

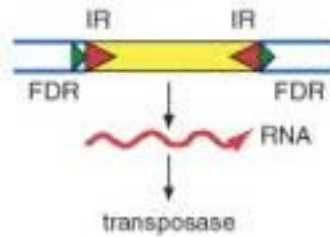
Elementi trasponibili nei batteri

- Sequenze d'inserzione
- I trasposoni
- MU ed altri batteriofagi simili a MU

Caratteristiche comuni

1. Contengono i geni per la trasposasi
2. Contengono delle sequenze inversamente ripetute all'estremità
3. Generano duplicazioni dirette nel sito d'inserzione

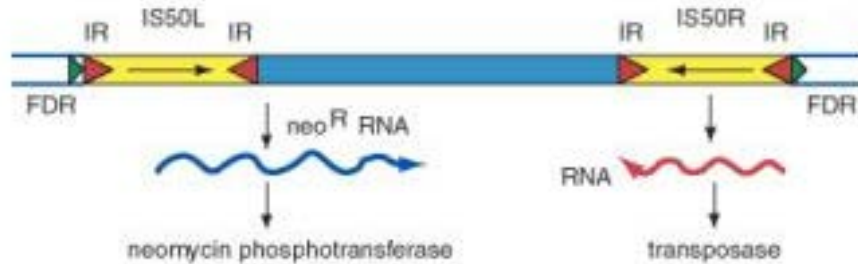
Insertion sequences



Le sequenze IS

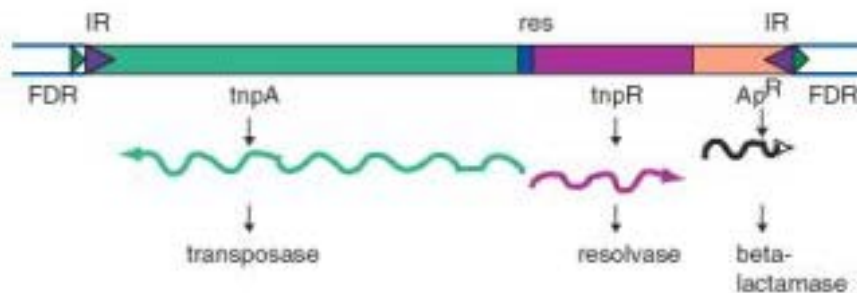
Transposons

Composite transposons, e.g. Tn5



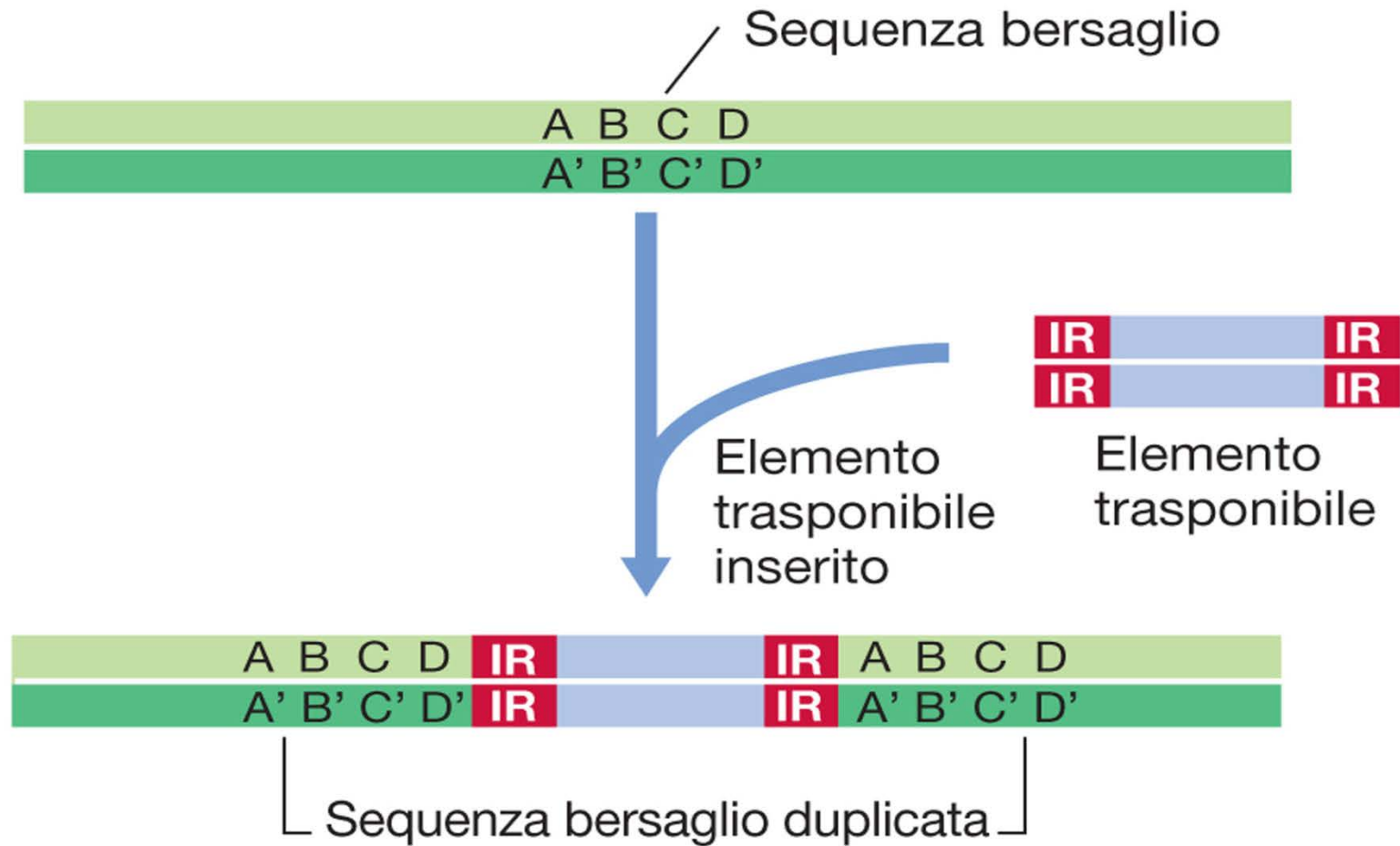
Trasposoni composti

Transposons lacking terminal ISs, e.g. TnA



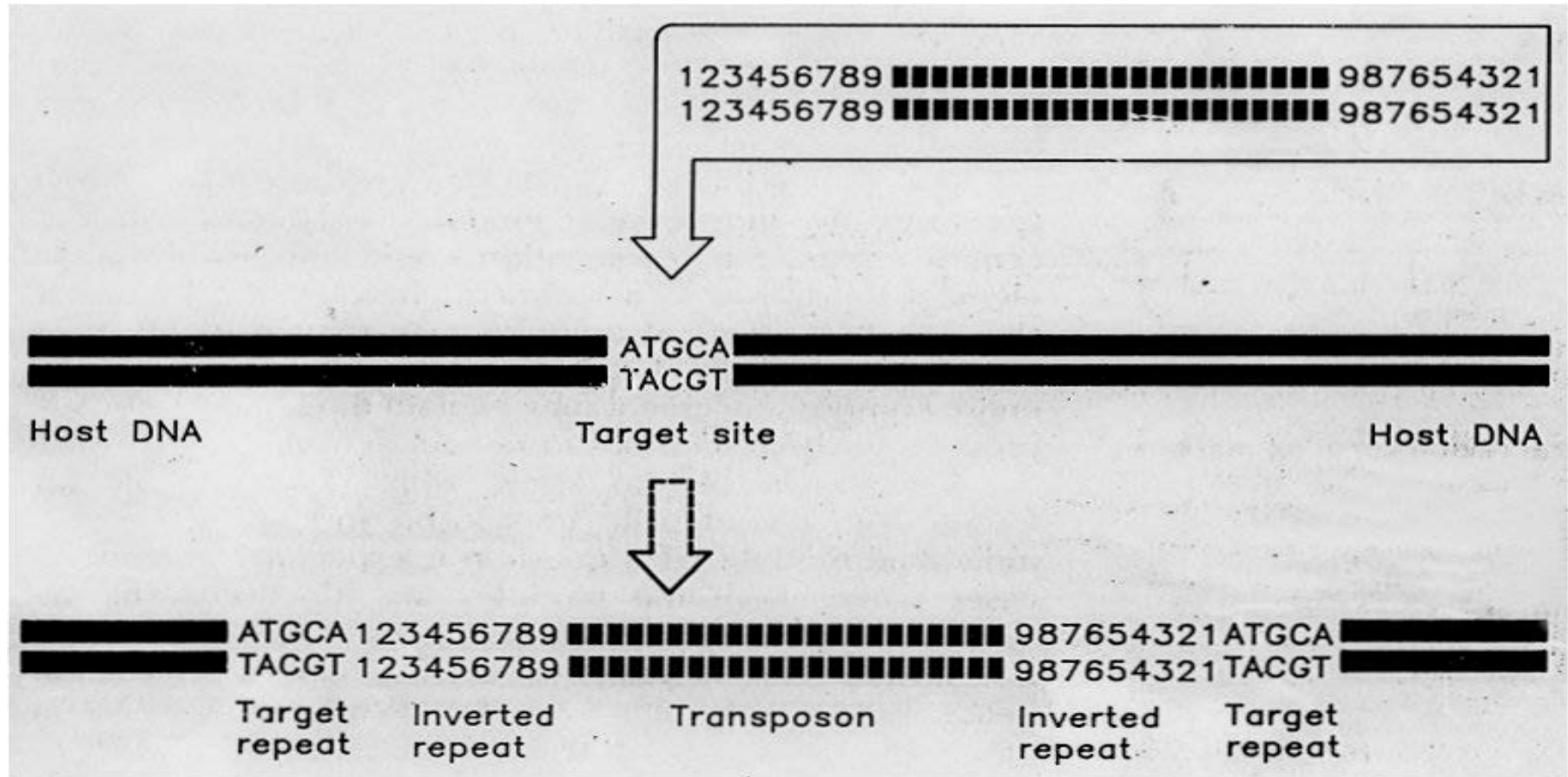
Trasposono semplici
o di tipo TnAp

Struttura dell'elemento Trasponibile



Caratteristiche fondamentali degli elemento trasponibili

- Sequenze invertite ripetute definite IR (Inverted Repeats) di lunghezza variabile da 10 a 40 bp fiancheggiano l'elemento trasponibile
- Il sito bersaglio (casuale) di lunghezza variabile tra le 5 e 9 bp sarà duplicato in seguito all'inserzione dell'elemento trasponibile



IS Sequenze d'inserzione sono gli elementi trasponibili più semplici

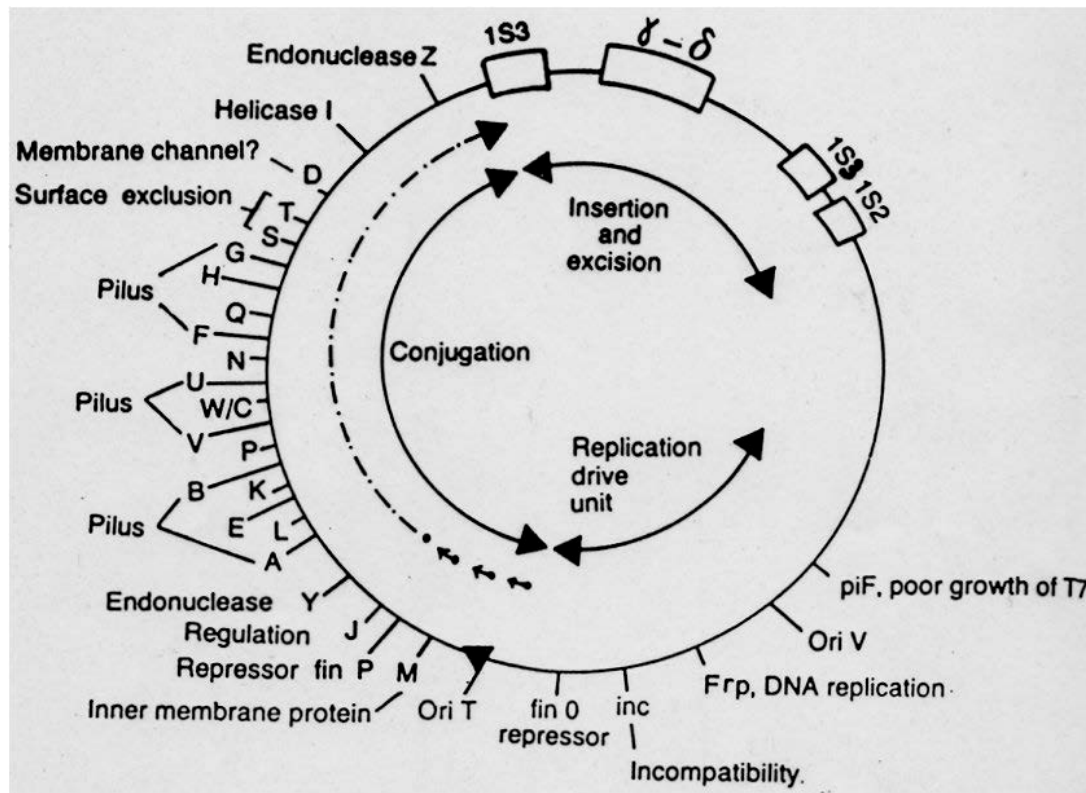
Caratteristiche strutturali :

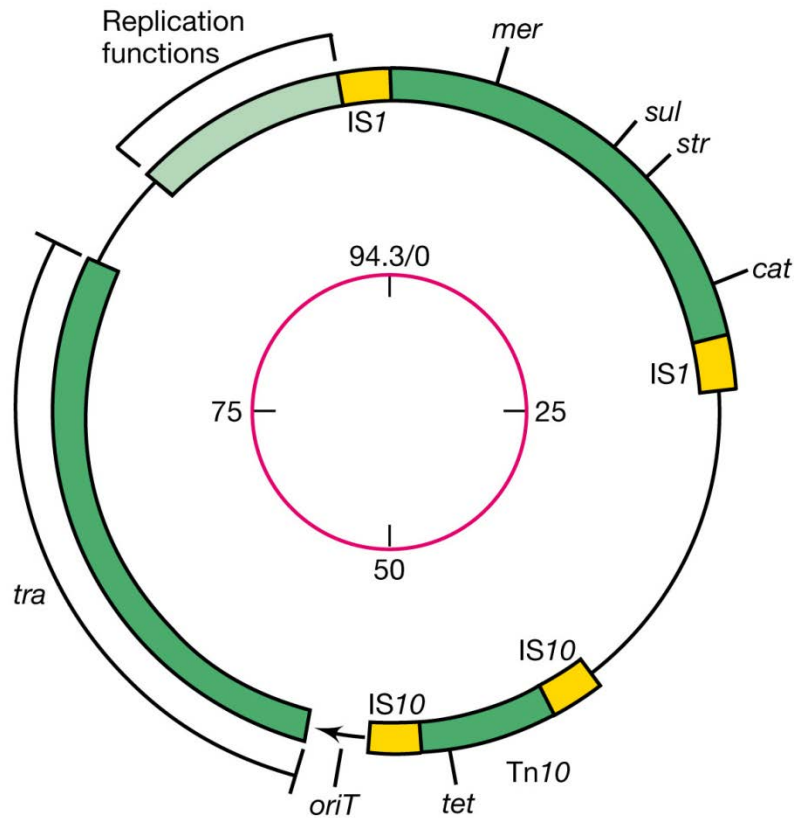
- Generalmente 1-2kb
- Fiancheggiati da IR di 10-30bp
- Contengono una ORF che codifica per la trasposasi

Caratteristiche funzionali

- Generatori di regioni di omologia tra elementi genetici diversi (plasmide e cromosoma)
- Generatori di regioni di omologia all'interno di uno stesso genoma
- Presenti in tutti i Batteri ed Archea

Sul plasmide F è presente un'ampia regione contenente sequenze d'inserzione di tipo IS2, IS3 e $\gamma\delta$ (definito anche Tn1000). Queste sequenze sono importanti per i processi di ricombinazione omologa quali integrazione di F nel cromosoma, excisione, fusione di plasmidi





