT) được mã hoá trong genom của người và được ký hiệu là: GLUT 1, GLUT2, GLUT3, GLUT4... v.v. GLUT 1 có mặt ở tất cả các mô tế bào và có chức năng điều hoà tổng thể sự cân bằng hấp thu glucose. GLUT2 có mặt chủ yếu ở mô gan, đảo tụy và các mô ruột, GLUT3 có mặt ở mô não thần kinh, GLUT4 phổ biến ở các tế bào cơ xương, mô mỡ và tim. Đáng chú ý là nhờ các GLUT1 sự vận chuyển glucose từ ngoài tế bào vào hồng cầu tăng gấp 50 ngàn lần so với không có sự xúc tác của GLUT1. GLUT1 là một protein có khối lượng 45kDa, với 12 mảnh kỵ nước xoắn α xuyên qua màng lipid.

Vai trò của insulin là làm tăng cường hoạt động của GLUT4, trong khi đó GLUT2 thực hiện chức năng lấy đi sự dư thừa của glucose trong máu sau các bữa ăn chứa nhiều đường và điều hoà sự giải phóng insulin ở đảo tụy. Do đó sự hoạt động và tổn thương của các GLUT2, GLUT4 có liên quan chặt chẽ tới bệnh tiểu đường, đặc biệt là bệnh tiểu đường typ I. Quá trình vận chuyển glucose qua màng có thể được mô tả tương tự như một phản ứng enzym trong đó "cơ chất" là glucose ở ngoài màng tế bào (S-out) và "sản phẩm" của phản ứng là glucose bên trong tế bào (S-in) và enzym được coi là GLUT (ký hiệu T). Người ta đã thiết lập được phương trình tốc độ của quá trình vận chuyển glucose theo Michaelis-Menten :

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_{out}}{K_t + [S]_{out}}$$

Trong đó, v_0 là tốc độ tích lũy ban đầu glucose nội bào khi nồng độ của nó ở môi trường xung quanh là S_{out} và K_t là hằng số vận chuyển tương tự K_m trong phương trình Michaelis-Menten

GLUT 4 có mặt ở tế bào cơ xương và cơ tim, tế bào mô mỡ có hoạt động tăng lên nhờ tác dụng của insulin được phóng thích từ đảo tụy β vào máu. Cơ chế điều hoà sự hấp thụ Glucose từ máu đưa vào tế bào cơ và tế bào mô mỡ (để chuyển hoá thành triacylglycerol) sau bữa ăn nhiều chất đường (carbohydrate) nhờ hoạt động của GLUT 4 như sau: Giữa các bữa ăn chỉ có một số GLUT 4 có mặt trên bề mặt tế bào, nhưng chúng có rất nhiều ở trong các bóng màng bên trong tế bào. Khi nồng độ glucose trong máu tăng lên sau bữa ăn sẽ có tín hiệu insulin được phóng thích vào máu để làm giảm nồng độ glucose của máu. Thụ thể tiếp nhận insulin trên màng bằng cơ chế hoạt động tyrosine kinase của chính thụ thể truyền tín hiệu huy động các bóng màng chứa GLUT 4 di chuyển lên bề mặt màng bằng cơ chế dung hợp với màng sinh chất để bộc lộ các GLUT 4 với nồng độ cao trên bề mặt tế bào làm cho tốc độ thu nạp glucose của tế bào tăng lên 15 lần hoặc lớn hơn so với bình thường. Khi nồng độ insulin trong máu giảm đi, các GLUT4 bề mặt sẽ được di chuyển vào nội bào bằng cơ chế nhập bào (endocytosis) để tạo thành các bóng màng chứa GLUT 4 bên trong tế bào.

Trong bệnh tiểu đường typ I, do tế bào tụy đảo β bị phá huỷ nên tín hiệu tiết insulin bị mất, do đó khả năng hoạt động di chuyển của GLUT4 trên bề mặt tế bào không thực hiện được. Hậu quả là bệnh tiểu đường typ I xuất hiện. Trong trường hợp bệnh tiểu đường typ II, vai trò của thụ thể insulin không được thực hiện do bị tổn thương cấu trúc của các phần tiểu đơn vị có hoạt tính tyrosine kinase đã bị tê liệt hoặc đột biến cấu trúc hoặc do rối loạn chức năng trao đổi chất.

Tóm tắt chương 8

Thụ thể insulin là một enzym kinase xuyên màng bao gồm hai chuỗi α bộc lộ phía ngoài màng liên kết với hai chuỗi β cắm xuyên qua màng có hoạt tính kinase ở vùng tế bào chất. Các chuỗi α của thụ thể tiếp nhận insulin truyền tín hiệu gây ra hoạt tính kinase cho các chuỗi β .

Thụ thể insulin có vai trò điều hòa nồng độ glucose của máu khi nồng độ glucose vượt quá ngưỡng cho phép từ 0,12% (khoảng 6,0mM) bằng các tác dụng là kích thích tế bào cơ xương, tế bào thận hấp thụ glucose từ máu để chuyển thành glycogen, ức chế quá trình phân giải glycogen và kích thích việc hấp thụ glucose để tổng hợp các chất béo.

Bên cạnh đó quá trình điều hòa tổng hợp glycogen thông qua con đường dephosphoryl hóa glycogen synthase b dạng bất hoạt thành dạng glycogen synthase a (dạng hoạt động) do hệ thống enzym phosphoprotein phosphatase kiểm soát. Hoạt tính của enzym này chịu ảnh hưởng của insulin.

Chương 9

Receptor được hoạt hoá bằng chất tăng sinh peroxisom (PPAR)

PPAR là tên viết tắt của receptor được hoạt hoá bằng các chất kích thích tăng sinh peroxisom (peroxisom proliferator – activated receptor). Đây là một receptor thuộc về họ các receptor hormon nội bào, được phát hiện lần đầu tiên ở tế bào gan chuột vào năm 1990 bởi Issemann và Green.

Theo cách phân loại của Jiang và cs (1995), PPAR thuộc về nhóm II của các receptor dành cho hormon không phải steroid, chẳng hạn các receptor dành cho vitamin D và một số receptor orphenlin. Đây là những receptor nội bào tham gia vào quá trình phiên mã và được coi là các yếu tố phiên mã (transcription factor). Chúng được gắn vào vùng chức năng trên ADN ở vị trí được xác định theo kiểu lặp lại trực tiếp (DR) có trình tự nửa chuỗi là 5' AGGGTCA 3'. Như vậy receptor này có thể coi là bao gồm chủ yếu hai trung tâm liên kết, một trung tâm liên kết với ligand và một trung tâm liên kết với một vị trí của ADN liên quan đến quá trình phiên mã.

Thực tế gen mã hoá cho PPAR thuộc về họ multigen, tức là PPAR tồn tại nhiều dạng isoform khác nhau, mỗi isoform được mã hoá bởi một gen riêng biệt. Có 3 isoform khác nhau của PPAR được xác định ở người và chuột gồm PPAR α , PPAR β/δ và PPAR γ [Lemberger et al, 1996], trong đó PPAR γ còn được phân biệt thành $\gamma 1$ và $\gamma 2$ [Corton et al, 2002].

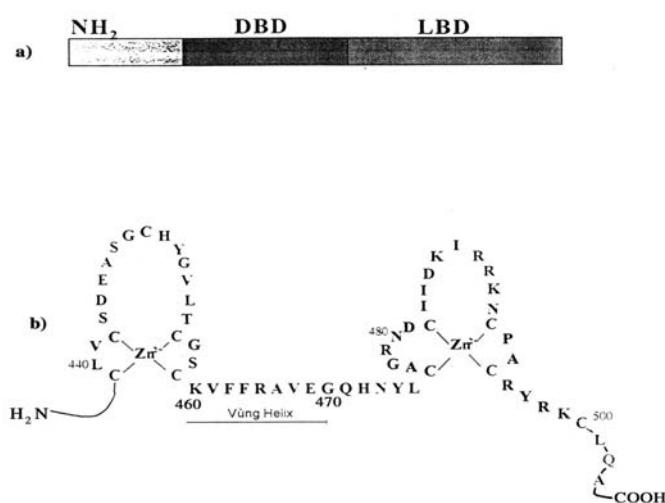
9.1 Cấu tạo phân tử PPAR

Những isoform khác nhau của PPAR đều đã được phân tích trình tự các acid amin của chuỗi polypeptid. Các isoform PPAR đều có sắp xếp trong một chuỗi polypeptid, tuy khác nhau về số lượng các acid amin nhưng chúng có mức độ tương đồng cao. Tổ chức các vùng chức năng trên chuỗi polypeptid PPAR tuân theo qui luật phân chia thành các vùng chức năng khác nhau. Một cách chi tiết, người ta phân chia cấu tạo của PPAR thành các vùng chức năng: A/B, C, D và E/F [Desvergne, Whali, 1999] (hình 9.1).

- Vùng A/B định cư ở đầu tận cùng N của chuỗi polypeptid. Đây chính là vùng đảm nhận chức năng hoạt hoá receptor trong một số tế bào mà không phụ thuộc vào ligand, được ký hiệu là vùng hoạt hoá 1 (activation function 1 – AF1).
- Vùng tận cùng C đóng vai trò liên kết với ADN ở vị trí đặc hiệu hay yếu tố đáp ứng trên phân tử ADN được gọi là PPRE (Peroxisom proliferator responsive element). Đây là vùng có tỉ lệ đồng nhất cao nhất giữa các isoform của PPAR về trình tự chuỗi peptid. Cũng giống như các receptor nội bào khác, vùng C của PPAR cũng có hai “ngón tay kềm”. Những “ngón tay kềm” này giúp cho receptor gắn được vào ADN ở vị trí đặc hiệu PPRE. Vùng PPRE này được cấu tạo bởi hai nửa theo kiểu nhắc lại trực tiếp cách một nucleotid (DR1) hoặc hai nucleotid (DR2). Vùng C, ngoài chức năng liên kết với ADN còn có vai trò trong việc tạo

dimer của PPAR với “đối tác” RXR cũng như trong việc liên kết với các yếu tố điều hoà phiên mã khác như coactivator hoặc corepressor.

- Vùng D là vùng rất hay thay đổi giữa các isoform. Vùng này không tham gia vào hoạt động chức năng của receptor mà chỉ có ý nghĩa như một vùng “khớp nối”.
- Vùng E hay còn gọi là vùng liên kết ligand LBD (ligand binding domain) đảm nhận chức năng gắn ligand vào PPAR để chuyển PPAR sang dạng hoạt động, sẵn sàng để gắn vào PPRE của ADN.
- Đầu C tận cùng chính là vùng hoạt hoá phụ thuộc vào ligand. Trên sơ đồ cấu tạo vùng này được ký hiệu bằng F hoặc AF - 2 (vùng hoạt hoá 2 – activation function 2’).



Hình 9.1

Sơ đồ cấu tạo chung của các receptor nội bào (a) và cấu tạo ngón tay kẽm của receptor glyocorticoid (b)

9.2 Các gen mã hoá cho PPAR

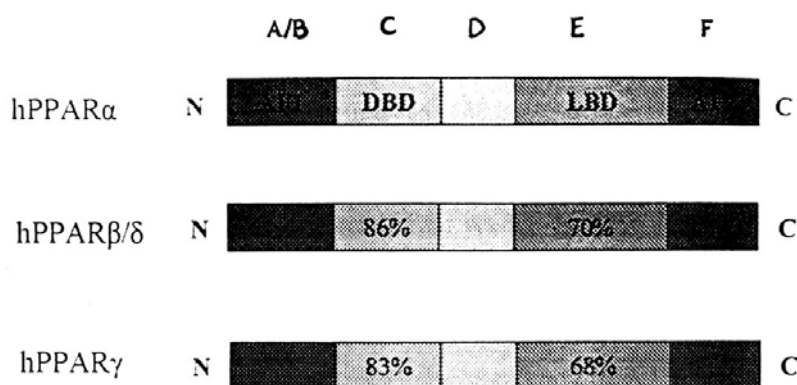
Như đã trình bày ở trên, PPAR thuộc về họ multigen. Trình tự của các gen PPAR cũng như vị trí của chúng đã được xác định. Qua những nghiên cứu về trình tự nucleotid của gen và trình tự chuỗi acid amin của protein cho thấy ở cả người và chuột, gen PPAR đều có sáu exon trong vùng dịch mã, được phân bố như sau: một exon cho đầu N tận cùng A/B, hai exon cho vùng DBD mỗi một exon tương ứng với một “ngón tay kẽm”, một exon cho vùng bản lề D và hai exon cho vùng LBD [Desvergne, whali, 1999].

Ở người, gen PPAR α (h PPAR α) được định cư trên nhiễm sắc thể số 22 trong vùng 22q12 – q13.1 [Sher. et.al, 1993], mã hoá cho protein 468 acid amin. Gen h PPAR δ nằm ở nhiễm sắc thể số 6 trong vùng 6p21.1 – p21.2 [Yoshikawa et.al, 1996], mã hoá cho một protein 361 acid amin (δ 1) và protein 441 acid amin [δ 2] (hình 9.2).

Gen h PPAR γ ở nhiều nhiễm sắc thể số 3 vùng 3425 [Greene et.al, 1995]. Biểu thị của gen h PPAR γ có điểm khác biệt rất lớn so với hai isoform PPAR còn lại. Gen hPPAR γ chịu sự chỉ huy của ba promoter khác nhau do đó cho ra sản phẩm là ba ARNm khác nhau nhưng từ các ARNm này sau khi dịch mã chỉ cho ra hai protein có 477 acid amin (PPAR γ 1) và 505

acid amin (PPAR γ 2). PPAR γ 1 có tám exon, trong đó hai exon A1 và A1 là hai exon đặc trưng cho γ 1 và không được dịch thành protein, 6 exon còn lại là 6 exon chung cho cả 3 ARNm. PPAR γ 2 có bảy exon, trong đó exon thứ nhất (exon B) gồm một phần không dịch mã và một phần mã hoá cho đoạn peptid đầu N tận cùng đặc hiệu của γ 2, 6 exon còn lại là 6 exon chung. Sự khác biệt về cấu tạo của gen PPAR γ được mô tả trong hình 9.3.

Các gen PPAR có sự biểu hiện đặc hiệu ở các mô khác nhau. Gen PPAR α biểu hiện chủ yếu ở các mô có khả năng oxi hoá acid béo mạnh như: gan, cơ tim, vỏ thận, cơ xương. PPAR γ biểu hiện chủ yếu ở mô mỡ trắng và nâu (hai mô dự trữ mỡ lớn nhất), ở tế bào của hệ miễn dịch (monocyte, macrophage), tế bào thành ruột và nhau thai, nhưng không biểu hiện ở cơ xương. PPAR δ được thấy biểu hiện khắp nơi, thường ở mức độ cao hơn so với hai isoform kia [Pascale, 2004].



Hình 9.2
Sơ đồ cấu tạo các isoform PPAR của người

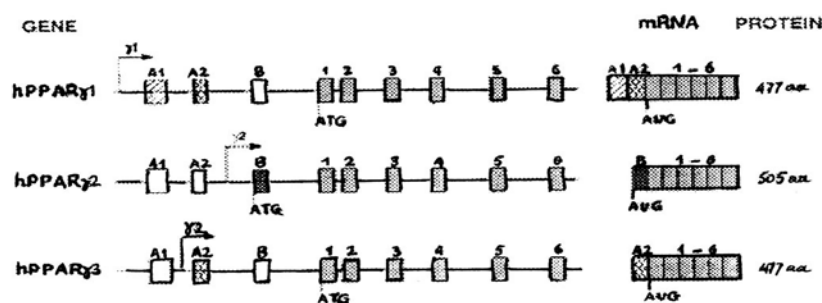
9.3 Vùng chức năng điều hoà trên ADN

PPRE (peroxisome proliferator responsive element) là một đoạn ADN nhỏ, có sự sắp xếp đặc biệt về trình tự các nucleotid, nằm phía trước điểm khởi đầu phiên mã của gen, đóng vai trò tiếp nhận và cho phép PPAR gắn vào.

PPRE được xác định lần đầu tiên nhờ vào chuỗi oligonucleotid tổng hợp và được mô tả bằng kiểu lặp lại trực tiếp với chuỗi AGGCTA -N-AGGTA(DR1).

PPRE tự nhiên được phát hiện khi phân tích promoter của gen acyl-CoA oxydase với trình tự chuỗi AGGCTA A AGGCTA [Tugwood và CS, 1992]. Sau đó một loạt PPRE tự nhiên khác được tìm thấy trong các gen chịu sự hoạt hoá của các chất kích thích peroxisome. PPRE luôn định cư phía trước điểm bắt đầu phiên mã, rất thay đổi giữa các gen với nhau.

So sánh giữa các trình tự chuỗi nucleotid thực tế của các PPRE tự nhiên đã được xác định, người ta nhận thấy rằng trình tự của những PPRE này không hoàn toàn giống với DR1 đã được xác định in vitro. Thực tế các PPRE tự nhiên là các đoạn lặp lại giả trực tiếp “pseudo-direct repeat”. Thậm chí nhiều PPRE còn khác biệt đến mức khó nhận ra đó là một “pseudo-direct repeat”, ví dụ như PPRE trong gen mã hoá cho enzym malic với chuỗi AGGCTA A AGGCTA [Upenber và CS, 1997].



Hình 9.3

Cấu tạo gen PPAR của người (hPPAR γ) (Theo Greene và cs, 1995)

Một số ý kiến cho rằng sở dĩ các PPRE có cấu tạo không hoàn toàn tuân theo DR1 là do áp lực của phức hợp PPAR-RXR với PPRE còn được quyết định bởi các nucleotid bên cạnh “vùng lõi-core” DR nhất là các nucleotid về phía đầu 5’ của chuỗi ADN so với DR.

Bảng 9.1

Trình tự của PPRE ở một số gen chịu sự tác động của PPAR

Gen	Trình tự PPRE
Enzym malic	GGGTCA A AGTTGA
AcylCoA oxydase	AGGACA A AGGTCA AGGTAG A AGGTCA AGGTCA C TGGTCA
AcylCoA synthetase	AGGGCA T CAGTCA
Apolipoprotein A – II	AGGGTA A AGGTTG
Apolipoprotein C – II	TGGTCA A AGGTCA
Adipocyte lipid – binding protein	GGATCA G AGTTCA
CYP 4A1	AGGGTA A AGTTCA
CYP 4A6	AGGACA A AGGCCA AGGGCA A AGTTGA
EnoylCoA hydratase	AGGTAA T AGTTCA
* Lipoprotein lipase	GGGGGA A AGGTCA
AcylCoA dehydrogenase	GGGGTA A AGGTCA
3 – hydroxy – 3 – methylglutaryl -	GGGCCA A AGGTCT
CoA synthetase mitochondrie	
Phospoenoylpyruvat	CGGCCA A AGGTCA
carboxykinase-1	
Phosphoenoylpyruvat	GGGATA A AGGTCT
Carboxykinase-2	

Hơn nữa sự biến thiên về cấu tạo PPRE cũng phù hợp với sự tồn tại của các isoform PPAR khác nhau.

9.4 Tương tác của PPAR với các protein điều hoà khác

Thực tế một mình PPAR đơn độc không thể gắn vào PPRE. Giống như các receptor thyroid acid Retinoic (RAR) và receptor Vitamin D (TR), receptor PPAR phải được kết hợp với receptor RXR (receptor của 9 cis-retinoic acid) dưới dạng heterodimere trước khi gắn vào PPRE. Phức hợp heterodimere giữa RXR với một receptor khác khi gắn vào vùng chức năng sẽ tạo cho mỗi receptor chiếm một nửa của cấu trúc phức hợp RAR_RXR, TR_RXR hoặc VDR_RXR khi gắn vào vùng chức năng thì RXR chiếm lĩnh vị trí thuộc về đầu 3', còn receptor (RAR, TR, VDR) chiếm lĩnh nửa về phía đầu 5' của DR (Permal, et al, 1993, towers, et al, 1993). Ngược lại, phức hợp PRAR_RXR hoặc khi VDR_RXR gắn vào PPRE thì PPAR chiếm lĩnh phần thuộc về đầu 3', còn RXR chiếm lĩnh phần thuộc về đầu 5'.

Do vai trò “đôi tác” cho nhiều receptor nội bào khác nhau nên RXR xuất hiện khả năng tương tác qua lại (cross-talk) về hoạt động với các receptor. Chẳng hạn như sự cạnh tranh để gắn vào vùng chức năng, bị hoạt hoá bởi ligand của RXR. Thêm nữa “cross-talk” giữa PPAR với các receptor nội bào khác còn được thể hiện qua các chất đồng kìm hãm (corepressor) hoặc đồng hoạt hoá (coactivator) dùng chung. Cũng giống như hầu hết các receptor nội bào, hoạt động của PPAR được kiểm soát bởi các yếu tố điều hoà đã được biết đến kiểu 2 nhóm là các coactivator, corepressor. Coactivator và corepressor có vai trò như một cầu nối protein giữa receptor với bộ máy phiên mã tương ứng nhằm làm tăng hoặc giảm tốc độ phiên mã. Một loạt các protein gắn vào PPAR đã được phân lập và thấy rằng chúng làm tăng hoạt động của gen thông báo (reporter gene) trung gian qua PPAR. Những coactivator này gồm: p300/CBP [Dowell và CS, 1997], [Henry và CS, 1998]. Vai trò của SRC-1 đối với hoạt động của PPAR α đã được chứng minh in vivo bằng cách sử dụng chuột knock-out. Khi gen đã mã hoá cho SRC-1 ở chuột bị bất hoạt thì những gene chịu sự tác động của các receptor đồng vận PPAR α ở gan của chuột đó không còn bị kích thích bởi các ligand này nữa (Qi et.al, 1999).

Liên quan tới corepressor của PPAR, có hai corepressor đã được xác định đó là N-COR hoặc RIP13 và SMRT hoặc TRAC [Zamir, et.al, 1999].

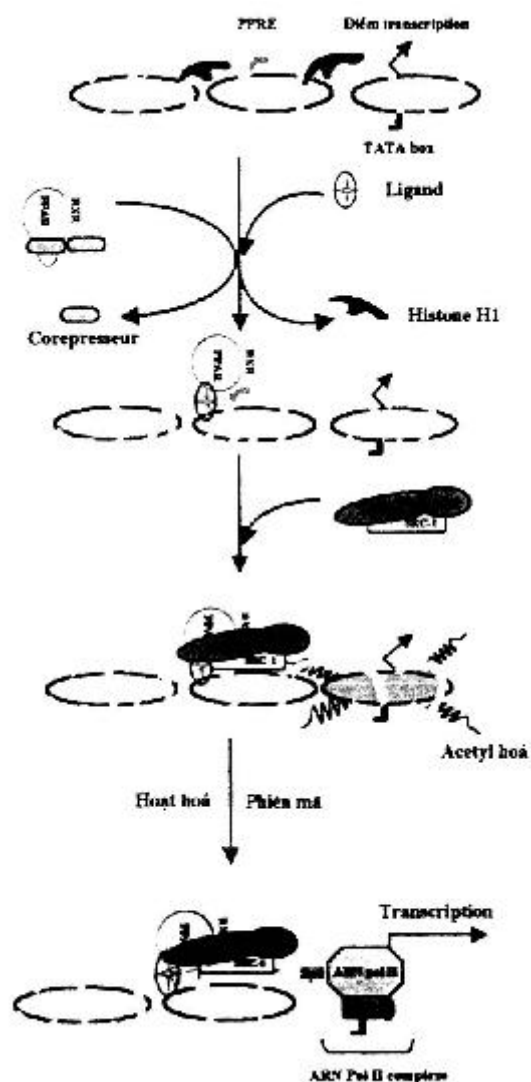
Vùng điều khiển ở gen đích của PPAR ở trạng thái không hoạt động.

PPAR định cư trong nhân dưới dạng heterodimere không hoạt động với RXR được gắn với corepressor.

Khi ligand gắn vào PPAR, corepressor được tách ra tạo thành phức hệ (ligand-PPAR-RXR) gắn tiếp vào PPRE. Tương tác này làm thay đổi cấu trúc chất nhiễm sắc ở vùng promoter của gene, làm Histon H1 tách ra.

Phức đồng hoạt hoá (p300/CBP, SRC...) và acetyltransferase được đưa tới và gắn vào ADN tại vị trí PPRE. Tương tác này giúp acetyl hoá các Histone còn lại. Promoter của gene lúc này chuyển thành dạng hoạt động để đón nhận yếu tố phiên mã.

Yếu tố điều hoà phiên mã như Spl, TBP, TFIIX và ARN polymerase II gắn vào promoter giúp phiên mã bắt đầu.



