18. Elementi genetici mobili o trasponibili / trasposoni

DOMANDE

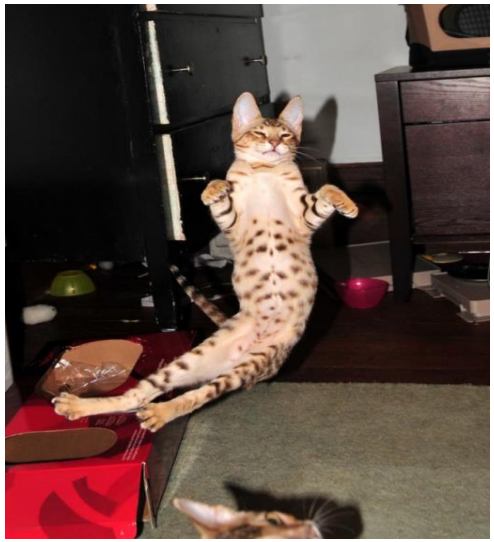
- Perché gli elementi trasponibili sono stati scoperti nel mais e isolati per la prima volta dal batterio *E. coli*?
- In che modo gli elementi trasponibili permettono la diffusione dei batteri resistenti agli antibiotici?
- Quali sono i due principali meccanismi di trasposizione usati dagli elementi trasponibili?
- Considerato che il 50% del genoma umano deriva dagli elementi trasponibili, come fanno a sopravvivere gli esseri umani?
- Perché l'organismo ospite è in grado di eliminare alcuni elementi trasponibili e non altri?

Trasposizione

- Una **classe di eventi che modificano ereditariamente il fenotipo**, ovvero mutazioni,
- è causata dallo spostamento di tratti del DNA da una regione del genoma ad un'altra:
  - **elementi genetici mobili** o **trasponibil**i (spesso indicati come trasposoni, o elementi di controllo).



"jumping genes"



Elementi trasponibili/trasposoni

- Sequenze di DNA che hanno la capacità **di muoversi da un sito all'altro del cromosoma di una cellula singola.**



- Lo spostamento avviene mediante un **evento specializzato di ricombinazione (i.e. trasposizione)**
  - tra sequenze di DNA poste all'estremità dell'elemento trasponibile e
  - una sequenza presente sul DNA della cellula ospite
- Diversamente dagli altri processi coinvolti nella ristrutturazione genomica, per la **trasposizione non c'è nessuna omologia tra le sequenze del sito donatore e accettore**

Caratteristiche generali

- **componenti normali e ubiquitari** dei genomi di procarioti e eucarioti,
- inserimento in nuove posizioni sul cromosoma, con le quali **non hanno omologia di sequenza;**
- generalmente quando gli e. t. si muovono mostrano una **scarsa selettività del sito di inserzione** → possono inserirsi all'interno dei geni, spesso distruggendone la funzione.
- si possono inserire anche nelle regioni regolatrici di un gene: possono **cambiare la modalità di espressione.**
- la trasposizione, quindi, è un processo diverso dalla ricombinazione omologa (che avviene tra sequenze di DNA corrispondenti) ed è chiamata ***ricombinazione non omologa.***
- lo spostamento avviene mediante **un evento di ricombinazione tra sequenze,** poste all' estremità dell'elemento trasponibile, e una sequenza presente sul DNA della cellula ospite
- causano importanti cambiamenti genetici: *p.e.*
  - **mutazioni** (*mutagenesi inserzionale),*
  - **aumento o diminuzione espressione genica (**inserzione in sequenze di regolazione genica, p.e. alterano le funzioni di un promotore o stimolano l'espressione di un gene attraverso l'azione di promotori presenti sull'elemento,
  - vari tipi di **mutazioni cromosomiche** -->evoluzione dei genomi di procarioti ed eucarioti attraverso ri-arrangiamenti cromosomici che hanno causato.
- **frequenza di trasposizione varia** a seconda del particolare elemento considerato, ma è di solito molto bassa.

Trasposoni

Presenti in tutte le specie: Fagi e vertebrati

Phages	*E. Coli*	*Yeast*	*Drosophila*	*Maize (Plants)*	*Human*
Mu (reproduces via transposition)	**IS1** **IS10** **Tn3** **Tn5** **Tn7** **Tn10**	**Ty1**	**P-Element** Copia **F-Element** Hermes	**Ac-Dc** BS1 Cin4	Ty1 THE-1 **L1 LINE**

Meccanismi usati per ricombinazione V(D)J (maturazione immunoglobuline

Cosa sono i trasposoni?

- **Sono stati individuati in tutti gli eucarioti**
- **Costituiscono la componente principale dei genomi eucariotici**

- ~50% of the genomes of human, chimp, mouse,
- ~80% of the maize genome
- ~85% of the barley genome
- ~98% of the iris genome



Iris brevicaulis



Iris fulva

- Angiosperme con genoma > 2000Mb hanno più del 50% del DNA nucleare rappresentato da retro-trasposoni-LTR e altre ripetizioni.
- Poiché la grandezza media dei genomi delle angiosperme è 5600 Mb, si conclude che la **maggior parte del DNA delle piante è composto da elementi trasponibili.**
- In un genoma di grandi dimensioni i **geni si trovano relegati in piccole isole** circondate da un mare di retrotrasposoni!!!!
- In mais ad es.costituiscono oltre l'80% del genoma

Un grande parte del genoma umano consiste di elementi genetici mobili – genetic mobile elements

TRANSPOSONI

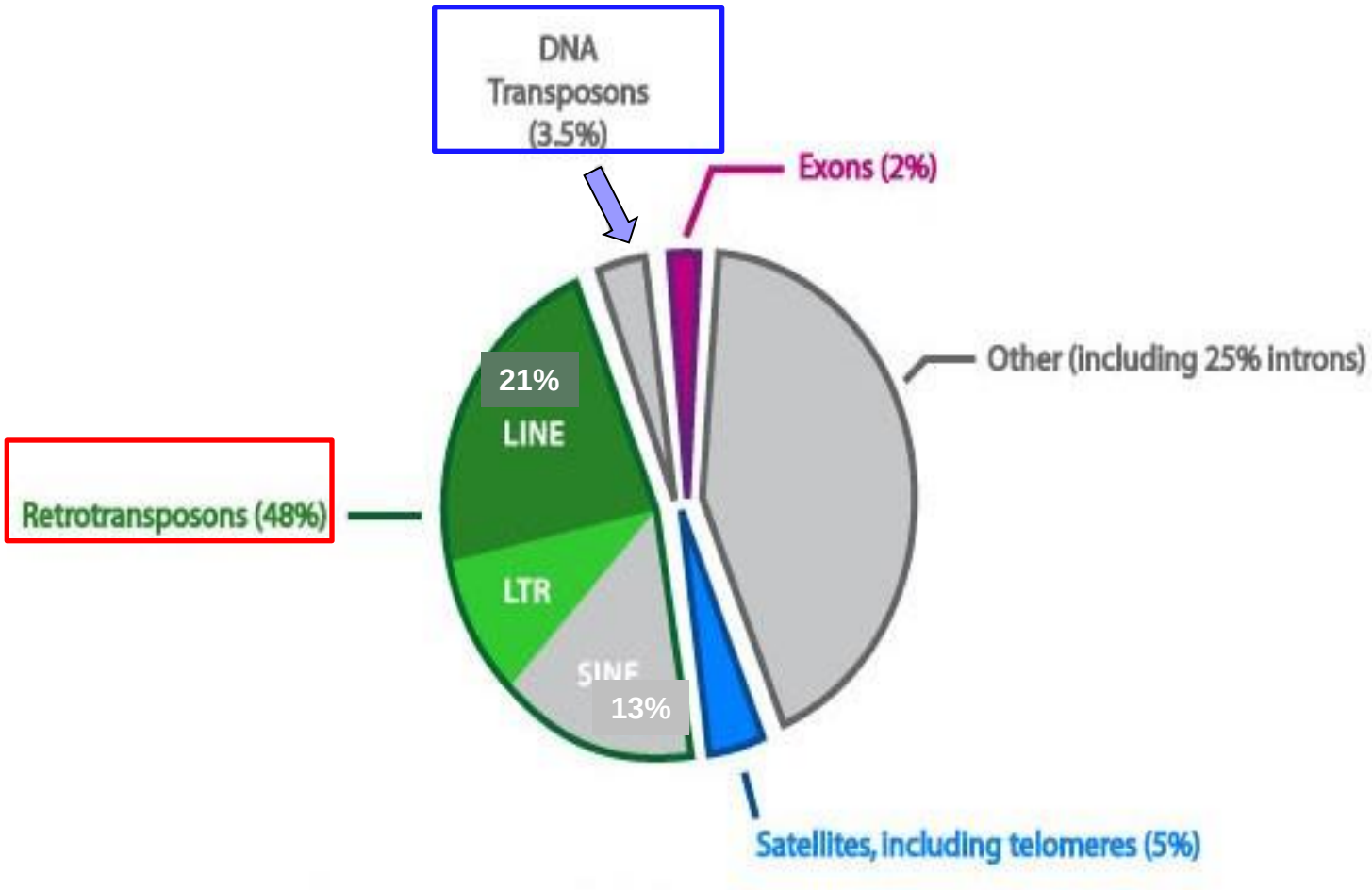
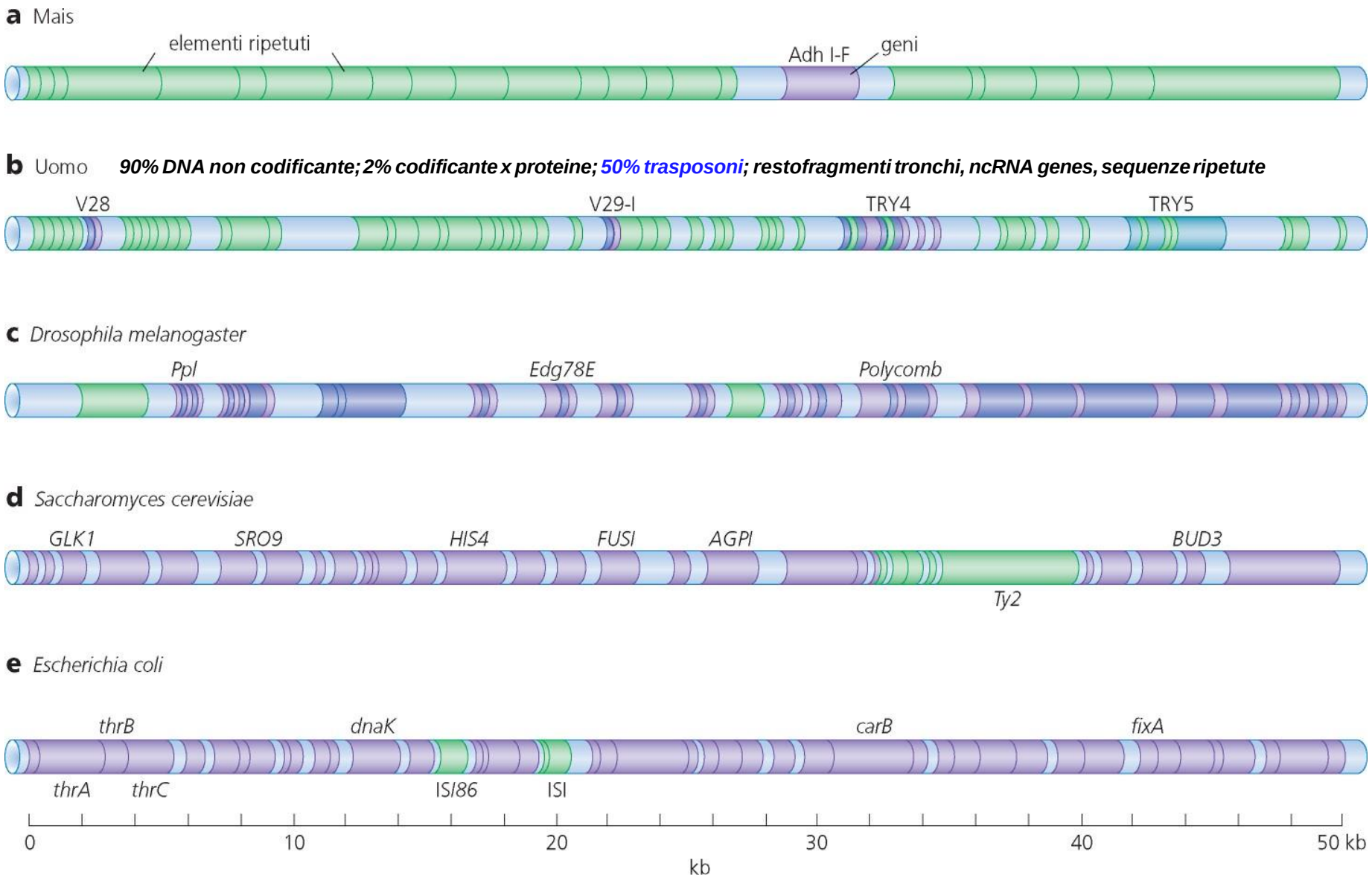


Fig. 1 - Composition of the human genome
Cristofari's lab 2010 - Adapted from Rollins *et al.* **Genome Res.** (2006)

I trasposoni nei genomi: frequenza e distribuzione



Un’anticipazione:

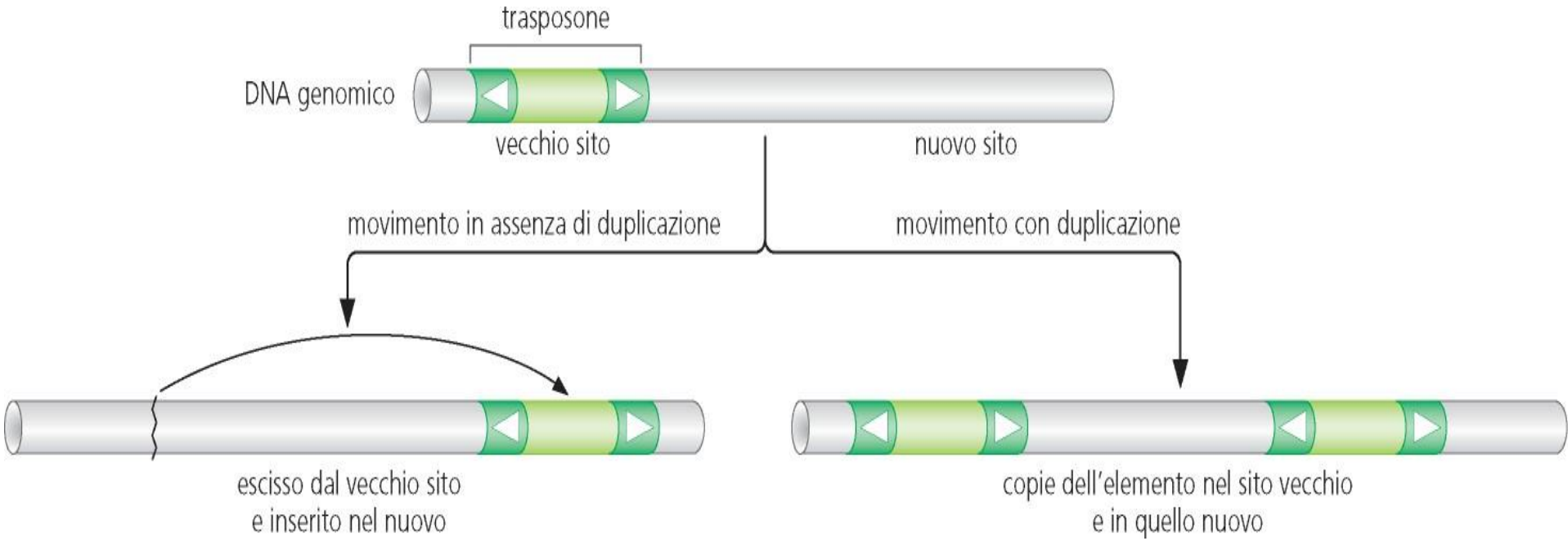
- Più recentemente i trasposoni sono stati considerati **organismi simbionti** del genoma eucariotico.
- Il genoma ospite utilizza, in certi casi, i trasposoni per regolare **l’espressione genica** di geni vicini, attraverso:
  - **metilazione,**
  - **promotori** situati al loro interno.
- Inoltre attraverso i trasposoni si viene **a creare nuova variabilità genetica:**
  - con l’origine di nuovi geni
  - nuovi pattern di espressione genica potenzialmente utili all’ospite.

Possibili consequenze della trasposizione

	Cause
Chromosome structure	
Chromosomal breakage	Excision of a TE.
Chromosomal rearrangements	Homologous recombination between TEs located at different positions in the genome.
Gene expression	
Mutation	Incorrect excision of TEs.
Gene inactivation	Insertion of a TE into a gene.
Alteration in gene regulation	Transposition of a gene next to regulatory sequences or the transposition of regulatory sequences next to a gene.
Alteration in the exon content of a gene	Insertion of exons into the coding sequence of a gene via TEs. This phenomenon is called exon shuffling.
Gene duplications	Creation of a composite transposon that transposes to another site in the genome.

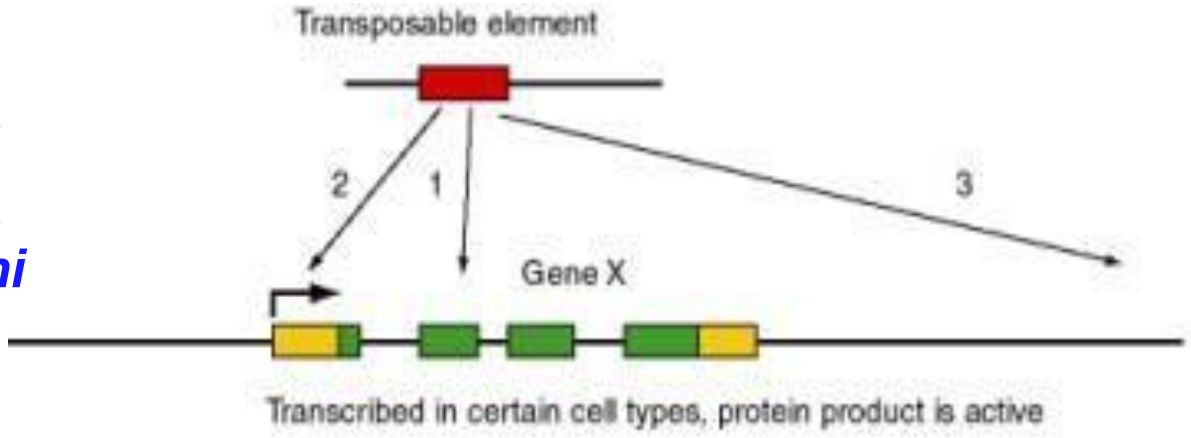
La trasposizione

- **Sposta elementi genetici da un sito ad un altro**
- Il movimento avviene per **una ricombinazione** tra
  - le **estremità dell'elemento trasponibile**
  - una sequenza di DNA della cellula.



Trasposizione: scarsa selettività nella scelta del sito d'inserzione

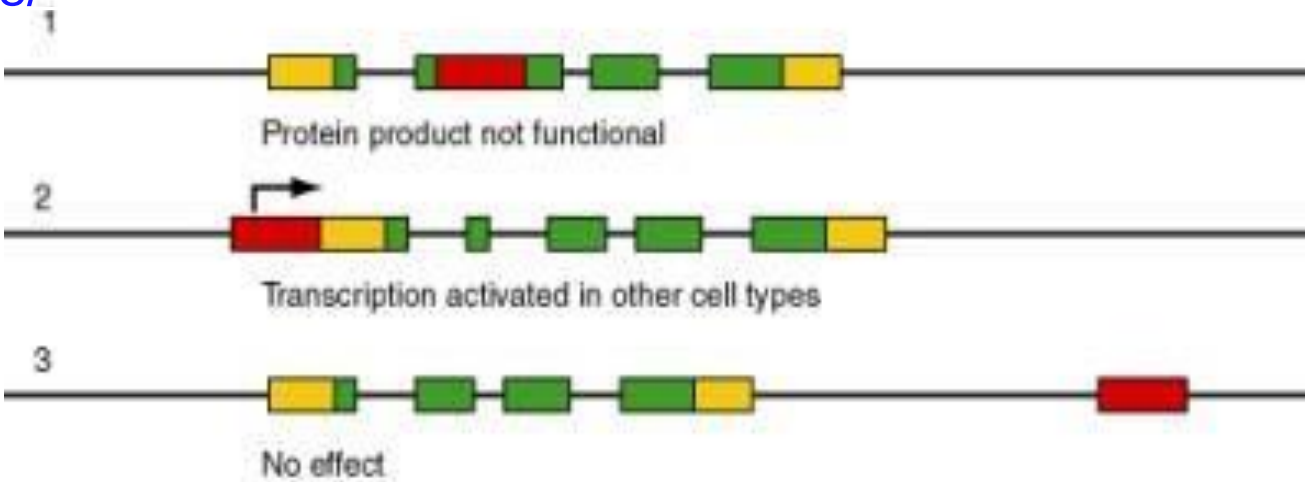
- ***Trasposoni a DNA***
- ***Trasposoni a RNA =Retrotrasposoni***



1) no proteina funzionante/ mutata

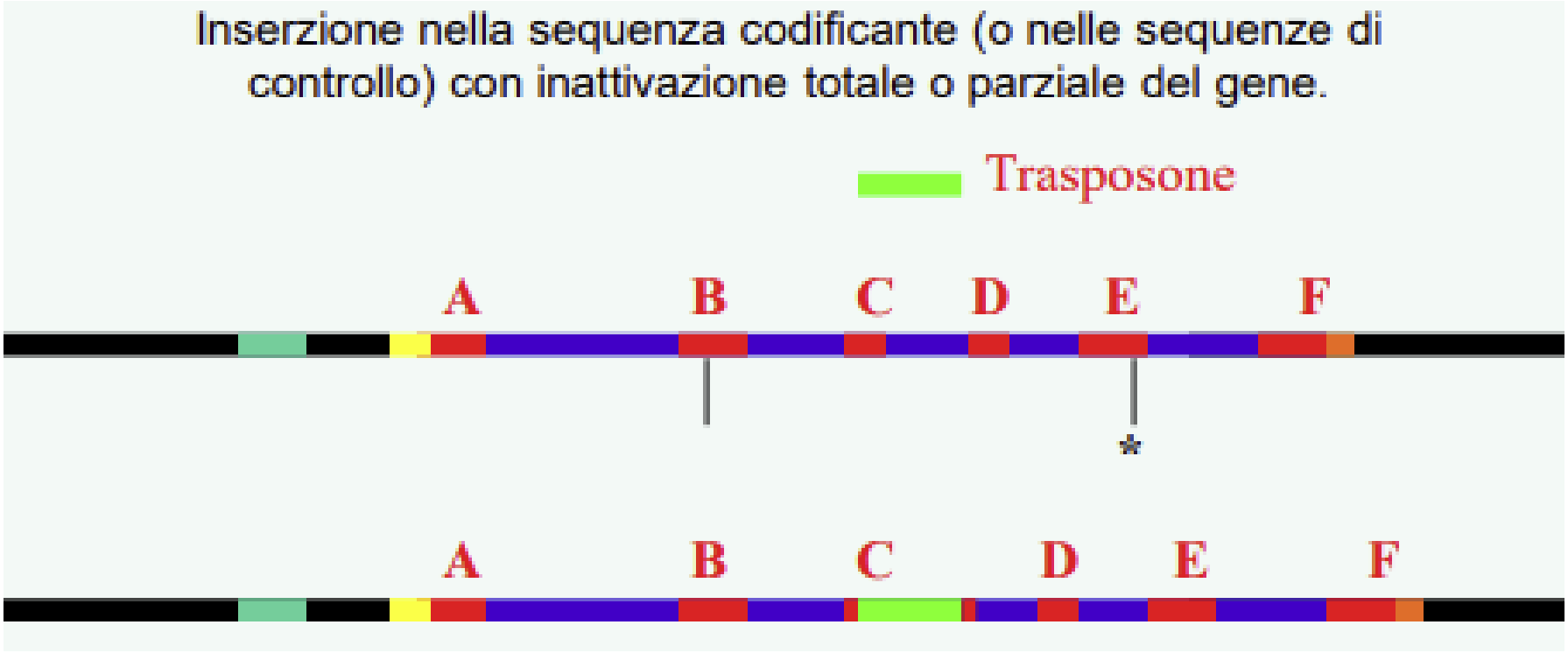
2) Cambio espressione genica

3) Trasposizione senza impatto



Cosa possono fare i trasposoni saltando nel genoma?

MUTAZIONE INSERZIONALE

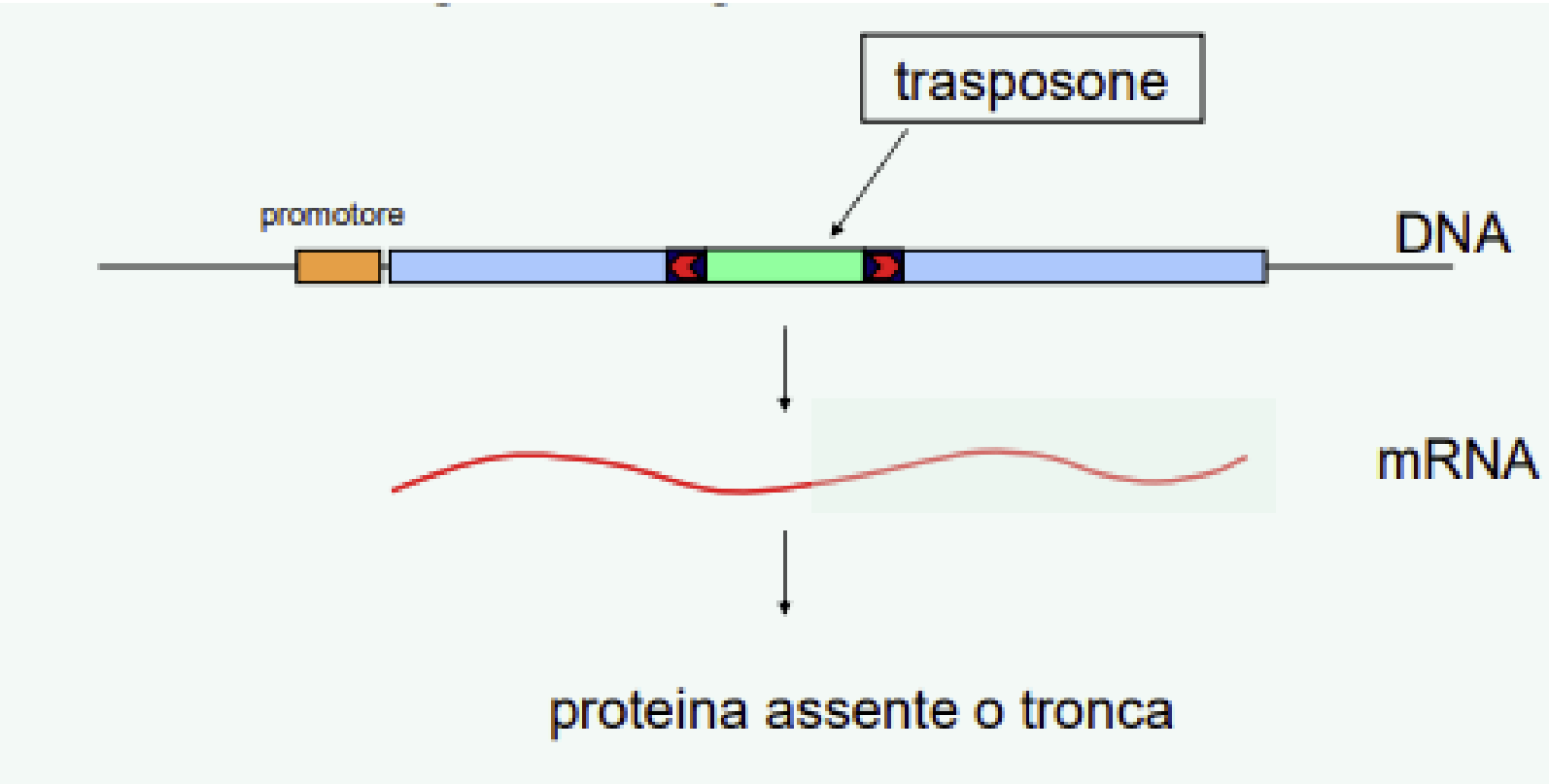


- Per questa proprietà, i trasposoni sono molto **utilizzati per mutagenizzare**
- e successivamente **identificare i geni responsabili di particolari f**enotipi.

Un organismo che si presta molto bene a questo è *D.melanogaster.*

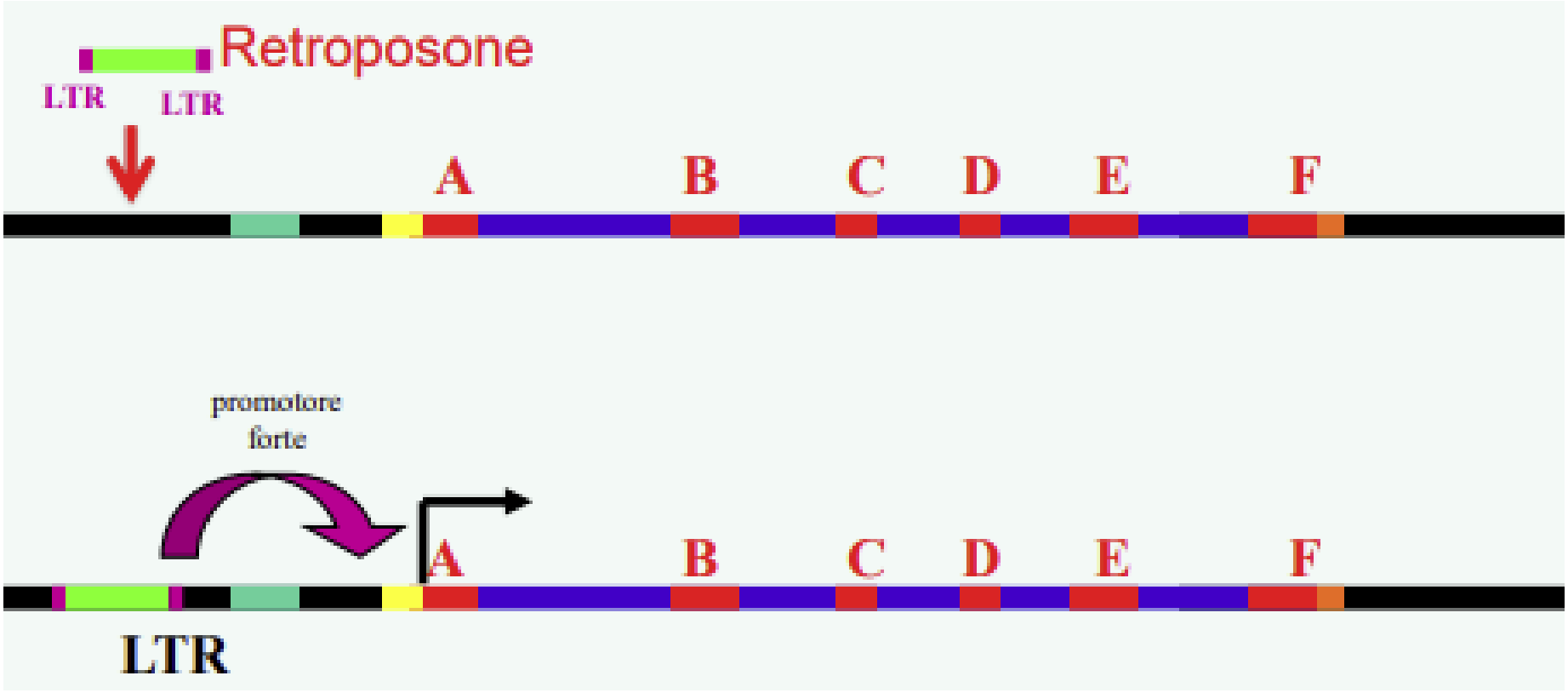
Cosa possono fare i trasposoni saltando nel genoma?

a. Inattivazione del gene bersaglio



Cosa possono fare i trasposoni saltando nel genoma?

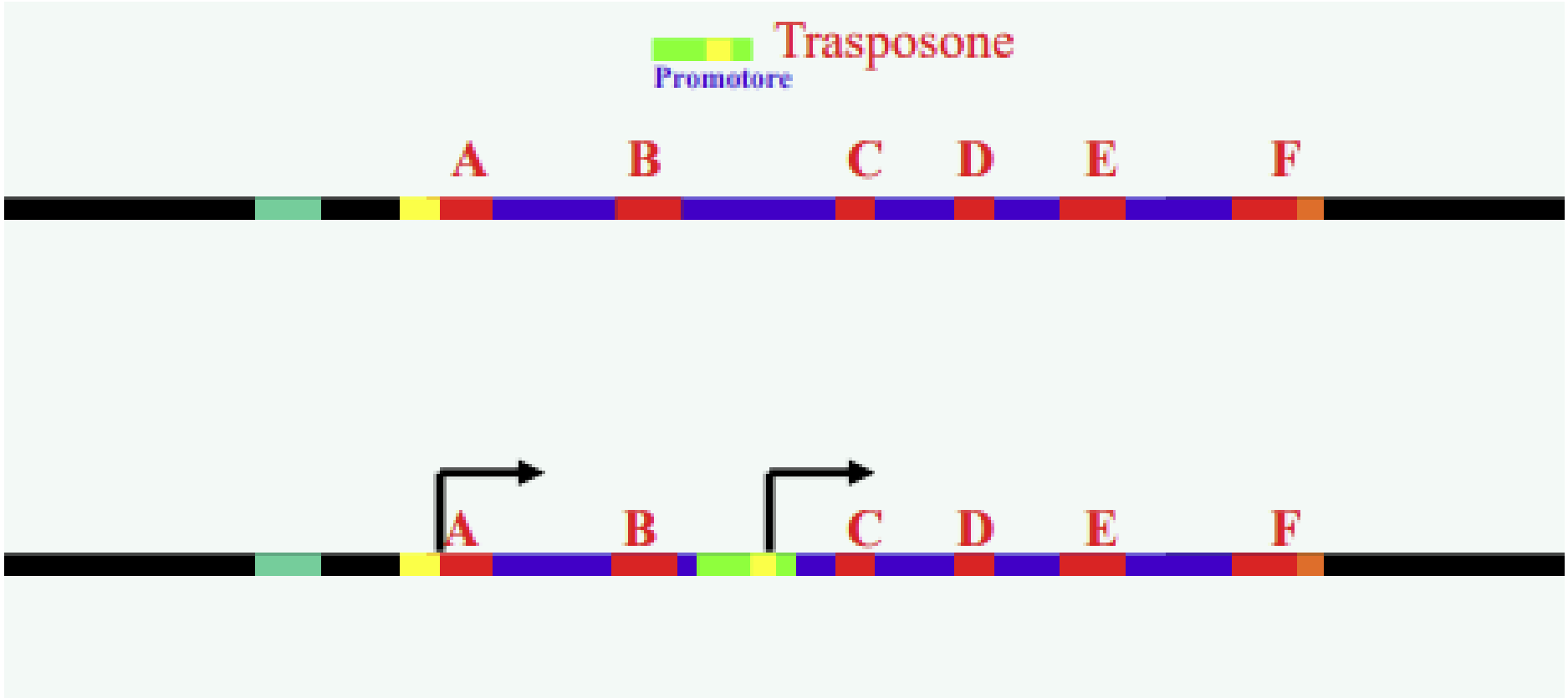
b. Attivazione trascrizionale del gene



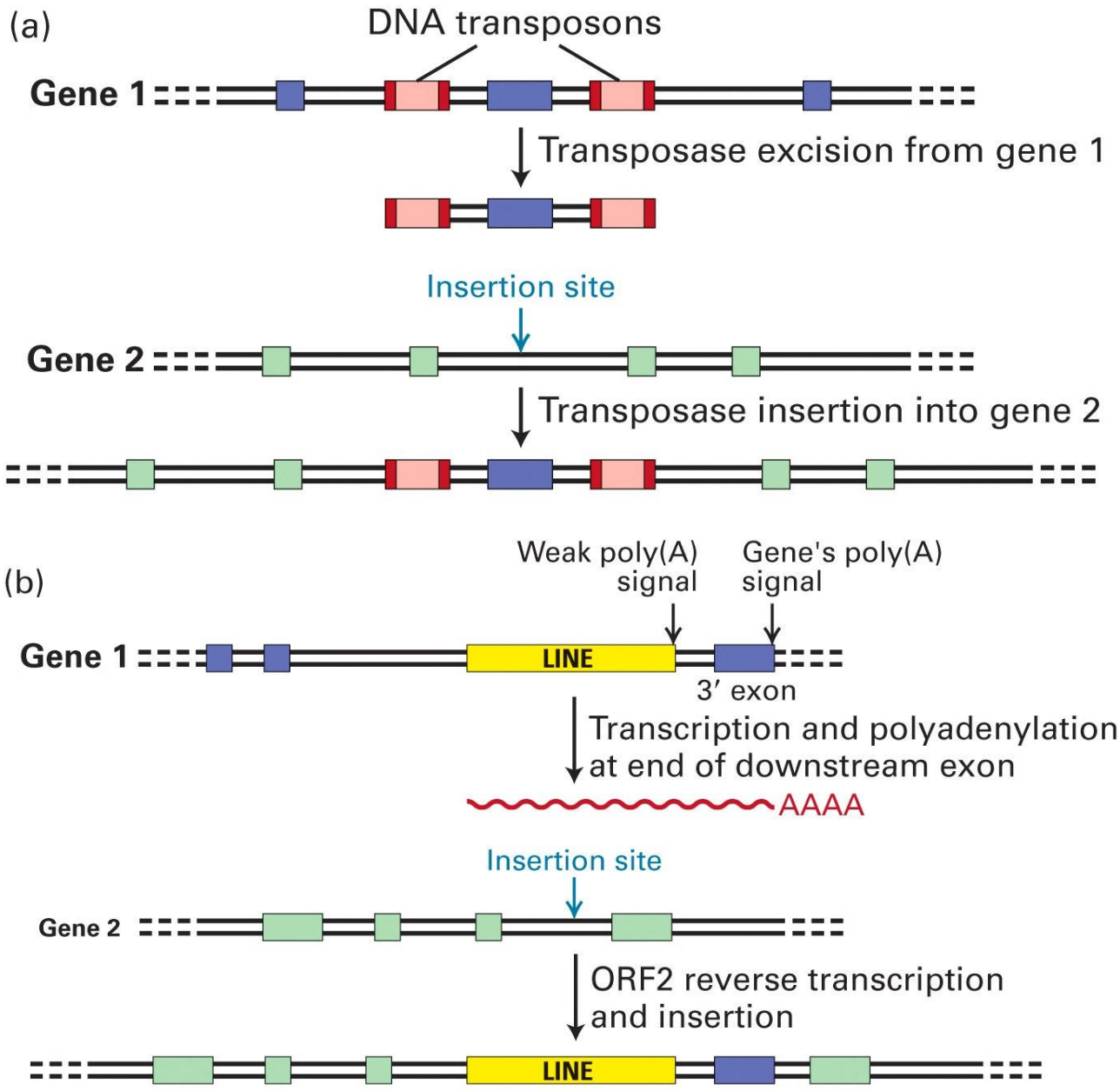
Elementi trasponibili hanno spesso promotori direzionati verso l'esterno