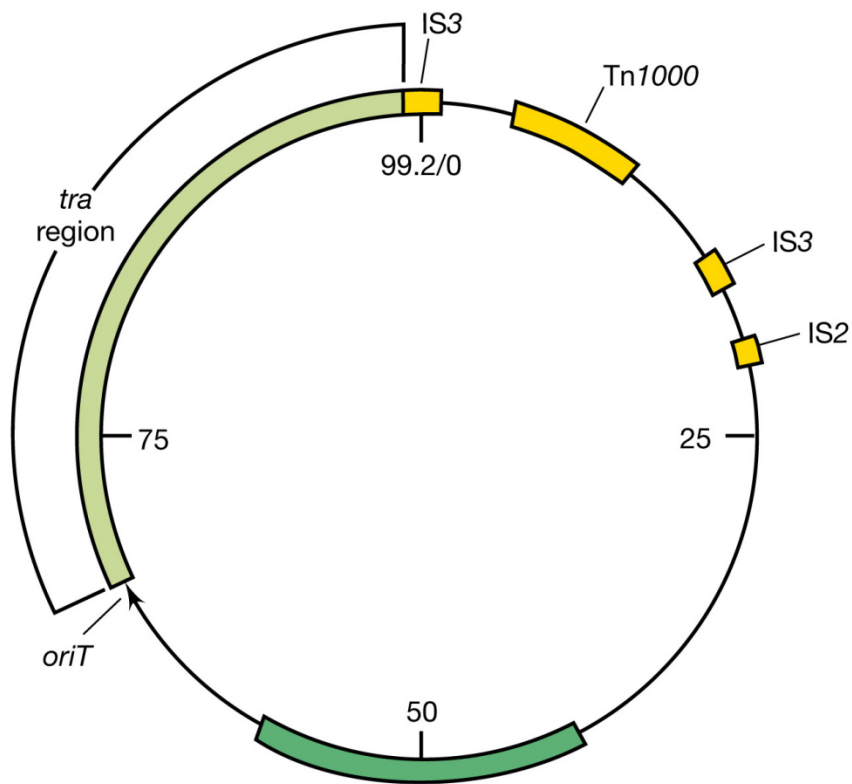
Sul plasmide R100 (o R1) sono presenti sequenze IS che fiancheggiano elementi trasponibili (trasposoni composti)

2 **IS1** fiancheggiano un'ampia regione contenente numerosi geni di antibiotico resistenza (Tn501)

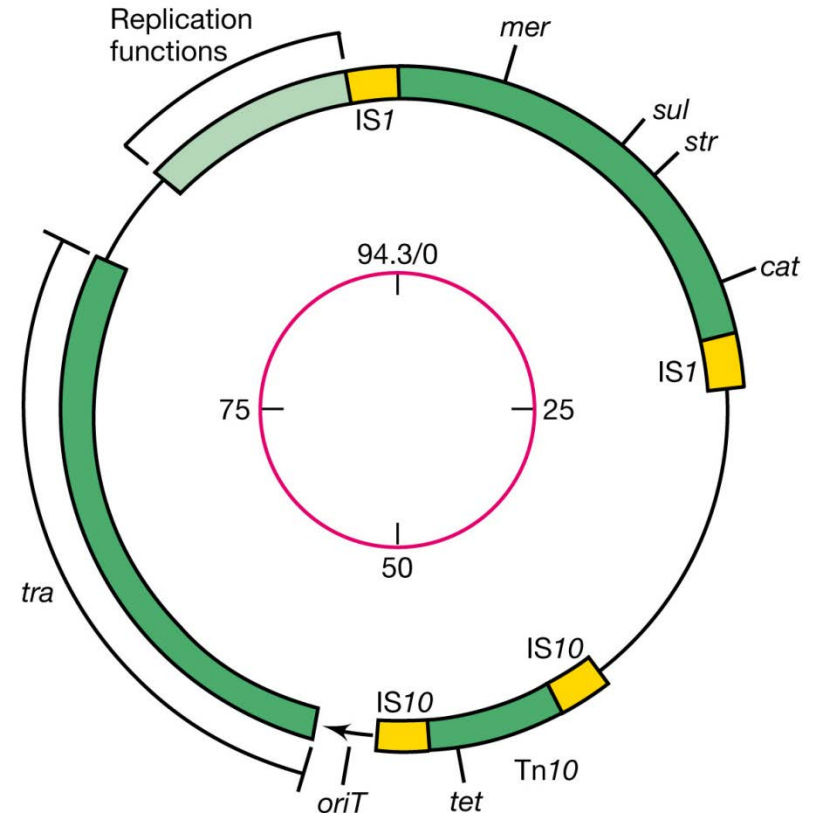
2 **IS10** fiancheggiano il gene per la resistenza alla tetraciclina (Tn10)

Plasmidi contengono numerosi elementi trasponibili sia IS che trasposoni

F

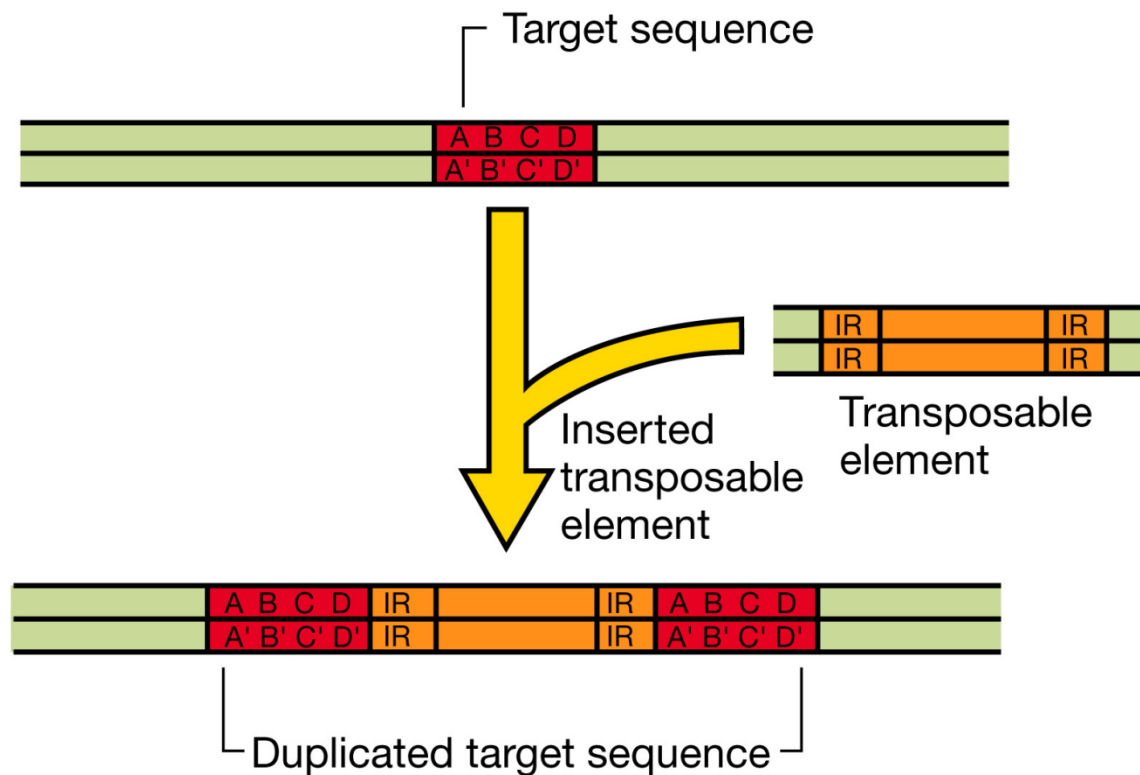


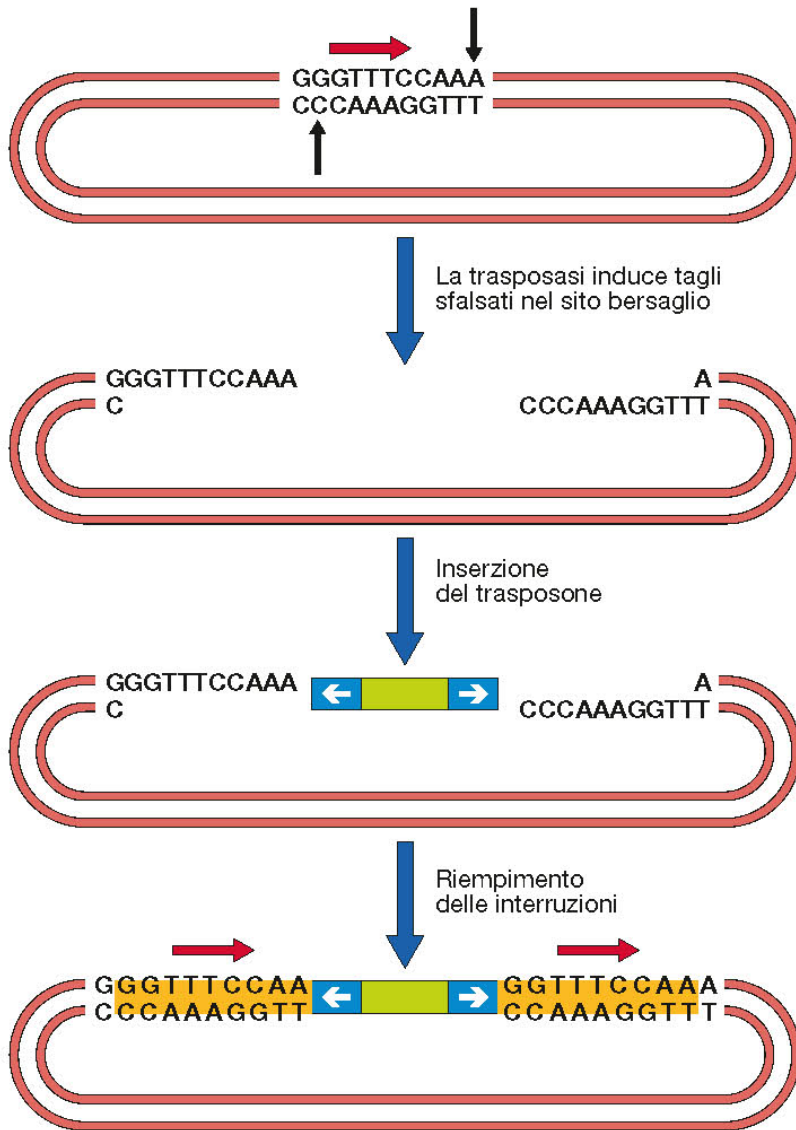
R100



Che cos'è la sequenza bersaglio (target sequence).
E' una sequenza casuale riconosciuta da un elemento
trasponibile

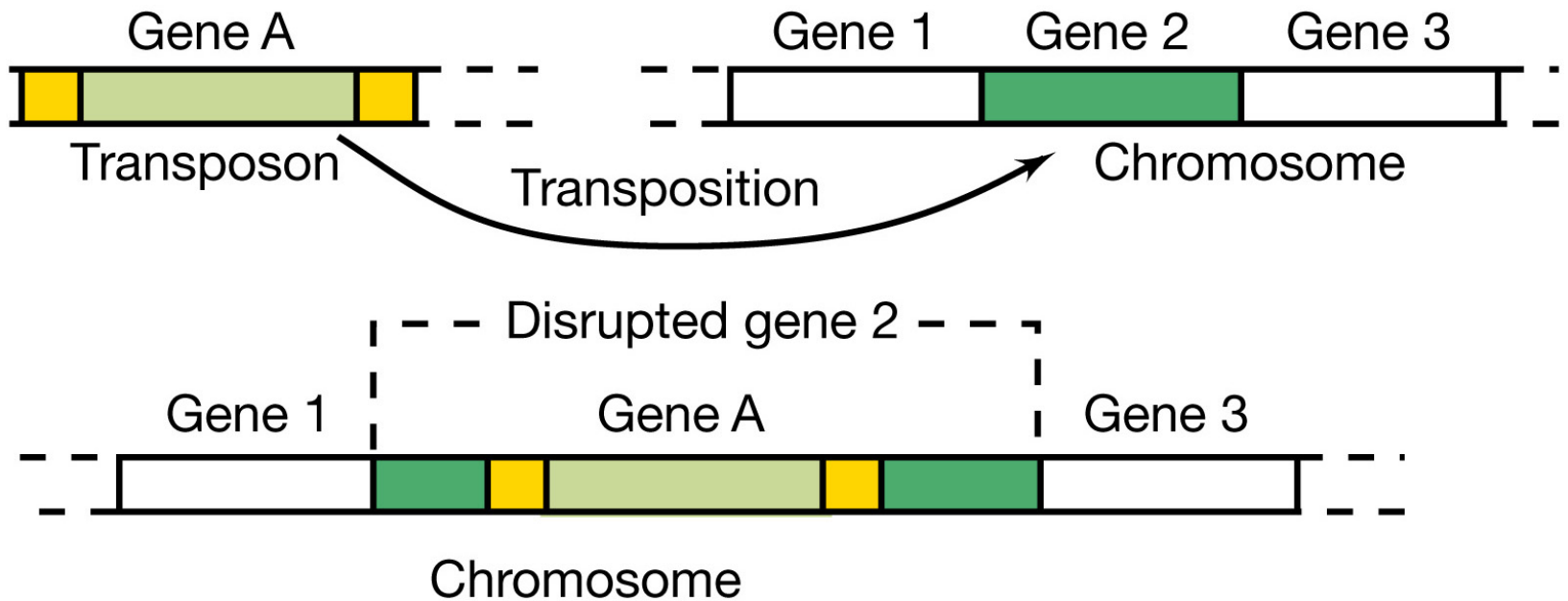
Nella gran parte dei casi non vi è specificità di sequenza
Ogni elemento IS riconosce un numero preciso di basi (da 6 a 8) che poi saranno duplicate





La trasposasi induce un taglio sfalsato di pochi nucleotidi in una sequenza **NON SPECIFICA** sui due filamenti e successivamente la polimerasi PolI riempirà le sequenze a singolo filamento del sito bersaglio generando le **duplicazioni** che sempre fiancheggiano l'elemento trasponibile.

L'inserzione di un elemento trasponibile (IS ,
trasposone ,fago MU) all'interno di un gene ne
inattiva la funzionalità

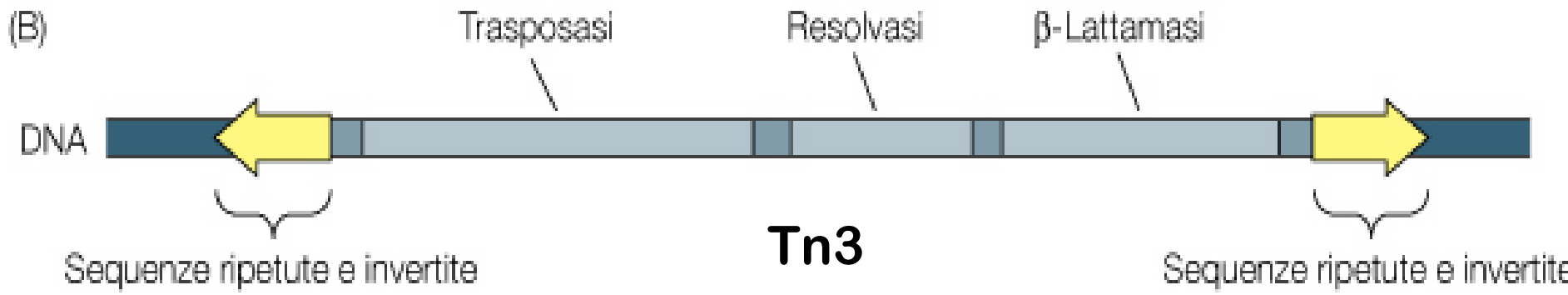
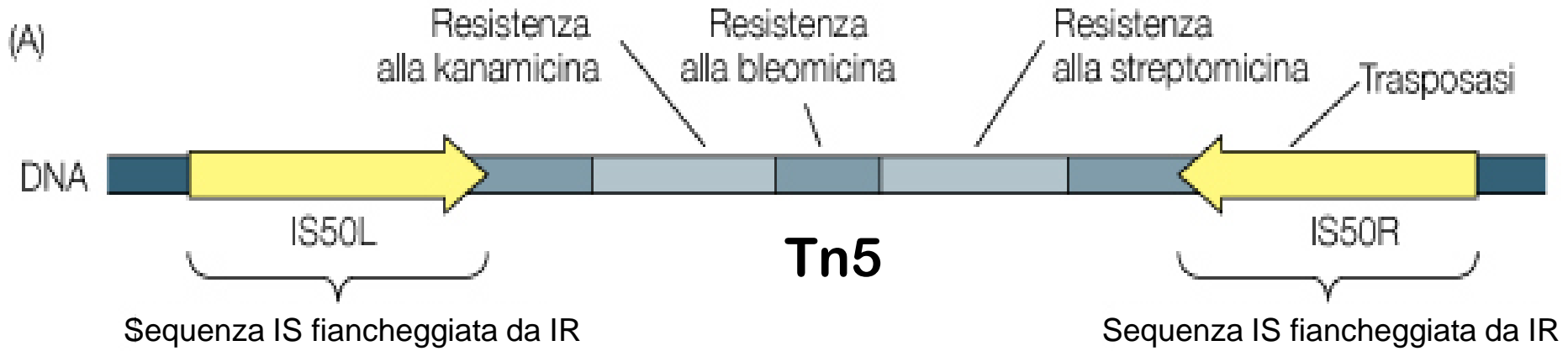