Hình 9.4
Sơ đồ tóm tắt cơ chế hoạt động của PPAR (theo Kliewer, et al. 2001)

9.5 Chức năng sinh học của PPAR

Những dấu hiệu đầu tiên để biết về chức năng sinh học của PPAR chính là việc phát hiện ra vai trò trung gian của PPAR α trong quá trình kiểm soát β -oxi hóa ở peroxisom gan (Dreyer et al, 1992, Tugwood et al, 1992) và vai trò của PPAR γ trong chuyển hóa chất béo (Tontonoz et al, 1994). Tiếp theo, những gen đích của PPAR được xác định đều tập trung ở gan và mô mỡ, hơn nữa nhưng gen này còn giữ vai trò chìa khóa trong chuyển hóa lipid đã chỉ ra rằng vai trò sinh học hàng đầu của PPAR là chuyển hóa lipid.

9.6 PPAR giữ vai trò điều hòa chuyển hóa lipid

Để thuận lợi cho việc phân tích vai trò của PPAR trong chuyển hóa lipid, chúng ta có thể tóm lược lại quá trình chuyển hóa lipid. Acid béo ở động vật có thể được tổng hợp từ sự thoái hóa lipid, hydrat carbon hoặc acid amin. Tuy vậy chủ yếu acid béo được hấp thu trực tiếp từ

thức ăn. Để có thể hấp thu được vào tuần hoàn trước hết triglycerid được thủy phân trong lòng ruột, sau đó được ester trở lại ở tế bào nội mạc. Lipid được đưa vào tuần hoàn qua hệ mạch bạch huyết dưới dạng hạt nhỏ (chylomicron) gồm triglycerid, cholesterol và lipoprotein. Lipase ở màng trong của tế bào mạch bạch huyết sẽ thủy phân triglycerid thành các acid béo và các acid béo này sau đó được đưa đến tế bào đích. Phần còn lại của chylomicron giàu cholesterol sẽ được đưa đến gan. Những acid béo trong máu không được ester hóa sẽ được vận chuyển bằng albumin.

Nguồn gốc của các acid béo này bắt nguồn từ thủy phân lipid ở các mô mỡ nhờ tác dụng kích thích của catecholamin hoặc glucagon.

Số phận của acid béo ở gan và tùy thuộc vào nhu cầu năng lượng. Khi năng lượng dư thừa, chúng sẽ được ester hóa để tạo lại triglycerid và giải phóng vào tuần hoàn dưới dạng lipoprotein tỷ trọng rất thấp (VLDL). Acid béo trong thành phần của VLDL được giữ lại ở các mô mỡ dưới dạng dự trữ. Ngược lại, khi nồng độ acid béo trong máu cao, nồng độ hydratcarbon thấp thì chúng được oxi hóa để tạo thành các thể ceton, đây chính là nguồn năng lượng cung cấp cho não, cơ, thận và các cơ quan ngoại vi khác. Như vậy, gan là cơ quan điều hòa nồng độ của ba hợp phần lipid trong tuần hoàn: acid béo tự do, triglycerid và thể ceton. Mô mỡ là cơ quan thứ hai giữ vai trò quan trọng trong việc điều hòa chuyển hóa lipid.

Do PPAR là receptor có nhiều isoform nên chức năng điều hòa chuyển hóa lipid của PPAR dưới góc độ từng isoform riêng biệt cũng khác nhau. Vai trò của PPAR α đối với chuyển hóa lipid được thể hiện ở tác động của PPAR α lên:

- Hấp thu acid béo và vận chuyển lipoprotein.
- Oxi hóa acid béo
- Chuyển hóa cholesterol

Ở ruột, acid béo hoặc thức ăn giàu fibrat (những ligand của PPAR α) cảm ứng biểu thị các protein gắn acid béo như các protein liên kết acid béo (I-FABP hoặc L-FABP) (Poirrier et al, 1997). Như vậy, PPAR α kiểm soát sự hấp thu acid béo vào mạch bạch huyết trước đây đã được giả thiết nhưng gần đây người ta mới phát hiện ra rằng có thể là PPAR α đã liên kết với ligand thực sự của L-FABP ở ruột.

Ở gan, khi PPAR α được hoạt hóa sẽ cảm ứng biểu thị các protein vận chuyển acid béo và acyl-CoA synthase mạch dài (Motojima et al, 1998; Schoonjan et al 1995). Một số enzym chìa khóa trong quá trình β -oxi hóa ở peroxisom như acyl-CoA oxidase cũng là đích trực tiếp của PPAR α (Dreyer, et al, 1992). β -oxi hóa ở peroxisom không trực tiếp cung cấp năng lượng nhưng nó có tác dụng cắt ngắn các acid béo mạch dài để sau đó chúng đi vào β -oxi hóa ở ty thể.

Liên quan đến β -oxi hóa ở ty thể, carnitine palmitoyl transferase I, một enzym đóng vai trò kiểm soát tốc độ của con đường cũng là đích trực tiếp của PPAR α . Acyl-CoA dehydrogenase, một enzym mấu chốt trong β -oxi hóa ở ty thể và hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, enzym cần thiết để tổng hợp ceton cũng được kích thích biểu thị khi PPAR α được hoạt hóa.

Tác dụng kích thích của PPAR α tạo biểu hiện hoạt tính của gen pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK 4) đã được ghi nhận ở cơ xương chuột và người. PDK4 là một kinase đóng vai trò phosphoryl hóa và bất hoạt pyruvate dehydrogenase. Vai trò sinh học của pyruvate dehydrogenase là enzym chuyển hóa pyruvate acetyl CoA, chuyển tiếp oxi hóa hiếu khí glucose ở chu trình tricarboxylic (chu trình Krebs). Khi enzym này bị bất hoạt ở cơ xương thì carbon của glucose từ quá trình oxi hóa sẽ được tổng hợp thành lactat, cuối cùng carbon glucose có thể được dự trữ bằng cách tân tạo glucose ở gan.

Để chứng minh vai trò của PPAR ở mức độ phân tử, người ta đã tạo ra “dòng chuột knock-out” với PPAR α . Bằng kỹ thuật này, người ta khẳng định rằng một loạt các enzym cần thiết cho quá trình hoạt hóa acid béo ở gan, quá trình oxi hóa ở peroxisom và ở ty thể (mitochondrie) thực sự là các đích tác dụng của PPAR α . Kỹ thuật knock-out còn cho phép hiểu biết về chức năng của PPAR α đối với chuyển hóa lipid ở tim. Khi chuột bị bất hoạt gen PPAR α , khả năng oxi hóa acid béo giảm đi và ít nhất 7 enzym chuyển hóa acid béo ở ty thể biểu thị ở mức thấp hơn so với bình thường. Hơn nữa những chuột này bị tổn thương cơ tim và xơ hóa mạch.

Tóm lại, PPAR α đóng vai trò chìa khóa cho thoái hóa lipid do tác động lên các gene mã hóa cho các enzym cần thiết để thoái hóa lipid.

9.7 Vai trò của PPAR γ

Mặc dù vai trò của PPAR γ chưa rõ ràng như PPAR α nhưng PPAR γ thực sự cũng có tác động lên chuyển hóa lipid. Thực vậy, PPAR γ được thấy liên kết vào vùng hoạt hóa tăng cường (enhancer) của gen ap2 (apolipoprotein2), gen mã hóa cho protein liên kết acid béo đặc hiệu ở mô mỡ. Hơn nữa gen PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), một gen có đặc tính giúp trưởng thành tế bào mô mỡ sẽ được cảm ứng khi mà PPAR γ được hoạt hóa bằng các ligand tổng hợp. Đối với gen PEPCK người ta còn nhận thấy vùng PPRE trong promoter của gen chỉ hoạt động ở tế bào mô mỡ mà không hoạt động ở tế bào gan. Tontonoz và cs cũng chỉ ra rằng sự biểu thị PPAR γ có khả năng thúc đẩy quá trình biệt hóa nguyên bào sợi fibroblast thành tế bào mô mỡ trưởng thành. Sự kích thích đặc biệt PPAR γ làm tăng cường quá trình biệt hóa tế bào mô mỡ non thành tế bào trưởng thành trong vài ngày ở chuột, cũng như biệt hóa tế bào mô mỡ người nuôi cấy. Tác dụng kích thích biệt hóa này không xuất hiện với những ligand đặc hiệu của PPAR α . Tác dụng kích thích biệt hóa tế bào của PPAR γ làm tăng số lượng tế bào mô mỡ trưởng thành và như vậy làm tăng khả năng dự trữ mỡ.

Quá trình dự trữ mỡ ở tế bào mô mỡ được kích thích bởi PPAR γ có thể hình dung thành các giai đoạn như sau:

- Giải phóng acid béo từ triglycerid trong hợp phần của lipoprotein bằng cách hoạt hóa lipoprotein lipase (Schoonjan et al, 1996).
- Vận chuyển acid béo vào trong nội bào nhờ ap2.
- Hoạt hóa acid béo bởi acyl-CoA synthase.
- Và ester hóa acid béo bằng cách kích hoạt PEPCK.

Như vậy, khác với PPAR α , PPAR γ có vai trò đối với chuyển hóa lipid ở giai đoạn dự trữ acid béo ở mô mỡ vì nó làm tăng cả hai quá trình: vận chuyển acid béo đến tế bào mô mỡ và chuyển acid béo thành dạng ester để dự trữ.

9.8 Những vai trò sinh học khác của PPAR

PPAR bên cạnh vai trò điều hòa chuyển hóa lipid như đã trình bày ở trên, một loạt nghiên cứu còn cho thấy PPAR có vai trò trong một số quá trình khác, chẳng hạn như chuyển hóa glucid, trong quá trình viêm, trong ung thư cũng như trong việc kiểm soát phân bào.

9.9 PPAR và tính nhạy cảm insulin

Chuyển hóa glucose liên quan mật thiết tới hoạt động của insulin cũng như tính nhạy cảm của receptor insulin với hormon. Cho dù lượng hormon không thiếu nhưng receptor insulin kém đáp ứng (insulin resistance) thì vẫn đưa đến tình trạng rối loạn chuyển hóa glucose mà biểu hiện là đái tháo đường. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy receptor PPAR có vai trò trong việc làm giảm tính đề kháng insulin.

Thử nghiệm trên chuột đã bất hoạt gen PPAR α (PPAR α -null mice) nhận thấy không có sự thay đổi có ý nghĩa về khả năng nhạy cảm với insulin. Ngược lại, khi kích thích PPAR α ở chuột kháng insulin thì tính nhạy cảm insulin được cải thiện và chất béo ở phủ tạng giảm đi. Hiện tượng này có thể giải thích do sự điều chỉnh cân bằng về chuyển hóa. Người ta đã biết được rằng acid béo nội bào và những dẫn chất của nó cản trở chuyển hóa glucose do có sự cạnh tranh về chất chuyển hóa hoặc do tác động lên con đường tín hiệu của insulin. Một khi PPAR α được hoạt hóa sẽ tăng cường oxy hóa acid béo và như thế sẽ giảm thiểu ảnh hưởng của acid béo lên chuyển hóa glucose.

Một số dẫn chất của thiazolidinedione (TZD) là những tác nhân chống đái tháo đường type 2 rất mạnh. Chúng có tác dụng làm giảm đường huyết, giảm insulin huyết và triglycerid trong máu ở cả động vật thực nghiệm và bệnh nhân bị đái tháo đường type 2. Mối liên quan giữa PPAR γ và tính nhạy cảm insulin xuất phát từ phát hiện rằng các TZD là những ligand rất mạnh và đặc hiệu của PPAR γ . Sau đó thì mối liên quan này đã được thừa nhận. Nhưng cho đến nay thực sự còn nhiều điều cần phải được làm sáng tỏ liên quan đến cơ thể làm tăng tính nhạy cảm insulin của PPAR γ . Ví dụ bằng cách nào PPAR γ tác động lên receptor insulin ở cơ khi nó chỉ hiện diện chủ yếu trong tế bào mô mỡ và gần như không có mặt ở cơ.

9.10 PPAR và phản ứng viêm

Một số sản phẩm chuyển hóa trung gian của lipid, đặc biệt là các eicosanoid như prostaglandin, leucotrien, lipoxim và thromboxin có nhiều tác động lên đáp ứng sinh lý của cơ thể nhất là đối với việc kích thích hoặc ức chế phản ứng viêm. Vai trò của PPAR đối với quá trình viêm được làm rõ khi mà phát hiện ra rằng leucotrien B₄, một eicosanoid tiền viêm là ligand của PPAR α và có khả năng tự cảm ứng chuyển hóa nó.

Cơ chế phân tử đối với tác động của PPAR lên quá trình viêm đã được nghiên cứu rất nhiều. Một số tác giả đã chỉ ra rằng, nhiều ligand của PPAR α ức chế sự tiết IL6 được kích thích bởi IL1 β cũng như ức chế sự sản xuất 6-keto-prostaglandin. Những agonist của PPAR α làm giảm biểu thị gen chịu sự điều hòa của cytokin gây viêm [46;511] bằng cách điều hòa âm giai đoạn phiên mã (transcription) (Stael et al, 1998; Delerive et al, 1999).

Các tác động khác của PPAR lên quá trình viêm là tương tác ức chế của PPAR α với con đường tín hiệu viêm trung gian qua NF κ B. PPAR α có khả năng liên kết vật lý với NF κ B để ức chế factor này. Ngoài tương tác vật lý, PPAR α còn tác động lên gen I κ B làm tăng biểu thị protein I κ B, một khi I κ B tăng sẽ ức chế NF κ B (Delerive et al, 2000).

PPAR α không phải là thành viên duy nhất trong họ PPAR tham gia điều hòa quá trình viêm. PPAR γ cũng có vai trò trong điều hòa này. Tuy nhiên cơ chế cụ thể về tác động của PPAR γ lên quá trình viêm chưa được rõ ràng như với PPAR α , dường như PPAR γ ức chế đối với các con đường tín hiệu trung gian bởi AP-1, NF κ B và có vai trò truyền dẫn tín hiệu và hoạt hóa phiên mã (STAT).

9.11 PPAR với khả năng sinh ung thư và kiểm soát phân bào

Tác động của PPAR đối với ung thư đã được làm rõ trên chuột. Rõ ràng rằng các chất kích thích peroxisom chính là nguyên nhân làm tăng tỉ lệ ung thư gan ở chuột thực nghiệm. Các tác giả cũng giải thích rằng sở dĩ có sự tăng tỉ lệ ung thư như vậy là do tăng sự trưởng tế bào và tăng tạo ra gốc peroxyd.

Nefenofine, một chất kích thích peroxisom ức chế sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào gan loài gặm nhấm nuôi cấy. Hơn nữa, sự biểu thị của những gen như kinase 1, kinase 4 phụ thuộc cycline, cycline D1 và c-myc có liên quan ít nhiều đến PPAR α .

Khác với chuột, chưa có dấu hiệu nào về mối liên hệ của PPAR α với tính sinh ung thư ở người. Sự khác nhau giữa các loài về vai trò của PPAR α đối với sinh ung thư có thể, theo như Tugwood và cs (1998), là do sự khác nhau về mức độ biểu thị của isoform này ở gan (biểu thị PPAR α ở gan người chỉ bằng 10% so với ở gan chuột).

Liên quan đến PPAR γ ở người, isoform này có khả năng ngừng cảm ứng phân bào. Shao và Lazar (1997) đã chứng minh rằng khi biểu thị đồng thời PPAR γ và C/EBP thì tế bào 3T3-L1 ngừng phân bào để biệt hóa thành tế bào mô mỡ. Vai trò làm ngừng phân bào của PPAR γ còn được chứng minh trên tế bào liposarcome người nuôi cấy. Ở những tế bào này có sự biểu thị rất mạnh PPAR γ và chúng chuyển sang dạng biệt hóa khi có kích thích của các ligand PPAR hoặc RXR. Ngoài ra, hoạt hóa PPAR γ ở những dòng tế bào động vật đưa đến giảm phân bào và khả năng tạo thành các đám tế bào, giảm rất nhiều sự biểu thị gen *bel-2* và tăng quá trình apoptosis. Theo như Xin và cs (1999) sự ức chế phân bào trung gian qua PPAR γ có thể được đưa đến từ đặc tính anti-angiogenesis của các ligand PPAR.

Ngược lại với những kết quả ở trên, một số tác giả thấy rằng trên mô hình nghiên cứu là chuột có đột biến ở gen APC, khi PPAR γ hoạt hóa sẽ làm tăng tỉ lệ ung thư trực tràng.

Như vậy, vai trò PPAR trong ung thư còn tiếp tục phải được làm sáng tỏ. Những dữ liệu lâm sàng cho thấy ligand của PPAR α không phải là nguyên nhân trực tiếp gây ra ung thư gan. Những thông tin liên quan tới PPAR γ chưa cho phép kết luận một cách chính xác vai trò của isoform này trong ung thư.

9.12 Một số dược phẩm tác dụng lên PPAR

9.12.1 Dẫn chất của Fibrate

Từ năm 1966 các dẫn chất fibrate đã được thử nghiệm trên lâm sàng về hiệu quả hạ lipid máu. Sau đó cho dù cơ chế tác dụng của thuốc chưa rõ ràng nhưng một số dẫn chất như clofibrate, bezafibrate và fenofibrate vẫn được đưa vào áp dụng điều trị cho bệnh nhân có chỉ số lipid trong máu cao. Một số tác giả cho rằng các fibrate có tác dụng hạ lipid máu do tương tác với những enzym cần thiết trong quá trình chuyển hóa lipid. Đến năm 1990 khi mà

Issermann và Green (1990) phát hiện ra rằng clofibrate và những dẫn chất fibrate khác hoạt hóa receptor PPAR thì cơ chế tác dụng của các fibrate dần dần được sáng tỏ.

Trên chuột, người ta nhận thấy rằng fibrate thông qua hoạt hóa PPAR α làm cảm ứng rất mạnh sự oxi hóa acid béo ở peroxisom gan. Như vậy lượng acid béo trong máu giảm đi. Thêm nữa, thông qua PPAR α các fibrate còn cảm ứng tăng biểu thị protein liên kết acid béo ở gan, một protein nội bào cần thiết cho vận chuyển và thoái hóa lipid. Fibrate cũng làm tăng biểu thị của apolipoproteinAI và apolipoproteinAII, những protein chủ yếu trong thành phần của lipoprotein tỷ trọng cao HDL, làm nhiệm vụ vận chuyển acid béo từ các tổ chức ngoại vị về gan. Ngoài ra, thông qua PPAR α , fibrate ức chế biểu thị apolipoproteinCIII, một hợp phần của lipoprotein giàu triglycerid và là chất ức chế lipoprotein lipase.

Đối với người, những gen mã hóa cho các enzym và protein cần thiết như đã trình bày ở trên vẫn đều là các đích tác dụng của PPAR α . Như vậy khi PPAR α được hoạt hóa bởi fibrate thì sẽ có tác dụng lên các gen đích này. Có một chút khác biệt về mức độ biểu thị của PPAR α ở gan chuột và gan người, lượng ARNm PPAR α ở gan người thấp hơn nhiều so với gan chuột. Mặc dù biểu thị thấp nhưng vai trò của PPAR α đối với chuyển hóa lipid vẫn thể hiện rõ ràng. Lambe và cs (1999) đã chỉ ra rằng khi loại bỏ vùng PPRE ở gen acyl-CoA oxydase thì mất hẳn đáp ứng của gen này, kể cả trên người. Helen Vosper và cs (2002) cho rằng thực sự thì các fibrate vẫn thông qua PPAR để làm giảm lipid máu nhưng về tác dụng cụ thể từng giai đoạn của quá trình có khác biệt về mức độ so với trên chuột. Chẳng hạn như khác biệt về ái lực liên kết của ligand với PPAR α để cuối cùng đến các gen đích cần thiết làm hạ lipid máu có sự bù trừ để cuối cùng thu được một tác dụng hạ lipid tương đương của fibrate trên người và chuột.

Hơn nữa, để hạ lipid máu, ngoài tác dụng vào giai đoạn oxi hóa ở peroxisom gan còn có thể tác động vào oxi hóa ở mitochondrie, cũng như vào quá trình điều hòa lipoprotein.

9.12.2 Các dẫn chất của Thiazolidinedione

Hiện tại, các dẫn chất của thiazolidinedione (Troglitazone, Pioglitazone và Rosiglitazone) được chứng minh rằng có tác dụng hạ đường huyết, hạ insulin huyết và hạ triglycerid trên cả động vật thực nghiệm và người. Hiện tại chúng tạo thành một nhóm thuốc mới đặc hiệu để điều trị bệnh đái tháo đường type2. Những thuốc này đã được chứng minh là các agonist mạnh của PPAR γ , ái lực liên kết của các thuốc này với PPAR γ vào khoảng 100nmol/l. Khi các agonist này gắn với PPAR γ chúng làm tăng tính nhạy cảm của các mô với insulin, do vậy chúng tăng cường khả năng nhạy cảm của các mô với insulin, do vậy chúng tăng cường sử dụng glucose và đưa đến làm giảm lượng glucose trong máu. Tài liệu dược điển chuyên môn về thuốc như VIDAL 2004, đã thừa nhận cơ chế tác dụng của các thiazolidinedione như đã được tóm tắt ở trên. Tuy vậy sự biểu của PPAR γ không đồng nhất ở các mô, isoform này biểu thị mạnh ở mô mỡ, ít hơn ở gan và rất ít có ở cơ xương. Trong khi đó cơ xương lại là cơ quan tiêu thụ glucose nhiều nhất. Như vậy câu hỏi được đặt ra là bằng cách nào khi thiazolidinedione (TZD) kích thích PPAR γ ở mô mỡ lại có thể làm tăng tính nhạy cảm insulin ở cơ xương. Theo như một số tác giả cho biết thì khả năng làm tăng tính nhạy cảm insulin của PPAR γ là sự kết hợp giữa tác dụng trực tiếp và gián tiếp.

9.13 PPAR γ tăng quá trình tích lũy tế bào mỡ

Tác dụng trực tiếp có thể hình dung bằng tác động tăng biểu thị gen vận chuyển glucose phụ thuộc insulin (GLUT4) (Wu et al, 1998), từ đó làm tăng chuyển glucose thành acid béo.

Tác dụng gián tiếp thông qua khả năng kích thích dự trữ lipid vào mô mỡ của PPAR γ . Khi đó lượng acid béo tiêu thụ ở các mô ngoại vi, như cơ xương chẳng hạn bị giảm đi và các mô này phải tăng cường sử dụng glucose để bù vào năng lượng thiếu hụt. Thêm nữa kích thích PPAR γ bởi TZD làm tăng biểu thị adiponectin mà protein này có tác dụng làm tăng tính nhạy cảm insulin và sự sử dụng glucose.

Hiện tại, rosiglitazone và pioglitazone đang được áp dụng điều trị cho những bệnh nhân đái tháo đường type II. Chúng có thể được chỉ định đơn độc hoặc kết hợp với metformine hoặc các sulfamid hạ đường huyết. Khi điều trị cần xác định độc tính của thuốc với gan (chỉ thị enzym gan).

Tóm tắt chương 9

Thụ thể PPAR là một thụ thể nội bào có thể biểu hiện nhiều dạng isoform khác nhau đã được xác định ba dạng ở chuột và người là PPAR α , PPAR β/δ và PPAR γ . Đó là một chuỗi polypeptid có bốn vùng chức năng khác nhau. A/B, C, D và E/F vùng A/B định vị ở tận cùng N đảm nhận chức năng hoạt hóa receptor, vùng C là vùng có hai ngón tay kềm có chức năng liên kết với vị trí đặc hiệu PPRE nằm trên ADN. Vùng E là vùng liên kết với ligand (dạng agonist hay antagonist) để chuyển thụ thể sang dạng hoạt động hay dạng bị kim hãm. Đầu C tận cùng của thụ thể, chứa đựng vùng F là vùng hoạt hóa phụ thuộc vào ligand. Bên cạnh đó vùng D, là trình tự đa dạng hóa (Diversity) cho các isoform thụ thể khác nhau.

Cơ chế hoạt động chung của các PPAR là khi liên kết với ligand, PPAR có thể tương tác với nhiều loại protein điều hòa khác tạo các phức hệ ligand – PPAR-RXR gắn vào PPRE đặc hiệu trên ADN làm thay đổi cấu trúc nhiễm sắc thể hoạt hóa tháo bỏ các histon chuyển gen thành dạng hoạt động. Các yếu tố điều hòa phiên mã khác như Spl, TBP, TFIIX giúp cho ARN polymerase II gắn vào promoter mở đầu cho quá trình phiên mã.

Trong các PPAR, PPAR α được nghiên cứu nhiều nhất tiếp đó là PPAR γ . PPAR có vai trò quan trọng trong kiểm soát β oxy hóa acid béo ở peroxisom trong chuyển hóa chất béo nói chung như: hấp thụ acid béo, vận chuyển lipoprotein, oxy hóa acid béo và chuyển hóa cholesterol.