Cosa possono fare i trasposoni saltando nel genoma?

c. Produzione di nuove varianti alternative di una proteina

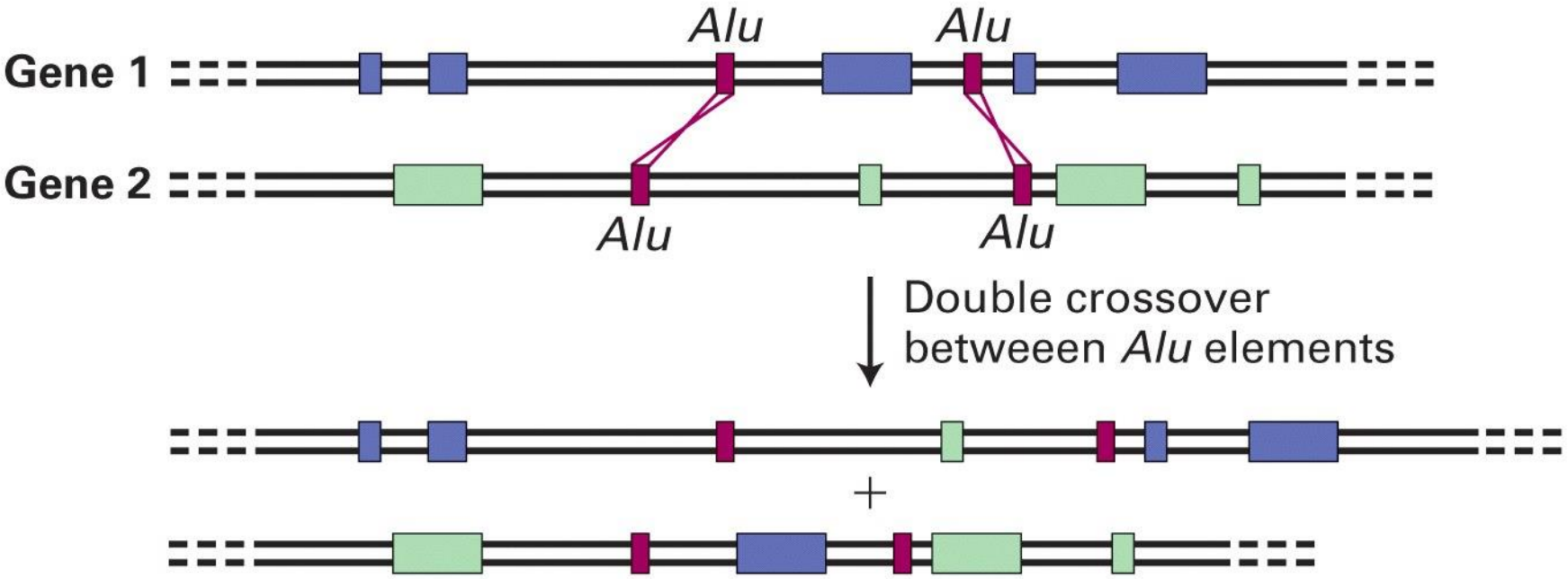


Cosa possono fare i trasposoni saltando nel genoma?



d. Exon shuffling per transposizione

Exon shuffling per ricombinazione tra interspersed repeats omologhi



II. La scoperta degli elementi trasponibili nel mais

Barbara McClintock (1948):
"jumping genes" nel mais





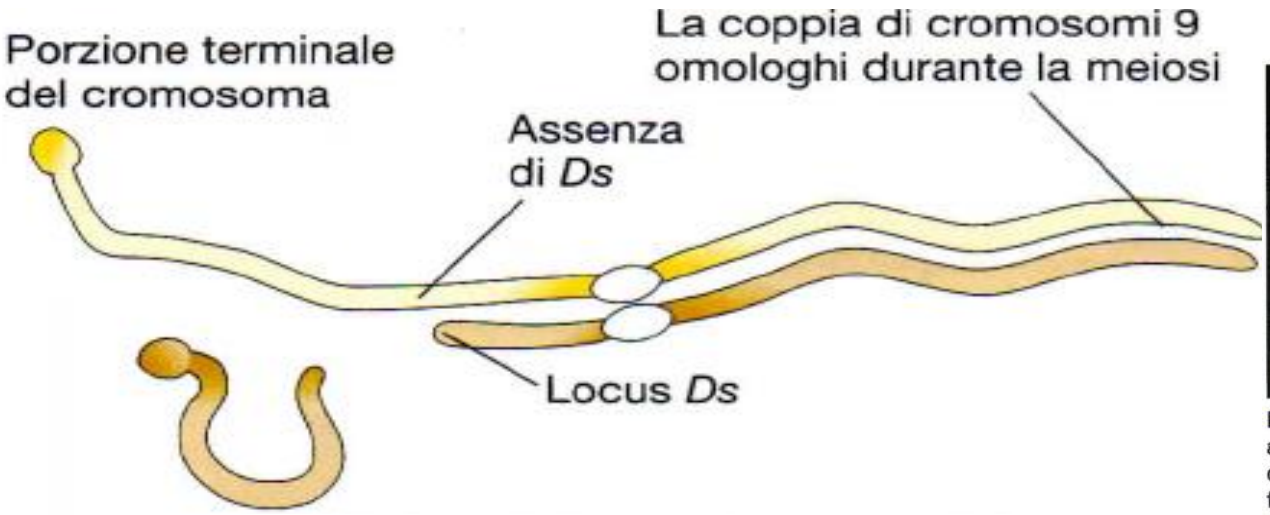


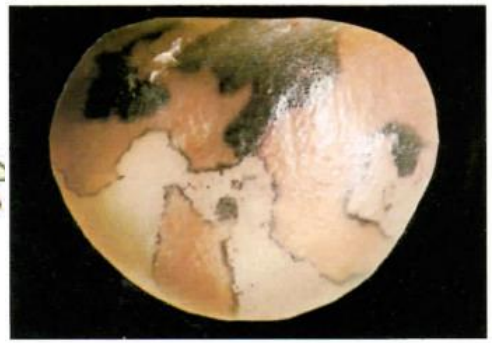
L'elemento trasponibile Ds favorisce la rottura del cromosoma

- **Pattern di rottura del cromosoma 9 nel locus *Ds*, dove si è Inserito l'elemento trasponibile *Ds*.**



Perdita ripetuta dello stesso fragmento cromosomico durante lo sviluppo *Dissociation (Ds)* locus





Endosperma di mais in cui lo stato allelico dei fattori genetici localizzati sul cromosoma 9 permette di osservare fenotipicamente l'effetto dei cicli BFB

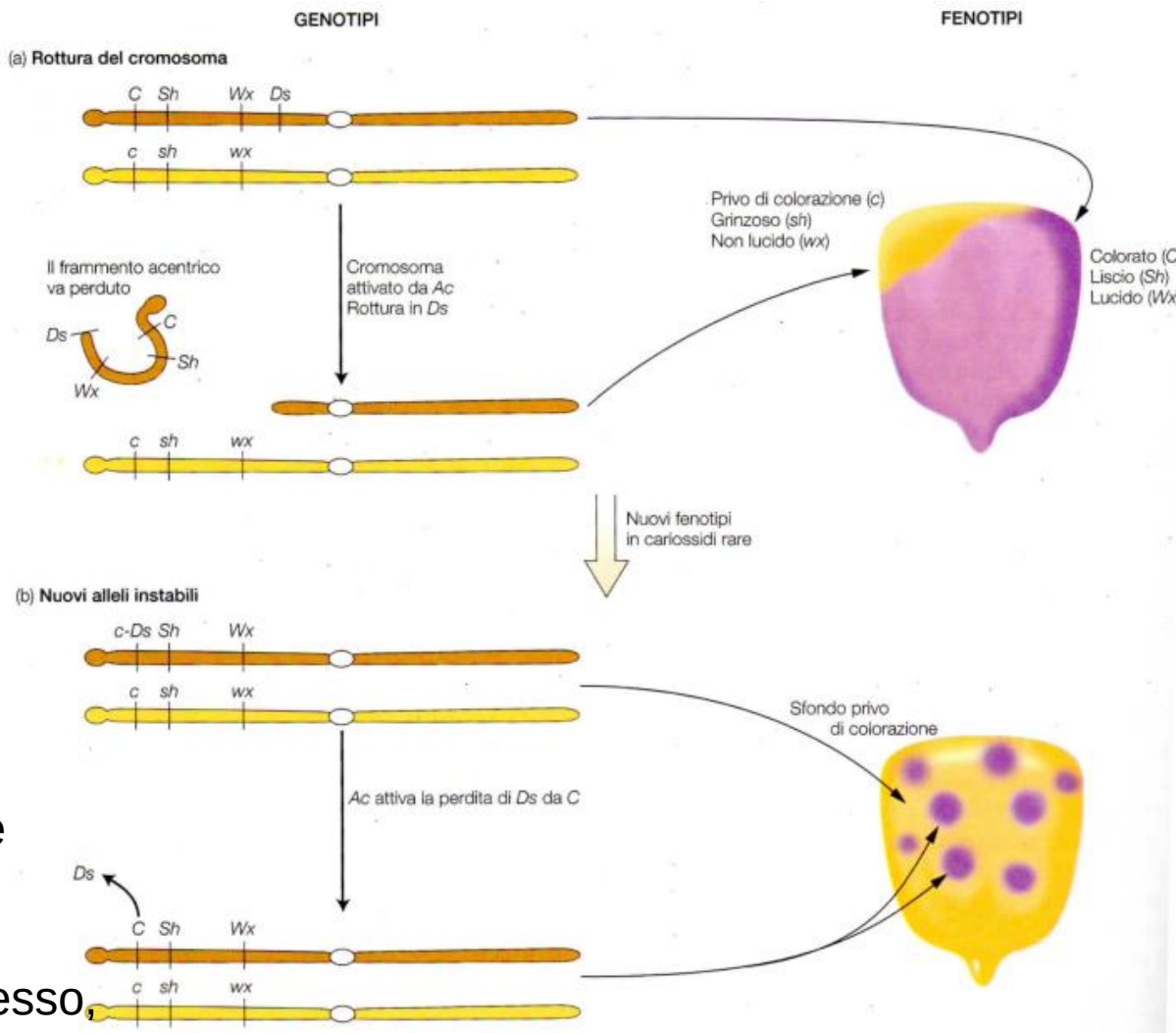
Secondo locus per attivare la rottura cromosomica *Activator (Ac)* locus

ma non poteva essere mappato

Nuovi fenotipi del mais prodotti dallo spostamento dell'elemento trasponibile *Ds sul cromosoma*

a. Un frammento cromosomico va perduto per effetto della rottura del locus *Ds.*

- Pertanto sono espressi gli alleli recessivi presenti sul cromosoma omologo,
- questi causano la mancata colorazione di settori della cariosside,



b) L'inserzione di Ds nel gene *C* (in alto) dà luogo a cellule della cariosside prive dì colorazione.

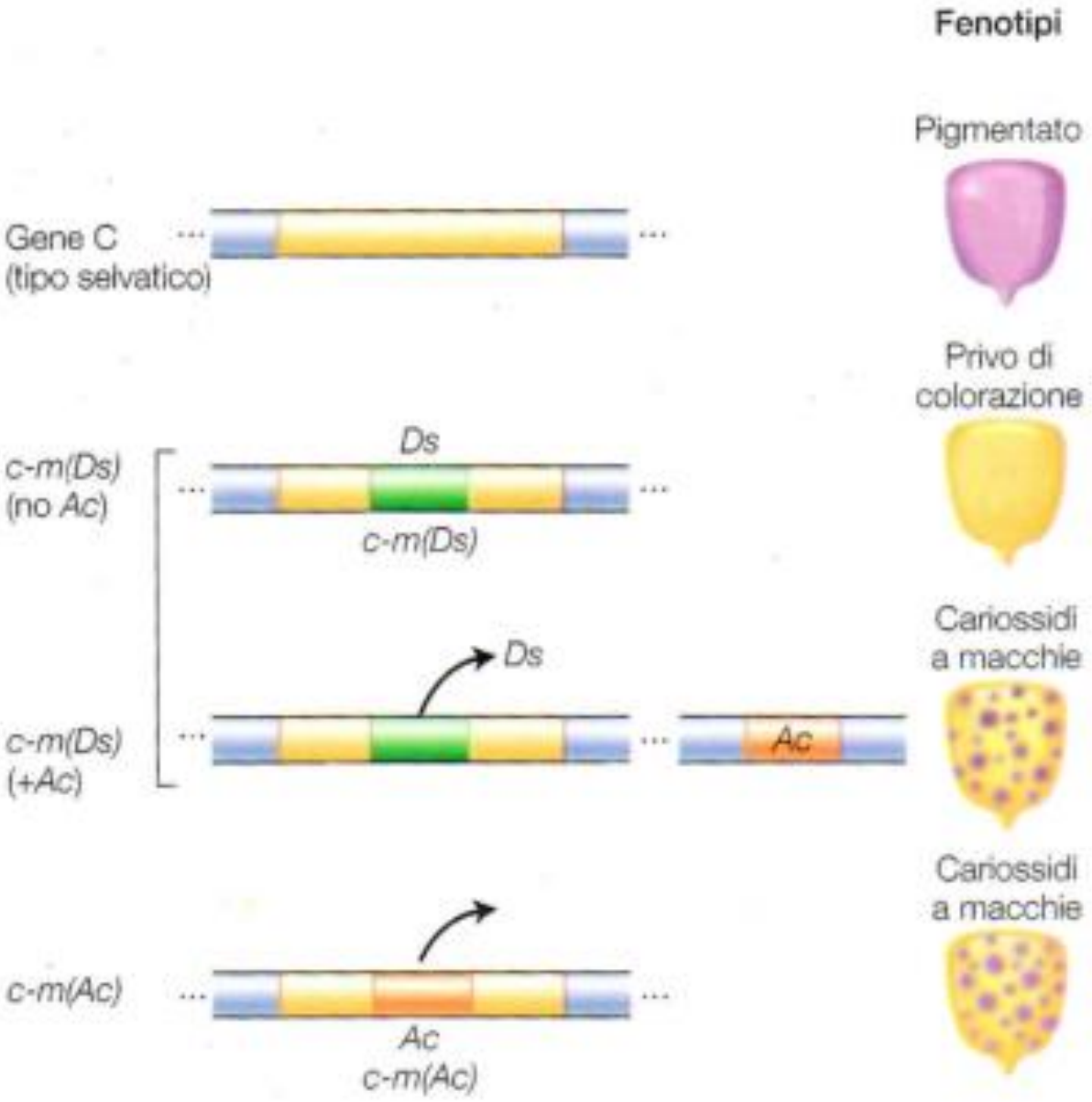
- L'escissione di *Ds* dal gene *C* per azione di *Ac*, in alcune cellule e nei loro prodotti mitotici, fa sì che il colore possa essere nuovamente espresso, producendo il fenotipo a macchie (spotted).

Riassunto dei principali effetti degli elementi trasponibili nel mais

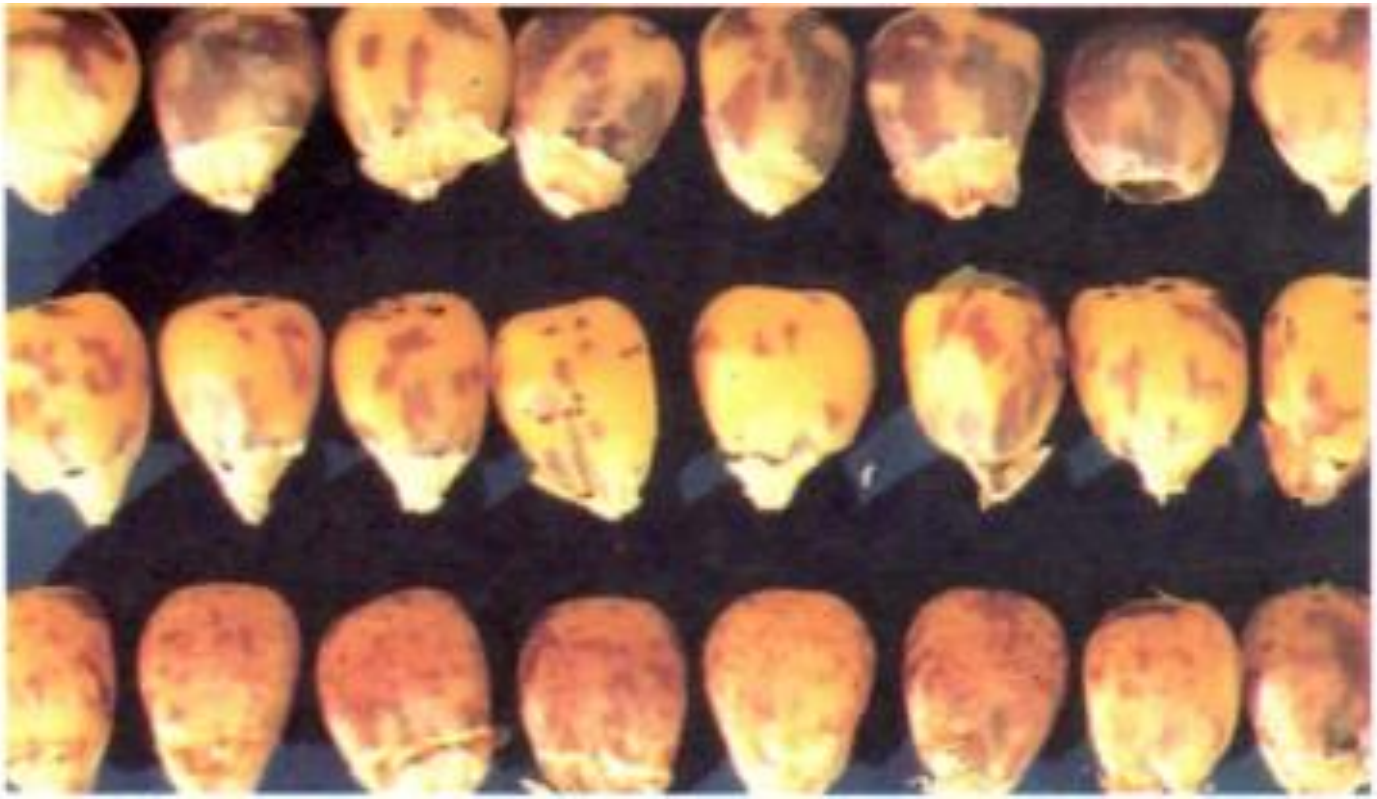
- *Ac* e *Ds* sono usati come esempi.
- Le macchie presenti sulla cariosside sono determinate
- dall'inserzione e
- dall'escissione

degli elementi *Ds e Ac* nel gene *C* (biosintesi antociani)

- questo controlla la pigmentazione del seme

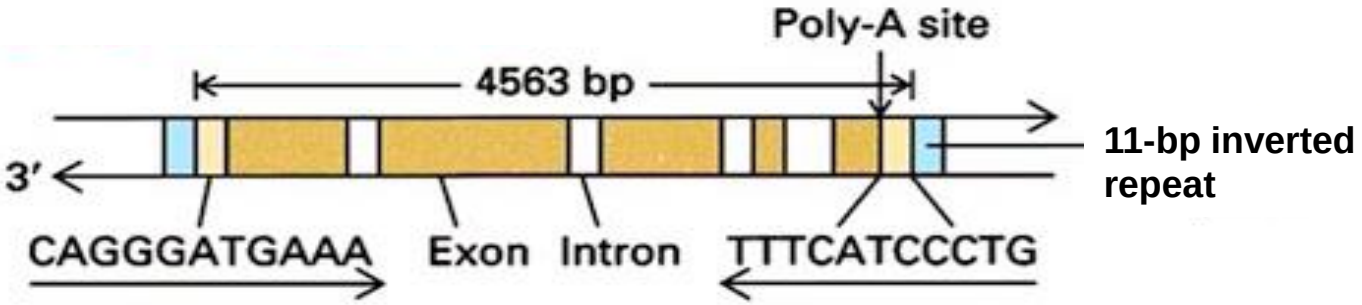


Mosaicismo nel mais per effetto dell'attività di un elemento trasponibile



- L'inserzione di un elemento trasponibile impedisce la produzione di pigmento, dando luogo a cariossidi gialle (prive di colorazione).
- L'escissione dell'elemento trasponibile ripristina la produzione di pigmento.
- La fotografia mostra alcune cariossidi in cui l'escissione dell'elemento trasponibile è avvenuta in momenti diversi dello sviluppo della cariosside **più grande è la macchia, prima è avvenuta l'escissione**.

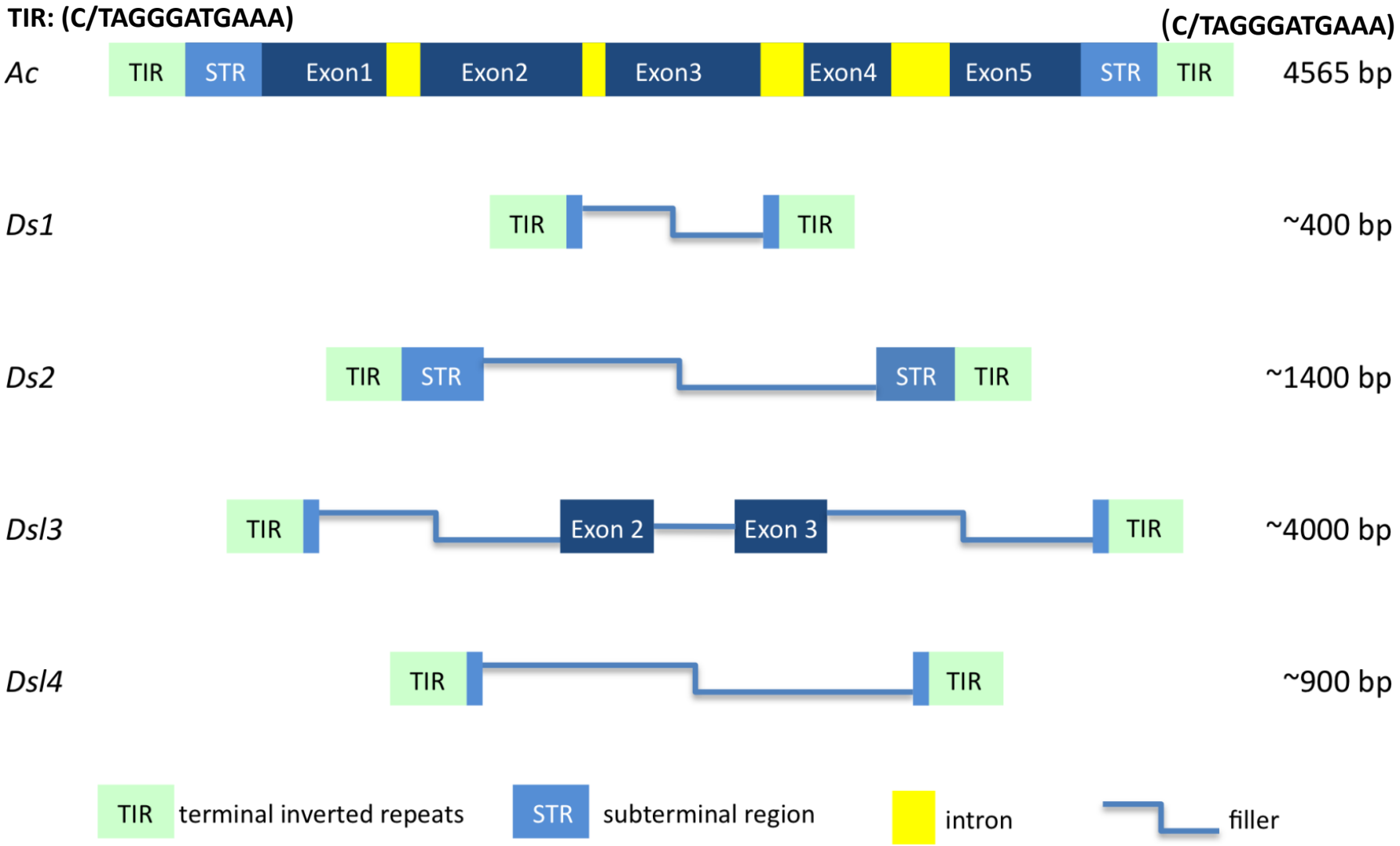
Activator (Ac)Transposable element of maize



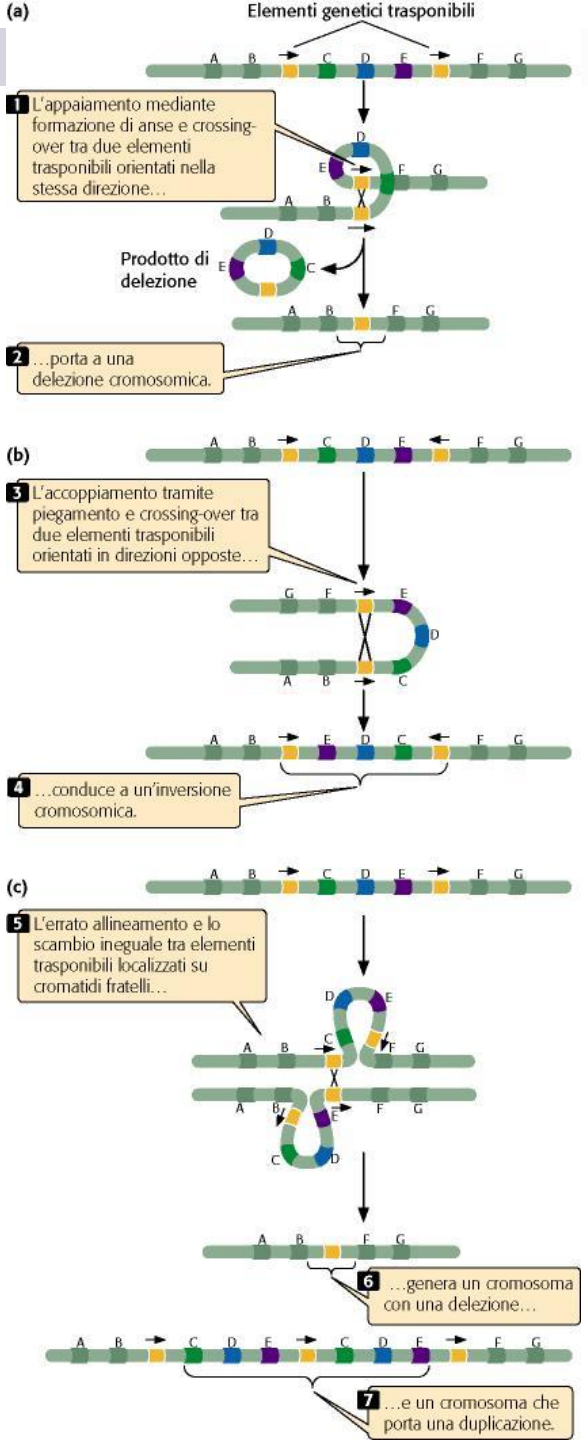
- *Ac* is 4,563 bp, and encodes a **5-exon transposase**
- 11-bp imperfect terminal IRs
- 1 transcription unit producing a 3.5 kb mRNA encoding an **807 a. a. transposase.**
- Insertion generates an **8-bp target site duplication**
- Most lines do not contain an *Ac element*
- *Ac active lines contain only one element*
- Dissociation element: Maize B73 stock, 903 *Ds elements*
- *Ds is a t*runcated version of *Ac*
- Require active *Ac* element to move
- Multiple versions of *Ds exist*
- Each version has different components of the full *Ac element*
- These are located in repetitive regions of the genome

Struttura degli elementi Ac/Ds in mais

(Du et al. 2011. BMC Genomics 12:588)



La trasposizione causa anche riarrangiamenti cromosomici



DUE CLASSI PRINCIPALI DI ELEMENTI TRASPONIBILI

- **TRASPOSONI A DNA (TRASPOSONI DI CLASSE II)**
- **RETROTRASPOSONI (TRASPOSONI DI CLASSE I)**

Classification of eukaryotic transposable elements as proposed by Wicker et al. [2007]

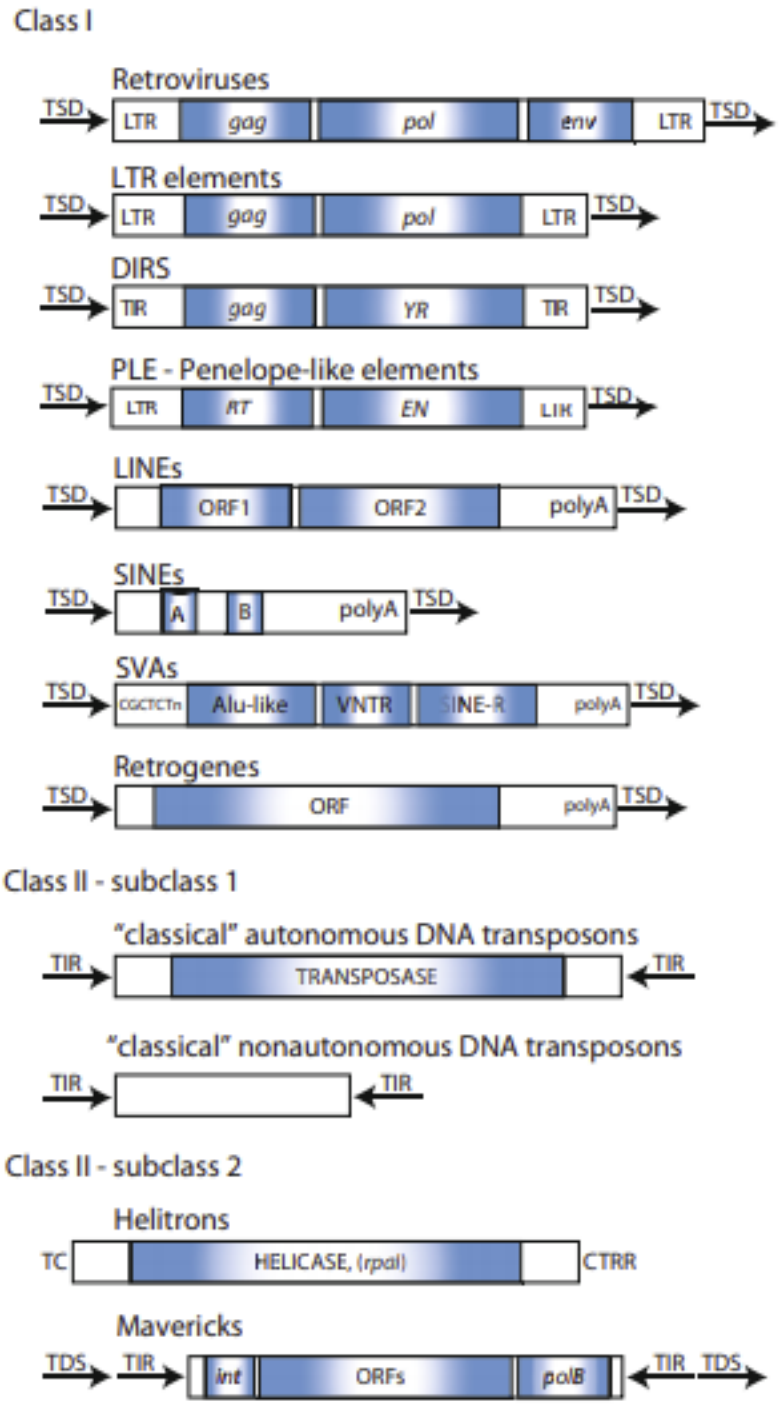
Class	Order	Superfamily	Phylogenetic distribution
Class I (retrotransposons)	LTR	Copia	Plants, metazoans, fungi
		Gypsy	Plants, metazoans, fungi
		Bel-Pao	Metazoans
		Retrovirus	Metazoans
		ERV	Metazoans
	DIRS	DIRS	Plants, metazoans, fungi
		Ngaro	Metazoans, fungi
		VIPER	Trypanosomes
	PLE	Penelope	Plants, metazoans, fungi
	LINE	R2	Metazoans
		RTE	Metazoans
		Jockey	Metazoans
		L1	Plants, metazoans, fungi
	SINE	tRNA	Plants, metazoans, fungi
		7SL	Plants, metazoans, fungi
		5S	Metazoans
		SVA[a]	Primates
		Retrogenes[a]	Plants, metazoans, fungi
Class II (DNA transposons) Subclass 1	TIR	Tc1-Mariner	Plants, metazoans, fungi
		hAT	Plants, metazoans, fungi
		Mutator	Plants, metazoans, fungi
		Merlin	Metazoans
		Transib	Metazoans, fungi
		P	Plants, metazoans
		PiggyBac	Metazoans
		PIF-harbinger	Plants, metazoans, fungi
		CACTA	Plants, metazoans, fungi
	Crypton	Crypton	Fungi
Class II (DNA transposons) Subclass 2	Helitron	Helitron	Plants, metazoans, fungi
	Maverick	Maverick	Metazoans, fungi

Please note that SVAs and retrogenes are not included in that classification

[a]Not included in the original Wicker classification

Structures of eukaryotic mobile elements.

Makałowski et al. 2019,.



target site Duplications (TSDs).

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_6,

2. Meccanismi di trasposizione

(movimento di un trasposone da una localizzazione all'altra)

- Esistono diversi modelli per spiegare i meccanismi di trasposizione dei trasposoni.
  - **Trasposizione replicativa** (duplicazione) **''copia & incolla"**
  - **Trasposizione non replicativa** (spostamento) **''taglia & incolla"**

- Nel **modello replicativo** avviene la trasposizione da un cromosoma a un altro o tra due siti lontani di due cromosomi.
- ✓ Secondo tale modello, la porzione di cromosoma che contiene il trasposone si fonde per breve tempo con la porzione di cromosoma accettrice.
- ✓ A questo punto, il trasposone si duplica, e una delle copie si posiziona nel DNA del cromosoma accettore, mentre l'altra rimane nella porzione donatrice. Questo tipo di trasposizione viene perciò anche chiamata trasposizione replicativa.