Confronto tra un Tn composto (Tn5) e un Tn semplice (Tn3)

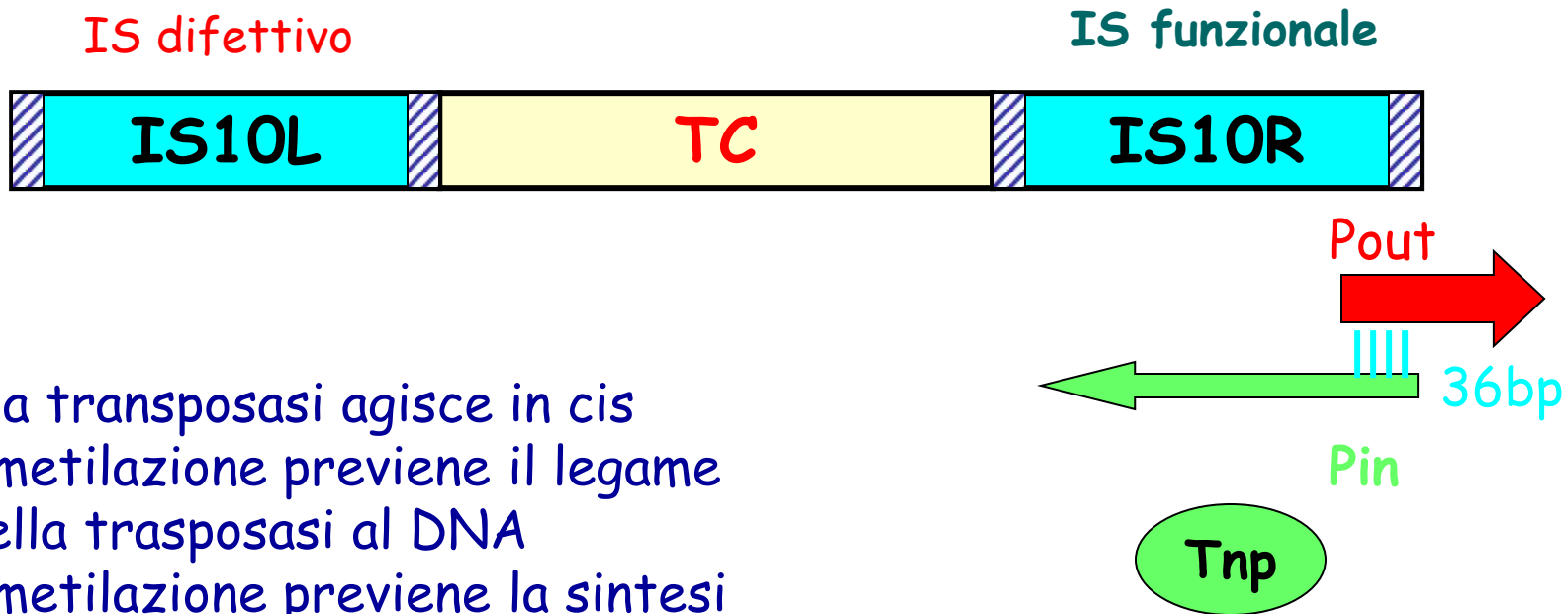
...in Tn5 la trasposasi è codificata dall'elemento IS

...in Tn3 non vi sono IS fiancheggianti

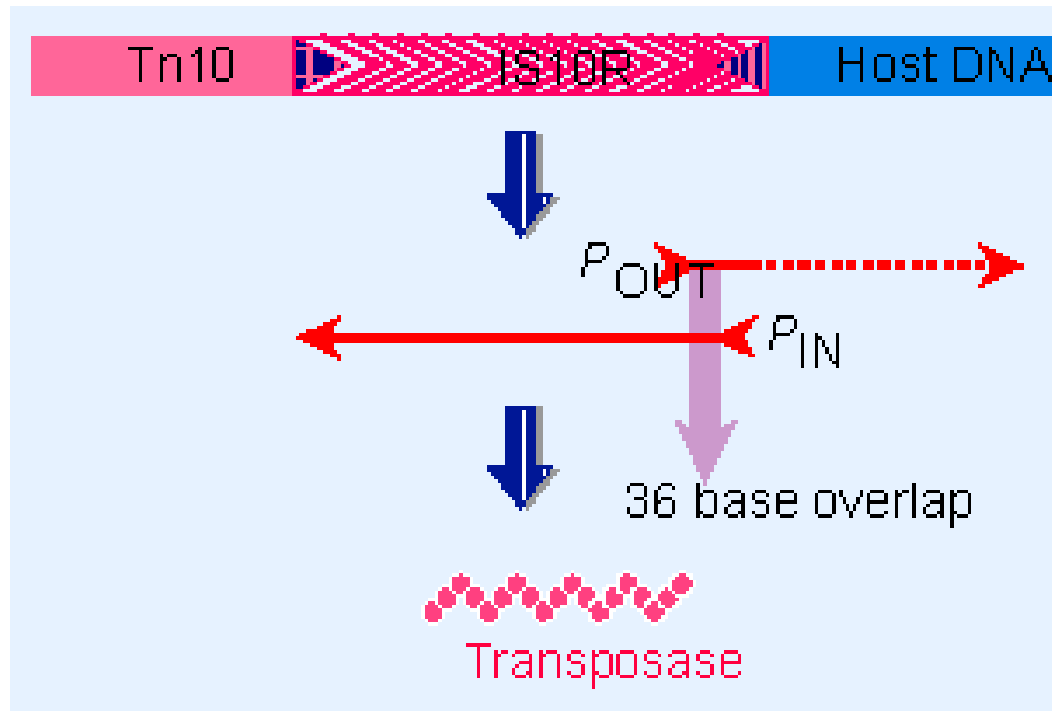
...in Tn3 oltre alla trasposasi è presente la resolvasi



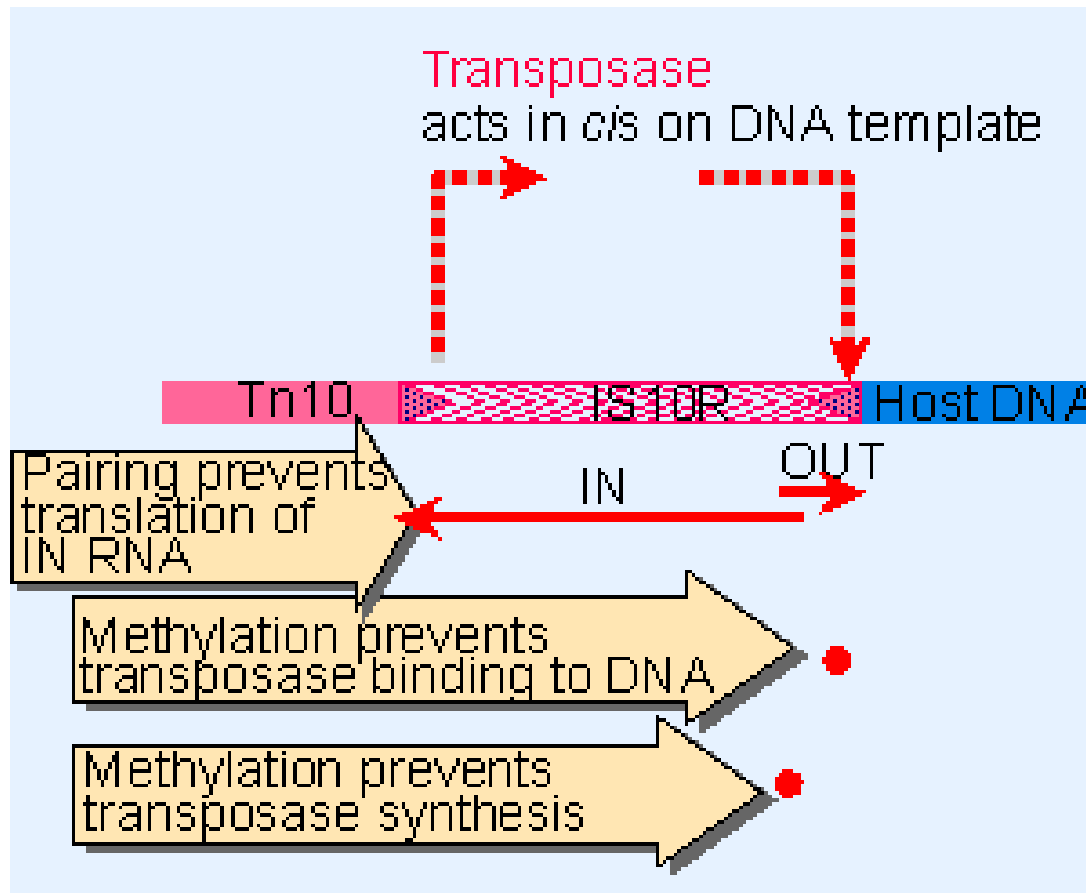
Struttura di Tn10



- la transposasi agisce in cis
- metilazione previene il legame della trasposasi al DNA
- metilazione previene la sintesi della trasposasi

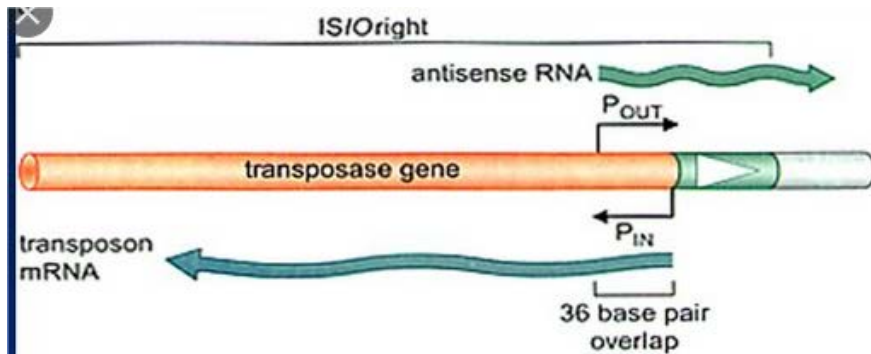


Tn10 è caratterizzato dalla presenza di 2 promotori localizzati all'estremità dell'IS10R. Il promotore forte P_{OUT} promuove la trascrizione verso l'esterno dell'elemento ovvero verso sequenze dell'ospite. Il promotore più debole P_{IN} promuove la trascrizione di un mRNA interno all' IS10R che sarà tradotto nella trasposasi. Il trascritto OUT è un mRNA di 70 nt espresso ad un livello 100 volte superiore rispetto mRNA IN ed è anche molto più stabile di mRNA IN



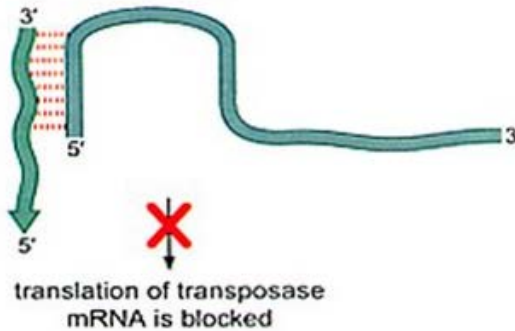
Several mechanisms restrain the frequency of Tn10 transposition, by affecting either the synthesis or function of transposase protein. Transposition of an individual transposon is restricted by methylation to occur only after replication. In multicopy situations, *cis*-preference restricts the choice of target, and OUT/IN RNA pairing inhibits synthesis of transposase.

Regolazione della trasposizione mediata da uno small RNA antisense



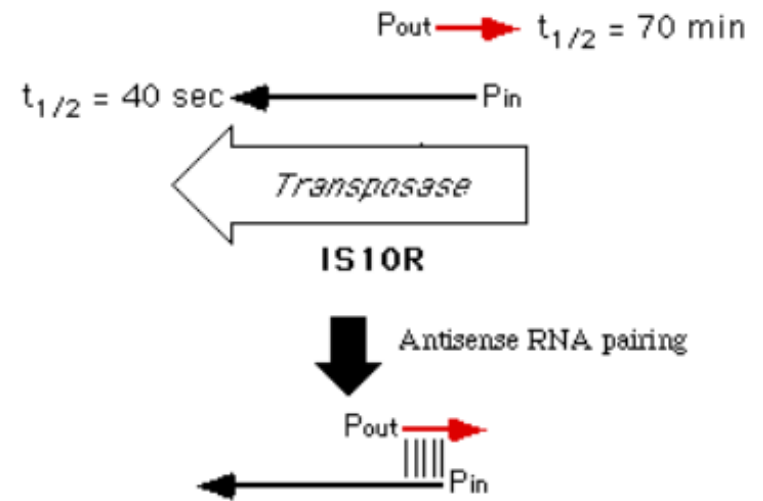
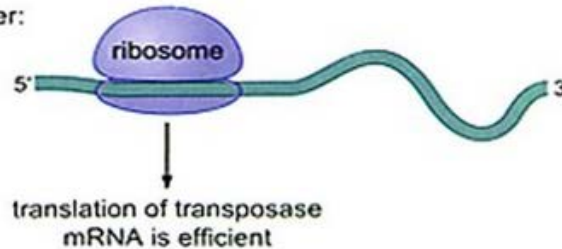
b high *Tn10* copy number:

RNA:RNA pairing is frequent



c low *Tn10* copy number:

RNA:RNA pairing is rare



Prevents ribosomes from binding to translation start sites on transposase mRNA
 \therefore decrease synthesis of transposase

Regolazione della trasposizione mediata dal livello di metilazione

La capacità di Tn10 di trasportare è strettamente correlata alla metilazione effettuata dalla metilasi Dam. La metilasi Dam è in grado di metilare l'Adenina all'interno della sequenza **GATC** sull'elica appena generata durante il processo di replicazione.

In un mutante Dam difettivo la frequenza di trasposizione è aumentata di circa 1000 volte.

Il primo sito di Dam metilazione si trova all'interno della sequenza invertita ripetuta (**IR**) all'estremità dell'IS10R proprio nel sito di legame della trasposasi.

Il secondo sito riconosciuto dalla Dam metilasi si trova all'interno del promotore **P_{IN}** dal quale parte la trascrizione per la sintesi del mRNA della trasposasi

Dam metilasi

Dam metilasi trasferisce un gruppo metilico dalla S-adenosyl-metionina al gruppo aminico dell'adenina nei siti 5'-GATC-3'.

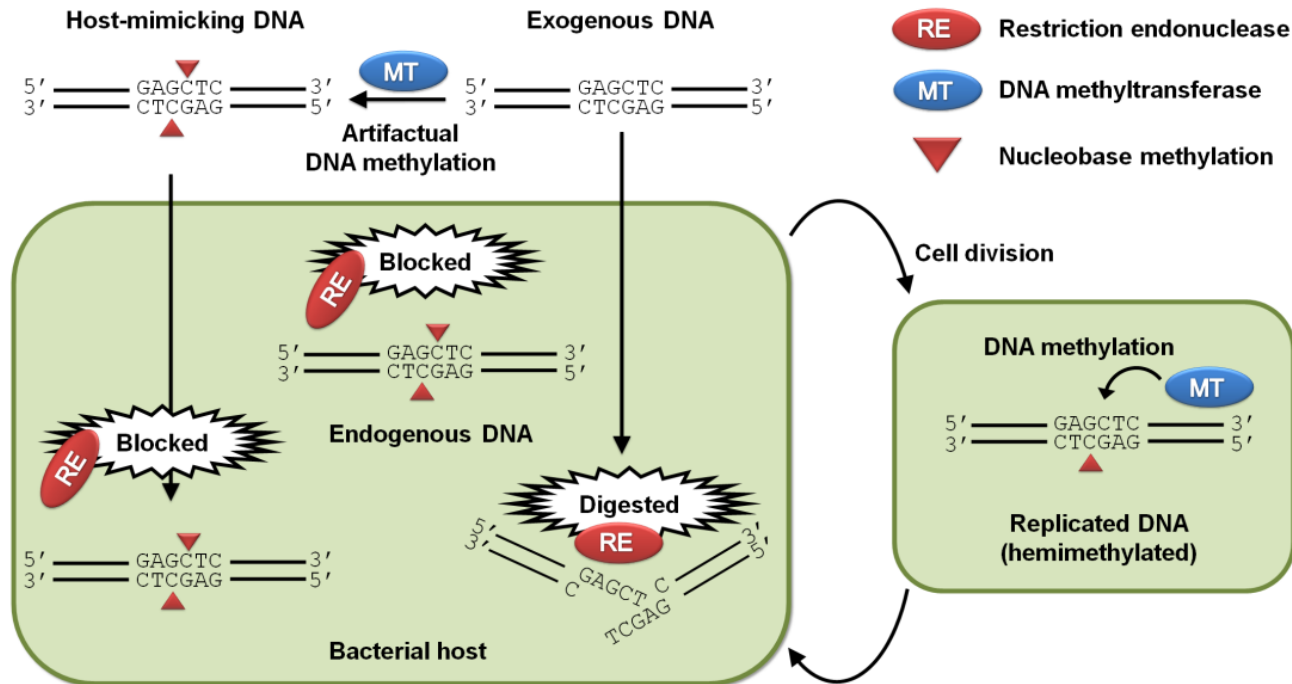
Metilazione avviene poco dopo la replicazione del DNA: il passaggio della forca di replicazione lascia quindi i siti GATC temporaneamente emimetilati.