Các PPAR nói chung có mối quan hệ với việc làm giảm tính đối kháng của insulin, nhưng điều này vẫn còn đang tiếp tục nghiên cứu. Tuy nhiên, một số dạng thuốc được thiết kế như là những agonist có tác dụng chuyển hóa nhanh lipid và làm giảm béo phì. Các PPAR cũng có mối quan hệ với ung thư, với hiện tượng và cơ chế viêm. Vấn đề này vẫn đang được nghiên cứu.

Chương 10

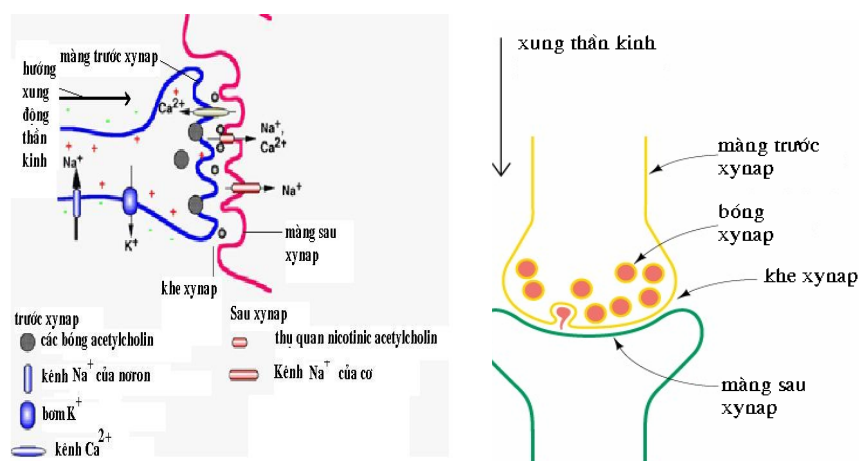
Thụ thể acetylcholin và sự truyền xung thần kinh

10.1 Màng synap thần kinh neurotransmitter

Trong quá trình phát sinh chủng loại, ở các động vật đơn bào chưa có hệ thần kinh. Cơ thể liên hệ với môi trường bên ngoài thông qua dịch nội bào. Đó chính là điều hoà thể dịch mà bản chất của nó là các quá trình hoá học.

Về sau, trong quá trình tiến hoá ở những động vật đa bào hệ thần kinh xuất hiện và phát triển dần từ thấp đến cao, ngày càng hoàn chỉnh về cấu tạo và chức năng. Nhờ sự xuất hiện của hệ thần kinh mà sự điều hoà phối hợp các hoạt động sống của cơ thể thông qua phản xạ được thực hiện nhanh hơn so với điều hoà thể dịch. Hai hệ điều hoà thể dịch và thần kinh tồn tại song song trong cơ thể, hình thành sự điều hoà phối hợp thần kinh – thể dịch, giúp cho cơ thể thích ứng tốt hơn với môi trường sống.

Hoạt động đơn giản nhất của hệ thần kinh ở bất kỳ một loài vật nào cũng phụ thuộc vào sự truyền tín hiệu điện gọi là các xung thần kinh đến hay đi ra khỏi những bộ phận khác nhau của cơ thể. Sự truyền tín hiệu này có liên quan đến từng tế bào mang thông tin - đó là các noron và các cấu trúc nhỏ bé là các synap, chúng cho phép các xung thần kinh được truyền từ noron này sang noron khác. Bất kỳ cung phản xạ thần kinh nào dù đơn giản hay phức tạp cũng đều được cấu tạo từ một số noron nối với nhau qua các synap.



Hình 10.1 Cấu trúc một synap thần kinh

Các vị trí tận cùng axon của một noron tiếp xúc với các noron khác và với các tế bào cơ được gọi là các synap. Cấu trúc của một synap được minh hoạ ở hình 10.1. Hầu hết các synap chỉ cho xung động đi một chiều, đó là nhờ các chất trung gian hoá học cần thiết cho sự dẫn truyền. Chất trung gian được chứa trong các túi hay các bóng nhỏ ở tận cùng màng trước của một dây thần kinh, khi một xung thần kinh đến đó, một vài túi hoà nhập với màng trước synap

và giải phóng chất đó vào một khe nhỏ gọi là khe synap. Mỗi bóng chứa một lượng chất trung gian bằng nhau, lượng chất này được gọi chung là một “hạt” hay một “lượng tử” chất. Việc phóng một lượng tử chất trung gian hoá học yêu cầu phải có các ion canxi (Ca^{++}) và vai trò của chúng cho đến nay vẫn chưa được rõ.

Một trong những chất hoá học trung gian nghiên cứu tốt nhất là acetylcholin. Khi được giải phóng ra khỏi màng trước synap, nó khuếch tán nhanh qua khe synap và kết hợp với cơ quan thụ cảm ở màng của noron thứ hai – còn gọi là màng sau synap. Kết quả làm thay đổi tính thấm của màng, làm ion Na^+ đi vào sau synap, gây khử cực màng noron và làm xuất hiện điện thế sau synap. Điện thế này nhỏ hơn và kéo dài hơn so với xung thần kinh. Điện thế sau synap không tuân theo quy luật “tất cả hay không có gì”, mà cường độ lớn nhỏ của nó phụ thuộc vào số lượng chất hoá học trung gian được giải phóng.

Nồng độ acetylcholin tác dụng lên màng sau synap không duy trì ở mức độ cao được lâu bởi vì khe synap chứa những enzym cholinesterase rất mạnh, chúng nhanh chóng phân huỷ acetylcholin, giúp cho điện thế nghỉ (hay còn gọi là điện thế tĩnh) ở màng sau synap được hồi phục và “dọn sạch” synap, do đó xung động tiếp theo mới được truyền qua. Acetylcholin ở dạng không hoạt động từ khe synap nhanh chóng quay trở lại tận cùng trước synap, ở đó nó sẽ hoạt động trở lại và được tái sử dụng.

Tác dụng của acetylcholin giải phóng ra ở synap là tạo ra sự khử cực màng sau synap, sản sinh ra xung động ở noron sau synap. Các synap có chất trung gian hoá học là acetylcholin gọi là các synap kích thích và gây ra điện thế kích thích sau synap (EPSP). Không phải tất cả các synap đều thuộc loại kích thích. Cũng tồn tại các synap ức chế sản sinh ra các điện thế ức chế sau synap (IPSP), nhưng chúng đòi hỏi chất trung gian hoá học khác. Đa số các noron nhận các tận cùng synap hỗn hợp tức là dạng kích thích và ức chế.

Xác định chất trung gian hoá học ở một loại synap là rất khó. Cùng với acetylcholin rất nhiều chất khác như adrenalin, dopamin, glycin, acid γ -amino butylic... cũng được coi là chất trung gian hoá học. Nhiều đặc điểm hoạt động của synap cho đến nay vẫn còn chưa được hiểu rõ. Ví dụ như chi tiết của cơ chế khi xung thần kinh đến làm giải phóng chất trung gian hoá học vẫn còn đang là một điều bí ẩn và cả vai trò của synap trong học hành và trí nhớ nữa. Thế nhưng lý do cơ bản của việc các synap hoạt động về mặt hoá học thay cho việc tiếp xúc điện trực tiếp giữa các noron thì đã khá rõ ràng. Đơn giản là các chất trung gian hoá học chỉ cần một lượng nhỏ đã có thể thay đổi màng noron hiệu quả hơn là kích thích điện trực tiếp do tiếp xúc giữa các tế bào. Hơn nữa tận cùng synap vô cùng nhỏ bé mà vẫn có hiệu quả. Điều đó có nghĩa là một noron đơn lẻ có thể nhận synap từ nhiều noron khác và qua các tận cùng noron của nó có thể chuyển thông tin tới rất nhiều noron khác. Khả năng liên lạc với nhau tạo ra các đường mòn khác nhau dường như là vô hạn. Đây là một trong những lý do chính làm cho hệ thần kinh có thể thực hiện được các chức năng xử lý thông tin rất linh hoạt.

10.2 Cấu trúc thụ thể acetylcholin

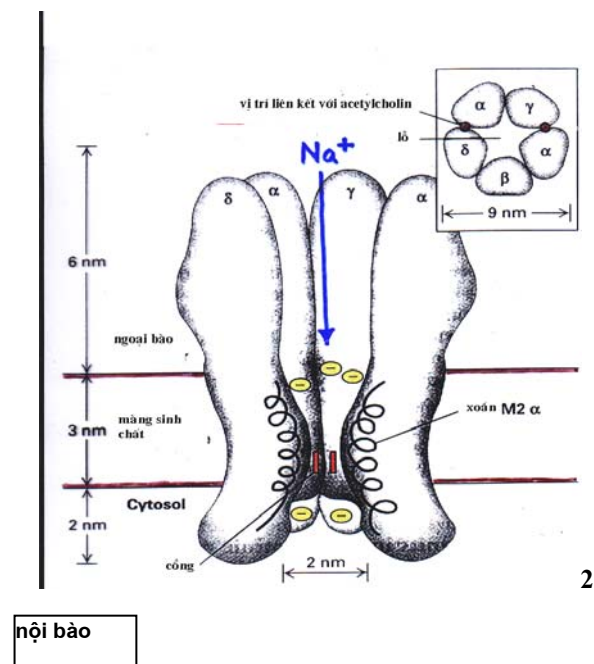
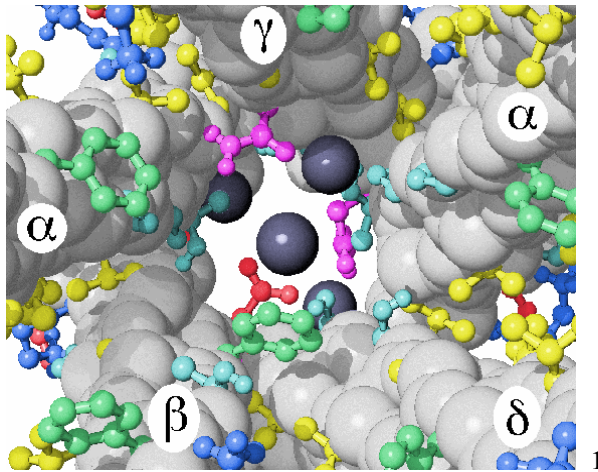
Thụ thể acetylcholin là kênh dẫn truyền được nghiên cứu sâu nhất và nhiều nhất, vì nó đóng vai trò quan trọng trong quá trình truyền xung thần kinh.

Kênh thụ thể acetylcholin đóng vai trò trung gian truyền các tín hiệu thần kinh qua các synap.

Các xung thần kinh được truyền qua hầu hết các synap bởi các phân tử nhỏ có thể khuếch tán gọi là các chất truyền thần kinh neurotransmitters chẳng hạn như acetylcholin. Màng trước synap được tách ra từ màng sau khớp thần kinh bằng một khe hở khoảng 50nm, được gọi là khe synap. Điểm kết thúc của một sợi trục axon trước synap được lấp đầy bằng các bóng synap, mỗi bóng chứa khoảng 104 phân tử acetylcholin (hình 10.1). Một xung thần kinh mới xuất hiện làm tiết ra acetylcholin từ đồng thời khoảng 300 bóng, làm tăng lượng acetylcholin ở khe synap từ 10nM – 500 μ M trong thời gian nhỏ hơn 1miligiây. Sự liên kết của acetylcholin với màng sau synap làm thay đổi tính thấm ion của nó một cách rõ rệt. Phân tử acetylcholin đã mở ra một loại kênh cation hầu như tạo ra tính thấm cân bằng của Na^+ và K^+ . Độ dẫn của cả Na^+ và K^+ tăng trong vòng 0,1miligiây, kéo theo một lượng lớn Na^+ vào trong và một lượng nhỏ K^+ ra ngoài. Sự xâm nhập của Na^+ vào trong gây ra sự khử cực màng sau synap và sinh ra một điện thế hoạt động. Sự chảy vào của Na^+ lớn hơn rất nhiều so với sự chảy ra của K^+ , do đó gradient điện thế qua màng là do Na^+ sinh ra. Sự thay đổi tính thấm là do thụ thể nicotinic acetylcholin điều khiển. Để hiểu một cách dễ dàng, ta có thể coi thụ thể này như là thụ thể của acetylcholin, mặc dù nó có sự khác biệt về chủng loại và chức năng.

Kênh thụ thể acetylcholin là công liên kết với cấu tử gắn (ligand) đã được hiểu rõ nhất. Kênh này được tách ra và nghiên cứu từ các tế bào sinh điện của cá đuối điện Torpedo, tế bào này rất giàu các màng sau synap tác động theo kiểu cholin. Thụ thể trên màng tế bào này được xếp dày đặc trên các màng của tế bào sinh điện (khoảng 20000/ μm^2). Nó có khối lượng là 268kDa và là một pentamer của bốn loại tiểu đơn vị, $\alpha 2\beta\gamma\delta$. Mỗi chuỗi α chứa một vị trí liên kết với acetylcholin. Khi tách dòng và đọc trình tự của những ADN bổ sung (cADN) mã hoá cho các tiểu đơn vị (50-58kDa) cho thấy chúng có các trình tự giống nhau. Điều này rất có thể là các gen mã hoá các tiểu đơn vị được tạo thành trong quá trình nhân đôi và là sự tiến hoá của một gen từ một tổ tiên chung. Một nửa trình tự tận cùng amino của mỗi chuỗi hình thành một vùng ngoại bào ưa nước (domain synap). Ngược lại, một nửa trình tự cuối cacboxyl chứa bốn đoạn nhỏ kỵ nước đi qua lớp màng lipid kép.

Nigel Unwin đã phân tích cấu trúc không gian ở độ phân giải 9 \AA đối với thụ thể acetylcholin, ông cho rằng năm tiểu đơn vị của thụ thể này khi ở dạng đóng thì được xếp đều đặn quanh một trục trung tâm của nó. Thụ thể có hình trụ năm góc đối xứng với đường kính thực khoảng 65 \AA , tất cả năm tiểu đơn vị hình que đều xuyên qua màng. Thụ thể nhô ra khoảng 60 \AA ở mặt synap của màng và khoảng 20 \AA ở mặt cytosol của màng (hình 10.2).



Hình 10.2

Cấu trúc của một kênh thụ thể acetylcholin (1) mặt phẳng đứng của mô hình không gian, (2) sơ đồ cấu trúc của kênh (theo Buchannan và CS, 2000).

Lỗ của kênh thì chạy theo trục đối xứng của nó. Hai vị trí liên kết với acetylcholin ở tại điểm cuối synap của các tiểu đơn vị α .

Miệng kênh nằm trên bề mặt synap của thụ thể là rất rộng (22 \AA). Tại đầu lipid của lớp bên ngoài là khoang đột ngột co lại nhỏ hơn 10 \AA . Và nó được mở rộng ra một lần nữa khoảng 20 \AA tại đầu nhóm lipid của lớp phospholipid bên trong. Vì thế mà kênh có ba phần (hình 10.2 (2)). Nó chứa một vùng lối vào ở ngoại bào, một vùng vận chuyển xếp xung quanh một lỗ hẹp, và một vùng lối vào tế bào chất. Lỗ được gắn bằng năm xoắn α của các tiểu đơn vị.

10.3 Cơ chế mở kênh thụ thể acetylcholin nhờ acetylcholin

Hệ số Hill là 1,97 chỉ mức độ phụ thuộc vào nồng độ của acetylcholin làm cho kênh mở ra. Do đó, hai phân tử acetylcholin phải liên kết với thụ thể để mở kênh. Các nghiên cứu về kênh ghép cho thấy rằng acetylcholin liên kết với trạng thái đóng của thụ thể để hình thành dạng AC và A2C, sau đó nó trải qua một quá trình biến đổi thành trạng thái mở A2O. Hằng số tốc độ kết hợp giữa acetylcholin với mỗi vị trí của thụ thể là $108M^{-1}s^{-1}$, liên quan chặt chẽ với giới hạn kiểm soát sự khuếch tán. Do đó, sự liên kết của acetylcholin ở các điều kiện sinh lý học xảy ra dưới 100μ giây. Cũng giống như vậy, sự biến đổi từ trạng thái đóng A2C thành trạng thái mở A2O xảy ra rất nhanh chóng (30μ giây). Vì vậy, kênh thụ thể mở ngay lập tức để trả lời lại với sự tăng đột ngột nồng độ acetylcholin ở khe synap.

Khoảng thời gian để kênh mở ra dưới tác động của điều kiện sinh lý chỉ được đo bằng miligiây, vì acetylcholin trong khe synap nhanh chóng bị thủy phân thành acetat và cholin do enzym acetylcholinesterase. Acetylcholinesterase là một enzym móc mỏ neo vào sau synap bằng liên kết cộng hoá trị với nhóm glycolipid. Enzym này có số quay vòng hoạt động rất nhanh (25.000 vòng/sec), bởi vì acetylcholinesterase đã đạt tới sự hoàn thiện về động học xúc tác, có giá trị k_{cat}/k_m là $2 \times 10^8 M^{-1} S^{-1}$. Sự xúc tác đáng khâm phục (tài tình) của acetylcholinesterase cho phép các synap truyền đi thế năng hoạt động ở tần số cao.

Các Fluorophosphat hữu cơ, giống như diisopropyl phosphofluoridat (DIPF), kìm hãm enzym acetylcholinesterase do hình thành phức chất phosphoryl-enzym bằng liên kết cộng hoá trị rất bền vững. Nhóm phosphoryl sẽ liên kết với serin của trung tâm hoạt động giống như các protease serin đã phản ứng với DIPF. Rất nhiều hợp chất phosphat hữu cơ đã được tổng hợp để sử dụng làm thuốc trừ sâu hoặc dùng làm hơi độc trong chiến tranh hoá học. Kênh thụ thể acetylcholin sẽ đóng mở như thế nào? Việc so sánh cấu trúc của dạng kênh đóng và mở sẽ cho biết thông tin này. Nếu nồng độ của acetylcholin còn lại cao, kênh sẽ tự đóng lại trong thời gian khoảng một giây, quá trình này gọi là sự gây mê.

Một cơ chế đáng tin cậy cho việc mở kênh suy luận từ các dẫn liệu nghiên cứu cấu trúc kênh. Như đã biết, lỗ của thụ thể được liên kết bằng năm xoắn α , trình tự acid amin của các xoắn này được đánh dấu bởi sự có mặt các đỉnh của các gốc phân cực nhỏ hoặc của các gốc trung tính (như serin, threonin, glycin) và các gốc rất kỵ nước (như isoleucin, leucin, phenylalanin). Ở trạng thái đóng, các gốc lớn bịt kín kênh bằng cách hình thành một vòng kỵ nước kín. Thực vậy, mỗi tiểu đơn vị có một leucin lớn tại chỗ uốn cong quan trọng của xoắn α . Sự liên kết của acetylcholin có thể làm biến dạng độ nghiêng của các xoắn này bằng cách làm thay đổi vị trí của các điểm nối. Lỗ có thể được mở ra sau đó, vì nó có thể được nối liền bằng các gốc phân cực nhỏ hơn là bằng các gốc kỵ nước lớn.

Các cation hoá trị một hoặc hai, nhưng không phải là các anion, chảy dễ dàng qua kênh thụ thể acetylcholin khi nó ở trạng thái mở. Kênh tạo ra khả năng lựa chọn cation như thế nào? Có ba vòng được tạo ra bởi các gốc acid amin mang điện tích âm lộ ra, một trong số chúng nằm trong vùng xuyên màng của lỗ và hai gốc còn lại nằm trên sườn của lối vào chỗ hẹp. Các anion như Cl^- không thể xâm nhập vào lỗ vì chúng bị đẩy ra bởi các lớp mang điện tích âm này. Các nghiên cứu tiếp theo về tính thấm của một chuỗi các cation hữu cơ khác nhau về kích thước (như các ion alkylammonium) cho thấy rằng chỗ hẹp nhất của lỗ có đường kính $6,5 \text{ \AA}$.

10.4 Điện thế màng tế bào thần kinh trong các synap

Điện thế hoạt động được xác định bởi sự chênh lệch quá độ giữa tính thấm của các ion Na^+ và K^+ . Xung thần kinh là tín hiệu điện được sinh ra do dòng chảy của các ion dọc theo màng sinh chất của một nơron. Bên trong của một nơron giống như hầu hết các tế bào bình thường, nồng độ ion K^+ nội bào cao và ion Na^+ thấp. Các gradient ion này được sinh ra do sự điều khiển của bơm $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$. Ở trạng thái nghỉ, màng của một sợi trục thần kinh (axon) có thể thấm nhiều K^+ hơn là Na^+ , vì vậy, điện thế màng được xác định là lớn do sự chênh lệch nồng độ ion K^+ bên trong so với bên ngoài.

Điện thế màng là -60 mV khi các axon không bị kích thích, ổn định ở gần mức -75 mV (là điện thế cân bằng của K^+). Ở mức điện thế này màng chỉ cho phép ion K^+ thấm qua. Một xung thần kinh, hay điện thế hoạt động, được sinh ra khi điện thế ở phía bên kia màng được khử cực đến một giá trị ngưỡng (từ -60 mV đến -40 mV). Điện thế màng trở thành giá trị dương trong vòng 1 miligiây và đạt tới một giá trị $+30 \text{ mV}$, trước khi trở về giá trị âm một lần nữa. Sự khử cực này được truyền dọc theo sợi thần kinh. Các axon khổng lồ của mực ống đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu điện thế màng tế bào thần kinh. Các vi điện cực có thể được cắm vào axon này và thí nghiệm do Alan Hodgkin và Andrew Huxley thực hiện. Kết quả thử nghiệm cho thấy điện thế hoạt động tăng nhanh khi tính thấm của màng axon đối với các ion $\text{Na}^+ \text{K}^+$ bị thay đổi trong thời gian rất ngắn. Có hai loại kênh mẫn cảm với điện thế, một kênh thấm chọn lọc Na^+ còn kênh kia là với K^+ . Đầu tiên độ dẫn của màng với Na^+ bị thay đổi, khi quá trình khử cực ở phía bên kia bắt đầu thì đồng thời nó cũng làm mở các kênh Natri. Do đó, các ion Na^+ bắt đầu đi vào tế bào theo gradient nồng độ dẫn đến một sự thay đổi lớn và nhanh chóng của điện thế màng, từ -60 mV đến $+30 \text{ mV}$ trong 1 miligiây.

Các kênh Na^+ tự động đóng lại và các kênh K^+ bắt đầu mở ra trong khoảng thời gian này. Do đó, các ion K^+ chảy vào trong tế bào và điện thế màng lại quay trở về giá trị âm. Điện thế màng ở mức -75 mV trong khoảng 2 miligiây, là điện thế cân bằng của K^+ . Mức điện thế nghỉ -60 mV được tồn tại trong một vài miligiây khi độ dẫn K^+ giảm đến giá trị ngưỡng không kích thích được. Như vậy, điện thế hoạt động có hiệu quả thực sự để truyền một tín hiệu đi xa.

Các nghiên cứu về độ dẫn của kênh cho thấy độ dẫn g của nó được tính theo công thức: $g = i / (V - E_r)$. Trong công thức này: g chính là nghịch đảo của điện trở và có đơn vị đo là Siemen (ký hiệu là S , $1S = 1 \Omega^{-1}$), E_r là điện thế ngược chiều được đo bằng Volt (V), i là cường độ dòng điện được đo bằng Ampe (A). Khi có một dòng $i = 4 \text{ pA}$ chảy qua kênh mở với điện thế màng là 100 mV (mà $1A = 6,24 \times 10^{18}$ điện tích/giây). Vậy phải có $2,5 \times 10^7$ ion Na^+ /giây chảy qua kênh mở. Nếu $E_r = 0$ thì tại dòng chảy trên sẽ tạo thành một độ dẫn là 40 pS .

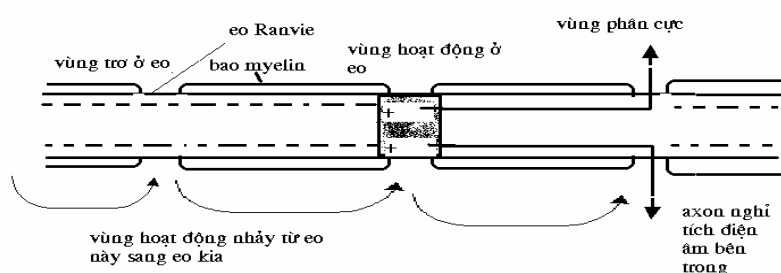
10.5 Sự truyền dẫn các xung thần kinh

Thuật ngữ truyền dẫn là muốn nói đến quá trình xung thần kinh chạy dọc theo axon của một nơron mà không giảm cường độ. Ở sợi axon không có màng myelin ví dụ, như ở axon khổng lồ của loài mực, xung động được truyền đi một cách đều đặn.