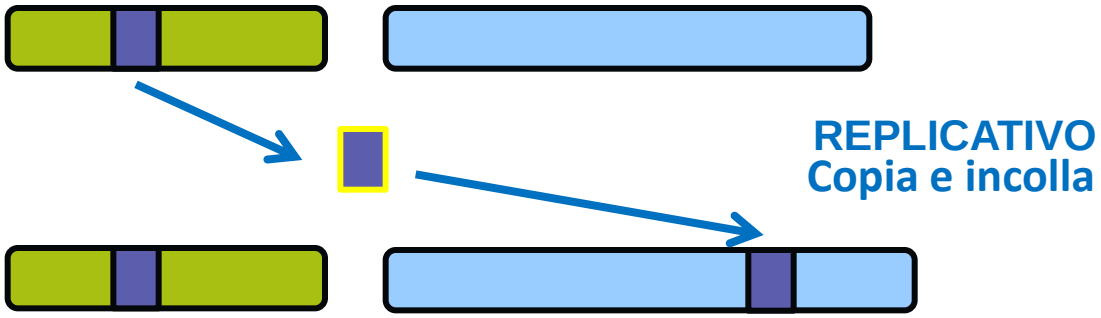
- **Nel modello non replicativo (o anche conservativo**), il trasposone, in genere composito, si sposta da una posizione all'altra del cromosoma, senza che questo si replichi.
- ✓ Ciò permette lo spostamento fisico del trasposone, dalla posizione iniziale a quella finale.
- ✓ Un altro tipo di trasposizione è quella conservativa, che prevede il taglio netto delle
- ✓ estremità del trasposone e un taglio netto nel DNA ricevente. Il trasposone viene così
- ✓ integrato senza formare ripetizioni fiancheggianti dirette

Meccanismi di trasposizione:

- **per la trasposizione sono necessari gli elementi ripetuti invertititi intatti alle estremità degli elementi (IR)**
- Deve essere presente l'enzima **TRASPOSASI**

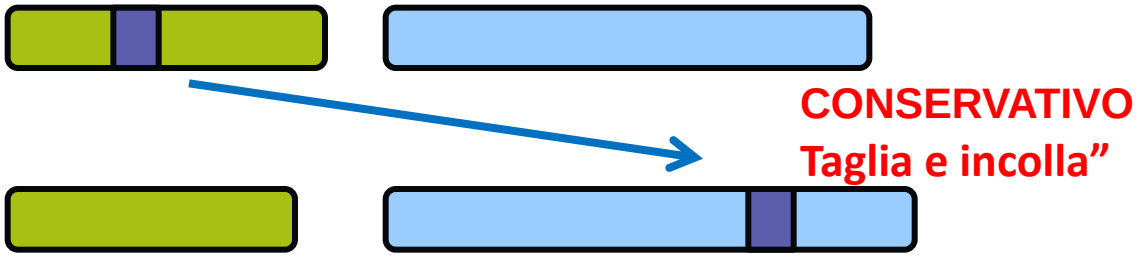
REPLICATIVO : l'elemento è replicato ed 1 copia rimane nel sito originale, la nuova copia si integra in un nuovo sito (es. Tn3 --> **elementi della classe II**

"Copia e incolla"
Il DNA viene copiato in un tratto di RNA, che si sposta e su cui viene sintetizzato nuovo DNA (solo Eucarioti)

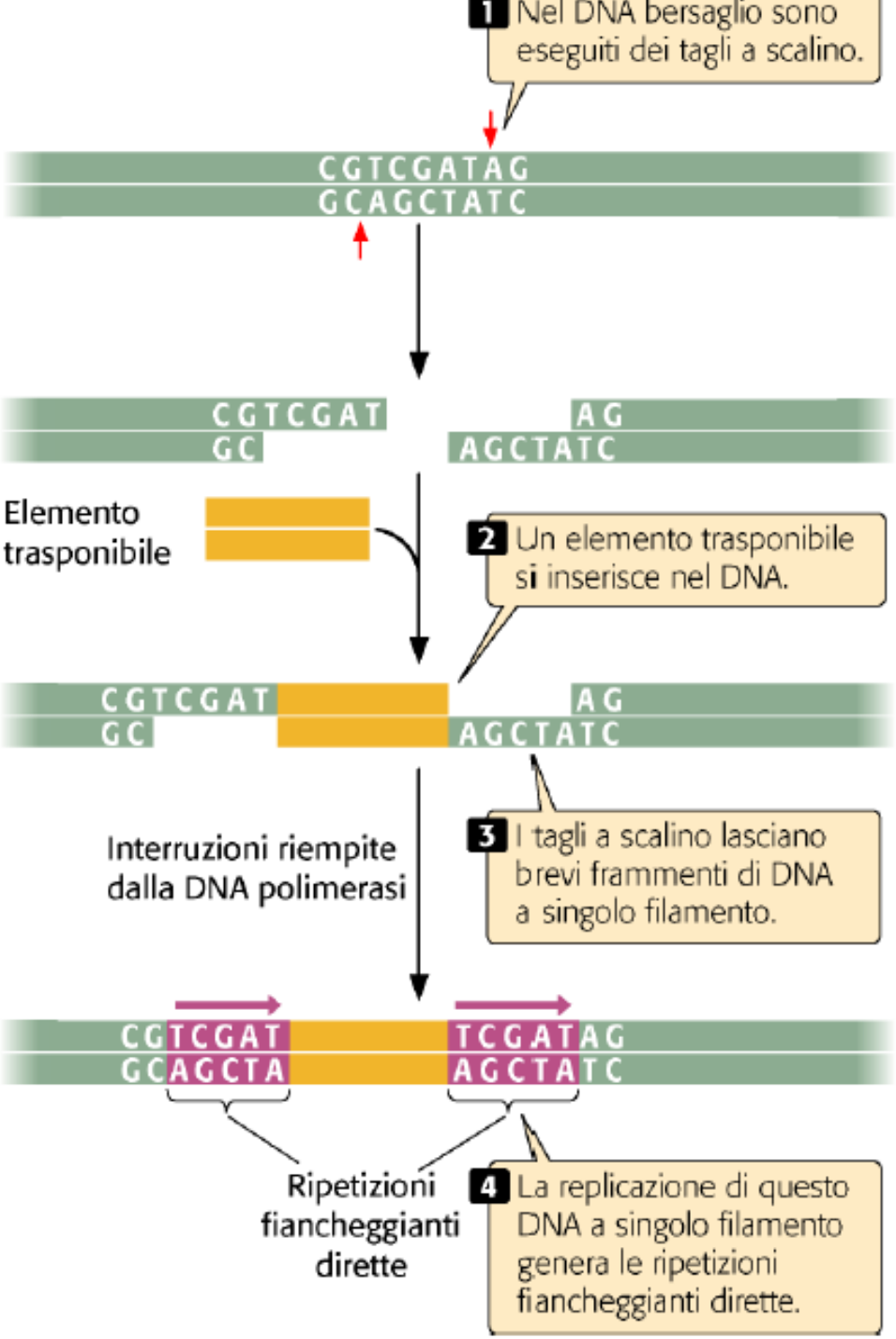


CONSERVATIVO : l'elemento è "TAGLIATO" dal sito originale e si inserisce in un nuovo sito (es. Tn5 -> **elementi della classe I**

"Taglia e incolla"
Il DNA viene tagliato e si sposta in un'altra posizione (Eucarioti e procarioti)



La trasposizione a DNA avviene con un meccanismo del tipo ”taglia e incolla”

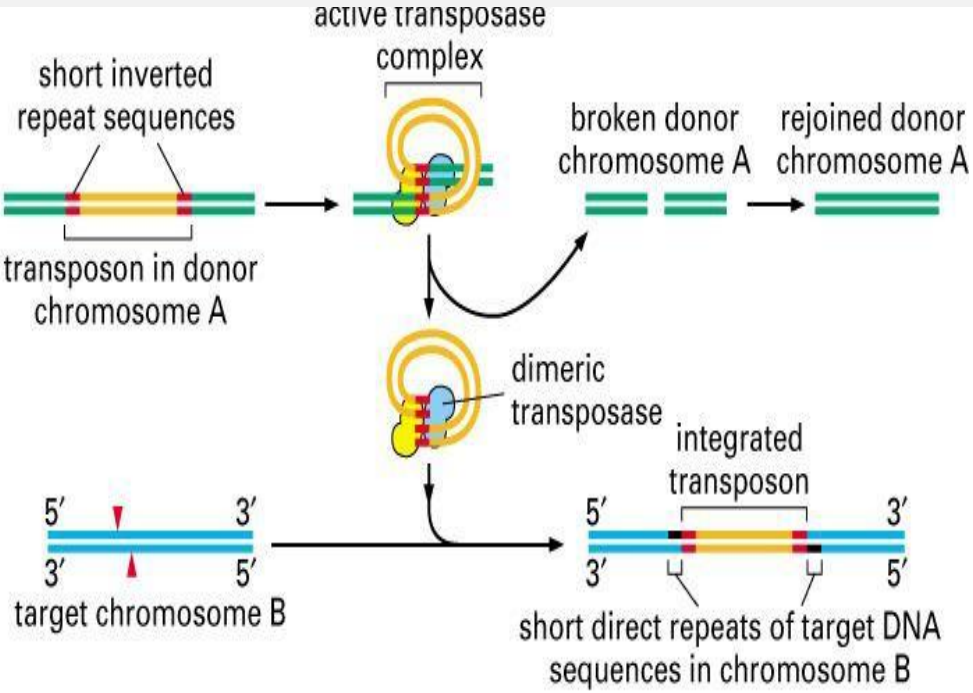


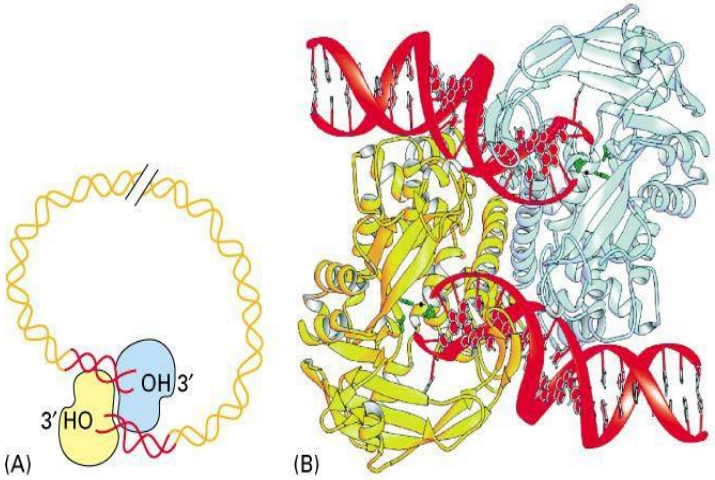
“Taglia e incolla”

La trasposizione a DNA avviene con un meccanismo del tipo ”taglia e incolla”

Il trasposoma

- **La trasposasi** è codificata dal trasposone
- Occorrono almeno **2 subunità**
- Ha il **ruolo di**
  - riconoscere le estremità,
  - unirle,
  - tagliarle per fare il trasposoma,
  - inserirlo nel DNA bersaglio



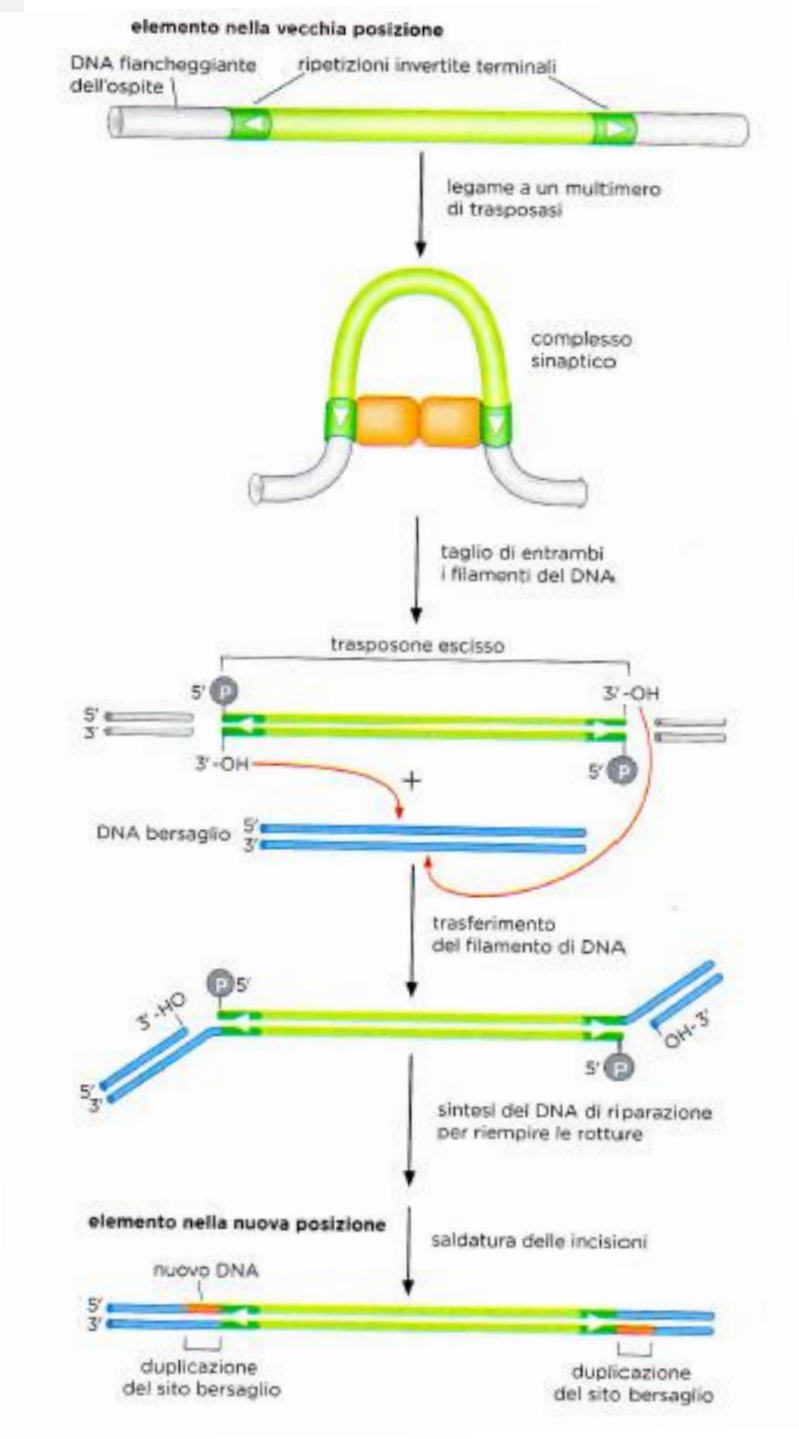


“Taglia e incolla”

1. La trasposizione a DNA avviene con un meccanismo del tipo ”taglia e incolla”

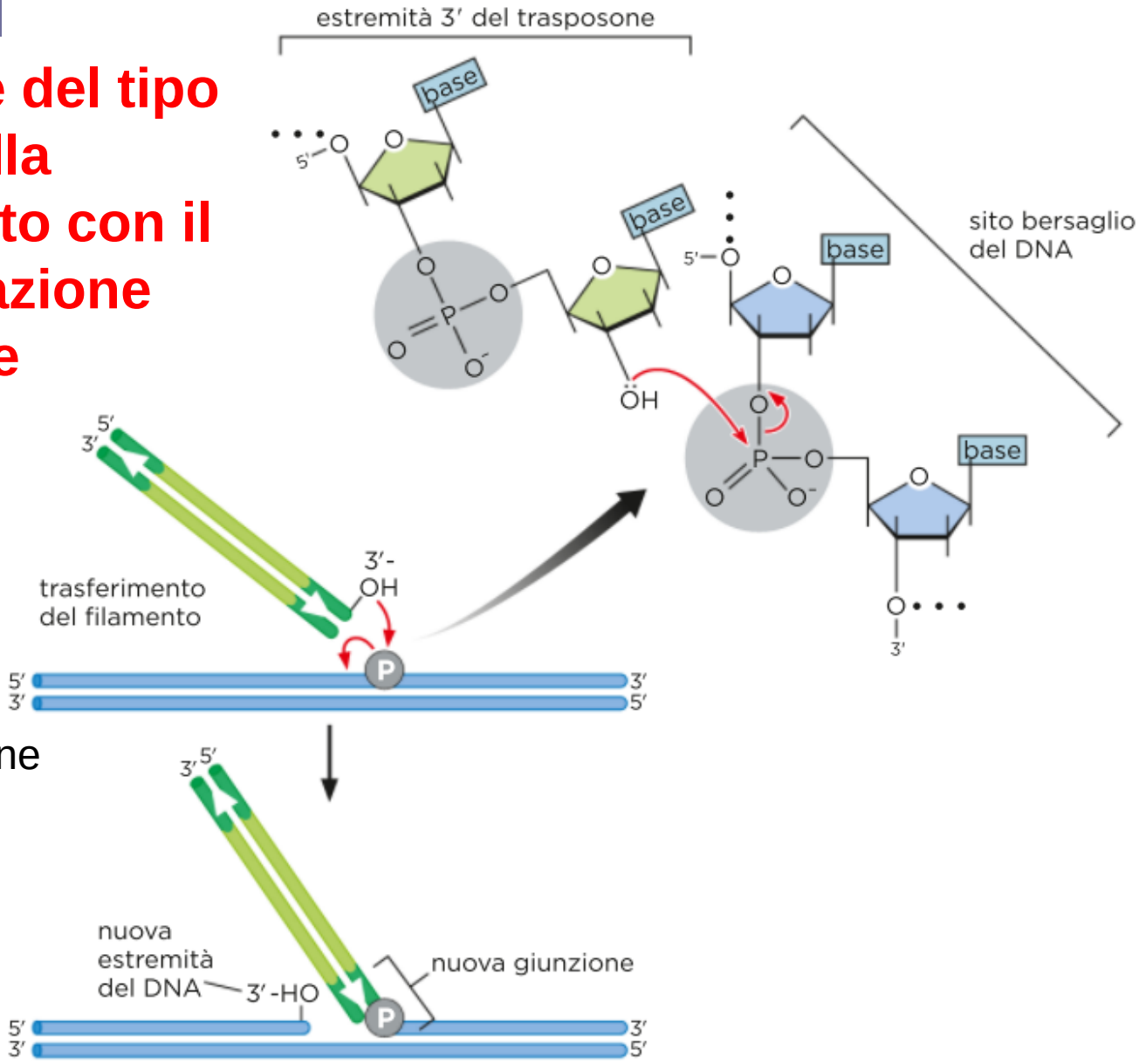
- **Il meccanismo di trasposizione del tipo taglia e incolla.**

- La figura mostra il movimento di un trasposone da un sito bersaglio nel DNA dell'ospite (grigio), a un nuovo sito (DNA blu).
- Si notino **i siti di taglio sfalsati sul DNA bersaglio** prodotti durante la reazione di trasferimento del filamento, che portano alla formazione di corte ripetizioni di sequenza sul nuovo sito (duplicazioni del sito bersaglio).
- Come risultato dell'escissione del trasposone, sul DNA, nel sito iniziale d'inserzione (qui rappresentato in grigio), resterà una **rottura a doppio filamento, che può essere riparata dalla ricombinazione** che **unisce le estremità non omologhe o da quella omologa.**
- Si noti che per maggiore chiarezza i passaggi chimici sono stati rappresentati senza alcuna proteina legata.



Nella trasposizione del tipo taglia e incolla l'intermedio è risolto con il sistema di riparazione delle rotture

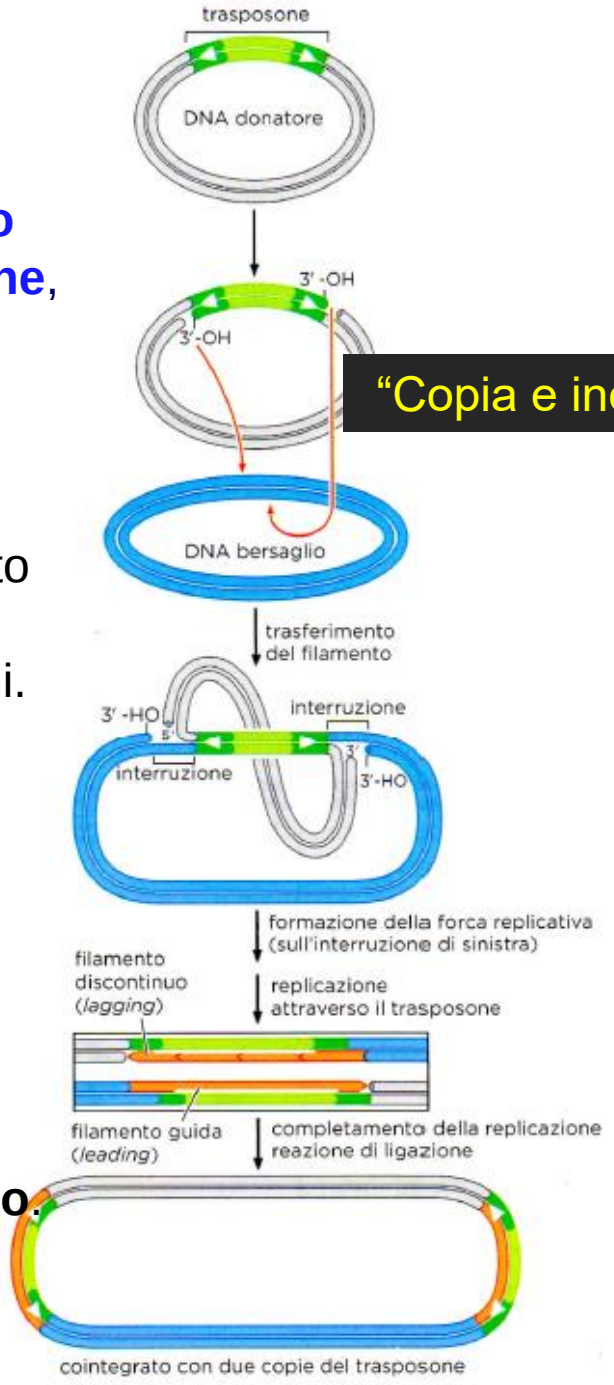
- Primo piano del passaggio chimico di trasferimento del filamento di DNA.
- Nella parte superiore della figura per una maggiore chiarezza viene mostrato solamente un filamento sia per il trasposone che per il DNA bersaglio



La reazione di **saldatura** avviene mediante un unico **passaggio di trans-esterificazione**, noto come trasferente del filamento di DNA

2. Il meccanismo della trasposizione replicativa.

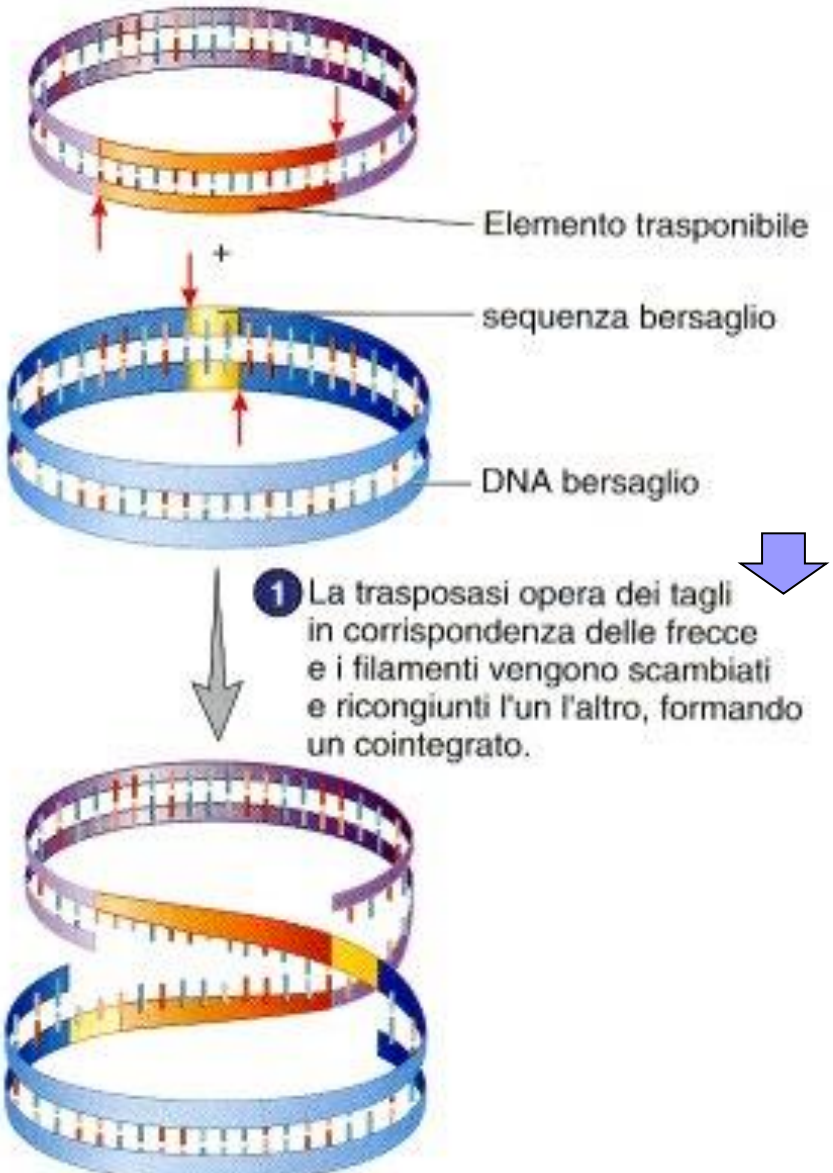
- Il trasposoma **introduce un' interruzione a singolo filamento su entrambe le estremità del trasposone**, generando su ciascuna di esse un gruppo 3'-OH.
- Quindi i gruppi OH attaccano il DNA bersaglio e si uniscono a esso mediante una reazione di trasferimento del filamento.
- Si noti che a ogni estremità del trasposone, a questo punto, solo un'estremità è trasferita sul bersaglio, formando una struttura a DNA con due ramificazioni.
- L'apparato replicativo si assembla su una di queste "forche" (nella figura, quella di sinistra).
- La replicazione prosegue lungo tutta la sequenza del trasposone.
- Il prodotto che si viene a costituire , detto **cointe-grato ,** ha le due molecole circolari in formazione unite dalle due coppie del trasposone.
- L'interruzione a singolo filamento nell'intermedio ramificato porta alla **duplicazione del sito bersaglio**. Per chiarezza, queste duplicazioni non sono mostrate nel cointegrato.

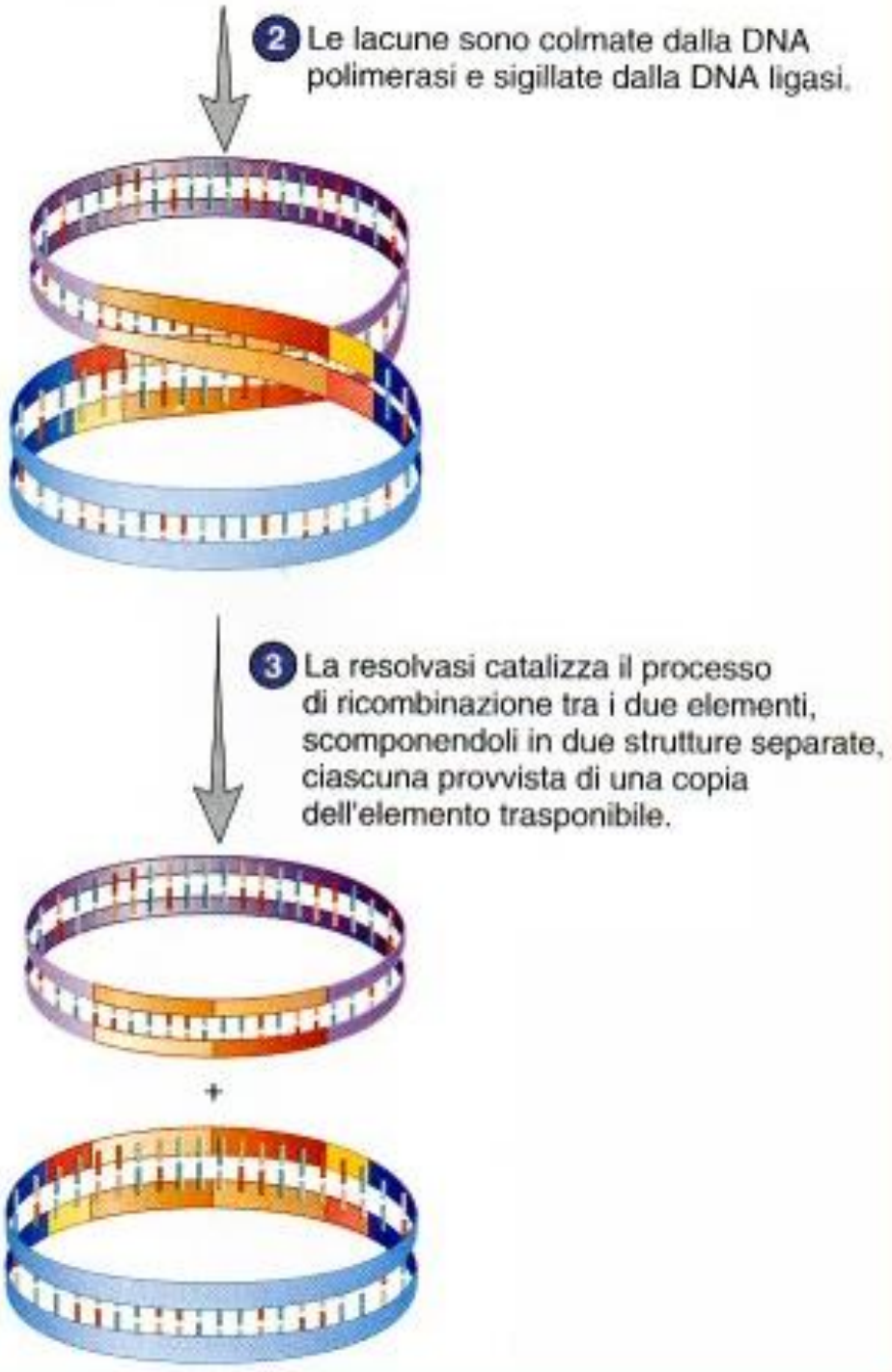


"Copia e incolla"

La trasposizione replicativa

Es fago Mu

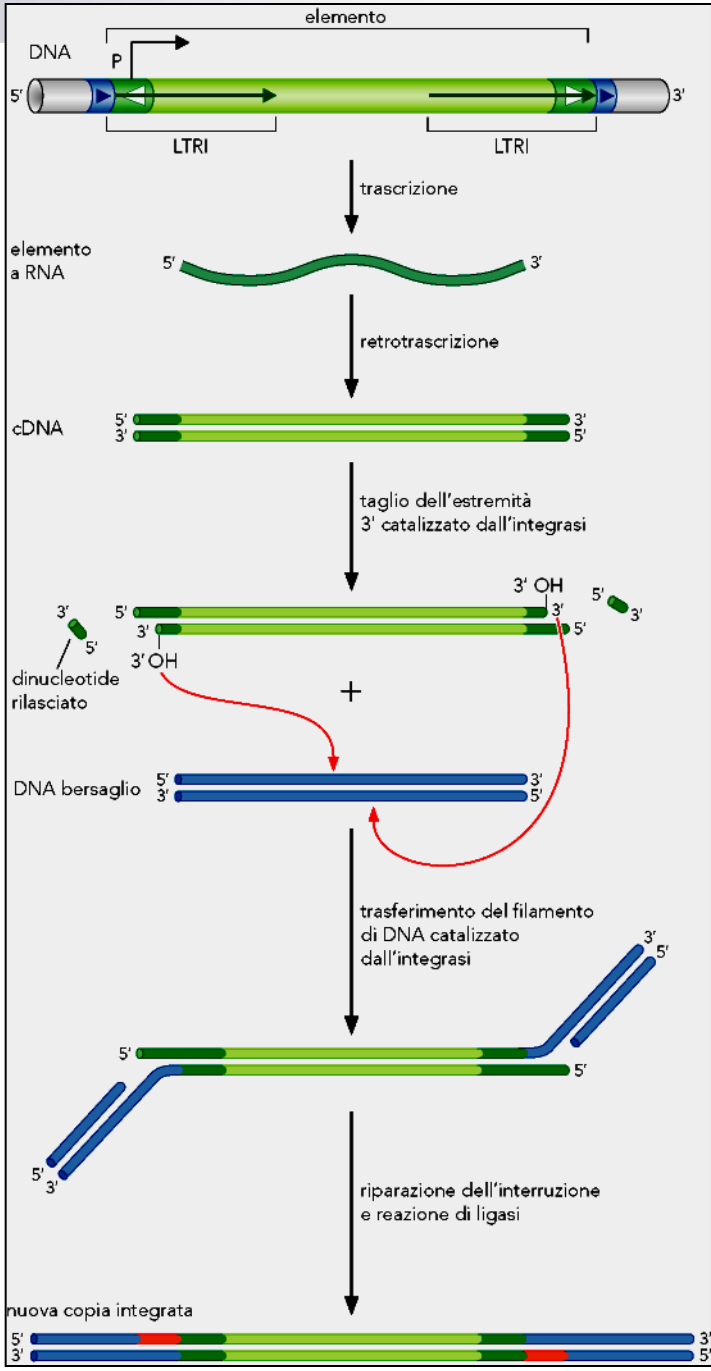




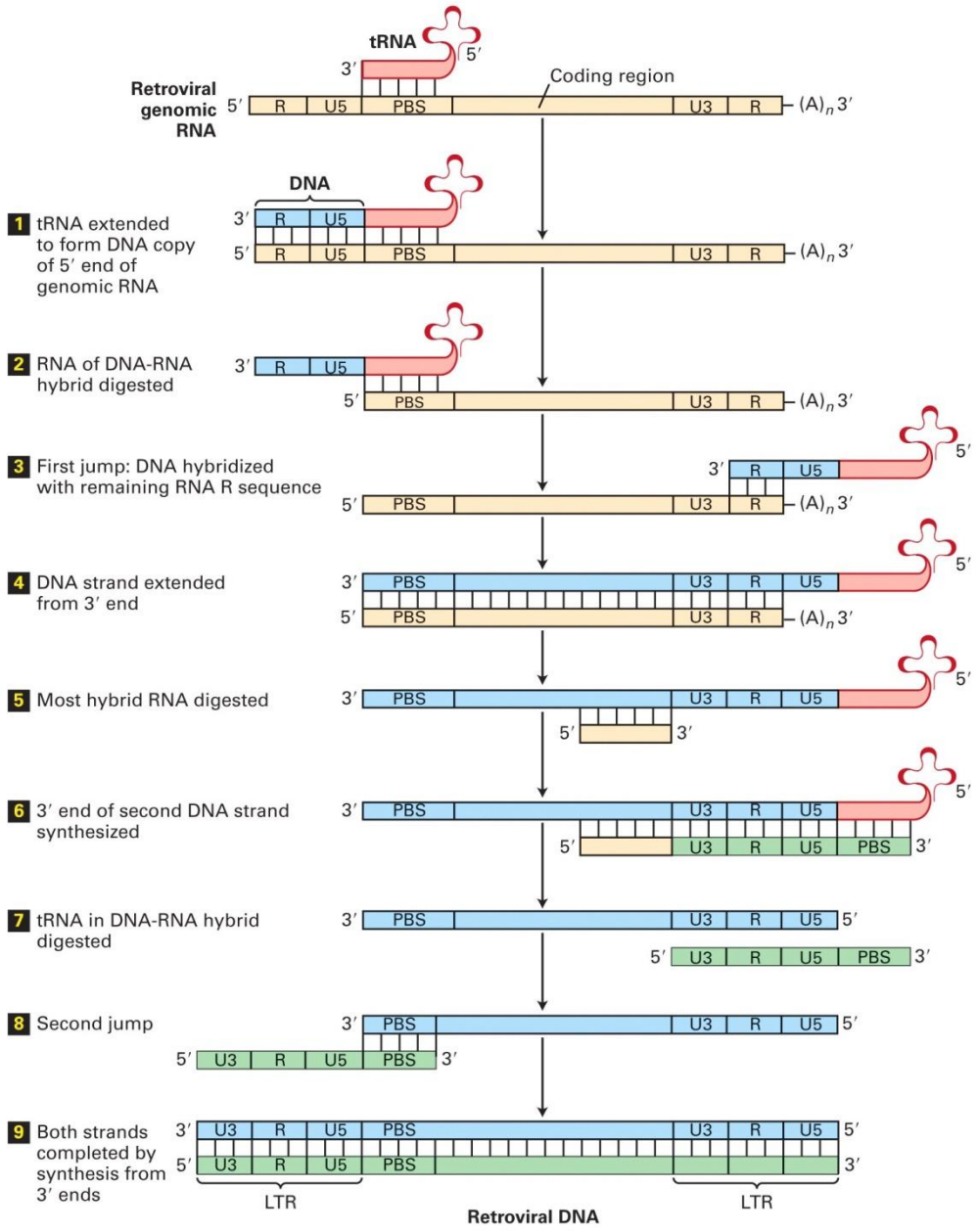
Retrotrasposoni simili ai virus

- Hanno un RNA intermedio
- Il promotore è su LTR e l'RNA viene copiato in cDNA
- Un'integrasi riconosce le estremità e
- dirige il trasposoma al bersaglio.
- Una trascrittasi inversa sintetizza il DNA

"Copia e incolla"



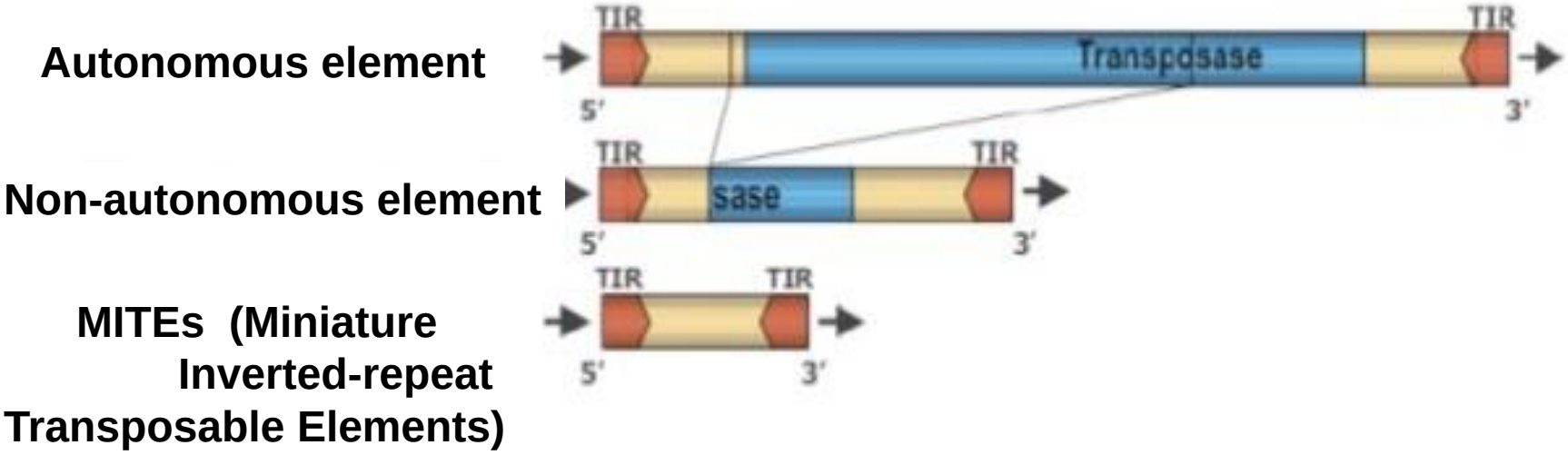
Modello dell retrotrascrizione di RNA retrovirale genomico in DNA



Struttura dei Trasposoni a DNA,

Trasposoni di Classe II

- I trasposoni possiedono sequenze terminali dette **TIR** (Terminal Inverted Repeats) **di 11-100 bp**
- Codificano l'enzima **trasposasi** necessario per la trasposizione.