La DAM metilasi metila con la stessa efficienza sia i siti emimetilati che non metilati.

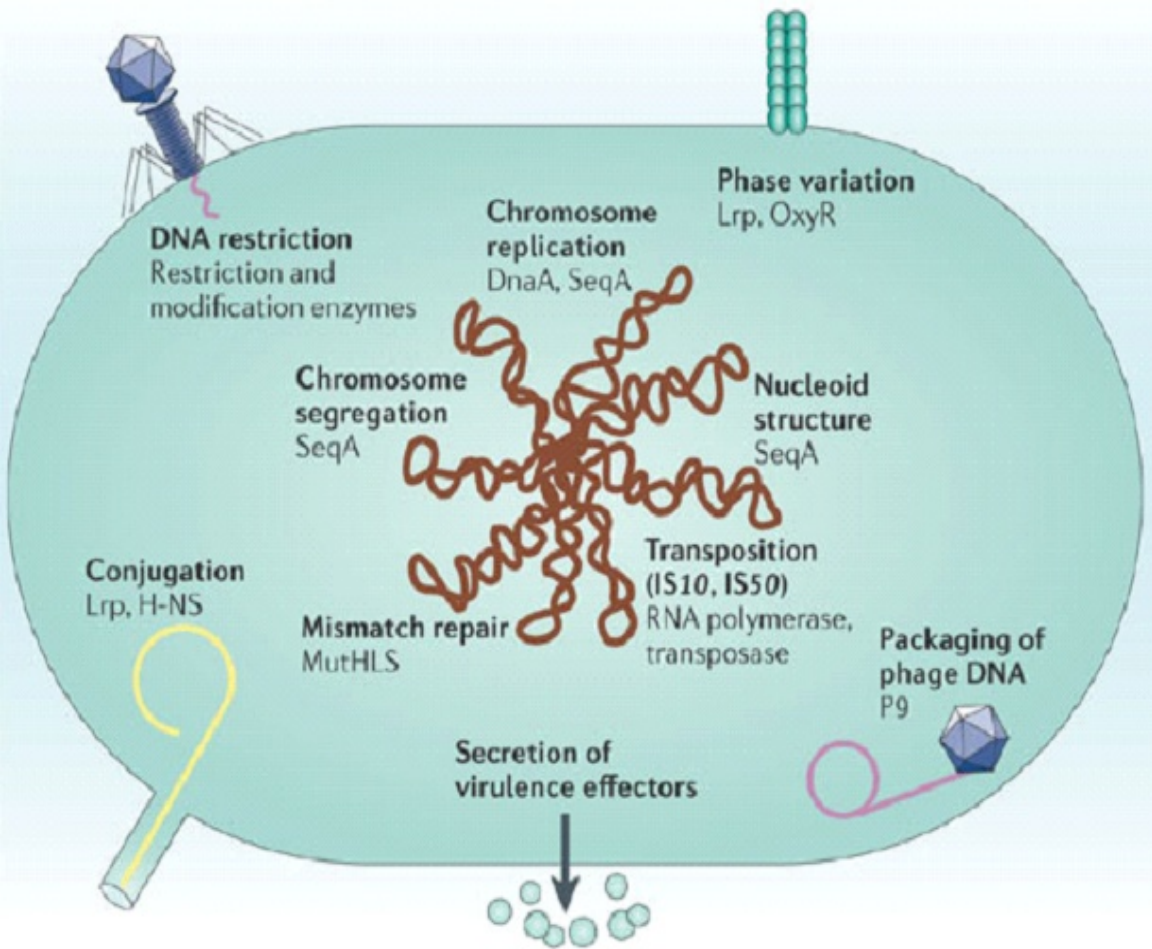
La Dam metilasi mostra omologia con metiltransferasi dei sistemi di restrizione e modificazione quali DpnII e MboIA

Sistemi R-M

Metiltransferasi associate ad enzimi di restrizione che agiscono sulle stesse sequenze e che possono distinguere il DNA *self* dal DNA *non-self*



Ruolo della Dam metilasi nei batteri.

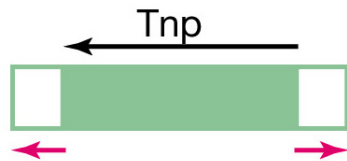


- Fenomeni importanti quali
- il coordinamento temporale della replicazione del DNA,
 - la ripartizione dei cromosomi
 - Il riparo del DNA
 - la coniugazione
 - La trasposizione
- sono sensibili allo stato di metilazione di specifiche regioni di DNA

Tutti questi eventi utilizzano come segnale lo stato di emimetilazione del DNA neoreplicato generatosi per replicazione semiconservativa di una molecola di DNA interamente metilata.

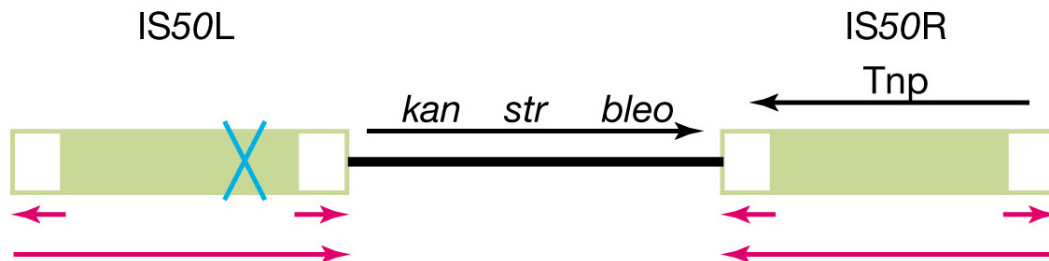
Elementi IS sono elementi trasponibili che codificano solo per funzioni correlate alla trasposizione

IS2



(a)

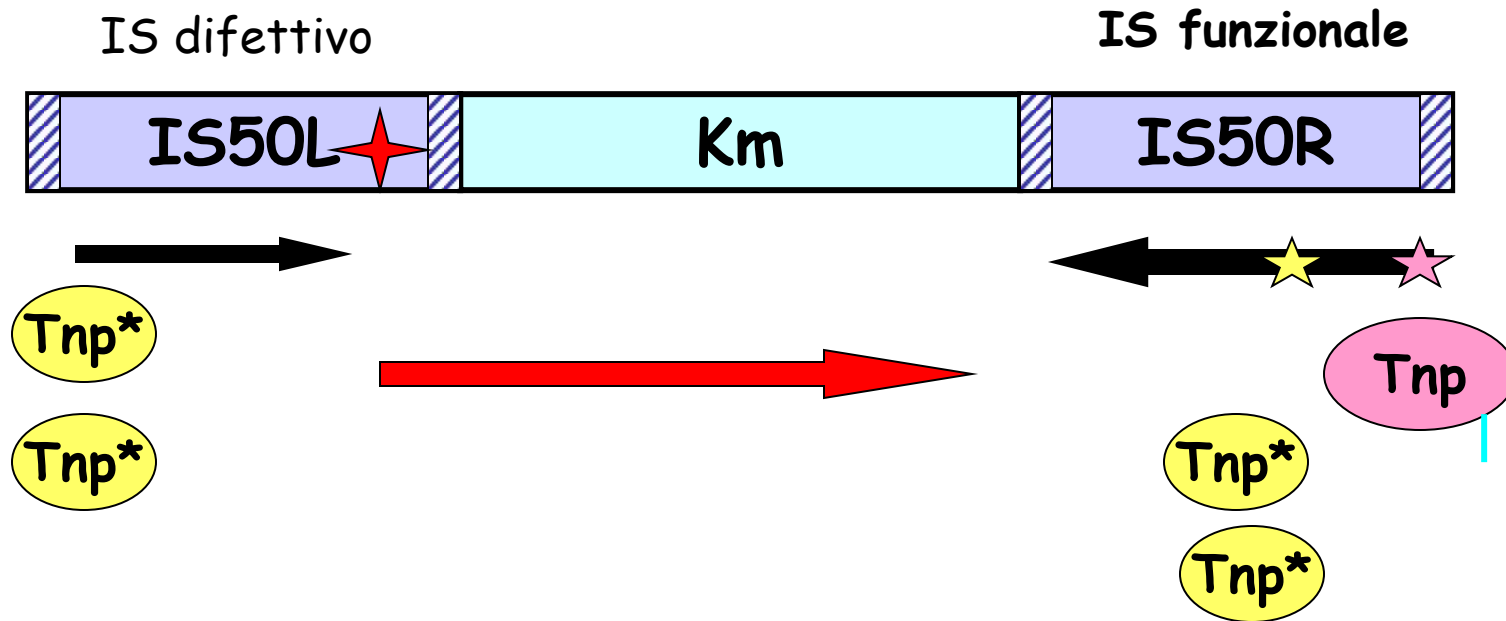
Tn5

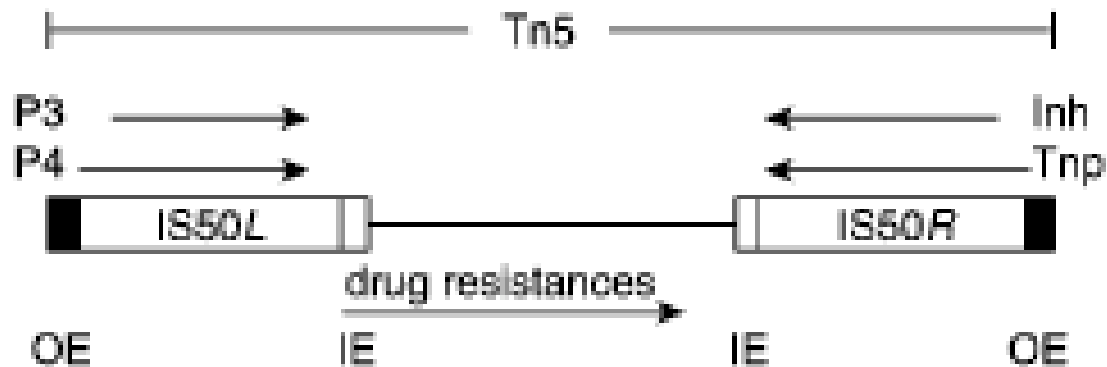


(b)

I trasposoni composti sono costituiti da due elementi IS che fiancheggiano una sequenza genica contenenti vari tipi di geni quali determinanti di antibiotico resistenza, tossine o altri geni di virulenza

Struttura di Tn5

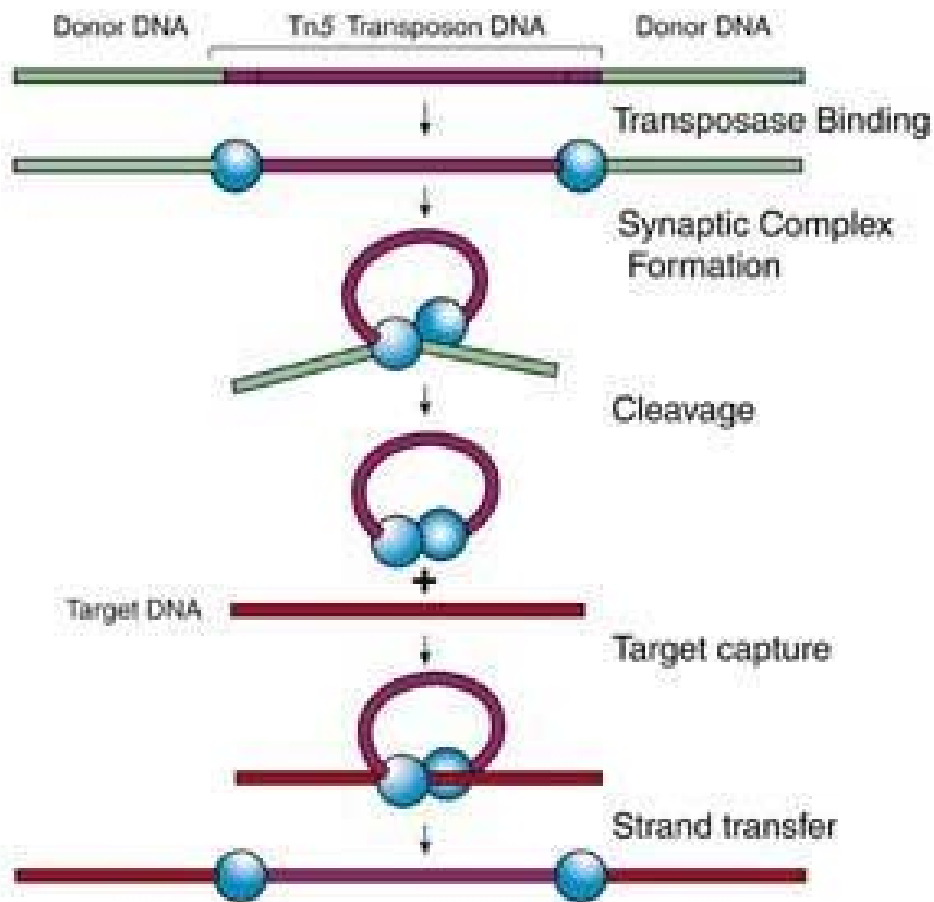




The IS50 proteins

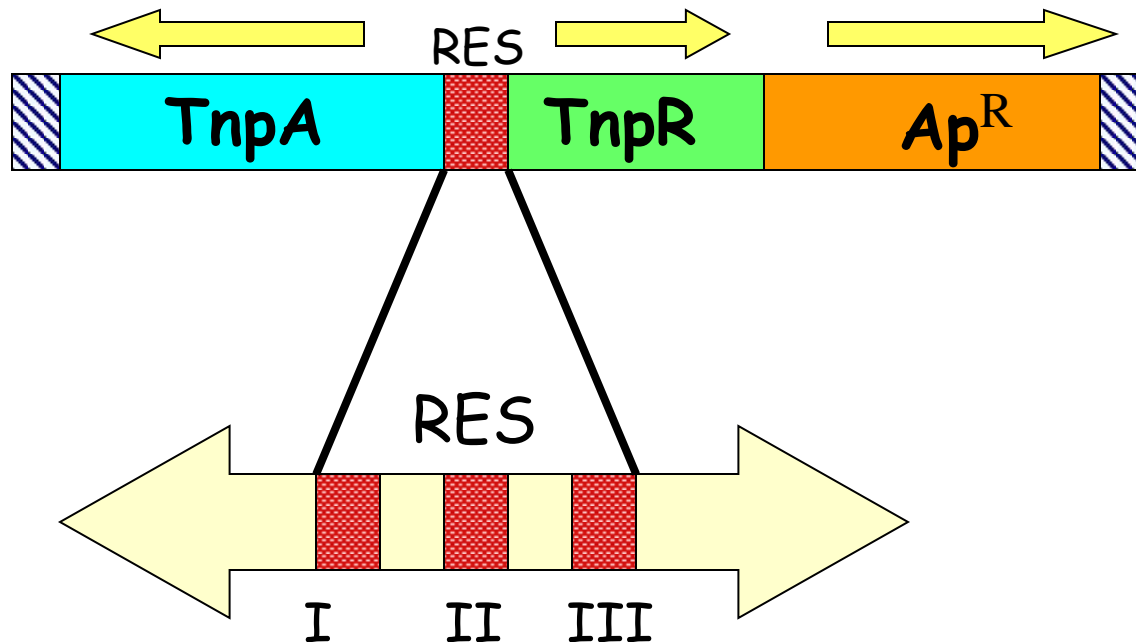
Tnp - 476aa (P1)	P3 - 450aa
Inh - 421aa (P2)	P4 - 395aa

L'inibitore della trasposasi (Inh) è trascritto sul medesimo mRNA della trasposasi ma viene tradotto a partire da un sito più a valle e perde i primi 55 AA che sono essenziali per il riconoscimento della sequenze all'estremità dell'elemento IS. Le proteine P3 e P4 sono simili alla trasposasi ma difettive e quindi competono con la trasposasi ma non sono funzionali.