Phần axon tham gia vào dẫn truyền xung thần kinh ở bất kỳ thời điểm nào cũng được coi là có ba vùng. Đầu tiên là vùng hoạt động, nơi xung thần kinh đạt tới đỉnh cao của nó. Ở thời điểm này axon tích điện dương ở bên trong. Do đó, các dòng điện dương nhỏ (hình thành bởi

các ion trong tương bào của axon) được truyền đến các khu vực tích điện âm ở bên cạnh của axon và truyền ra qua màng axon. Phía trước đỉnh của xung, dòng điện dương này hoạt động như một kích thích, nó sẽ khử cực phần tiếp theo của axon gọi là vùng khử cực, đến một lúc nào đó nó sẽ đạt và vượt ngưỡng kích thích, lúc đó vùng kích thích sẽ trở thành vùng hoạt động và tự tạo ra xung động. Khi các quá trình tiếp tục diễn ra, xung thần kinh chạy dọc theo axon. Phía sau xung động, ở vùng trơ tuyệt đối, axon tạm thời không có khả năng hoạt động, do đó bất kỳ dòng điện nào đi ra từ vùng hoạt động đều không có tác dụng. Đó là lý do tại sao xung thần kinh được dẫn truyền chỉ theo một hướng từ thân tế bào ra đến axon. Nếu như một axon đang nghỉ ngơi, người ta dùng một vi điện cực kích thích ở một điểm nào đó dọc theo chiều dài của nó, xung thần kinh ngay lập tức được dẫn truyền theo hai hướng bởi vì không có vùng trơ tuyệt đối ngăn cản nó.

Xung thần kinh ở một axon không có màng myelin điển hình thông thường được truyền đi với vận tốc khoảng 1m/giây hoặc nhỏ hơn. Tốc độ dẫn truyền có thể tăng lên khi đường kính axon tăng lên. ở các loài vật, tốc độ là một yếu tố vô cùng quan trọng đối với chúng, ví dụ, trong các phản ứng chạy trốn nhanh, các axon thần kinh khổng lồ rất phát triển. Tuy nhiên, các axon khổng lồ của loài mực còn được sử dụng khi con mực dùng ống xi-phông của nó để đẩy nước chạy trốn. Hệ thống thần kinh của nhiều loài động vật có xương sống khác cũng có chứa các axon khổng lồ.



Hình 10.3

Sự truyền xung thần kinh trong axon có bao myelin: sự truyền nhảy cóc

Ở các động vật có xương sống, tốc độ dẫn truyền tăng lên rất nhiều do có các chất cách điện bao quanh axon của nhiều neuron, đó là chức năng của bao myelin. Như mô tả ở hình 10.3, dòng điện chỉ có thể rời axon ở eo Ranvie nơi mà axon không được bao bọc. Khu vực giữa hai eo không sản sinh ra xung động, nhưng nó cho phép dẫn truyền dòng điện một cách bình thường như ở trong dây dẫn. Tuy nhiên khoảng cách giữa các eo hầu như rất nhỏ nên xung động nhảy từ khe này sang khe khác khi nó truyền dọc theo axon. Quá trình này được gọi là quá trình dẫn truyền “nhảy cóc” và tốc độ dẫn truyền có thể đạt tới 100m/giây hay hơn nữa. Quá trình bọc myelin tạo hiệu quả cao cho cả các axon nhỏ, do đó, hệ thống thần kinh của động vật có xương sống có thể chứa nhiều tế bào neuron hơn rất nhiều so với động vật không xương sống. Kết hợp các ưu điểm của tính hiệu quả và tính kinh tế của sự myelin hoá cho phép hệ thống thần kinh của động vật có xương sống trở nên cực kỳ hoàn hảo, mà hoàn hảo nhất phải kể đến não người.

10.6 Cơ chế gây độc tế bào thần kinh của các độc tố cá nóc

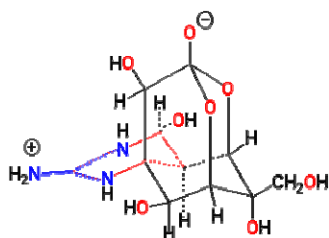
Cá nóc được các đầu bếp Nhật coi là một hải sản cao cấp. Nhưng hàng năm có hơn 200 người tử vong do ăn cá nóc, vì trong thịt cá nóc có độc tố của nó. Độc tố cá nóc (gồm tetrodotxin (TTX) và sacidoxin (STX)) cũng là chất độc thần kinh cực mạnh từ một loại nguyên sinh động vật có hai tiên mao.



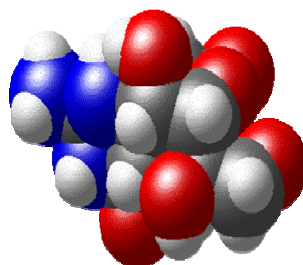
Hình 10.4
Hình dạng cá nóc

TTX là chất độc thần kinh rất đặc hiệu, bao vây đặc hiệu cổng tích điện của các kênh Natri nằm trên bề mặt của màng tế bào thần kinh. Phân tử này có chứa một nhóm Guanidin tích điện dương (làm tăng tính ổn định cho các cation (hình 10.5 và 10.6), nên nhóm chất độc thần kinh này có tên gọi là chất độc guanidin), và vòng Pyrimidin với sự tăng cường hợp nhất các hệ thống vòng (việc thêm các hệ thống vòng này, làm cho toàn bộ chứa 5 nhóm hydroxyl, chắc chắn hỗ trợ cho tính bền vững của phức hệ liên kết giữa TTX với kênh Natri tại phần ưa nước). Sự liên kết của TTX với kênh Natri rất nhạy ($K_d = 10^{-10} \text{M}$). TTX có tác dụng rất giống tác dụng của hydrat Natri, khi xâm nhập vào miệng kênh liên kết với nhóm peptit glutamat, sau đó thắt chặt vòng lại khi peptit thay đổi cấu hình không gian của nửa phần liên kết. Do vậy phức hệ nhận dạng thay đổi, hơn nữa TTX tấn công vào các điện tích có tác dụng mở cổng của kênh Na^+ (hậu quả thứ hai xảy ra trong cơ thể khi dehydrat phức hệ nước- Na^+). Sự bám chặt của tetrodotoxin cá nóc làm bao vây sự truyền dẫn xung thần kinh tại phức hệ Na^+ -kênh được giải thích rõ ràng hơn bởi thời gian chiếm giữ lâu của TTX so với hydrat- Na^+ ở trong phức hệ. Hydrat natri có thể đảo ngược liên kết trong thời gian 1nanogiây, trong khi TTX liên kết với kênh và tồn tại trong thời gian được tính bằng lũy thừa 10 của giây là một khoảng thời gian vô cùng lớn, bởi vì 1 giờ chỉ bằng 3600 giây. Với lượng lớn các phân tử TTX này đã không cho natri có cơ hội xâm nhập vào kênh, sự di chuyển natri bị bao vây với hiệu lực cao và điện thế hoạt động dọc theo màng thần kinh bị dừng lại. Một miligram TTX hoặc ít hơn (một lượng nhỏ như đầu kim), cũng đủ giết chết một người trưởng thành.

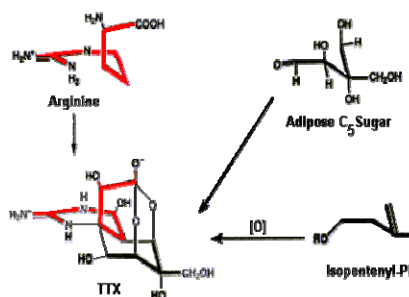
Sacidoxin (STX) là độc tố thần kinh từ một loài nguyên sinh động vật có các nhóm chức năng, kích thích và hoạt động tương tự như TTX.



Hình 10.5
Cấu trúc hóa học của TTX



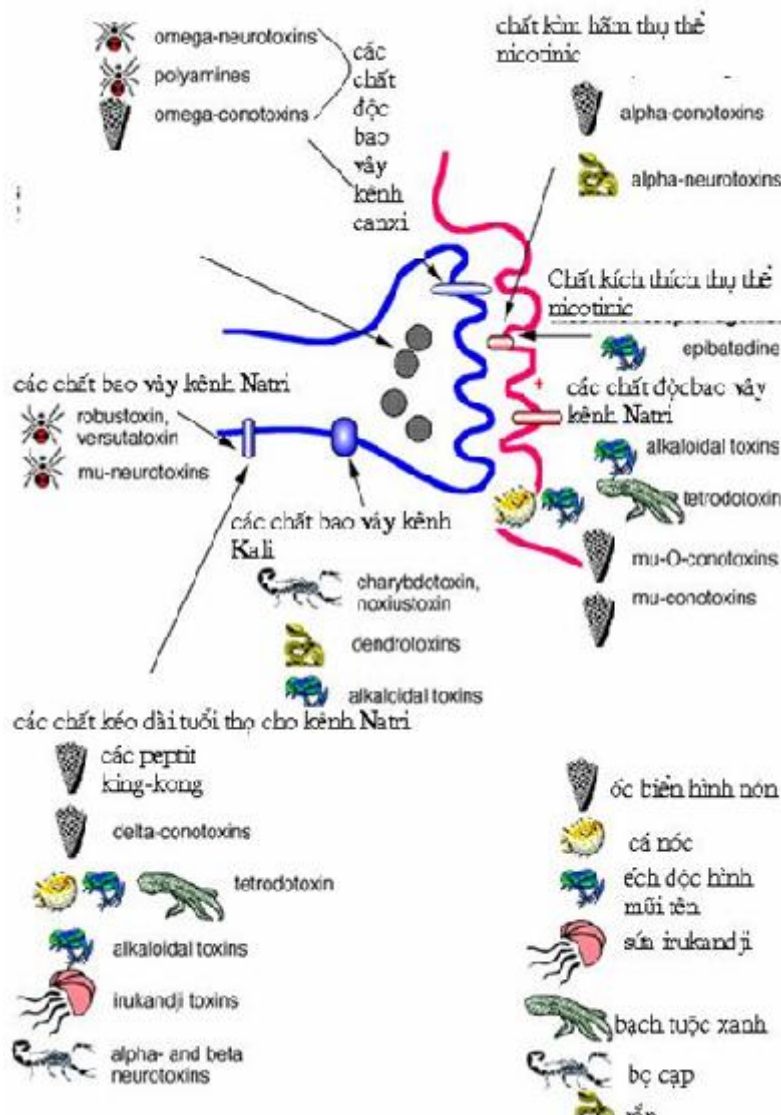
Hình 10.6
Ảnh không gian ba chiều và cấu trúc hóa học từng phần của TTX



Các triệu chứng đầu tiên của quá trình trúng độc TTX là tê liệt nhẹ môi và lưỡi, triệu chứng này xuất hiện từ 20 phút đến ba giờ sau khi ăn cá nóc có độc. Triệu chứng tiếp theo là

cảm giác khác thường tăng lên ở mặt và tay chân, có thể là cảm giác hoa mắt hoặc chóng chên. Đau đầu, đau thượng vị, buồn nôn, ỉa chảy, hoặc nôn mửa có thể xảy ra. Giai đoạn thứ hai là tình trạng tê liệt tăng. Nhiều nạn nhân không thể cử động được, thậm chí ngồi cũng khó khăn. Hô hấp bị tê liệt. Khả năng nói cũng bị ảnh hưởng và nhiều nạn nhân cảm thấy khó thở, tím tái và tụt huyết áp. Tăng tê liệt, rối loạn và tổn thương thần kinh, loạn nhịp tim có thể xuất hiện. Mặc dù nạn nhân tỉnh táo hoàn toàn hoặc còn ý thức được, và ở một số trường hợp nạn nhân vẫn còn tỉnh táo cho đến trước khi chết. Cái chết thường xảy ra trong vòng 4 đến 6 giờ, với một loạt các dấu hiệu biết trước từ khoảng 20 phút đến 8 giờ.

Tính độc của TTX gấp 10 đến 100 lần so với liều gây chết của nhện độc và gấp 10000 so với cyanide. STX cũng có tính độc giống như TTX.



Hình 10.7

Vị trí tác động của các chất độc thần kinh và các động vật có chứa chất độc thần kinh

Chương 11

Thụ thể hoá học truyền tín hiệu vận động

11.1 Mở đầu

Các tế bào thường có khả năng đáp ứng cao đối với các tín hiệu từ môi trường xung quanh của chúng. Những ví dụ về các đặc tính cơ bản này là: sự di chuyển của vi khuẩn về phía có chất dinh dưỡng, phát hiện ánh sáng bởi các tế bào võng mạc, sự giải phóng các phân tử cung cấp năng lượng bởi các tín hiệu hormon lúc đói và sự cảm ứng biệt hóa bởi các yếu tố sinh trưởng. Quá trình nhận cảm và xử lý của các kích thích được thực hiện bởi một dòng thác các tín hiệu truyền tin (*signal transduction cascades*). Các phân tử tham gia vào chuỗi truyền tin trong tế bào bao gồm các thụ thể (*receptors*), các enzym, các kênh (*channels*) và các protein điều hoà (*regulatory proteins*). Những tín hiệu được đưa vào, hình thành, khuếch đại và hợp thành các tín hiệu khác nhau truyền ra bên ngoài.

Ban đầu chúng ta quan tâm đến sự hóa hướng động (chemotaxis) của vi khuẩn, ví dụ như sự di chuyển của các tế bào vi khuẩn về phía các chất dẫn dụ và sự di chuyển ra khỏi các chất xua đuổi. Vi khuẩn thường xuyên tìm kiếm hướng đến những nơi có màu xanh của cây cỏ. Một hệ thống giác quan sẽ gửi tín hiệu đến các động cơ ở gốc lông roi (flagellar motors) để giúp cho chúng bơi theo một đường thẳng hoặc lộn nhào để thay đổi hướng tới. Sự thích ứng để điều chỉnh một cách tự động làm cho một vi khuẩn có thể đáp ứng lại sự thay đổi nhỏ về nồng độ hơn là giá trị tuyệt đối. Sau đó chúng ta quan tâm đến sự kích thích tế bào thần kinh cảm giác ở động vật có xương sống, một quá trình cảm ứng tinh xảo của tế bào hình que trong võng mạc có thể bị kích thích bởi một photon đơn lẻ. ánh sáng sẽ kích thích cho sự hoạt động của một loạt các enzyme được khuếch đại cao, là điểm đỉnh trong sự đóng các kênh màng.

Trong các phần trên đã giới thiệu một số cách thức hoạt động của các hormon. Ví dụ: epinephrine, cũng giống như ánh sáng, được tiếp nhận nhờ một thụ thể gồm 7 chuỗi xoắn xuyên màng và một protein G. Sự hoạt hoá tiếp theo của enzym adenylate cyclase sẽ dẫn tới sự tổng hợp của AMP vòng, AMP vòng sẽ kích thích một protein kinase phosphoryl hoá nhiều đích. AMP vòng (cAMP) là một chất truyền tin nội bào rất quan trọng trong nhiều quá trình sinh lý.

Tiếp theo chúng ta quan tâm đến sự thay đổi của ion Ca^{2+} , đó là một chất truyền tin khác, có mặt ở khắp mọi nơi trong sinh vật nhân chuẩn. Sự kích thích của nhiều tế bào sẽ dẫn tới làm tăng mức Ca^{2+} nội bào, nó được xác định bởi các calmodulin và các bộ cảm biến (sensor) canxium khác.

Một vấn đề khác cần quan tâm đó là thụ thể của các tyrosine kinase. Insulin, yếu tố sinh trưởng biểu mô, và các yếu tố sinh trưởng khác sẽ gắn vào các vùng ngoại bào của các enzyme vận chuyển qua màng và kích thích cho sự tự phosphoryl hóa và hoạt hóa của chúng. Các thụ thể tyrosine kinase là trung tâm điều khiển sự sinh trưởng và biệt hóa. Quả thực, các đột biến của các thụ thể này hoặc các phần liên kết với chúng thường dẫn tới ung thư.

11.2 Các hóa thụ thể của vi khuẩn nhận biết các chất dẫn dụ và các chất xua đuổi (chemoreceptors)

Trong nửa cuối của thế kỷ 19, Wilhelm Pfeffer, một nhà thực vật, cho biết rằng các vi khuẩn có khả năng di động sẽ tập trung vào gần miệng một ống mao quản có chứa một chất dẫn dụ ví dụ như đường. Nhưng trái lại, chúng lại di chuyển ra khỏi miệng ống nếu ống đó có chứa một chất xua đuổi ví dụ như phenol, hoặc một chất có hại. Sự di chuyển định hướng này của vi khuẩn về phía của một số chất đặc biệt và rời khỏi các chất khác được gọi là hoá hướng động. Vào những năm 1960 Julius Adler bắt đầu nghiên cứu cơ sở phân tử hiện tượng hoá hướng động của vi khuẩn. Các phân tích hoá sinh, di truyền và cấu trúc đã làm sáng tỏ khá nhiều điều về quá trình này. Hóa hướng động bắt đầu bằng sự gắn kết của các chất dẫn dụ và các chất xua đuổi vào các protein thụ thể được gọi là các hóa thụ thể, nó nằm trải trên bề mặt của màng sinh chất. Một số phân tử này, ví dụ như aspartate, gắn trực tiếp vào các hóa thụ thể, trong khi đó các chất khác lại được gắn thông qua các protein liên kết (binding protein). Thông tin từ các hóa thụ thể sẽ được chuyển đến một hệ thống xử lý trung tâm để phân tích. Tín hiệu sau khi được xử lý sẽ được gửi đến các motor nằm ở gốc roi để xác định cho vi khuẩn có bơi thẳng hay đổi hướng.

11.3 Sự định hướng của của bộ máy vận động vi khuẩn

Các vi khuẩn bơi nhờ lông roi quay, xuất phát từ bề mặt của chúng. Một vi khuẩn E.coli hoặc Salmonella typhimurium có khoảng 6 lông roi. Những tám xoắn mòng này (có đường kính 15nm và dài 10 μ m) được tạo nên từ các tiểu đơn vị lông roi. Một lông roi vi khuẩn là một phần phụ ngoại bào được quay nhờ một motor định vị ở vùng nối giữa lông roi và phần vỏ tế bào. Nó được cung cấp lực đẩy của proton qua màng sinh chất. Một đặc điểm hấp dẫn của motor này là nó có thể quay theo chiều kim đồng hồ hoặc ngược chiều kim đồng hồ và sự chuyển chiều quay là tức thời.

Một vi khuẩn bơi gần như một đường thẳng. Trong khoảng thời gian này nó bơi được một khoảng cách 30 μ m bằng khoảng 15 lần chiều dài cơ thể. Các vi khuẩn sau đó đột ngột thay đổi hướng tới bằng cách nhào lộn. Sự nhào lộn trung bình khoảng 600. Cái gì quyết định một vi khuẩn bơi thẳng hoặc nhào lộn như vậy? Khi các lông roi quay ngược chiều kim đồng hồ các sợi xoắn hình thành một bó gắn kết và các tế bào bơi thẳng. Khi lông roi quay theo chiều kim đồng hồ hoặc chiều ngược lại, bó lông roi tung ra ở trạng thái xoắn ốc không có liên quan đến chiều quay. Mỗi một lông roi sau đó được đẩy theo mỗi hướng khác nhau và vì thế tế bào lộn nhào.

11.4 Vi khuẩn phát hiện nồng độ chất dẫn dụ và chất độc như thế nào?

Khi vi khuẩn di chuyển theo hướng nồng độ chất dẫn dụ tăng dần, sự đảo lộn ít gặp hơn. Ngược lại khi nó di chuyển xa chất dẫn dụ thì việc đảo lộn xảy ra thường xuyên hơn. Như vậy nếu một vi khuẩn di chuyển theo hướng một chất dẫn dụ hoặc ra xa chất xua đuổi thì nó sẽ bơi thẳng trong thời gian dài hơn khi nó chuyển động theo hướng ngược lại.

Có sự so sánh nồng độ của một chất dẫn dụ ở đầu này của tế bào với một điểm khác hoặc có sự so sánh nồng độ chất dẫn dụ hiện tại với thời điểm trước đó không? Nói cách khác, cơ quan cảm giác là một cơ quan cảm nhận sự thay đổi nồng độ (gradient)? Daniel Koshland và Robert Macnab đã trả lời câu hỏi quan trọng này bằng cách thực hiện một thí nghiệm đơn

giản và lý thú. Họ đã trộn vi khuẩn trong môi trường thiếu chất dẫn dụ với một dung dịch chứa một chất dẫn dụ và sau đó họ quan sát cẩn thận tần số đảo lộn của vi khuẩn. Điều thú vị phát hiện ra là sự đảo lộn bị dừng lại trong một thời gian ngắn hơn 1 giây. Vi khuẩn bơi một khoảng cách dài trong dung dịch hỗn hợp theo một đường thẳng không có một gradient nồng độ. Như vậy thí nghiệm này đã chứng tỏ rằng vi khuẩn đã thực hiện một cơ chế cảm nhận nhất thời. Nói cách khác một vi khuẩn phát hiện một gradient chất dẫn dụ theo thời gian thay đổi nồng độ và cảm nhận theo sự biến đổi gradient trong không gian.

Một vi khuẩn quyết định nơi đến hoặc không đảo lộn bằng cách so sánh nồng độ chất dẫn dụ và chất xua đuổi được cảm nhận trong khoảng 3 giây sau khi chạm trán với chất dẫn dụ hoặc chất xua đuổi. Nếu nồng độ của một chất xua đuổi tăng hoặc nếu nồng độ một chất dẫn dụ giảm thì việc đảo lộn tăng lên.

Về cơ bản, hoá hướng động ở vi khuẩn là một quá trình ngẫu nhiên, tập tính chủ động tăng lên trong quá trình chọn lọc hướng di chuyển cũng theo một cách ngẫu nhiên.

11.5 Bốn loại hóa thụ thể truyền tín hiệu xuyên qua màng sinh chất

Sự hóa hướng động bắt đầu với việc bám của các phân tử vào bốn loại thụ thể trong màng nội chất. Trong E.coli và các vi khuẩn Gram âm khác, màng sinh chất được bao phủ bởi một lớp màng ngoài có thể thấm các phân tử nhỏ. Từ đó một không gian xung quanh được phân tách màng sinh chất và màng ngoài. Các hóa thụ thể được mã hóa bởi các gene *tsr*, *tar*, *trg* và *tap* ban đầu được gọi là các protein hóa hướng động gắn methyl (MCPs) bởi vì chúng được methyl hóa thuận nghịch. Các chất xua đuổi và một số chất dẫn dụ gắn trực tiếp vào các thụ thể này, trong khi một số chất dẫn dụ khác lại gắn vào các protein ngoại vi và các protein này được gắn với các thụ thể. Ví dụ chất dẫn dụ Aspartate gắn trực tiếp vào các protein *tar*, nó cũng có thể được coi như là các thụ thể của aspartate.

Bốn loại hóa thụ thể có cấu trúc giống nhau gồm một phân tử protein xuyên màng có kích thước khoảng 60 kd có chứa bốn vùng:

1. Một vùng ngoại bào, nó gắn với một chất dẫn dụ hoặc chất xua đuổi
2. Một vùng vắt qua màng có chứa hai chuỗi xoắn α nằm trong màng sinh chất.
3. Một vùng nội bào tương tác với các thành phần của hệ thống xử lý trung tâm
4. Một vùng nội bào có thể được methyl hóa thuận nghịch ở nhiều vị trí (hình 11.1)

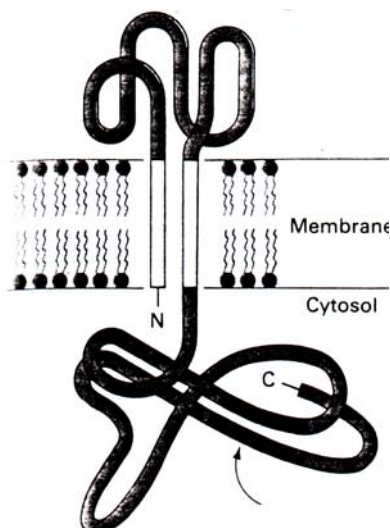
Vùng liên kết với chất dẫn
dụ hoặc xua đuổi

vùng ngoại bào

Màng sinh chất

vùng nội bào

Vùng kết nối với hệ
thống xử lý nội bào



Hình 11.1

Sơ đồ một hóa thụ thể. Tín hiệu hóa hướng động được truyền qua màng nhờ hóa thụ thể này. Các chất xua đuôi hoặc chất dẫn dụ có thể liên kết với vùng ngoại vi của hóa thụ thể. Vùng nội bào kết nối với hệ thống xử lý kiểm soát hướng quay của lông roi (tiên mao) (Koshland và cộng sự 1983)

Các vùng nội bào của chúng có tính bảo thủ cao bởi vì chúng tương tác với cùng thành phần giống nhau của hệ thống xử lý. Thay vậy, các vùng nội bào của tsr và tar có chứa một trình tự gồm 48 gốc acid amin giống nhau. Trái lại, ở vùng ngoại bào thì lại khác nhau bởi vì chúng gắn với các chất dẫn dụ, các chất xua đuôi và các phức hệ protein-chất dẫn dụ là khác nhau. Một thụ thể được hình thành từ một nửa đầu N của tar và một nửa đầu C của tsr được khởi động bởi aspartate và các chất dẫn dụ khác thì được cảm nhận bởi tar. Do vậy, các hóa thụ thể này truyền tín hiệu xuyên qua màng theo cách tương tự nhau.