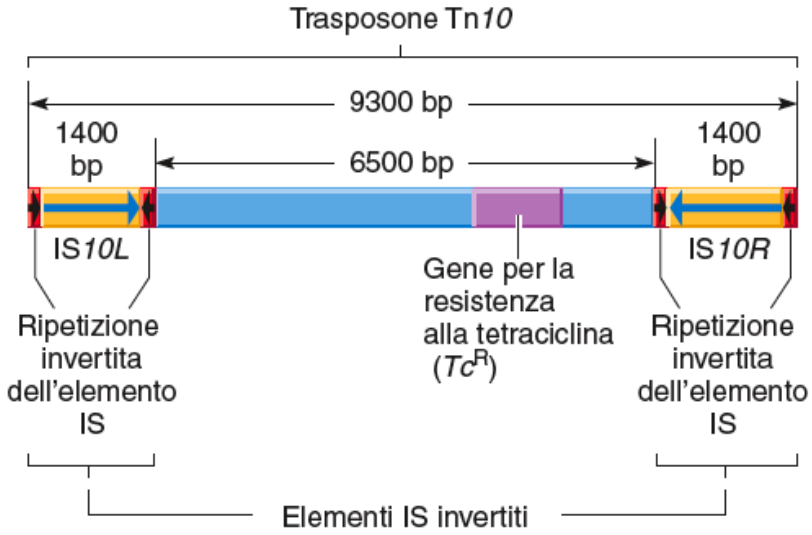


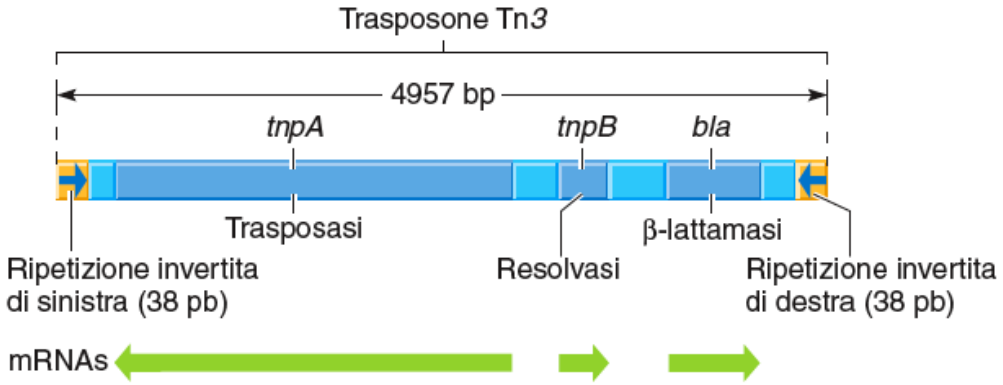
- 5 superfamiglie di trasposoni nelle piante (CACTA, Tc1-Mariner, hAT, **Mutator-Like DNA Elements (MULEs)**, PIF-Harbinger).
- Basso numero di copie di elementi individuali
- In riso più di 3000 MULEs contengono frammenti genici (Pack-MULEs) anche appartenenti a geni differenti ("exon shuffling" formazione di geni chimerici con nuove funzioni), alcuni (5%) sono espressi!!

I trasposoni nei procarioti

- I **trasposoni sono elementi mobili di maggiori dimensioni, che contengono più geni (oltre a quello per la trasposasi). Possono avere come ripetizioni invertite due interi elementi IS**

a)





(a) Trasposone composito *Tn 10.*

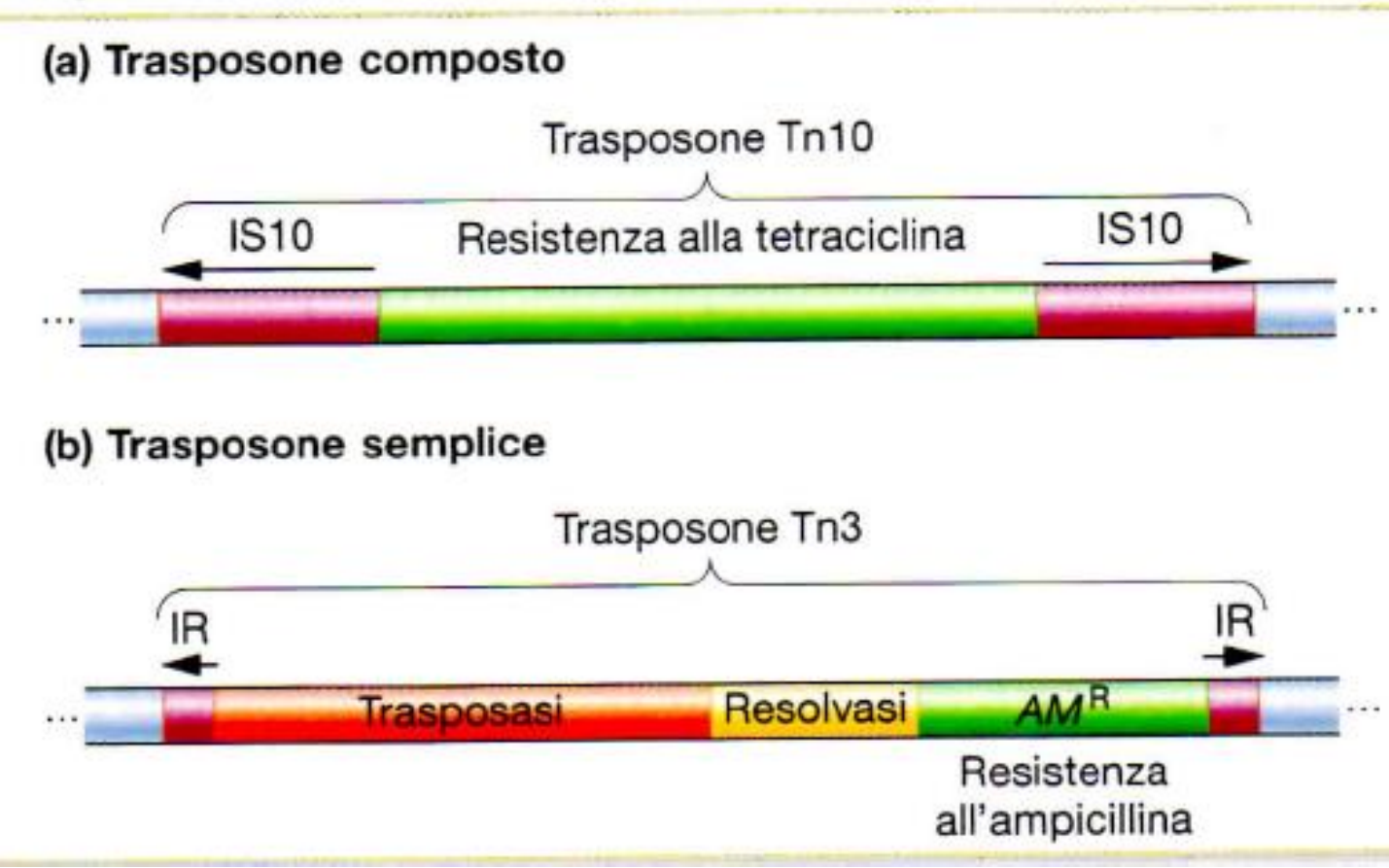
Le caratteristiche generali sono:
una regione centrale che porta uno o più geni , p.e. resistenza a antibiotici , fiancheggiata da elementi IS diretti o invertiti .
Il trasposone *Tn10* , lungo 9300 bp, consiste di una regione centrale non ripetuta di DNA, lunga 6500 bp e contenente il gene per la resistenza alla tetraciclina, fiancheggiata a ciascuna estremità da elementi IS lunghi 1400 bp, *IS10L*. e *IS10R,* in orientamento inverso.
Gli elementi IS hanno essi stessi delle sequenze e ripetute invertite terminali.

b) **Struttura del trasposone non composito o semplice *Tn3.***

Il trasposone *Tn3*, 4957bp, contiene nella sua regione centrale 3 geni che codificano per altrettanti enzimi formati da una b-lattamasi (che inattiva antibiotici:come penicillina e ampicillina), t*npA* che codifica per la trasposasi, e *tnpB* che codifica per la resolvasi.
Trasposasi e resolvasi sono coinvolte nel processo traspositivo. Tn3 ha sequenze terminali ripetute invertite di 38 bp che non assomigliano a quelle degli elementi IS.

"Taglia e incolla"

Caratteristiche strutturali dei trasposoni semplici e composti

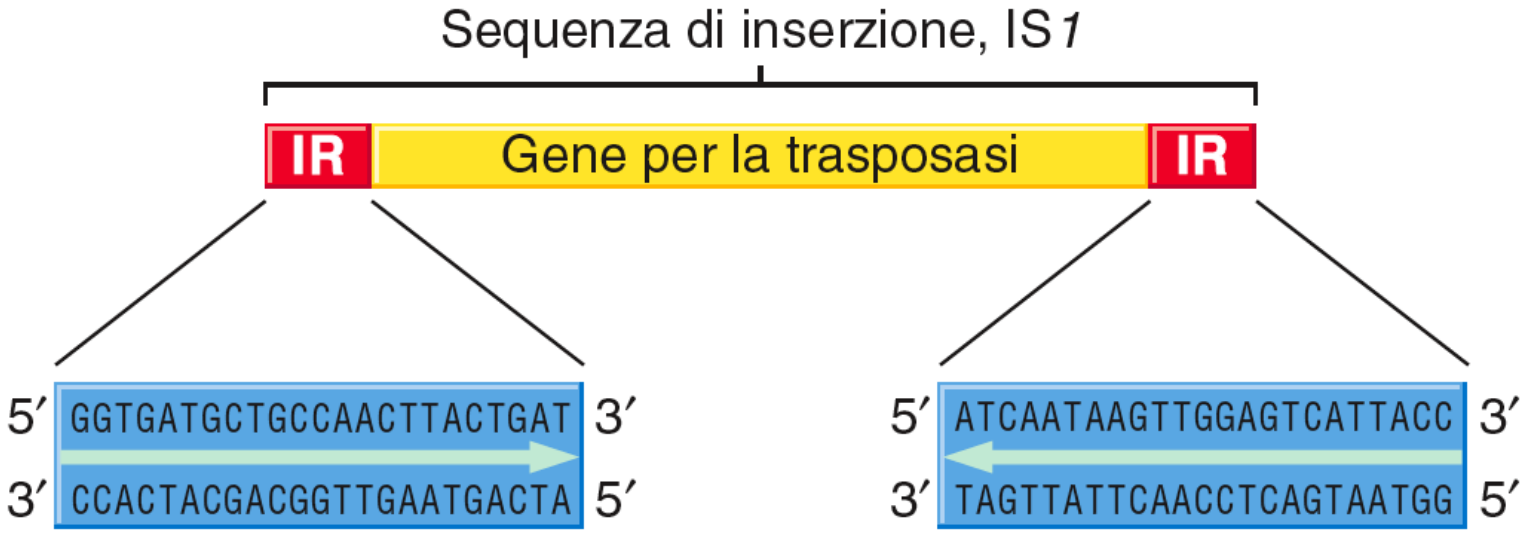


- **Tn 10, un esempio di trasposone composto.**
- Gli elementi IS sono inseriti in direzioni opposte
- formano le ripetizioni invertite (IR). Ogni elemento IS contiene il gene per la trasposasi, ma solitamente una sola sequenza IS è funzionale,
- **Tn3 è un esempio di trasposone semplice.**
- Le brevi sequenze invertite non contengono il gene per la trasposasi.
- Al contrario, i trasposoni semplici codificano la propria trasposasi.
- La **resolvasi è una proteina che promuove la ricombinazione e rilassa la struttura superelicoidal**e aprendo i cointegrati.

Trasposoni batterici semplici (classe I): Sequenze di inserzione

Gli elementi mobili più semplici sono le sequenze di inserzione (elementi IS) di *Escherichia coli*

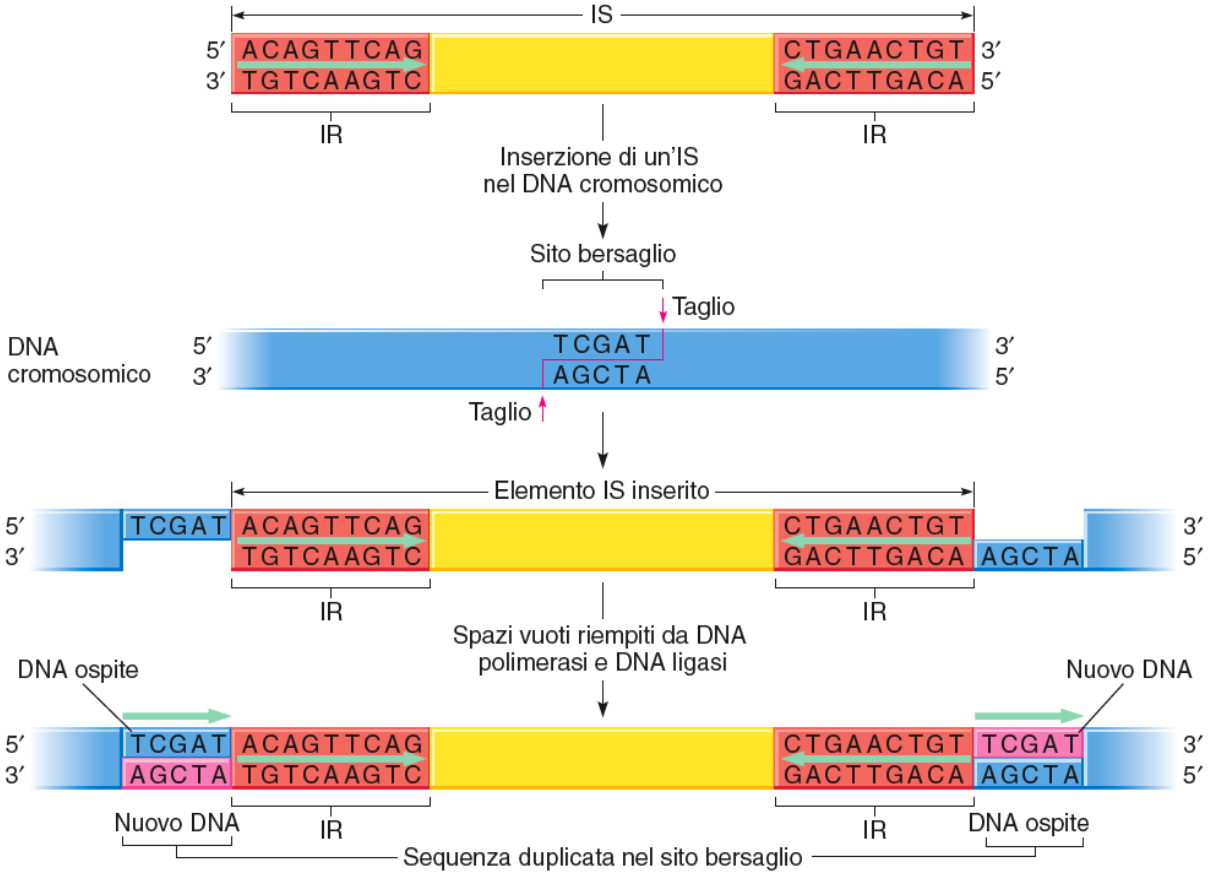
- **circa 800 bp,** presente in numerose forme (IS1, IS2…) e in molte copie nel genoma



- Sequenza di inserzione (IS) dell'elemento trasponibile IS7.
- L'elemento IS è lungo 768 coppie di basi e ha una ripetizione Invertita (IR) a ciascuna estremità.
- Sotto l'elemento sono indicate le sequenze delle ripetizioni invertite terminali (IR) di 23 copie di basi

"Taglia e incolla"

Gli elementi IS iniziano e terminano con sequenze (IR: 9-40 basi) ripetute e invertite



- In seguito all'evento di integrazione, il sito di taglio si duplica e produce ripetizioni che rappresentano un bersaglio diretto.
- In questo modo un elemento IS integrato è caratterizzato dalle proprie sequenze terminali ripetute invertite (IR), fiancheggiate dalle sequenze ripetute dirette del bersaglio.
- L'integrazione comporta la produzione di tagli sfalsati nel sito bersaglio dell'ospite. Dopo l'inserimento dell'IS gli spazi vuoti vengono riempiti per azione della DNA polimerasi e della DNA ligasi. (NB: le sequenze di basi delle IR hanno solo uno scopo illustrativo e non sono uguali a quelle reali né nell'ordine né nella lunghezza).

"Taglia e incolla"

Alcuni elementi IS osservati nei procarioti

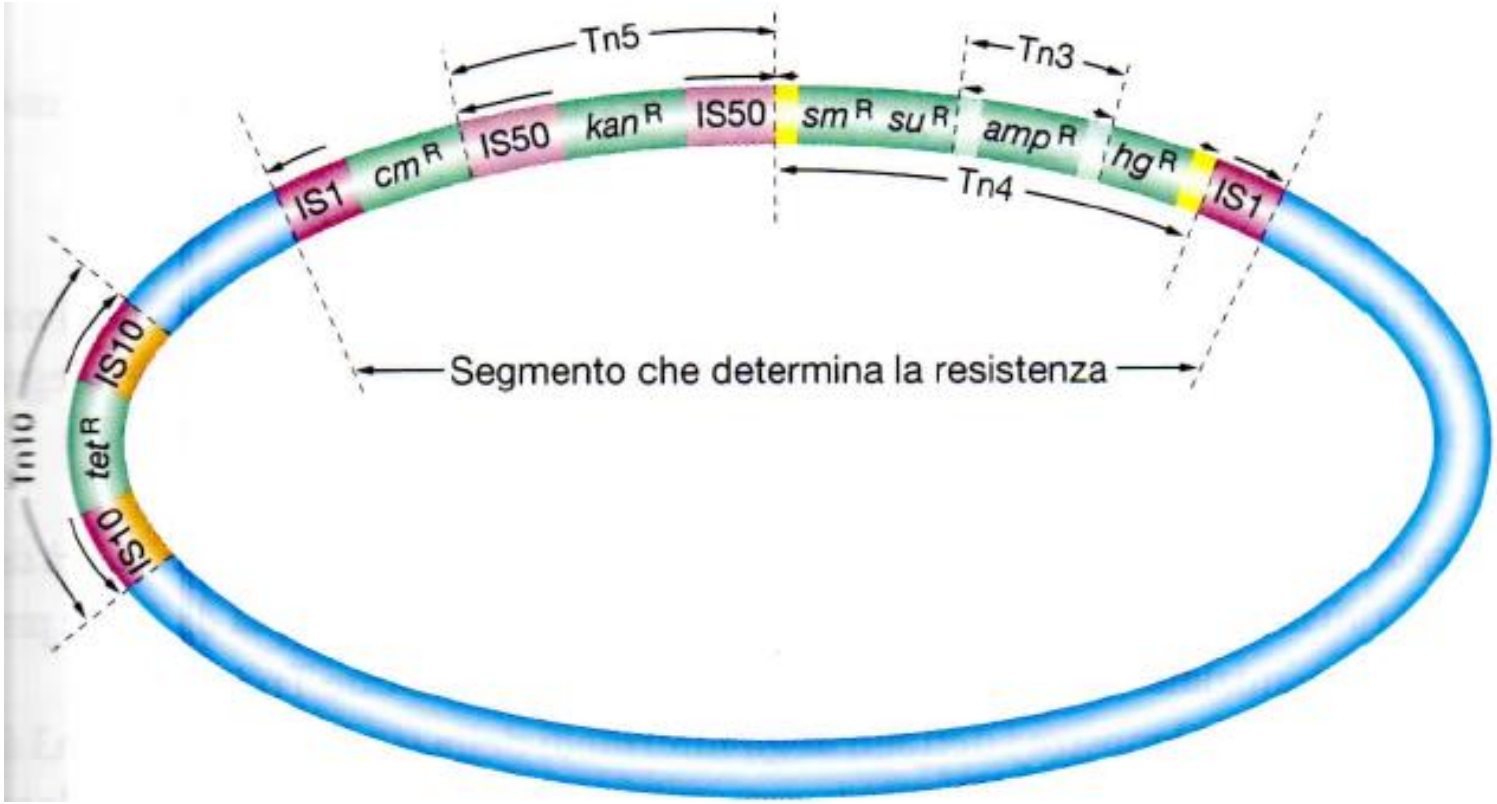
20-1 TABLE Prokaryotic Insertion Elements

Insertion sequence	Normal occurrence In *E. coli*	Length (bp)	Inverted repeat* (bp)
IS1	5–8 copies on chromosome	768	18/23
IS2	5 copies on chromosome; 1 on F	1327	32/41
IS3	5 copies on chromosome; 2 on F	1400	32/38
IS4	1 or 2 copies on chromosome	1400	16/18
IS5	Unknown	1250	Short
γ-δ (TN1000)	1 or more copies on chromosome; 1 on F	5700	35
pSC101 segment	On plasmid pSC101	200	30/36

* Fraction of base pairs; for example, 18 of 23 bp, and so forth.
Source: M. P. Calos and J. H. Miller, *Cell* 20, 1980, 579–595.

"Taglia e incolla"

Un fattore R può contenere diversi trasposoni che contengono geni che conferiscono resistenza

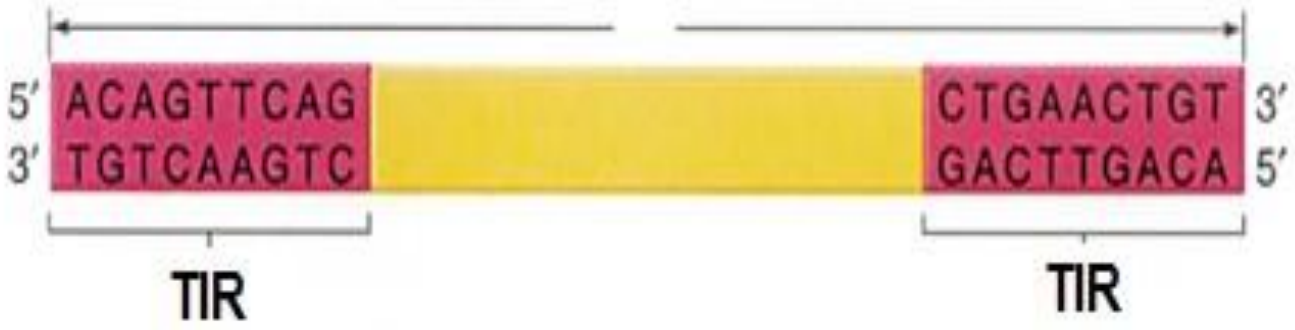


Disegno schematico di un plasmide che contiene diverse inserzioni di trasposoni semplici e composti che contengono geni che conferiscono resistenza agli antibiotici. La sequenza del plasmide è quella in blu.
Sono mostrati i geni che conferiscono la resistenza ai seguenti antibiotici:
tetraciclina (tet), kanamicina (kanR), streptomicina (smR), sulfamide (suR), ampicillina (ampR), mercurio (hgR). Il segmento che determina la resistenza si muove come un cluster di geni. Tn3 è all'interno di Tn4. Ogni trasposone si trasferisce indipendentemente

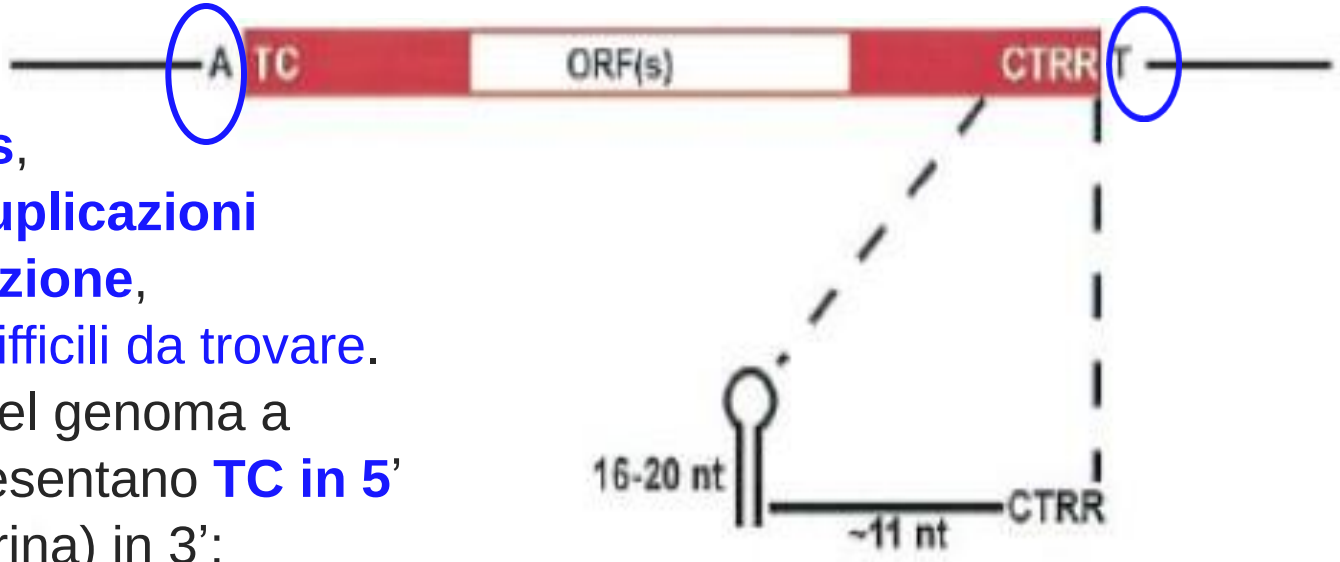
Altri trasposoni di Classe II
MITE: Miniature Inverted repeat Transposable Elements

- **Trasposoni a DNA non autonomi**, lunghi da poche decine a poche centinaia di pb.

- A volte sono molto ripetuti, per esempio la famiglia ***Stowaway*** di riso

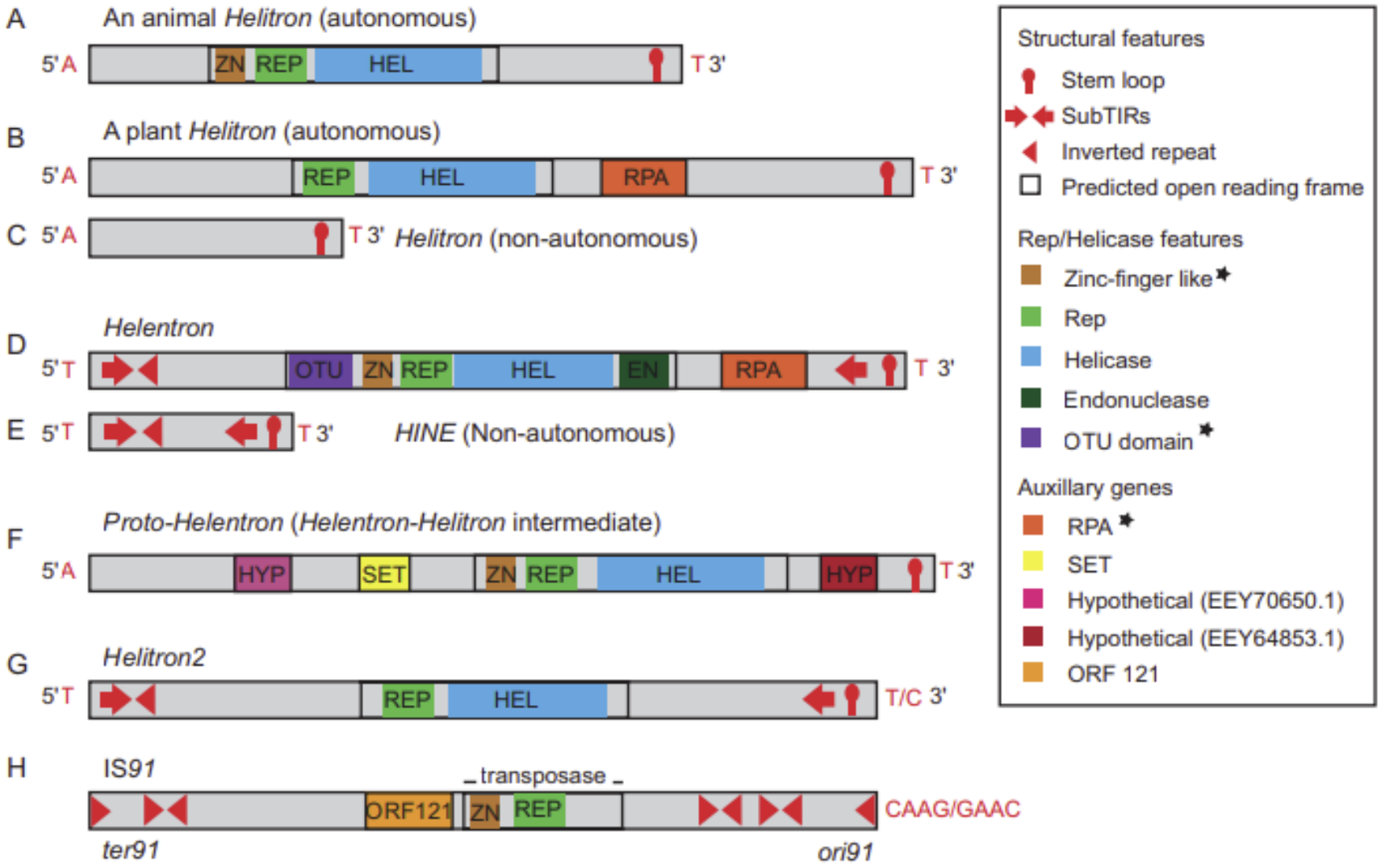


Altri trasposoni di Classe II: gli Helitron

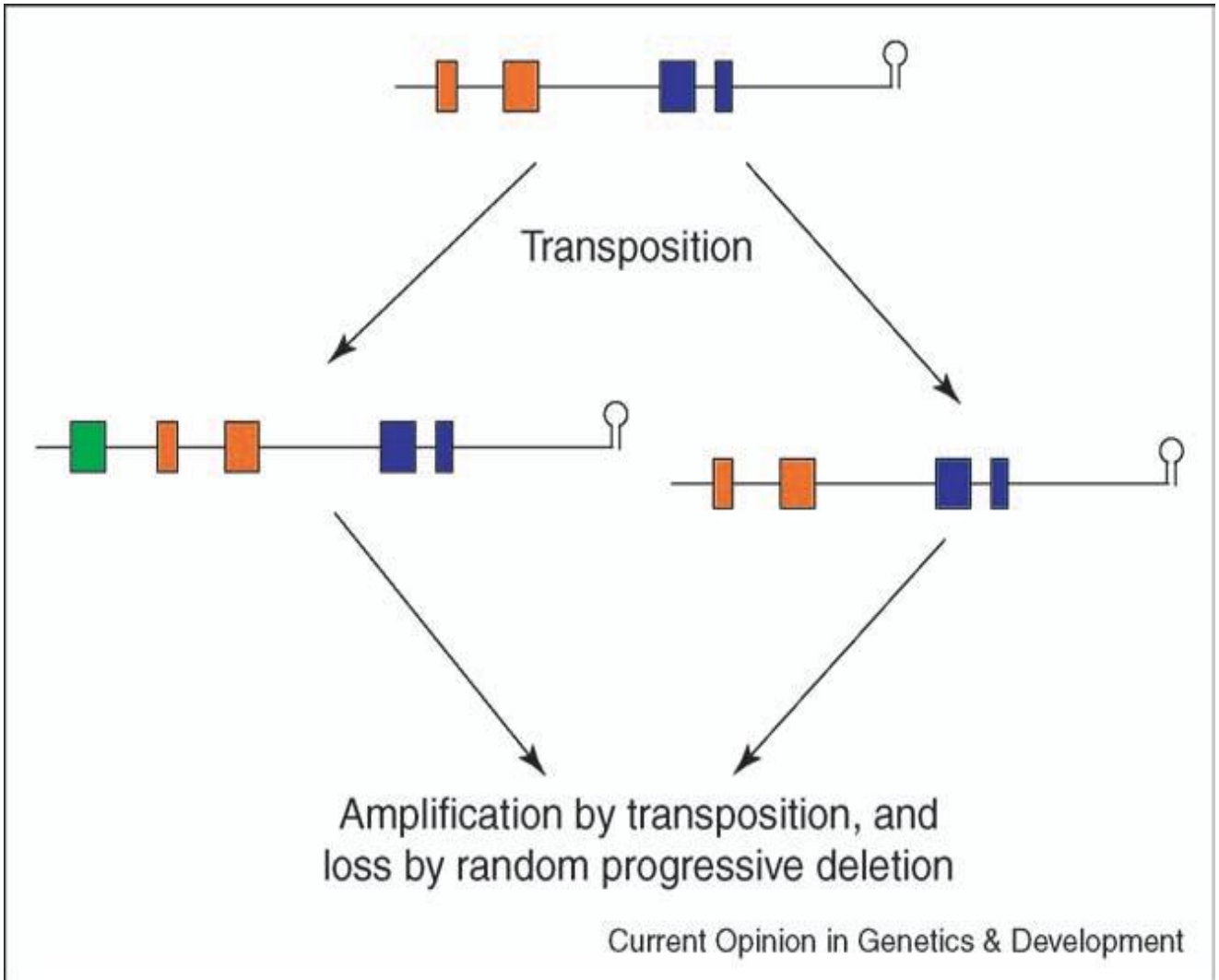


- **Non hanno TIRs**,
- **non causano duplicazioni nel sito di inserzione**,
- quindi sono difficili da trovare.
- Si inseriscono nel genoma a livello di **AT,** presentano **TC in 5**’ e **CTRR** (R=purina) in 3’;
- in 3’c’è una **sequenza palindromica** con basi appaiate e un loop intermedio di 2-4 bp non appaiate.
- Codificano **proteine iniziatrici della replicazione**, **elicasi e RPA** (replication protein A)-like, una proteina che lega il DNA a singola elica durante la replicazione.
- **Basso numero di copie** di elementi individuali. Molti Helitron non sono autonomi
- Meccanismo di trasposizione “**rolling-circle”**, diverso da quello degli altri trasposoni a DNA:
- Spesso catturano sequenze geniche
- giocano un ruolo importanti dal punto di vista evolutivo

Structure and coding capacity of canonical animal and plant Helitrons, Helentrons, Proto-Helentron, Helitron2 and IS91



- Come per i MULEs, **gli elitroni sembrano in grado di catturare brevi sequenze geniche o frammenti** di esse (“exon shuffling”) nello stesso orientamento delle ORFs dell’elitrone.
- Splicing corretto e formazione di NUOVI GENI!!!



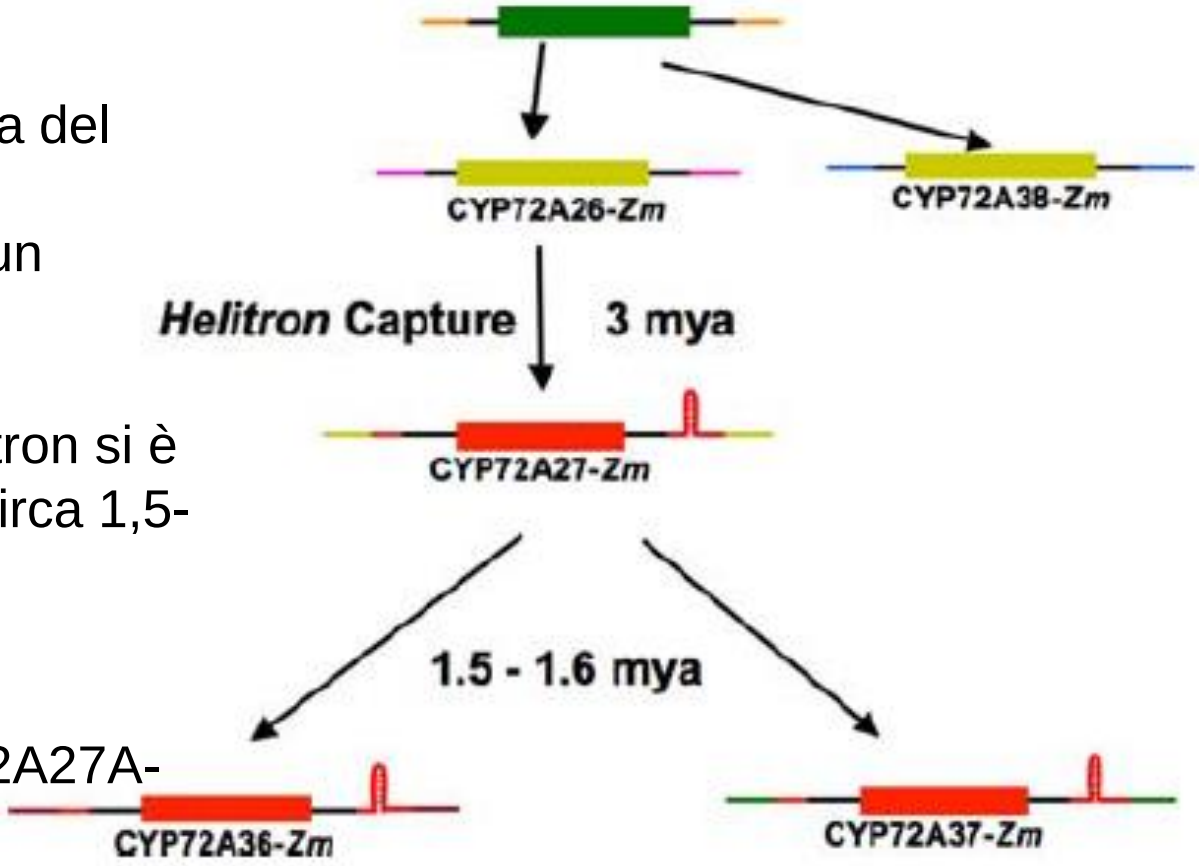
Helitron hanno mediato l'amplificazione del gene P450 in mais

- Il progenitore del gene del mais P450 duplicato in CYP72A26-Zm e CYP72A38-Zm.

- Una copia quasi completa del gene CYP72A26AZm gene è stato catturato da un Helitron circa 3 mln anni fa.

- Il gene catturato da Helitron si è poi duplicato due volte, circa 1,5-1,6 milioni di anni fa.