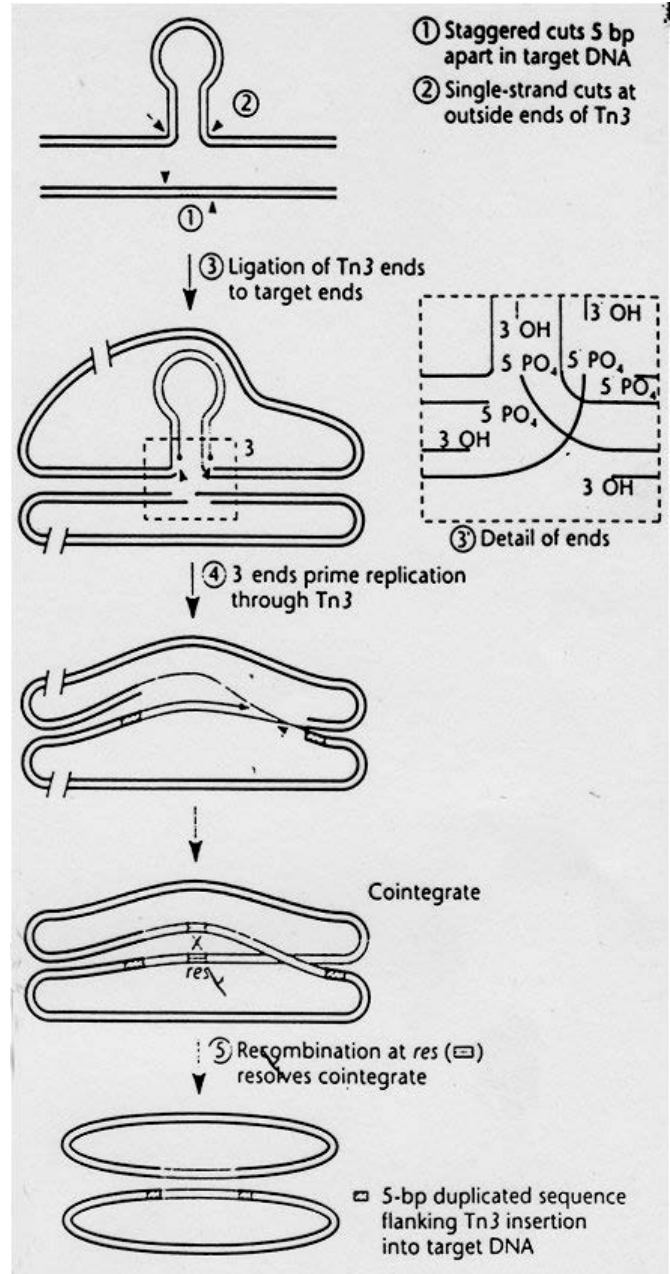


Struttura dei trasposoni di tipo Tn3 (TnAp)

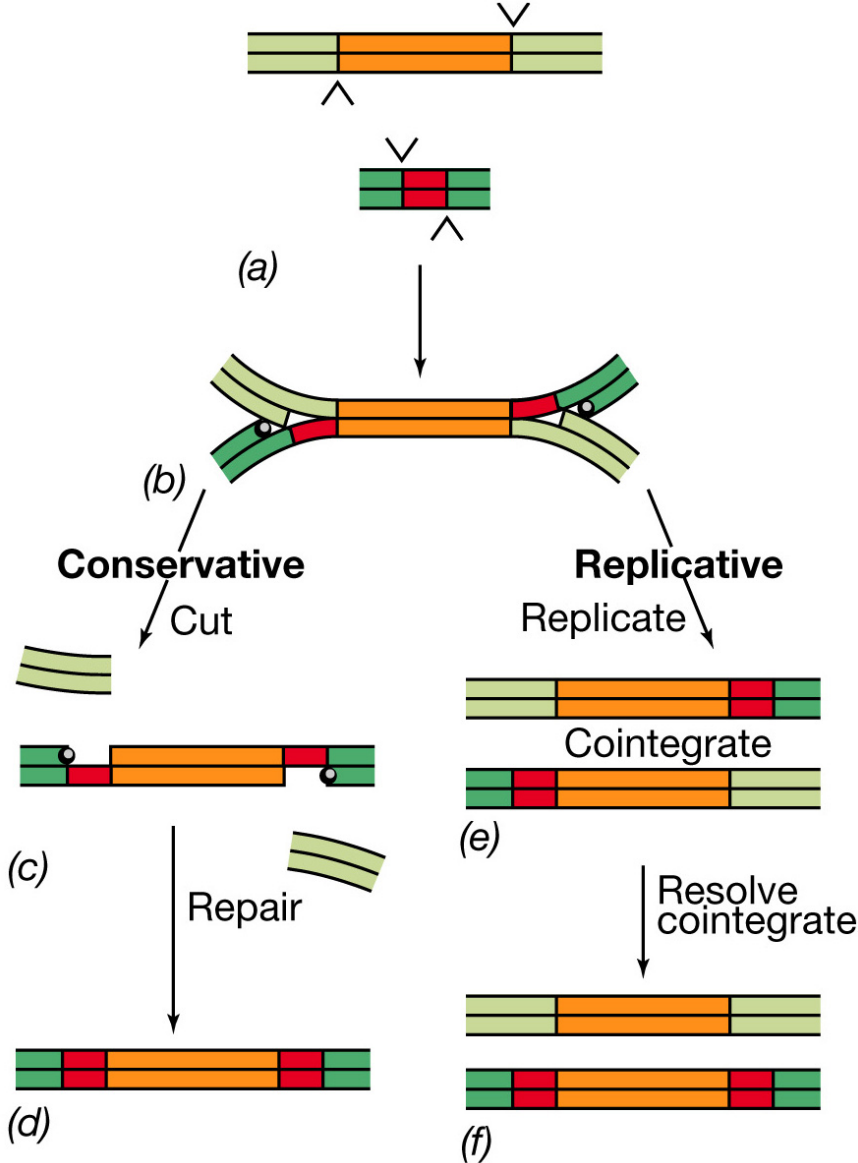
Modalità di trasposizione di tipo replicativo



TnpR resolvasi e repressore della trasposasi



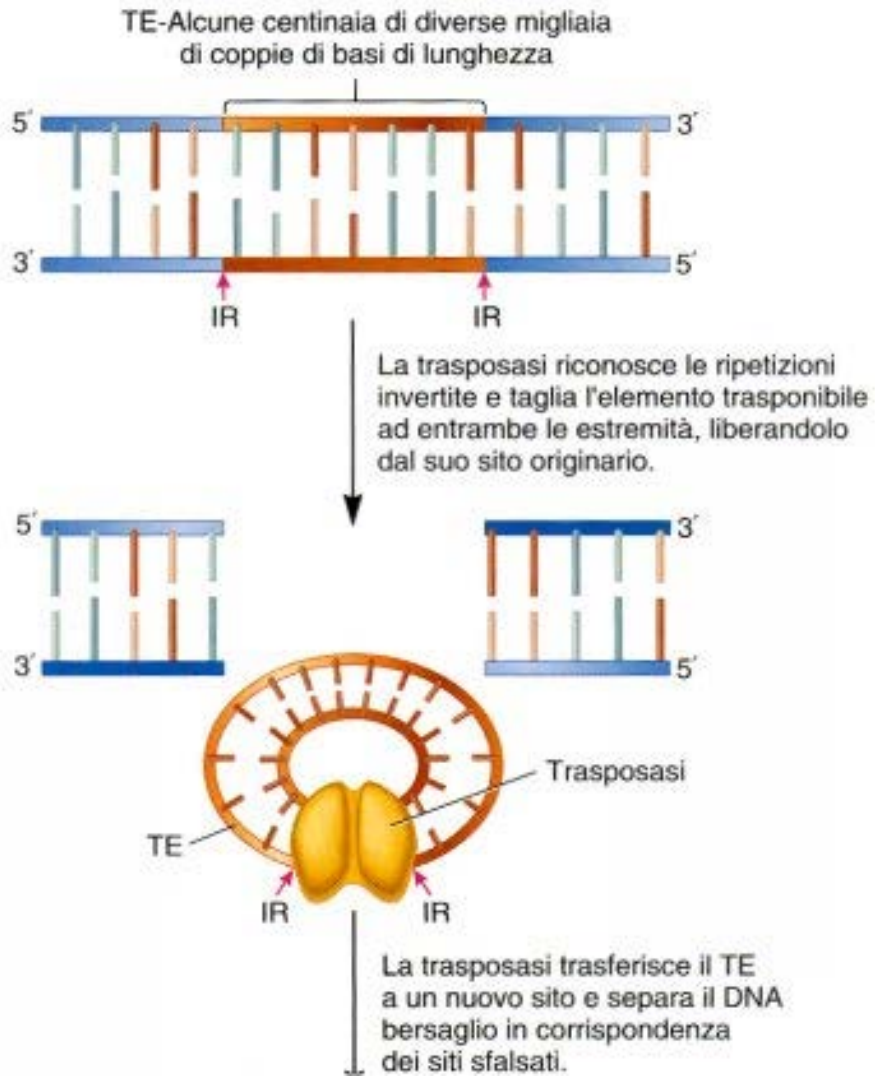
Due tipi di trasposizione: Conservativa Replicativa



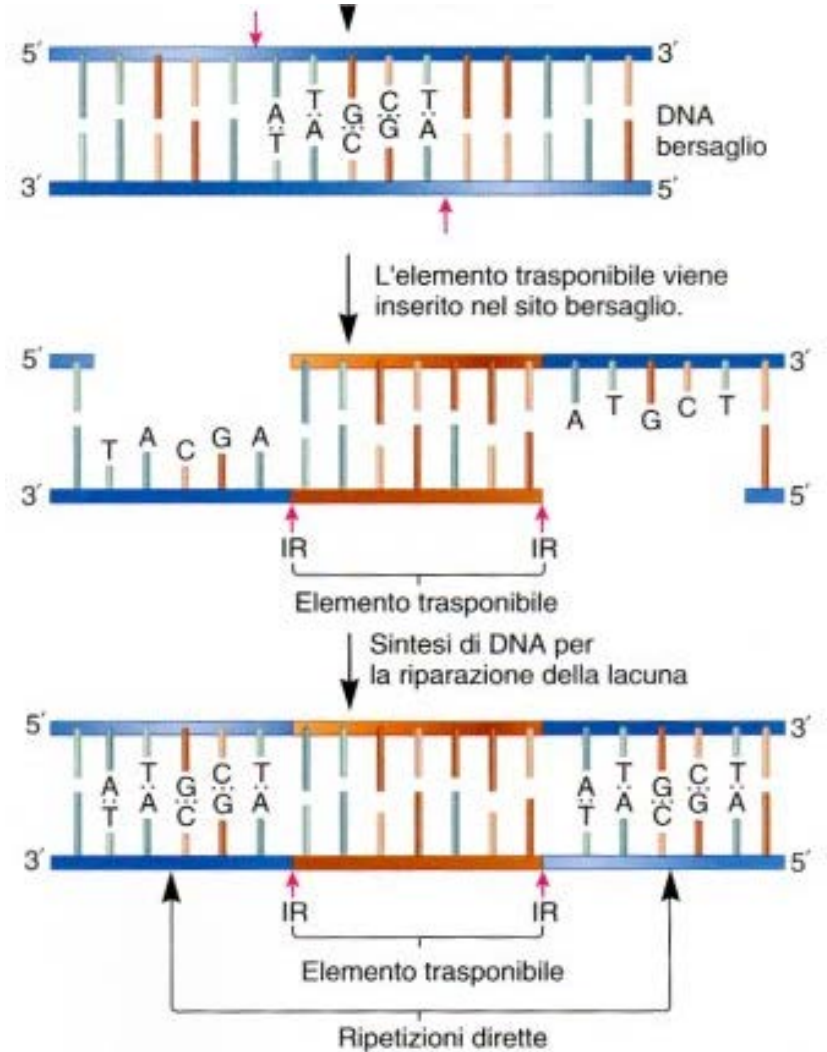
Trasposizione conservativa o semplice

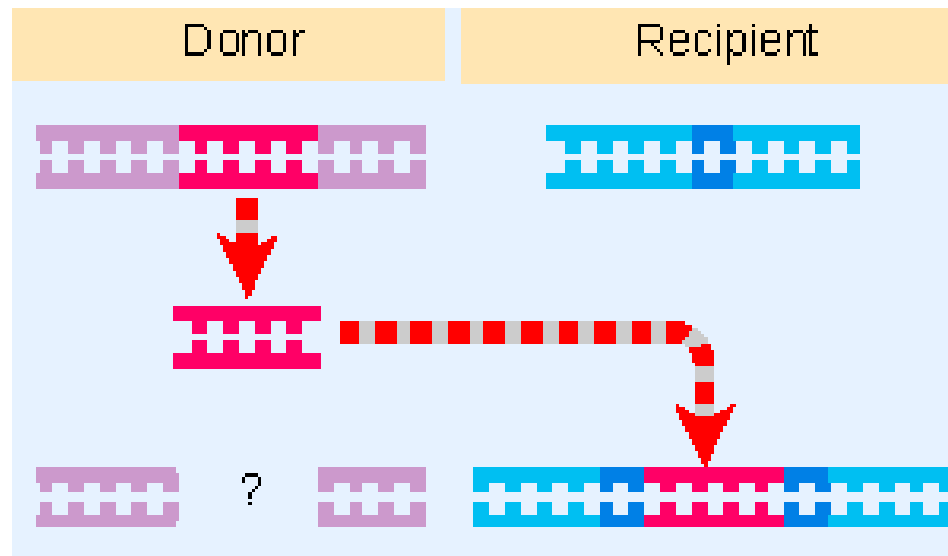
- viene effettuato un taglio sui due filamenti del DNA donatore sia al 5' che al 3'
- viene effettuato un taglio sfalsato sulla molecola del recipiente (5' e 3')
- il trasposone viene exciso dalla molecola donatore
- il trasposone si traspone nella molecola recipiente
- la DNA polimerasi I aggiunge le basi mancanti sulla molecola del recipiente laddove è avvenuto il taglio sfalsato
- si generano quindi delle brevi sequenze (5-8 bp) direttamente ripetute all'estremità del trasposone.
- la lunghezza delle sequenze direttamente ripetute corrisponde al numero di basi a SS generate dal taglio sfalsato

La trasposizione semplice: taglio su entrambe le eliche al 5' e al 3'



TE= Elemento Trasponibile





La trasposizione conservativa, si ha perdita della molecola donatore. Se non si ha riparo, l'elemento trasponibile si troverà quindi solo sulla nuova molecola