Cấu trúc không gian ba chiều của vùng ngoại bào của thụ thể aspartate gần đây đã được xác định. Vùng gắn kết với các cấu tử này sẽ dimer để tạo thành một cấu trúc kéo dài. Mỗi một tiểu đơn vị là một bó gồm bốn chuỗi xoắn có đường kính 20 \AA và chiều dài hơn 70 \AA . Các vị trí gắn cho aspartate là ở bề mặt giữa các vùng được coi là tiểu đơn vị có chiều dài hơn 60 \AA từ bề mặt màng sinh chất.

Chúng ta cần quan tâm đến các phần khác của thụ thể này và làm cách nào sự gắn của aspartate làm thay đổi tín hiệu ở các vùng nội bào.

Làm thế nào để các thụ thể có thể làm thay đổi hướng quay của các roi? Các phân tích di truyền đã chỉ ra có sự tồn tại của một hệ thống xử lý chung được mã hóa bởi các gen che và cung cấp những giá trị quan trọng về các vòng phân tử của nó. Tám locus che đã được xác định: A, B, C, D, W, R, Y và Z. Các đột biến ở các gene này làm sai lệch sự hóa hướng động đối với tất cả các chất dẫn dụ và các chất xua đuôi. Trái lại với đột biến ở một loại thụ thể riêng nó sẽ phong tỏa sự đáp ứng đối với các kích thích của các tác nhân này. Đối với các vi khuẩn thiếu tất cả các protein Che nội bào (ví dụ như vi khuẩn đường ruột) thì sẽ luôn luôn bơi thẳng bởi vì các roi của chúng luôn quay ngược chiều kim đồng hồ (CCW). Sự bổ sung gen của protein CheY vào các chủng đường ruột tạo sự biểu hiện được điều khiển của một gene CheY sẽ dẫn tới sự quay theo chiều kim đồng hồ (CW) tăng lên. Thêm vào đó, ở các đột biến biểu hiện mức độ cao không bình thường của protein CheY nhưng các protein Che khác

ở mức độ bình thường thì các roi chỉ quay theo chiều kim đồng hồ. Các phát hiện này chỉ ra rằng hướng quay của các roi được điều khiển bởi protein CheY.

Cung cấp ATP cho cả pha kích thích và pha thích ứng của quá trình hóa hướng động đã cho ta biết CheY có thể được điều khiển như thế nào. Một aspartate đặc hiệu của CheY có thể trở nên bị phosphoryl hóa. Điều quan trọng nhất, CheY được phosphoryl hóa sẽ cảm ứng sự lộn nhào, trong khi CheY bị dephosphoryl hóa thực sự không ảnh hưởng đến sự thay đổi chiều quay của roi. CheY được phosphoryl hóa chỉ là dạng tạm thời. Sự thủy phân tự phát nhóm phospho trong một phản ứng sẽ được tăng lên 100 lần bởi CheZ.

Làm thế nào mà CheY nhận được một nhóm phosphate và làm thế nào sự phosphoryl hóa của nó được điều khiển bởi các hóa thụ thể? Mel Simon đã phát hiện ra rằng protein CheA được tinh sạch chịu một sự tự phosphoryl hóa chậm chạp. Vị trí phosphoryl hóa là N-3 của một gốc histidine. Sự tự phosphoryl hóa này được tăng tốc bởi sự liên kết của CheA, cùng với CheW, vào một thụ thể không bị chiếm chỗ hoặc một phức thụ thể chất xua đuôi chứ không phải vào một phức thụ thể chất dẫn dụ. Các nhóm phospho được gắn vào CheA có thể được chuyển sang CheY. Từ đó, các chất xua đuôi làm tăng số lượng CheA được phosphoryl hóa và tiếp theo là CheY được phosphoryl hóa. Các chất dẫn dụ có hiệu quả ngược lại. Trong cách này, các chất xua đuôi làm tăng sự quay theo chiều kim đồng hồ CW và sự lộn nhào, trong khi các chất dẫn dụ lại làm tăng sự quay ngược kim đồng hồ và bơi thẳng.

Cần phải chú ý rằng CheA thuộc về một họ của các protein điều hoà nó đảm bảo cho vi khuẩn nhận biết được môi trường và trạng thái trao đổi chất bên trong của chúng. Ví dụ, NtrB, tương đồng với CheA, điều khiển sự biểu hiện của các gene đáp ứng với sự cân bằng nitơ của tế bào. Tất cả các loại tương đồng với CheA đều là các kinase tự phosphoryl hóa nó điều hoà hoạt tính của các protein đích bằng cách phosphoryl hóa chúng. Các cặp sensor-effector được gọi là hệ thống điều hoà hai thành phần.

Như vậy, hóa thụ thể vận động đã khởi động quá trình phosphoryl hóa liên tục để kiểm soát hướng quay của tiêm mao hay lông roi.

11.6 Sự methyl hóa thuận nghịch của các hóa thụ thể tạo thích ứng chuyển động

Chúng ta cần xem xét đến sự đáp ứng của một vi khuẩn đối với sự tăng đột ngột nồng độ chất xua đuôi. Lượng CheY được phosphoryl hóa (P-CheY) tăng nhanh sẽ cảm ứng sự quay theo chiều kim đồng hồ và lộn nhào. Tuy nhiên, sau một vài giây nó sẽ quay trở lại trạng thái ban đầu. Tính nhạy cảm đó gọi là sự thích ứng (adaptation). Làm thế nào để đạt được điều đó trong sự hóa hướng động? Một manh mối đã được mở ra từ việc nghiên cứu thấy rằng sự thích ứng bị sai lệch đi nhiều trong các đột biến thiếu cả hai protein CheR và CheB. CheR mã hóa cho một methyltransferase và CheB mã hóa cho một methylesterase. Bốn chuỗi bên glutamate trên mỗi hóa thụ thể có thể được methyl hóa bởi CheR khi chúng sử dụng S-adenosylmethionine như một chất cho methyl. Những nhóm γ -methyl này tiếp theo sẽ được tách bỏ đi bởi hoạt động thủy phân của CheB. Điều đó cho thấy rằng sự methyl hóa thuận nghịch là trung tâm của sự thích ứng.

Sự methyl hóa dẫn đến sự thích ứng thực hiện thông qua một vòng điều hoà được dựa trên bốn tương tác :

1. Sự liên kết của một chất dẫn dụ vào một thụ thể sẽ thúc đẩy sự methyl hóa. Trong khi sự liên kết của một chất xua đuổi sẽ ức chế sự methyl hóa. Trong sự vắng mặt của chất dẫn dụ hoặc chất xua đuổi, một thụ thể có chứa trung bình hai nhóm methyl.
2. Sự methyl hóa sẽ làm tăng khả năng của một thụ thể trong việc khởi động sự tự phosphoryl hóa của CheA và tiếp theo là sự phosphoryl hóa của CheY.
3. Cả CheB và CheY đều được phosphoryl hóa bởi P-CheA. Vị trí của sự phosphoryl hóa này là ở chuỗi bên của aspartate.
4. Hoạt tính methylesterase của CheB được tăng lên đáng kể bởi sự phosphoryl hóa.

Làm thế nào mà sự liên kết giữa methyl hóa và phosphoryl hóa này lại dẫn tới sự thích ứng. Bổ sung một chất xua đuổi sẽ dẫn tới tăng tốc thời của P-CheA và P-CheY, điều đó sẽ cảm ứng sự quay theo chiều kim đồng hồ và lộn nhào. Sau đó CheB được phosphoryl hóa. Kết quả là làm tăng hoạt tính methylesterase và trong thời gian chất xua đuổi bám vào thụ thể sẽ dẫn tới làm giảm sự methyl hóa thụ thể. Vì ít P-CheA và P-CheY được tạo thành sau đó nên khả năng quay CW giảm và vi khuẩn ít lộn nhào. Sự đáp ứng đối với sự tăng của một chất dẫn dụ là ngược lại so với chất xua đuổi. Trong cả hai trường hợp sự methyl hóa đóng vai trò là một tín hiệu điều hòa ngược âm, nó làm cho hệ thống cảm nhận quay trở lại trạng thái không được kích thích.

Các hóa thụ thể bản thân chúng là các mô hình xử lý thông tin thu nhỏ đầy ấn tượng. Đường ra của chúng phụ thuộc vào:

- Có hay không chất xua đuổi được gắn vào.
- Có hay không chất dẫn dụ được gắn vào.
- Và có hay không có từ 0, 1, 2, 3 đến 4 nhóm methyl được gắn vào thụ thể.

Do vậy một thụ thể có thể là một trong 20 trạng thái ($2 \times 2 \times 5$). Điều đó khác biệt nhau nhờ sự khởi động phosphoryl hóa của chúng và sự nhạy cảm tiếp theo đối với sự methyl hóa. Một tính chất khác cần chú ý của hệ thống cảm nhận này là sự kích thích sẽ được tiếp nối một cách tự động bằng sự thích ứng vì sự methyl hóa và sự phosphoryl hóa được liên kết với nhau. Sự hóa hướng động ở vi khuẩn cho thấy rằng tập tính tích lũy có thể tăng dần lên từ sự biến thiên của các nhân tố ngẫu nhiên.

Tóm tắt chương 11

Khả năng hóa hướng động (chemotaxis) của các loại sinh vật bậc thấp đối với các chất dẫn dụ và các chất xua đuổi phụ thuộc vào các dạng hóa thụ thể (chemoreceptor) trên màng tế bào.

Sự định hướng vận động của các vi khuẩn là nhờ thông tin từ hóa thụ thể được chuyển đến một hệ thống xử lý trung tâm để phân tích, sau đó tín hiệu được xử lý sẽ gửi đến các bộ máy vận động (motor) nằm ở gốc lông roi (tiên mao) giúp cho vi khuẩn bơi thẳng hoặc lộn nhào đổi hướng.

Có bốn loại hóa thụ thể xuyên qua màng sinh chất thực hiện chức năng truyền tín hiệu vận động được mã hóa bởi các gen *tsr*, *tar*, *trg*, và *tap* và đều có đặc điểm có vị trí methyl hóa. Quá trình methyl hóa thuận nghịch giúp cho thụ thể tạo ra sự thích ứng (adaptation) chuyển động trước các chất dẫn dụ hay chất xua đuổi theo cơ chế điều hòa ngược âm làm cho hệ thống cảm nhận đều biến trạng thái kích thích. Đặc điểm của hệ thống cảm nhận là sự kích thích sẽ được nối tiếp nhau một cách tự động, liên quan đến nhiều protein Che nội bào như Che-A, Che-B, Che-R, Che-Y và Che-Z, Che-W và được thực hiện bằng sự methyl hóa và phosphoryl hóa kế tiếp nhau

Chương 12

Quang thụ thể rhodopsin

12.1 Tế bào võng mạc hình que có thể bị kích thích bởi một photon đơn lẻ

Chúng ta quay trở lại với dòng dẫn truyền tín hiệu ánh sáng trong các sinh vật bậc cao. Đó chính là sự biến đổi tín hiệu ánh sáng thành các dạng biến đổi của các phân tử hoá học để sau đó chuyển thành các tín hiệu thần kinh. Động vật có xương sống có hai loại tế bào thụ thể quang, bao gồm các tế bào hình que và thể nón, cách gọi như thế là vì hình dạng của chúng. Chức năng của tế bào nón đáp ứng lại các hình ảnh màu sắc, trong khi các tế bào hình que có chức năng trong tối nhận biết ánh sáng nhưng không phân biệt màu sắc. Một võng mạc ở người chứa khoảng 3 triệu tế bào hình nón và hàng trăm triệu tế bào hình que. Các tế bào hình que và tế bào hình nón tập hợp thành các vùng synap liên kết với các tế bào lưỡng cực. Về phần mình các tế bào lưỡng cực được nối với các tế bào thần kinh khác qua các synap.

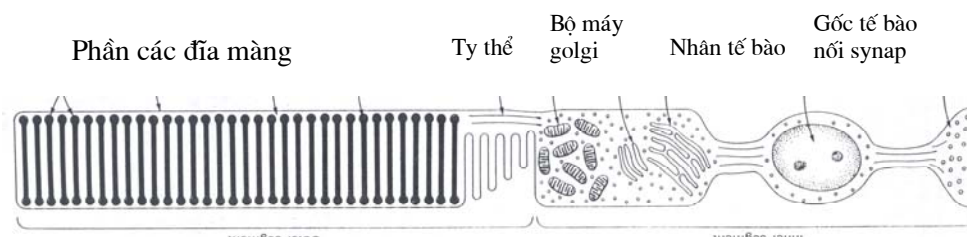
Tín hiệu điện sinh ra bằng sự cảm nhận ánh sáng và biến đổi năng lượng ánh sáng của các quang thụ thể cùng với mạng lưới tế bào thần kinh phức tạp nằm trong võng mạc và sau đó được truyền vào não nhờ các sợi thần kinh thị giác. Như vậy võng mạc có một chức năng kép là truyền ánh sáng đến thần kinh thúc đẩy và hình thành thông tin thị giác.

Trong năm 1938, Selig Hechi đã khám phá ra hiện tượng này thông qua các nghiên cứu vật lý, đã thấy rằng các tế bào hình que ở người có thể bị kích thích bởi một dòng photon đơn lẻ. Đây là khám phá có cơ sở phân tử của các cơ quan cảm giác tinh tế này. Các tế bào hình que có cấu trúc mỏng và dài, ở người chúng có đường kính $1\mu\text{m}$ và dài $40\mu\text{m}$. Chức năng chính của tế bào hình que là cảm nhận năng lượng ánh sáng. Tế bào hình que chia làm hai phần: phần ngoài là các đĩa màng xếp chồng nhau dùng để tiếp nhận ánh sáng, phần thứ hai là phần chuyển hoá năng lượng có chứa nhân và nhiều ti thể. Bộ phận bên ngoài của tế bào hình que đặc trưng cho quang thụ thể bao gồm một ngăn chứa khoảng 100 lớp đĩa màng được ghép lại với nhau. Những cấu trúc này được bao bọc dày đặc bởi các protein thụ thể quang. Các lớp màng này tách khỏi tế bào chất. Một tiêm mao mỏng không chuyển động nối bộ phận ngoài và bộ phận trong, tại vùng này chứa nhiều ti thể và riboxom. Màng bên trong sinh ra ATP với một tốc độ nhanh để thực hiện quá trình truyền tin và hoạt động tổng hợp protein.

Các tấm mỏng trong màng ngoài có thời gian sống một tháng và được phục hồi một cách liên tục. Phần bên trong là phần chứa thân synap. Rất nhiều nang chứa chất truyền tin có mặt trong synap này.

Màng của tế bào hình que chứa các kênh vận chuyển cation, sẽ được mở trong tối. Trong tối ion Na^+ nhanh chóng đi ra phần ngoài vì các kênh này có khả năng dễ thấm cao đối với ion Na^+ và tạo ra gradient là rất lớn. Gradient này được tạo ra là do ion Na^+ , K^+ . ATPase được định vị ở màng bên trong. Ánh sáng sẽ ngăn cản những kênh đặc hiệu cation ở màng ngoài. Tiếp theo đó sự tràn ion Na^+ bị giảm xuống và màng sinh chất trở thành bị phân cực cao so với lúc đầu trên màng ngoài. Sự phân cực cao bị cảm ứng bởi ánh sáng sau đó được chuyển qua màng sinh chất từ phần ngoài đến thân synap. Một photon đơn lẻ bị hấp thụ bởi

thể que thích hợp tối có thể đóng hàng trăm các kênh đặc hiệu cation và dẫn tới sự phân cực cao khoảng 1mV và được nhận cảm bởi synap và được truyền đến các nơron khác trong võng mạc (hình 12.1).



Hình 12.1

Sơ đồ tế bào võng mạc hình que (theo Stryer.L.1998)

12.2 Rhodopsin, một thụ thể ánh sáng của võng mạc mắt

Ánh sáng sẽ dẫn đến sự đóng các kênh trên màng và gây ra sự phân cực cao như thế nào? Ánh sáng phải được hấp thụ để kích thích một tế bào thụ thể quang. Hơn nữa nhóm hấp thụ ánh sáng (gọi là một thể màu – Chromophor) phải được trải qua một sự biến đổi cấu trúc sau khi nó hấp thụ một photon. Phân tử cảm quang trong phần lớp mỏng của các thể que được gọi là rhodopsin, là phân tử bao gồm opsin, một protein và nhóm thêm 11- cis – retinal. Tiền chất của 11- cis – retinal là vitaminA (all-trans-retinol) chất này không được tổng hợp lại ở các động vật. Sự thiếu hụt vitamin A sẽ dẫn đến nguy cơ bị mù mà biểu hiện ban đầu là bệnh quáng gà và cuối cùng dẫn đến làm hỏng bộ phận ngoài của tế bào hình que.

All-trans-retinal được chuyển thành 11- cis - retinal theo các bước. Màu sắc của rhodopsin và phản ứng của nó với ánh sáng phụ thuộc vào sự có mặt của 11- cis – retinal. Các tế bào chứa thể màu này rất cần có rhodopsin. Khả năng hấp thụ ánh sáng tối đa trong khoảng bước sóng nhìn thấy là 500nm. 11- cis – retinal được gắn vào một protein bằng liên kết base schif. Nhóm aldehyd của 11- cis – retinal được liên kết với nhóm ε- amino của một gốc lysine(Lys 296). Liên kết base schif không nhường proton sẽ hấp thụ tối đa ở bước sóng 380nm. Ở bước sóng 440nm hoặc bước sóng dài hơn thì liên kết base schif là ở dạng cho proton.

Ở bước sóng tối đa 500nm của rhodopsin người ta đã chỉ ra một cách rõ ràng là các base schif là chất cho một proton. Rhodopsin, một protein màng có khối lượng 40kD chứa 7 chuỗi xoắn α xuyên qua màng. Gốc amin tận cùng của nó ở vị trí phía trong màng và gốc cacboxyl ở trong tế bào chất. Nhóm thêm phi protein 11 – cis – retinal nằm trên một vùng (domain) của phân tử protein gần giữa trung tâm của màng. Thụ thể bị kích thích thì không hoạt động được vì sự photphoryl hoá gốc serine và gốc threonine trong phần đuôi tận cùng của gốc cacboxyl liền kề. Kiểu 7 vòng xoắn có mặt trong nhiều thụ thể màng eukaryota từ nấm men đến người.

12.3 Sự kích thích thị giác do quang isomer hoá của 11 – cis – retinal

Năm 1958, George Wald và cộng sự đã khám phá ra rằng ánh sáng tạo ra sự isomer hoá nhóm 11- cis – retinal của rhodopsin thành dạng all - trans - retinal. Sự isomer hoá này làm

kích thích thị giác, gây ra sự thay đổi rõ ràng cấu trúc không gian của nhóm retinal. Người ta nhận thấy các liên kết base schif giữa retinal và phần protein opsin di chuyển một khoảng cách xấp xỉ 5 \AA khi quan sát phổ hấp phụ của hợp chất này. Về cơ bản một photon của ánh sáng đã làm biến đổi cấu hình của phân tử rhodopsin bằng cách tạo ra sự dao động ở mức nguyên tử của phân tử này.

Nhiều sự isomer hoá của retinal xảy ra trong khoảng 10-12 giây (picosec) để hấp thụ một photon. Cả retinal và protein đều tiếp tục thay đổi về cấu trúc khi bị phản hồi trong sự hình thành một loạt các chất dẫn truyền trung gian với các đặc tính quang phổ khác nhau. Các liên kết base schif trở nên bị deproton (mất đi proton) trong sự biến đổi từ meta rhodopsin I thành II trong khoảng 10-6 giây. Meta rhodopsin II được gọi là rhodopsin bị kích thích bởi ánh sáng, khởi động một loạt các chuỗi enzym. Các base schif không proton trong meta rhodopsin II bị thủy phân trong khoảng một phút tạo ra sản phẩm opsin và dạng all-trans- retinal, chất này khác biệt với các protein vì nó không tác động vào vị trí gắn với 11- cis – retinal. All-trans- retinal bị khử tiếp thành all-trans-retinol và đồng phân hoá thành 11- cis – retinal và hình thành một liên kết base schif, sau đó liên kết với opsin.

12.4 Ánh sáng giúp Rhodopsin hoạt hoá protein G làm thủy phân GMP vòng

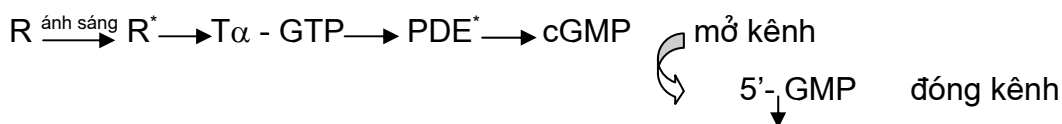
Việc đóng các kênh đặc hiệu cation và sự phân cực cao tiếp theo được khuếch đại để trả lời các bộ phận ngoài. Hơn một triệu ion Na^+ bị ngăn chặn lại bởi sự hấp thụ một photon đơn lẻ nhờ một thể que thích ứng tối. Cơ chế của sự khuếch đại đặc biệt này xảy ra như thế nào ?

Trong tối, các kênh đặc hiệu cation trên màng sinh chất được mở nhờ GMP vòng. Một nucleotide vòng được bắt nguồn từ GTP. Rhodopsin bị kích thích bởi ánh sáng sẽ khởi động một chuỗi enzyme dẫn đến sự thủy phân của GMP vòng. Dòng thông tin trong sự kích thích thị giác là từ rhodopsin bị kích thích (R^*) thành dạng transducin ($\text{T}\alpha$ - GTP) đến một dạng phosphodiester (PDE) để thủy phân GMP vòng (cGMP).

Sự cảm ứng ánh sáng làm giảm nồng độ cGMP sau đó các kênh đóng lại.

Transducin, một protein có tín hiệu kép trong sự kích thích thị giác, có liên quan đến sự bất hoạt trạng thái GDP và một dạng hoạt động GTP. Protein này bao gồm các tiểu đơn vị α (39kd), β (36kd), γ (8kd), vị trí gắn với nucleotide guanyl nằm trên tiểu đơn vị α . Trong tối, transducin là ở dạng GDP bị bất hoạt. Rhodopsin bị kích thích bởi ánh sáng (R^*) hoạt hoá transducin bằng cách hình thành phức hợp với nó và xúc tác thay đổi GTP thành GDP. Việc gắn GTP với transducin dẫn đến giải phóng R^* , dạng có khả năng xúc tác hoạt hoá 500 phân tử transducin, đây là trạng thái đầu tiên trong việc khuếch đại tín hiệu thị giác.

Việc liên kết GTP cũng dẫn tới sự phân tách $\text{T}\alpha$ - GTP thành $\text{T}\gamma\beta$, dạng hoạt động của transducin, sau đó chuyển thành dạng photphodiester (PDE) bằng cách làm giảm một chất kìm hãm chất ức chế. Trong tối, hai tiểu đơn vị α β của PDE được giữ chắc chắn nhờ một cặp tiểu đơn vị kìm hãm γ . Sự thủy phân của cGMP nhờ photphodiesterase là trạng thái thứ hai của sự khuếch đại (hình 12.2).



Hình 12.2

Sơ đồ cơ chế kích động ánh sáng làm đóng mở kênh canxi liên quan đến hoạt động của transducin và sự thủy phân GMP vòng (cGMP)

12.5 Sự thủy phân cGMP giúp đóng các kênh đặc hiệu cation để sinh ra một tín hiệu thần kinh

Sự thủy phân cGMP bị kích thích bởi ánh sáng sẽ dẫn đến việc đóng các kênh đặc hiệu cation trên màng sinh chất như thế nào? Câu trả lời bắt nguồn từ tập hợp các nghiên cứu nhỏ về màng của thể que. Một bộ phận của màng được mở ra nhờ thêm vào các cGMP (hoặc một chất tương tự chống lại sự thủy phân của cGMP) vào bề mặt của nội chất. Các nucleotide khác không hiệu quả và ATP thì không cần thiết. Do vậy việc mở các kênh bởi cGMP được trực tiếp hơn việc qua trung gian bởi các sự cải biến hoặc bằng cách gắn với một protein nội bào.