- Le denominazioni CYP72A27A-Zm, CYP72A27B-Zm e CYP72A27CZm sono state assegnate arbitrariamente



Modello di DNA di riempimento e ricombinazione sito-specifica modello di cattura genica

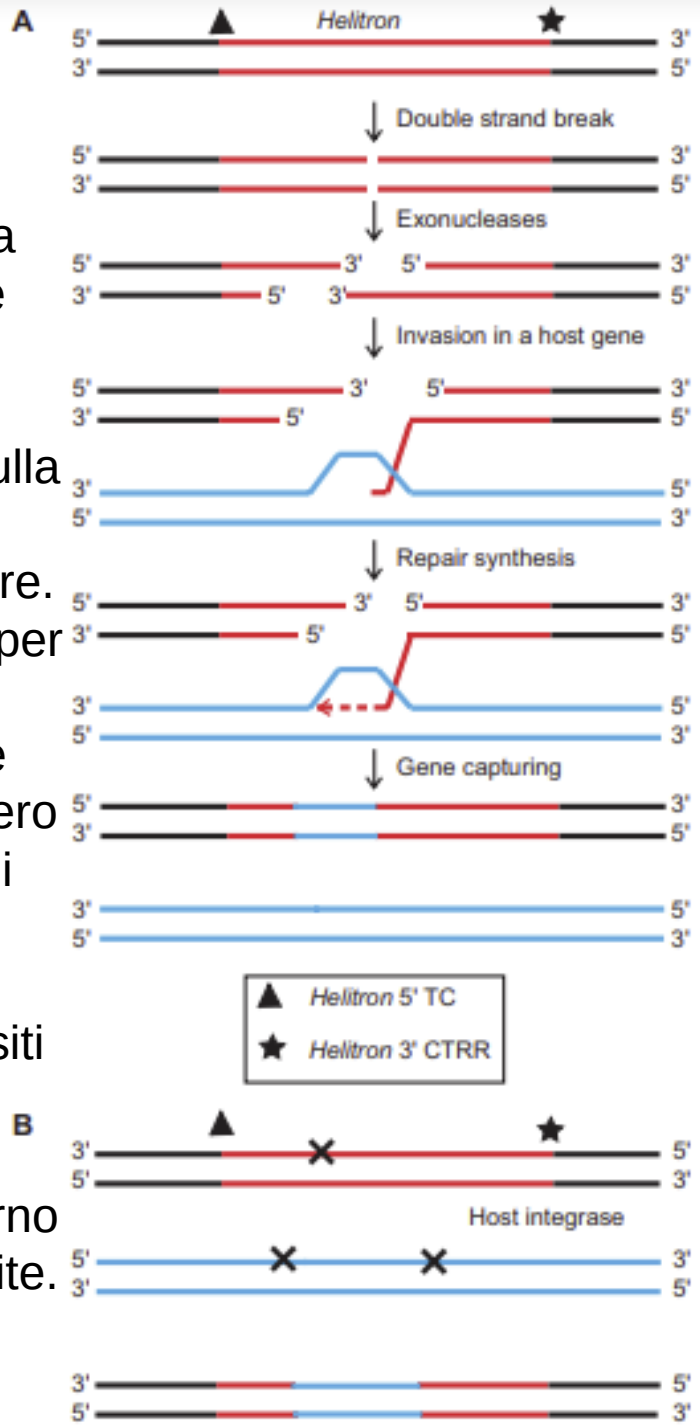
A. Modello di DNA di riempimento Quando si verifica una rottura del doppio filamento nel DNA dell'accettore (Helitron) (linea rossa), l'esonucleasi dell'ospite crea sporgenze di 3′ a singolo filamento (ss).

- Il 3 'ssDNA libero si ricottura al DNA del donatore sulla base della microomologia innescando la sintesi di nuovo DNA, che poi si riassocia al DNA dell'accettore.

Il nuovo DNA acquisito dal donatore funge da stampo per l'altro filamento.

- Quindi, l'Helitron ora contiene sequenze dell'ospite provenienti da una posizione casuale, che potrebbero essere di origine genica o non genica, a seconda di quale regione dell'ospite è stata utilizzata per la riparazione.

(**B) Modello di ricombinazione specifico del sito**. I siti di ricombinazione sono contrassegnati da croci. La cattura della sequenza ospite da parte dell'Helitron richiederebbe tre eventi di ricombinazione, uno all'interno dell'Helitron e due che fiancheggiano la sequenza ospite. Poiché gli Helitron non codificano l'integrasi, per la cattura viene utilizzata un'integrasi dell'ospite. :



- Probabilmente il **basso numero di copie** di MULEs ed elitroni è dovuto al fatto che **sono prontamente silenziati**
  - non hanno modo di amplificarsi e raggiungere un elevato numero di copie.
- Il fatto di
  - portare frammenti genici
  - essere espressi,
  - fa sì che gli **RNA chimerici prodotti** servano alla **regolazione epigenetica** (silenziamento) di loro stessi e dei geni intatti da cui hanno acquisito i frammenti.
- Inoltre se, nel corso dell'evoluzione, i geni chimerici prodotti da tali trasposoni non determinano un vantaggio evolutivo per la pianta ospite, essi sono soggetti a mutazioni e delezioni che portano alla loro inattivazione e/o rimozione nell'arco di pochi milioni di anni.

Classe I: Trasposoni (o) Retrotrasposoni

- anche i retrotrasposoni si muovono con un meccanismo di **"copia e incolla".**
- ma contrariamente ai trasposoni , la **copia è fatta di RNA,** non di DNA.

I retrotrasposoni hanno caratteristiche in comune con i retrovirus

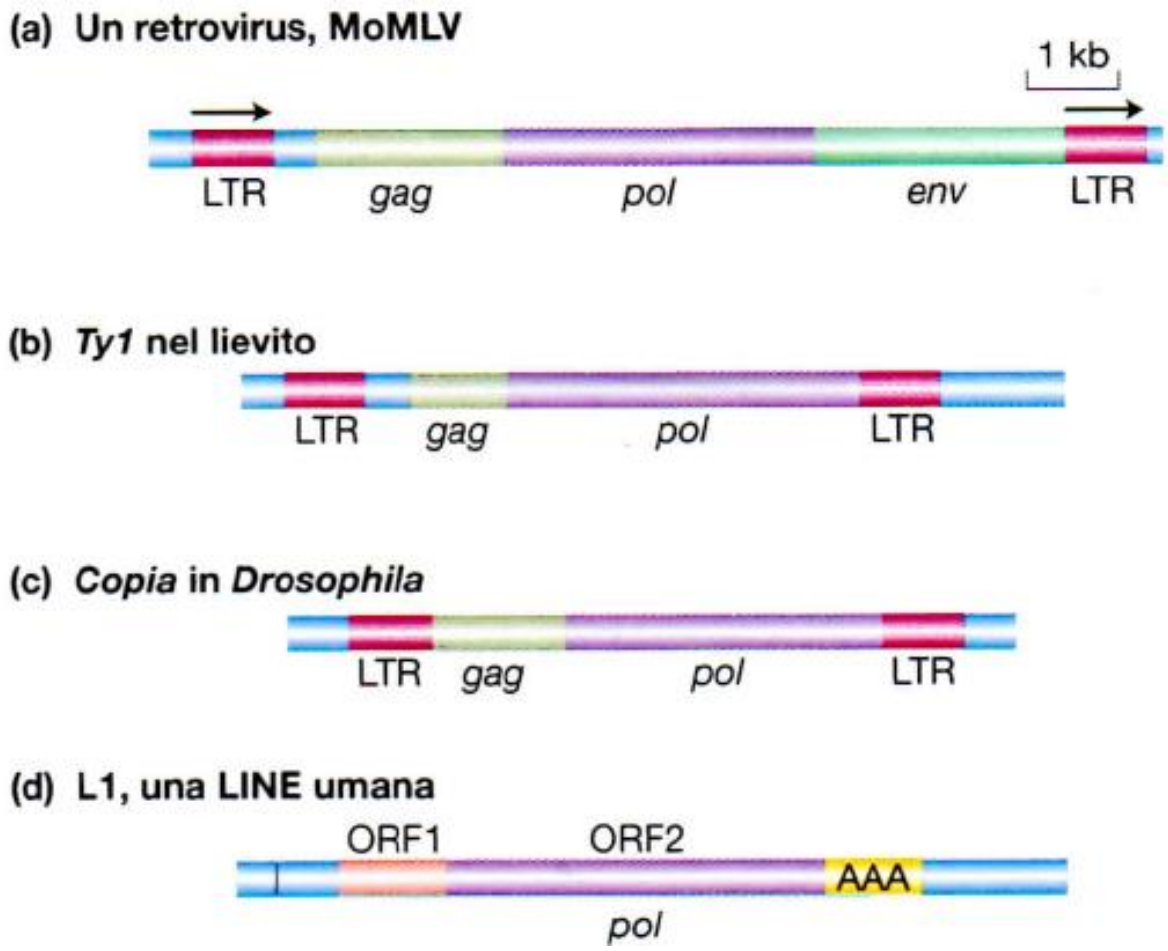
Confronto della struttura di un retrovirus con quella dei trasposoni trovati negli eucarioti.

(a) Un retrovirus, virus Moloney della leucemia nel topo (MoMLV).

(b) Un retrotrasposone, *Tyì*, del lievito,

(c) Un retrotrasposone, *copia,* di *Drosophila.*

d) Lunghe sequenze disperse (LINE) nell'uomo.



Abbreviazioni: LTR, lunghe ripetizioni terminali; ORF, modulo di lettura aperto

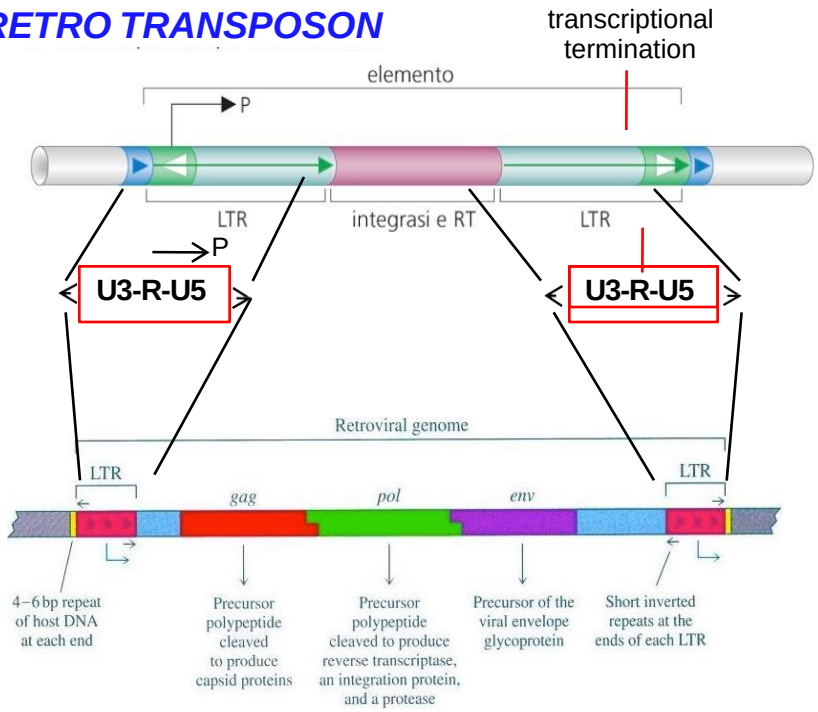
La proteina prodotta dal gene gag ha un ruolo nella maturazione dell'RNA genomico,→ **codifica per il capside** e protegge il sistema durante la retrotrascrizione

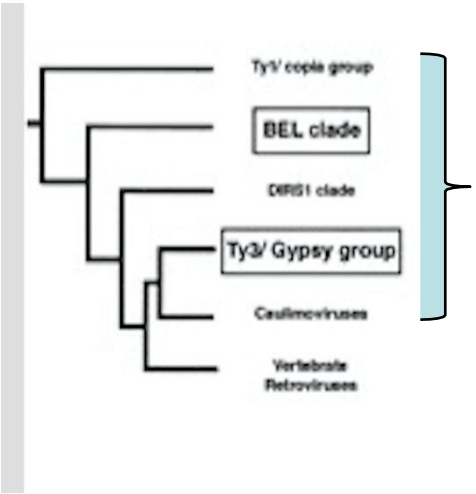
il *gene* ***pol*** codifica tutte le più importanti **trascrittasi inverse,**

- il gene *env* codifica la proteina strutturale che avvolge il virus.

Un'ipotesi corrente propone che i retrovirus si siano evoluti dai retrotrasposoni

RETRO TRANSPOSON



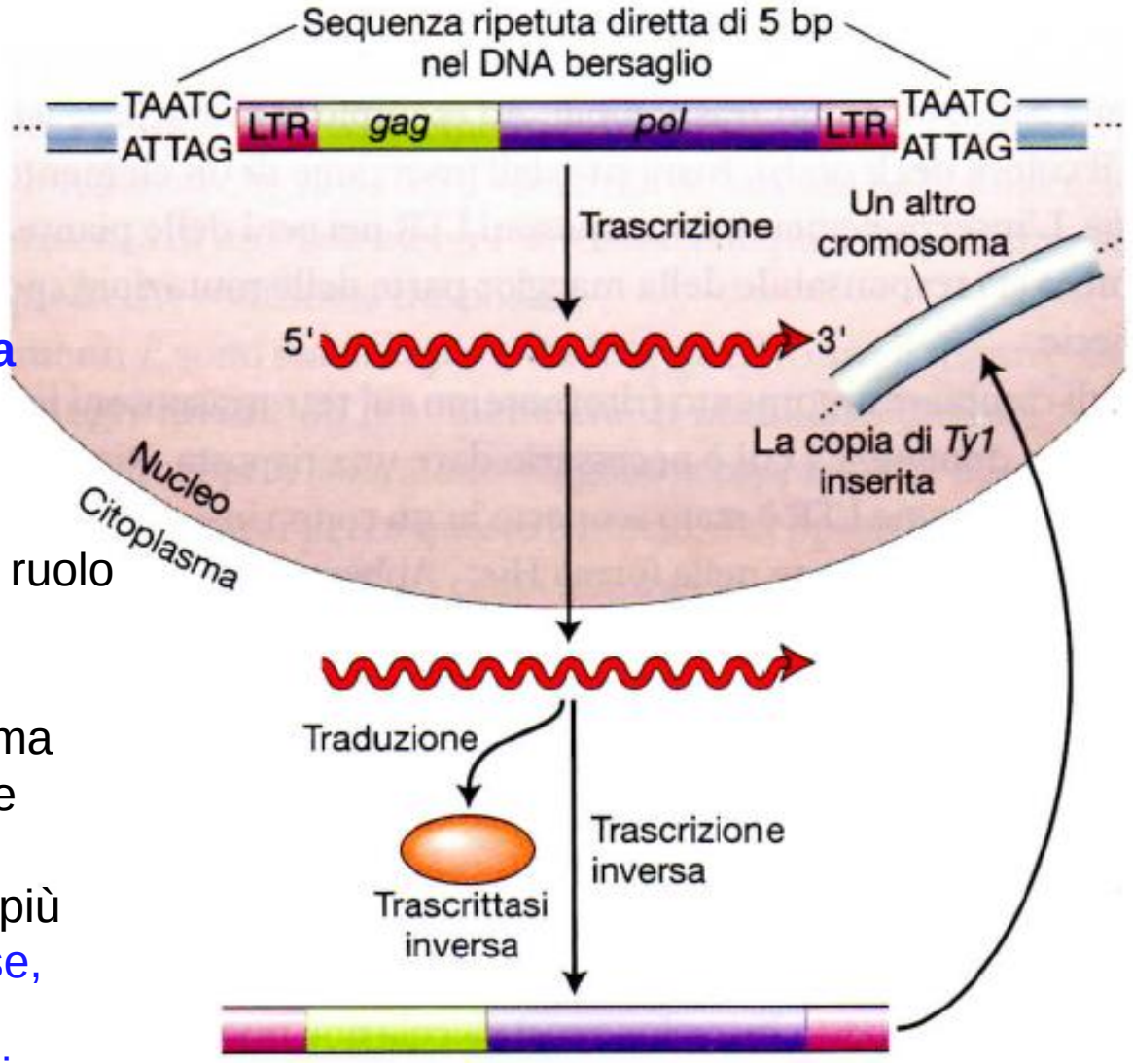


RETROVIRUS

- SIR= short inverted repeats
  PBS = primer binding site
  U3 = sequenza terminale unica al 3'
  R = sequenze terminali ridondanti ripetizione
  U5 = estremità unica al 5'

Un retrotrasposone viene trasposto attraverso un intermedio a RNA

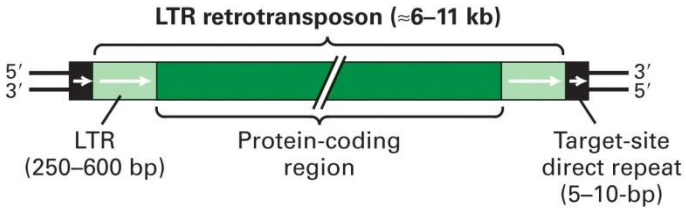
- Un trascritto di RNA di un retrotrasposone subisce la trascrizione inversa in DNA, a opera di una trascrittasi inversa codificata dal retrotrasposone.
- **La copia di DNA è inserita in un nuovo locus del genoma.**

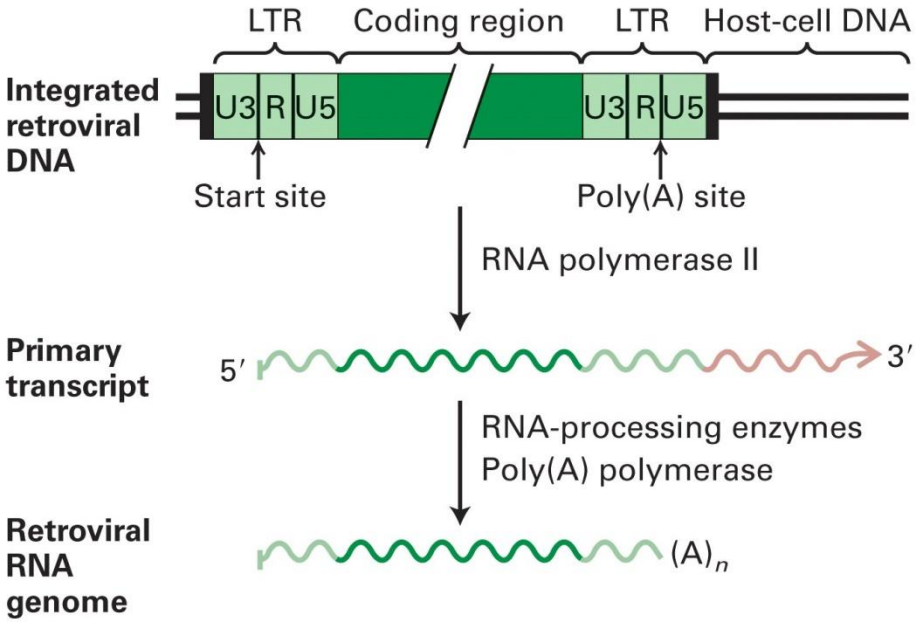


- Il gene gag: proteina gag→ ruolo nella maturazione dell'RNA genomico,→ codifica per il capside e protegge il sistema durante la retrotrascrizione
- il *gene pol* codifica tutte le più importanti trascrittasi inverse,
- il gene *env* codifica la proteina strutturale che avvolge il virus.

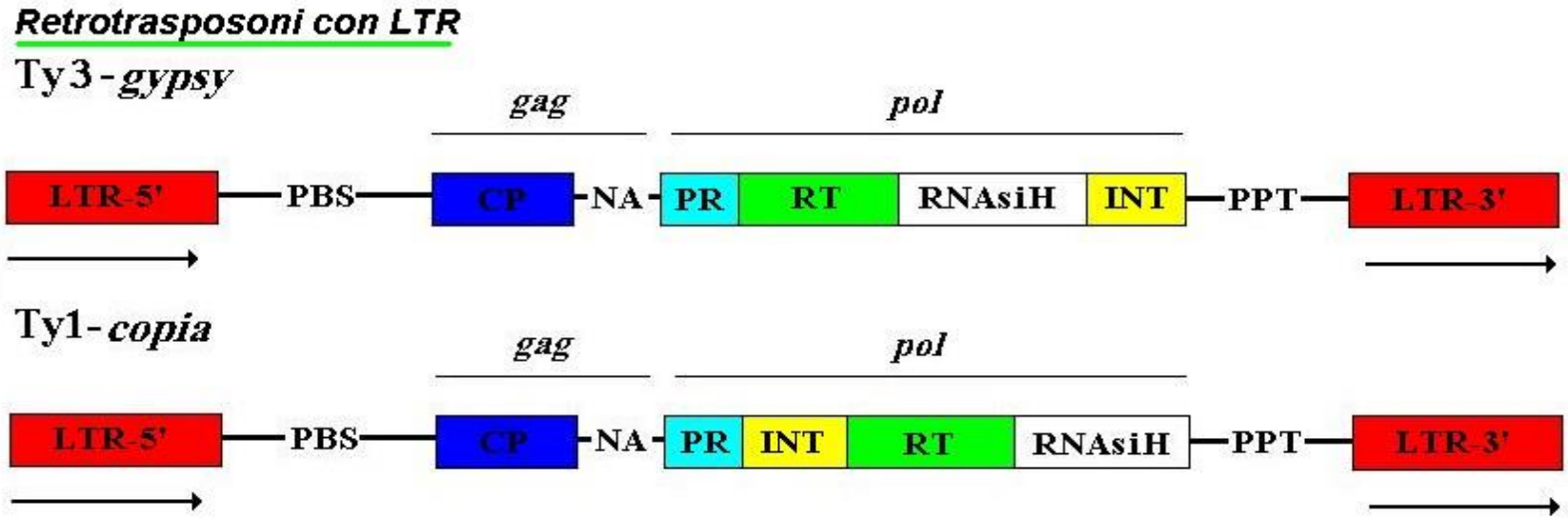
A. Retrotrasposoni con LTR

- Alcuni contengono **long terminal repeats** (**LTR, 250-600 bp**)
- Codificano le proteine tipiche dei retrovirus, eccetto quelle dell'envelope.
- Codificano reverse transcriptase e integrasi
- Nell'uomo la maggior parte deriva dal retrovirus endogeno ERV





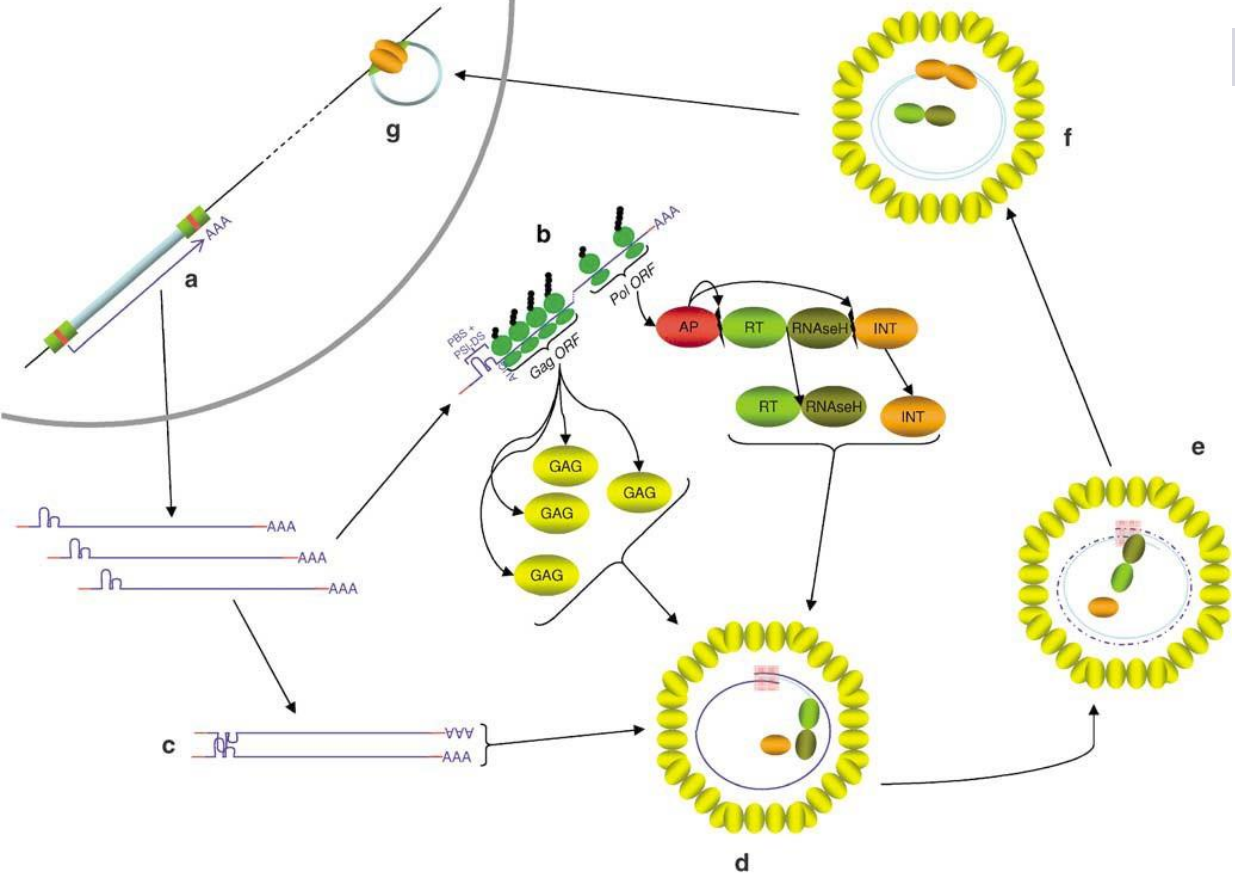
RETROTRASPOSONI con LTR:
2 superfamiglie, *Gypsy* e *Copia*



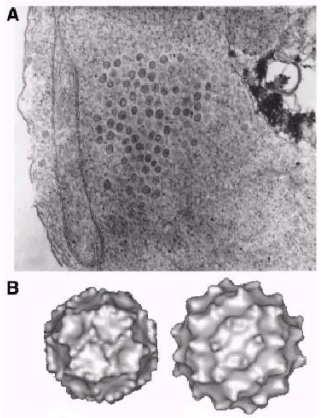
Dimensioni: 4.000 -15.000 pb

- **LTR long terminal repeats, ripetizioni dirette che fiancheggiano l'elemento da entrambe le estremità. Cominciano tipicamente con TG e finiscono con -CA**
- **gag: (contiene un gene per una proteina del capside (CP) e un sito di legame per gli ac. nucleici (NA)**
- **pol: (poliproteina con un dominio proteasi (PR), uno retrotrascrittasi (RT), uno RNAsiH, uno integrasi (INT))**
- **PBS: Primer Binding Site – sequenza di 18 bp complementare alla coda 3'dei tRNA.**
- **PPT: – Poly Purine Trait – tratto di 11-15 bp ricco in purine (A, G). PBS e PPT sono importanti per la retrotrascrizione.**

Ciclo teorico dei RE con LTR



Yeast retrotransposon virus-like particles



- La RNA pol dell'ospite (pianta) si lega al promotore situato sull'LTR in 5' e trascrive il RE (a).
- L'RNA è tradotto in GAG e una Poliproteina e la proteasi frammenta in proteine funzionanti (RT, RNAsiH, INT)(b),

  dimerizzazione dell'RNA (c), impacchettamento dell'RNA (d).
- La GAGs polimerizza per formare Virus Like Protein in cui avviene la sintesi del cDNA con l'ausilio di RT e RNAsiH (e,f).

Completamento della sintesi di cDNA a doppio filamento e legame di INT alle LTR (f), rottura del doppio filamento del DNA ospite e inserimento della nuova copia nel genoma (g).

La formazione del cDNA dei retrotrasposoni con LTR

A) Legame del tRNA dell'ospite alla regione PBS dell'RNA del RE e sintesi filamento (-) fino alla fine di r del 5'LTR. L'RNAseH degrada r e U5 dell'LTR 5'.

B) Appaiamento del frammento (-) di nuova sintesi all'LTR 3' dell'RNA.

C)Sintesi del filamento (-) fino al PBS. L'RNAseH degrada l'RNA (tranne PPT).

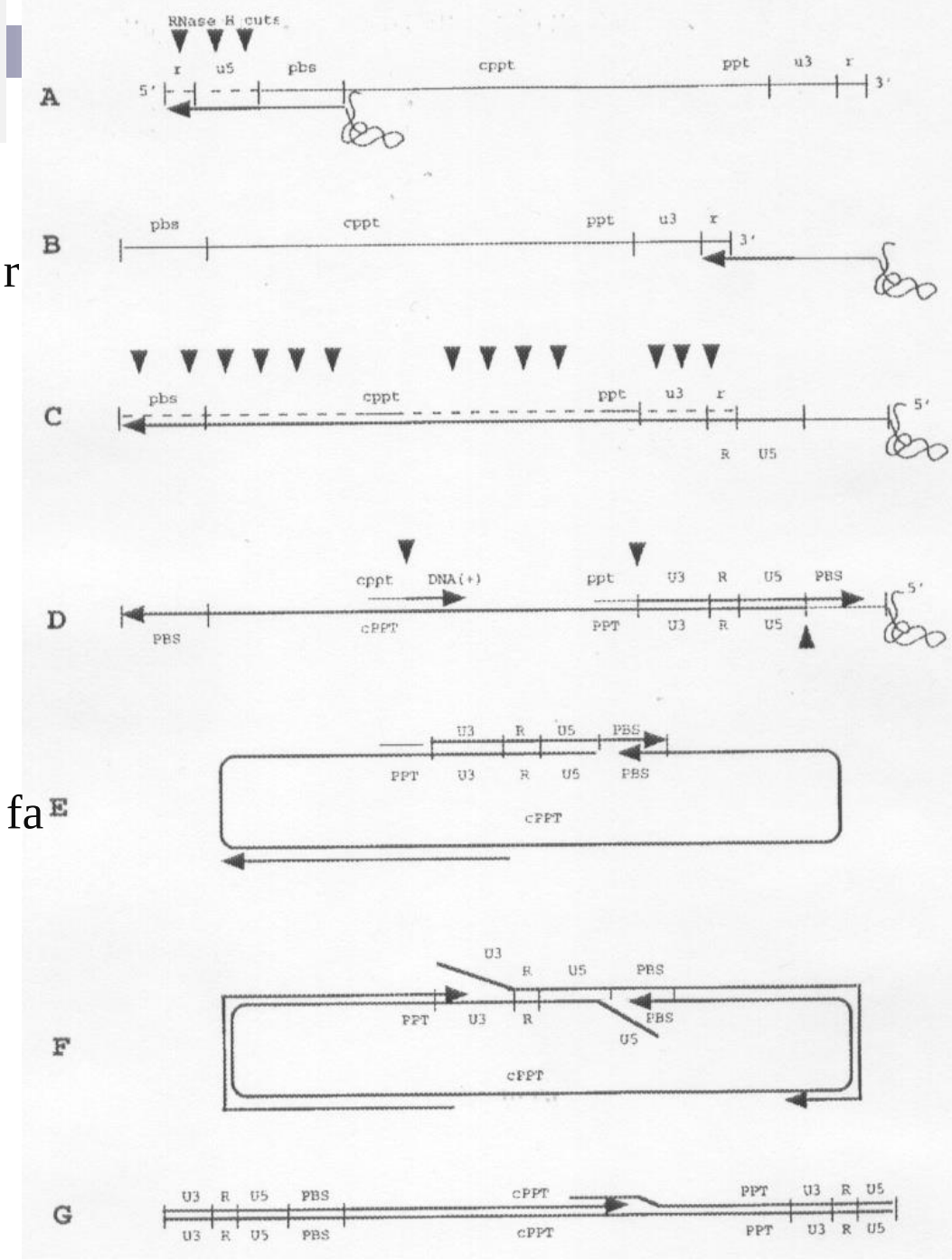
D)Sintesi del filamento (+) dal PPT che fa da inneso. Si replica anche il PBS.

E) Appaiamento PBS-PBS.

F) RT completa i filamenti (+) e (-).

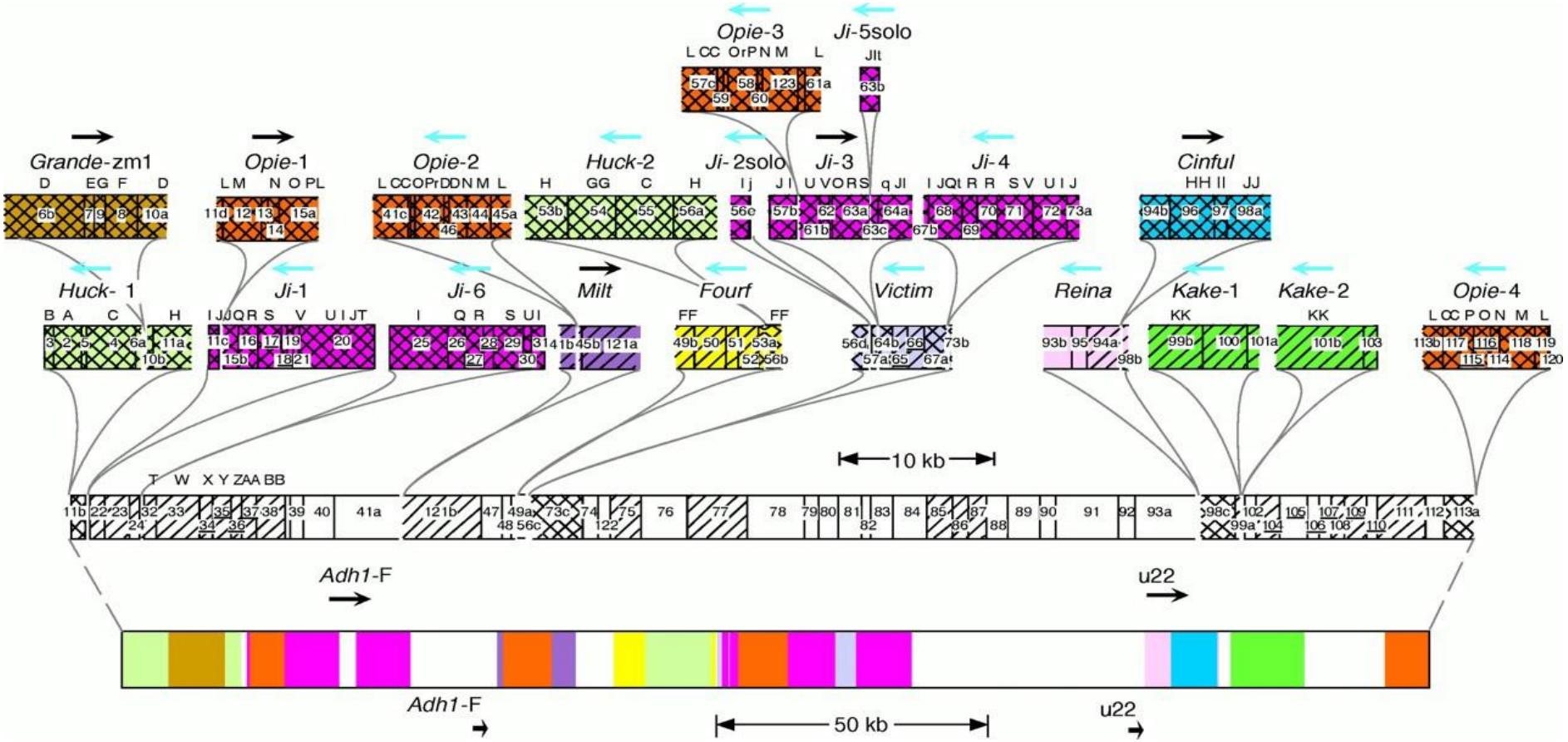
G) Il retroelemento a DNA è completo.

E' più lungo dell'RNA stampo per la duplicazione di U3 in 3' e U5 in 5'.