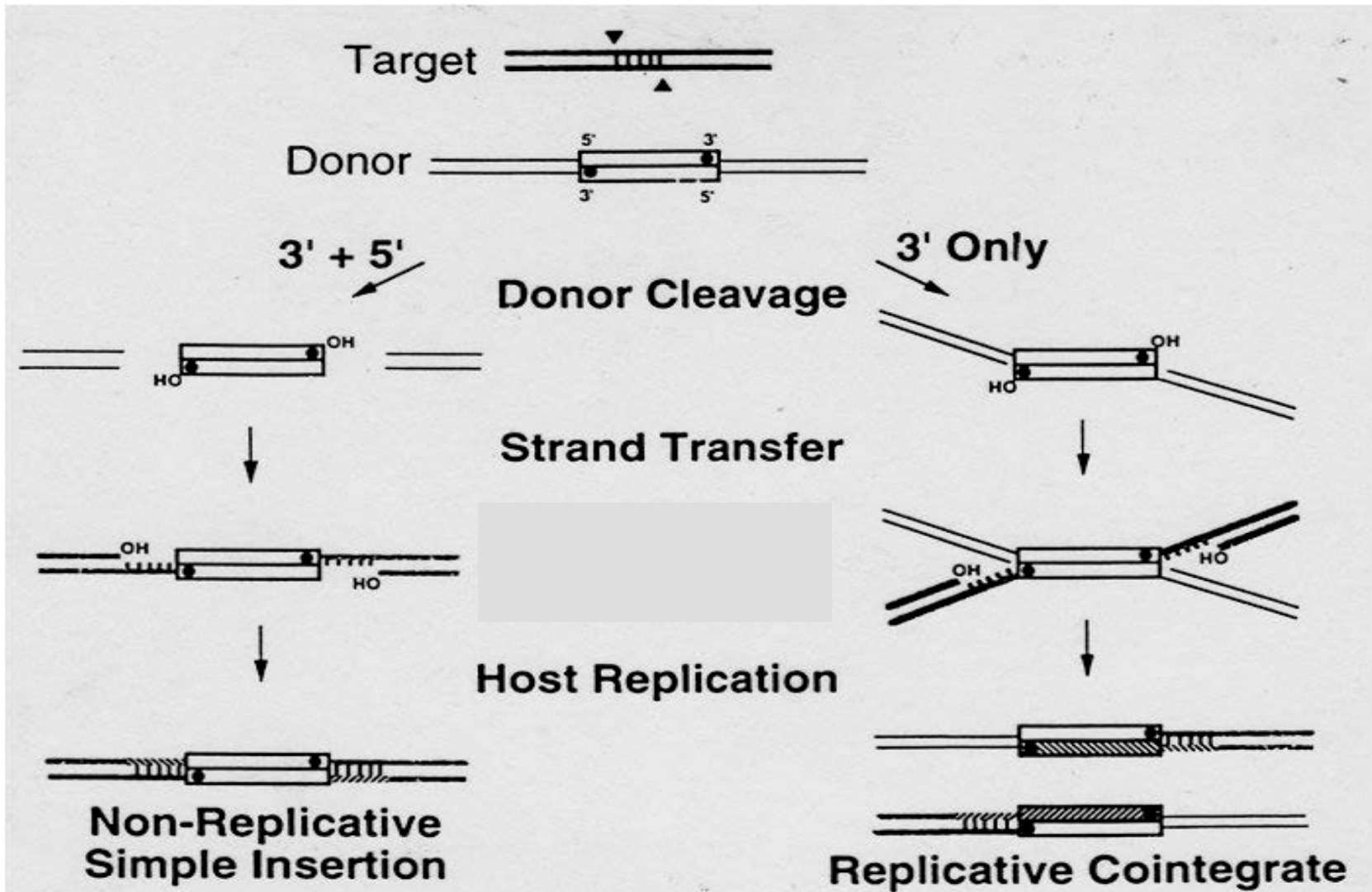
Trasposizione replicativa

viene effettuato un taglio sui due filamenti del DNA donatore **solo al 3'**

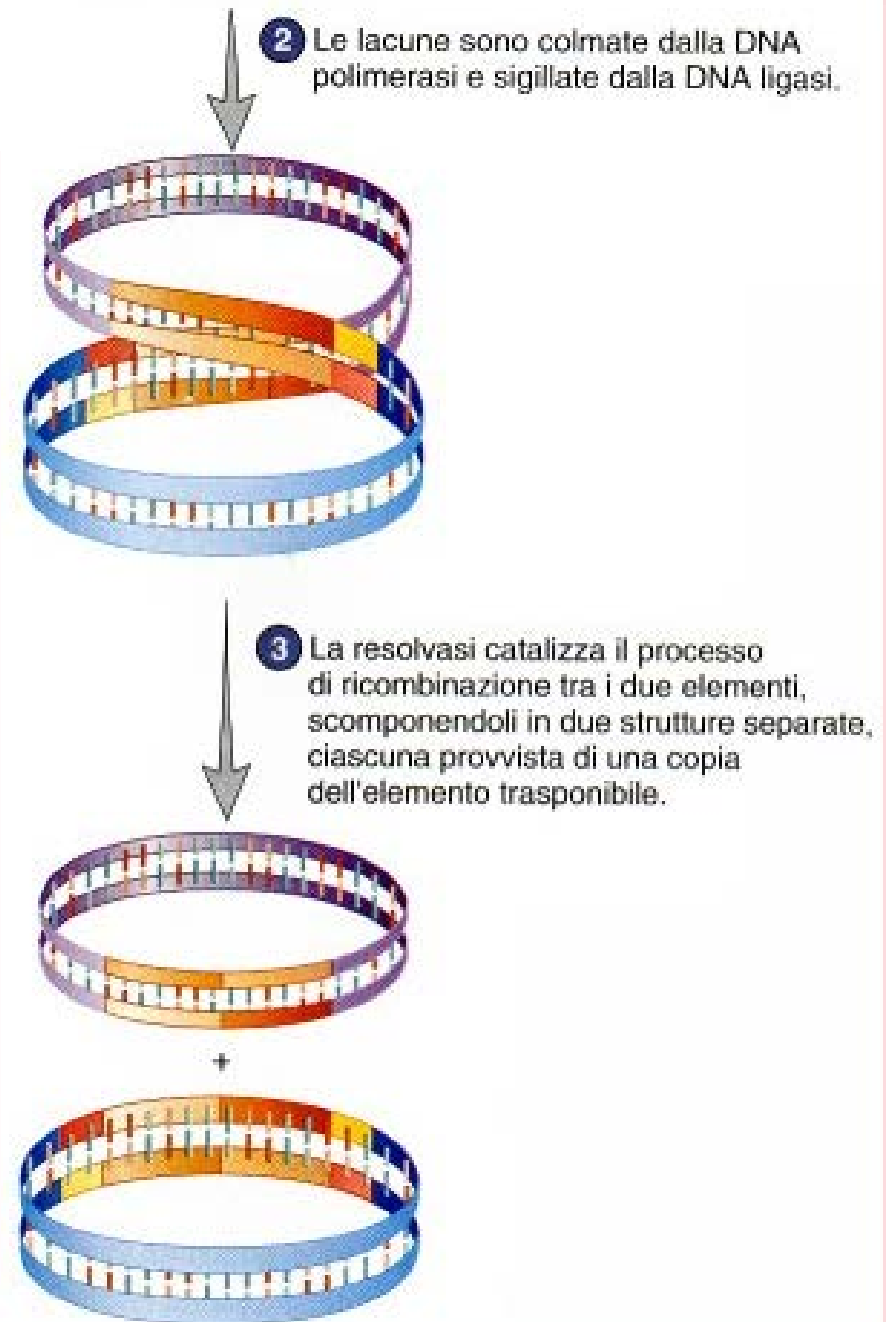
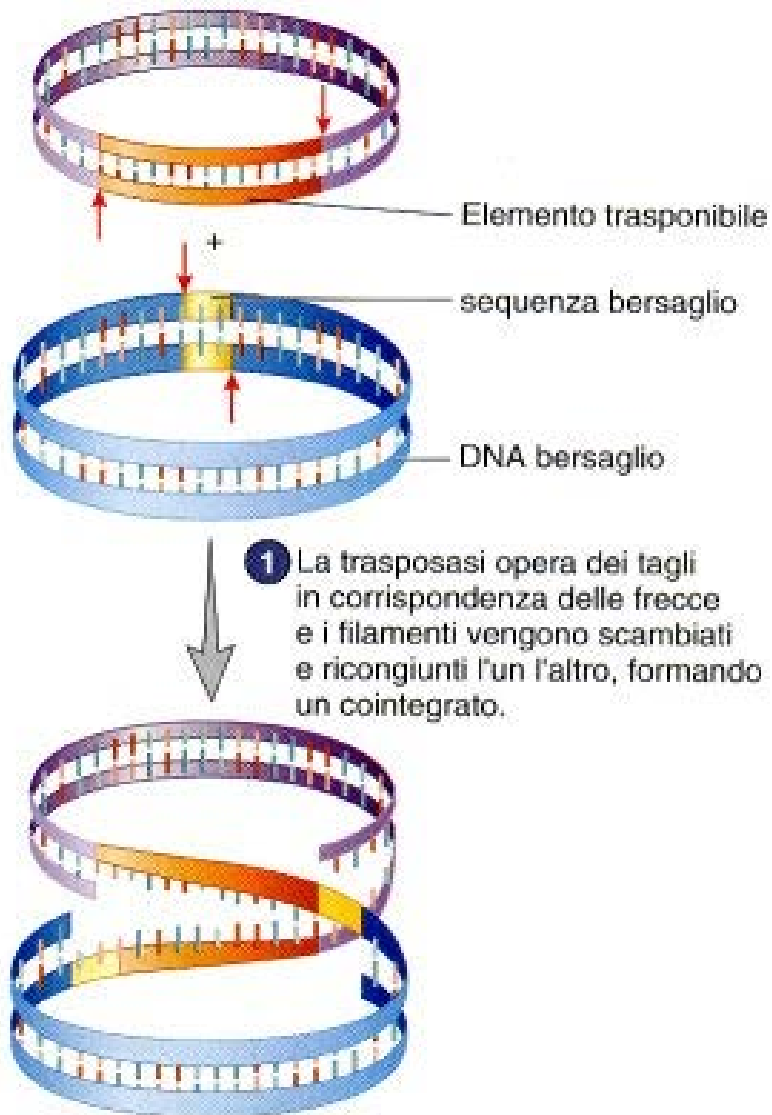
- viene effettuato un taglio sfalsato sulla molecola del recipiente (5' e 3')
- il trasposone prende contatto con le estremità della molecola recipiente rimanendo inserito nella molecola del donatore
- la DNA polimerasi replica la sequenza corrispondente all'intero trasposone oltre alle basi mancanti sulla molecola del recipiente laddove è avvenuto il taglio sfalsato.
- Si genera quindi una seconda copia dell'elemento trasponibile

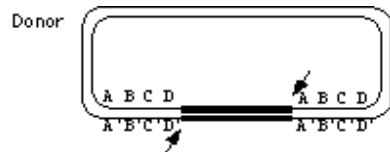
Trasposizione conservativa e replicativa a confronto:

si noti il taglio solo al 3' (replicativa) e al 3' e 5' (conservativa) nella molecola donatore



La trasposizione replicativa

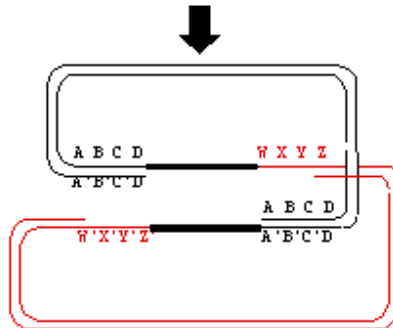




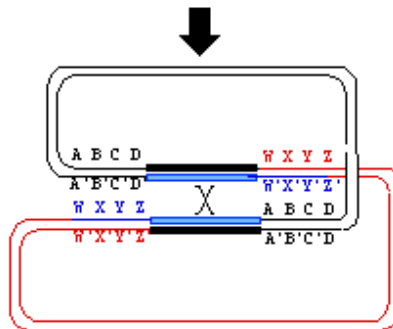
The donor DNA molecule is nicked by transposase yielding a 3'-OH at each end



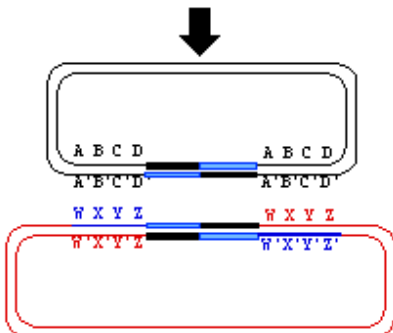
The recipient DNA molecule is nicked by transposase yielding a 5'-PO₄ at each end of target DNA sequence. The distance between the cleavage sites in the target sequence equals the length of the target site duplication after transposition.



Donor and recipient strands separate at nicks; the 3'-OH at the end of the transposon is ligated to the 5'-PO₄ from the target sequence.

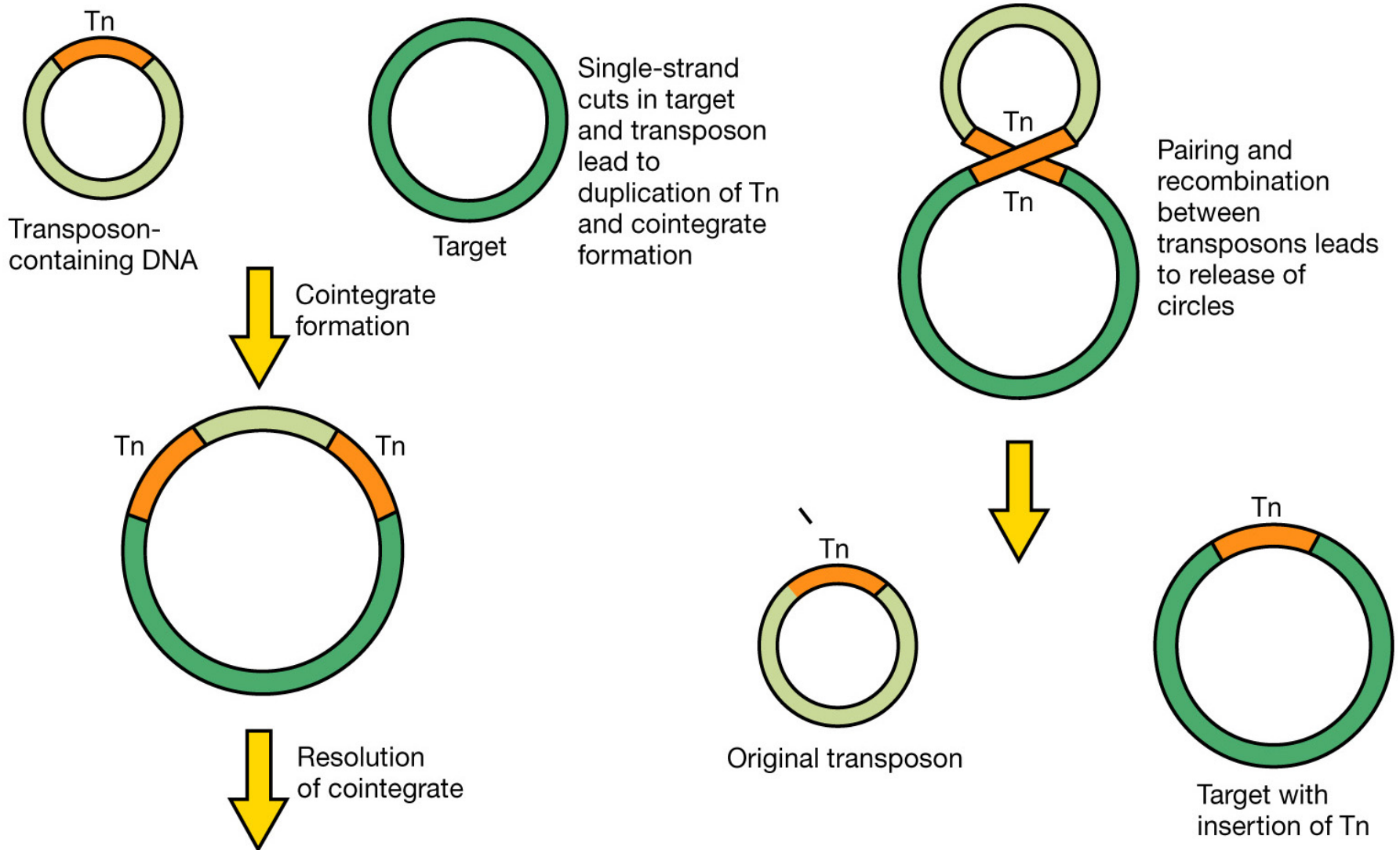


DNA replication fills in the ssDNA on both strands, copying the transposon and adjacent target sequences. The resulting molecule with the two plasmids joined is called a cointegrate.



Recombination between the duplicated transposon sequences separates the two DNA molecules, resulting in a donor plasmid with a transposon insertion at the original site, and a recipient plasmid with a transposon at a new site with a short direct repeat of flanking DNA sequences.

Trasposizione di tipo replicativo si viene a formare un cointegrato che verrà poi risolto ad opera della resolvasi

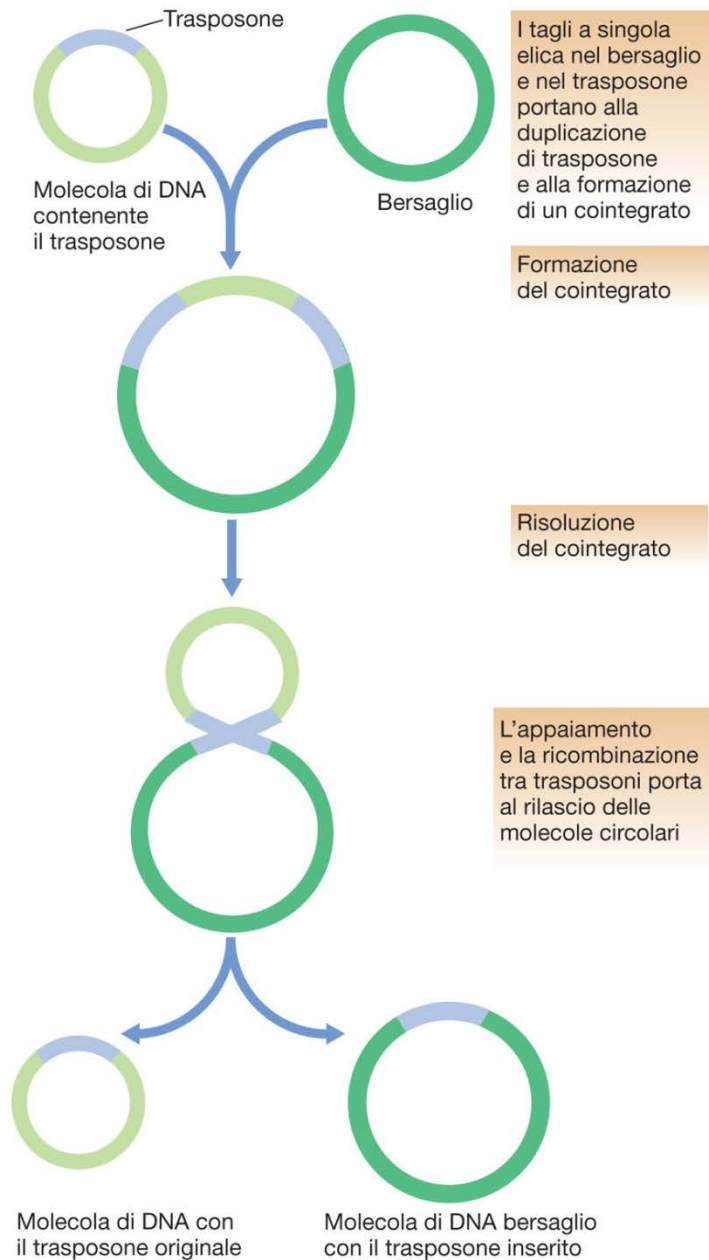


Le MOLECOLE di DONATORE e RECIPIENTE
RIMANGONO UNITE in UNA STRUTTURA definita
COINTEGRATO

Per la risoluzione del COINTEGRATO interviene una
proteina definita RESOLVASI codificata solo dai
trasposoni di tipo replicativo (es. Tn3)

RISULTATO della TRASPOSIZIONE REPLICATIVA
Una copia del Tn sulla molecola donatore e una copia
del Tn sulla molecola recipiente

Analogamente alla replicazione conservativa si
generano delle brevi sequenze (5-8 bp) direttamente
ripetute all'estremità del trasposone.