Các kênh cation là một dạng protein cấu trúc bậc bốn (multimer) gồm nhiều tiểu đơn vị có khối lượng 80kDa. Việc mở kênh này là sự kết hợp cao với việc gắn cGMP. Hệ số Hill cao nhất của sự kết hợp này chỉ ra rằng kênh mở đòi hỏi gắn vào ít nhất 3 phân tử cGMP. Phần năng lượng tự do của liên kết này được sử dụng để thay đổi cấu trúc của kênh màng từ trạng thái đóng sang trạng thái mở như trong trường hợp kênh thụ thể acetylcholin và các kênh đóng mở nhờ được gắn với các ligand khác. Mức độ hợp tác cao của gắn kết làm tăng độ nhạy cảm của các kênh ngay cả khi có sự thay đổi nhỏ về nồng độ cGMP cho phép cGMP hoạt động như một công tắc điện. Các kênh cation mở và đóng trong khoảng thời gian tính theo miligiây để đáp lại các thay đổi sinh lý trong mức độ nhỏ của cGMP. Một kênh tương tự của các thụ thể khứu giác được điều khiển hoạt động nhờ cAMP cũng đã được nghiên cứu như là chất giữ một vai trò chìa khoá trong khứu giác.

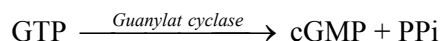
12.6 Cảm ứng ánh sáng làm giảm nồng độ Ca^{2+} điều biến sự phục hồi và thích ứng

Hệ thống hoạt hoá protein G và transducin phục hồi trở lại với trạng thái tối như thế nào?

Tiểu đơn vị α của transducin có hoạt tính GTPase thủy phân liên kết GTP với GDP. Sự thủy phân xảy ra rất nhanh sau khi transducin gắn với photphodiesterase. Photphodiesterase trở nên bị bất hoạt khi transducin bị chuyển hoá thành $T\alpha$ -GDP. Sự thủy phân của $T\alpha$ -GTP thành $T\alpha$ -GDP là cần thiết nhưng không hiệu quả cho sự bất hoạt của photphodiesterase. R^* cũng bị bất hoạt vì thế nó không tiếp tục khởi động hoạt hoá của transducin.

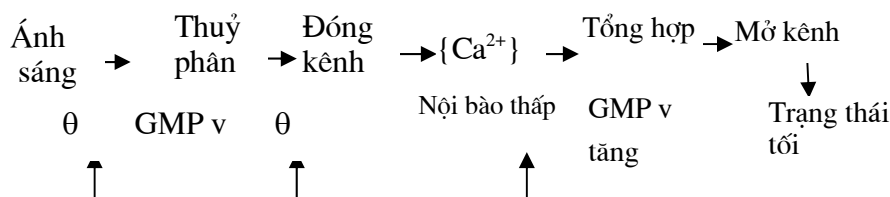
Rhodopsin kinase xúc tác sự photphoryl hóa R^* tại hàng loạt các gốc serine và threonine trong vùng cacboxyl tận cùng. Arrestin, một loại protein kìm hãm, sau khi gắn với R^* đã bị photphoryl hoá để ngăn cản việc gắn của transducin và ngăn chặn hoạt động của

phosphodiesterase. Sự phục hồi của trạng thái tối cũng đòi hỏi sự tổng hợp của cGMP từ GTP một phản ứng được xúc tác bởi guanylate cyclase:



Ion Ca²⁺ giữ một vai trò chìa khoá trong việc kiểm tra hoạt động của enzyme này. Trong tối Ca²⁺ cũng như Na⁺ đi vào bộ phận ngoài của màng thể que thông qua kênh kiểm soát cGMP trên màng. Dòng ion Ca²⁺ đi vào và đi ra được cân bằng thông qua một kênh trao đổi. Hậu quả cuối cùng là nồng độ ion Ca²⁺ ở tế bào chất giảm từ 500nM xuống còn là 50nM.

Rõ ràng sự cảm ứng ánh sáng làm giảm nồng độ Ca²⁺ bị kích thích bởi guanylate cyclase. Như vậy sự khôi phục tiếp theo một xung động ánh sáng được truyền qua trung gian bởi hoạt động GTPase của transducin, sự bất hoạt của R* bởi rhodopsin kinase và arrestin và sự hoạt động của guanylate cyclase làm điều hoà nồng độ ion Ca²⁺. Sự kích thích một cách tự động trong sự thay đổi quá trình phục hồi bằng việc đóng các kênh màng để làm giảm nồng độ ion Ca²⁺. Sự thích ứng cho phép các tế bào hình que của võng mạc nhận biết được sự tương phản ở mức độ nhạy trên 10 vạn lần (100.000) của cường độ ánh sáng cơ bản. Về bản chất cGMP là chất truyền tin kích thích, và các ion Ca²⁺ là sự ghi nhớ lại việc truyền qua của các photon ánh sáng. Các nghiên cứu điện sinh lý đã chứng minh rằng ion Ca²⁺ giữ một vai trò chìa khoá để thích ứng cho sự phục hồi. Hệ thống thị giác như là một hệ thống hoá hướng động ở vi khuẩn đã nói ở trên, liên tục nhạy cảm với các kích thích tăng cường (hình 12.3).



Hình 12.3

Sơ đồ sự kích thích thị giác bằng ánh sáng tiếp theo xảy ra sự phục hồi và thích ứng. Sự hạ thấp mức độ Ca²⁺ nội bào do cảm ứng ánh sáng là một tín hiệu điều biến. Dấu θ chỉ cơ chế điều hoà ngược (feedback)

12.7 Cảm giác nhìn nhận màu sắc thực hiện nhờ ba loại thụ thể giống rhodopsin của tế bào hình nón

Vào năm 1802, Thomas Young đã nêu ra rằng cảm giác nhìn nhận màu sắc được thực hiện bằng ba thụ thể cơ bản. Những nghiên cứu về phép đo quang phổ đối với võng mạc nguyên vẹn từ hơn một thế kỷ trước và kéo dài đến nửa thế kỷ sau này đã phát hiện ra rằng có ba kiểu tế bào hình nón có khả năng hấp thụ màu xanh lơ (da trời), màu xanh lá cây và màu đỏ. Xác định phổ hấp thụ của ba kiểu protein quang thụ thể (photoreceptor) bằng cách chiếu sáng vào phần mảnh ngoài của tế bào hình nón với một chùm sáng có đường kính 1 micromét. Sự đáp ứng của các tế bào hình nón khác nhau đối với ánh sáng đơn sắc có bước sóng khác nhau cho thấy rằng các tế bào này thuộc vào 3 nhóm cơ bản là: một số tế bào bị kích thích bằng ánh sáng xanh lơ, một số khác là xanh lá cây, số còn lại là ánh sáng đỏ. Ở cá vàng, sự hấp thụ cực đại (λ_{max}) của ba loại thụ thể tương ứng là 455, 530, 625 nm, ở người là 426, 530, 560 nm đồng thời người ta cũng đã xác định λ_{max} của rhodopsin là 500 nm.

Các protein quang thụ thể của tế hình nón là những protein có bảy vòng xoắn xuyên màng và cũng chứa yếu tố hấp thụ màu (Chromophore) là 11 – Cis retinal. Các nghiên cứu về đột biến đặc hiệu vị trí và các thụ thể tế bào hình nón của các loài linh trưởng khác nhau đã phát hiện thấy có ba gốc acid amin chứa hydroxyl định vị ở gần retinal xác định sự khác nhau về phổ ánh sáng giữa thụ thể màu xanh lá cây và màu đỏ. Sự thay thế một gốc acid amin không phân cực bằng một gốc phân cực (ví dụ: alanin được thay bằng Serine) ở mỗi một trong ba vị trí đã làm thay đổi λ max đối với màu đỏ khoảng 10 nm.

Tóm tắt chương 12

Rhodopsin là một quang thụ thể cảm nhận ánh sáng, là một protein xuyên màng bảy lần được phân bố trên lớp màng xếp chồng của các tế bào hình que và hình nón ở cơ quan võng mạc mắt động vật. Tế bào hình que cảm nhận ánh sáng, tế bào hình nón cảm nhận màu sắc.

Cơ chế tiếp nhận ánh sáng của các thụ thể này thông qua sự kích thích của photon ánh sáng làm biến đổi các dạng cấu trúc của 11-cis-retinal, nhóm thêm của thụ thể Rhodopsin. Tiếp theo là hàng loạt phản ứng oxy hóa khử xảy ra tạo xung điện truyền qua các tế bào phân cực và các synap của các noron thần kinh thị giác tới não cho ta cảm nhận ánh sáng và màu sắc của vật nhìn.

Sự hoạt động của thụ thể Rhodopsin luôn luôn thông qua cơ chế biến đổi của protein G và luồng ion Ca^{2+} , ion Na^{+} . Các nghiên cứu điện sinh lý đã chứng minh vai trò thích ứng và phục hồi là do luồng ion Ca^{2+} đảm nhiệm.

Chương 13

Một số thụ thể của các tế bào miễn dịch

13.1 Thụ thể màng tế bào lympho T

Các tế bào nguồn lympho bao gồm hai dạng quần thể là lympho T và lympho B, chúng đều có nguồn gốc từ các tế bào nguồn tạo máu (*haematopoietic stem cell*) của tủy xương.

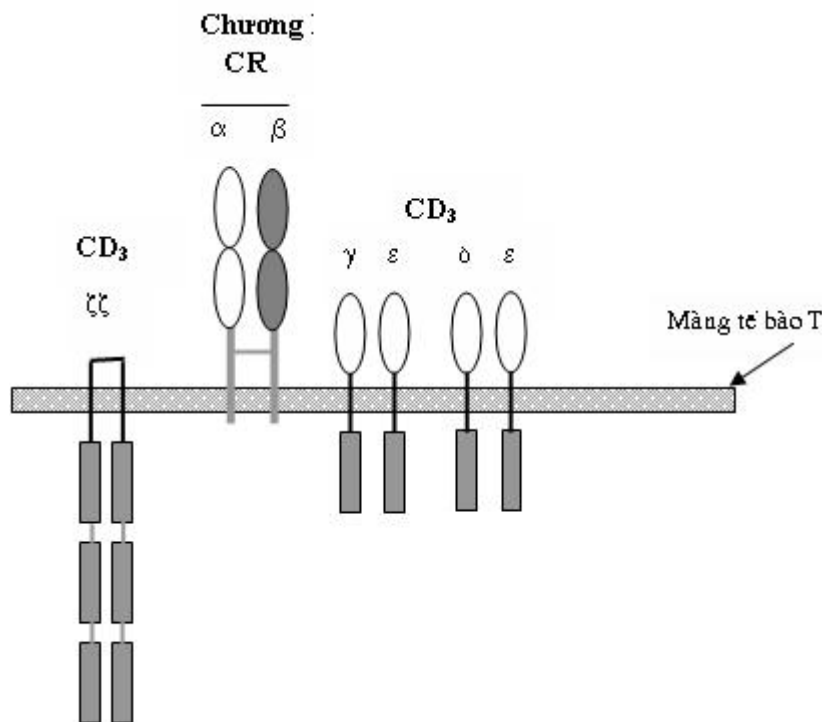
Lympho T được biệt hóa từ tế bào tiền thân tủy xương $CD_{34}^{+} 44^{+}$ di chuyển về tuyến ức. Ở đây chúng trở thành tế bào ức lớp vỏ là những nguyên bào sau đó phân chia và bộc lộ các phân tử kháng nguyên CD_2 , CD_1 , CD_5 . Tiếp theo các tế bào bộc lộ phân tử TCR, phức hệ CD_3 . Các tế bào khác bộc lộ thêm phân tử CD_4 và CD_8 (trên mỗi loại tế bào T chỉ biểu hiện một loại hoặc là cụm biệt hóa CD_4 hoặc là CD_8).

Các tế bào T chia thành 2 lớp chính, khác nhau ở chức năng phản ứng. Hai lớp này được phân biệt bởi sự biểu hiện của các protein bề mặt tế bào CD_4 và CD_8 chúng nhận ra 2 lớp phân tử MHC khác nhau biểu hiện ở cấu trúc và mô hình biểu hiện trên các mô của cơ thể. Cụm biệt hóa CD_4 và CD_8 được biết như các dấu hiệu (marker) cho nhiều chức năng khác nhau của các tế bào T. CD_4 gắn với các phân tử MHC lớp II và CD_8 gắn với các phân tử MHC lớp I. Trong quá trình nhận diện kháng nguyên, tùy thuộc vào dạng tế bào T, các phân tử CD_4 hoặc CD_8 trên bề mặt tế bào T kết hợp với các receptor tế bào T và gắn với các vị trí bất biến trên phần MHC của tổ hợp MHC: peptit gắn. Việc gắn này cho phép tế bào T tạo nên một đáp ứng hiệu quả, cũng chính vì vậy CD_4 và CD_8 đôi khi còn được gọi là các đồng thụ thể (co-receptor).

13.2 Phức hệ TCR/CD3

Các thụ thể của lympho T hoặc TCR (T-cell receptor) ở dạng heterodimer do hai chuỗi polipeptit xuyên qua màng tế bào là α và β hoặc γ và δ kết hợp với nhau. Mỗi chuỗi polypeptit đều bao gồm một vùng dễ biến đổi (V) tận cùng đầu N và một vùng không biến đổi (C) xuyên qua màng và bộc lộ một đoạn rất ngắn phía trong màng tế bào chất đầu C tận cùng. Các thụ thể TCR kết hợp bằng liên kết không cộng hóa trị với 5 tiểu đơn vị của phức hệ CD3 tương ứng là gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ) và eta (η). Các tiểu đơn vị zeta có hai dimer giống nhau (ζ - ζ) chiếm 90% và dị dimer (ζ - η) khoảng 10%. Trong quá trình đáp ứng miễn dịch, phân tử CD_4 tương tác với phân tử MHC lớp II, còn phân tử CD_8 tương tác với phân tử MHC lớp I tạo ra sự ổn định giữa TCR và phức hợp kháng nguyên – phức hệ phù hợp tổ chức chủ yếu (Ag-MHC) của tế bào trình diện kháng nguyên (Antigen Presenting Cell-APC).

Hai đơn vị chức năng của phức hệ CD3 là $\gamma\epsilon\delta\epsilon$ và $\zeta\zeta$.

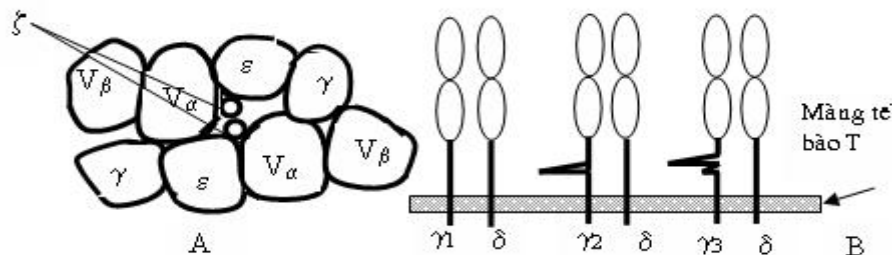


Hình 13.1
Sơ đồ phức hệ TCR/CD₃. Hai chuỗi chức năng α và β

Khoảng 70% lympho của máu tuần hoàn chứa các thụ thể TCR và chủ yếu ở dạng $\alpha\beta$ (95% là $\alpha\beta$ và khoảng vài phần trăm là $\alpha\delta$). Trong khi đó, ở mô tế bào tỷ lệ phần trăm $\gamma\delta$ cao hơn và chủ yếu là ở các tuyến nhầy.

Các chuỗi polypeptit ζ và η có phần ngoại bào rất ngắn chỉ gồm 9 gốc acid amin, một mảnh peptit xuyên qua màng và hai vùng rất dài nằm trong tế bào chất. Hai chuỗi polipeptit có thể ở dạng homodimer ($\zeta\zeta$) hoặc ($\eta\eta$) hoặc ở dạng heterodimer ($\zeta\eta$). Các vùng tế bào chất của các chuỗi polipeptit này có một kiểu modul $\gamma\epsilon\delta\epsilon$ hoặc ba kiểu modul $\zeta\zeta$ đóng vai trò truyền dẫn tín hiệu khi chúng tương tác với các tirozinkinase.

Dạng phức hệ TCR/CD3 luôn có mặt ở các lympho T $\alpha\beta$ thường liên kết với các phân tử CD4 và CD8 của các lympho T hỗ trợ (TH), tham gia tương tác miễn dịch với các phân tử phức hệ MHC lớp II và lớp I (hình 13.1 và 13.2).



Hình 13.2(A)
Mô hình tổ chức phức hệ TCR/CD₃ (nhìn trực diện từ trên xuống) (B) Ba kiểu thụ thể $\gamma\delta$ của lympho T

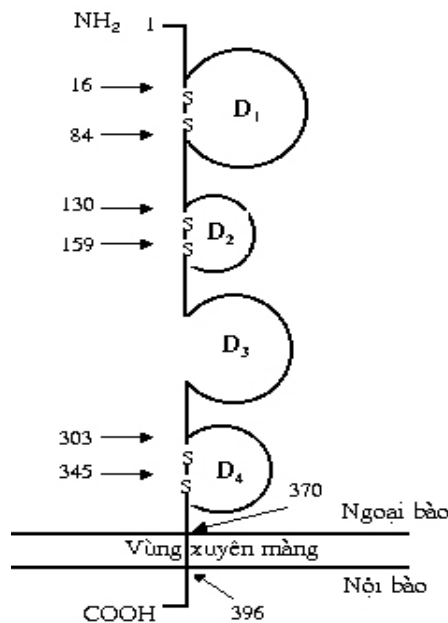
Phức hợp TCR/CD3 là một cấu trúc đa phân tử đặc thù của tế bào T. Phức hệ này cần thiết để bộc lộ trên bề mặt của các thụ thể TCR và đảm bảo cho sự truyền dẫn các tín hiệu do sự tương tác giữa các TCR với kháng nguyên.

13.3 Sự tổng hợp các thụ thể của lympho T

Sự tổng hợp các chuỗi polypeptit của các thụ thể lympho T cũng được thực hiện nhờ các gen tương ứng và có thể so sánh với các gen tổng hợp các Ig. Cũng giống như các Ig, sự tổng hợp một chuỗi polypeptit của TCR có chức năng luôn luôn có quá trình tái tổ hợp của các mảnh gen nhỏ có mặt ở các tế bào T đã chín muồi bên trong tuyến ức. Sự sắp xếp các mảnh minigen này xảy ra theo thứ tự thời gian, trước tiên là γ và δ , sau đó là $\alpha\beta$, β và cuối cùng là α . Cụ thể là để mã hóa cho các chuỗi α và γ có sự sắp xếp các mảnh gen $V\alpha$ $J\alpha$ $C\alpha$ và $V\gamma$ $J\gamma$ $C\gamma$, còn đối với các chuỗi β và δ là các mảnh gen $V\beta$ $D\beta$ $C\beta$ và $V\delta$ $D\delta$ $J\delta$ C .

13.4 Cấu trúc phân tử CD4

Phân tử CD4 là một dấu hiệu (marker) của quần thể phụ của các tế bào Lympho T có thể nhận biết mảnh kháng nguyên tương ứng do các phân tử thuộc phức hệ MHC lớp II trình diện. Là một protein màng thuộc họ globulin miễn dịch có cấu trúc đơn phân tử, phân tử CD4 bao gồm 4 vùng chức năng domain nằm bên ngoài màng tế bào, một vùng xuyên màng có vùng ngắn nằm trong nội bào. Có tương tác theo kiểu trans đối với các phân tử MHC lớp II để làm ổn định mối tương tác thụ thể kháng nguyên T-MHC và có thể truyền tín hiệu tới các tế bào lympho T qua tyrosine kinase p56 hoặc sau đó tương tác theo kiểu cis với receptor T (hình 13.3).



Hình 13.3
Sơ đồ cấu trúc CD₄

Phân tử CD4 là một glycoprotein màng biểu hiện chủ yếu ở trên bề mặt của tế bào lympho T hỗ trợ (T help), cùng với các thụ thể khác trên màng tế bào, nó sẽ nhận ra kháng nguyên được trình diện trên các phân tử MHC lớp II. Mặt khác, các kết quả thực nghiệm đã chỉ ra rằng trong quá trình tương tác với kháng nguyên, phân tử CD4 đã truyền một tín hiệu tới tế bào và kết hợp với phức hệ TCR/CD3 để khuếch đại tín hiệu hoạt hoá. Phân tử CD4 cũng có một vai trò rất quan trọng được xuất hiện trong quá trình “đào tạo” ở tuyến ức để lựa chọn các thụ thể của TCR.

Phân tử CD4 là một glycoprotein đơn phân tử có khối lượng 55 kDa thuộc họ lớn globulin miễn dịch gồm 4 vùng ngoại bào là D1, D2, D3 và D4 chứa 370 acid amin, một vùng xuyên màng (25 aa) và một vùng nằm trong tế bào chất (38 aa). Các vùng chức năng D1, D2 và D4 có các liên kết disulfua được tạo bởi các acid amin cystein. Ngoài quần thể phụ tế bào lympho T, phân tử CD4 còn có mặt trên các tế bào đơn nhân (bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, các tế bào tua...).

Protein CD4 có cấu trúc gồm 4 vùng chức năng ngoại bào cũng có dạng tương đồng như các phân tử globulin miễn dịch (Ig). Hai vùng chức năng D1 và D2 của phân tử CD4 được bao gói chặt với nhau tạo thành một dạng cầu rắn chiều dài khoảng 60 Å, chúng được gắn bởi một khớp nối như bản lề với một dạng cầu tương tự tạo ra bởi các vùng chức năng D3 và D4.

Nghiên cứu cấu trúc ba chiều của phân tử CD4 và tinh thể học cho thấy phân tử CD4 giống như vùng siêu biến của các phân tử Ig (hình 13.3).

13.4.1 Sự đa dạng của phân tử CD₄ ở một số loài động vật khác nhau

Người ta đã phát hiện thấy gen mã hoá cho phân tử CD4 ở người nằm trên nhiễm sắc thể số 12, bao gồm 9 exon tách biệt với 8 intron có chiều dài 33kb. Những kết quả phân tích trình tự acid amin và so sánh trình tự acid amin ở phần ngoại bào của phân tử CD4 với phân tử CD4 của hắc tinh tinh, chuột nhắt và chuột cống (bảng 13.1) cho thấy có sự tương đồng tới 92% so với hắc tinh tinh, 55% so với chuột nhắt và gần 74% so với chuột cống. Vùng nằm trong tế bào chất là phân tử có tính bảo thủ rất cao (>78%) trong các loài động vật khác nhau, có giả thuyết cho rằng vùng này có vai trò thực hiện nhiều chức năng quan trọng.

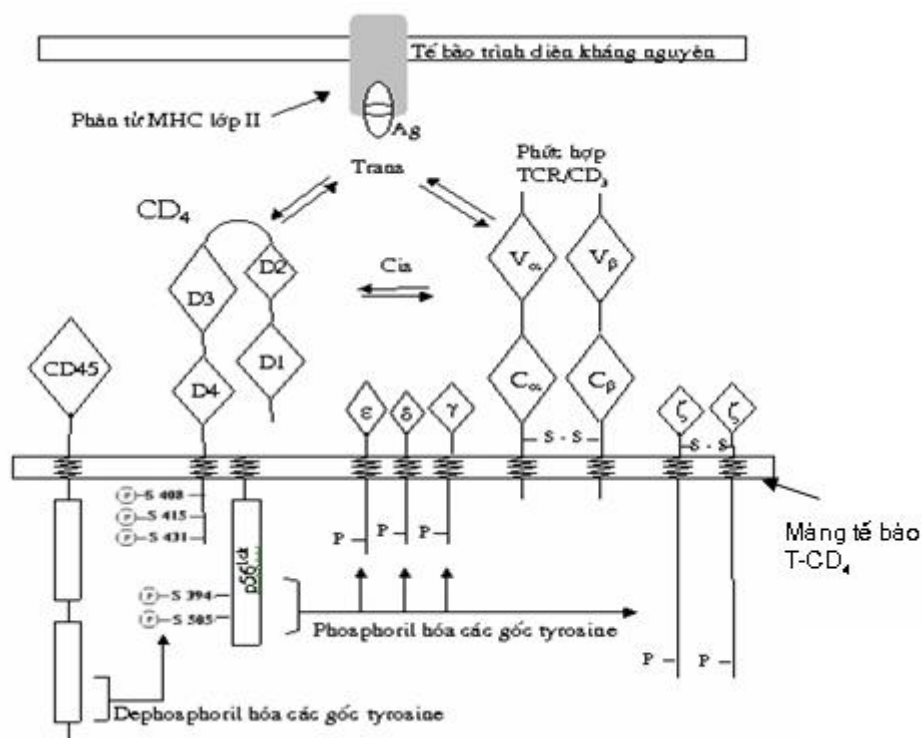
Bảng 13.1							
So sánh độ tương đồng của phân tử CD ₄ người với một số động vật							
Cấu trúc phân tử CD₄ ở các loài động vật							
Phân tử CD₄	Vị trí các gốc cystein		Vị trí các gốc glycosyl (asparagine)		Mức độ tương đồng (%)		
Người	D	16-84	D	271			
	1	130 -	3	300			
	D	159	D				
	2	303 -	4				
	D	345					
	4						
Khỉ	D	16 - 84	D	271	E	89	
	1	---		---			95
	D						100
	2	345	*		M C y t		
D							
	4						

Hắc tinh tinh	D 1 D 2 D 4	16 - 84 130 - 159 303 - 345	D 3 D 4	161 272	E x t T M C y t	96 100 97
Chuột nhất (L3T4)	D 1 D 2 D 4	16 - 86 132 - 162 302 - 344	D 1 D 2 D 3 D 4	161 272 279 366	E x t T M C y t	54 52 80
Chuột cống (W3/25)	D 1 D 2 D 4	16- 84 131 - 160 301 - 343	D 2 D 3 D 4	159 270 365	E x t T M C y t	51 47 78

(Ghi chú: Ext: ngoại bào; TM: vùng xuyên màng; Cyt nội bào)

13.4.2 Tương tác giữa phân tử CD4 và phức hợp Ag - MHC lớp II

Phân tử CD4 gắn với MHC lớp II bằng liên kết yếu (không phải liên kết cộng hóa trị). Sau quá trình tiếp xúc này sẽ xảy ra sự phosphoryl hoá ở nhiều vị trí trên phân tử CD4: 408, 415 và 431, trong đó quan trọng nhất là sự phosphoryl hóa của gốc 408. Hơn nữa vùng chức năng nằm trong tế bào chất của phân tử CD4 có một mô hình cấu trúc gồm 4 acid amin bảo thủ là Cys 420, Glu 421, Cys 422, Pro 423 và một phần chịu trách nhiệm kết hợp với enzym tyrosine kinase p56lck. Sự tương tác chặt chẽ của phân tử CD4 với enzym nội bào tyrosine kinase còn gọi là Lck sẽ chuyển enzym này trở nên gần hơn về mặt không gian với các thành phần tín hiệu của phức hợp thụ thể tế bào T. Kết quả này làm tăng cường tín hiệu tạo ra khi các thụ thể tế bào T gắn với phức hệ: peptit - MHC lớp II (hình 13.4).