I retrotrasposoni possono essere raggruppati e inseriti uno dentro l'altro (*nested*) in un sito cromosomico, soprattutto in specie con genoma grande

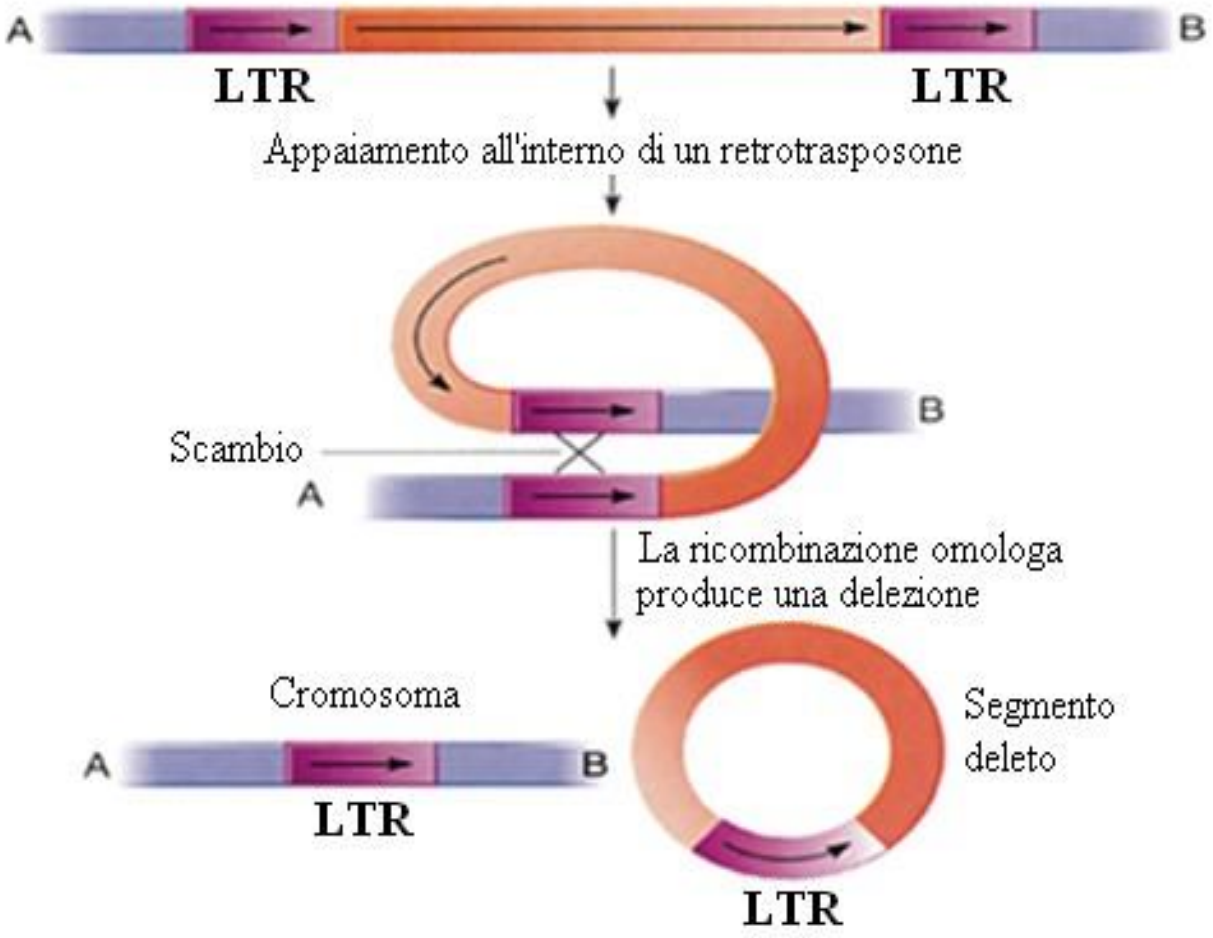
Es. Locus *Adh1* di mais



SOLO-LTR, come si sono formate

- La ricombinazione tra due LTR di un retrotrasposone porta alla eliminazione della regione codificante e di una LTR

- Nel genoma dell'ospite rimane una singola LTR detta **solo-LTR**



B. Retrotrasposoni senza LTR

- Chiamati anche **retrotransposoni non virali.**
- Formano due classi:
  - **Long interspersed elements (LINE)** (6 kb), promuovono la loro mobilità e forniscono le proteine per la mobilità di SINE
  - **Short interspersed elements (SINE)** (300 bp)

Hanno sequenze simili ai geni: un promotore e poliA. Spesso si presentano come pseudogeni processati, senza il 5'

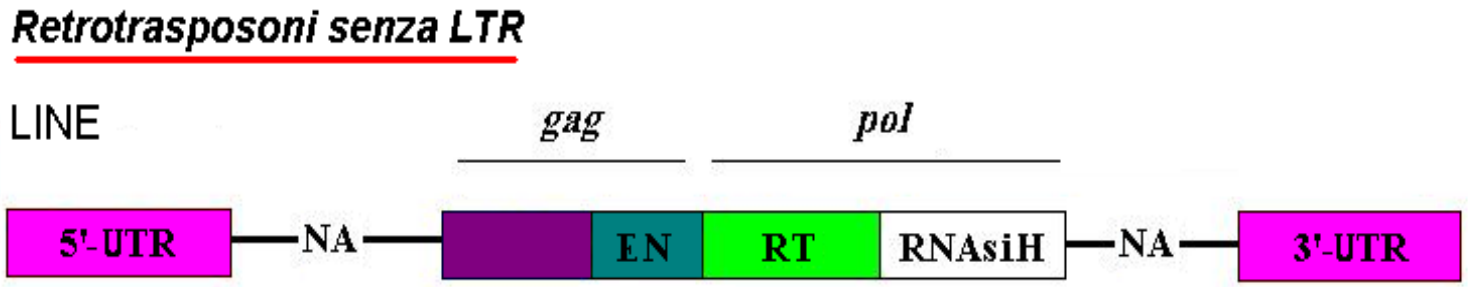
Elementi trasponibili nel genoma umano

Tipi di elementi trasponibili nel genoma umano

Elemento	Trasposizione	Struttura	Lunghezza	Numero di copie	Frazione del genoma
LINE	Autonoma		1–5 kb	20 000–40 000	21%
SINE	Non autonoma		100–300 bp	1 500 000	13%
Trasposoni a DNA	Autonoma		2–3 kb	300 000	3%
	Non autonoma		80–3000 bp		

RETROTRASPOSONI SENZA LTR

❑ LINE (Long Interspersed Elements)



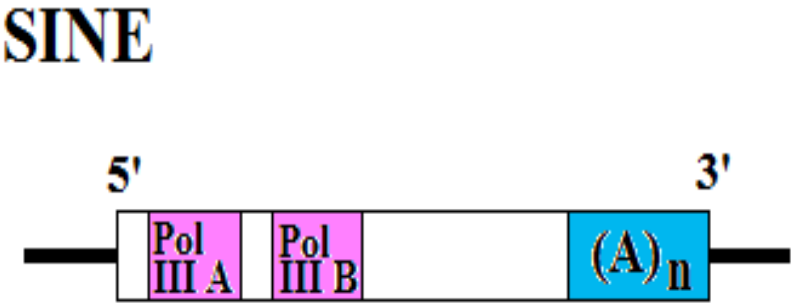
- **Dimensioni = 5000-8000 pb**
- Il gene ***gag*** dei LINE codifica anche una endonucleasi (EN) – Il gene ***pol*** contiene un dominio per una retrotrascrittasi (RT) e uno per l'RNAsiH
- Struttura simile ai retrotrasposoni con LTR ma mancano LTR, PBS e PPT

  Nelle piante non sono molto frequenti rispetto ai retro con LTR

- Molto numerosi nei **primati e nel topo**: la superfamiglia L1 costituisce il 17% di tutto il genoma dell'uomo

B. RETROTRASPOSONI SENZA LTR

➢ SINE (Short Iterspersed Elements)



- Dimensioni = **100-500 pb**
- Pol IIIA e Pol III B: promotori per l'RNA polimerasi III - (A)n : coda poli-A.
- Elementi non autonomi che derivano da trascritti della RNApol III che accidentalmente sono stati retrotrascritti in DNA e inseriti nel genoma.
- Nei mammiferi sono molto frequenti (es. la famiglia ***Alu* I** nel genoma umano :1,2 x 10^6 copie)

Inserzioni di elementi L1 e Alu in geni umani

(da Kazazian e Moran, 1998 Nat. Genetics 19, pp19--24)

L1

Due inserzioni indipendenti nel gene del fattore VIII di coagulazione dovute a copie incomplete (1988)

Una inserzione nel gene del fattore VIII di coagulazione emofilia

Tre nel gene DMD distrofia muscolare

Una nel gene APC cancro del colon (evento somatico)

Una nel gene della β-globina

Alu

Nel nel gene del fattore IX di coagulazione emofilia

Nel gene NF1 neurofibromatosi

Nel gene FGFR2 sindrome di Apert

Nel gene APC

Nei geni XLA e XSCID sindrome di immunodeficienza X-linked

Nel gene BCRA2 cancro del seno

altre sequenze comuni ripetute intervallate negli esseri umani

- LTR-containing retrotransposons
  - MaLR: mammalian, LTR retrotransposons
  - Endogenous retroviruses
  - MER4 (MEdium Reiterated repeat, family 4)
- Repeats that resemble DNA transposons
  - MER1 and MER2
  - Mariner repeats
  - Were active early in mammalian evolution but are now inactive

LTR and non-LTR retrotransposons appear to have contributed to mammalian brain evolution organization.

- This was reached by acting as sources of
- novel ncRNAs,
- proteins, enhancers,
- RNA regulatory sites
- sites for 3D genome organization.

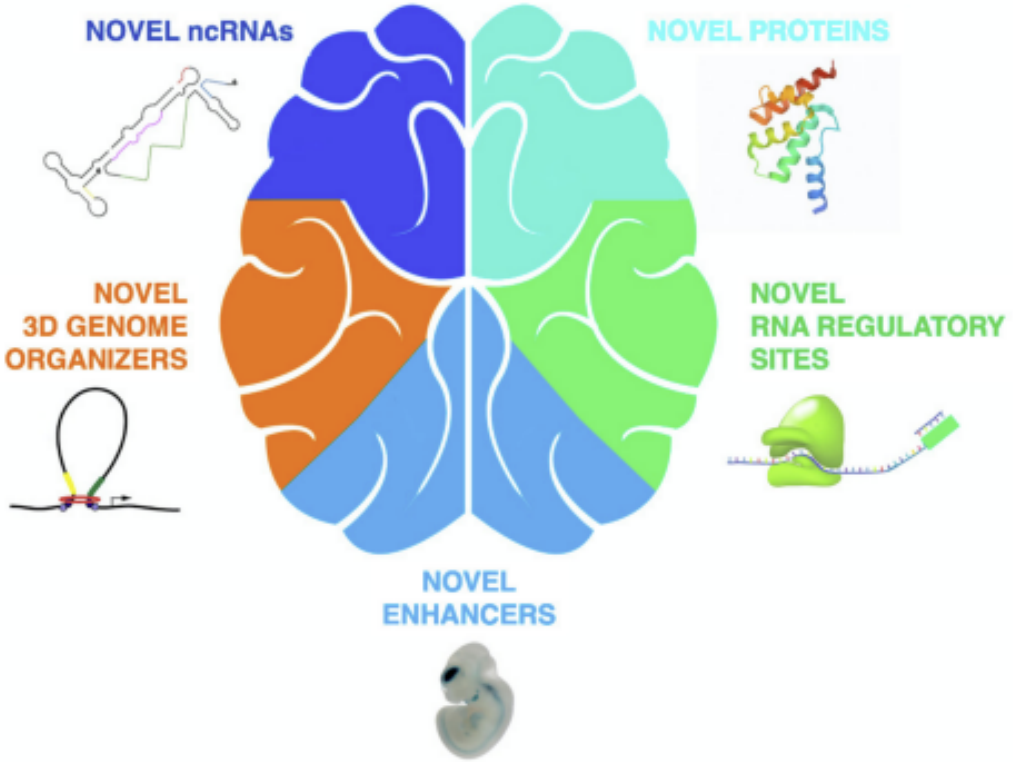


Figure 3. Summary of retrotransposon exaptations involved in brain evolution. Schematically recapitulated in the Figure are five major types of genomic novelty provided by RE exaptation that have been recognized to strongly affect brain evolution. Going clockwise from the left upper sector: REs can be a source of novel retrotransposon-derived ncRNAs (e.g., SINE-derived BC200 RNA); REs can be the source of novel proteins derived from retrotransposon (especially ERV) coding sequences; exonization of retrotransposon sequences (resulting in mRNAs or lncRNAs with embedded RE-derived sequences) can lead, for example, to the appearance of a new regulatory site (green box) within mRNA sequences, which can recruit miRNA, thereby affecting mRNA translation/stability; REs can provide new transcription TF binding sites, contributing to the birth of novel enhancers and altering the transcription of specific brain genes; REs can play a major role as 3D genome organizers, thereby strongly influencing the expression of brain-specific genes via changes in the 3D nuclear chromatin folding.

Ferrari et al. Life 2021, 11, 376. https://doi.org/10.3390/life11050

RIEPILOGO DELLE CLASSI DI TRASPOSONI

- **TRASPOSONI AUTONOMI** (con trasposasi)
- **NON AUTONOMI (**hanno perso trasposasi)
- **MITE** (Miniature Inverted repeat Transposable El.), poche cent. bp Helitron

- **RETROTRASPOSONI**
- CON LTR AUTONOMI (*Gypsy* e *Copia*)

NON AUTONOMI: - TRIM (Terminal Repeat In Miniature) > 4000bp

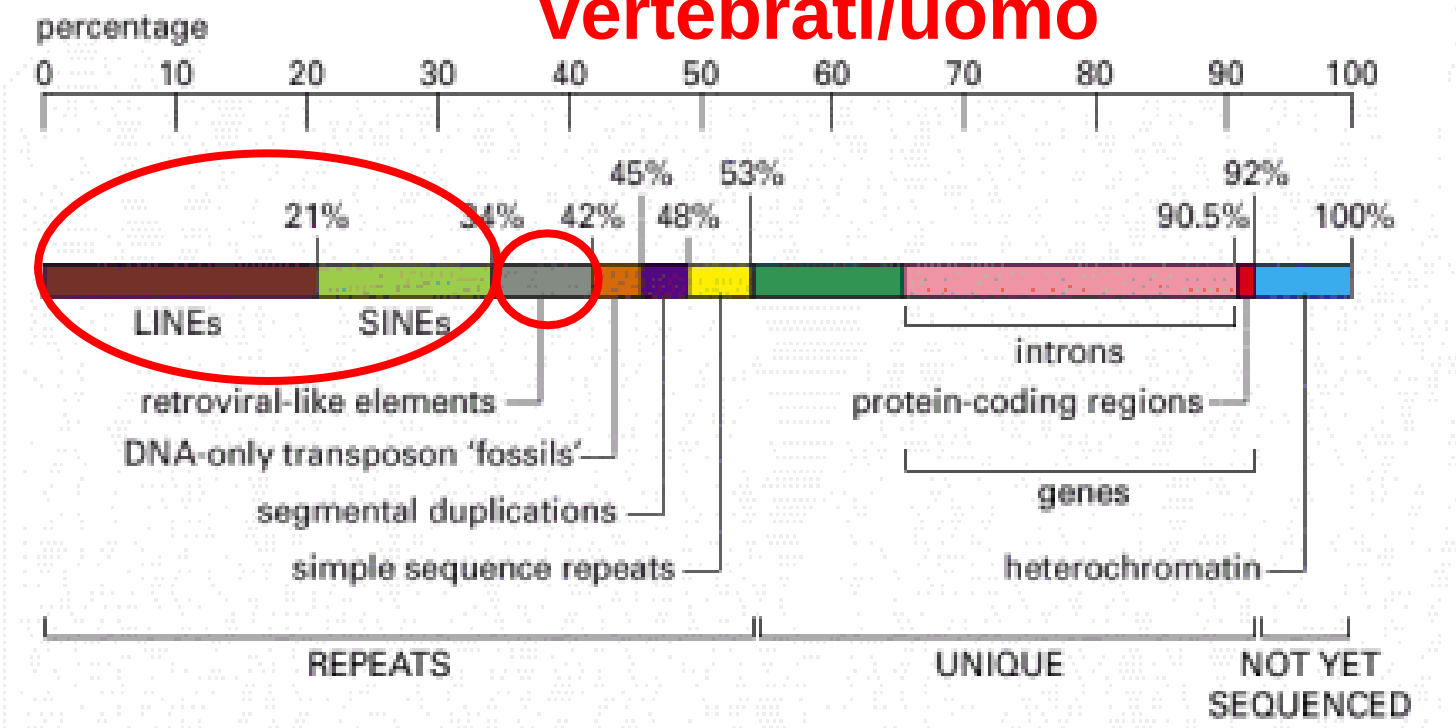
- LARD (LArge Retrotransposon Derivative) >4000bp

- SOLO LTR (dalla ricombinazione di due LTR, ne rimane una sola)

- SENZA LTR - **LINE** (Long Intersperse Element) 5-8000 bp -

SINE (Short Intersperse Element) 100-500 bp

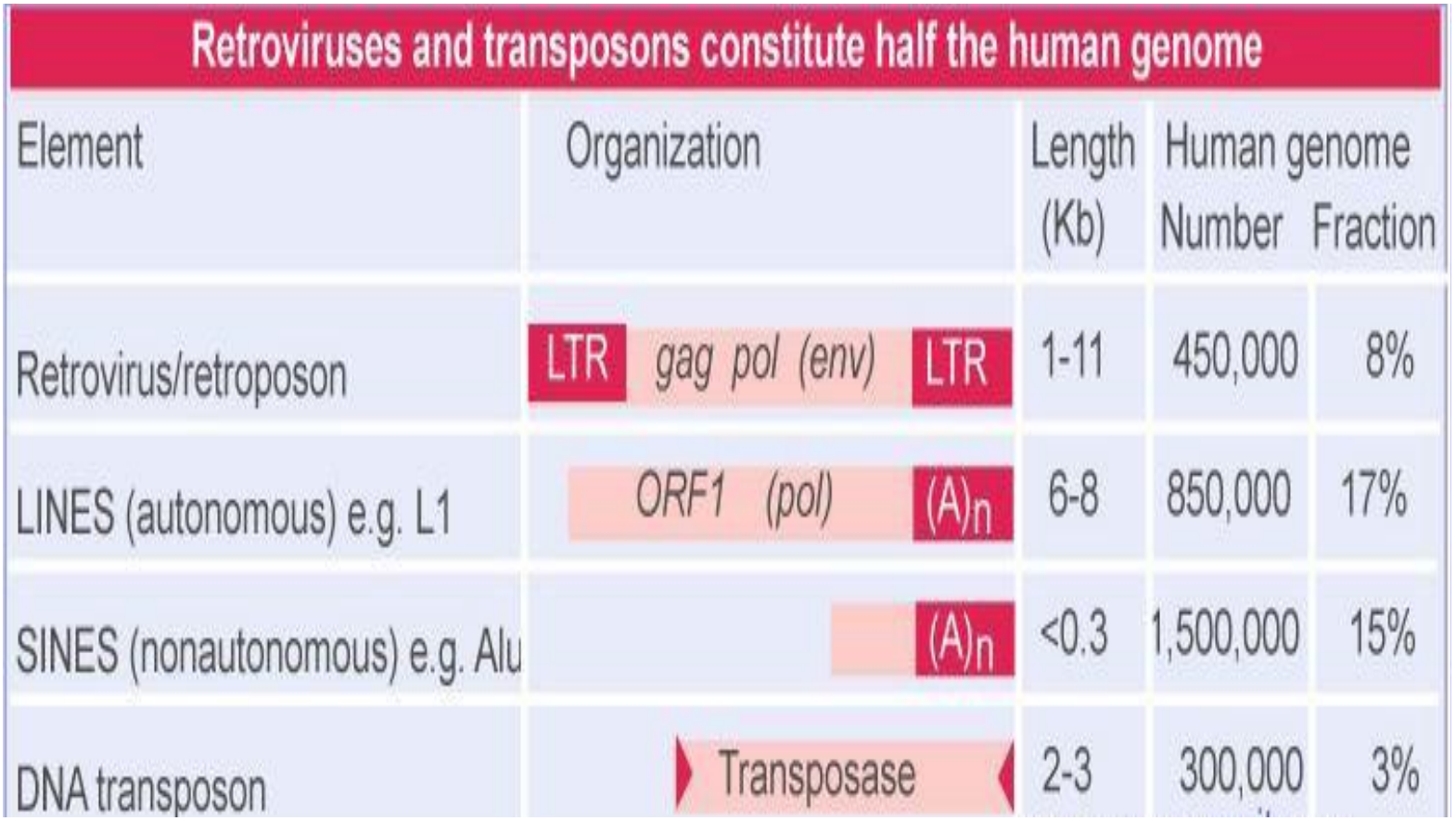
Retrotrasposoni con rilevanza per vertebrati/uomo



Representation of the nucleotide sequence content of the human genome.
LINE, SINE, retroviral-like elements, and DNA-only transposons are all mobile genetic elements that have multiplied in our genome by replicating themselves and inserting the new copies in different positions. Simple sequence repeats are short nucleotide sequences (less than 14 nucleotide pairs) that are repeated again and again for long stretches. Segmental duplications are large blocks of the genome (1000 200,000 nucleotide pairs) that
are present at two or more locations in the genome. Over half of the unique sequence consists of genes and the remainder is probably regulatory DNA. Most of the DNA present in heterochromatin, a specialized type of
chromatin that contains relatively few genes, has not yet been sequenced.

Watson et al., BIOLOGIA MOLECOLARE DEL GENE, 6/E, Zanichelli

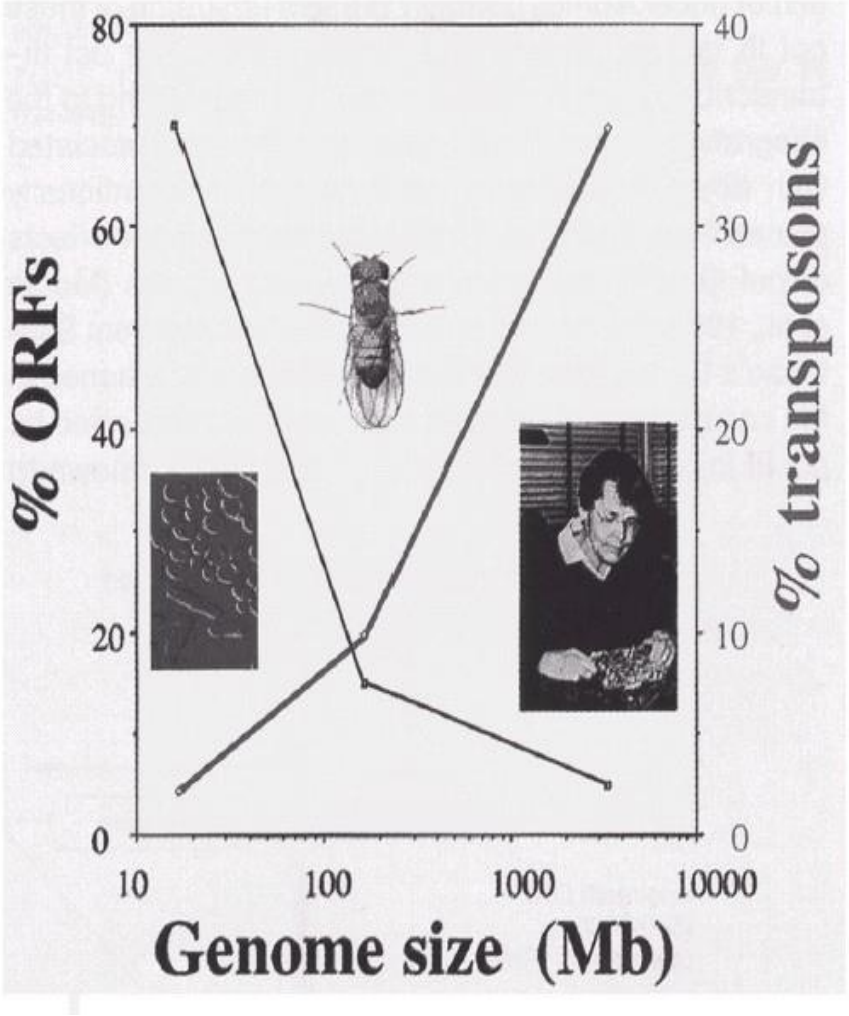
Costituiscono metà del genoma umano



Retroviruses and transposons constitute half the human genome

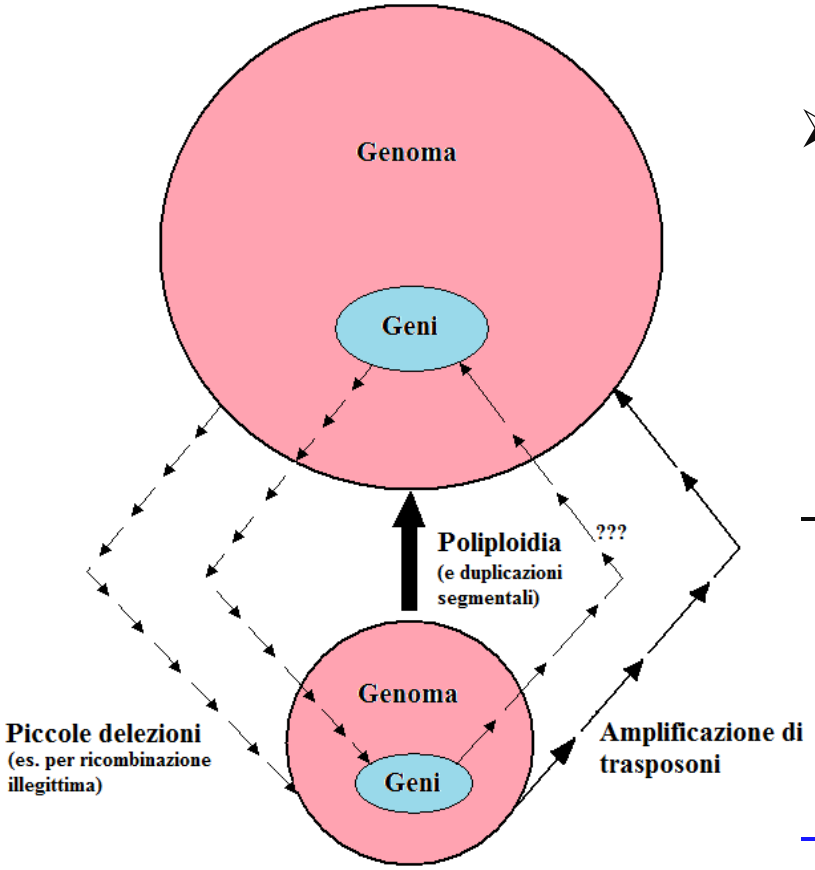
Element	Organization	Length (Kb)	Human genome Number	Fraction
Retrovirus/retroposon	LTR *gag pol (env)* LTR	1-11	450,000	8%
LINES (autonomous) e.g. L1	*ORF1 (pol)* $(A)_n$	6-8	850,000	17%
SINES (nonautonomous) e.g. Alu	$(A)_n$	<0.3	1,500,000	15%
DNA transposon	Transposase	2-3	300,000	3%

III) EFFETTO DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI SUL GENOMA



- **Gli elementi retro-trasponibili sono responsabili dell'incremento delle dimensioni del genoma**

- **Nelle piante questo ruolo è svolto soprattutto dai retrotrasposoni con LTR.**



Aumento grandezza genomi:

- **comparazioni di genomi di specie differenti indicano che** la poliploidia o (paleopoliploidia), duplicazioni segmentali (anche di bracci di cromosomi o interi cromosomi), **amplificazioni episodiche di di trasposoni** (transposon burst).

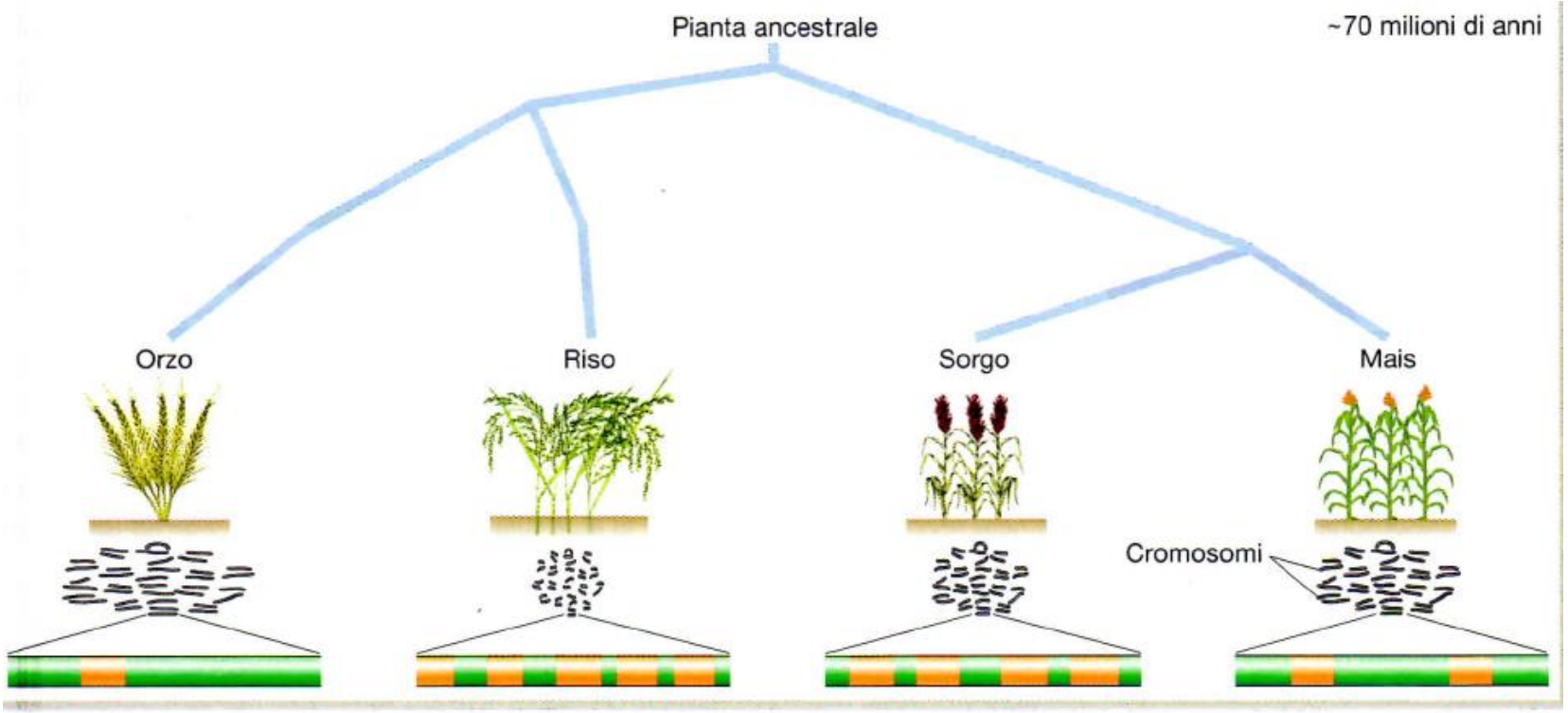
-**Diminuzione grandezza genomi:**

Ricombinazione ineguale può comportare la perdita di sequenze di DNA comprese ad es. tra due LTR dello stesso RE o di due RE della stessa famiglia.

- Ricombinazione illegittima (rottura e riparazione DNA che comportano piccole delezioni)

- Angiosperme con grandi genomi (mais) nel corso dell'evoluzione sono andate incontro a **duplicazioni geniche, poliploidia ed espansioni di retrotrasposoni.**
- -In gimnosperme del genere *Pinus* tutte le specie hanno 2n=24 cromosomi,: la grandezza del genoma è dovuta principalmente all'espansione di retrotrasposoni.

I cereali:
i retrotrasposoni LTR abbondano nei genomi grandi



- **Gli elementi trasponibili nei cereali sono responsabili delle differenze nella dimensione dei genomi**

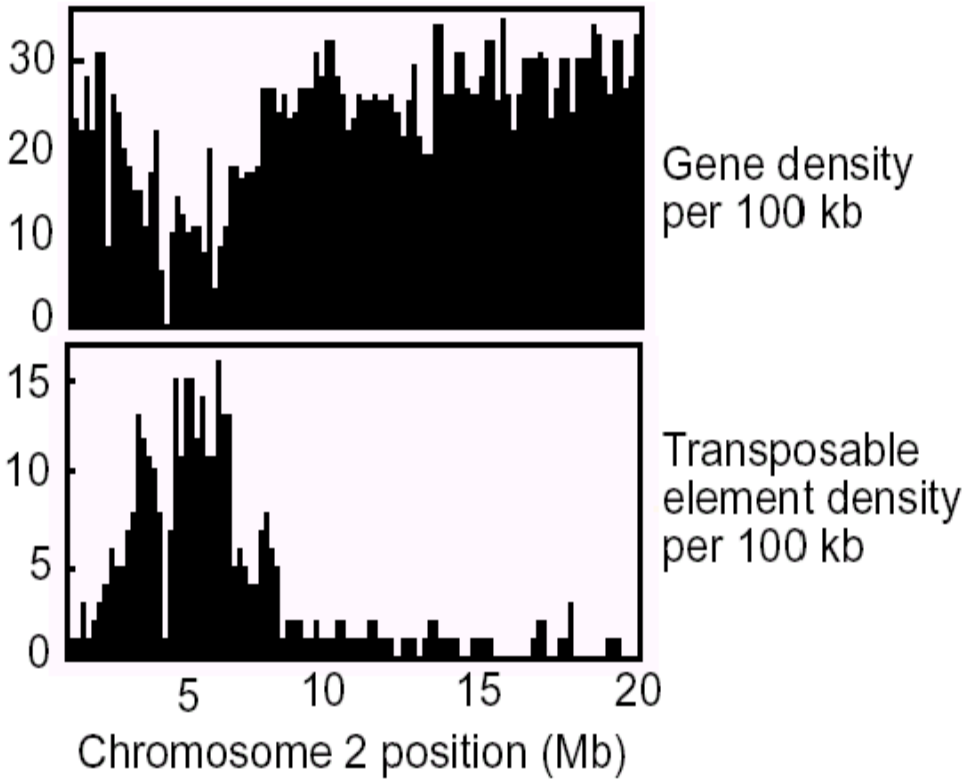
- I cereali, inclusi l'orzo, il riso, il sorgo e il mais,derivano da un antenato comune di 70 milioni di anni fa. Da allora, gli elementi trasponibili si sono accumulati a differenti livelli in ogni specie.
- I cromosomi sono più grandi nell'orzo e nel mais, i cui genomi contengono grosse quantità di retrotrasposoni LTR.
- Il tratto **verde del genoma** nella figura rappresenta il **gruppo di retrotrasposoni**,
- mentre il tratto **arancione rappresenta i geni.**

- I retrotrasposoni in particolari condizioni sono in grado di attivarsi ed inserirsi in un nuovo sito del genoma.
- Non sappiamo se e come i REs individuino precisi **siti di inserzione,** tuttavia è si è osservato che:
  - hanno un ruolo strutturale e funzionale in centromeri, telomeri, e altre regioni eterocromatiche

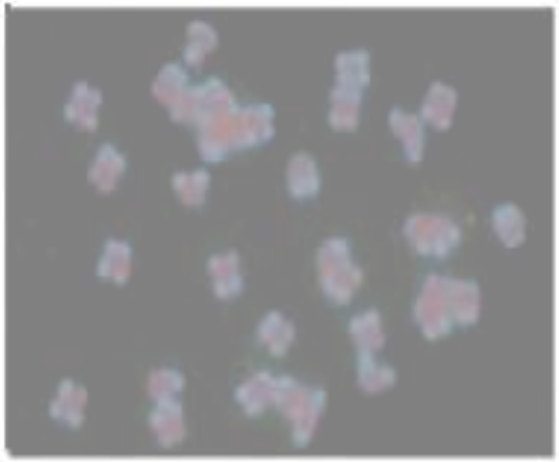
  - REs **Gypsy** occupano preferenzialmente regioni **centromeriche** e **pericentromeriche**
  - REs **Copia** sono più rari nei centromeri e presenti frequentemente in regioni **subtelomeriche**

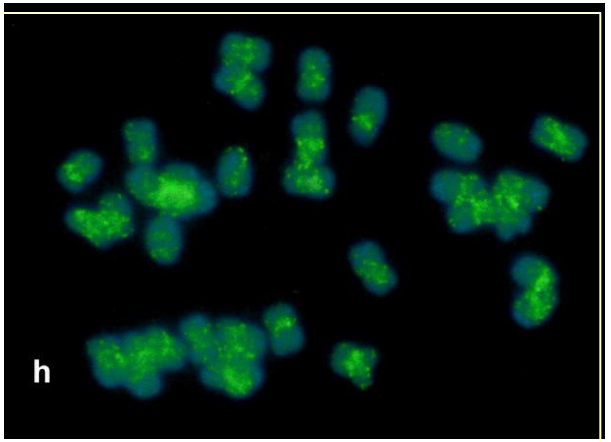
Centromeri e retrotrasposoni

I retrotrasposoni sono spesso associati alla eterocromatina centromerica



Arabidopsis thaliana





Helianthus annuus (Gypsy)

I REs possono avere un ruolo funzionale per l'ospite?

Significato Biologicico dei Trasposoni

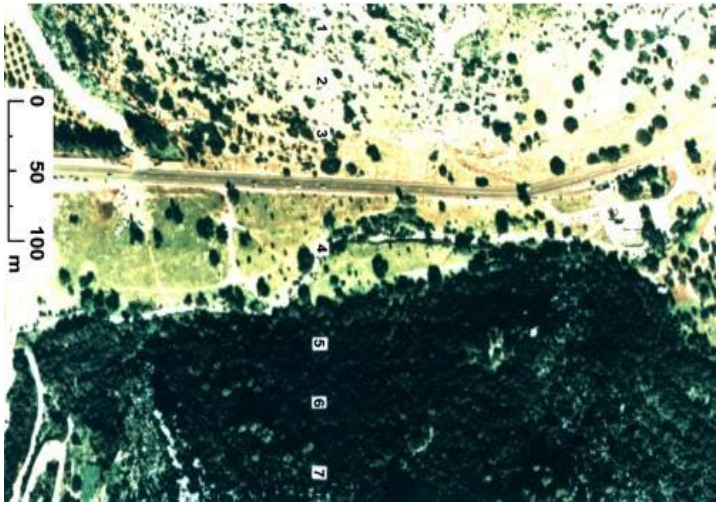
- Forniscono una strategia per il cambiamento e la variazione genomica, in particolare in risposta allo stress (ipotesi dello "stress" di McClintock) (Lezione per il Nobel del 1983, Science 226:792)

- solo "DNA egoista"?
- Nessun esempio noto di un elemento che svolge un ruolo normale nello sviluppo.

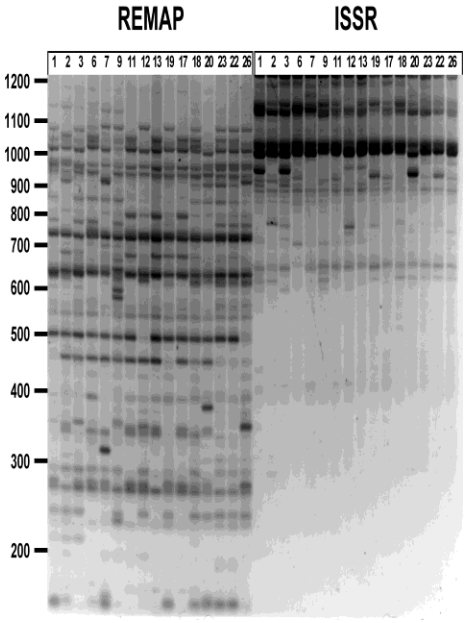
Un esempio di microevoluzione del genoma legata all'attività dei retrotrasposoni in relazione a diverse condizioni ambientali: BARE-1 in *Hordeum spontaneum* sul Mount Carmel, Israele (Kalendar et al., PNAS 2000)



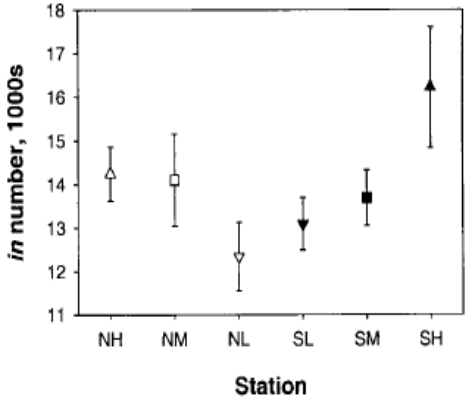
Vista dell' "Evolution Canyon", Lower Nahal Oren, Mt. Carmel, Israel. Lato Sud (SFS) sulla destra, lato Nord (NFS) sulla sinistra.



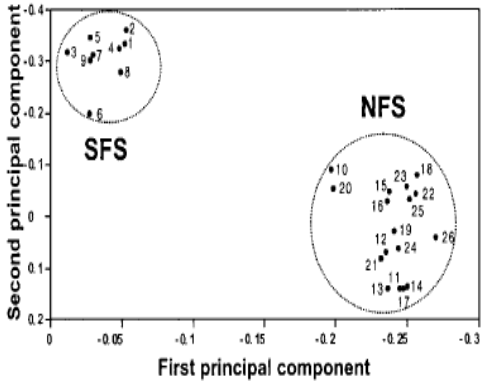
Vista aerea del Canyon con le stazioni di campionamento: 1, south high , SH; 2, south middle, SM; 3, south low, SL; 5, north low, NL; 6, north middle, NM; 7, north high, NH.



Elettroforesi delle bande ottenute con marcatori basati sul *Bare-1* (REMAP e ISSR).