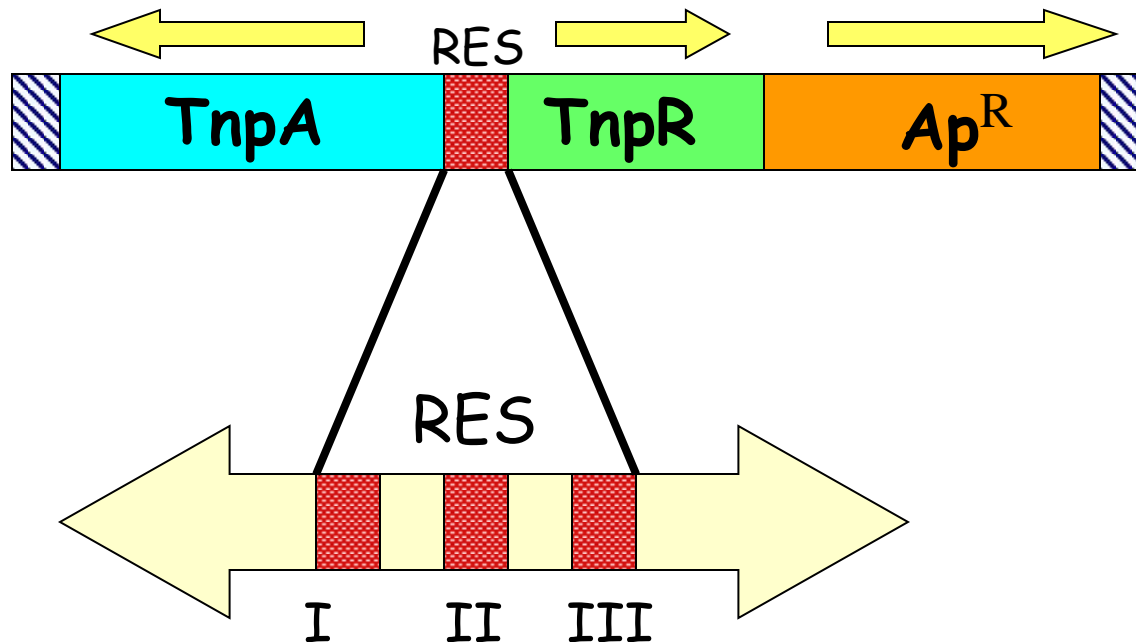


Formazione e risoluzione del cointegrato

È necessaria una proteina la **RESOLVASI** codificata dai soli Tn con replicazione replicativa (tipo Tn3 o TnAp) che riconosce le sequenze **RES** ed effetto taglio e riunione liberando la molecole di donatore e recipiente

Struttura dei trasposoni di tipo Tn3 (TnAp)

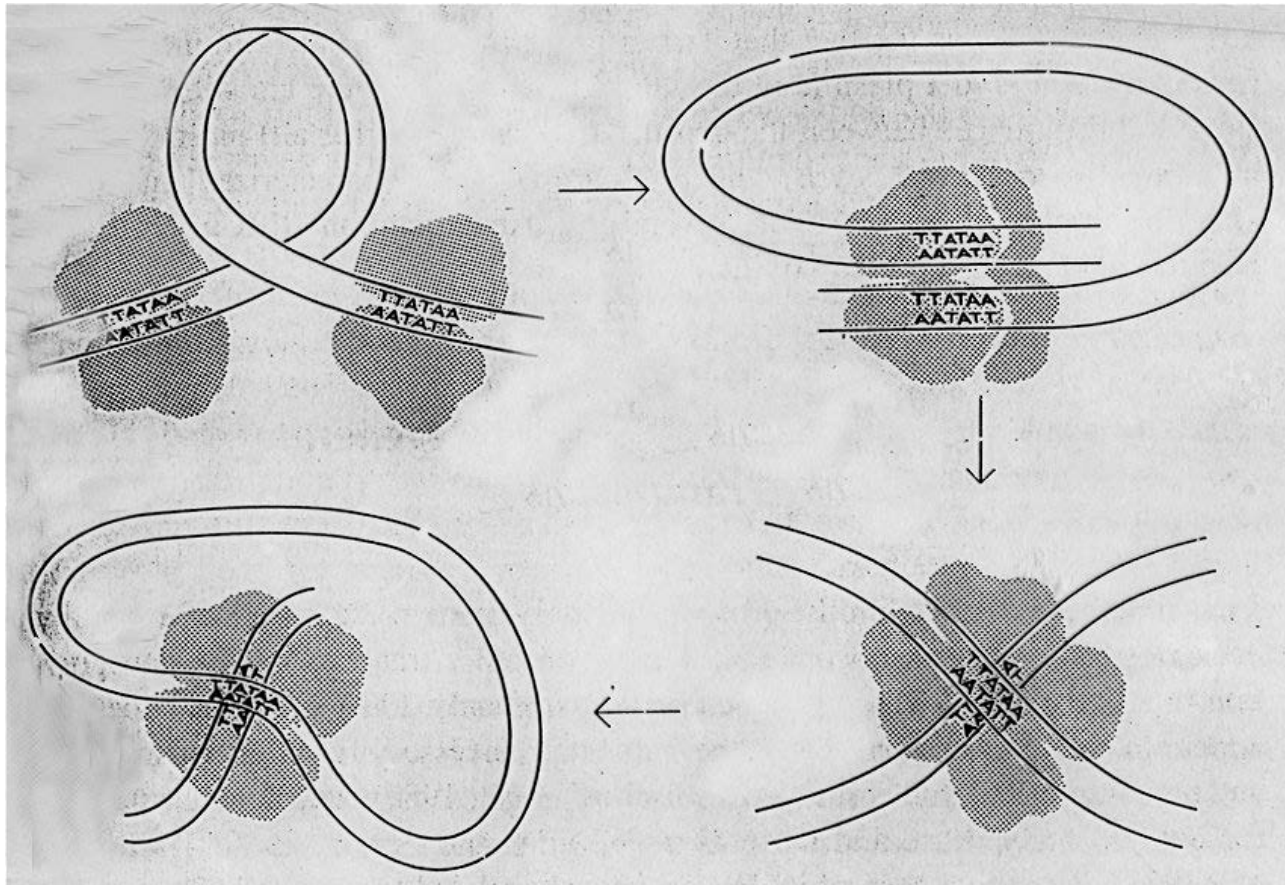
Modalità di trasposizione di tipo replicativo

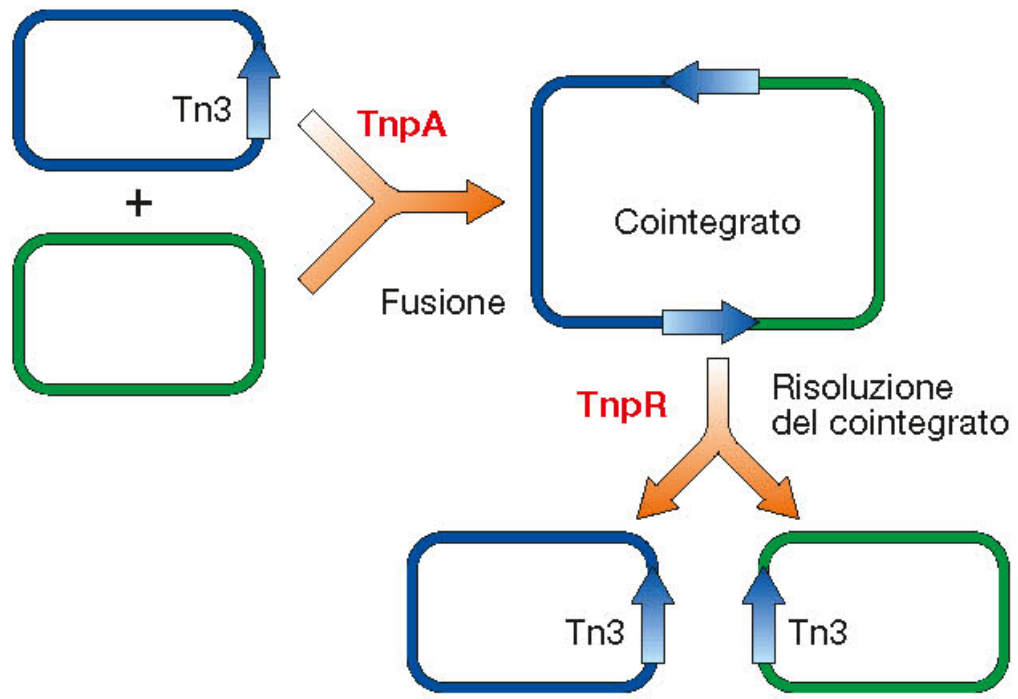


TnpR resolvasi e repressore della trasposasi

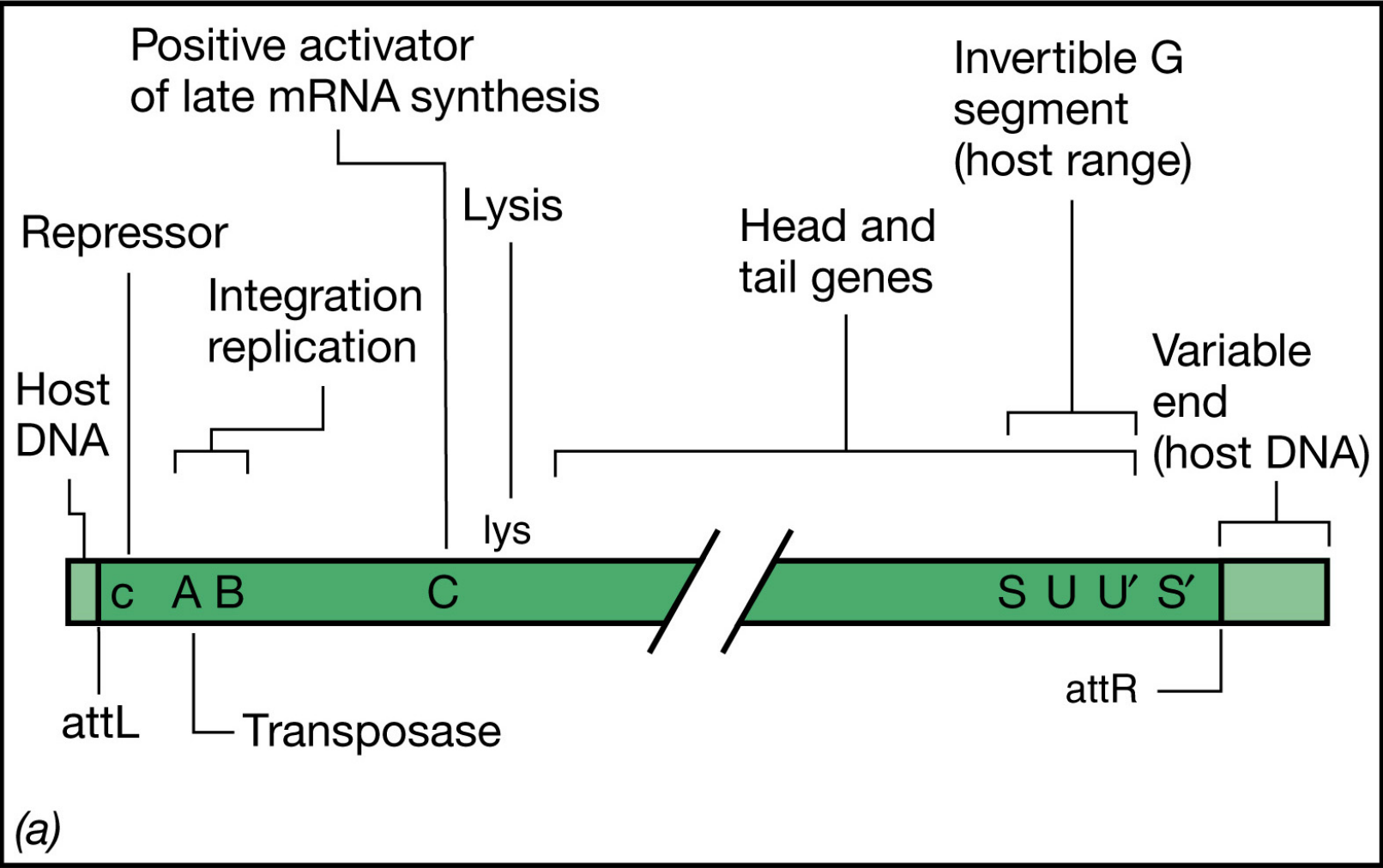
Risoluzione del COINTEGRATO

- Resolvasi in forma di dimero si lega a brevi sequenze di DNA del trasposone
- L'interazione tra le diverse subunità riavvicina i due trasposoni
- La resolvasi induce lo scambio e la scissione del cointegrato

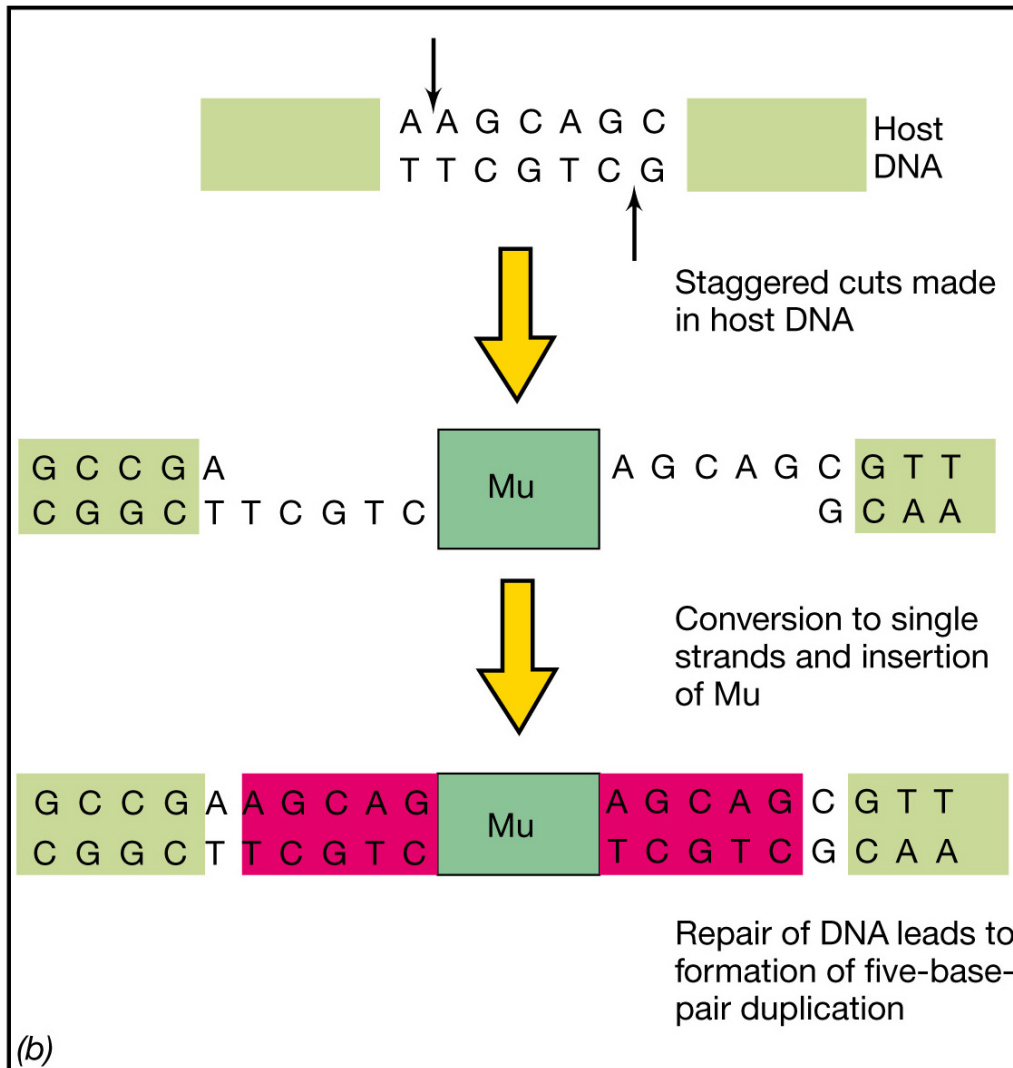




Il fago MU : un trasposone con funzioni virali



Il fago MU si inserisce in un sito casuale del genoma e provoca duplicazione diretta della sequenza in cui si è inserito