Hình 13.4

Sơ đồ tương tác giữa phân tử CD₄ với kháng nguyên trình diện trên phân tử MHC lớp II

Phân tử CD₄ ngoài chức năng là thụ thể của tế bào T khi tiếp xúc với kháng nguyên được trình diện trên phân tử MHC lớp II nó cũng đồng thời là một thụ thể ban đầu quan trọng nhất cho HIV, nguyên nhân gây ra bệnh AIDS. Các nghiên cứu về cấu trúc cho thấy, phần nằm trong tế bào chất của phân tử CD₄ được biết là yếu tố cơ bản cho sự tương tác của các protein virus HIV-1 là Vpu và Nef gồm 17 acid amin tổng hợp cho đoạn peptit CD₄ (403-419). Bằng phân tích trình tự acid amin và cộng hưởng từ hạt nhân người ta thấy thành phần xoắn α trung bình của đoạn peptit này khoảng 25%. Các chỉ số phân tích biến đổi hoá học và xác định được phần xoắn α của đoạn peptit bắt đầu từ Gln403 đến Arg412. Điều này rất đáng chú ý bởi vì vùng xoắn α này có thể là vùng tiếp xúc với các protein Vpu và Nef của HIV.

13.5 Vai trò của tế bào T- CD₄

Trong một cơ thể khoẻ mạnh có khoảng 800 đến 1200 tế bào T CD₄/microlit máu, tuy nhiên số lượng này sẽ bị giảm mạnh ở giai đoạn cuối của quá trình nhiễm HIV. Khi số lượng của T-CD₄ giảm xuống mức 200/microlit máu, cơ thể đã chuyển sang AIDS và cực kì mẫn cảm với các mầm bệnh cơ hội. Nguyên nhân là do tế bào T-CD₄ đóng một vai trò trung tâm trong đáp ứng miễn dịch đặc hiệu tế bào. Các vai trò chính của tế bào T-CD₄:

- Hoạt hoá và cảm ứng các đại thực bào và các tế bào giết tự nhiên
- Điều khiển quá trình chín (trưởng thành) và cảm ứng tế bào B
- Tiết ra các yếu tố sinh trưởng và biệt hóa của các tế bào lympho
- Tiết ra các yếu tố kích thích quần lạc

Tiết ra các yếu tố cảm ứng chức năng những tế bào không có nguồn gốc lympho.

Trong cơ thể, tế bào T-CD4 có vai trò hoạt hóa các tế bào B, tế bào giết tự nhiên, các đại thực bào phụ thuộc vào việc nhận ra các kháng nguyên lạ thông qua phức hệ MHC lớp II, và với lí do trên, T-CD4 đóng vai trò then chốt trong đáp ứng miễn dịch của cơ thể khoẻ mạnh. Tế bào T-CD4 hoạt hoá các tế bào có thẩm quyền miễn dịch khác bằng việc tiết ra các cytokin, trước hết là interleukin (IL-2) và các interferon γ (IFN-gamma). Các tế bào B được hoạt hoá sẽ sản xuất kháng thể làm trung hoà các kháng nguyên lạ của virus, ngăn cản sự dung hợp với màng tế bào.

Bảng 13.2 Các phối tử gắn (ligands) và các phân tử kết hợp với CD₄	
Các phân tử	Vai trò
Các phân tử MHC lớp II	Chất gắn ngoại bào cho CD ₄
Glycoprotein vỏ HIV (gp120)	
IL-16	
Glycoprotein plasma tinh dịch người (gp 17) Protein gắn actin kích thích bài tiết (Secretory actin-binding protein -SABP) Protein cảm ứng Prolactin (Prolactin-inducible protein -PIP) Gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15). Glycoprotein tuyến ngoại mang tai (Extra-parotid glycoprotein (EP-GP))	Chất gắn ngoại bào cho CD ₄
P56lck	Protein tyrosine kinase. Chất gắn nội bào cho CD ₄ (intracellular ligand for CD ₄)

Thực tế cho thấy ở những bệnh nhân nhiễm HIV, số lượng các tế bào T-CD4 bị giảm trong suốt quá trình mang bệnh.

13.6 Những nguyên nhân dẫn đến sự giảm số lượng tế bào T-CD4 khi cơ thể nhiễm HIV

Sau khi xâm nhập vào các tế bào mang cụm biệt hóa CD4, HIV liên tục nhân lên tạo ra hàng loạt virus mới. Sự thiếu hụt miễn dịch mắc phải, về mặt nguyên tắc do sự giảm các lympho CD4, tuy nhiên, cơ chế của việc giảm số lượng CD4 vẫn chưa được hiểu một cách rõ ràng. Một số tác giả cho rằng việc sao chép của HIV đã trực tiếp giết chết những tế bào bị nhiễm hoặc những đáp ứng miễn dịch chống lại HIV của cơ thể đã giết những tế bào này. Tuy nhiên, rất nhiều nghiên cứu đã không chứng tỏ được quan điểm đó. Hơn nữa, những số liệu lại chỉ ra rằng sự giảm số lượng các lympho CD4 là do những cơ chế gián tiếp. Sau đây là một số giả thuyết về nguyên nhân giảm số lượng T-CD4:

1. **Giết trực tiếp tế bào:** Sự nhiễm của HIV vào các tế bào T CD4 và sau đó sinh sôi và phá hủy màng tế bào gây ra hiện tượng giết chết tế bào. HIV cũng có thể

phá vỡ bộ máy bên trong của tế bào dẫn đến cái chết của tế bào. Hơn nữa việc gắn HIV với tế bào T-CD4 cũng kích thích hoạt hoá tế bào gây độc T-CD8 tấn công và tiêu diệt tế bào bị nhiễm virus.

2. **Lấp đầy các vị trí gắn của thụ thể CD4:** HIV có thể gắn với các thụ thể trên bề mặt tế bào T theo 2 cách. Trước tiên, thành phần gp120 của gp160 có thể gắn với thụ thể CD4. Cũng vậy, gp120 có thể tách rời khỏi HIV và gắn với thụ thể CD4. Các tế bào có gp120 gắn với thụ thể CD4 rất mẫn cảm với các tế bào gây độc phụ thuộc kháng thể và các tế bào T gây độc không phụ thuộc kháng thể tấn công. Hơn nữa, việc gắn với thụ thể CD4 làm cho tế bào T giảm chức năng miễn dịch mặc dù HIV đã dung hợp và xâm nhiễm vào tế bào.
3. **Tạo thành hợp bào:** Hợp bào được định nghĩa như là sự dung hợp của tế bào CD4 chưa bị nhiễm với tế bào CD4 đã bị nhiễm để tạo thành một phức hệ tế bào đa nhân. Một vài nghiên cứu in vitro đã thấy rằng có một mối liên hệ tuyến tính trực tiếp giữa sự có mặt của hiện tượng hợp bào và mức độ tác động lây nhiễm tế bào của HIV, tuy nhiên, cơ chế này chưa được hiểu một cách rõ ràng.
4. **Gây chết theo chương trình (Apoptosis):** cái chết tế bào theo chương trình đã thể hiện ở các tế bào T CD4 nhiễm HIV và những tế bào CD4 chưa bị nhiễm với gp120. Việc gắn của gp120 chủ yếu với thụ thể T CD4 khi tế bào T gặp phải kháng nguyên trình diện trên phân tử MHC lớp II dẫn đến việc truyền một tín hiệu kích thích enzym CAD (caspase-activated DNase) trong nhân tế bào. Tùy thuộc vào sự hoạt hoá của CAD, phân tử ADN của tế bào chủ bị phân cắt thành các cặp base có chiều dài khoảng 200 bp và dẫn đến apoptosis của tế bào.
5. **Siêu kháng nguyên:** Kháng nguyên điển hình hoặc các virus có thể khởi phát đáp ứng miễn dịch chỉ ở khoảng 0,01% tế bào T-CD4. Tuy nhiên, các siêu kháng nguyên, tương tác từ 5% tới 30% của tế bào T-CD4 bằng cách gắn với MHC lớp II hoặc các thụ thể tế bào T. Giả thuyết này nói lên rằng HIV mã hoá cho các siêu kháng nguyên gắn với MHC lớp II trên tế bào trình diện kháng nguyên, do đó cảm ứng tế bào T-CD4 thành tính không đáp ứng (anergy là trạng thái không đáp ứng kháng nguyên) và cuối cùng là cái chết của tế bào T.

13.7 Sự tương tác của HIV với phân tử CD4

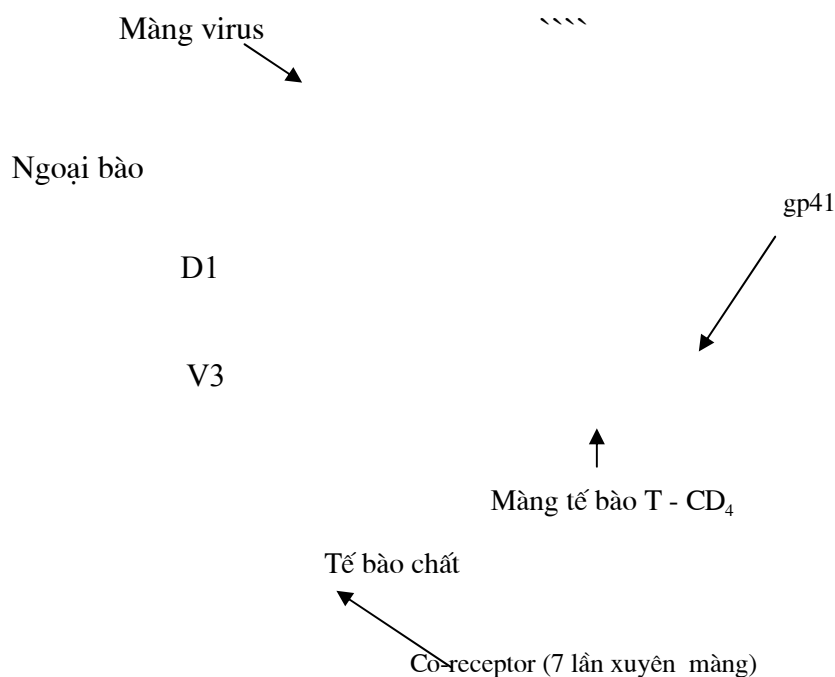
Chức năng của phân tử CD4 đã được làm sáng tỏ, nó sử dụng như một thụ thể cho cả MHC lớp II và HIV.

Khả năng của HIV thâm nhập vào một số dạng tế bào đặc biệt do sự biểu hiện của các thụ thể của virus trên bề mặt của những tế bào này. HIV xâm nhập vào bằng cách tạo ra một phức hợp liên kết không cộng hóa trị kết hợp với glycoprotein của virus, gp 120 và gp 41, ở trong vỏ bao của virus. Thành phần gp 120 của phức hợp glycoprotein có ái lực cao đối với bề mặt phân tử CD4. Theo cách đó, glycoprotein này kéo virus vào tế bào T-CD4, các tế bào tua, đại thực bào và những tế bào biểu hiện thụ thể CD4 trên bề mặt cũng có cơ chế liên kết với HIV nhưng ở mức độ thấp hơn T-CD4.

Trước khi dung hợp, gp120 của virus phải gắn với một co-receptor trên màng của tế bào chủ. Có một vài phân tử khác hoạt động như co-receptor cho HIV đi vào, hầu hết trong số chúng là các thụ thể chemokine. Các thụ thể chemokine có liên quan chặt chẽ với họ protein G

của thụ thể kép với 7 lần xuyên màng. Cho đến nay hai thụ thể chemokine quan trọng trong quá trình tương tác với HIV được biết đến là CCR5 (biểu hiện rõ ở tế bào tua, đại thực bào và tế bào T-CD4) và CXCR4, biểu hiện trên các tế bào T đã được hoạt hóa, là những coreceptor chính cho HIV.

Sau việc gắn của gp 120 với thụ thể và đồng thụ thể, gp 41 gây ra sự dung hợp của vỏ virus và màng sinh chất của tế bào, tiếp sau đó genome của virus kết hợp với các protein virus đi vào tế bào chất.



Hình 13.5

Mô hình tương tác giữa phân tử CD₄ của lympho T-CD₄ với gp120 - gp41 và các đồng thụ thể trên màng virus HIV (CXCR4, CCR5 hoặc 1 đồng thụ thể khác)

Ngoài protein màng CD₄ nằm trên tế bào T là một thụ thể ban đầu quan trọng, các chủng HIV lây truyền phổ biến nhất cũng đòi hỏi một thụ thể thứ hai gọi là đồng thụ thể CCR5. Một số nghiên cứu gần đây cho thấy một đột biến đặc hiệu trên gen CCR5 đã làm giảm nguy cơ nhiễm HIV, thậm chí chỉ cần một gen CCR5 thay đổi. Điều đó gợi ý có thể tìm kiếm một loại thuốc “khóa” thụ thể CCR5 mà không cần thiết phải khóa tất các phân tử thụ thể đã giảm khả năng xâm nhiễm của HIV.

Người ta cho rằng sự khác nhau của HIV và các dạng tế bào mà chúng lây nhiễm được xác định ở một mức độ lớn bởi chính thụ thể chemokine mà chúng gắn như là co-receptor.

Quá trình nhiễm HIV được khởi đầu bằng tương tác chọn lọc giữa glycoprotein bên ngoài vỏ, gp120, và các thụ thể nằm trên tế bào đích, CD₄, và các thụ thể chemokine bắt buộc (CCR5 hoặc CXCR4). Các bằng chứng hoá sinh về cấu trúc đã chỉ ra rằng khi gắn với virus CD₄ khơi mào sự thay đổi cấu trúc ở vỏ của HIV, điều này kích thích sự nhận ra của các thụ thể chemokine dẫn, cuối cùng dẫn đến sự dung hợp màng. Bằng chứng của CD₄ được cảm ứng thay đổi cấu trúc bao gồm sự tăng cường hoạt tính miễn cảm của protease trong các vòng nơ (loop) biến đổi của gp 120 và giải phóng gp 120 khỏi vỏ virus và tế bào đã bị nhiễm virus. Điều này làm tăng cường sự tạo thành của các vị trí thụ thể chemokine và các epitop cho kháng thể trung hoà có thể khóa việc gắn với thụ thể chemokine. Về cơ bản, những nghiên cứu về hóa sinh trước hết ở vùng ngoại vi của gp 120 và chỉ ra rằng CD₄ đã cảm ứng cho sự di chuyển của các vùng loop biến đổi.

Sự tương tác đặc hiệu giữa gp120, CD₄ và từng co-receptor riêng biệt sẽ quyết định cho sự dung hợp và đi vào của HIV. Người ta đã thấy rằng sự tương tác vật lý phức hệ CD₄ và

gp120 với thụ thể chemokine N tận cùng là một phần quan trọng cho quá trình đi vào của HIV.

13.8 Sự kết hợp giữa thụ thể CD4 và các co-receptor trong quá trình tương tác với HIV

Khả năng xâm nhập của HIV vào một số dạng tế bào nhất định được quyết định bởi sự biểu hiện của các thụ thể đặc hiệu cho bề mặt virus của những tế bào này. HIV xâm nhập vào tế bào thông qua một phức hệ của 2 glycoprotein virus kết hợp không cộng hoá trị với nhau, đó là gp120 và gp41 trong vỏ của virus. Thành phần gp 120 của phức hệ glycoprotein gắn với một ái lực cao với các phân tử bề mặt tế bào phân tử CD4. Glycoprotein này nhờ đó kéo virus gắn vào các tế bào T-CD4 cũng như các macrophage và tế bào tua là những tế bào cũng biểu hiện cụm biệt hóa CD4. Trước khi dung hợp và đi vào của virus, gp 120 cũng phải gắn với một co-receptor trong màng của tế bào chủ (hình 13.5).

13.9 Các co-receptor chủ yếu của HIV

Ngoài phân tử CD4, thụ thể chính cho HIV, một số phân tử khác cũng có thể được sử dụng như là các co-receptor. Hầu hết những thụ thể chemokine có liên quan chặt chẽ với các thụ thể liên kết với họ protein G với 7 vùng domain xuyên màng. Có 2 thụ thể chemokine chính được biết là CCR5 (biểu hiện chủ yếu trên các tế bào tua, macrophage, và tế bào T CD4) và CXCR4, biểu hiện trên những tế bào T đã được hoạt hóa, là những co-receptor chủ yếu cho HIV. Sau việc gắn của gp 120 với thụ thể và co-receptor, gp41 sau đó tạo ra sự dung hợp của vỏ virus với màng tế bào chất của tế bào, cho phép genome virus và các protein phụ trợ đi vào bào tương.

Sự đa dạng của HIV, và các dạng tế bào mà chúng lây nhiễm được quyết định bởi thụ thể chemokine nào mà chúng sử dụng như co-receptor. Sự đa dạng của HIV là ở chỗ chúng được kết hợp với sự nhiễm trước tiên sử dụng CCR5 kết hợp với CC chemokine RANTES, MIP-1 α và MIP-1 β , như là một co-receptor, và trong trường hợp này chúng chỉ cần một lượng rất thấp CD4 trên bề mặt tế bào mà chúng sẽ xâm nhập. Điều này được thể hiện rõ trong các thí nghiệm sử dụng các tế bào lympho có rất ít hoặc thậm chí không có cụm biệt hóa CD4.

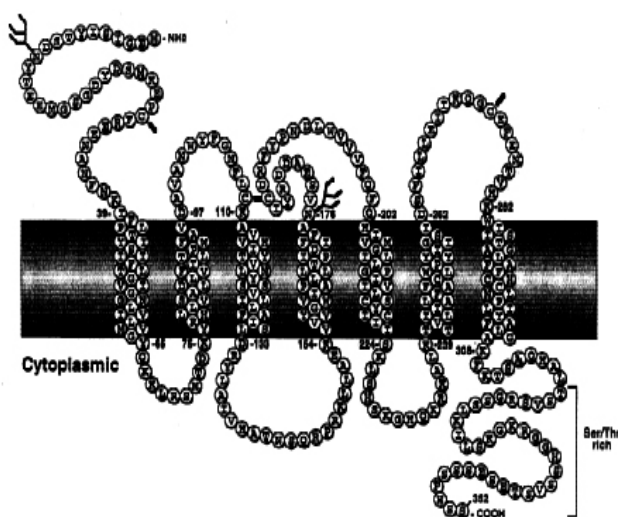
Nhiều nghiên cứu cho thấy các virus có khả năng nhận ra rất nhiều các phân tử bề mặt tế bào (thụ thể cho virus) để sử dụng chúng trong việc chuyển vật chất di truyền vào trong những tế bào này. Dường như bất kỳ một phân tử nào bộc lộ trên bề mặt tế bào đều có thể sử dụng như là thụ thể cho virus. Ví dụ: Các siêu họ Ig màng, intergrin, các thụ thể truyền tín hiệu, acid sialic, heparan sulphate và các phân tử khác... Khả năng nhận ra các thụ thể khác nhau phản ánh sự biến đổi di truyền rất nhanh của chúng. Cũng vậy không có mối liên hệ rõ ràng giữa họ virus với các cấu trúc, chức năng thụ thể. Ngay các thành viên trong cùng một họ vẫn có thể sử dụng các thụ thể khác nhau.

Quá trình tiến hoá của một số virus, chẳng hạn như HIV, có thể liên quan đến việc sử dụng các phân tử đồng thụ thể để thâm nhập vào tế bào. Cần phân biệt rõ các yếu tố giúp cho quá trình đi vào của virus (hoạt động ở những giai đoạn muộn của quá trình xâm nhiễm), ở đây chúng ta sử dụng thuật ngữ co-receptors (các đồng thụ thể) để chỉ những yếu tố mà kết hợp với thụ thể sơ cấp (ban đầu) ở những giai đoạn sớm của quá trình xâm nhiễm bằng cách tạo phức hợp với VAP (các protein gắn của virus- Viral attachment protein). Việc sử dụng các

đồng thụ thể có thể giúp làm tăng nhanh sự chuyển tiếp tới các thụ thể mới hoặc làm tăng hiệu quả khi tương tác với các thụ thể quan trọng đầu tiên trong những tế bào chủ tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sao chép của virus.

13.10 Sự tương tác của HIV, CD4 và các đồng thụ thể CXCR4 và CCR5

Rõ ràng trong quá trình tiến hoá của HIV, thụ thể quan trọng đầu tiên chính là CD4. Khả năng tương tác với CD4 được trợ giúp bởi một số đồng thụ thể, CXCR4. Đối với những tế bào thiếu thụ thể CD4, HIV vẫn có thể xâm nhập thông qua đồng thụ thể CXCR4. Khi nghiên cứu sự xâm nhiễm của SIV ở khỉ (simian) người ta đã sử dụng các tế bào thiếu thụ thể CD4 (CD4-negative cell) và đã phát hiện ngoài CD4 còn có một đồng thụ thể mới quan trọng là CCR5 cũng có vai trò giống như CXCR4. Nhiều nghiên cứu sâu hơn đã chỉ ra có sự tiến hoá trong quá trình xâm nhiễm vào tế bào của các virus nói chung trong đó đặc biệt là các retrovirus (HIV) sử dụng con đường coreceptor. Cho đến nay người ta đã phát hiện được khoảng 15 đồng thụ thể bao gồm (CCR5, CXCR4, CCR3, CCR2b, STRL33, GPR1, GPR15, V28, CCR8, CCR9, CCR1, CCR4, CX3CR1, APJ và US28) (hình 13.6)



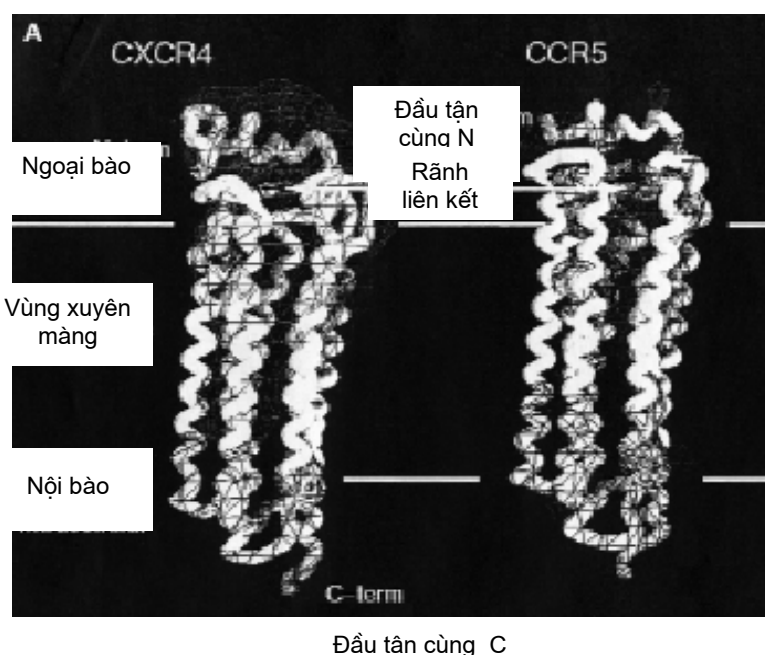
Vùng nội bào

Hình 13.6

Cấu trúc một dạng Co-receptor

Vùng chứa Serin và Threonin

Các đồng thụ thể chính của HIV, CCR5 và CXCR4 là những phân tử có 352 gốc acid amin và đầu N tận cùng có tính acid cao. CXCR4 chứa 2 vị trí có khả năng glycosyl hoá cao (một vị trí ở đầu N tận cùng, một vị trí ở trong vùng nơ (loop) ngoại bào thứ 2). Trong khi đó CXCR5 chỉ có một vị trí ở vùng loop ngoại bào thứ 3. Đầu C tận cùng của cả 2 phân tử rất giàu các gốc acid amin serin và treonin và có mặt các vị trí có khả năng phosphoril hóa bởi họ các protein G (sự phosphoril hoá xảy ra sau quá trình gắn của virus với tế bào). Các gốc cystein bảo thủ cao được cho là để tạo các liên kết disulfua giữa các vòng lớp ngoại bào thứ nhất và thứ hai. Đầu N tận cùng và vòng loop ngoại bào thứ 3 tạo ra một cấu trúc phù hợp cho việc tiếp xúc của HIV bằng cách kéo các vùng chức năng ngoại bào vào gần hơn về mặt không gian. Cho đến nay, cấu trúc ba chiều của các đồng thụ thể HIV-1 vẫn chưa được biết rõ. Một mô hình ba chiều của đồng thụ thể HIV-1, CXCR4 và CCR5 đã được mô phỏng bởi Durell.S (Hình 13.7).