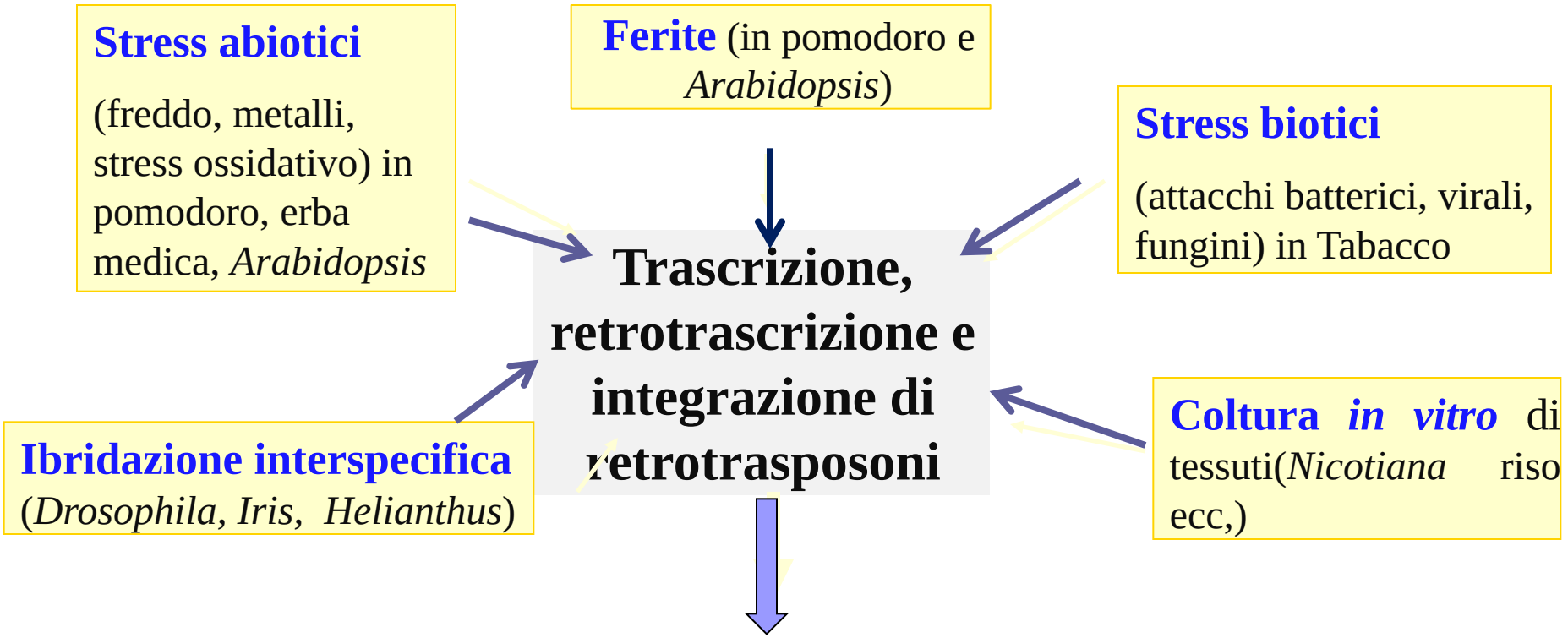
Il numero di copie di BARE-1 (*integrase)* correla con i siti di campionamento del Canyon.



Principle component analysis del Canyon ottenuta dalla variazione delle bande REMAP. I pattern elettroforetici dei campioni prelevati sul lato Sud del Canyon differiscono da quelli del lato Nord.

Attività dei retrotrasposoni

- **Stimoli diversi possono indurre l'attivazione, traduzione, retrotrasposizione e integrazione** in un nuovo sito dei retrotrasposoni :



- **L'attività dei REs può indurre nuova variabilità genetica, attraverso vere e proprie mutazioni geniche,**
  - **ma anche variazioni nei pattern di regolazione dei geni**

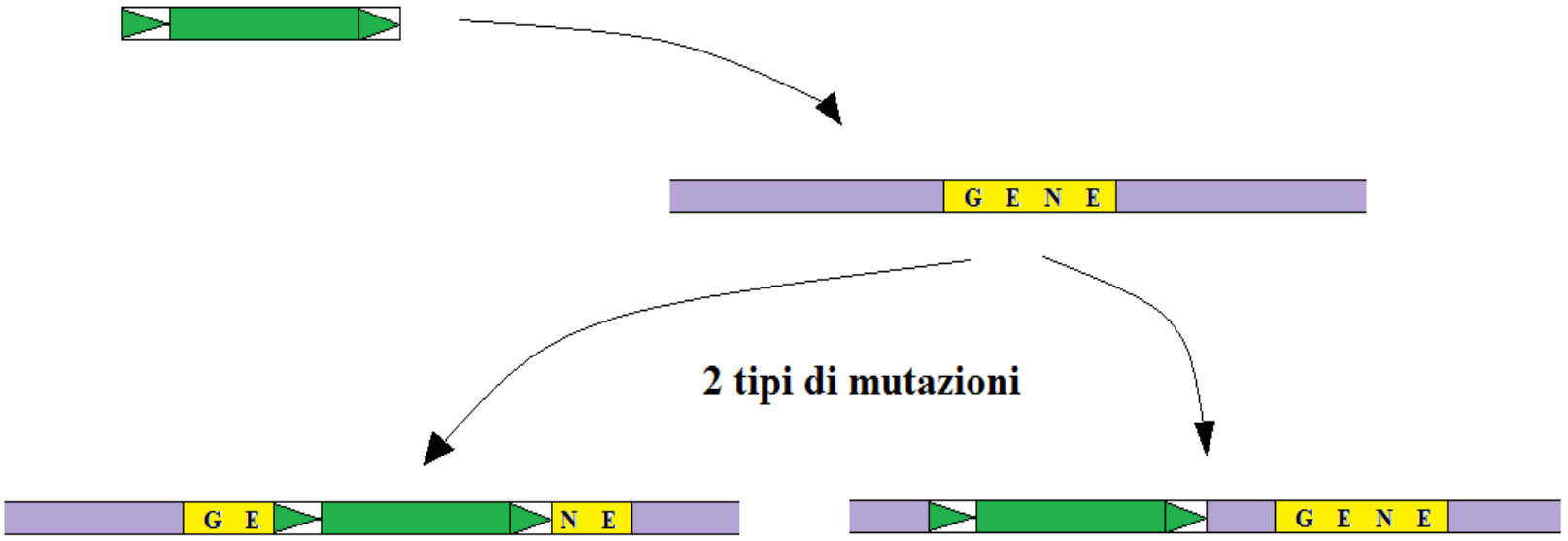
I trasposoni possono influenzare positivamente i genomi

- Generare nuova variabilità
- **Retrogeni:** Geni derivati da inserzione di retroelementi in un gene

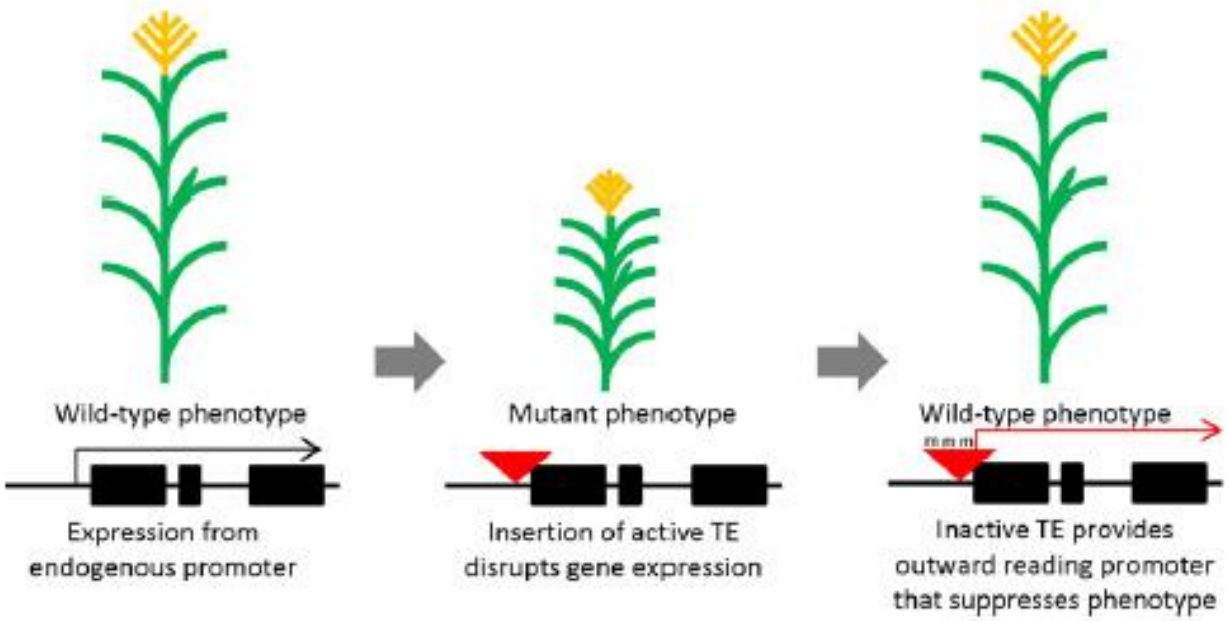
  - Richiedono
    - perdita di introni
    - reclutamento di elementi regolatori
  - Riso per esempio (Plant Cell 18:1791)
    - Minimo di 1.235 eventi primari
    - 5.734 includono duplicazioni in tandem
  - ***21% del genoma del riso***

GLI ELEMENTI GENETICI MOBILI POSSONO MODIFICARE L'ATTIVITA' DI GENI VICINI

- L'inserimento di un elemento trasponibile può indurre nuova variabilità genetica, attraverso interruzioni della regione **codificante**, ma anche variazioni nei pattern di regolazione dei geni, attraverso interruzioni delle **regioni regolatorie.**



Suppressible TE alleles with outward reading promoters



- Example of a suppressible phenotype induced by a TE insertion.
- A TE insertion within the promoter or UTR region of a gene blocks expression when the TE is active.
- When the TE is silenced by chromatin modifications (m) an outward reading promoter within the TE becomes active and produces a transcript that can suppress the mutant phenotype.

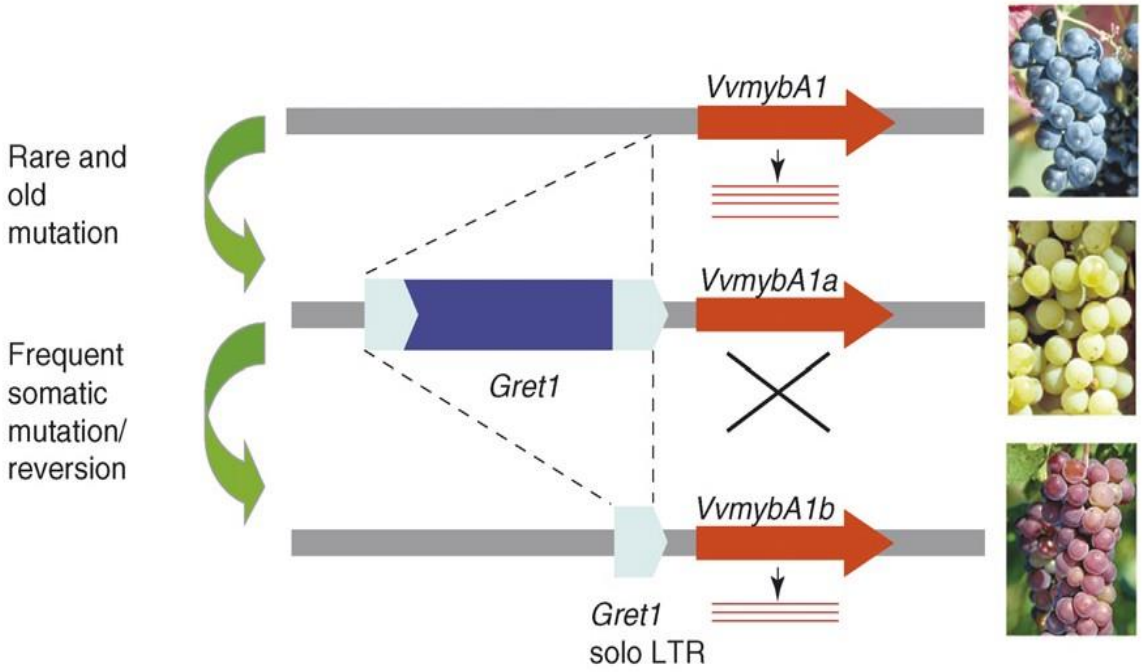
Un esempio di mutazione dovuta all'inserzione di un elemento trasponibile

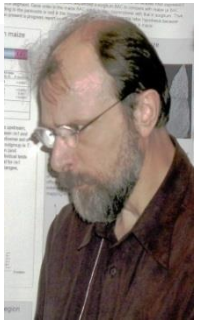
- Mutazione da uva nera a uva bianca



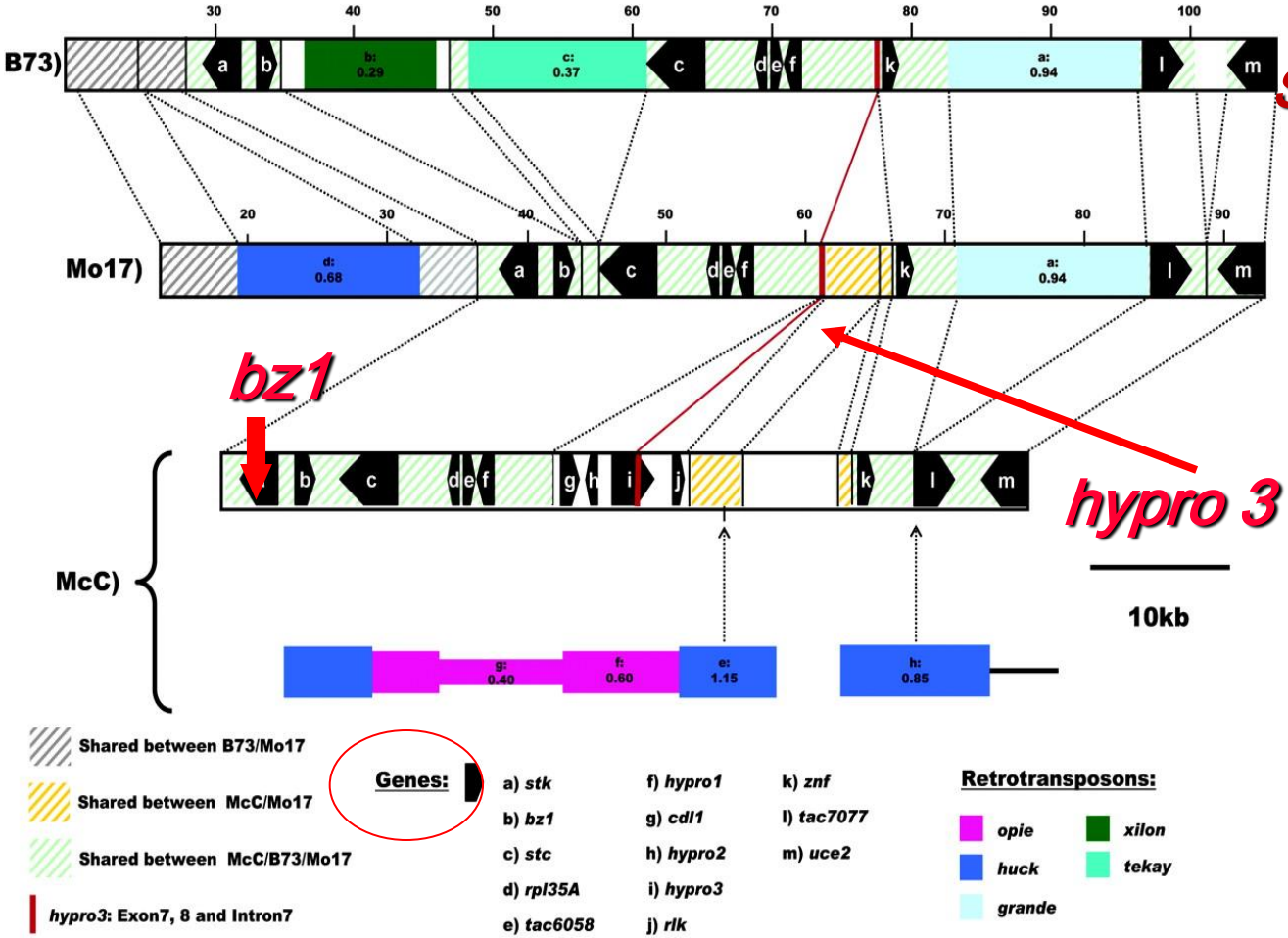


- ***GRET1 (GRAPE RETROTRASPOSON 1)*** è un retrotrasposone *gypsy* inseritosi nella regione di un fattore di trascrizione (*VvMybA1*) fondamentale nella regolazione della biosintesi delle antocianine, inattivandolo.





Bz LOCUS, B73,M17, McC



Shared, nonshared, between the three lines

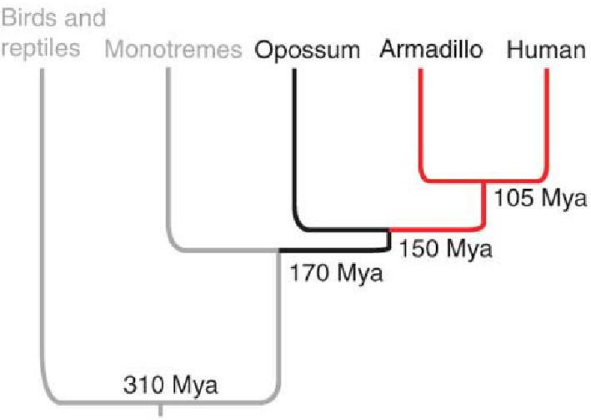
NB: 10% of genes present in B73 ref genome may be missing from at least some other lines

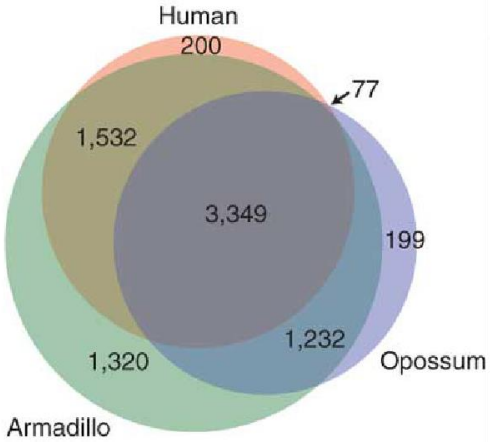
"I trasposoni hanno mediato il ricablaggio delle reti di regolazione dei geni contribuendo all'evoluzione della gravidanza nei mammiferi"

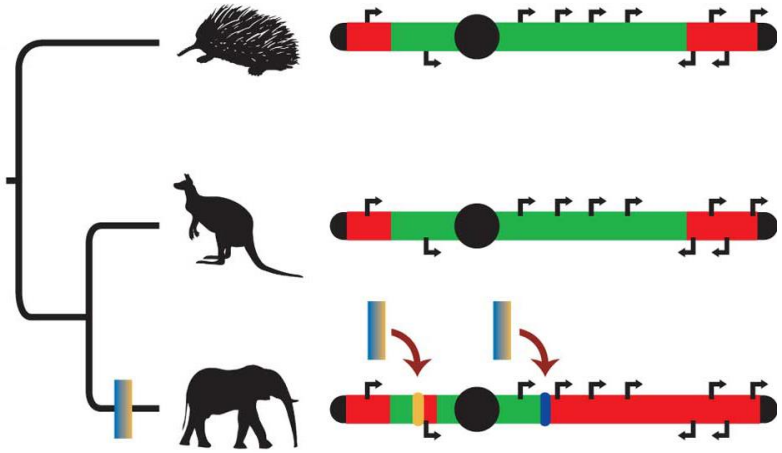
(Lynch et al., 2011 Nature Genetics)







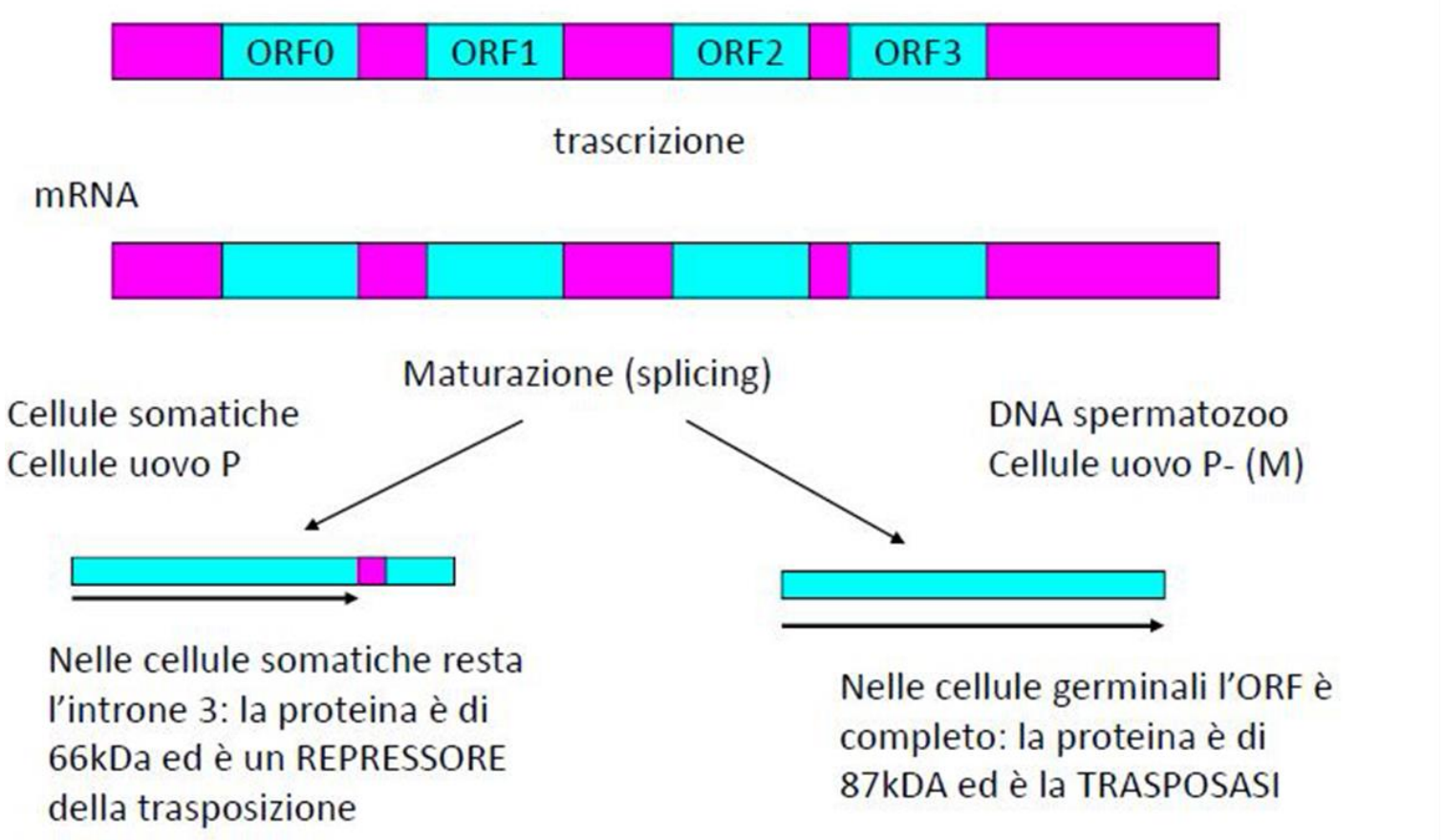




E lemento P

1)Gli elementi P vengono attivati nella linea germinale da uno splicing alternativo generando una trasposasi la quale lega sequenze di 10 bp adiacenti alle ripetizioni invertite **avviando una trasposizione di tipo non replicativo "tipica degli eucarioti".**

2) **l'elemento P produce** un **repressore della trasposizione** **ereditato per via materna**



Disgenesi dell'ibrido in drosophila

1)"elementi P" portati dai ceppi P ma non M

2)l'incrocio tra un maschio P e femmina M attiva la trasposizione inattivando geni della fertilità

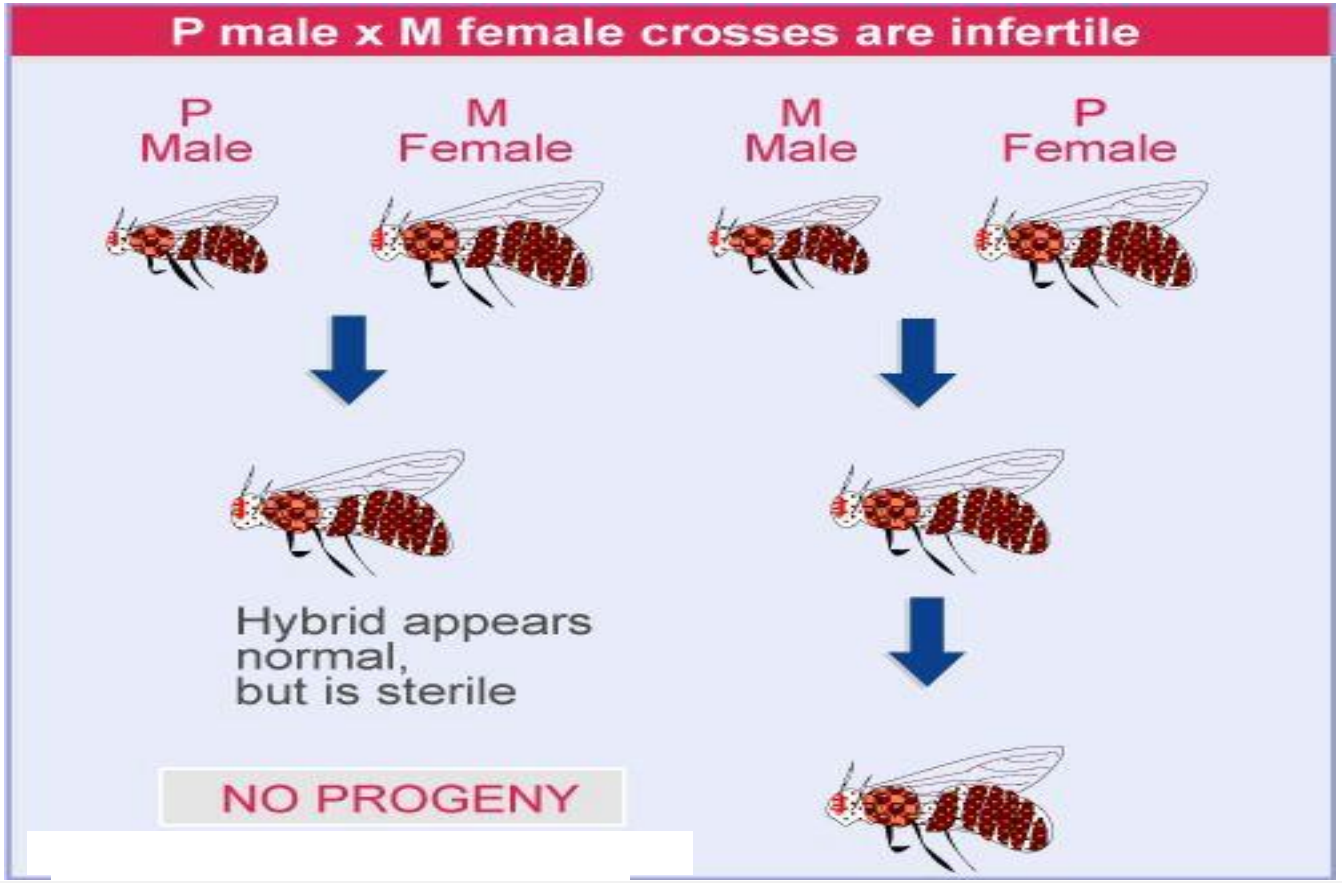
Nella disgenesi degli ibridi, un incrocio

femmina di un ceppo di laboratorio

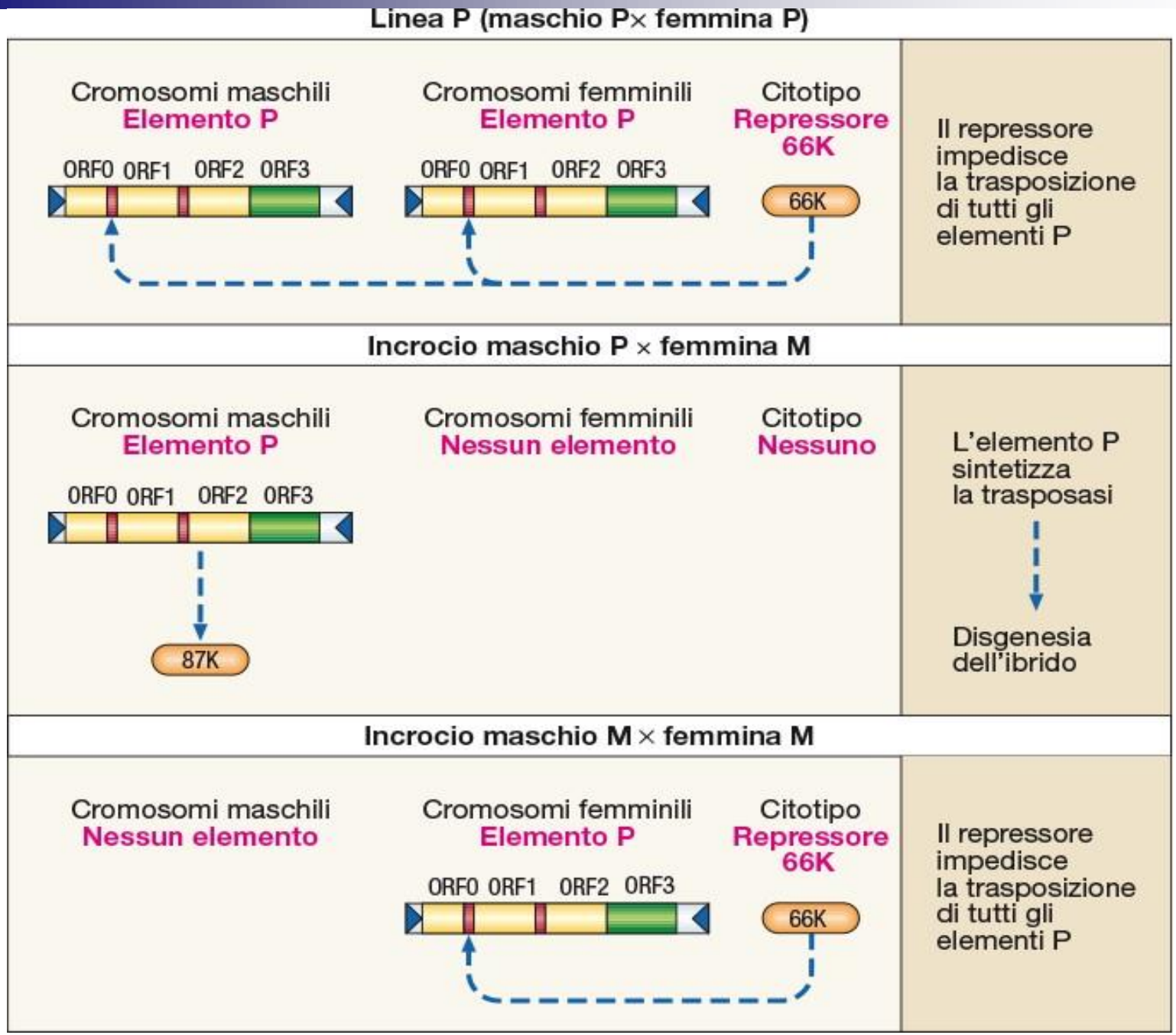
X

maschio wild-type

dà una progenie difettiva.



Per disgenesi degli ibridi si intende l'incapacità di produrre progenie fertile quando ceppi diversi di *D. melanogaster* sono incrociati in un certo modo.


Linea P (maschio P× femmina P)
Cromosomi maschili
Elemento P
ORF0 ORF1 ORF2 ORF3
Cromosomi femminili
Elemento P
ORF0 ORF1 ORF2 ORF3
Citotipo
Repressore
66K
66K
Il repressore impedisce la trasposizione di tutti gli elementi P
Incrocio maschio P × femmina M
Cromosomi maschili
Elemento P
ORF0 ORF1 ORF2 ORF3
87K
Cromosomi femminili
Nessun elemento
Citotipo
Nessuno
L'elemento P sintetizza la trasposasi
Disgenesia dell'ibrido
Incrocio maschio M × femmina M
Cromosomi maschili
Nessun elemento
Cromosomi femminili
Elemento P
ORF0 ORF1 ORF2 ORF3
Citotipo
Repressore
66K
66K
Il repressore impedisce la trasposizione di tutti gli elementi P

I trasposoni sono un importante strumento in biologia

- Le caratteristiche dei trasposoni hanno permesso la messa a punto di metodi sperimentali idonei per l'applicazioni di biologia molecolare

  - 1. L'introduzione di un trasposone in un genoma è una strategia favorevole per abolire l'espressione di un gene

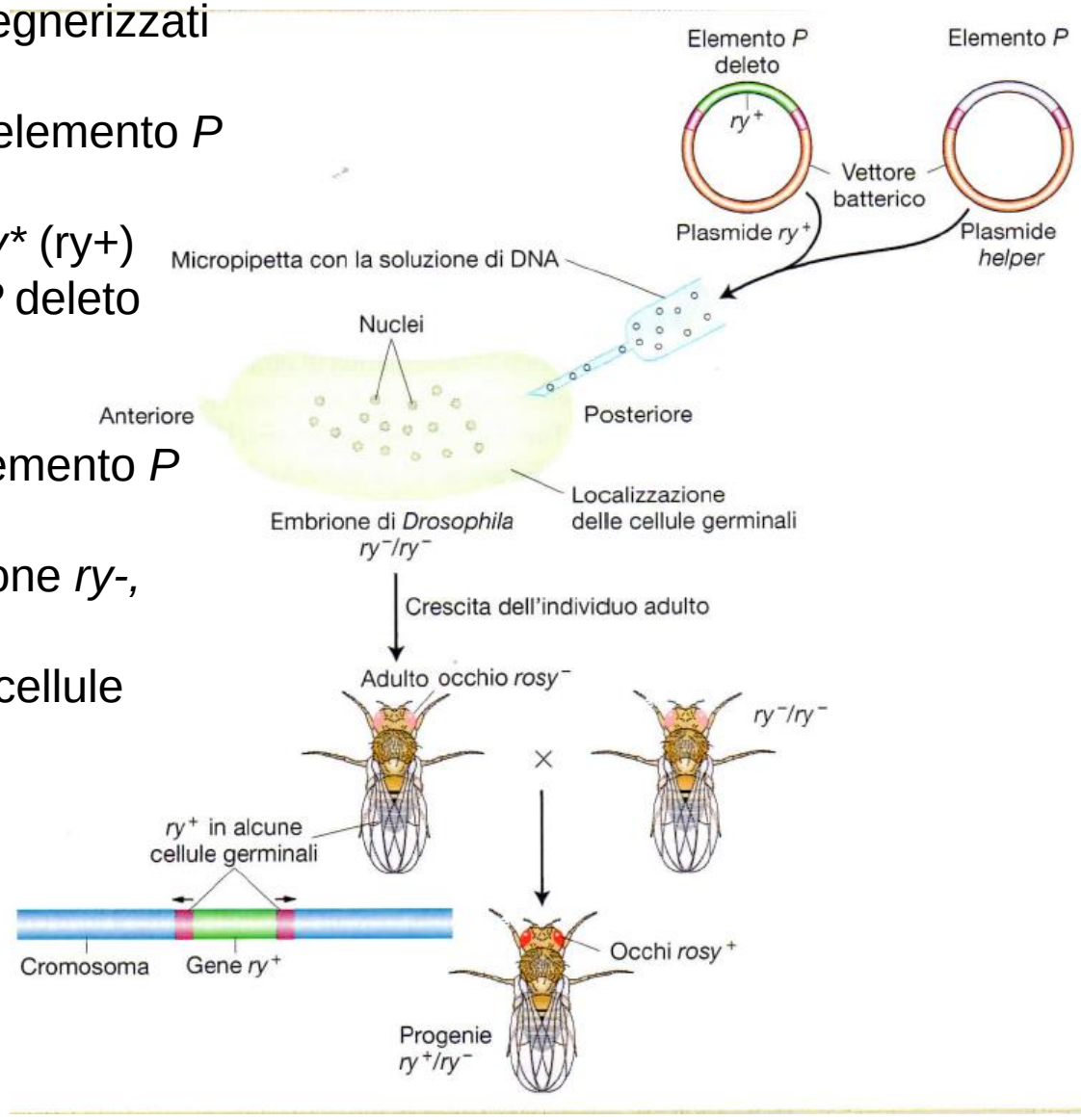
  - 2. Esso può essere usato per clonare un gene specifico con una strategia nota come **transposon tagging**

L'utilità dei trasposoni a DNA nella scoperta dei geni

- L'uso dell'elemento P per marcare i geni per il clonaggio.
- Transposone tagging

L’uso degli elementi *P* per inserire i geni

- Gli elementi **P** possono essere ingegnerizzati per trasferire i geni.
- Trasferimento genico mediato dall'elemento *P* in *Drosophila.*
- Il gene per il colore degli occhi *rosy** (ry+) è ingegnerizzato in un elemento *P* deleto trasportato da un vettore batterico.
- Allo stesso tempo, è inserito un plasmide *helper* che trasporta l'elemento *P* intatto.
- Entrambi sono iniettati in un embrione *ry-*, dove il gene *ry*+ si trapone con l'elemento *P* nei cromosomi delle cellule della linea germinale.