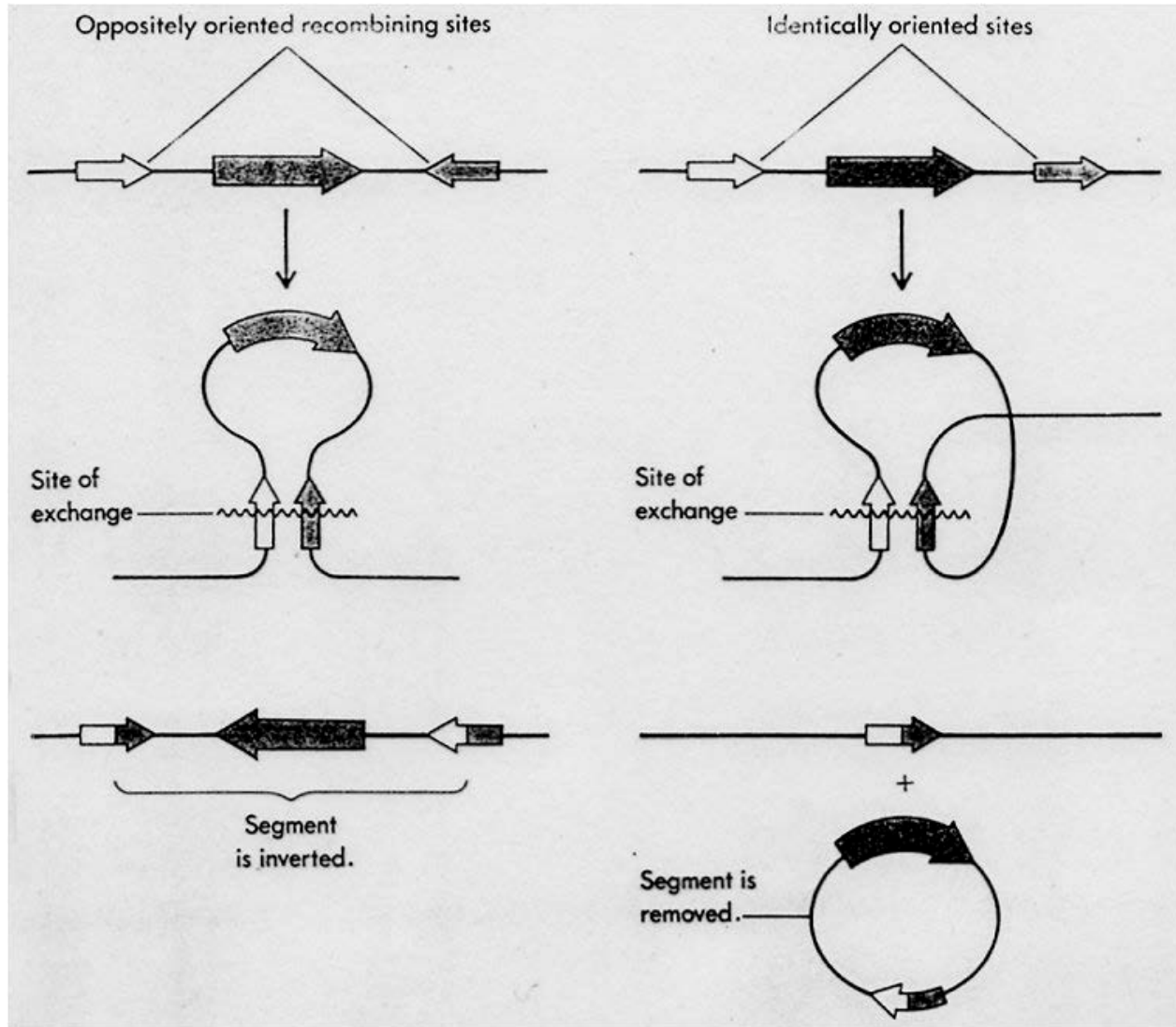


Se la medesima sequenze d'inserzione (IS) o trasposone si trovano nella stessa cellula creano regioni di omologia

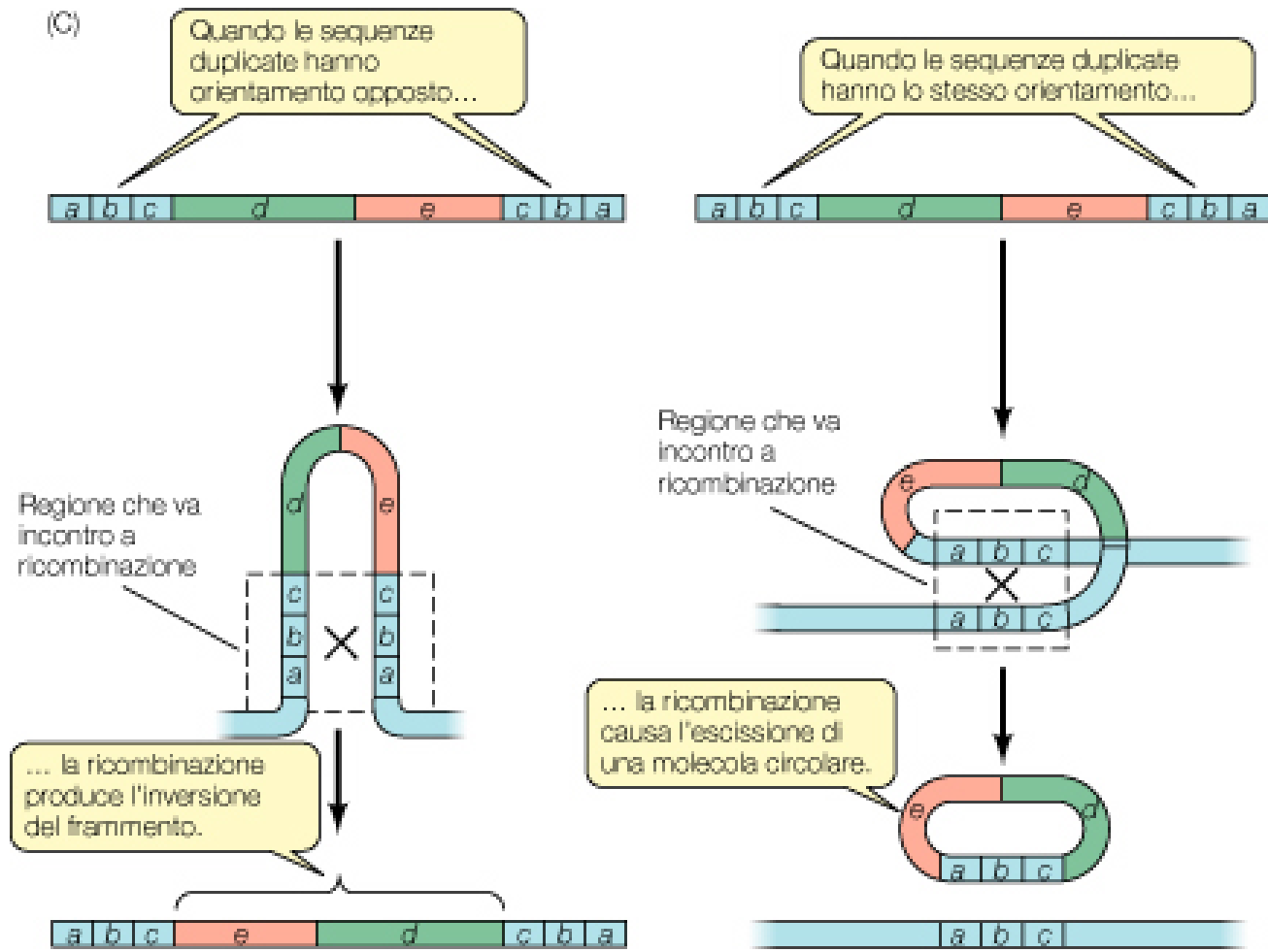
- all'interno dello stesso genoma
- tra cromosoma e plasmide
- tra plasmidi diversi

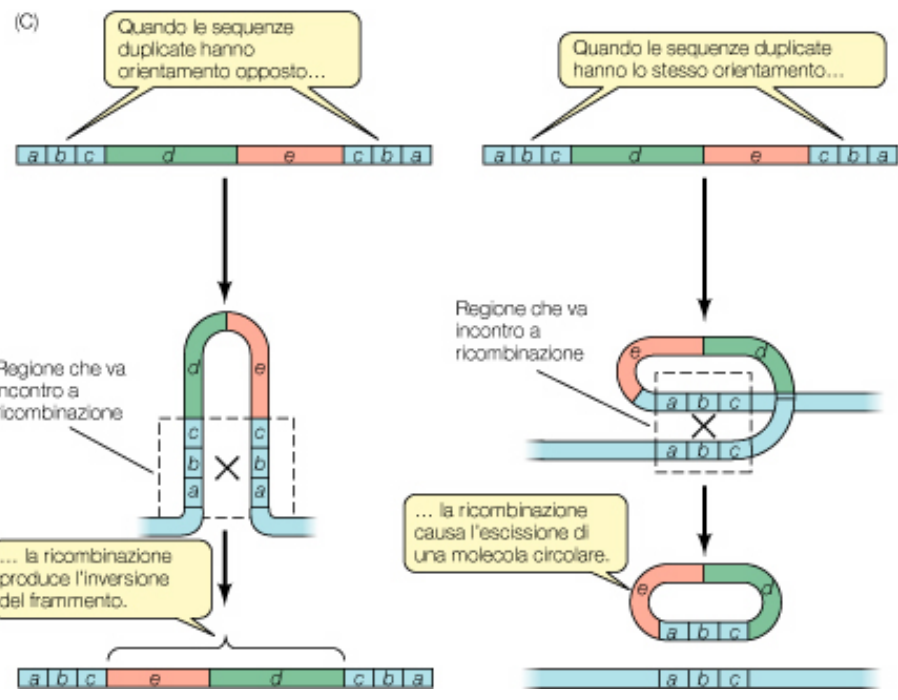
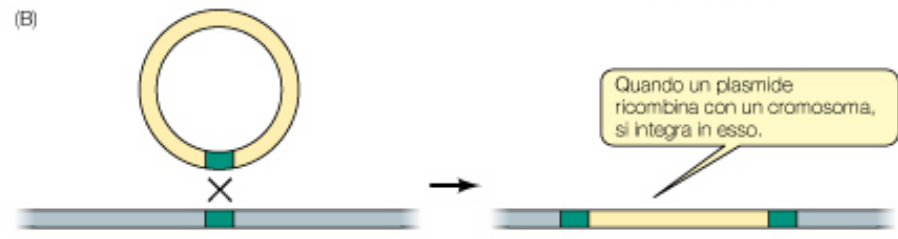
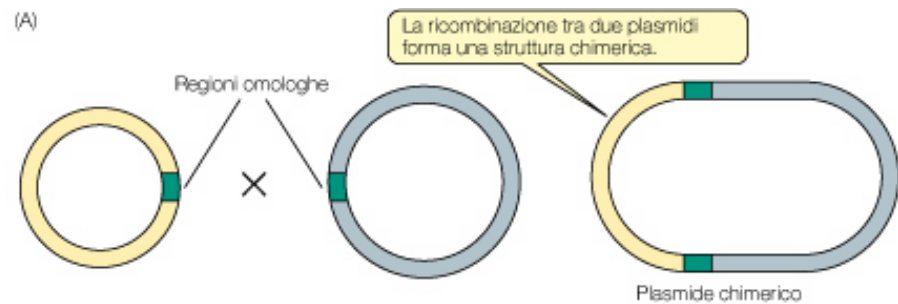
Quali sono le conseguenze di eventi di ricombinazione mediati dal sistema RecA/BCD utilizzando come regioni di omologia le sequenze IS o i trasposoni??

Riarrangiamenti genetici generati dagli elementi trasponibili : INVERSIONI E DELEZIONI



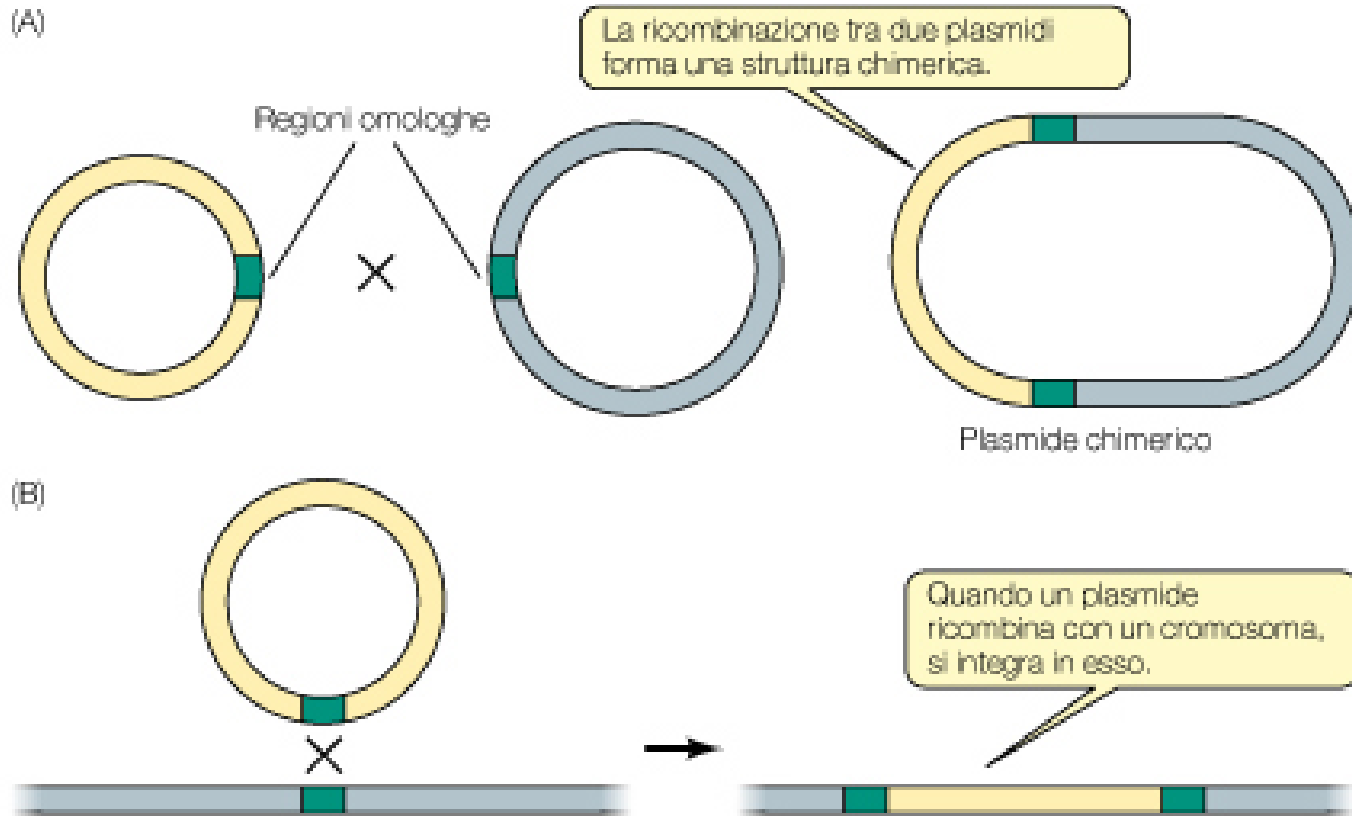
- formazione di inversioni
- formazione di delezioni





Processi di ricombinazione omologa mediati dagli elementi IS

- formazione di plasmidi chimerici
- formazione di ceppi Hfr



Gli elementi IS sono le regioni di omologia che determinano l'integrazione del plasmide nel cromosoma per **RICOMBINAZIONE OMOLOGA**