Hình 13.7
Cấu trúc ba chiều của 2 đồng thụ thể CXCR4 và CCR5

Vậy thì các đồng thụ thể đã trợ giúp quá trình đi vào của HIV như thế nào? Sự tương tác ái lực rất cao giữa gp120 và CD4 là một quá trình quan trọng nhất dẫn đến kết quả cuối cùng là có sự dung hợp của virus và màng tế bào đích, cho phép chuyển vật chất di truyền. Tuy nhiên, những sự kiện phân tử xảy ra sau quá trình gắn của virus vào màng tế bào vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ nhưng có thể được khơi mào một phần bởi những thay đổi cấu trúc được cảm ứng bởi các thụ thể và có thể do sự gắn (tham gia) của các đồng thụ thể. Cả protein vỏ virus (Env) và CD4 đều trải qua những thay đổi cấu trúc sau khi gắn. Những thay đổi cấu trúc này có thể dẫn đến sự bộc lộ peptit có các nhóm amino tận cùng kỵ nước của gp41 và cuối cùng sự dung hợp màng xảy ra.

Tuy nhiên do tất cả các HIV quan trọng phân lập được qua lâm sàng đều phụ thuộc chặt chẽ vào thụ thể CD4 và trong hầu hết các trường hợp chúng sử dụng hoặc là đồng thụ thể CXCR5 hoặc CCR5 hoặc là một số phân tử khác cùng tương tác với CD4 để đi vào tế bào. Vì vậy, CD4 vẫn được coi là thụ thể đầu tiên có vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của HIV.

Tóm lại, HIV liên quan đến việc sử dụng một số phân tử như các thụ thể ban đầu, thụ thể quan trọng nhất trong quá trình xâm nhiễm là CD4 và một số đồng thụ thể khác, có lẽ quan trọng nhất trong số này là CCR5. Điều đáng ngạc nhiên là CCR5 và các đồng thụ thể chính khác, CXCR4, có thể sử dụng như một thụ thể ban đầu để phân lập HIV-2 và SIV. Gần đây, có 15 phân tử đã được biết đến sử dụng như là các đồng thụ thể của HIV và SIV, hơn một nửa trong số chúng là các thụ thể chemokin và những chức năng khác chưa được biết đến. Tất cả trong số chúng chứa các vùng chức năng được dự đoán xuyên màng bảy lần. Cơ chế chính xác về vai trò trợ giúp cho việc xâm nhập của HIV hiện nay chưa được biết rõ. Quá trình đi vào của virus liên quan đến một quá trình tương tác giữa các phức hệ rất phức tạp mà trước hết được khởi phát bằng việc gắn chậm nhưng có ái lực rất cao giữa phức hệ gp120-gp41 với

thụ thể bề mặt tế bào CD4 và các đồng thụ thể khác, dẫn đến những thay đổi cấu trúc trong sự tương tác đa phân tử của virus và các phân tử thụ thể màng. Những thay đổi cấu trúc này có thể dẫn đến sự sắp xếp lại cấu trúc trong vùng loop V3 và các cấu trúc liên quan khác như: V1, V2 và vùng C4 của gp120 cũng như cả phân tử CD4 kết quả là tạo ra sự cuộn xoắn trong phân tử gp41, điều này dẫn đến sự bộc lộ đoạn peptit dung hợp gp41. Chuỗi peptit kỵ nước này phá vỡ cấu trúc ổn định của màng tế bào và màng virus dẫn đến sự trộn lẫn về mặt vật lý của các lớp lipid kép của chúng và hình thành lỗ hổng cho dung hợp. Lỗ hổng này ngày càng mở rộng cho phép acid nucleic đi vào bên trong tế bào chất để tiếp tục quá trình sao chép, bao gói và giải phóng các hạt virus trong cơ thể.

Tóm tắt chương 13

Trong các loại thụ thể của hệ miễn dịch, thụ thể lymphoT (TCR) và các cụm biệt hóa của chúng như CD3, CD4, CD8 có vai trò đặc biệt trong việc truyền tín hiệu đáp ứng miễn dịch.

Vai trò hoạt động của các thụ thể TCR và cụm biệt hóa CD4 đã được nghiên cứu rất kỹ về sự biểu hiện gen, sự tương tác của chúng đối với sự trình diện kháng nguyên và đặc biệt trong sự nhận biết và tương tác của chúng đối với virus HIV, một dạng virus gây bệnh AIDS ở người.

Những tiến bộ trong nghiên cứu mới đây cũng chỉ ra hàng loạt các đồng thụ thể (co-receptor) nằm trên màng tế bào T cũng tham gia tương tác với virus HIV cùng với thụ thể TCR và cụm biệt hóa CD4.

Chương 14

Các bệnh phát sinh liên quan đến thụ thể màng

Như đã trình bày ở các chương trước, chức năng sinh học của các thụ thể tế bào là tiếp nhận và thực hiện cơ chế truyền thông tin và điều hòa các quá trình trao đổi chất, các quá trình tăng trưởng và biệt hóa tế bào. Các tác động vi phạm vào cấu trúc của các thụ thể có thể dẫn đến các bệnh lý khác nhau cho tế bào và cơ thể.

14.1 Thụ thể tyrosine kinase đối với bệnh ung thư

Thụ thể tyrosine kinase là một loại thụ thể thực hiện chức năng truyền thông tin cho quá trình trao đổi chất của tế bào. Các thụ thể này có vai trò tiếp nhận và liên kết với các hormon như insulin, yếu tố tăng trưởng biểu bì (Epidermal Growth factor- EGF), yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc tiểu cầu (Platelet- derived growth factor- PDGF).

Các thụ thể tyrosine kinase không giống như các thụ thể có bảy xoắn α xuyên màng mà chúng thường chỉ có một hoặc hai xoắn α xuyên màng và đều là các enzym. Các nghiên cứu tách dòng gen mã hóa cho nhiều thụ thể tyrosine kinase của Ullrich.A và Schlessinger.J (1992) đã phát hiện ra một số dạng cấu trúc và cơ chế tác động chung của chúng. Cho đến nay, người ta đã tìm được bốn kiểu thụ thể tyrosine kinase. Thụ thể tyrosine kinase nhận biết yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF); Thụ thể tyrosine kinase nhận biết insulin; Thụ thể nhận biết PDGF và thụ thể tyrosine kinase nhận biết yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (thụ thể dành cho FGF).

Về vị trí sắp xếp trong màng tế bào, kiểu một, kiểu ba và kiểu bốn là các protein monome, xuyên qua màng một lần bằng một vùng xoắn α . Trong khi đó kiểu hai của thụ thể tyrosine kinase là một tetrame sắp xếp theo dạng $\alpha 2\beta 2$. Cơ chế hoạt động của các thụ thể tyrosine kinase là sau khi nhận biết tín hiệu thông tin thứ nhất (thường là hormon, yếu tố tăng trưởng), hoạt động kinase của thụ thể gây ra quá trình phosphoryl hóa hàng loạt các gốc tyrosine ở các protein đích. Các protein đích được phosphoryl hoá sẽ hoạt hoá tiếp các protein khác của tế bào tạo ra sự sinh trưởng và biệt hoá tế bào. Những đột biến gen của các thụ thể tyrosine kinase tạo cho chúng hoạt động kinase dai dẳng và kéo dài, sẽ dẫn đến các bệnh ung thư.

Các đột biến này đã tạo ra tỷ lệ cao và hoạt động tăng cường của các gen gây ung thư (oncogenes).

14.2 Cơ chế hoạt hoá các thụ thể tyrosine kinase bằng ligand

Các ligand hoặc cấu tử gắn vào thụ thể sẽ làm biến đổi cấu hình không gian của thụ thể làm hoạt hoá protein màng như adenylate cyclase thông qua tác động của protein G, truyền tín hiệu cho các quá trình trao đổi chất thông qua hàng loạt quá trình phosphoryl hoá nhiều loại protein enzym nội bào. Tương tự như vậy, yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGF) lần đầu tiên đã

được Stanley Cohen phát hiện ra trong khi ông nghiên cứu vai trò của yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF) cũng đã gây ra sự thay đổi cấu hình không gian của thụ thể nhận biết EGF. Cơ chế của quá trình làm biến đổi cấu trúc không gian của EGF là khi EGF liên kết với thụ thể của nó ở vùng ngoại bào, đã gây ra sự dimer hoá của các monome không hoạt động của thụ thể, biến thụ thể thành dạng dimer hoạt động có khả năng tự phosphoryl hoá (autophosphorylation). Vị trí xúc tác của một chuỗi tạo ra phosphoryl hoá năm gốc tyrosine nằm ở gần tận cùng C của chuỗi polypeptid trong dimer. Quá trình tự phosphoryl hoá tạo ra cho thụ thể phosphoryl hoá nhiều protein đích khác nhau theo phản ứng dây chuyền. Tương tự như vậy, sự liên kết của yếu tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF) và yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF) cũng tạo ra sự dimer hoá các thụ thể của chúng và đưa đến quá trình tự phosphoryl hoá thụ thể.

Đối với receptor của insulin có sự khác biệt là chúng có cấu tạo dạng $\alpha_2\beta_2$ trong đó hai chuỗi α liên kết bằng một cầu disulfit và nằm ở vùng ngoại bào, còn hai chuỗi β xuyên qua màng nhưng được liên kết với chuỗi α cũng bằng hai liên kết disulfit. Thụ thể insulin giống với thụ thể EGF về trình tự và cả về cách kiến trúc. Như vậy, thụ thể tiếp nhận insulin có cơ chế truyền tín hiệu giống cơ chế của thụ thể EGF không? Vấn đề này đã được trả lời khi các nhà nghiên cứu thực hiện công việc thiết kế một gen mã hoá cho một thụ thể chimeric (thụ thể lai ghép gen, không có trong tự nhiên) trong đó phần ngoại bào là gen của thụ thể insulin và phần xuyên màng là gen của thụ thể EGF. Kết quả cho biết khi insulin liên kết với thụ thể chimeric này sẽ tạo ra cảm ứng hoạt động tyrosine kinase theo cơ chế tự phosphoryl hoá. Như vậy thụ thể insulin và thụ thể EGF đều sử dụng một cơ chế chung khi truyền tín hiệu qua màng tế bào.

Thụ thể tyrosine kinase có vai trò như thế nào đối với sự phân chia tế bào và biệt hoá tế bào? Người ta đã phân tích trình tự sắp xếp các acid amin của vùng xúc tác và nhận thấy trình tự GXGXXG nằm gần kề với tận cùng N. Thêm vào đó, gốc lysine tham gia chủ yếu vào hoạt tính kinase là không thay đổi nằm ở 20 gốc acid amin của đầu tận cùng C của thụ thể. Nếu có sự thay thế gốc lysine quan trọng đó bằng bất kỳ một gốc acid amin nào sẽ ức chế khả năng hoạt hoá các protein khác theo cơ chế phosphoryl hoá, do đó làm thay đổi rất cơ bản quá trình truyền dẫn tín hiệu sinh trưởng tế bào.

14.3 Thụ thể tyrosine kinase hoạt hoá các protein truyền tín hiệu

Các gốc tyrosine đã được phosphoryl hoá của thụ thể tyrosine kinase có vai trò khác rất quan trọng là có khả năng nhận biết đặc hiệu các dạng protein có cấu trúc đặc biệt chứa trình tự SH2. Ví dụ các protein đặc trưng có chức năng kiểm soát sự tăng trưởng tế bào như tyrosin kinase Src, Phospholipase C- γ 1 (PLC γ 1) đều có vùng SH2. Vùng trình tự SH2 là một module bao gồm khoảng 100 gốc acid amin tương tự như protein Src. Kiểu sắp xếp tái diễn trình tự này có vai trò rất quan trọng trong việc nhận biết thụ thể tyrosine kinase đã hoạt hoá. Cụ thể là các vùng SH2 liên kết với những protein đã được phosphoryl hoá. Thật vậy, domain SH2 dẫn dắt protein Src và những protein khác chứa chúng hướng đến các thụ thể tyrosine kinase đã được hoạt hoá. PLC γ 1 là một phospholipase khác với các isoform PLC bình thường là chúng chứa các vùng SH2. Các vùng SH2 này liên kết với những gốc tyrosine đã được phosphoryl hoá nằm gần đầu tận cùng C của thụ thể đã hoạt hoá. Các vị trí sắp xếp đã giúp cho một gốc tyrosine quan trọng của PLC γ 1 đạt đúng hướng cho phép nó được phosphoryl hoá nhờ vùng xúc tác của thụ thể EGF. Trong trường hợp này, sự phosphoryl hoá PLC γ 1 tạo ra cho nó có

hoạt tính phospholipase. Hơn nữa sự hoạt hoá này còn giúp cho vùng SH3 của PLC γ 1 liên kết với bộ khung tế bào, tạo vị trí để thủy phân PIP2 (Phosphatidyl Inositol 4, 5 bi phosphate) thành IP3 (Inositol 1,4,5 triphosphate) và DAG (Diacylglycerol). IP3 và DAG là hai chất truyền tin bên trong tế bào, trong đó IP3 thực hiện chức năng mở kênh giải phóng ion Ca $^{2+}$ từ kho dự trữ trong tế bào, và DAG làm hoạt hoá protein kinase C, để từ đó hoạt hoá hàng loạt protein đích khác.

14.4 Nhiều gen gây ung thư (oncogene) mã hoá cho các protein truyền dẫn tín hiệu

Năm 1909, nhà nghiên cứu Peyton Rous ở viện Rockefeller đã điều chế một chế phẩm dịch phi tế bào chiết rút từ khối u mô liên kết của gà và tiêm vào gà con bình thường. Kết quả là gà con bị các khối u ác tính được gọi là sarcoma. Tác nhân gây bệnh ung thư đó ngày nay đã được biết là virus sarcoma mang tên Rous (Rous sarcoma virus). Năm chục năm sau đó, P. Rous đã nhận giải Nobel về phát minh này.

Hàng chục năm sau này, các nhà nghiên cứu về những virus đã đột biến phát hiện thấy chỉ có một gen virus là Src làm biến nạp vào đối tượng tiếp nhận gây ung thư. Gen Src mang tên như vậy vì có khả năng trực tiếp mã hoá cho một protein tạo ra ung thư sarcoma. Như vậy gen Src phải chăng có “đôi tác” của nó ở trong tế bào tiếp nhận? Michael Bishop và Harold Varmus tiến hành nghiên cứu cho thấy gà con bình thường chứa gen Src rất giống với gen của virus được xâm nhập. Gen xuất phát từ tế bào được gọi là c-Src để phân biệt với gen của virus là v-Src. Như chúng ta đã biết ở phần đầu của chương này (mục 7.3), protein này chính là tyrosine kinase nội bào. 19 gốc acid amin ở đầu tận cùng C của protein tế bào được thay thế bằng 12 gốc acid amin không liên quan (khác lạ) nằm trong protein Src của virus. Như vậy, bản dịch biến thể của virus đối với Src đã tạo ra sự hoạt hoá của gen vì biến thể này đã làm mất đi vùng ức chế nằm ở tận cùng C có mặt ở Src của tế bào. Trong khi đó, bản dịch Src của virus lại không cần được thụ thể tyrosine kinase phosphory hoá để truyền dẫn tín hiệu sinh trưởng. Do đó, đã gây ra ung thư nội tại và v-Src là một oncogene.

Đã có rất nhiều oncogene được phát hiện. Tất cả các gen này mã hoá cho các thụ thể tyrosine kinase hoặc là các thành viên tham gia vào dây khởi động các oncogene. Chẳng hạn, gen ung thư v-erbB của virus gây bệnh nguyên bào hồng cầu từ chim bắt nguồn từ gen mã hoá cho thụ thể EGF. 34 gốc axit amin cuối cùng và gần như toàn bộ vùng ngoại bào của protein sản phẩm của gen này bị biến mất, nghĩa là sản phẩm của gen ung thư chỉ là một tyrosine kinase xuyên màng nhưng không có phần ngoại bào và hoạt động mạnh ở vùng tận cùng C. Một dạng oncogene khác tạo ra một tyrosine kinase hoạt động thường xuyên là gen Neu-oncogene được xác định nguyên gốc là từ khối u nguyên bào thần kinh (neuroblastoma). Một gen đồng dạng HER 2 được tìm thấy trong ung thư vú và buồng trứng ở người (dạng Carcinoma) liên quan với tiên lượng xấu của bệnh. Đột biến điểm ở vùng xuyên màng làm hoạt hoá protein neu, sẽ tạo ra sự dimer hoá của protein này ngay khi không có cấu tử gắn. Như vậy, gen ung thư (neu – oncogene) luôn luôn tạo ra sản phẩm tự phosphoryl hoá. Nó hình thành một phức hệ với PLC γ 1 và hoạt hoá phospholipase trong khi không cần sự có mặt của tín hiệu bên ngoài (hormon hoặc kích thích tố tăng trưởng).

14.5 Các đột biến protein ras gây bất hoạt GTPase sẽ dẫn đến ung thư

Sự suy yếu hoạt tính GTPase ở protein điều hoà có thể dẫn đến ung thư. Các tế bào của động vật có vú chứa ba loại protein ras 21 kDa là H-ras, K-ras và N-ras. Các protein này điều hoà sự quay vòng giữa GTP và dạng GDP. Dạng GTP hình thành từ các protein này kích thích sự tăng trưởng và biệt hoá tế bào ở động vật có vú. Các protein ras là thành viên của một họ các protein GTPase có phân tử nhỏ (từ 20-35 kDa). Chúng khác biệt với các protein G là có kích thước nhỏ hơn và ở dạng monome nhưng cũng có một số nét cấu trúc và cơ chế tác động tương tự protein G. Vùng hoạt tính GTPase của ras tương tự như đối tác transducin của nó.

Các protein ras đã được phát hiện thông qua sự biến nạp của đối tác virus, một gen v-ras từ virus sarcoma của chuột cống mã hoá cho protein này. Sản phẩm của gen này khác với sản phẩm của gen ở tế bào bình thường là có hoạt tính GTPase yếu kém. Đúng như vậy, đã có sự thay đổi của một acid amin (glycine thay cho valine) làm biến đổi từ sản phẩm của gen bình thường thành sản phẩm của gen ung thư. Sự thủy phân GTP thành GDP ở protein ras bình thường được tăng lên gấp bội nhờ vào một dạng protein hoạt hoá GTPase 116 kDa. Protein hoạt hoá này gọi là GAP (G.activating Protein). Tuy nhiên GAP liên kết với protein ras gây ung thư lại làm mất đi tốc độ thủy phân của các protein ras ung thư. Hậu quả là dạng ras ung thư gần như luôn luôn ở dạng GTP.

14.6 Ras đóng vai trò rất quan trọng trong việc kiểm soát số phận tế bào

Các nghiên cứu về một đột biến ở ruồi dấm (*Drosophila mutant*) rất đáng quan tâm là đã cung cấp cho ta cách nhìn nhận mới về tác động của ras. Mỗi đơn vị cấu trúc của mắt tạo nên bằng cách hợp phần ghép ở ruồi dấm chứa 8 tế bào tiếp nhận ánh sáng được đặt tên từ R1- R8 và 12 tế bào không phải là tế bào thần kinh. Đột biến gen sev (sevenless) không cho tế bào R7 phát triển thành tế bào tiếp nhận ánh sáng, thay vào đó là tế bào này biến thành một tế bào thủy tinh thể. Protein sev trên R7 bình thường được hoạt hoá bằng một loại protein liên kết màng của tế bào R8 nằm liền kề. Gen mã hoá cho protein hoạt hoá này được gọi là boss (viết tắt từ chữ bride – of – sevenless nghĩa là “Cô dâu” của sev). Như vậy, boss đã hướng dẫn R7 trở thành một tế bào tiếp nhận ánh sáng như thế nào? Việc tách dòng gen sev đã cho thấy nó mã hoá cho một dạng protein có kích thước rất lớn gồm 2554 gốc acid amin và có hai mảnh xuyên qua màng và một vùng có hoạt tính tyrosine kinase. Đích của sev kinase ở tế bào R7 là một protein được mã hoá bởi gen sos (son – of – sevenless nghĩa là “đứa con” của sev). Chúng được nối với protein drk. Protein sos về phần mình, làm hoạt hoá protein ras bằng cơ chế kích thích sự biến đổi giữa GTP và GDP. Do vậy, protein ras là một thành viên tham gia vào con đường biệt hoá ruồi dấm *Drosophila* và con đường này được khởi động bằng sự hoạt hoá của một thụ thể tyrosine kinase thông qua sự tương tác tế bào – tế bào.

Đối với sự tăng trưởng và biệt hoá các tế bào ở động vật có vú, protein ras có vai trò kiểm soát như thế nào? Sự phát hiện rất đáng chú ý mới đây là các động vật có vú có thụ thể tyrosine kinase thực hiện cơ chế hoạt động tương tự như ở ruồi dấm. Sản phẩm của gen sos tương tự ở động vật có vú mang tín hiệu tăng trưởng đến cho protein ras, tiếp sau đó tác động vào các serine – threonine kinase và những protein đích khác. Cốt lõi của con đường kiểm soát tăng trưởng đã tồn tại ít nhất 800 triệu năm trước đây. Sự biến đổi giữa GTP – GDP bật tín hiệu cho các protein ras và protein G đã tồn tại thậm chí còn lâu hơn nữa. Phương thức hoạt động ở mức phân tử rất tinh vi đó đã được hoàn thiện sớm trong quá trình tiến hoá và hiện tại được sử dụng cho việc thực hiện nhiều chức năng tế bào, như di chuyển các đại phân

từ trong tổng hợp protein, truyền dẫn các kích thích hormon và chất cảm biến khác, cũng như điều hoà sự tăng sinh tế bào.

Tóm tắt chương 14

Các thụ thể tyrosine kinase xuyên màng có vai trò kiểm soát sự tăng trưởng và biệt hoá tế bào. Chúng chứa các vùng ngoại bào liên kết với các yếu tố tăng trưởng, vùng xuyên màng và vùng nằm trong nội bào có chứa hoạt tính tyrosine kinase. Thụ thể được hiểu rõ nhất là thụ thể EGF. Sự kết hợp các ligand vào thụ thể của nó, tạo ra sự dimer hoá và sự phosphoryl hoá của thụ thể. Năm gốc tyrosine ở đuôi tận cùng C đã tự phosphoryl hoá cho phép thụ thể phosphoryl hoá các protein đích như dạng isoform PLC γ 1. Các tyrosine được phosphoryl hoá ở thụ thể tyrosine kinase đã hoạt hoá nói chung được sử dụng làm vị trí cập bến cho vùng SH2 có mặt ở nhiều loại protein truyền tín hiệu.

Rất nhiều gen ung thư (oncogene) xuất hiện do các đột biến làm thay đổi cấu trúc của các protein trên đây truyền dẫn các tín hiệu tăng trưởng và biệt hoá tế bào. Virus sarcoma Rous gây ung thư cho gà là do nó chứa gen mã hoá cho dạng hoạt động của protein Src, dạng tyrosine kinase của Cytosol. Những đột biến gen mã hoá cho các thụ thể tyrosine kinase thường tạo ra gen ung thư. Ví dụ như HER 2 được tìm thấy ở ung thư biểu mô vú của người với tỷ lệ cao. Protein ras là chất truyền thông tin quan trọng cho dãy phản ứng tyrosin kinase, cho các chu trình biến đổi giữa dạng bất hoạt GDP và dạng hoạt động GTP. Sản phẩm protein ras ung thư làm giảm bất thường hoạt tính của GTPase dẫn đến ung thư.