Trasposoni sono soggetti a regolazione

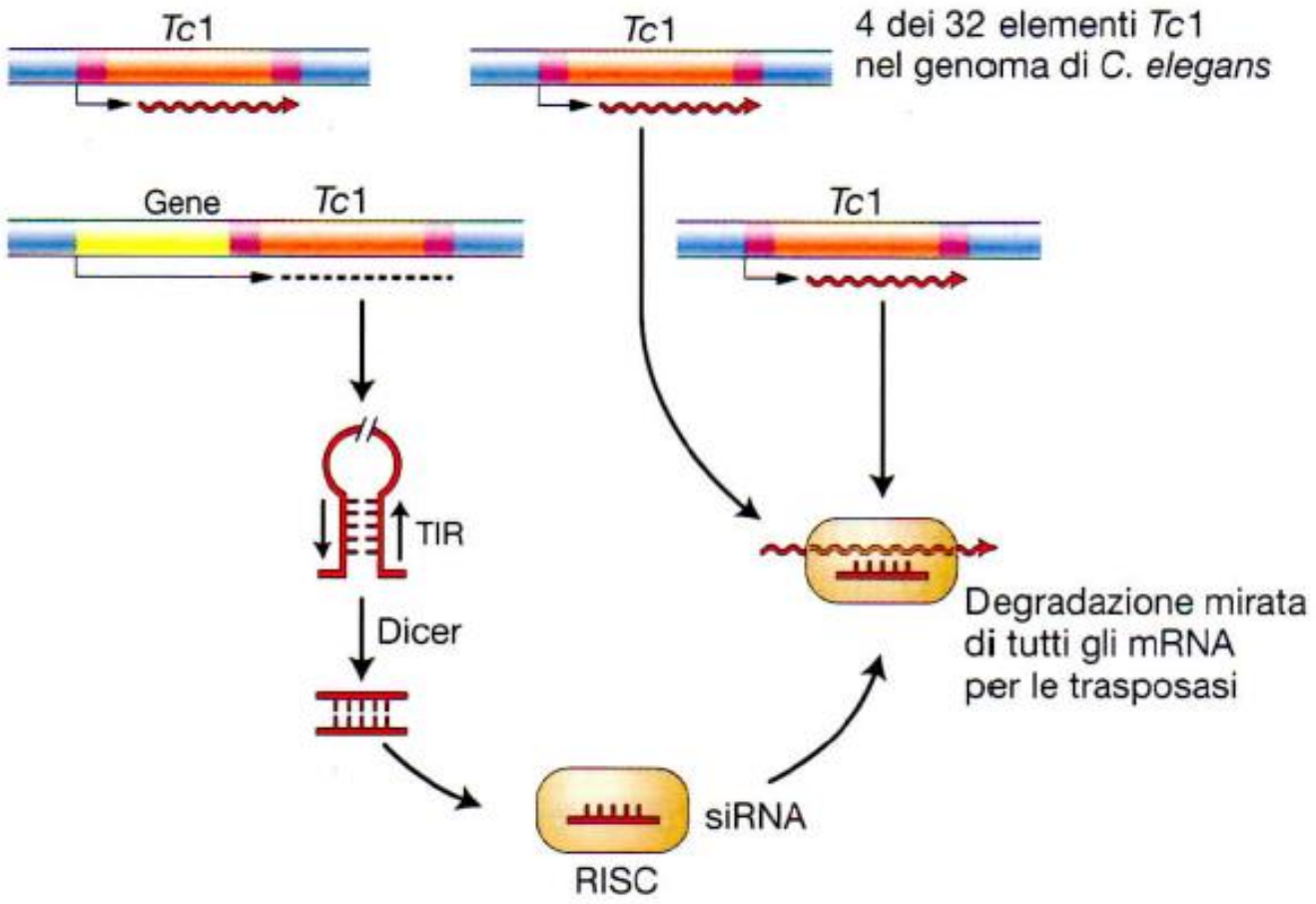
- Numero di elementi trasponibili è correlato negativamnete con la fitness dell'ospite.

- Silenziati da diversi meccanismi.

Regulation and Control of Transposition

- ***Overproduction Inhibition (OPI)***
- ***Vertical Inactivation***
- ***Other Mechanisms***

Regolazione epigenetica degli elementi trasponibili a opera degli organismi ospiti



Un singolo elemento Tc1 può reprimere la trasposizione

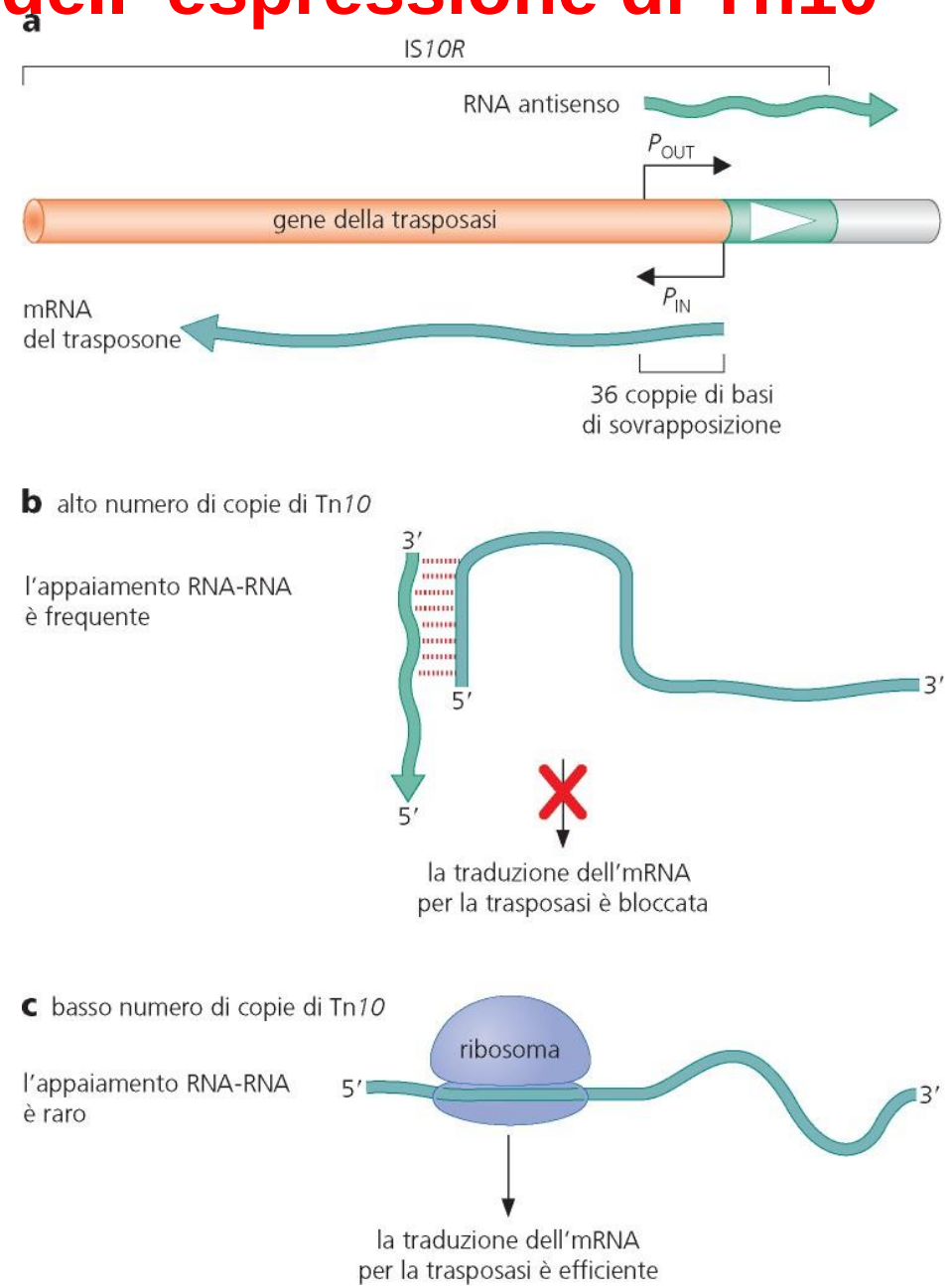
Regolazione antisenso dell'espressione di Tn10

- **P_{IN}:**
  promotore che promuove l'espressione del gene della trasposasi
- **P_{OUT}:**
  - promotore che promuove la trascriptione in orientazione anti-sense
- Overlap 36nt con trasposase mRNA
  - P_{OUT}: RNA ha una vita media piu lunga.

- In cellule con numero alto di Tn10, i livelli di P_{OUT} sono molto alti e si forma un appaia-mento RNA-RNA
  - **Traduzione bloccata**

- In cellule con numero basso di Tn10, ilivelli di P_{OUT} sono bassi.
- - Traduzione della trasposase

Risultato: quando in numero di copie di Tn10 è molto alto Tn10 i trasposoni sono inattivati



Trasposoni e RNA silencing

- Poiché i trasposoni sono potenzialmente **altamente mutagenici,** l'ospite ha sviluppato efficienti meccanismi **epigenetici** per controllare (inibire) la loro proliferazione

- La maggior parte dei trasposoni sono inattivi, metilati e, se trascritti, sono silenziati da siRNA

- Silenziamento post trascrizionale tramite RNAi
- Alterazioni della cromatina mediate da RNAi

Trasposoni e RNA silencing

- Per essere silenziati i trasposoni devono essere **riconosciuti** dal genoma ospite, ma i trasposoni hanno caratteristiche e sequenze differenti!!.
- Ciò che viene riconosciuto non è l'elemento trasponibile in sé ma ciò che esso produce, ovvero un **RNA "aberrante".**
- Tale RNA è una molecola di RNA a doppio filamento **(dsRNA)** che viene processata in piccoli **siRNA** innescando il silenziamento del trasposone.

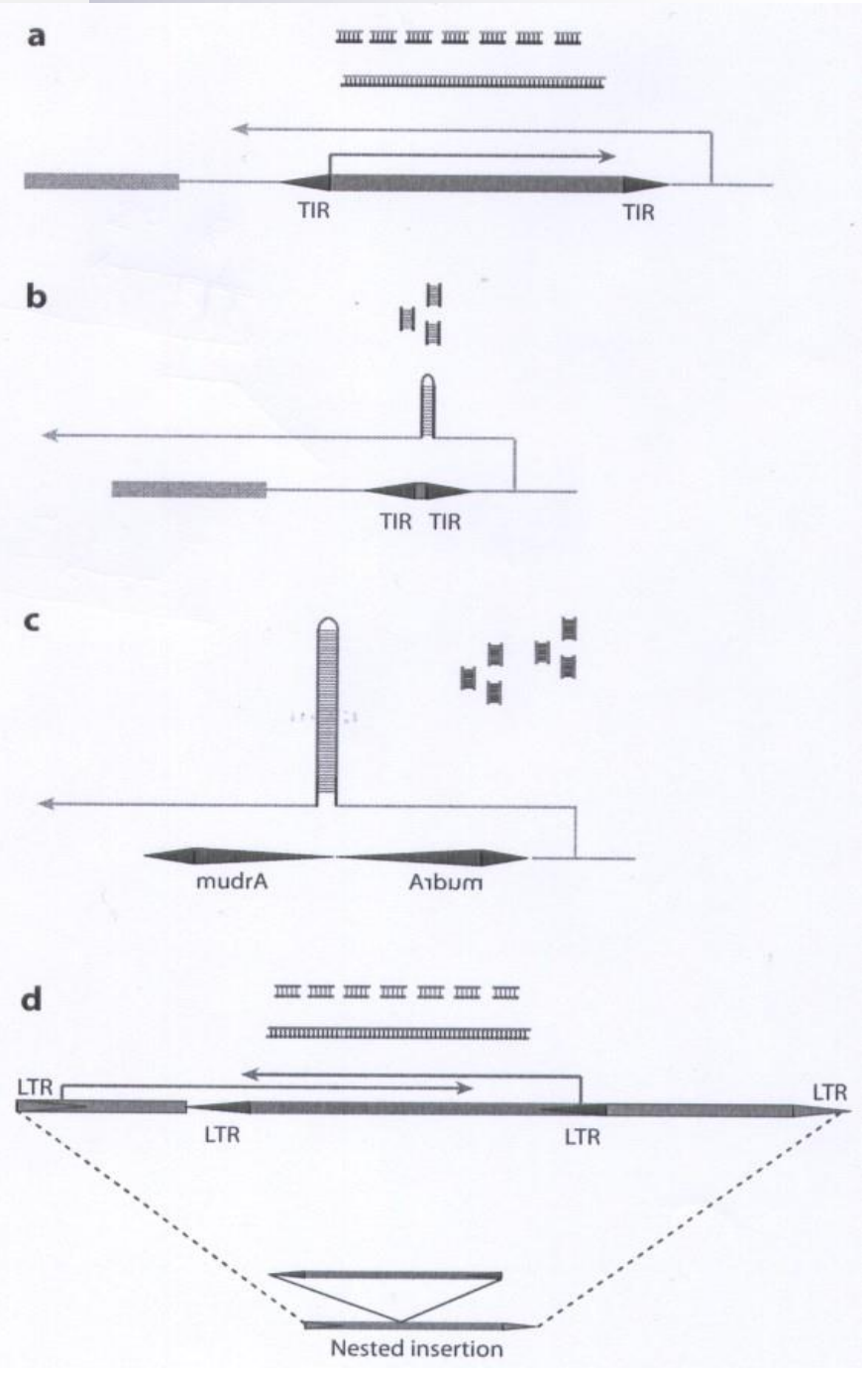
Trasposoni e RNA silencing

- Come si possono formare i dsRNA?

a) Trasposoni inseriti in regioni tra-scritte possono essere trascritti in dire-zione antisenso. Gli RNA prodotti pos-sono appaiarsi con l'RNA senso creando dsRNA

-Trasposoni con TIR **b)** o con porzioni duplicate e invertite **c)** possono essere trascritti e il loro RNA formare loop di dsRNA simile a precursori di microRNA

d) In Retrotrasposoni ″nested″ in orien-tamento opposto, i promotori presenti nelle LTR possono produrre RNA senso e antisenso, favorendo la formazione di dsRNA

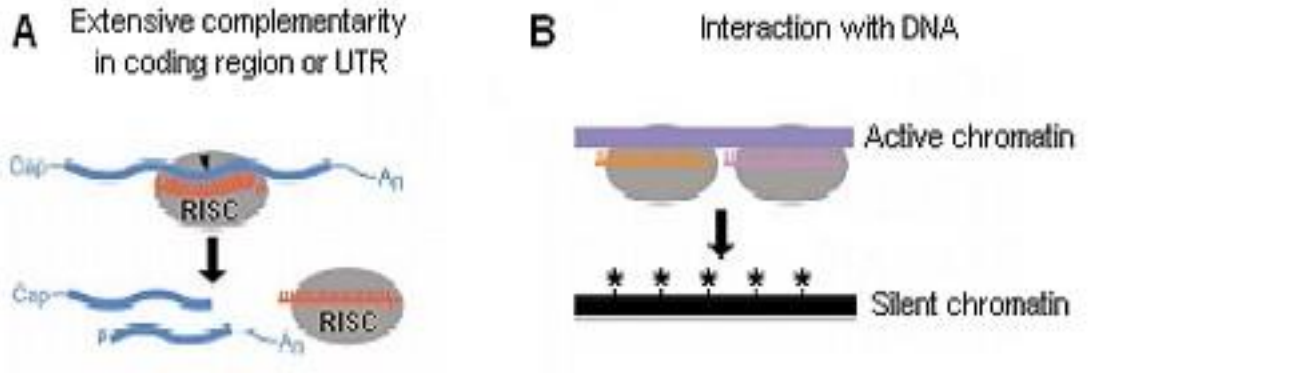


Trasposoni e RNA silencing

I dsRNA sono tagliati da nucleasi **DICER** per formare small interfering RNA (siRNA) di 21-26 nt

- Un filamento di questi siRNA si lega all' RNA-induced silencing complex (RISC)
- siRNA-RISC si lega a RNA bersaglio che viene degradato dal RISC
  Posttranscriptional silencing, PTGS

- siRNA, con l'ausilio di metil-trasferasi e altre proteine per il rimodellamento della cromatina, silenziano il DNA bersaglio tramite il rimodellamento della cromatina , la metilazione di istoni e di DNA Transcriptional gene silencing (TGS) tramite RNA-directed DNA methylation (RdDM)

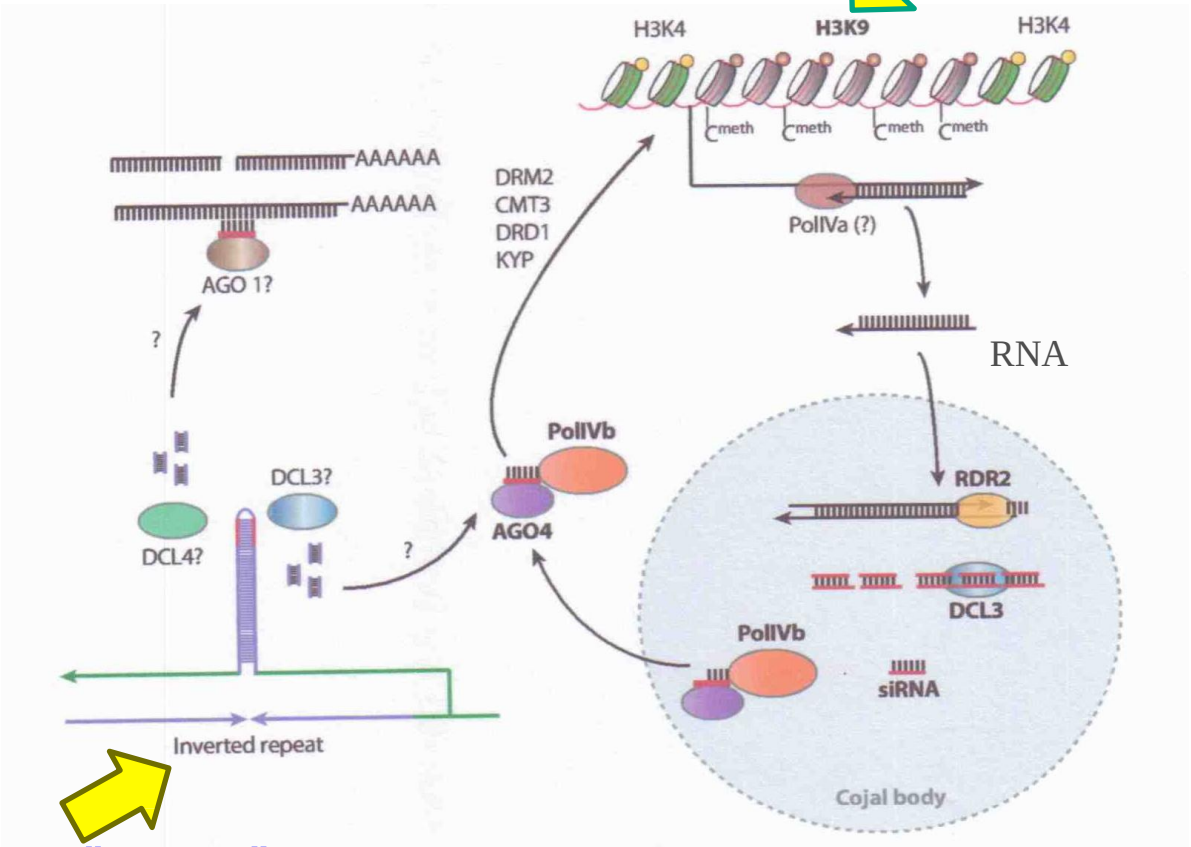


The Action of Small Silencing RNAs
(A) Messenger RNA cleavage specified by a miRNA or siRNA. Arrowhead indicates site of cleavage.
(B) Transcriptional silencing, thought to be specified by heterochromatic siRNAs.

Gli Elementi Trasponibili sono silenziati tramite RNA silencing

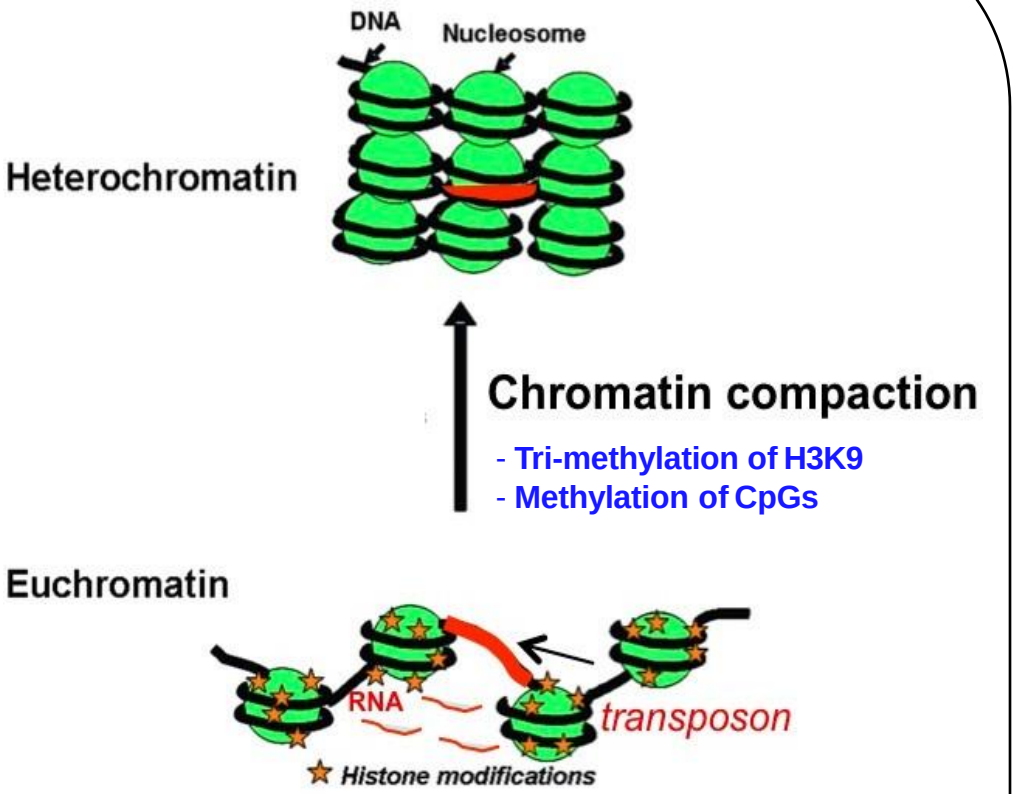
- La trascrizione dei MITE (grazie alle TIR) o quella di due Retrotrasposoni adiacenti e opposti produce dsRNA che **innescano il silenziamento tramite il DCL** il RISC-AGO e la produzione di siRNA che vanno a **silenziare il DNA tramite il rimodellamento della cromatina, la metilazione di istoni e di DNA** (detta metilazione del DNA RNA dipendente)

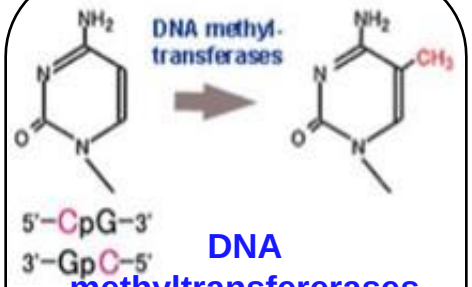
sequenze eterocromatiche



Trasposoni sono il ″trigger″ iniziale del loro silenziamento che poi si mantiene auto-rinforzandosi

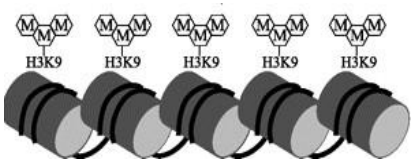
Le cellule possono "silenziare" i trasposoni compattando la struttura della cromatina





DNA methyltransferases ((i.e. DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) act only on CpG di-nuceotides

Histone H3 specific lysine-methyltransferases (i.e. Suv39h1) methylate Lysine 9 of histone H3



Sintesi

- Gli elementi trasponibili sono stati scoperti nel mais B Barbara McClintock come causa di alcune mutazioni instabili.
- Le sequenze di inserzione (IS) di batteri sono stati i primi elementi trasponibili isolati a livello molecolare. Ci sono molti tipi differenti di IS nei ceppi del batterio *E. coli,* e di solito presenti in molte copie.
- I trasposoni composti contengono elementi IS che fiancheggiano uno o più geni, come quelli responsabili della resistenza agli antibiotici.
- I trasposoni, con i geni per la resistenza, possono insersi nei plasmidi ed essere trasferiti per coniugazione in batteri non resistenti.
- Ci sono due grandi gruppi di elementi trasponibili negli eucarioti: elementi di classe 1 (retrotrasposoni) e di classe 2 (trasposoni a DNA).
- *Ac, Ds e P* sono esempi di trasposoni a DNA, così chiamati perché l'intermedio della trasposizione è a DNA.
- Gli elementi autonomi come *Ac* codificano una trasposasi che lega le estremità degli elementi autonomi e non autonomi e catalizza l'escissione dell'elemento da un sito donatore e l'inserzione in un nuovo sito bersaglio.
- I retrotrasposoni sono stati isolati molecolarmente per la prima volta da mutanti di lievito, e la somiglianza con i retrovirus è stata subito evidente.
- I retrotrasposoni sono elementi di classe 1 perché usano RNA come intermedio.

- Una particolare classe di mutazioni è dovuta al taglio o alla copia (tramite intermedi a RNA) di tratti di DNA, gli elementi mobili, che vengono poi trasposti in un'altra posizione
- I retrotrasposoni contengono una trascrittasi inversa e sono evolutivamente imparentati con i retrovirus

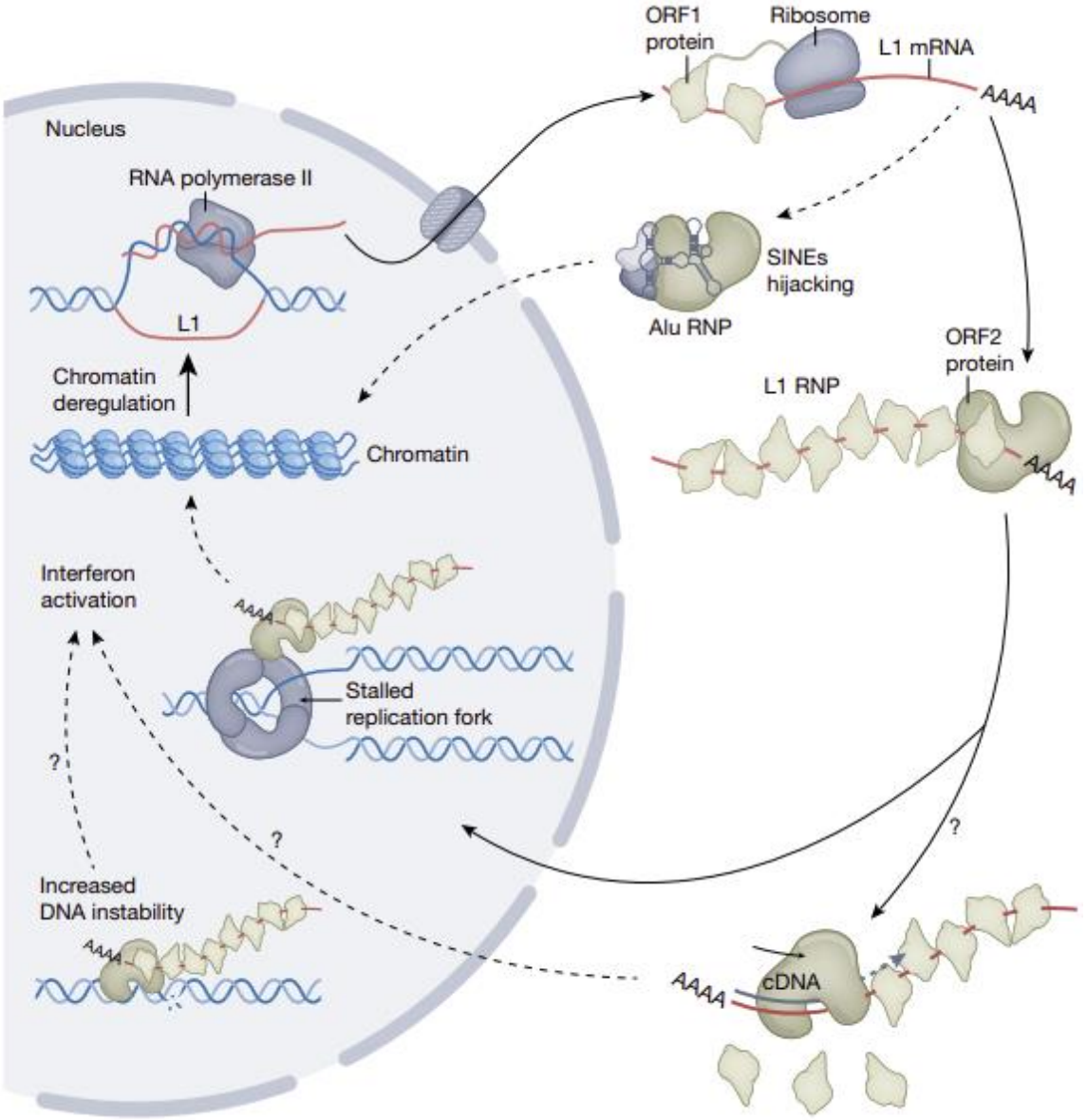
the lesson is over



The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases.
Nature | Vol 596 | 5 August 2021 | 43

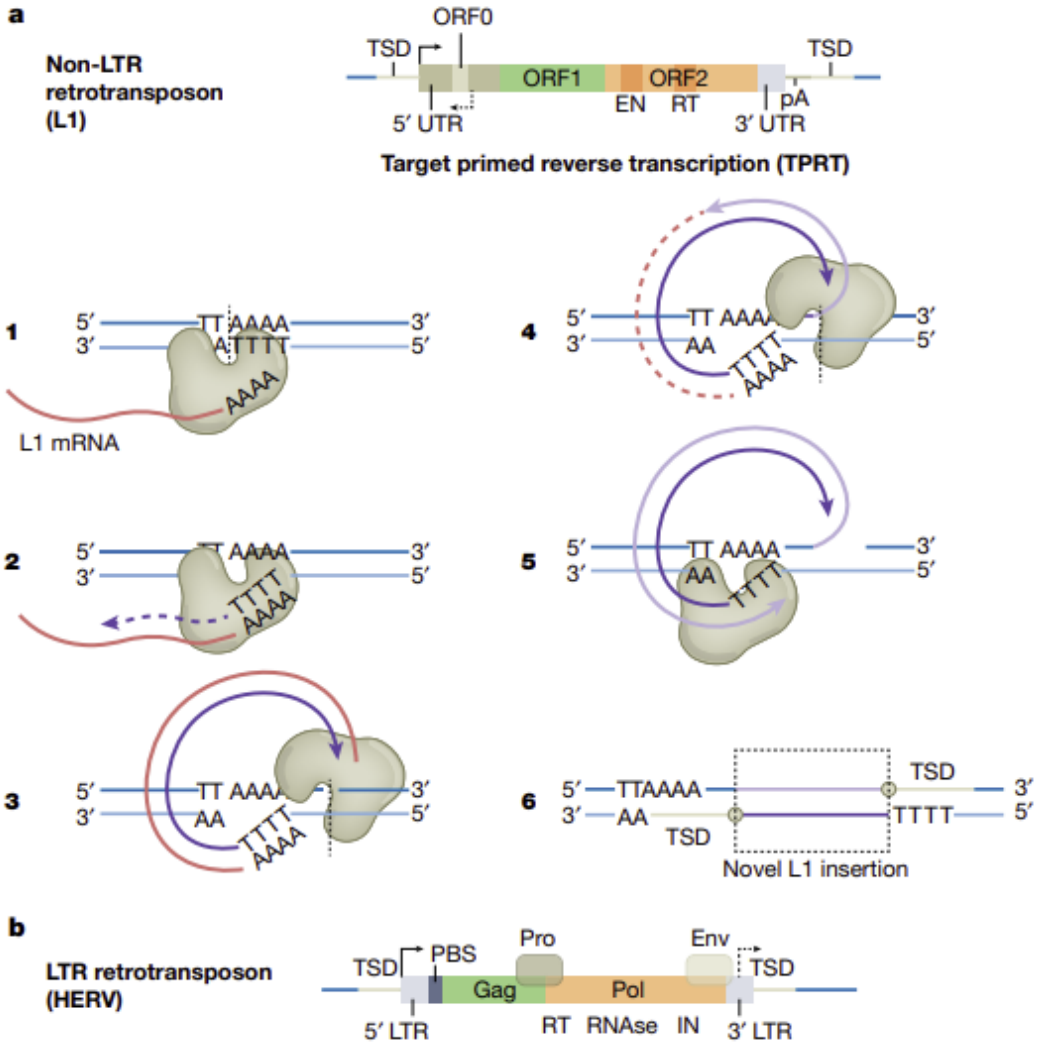
The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated disease

L1 life cycle. L1 elements are transcribed by host RNA polymerase II. The mRNAs are translated (ribosome) into ORF1 and ORF2 proteins. Multiple trimers of ORF1 and one ORF2 bind the mRNA in cis to form the L1 RNP. SINEs (Alu) hijack
ORF2 in trans to form their own RNPs. RNPs access the nucleus during mitosis and interact with the DNA replication machinery during S phase to retrotranspose
into the genome. How L1 cDNA is produced in non-replicating cells is not clear.

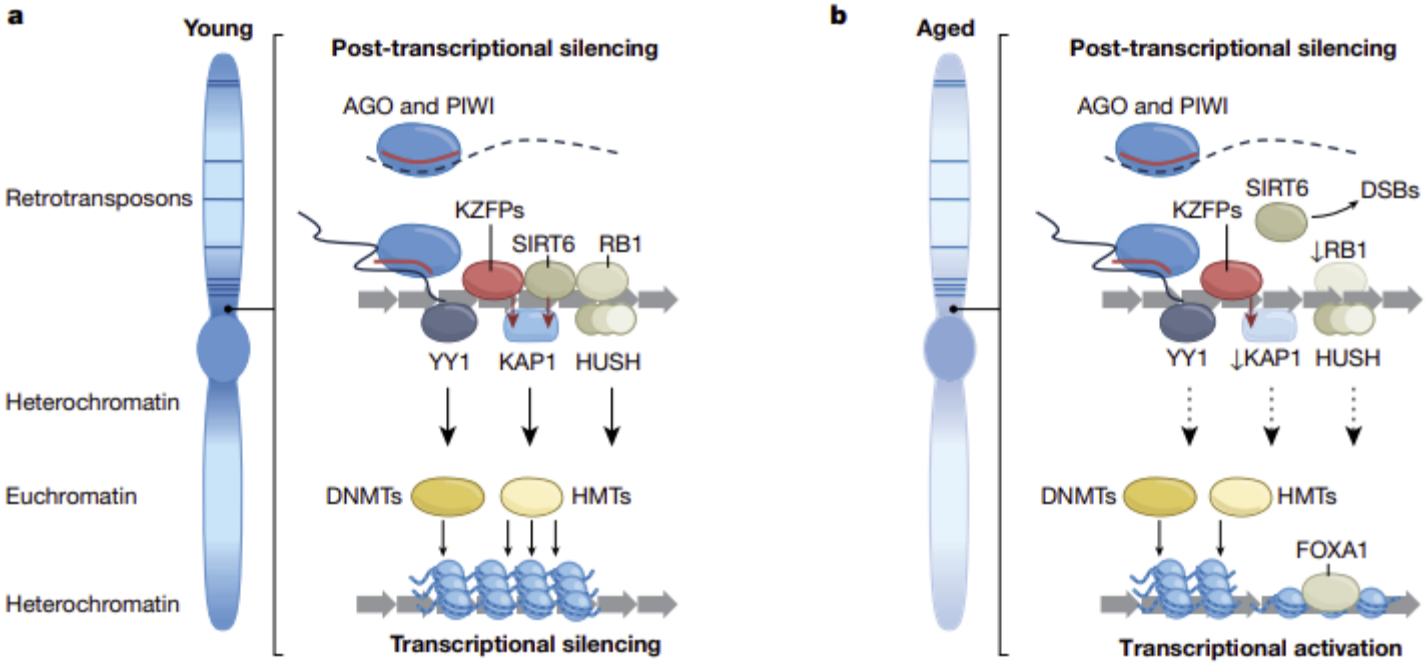


Retrotransposition mechanisms. a, Non-LTR elements. L1 structure: 5′ UTR with internal promoters, beige; ORF0, light beige; ORF1, green; ORF2, orange; EN, endonuclease domain of ORF2; RT, reverse transcriptase domain of ORF2; 3′ UTR with polyadenylation signals (pA), light blue; TSD, target site duplications. The steps (1–6) of TPRT are illustrated. The dark-purple (3,4,5) and light-purple (4,5) lines with arrows represent the first and second strands of the L1 cDNA, respectively.

b, LTR elements. HERV structure: LTRs (5′ and 3′) with internal promoters, light blue; PBS, tRNA primer-binding site; Gag (capsid protein), green; Pro (protease), beige; Pol (polymerase), orange; Env (envelope protein), light beige. Many HERVs lack envelope protein. Pol has domains with reverse transcriptase, RNase H (RNase) and integrase (IN) activities



3 | Surveillance of retrotransposons. In the stylized chromosomes shown on the left of each panel, heterochromatin is indicated in dark blue, euchromatin in light blue and retrotransposons as horizontal dark blue lines. a, Young condition. Transcriptional r SIRT6, HUSH and YY1) ta retrotransposon elements arrows) in the genome. SIRT6 and KZFPs both rec repressor KAP1. AGO and are targeted to nascent ret (dashed lines) by siRNAs piRNAs (red lines). Collect (downward black arrows) DNMTs and repres methyltransferases (HMTs the formation of heterochr transcripts are also degraded by AGO slicer complexes. b, Aged condition. Surveillance by regulators such as RB1 and SIRT6 is diminished, resulting in decreased KAP1 recruitment and reduced DNA methylation and repressive heterochromatin modification at retrotransposons. This allows the binding of transcriptional activators (FOXA1



Retrotransposons as agents of ageing and disease.

. a, Overview of retrotransposon–ageing interactions.
Defence mechanisms are weakened with age, which allows the deprepression of retrotransposons (inner layer). The direct molecular consequences of retrotransposon activity (middle layer) drive several cellular and tissue-level processes (outer layer), which collectively promote ageing.
b, Specific retrotransposon–disease interactions. L1 transcription and integration are shown inside the nucleus (double circle), translation in the cytoplasm and reverse transcription in both compartments. DNA strands are shown in blue and RNA strands in red. ssDNA, single-stranded DNA. Diseases are abbreviated in capital red letters (terms not defined in text: AD, Alzheimer's disease; AMD, age-related macular degeneration; CD, cardiovascular diseases; ND, neurodegenerative diseases; OA, osteoarthritis; PD, Parkinson's disease; RA, rheumatoid arthritis). Arrows, activating effects; lines ending in bars, inhibitory interactions; dashed arrows and question marks, hypothetical or uncertain processes

