

La ricombinazione sito-specifica e la trasposizione del DNA

Tipi di ricombinazioni

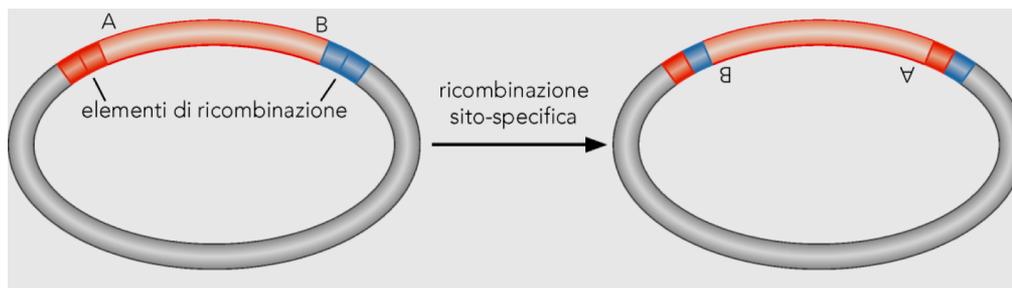
1. Ricombinazione tra sequenze omologhe: (**generalized o Homologous recombination**) avviene prevalentemente nella meiosi. Avviene allo stadio di “four strand” (elevata fedeltà -> mantenimento dell'identità del genoma).

2. Ricombinazione tra paia di sequenze specifiche: **site specific ricombination**. Es. nell'integrazione dei fagi. Gli enzimi sono specifici per la sequenza.

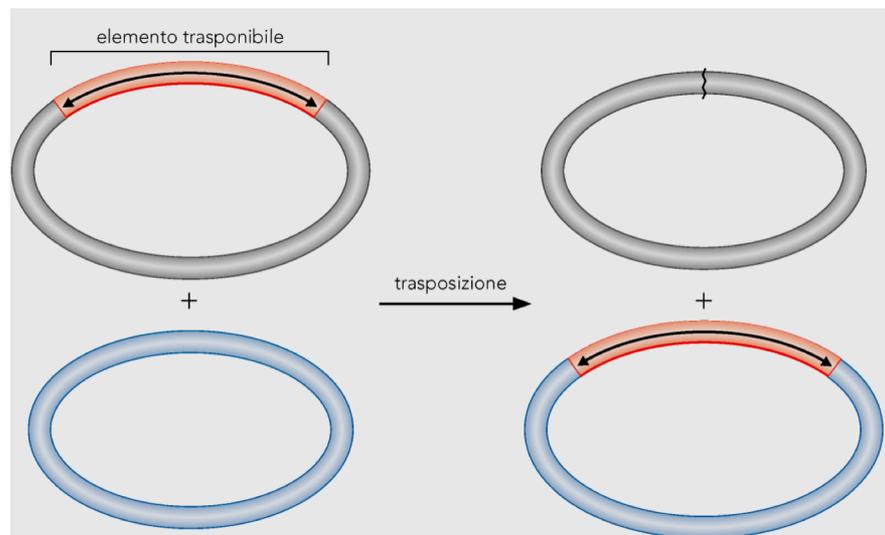
3. Ricombinazione per trasposizione (**Trasposizione**): sequenze vengono inserite senza bisogno di omologia di sequenza.

Ricombinazioni

- Ricombinazione conservativa sito-specifica (**CSSR**): tra due elementi di DNA definiti



- Ricombinazione per trasposizione (**trasposizione**): tra sequenze specifiche e siti non specifici



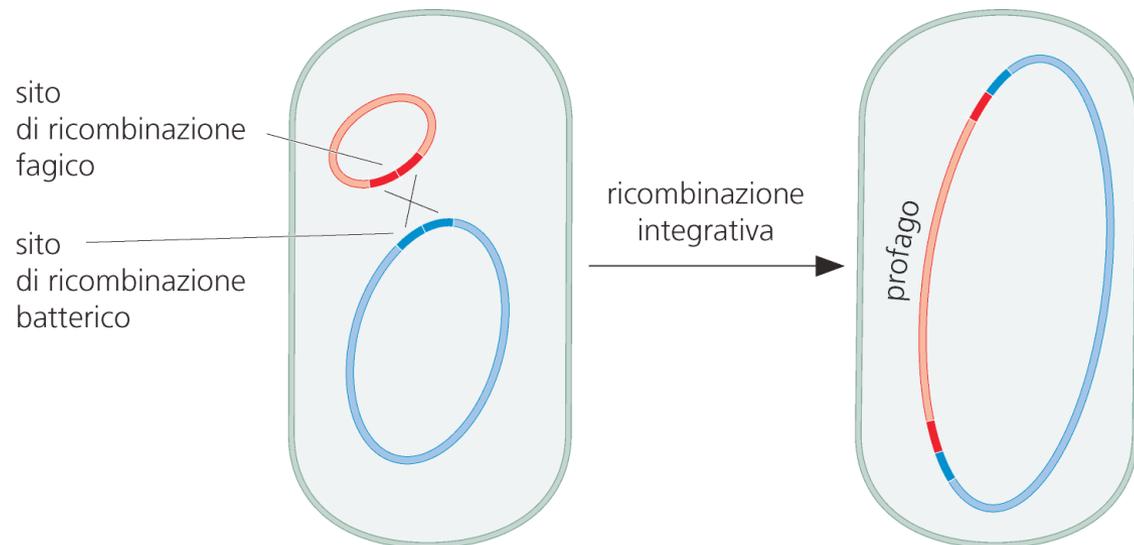
Hanno in comune le ricombinasi e la formazione del complesso sinaptico

CSSR

(Ricombinazione conservativa sito-specifica)

Il segmento di DNA che viene spostato porta i siti di ricombinazione
Esempio fago λ un sito di ricombinazione sul DNA fagico e l'altro
sul DNA batterico

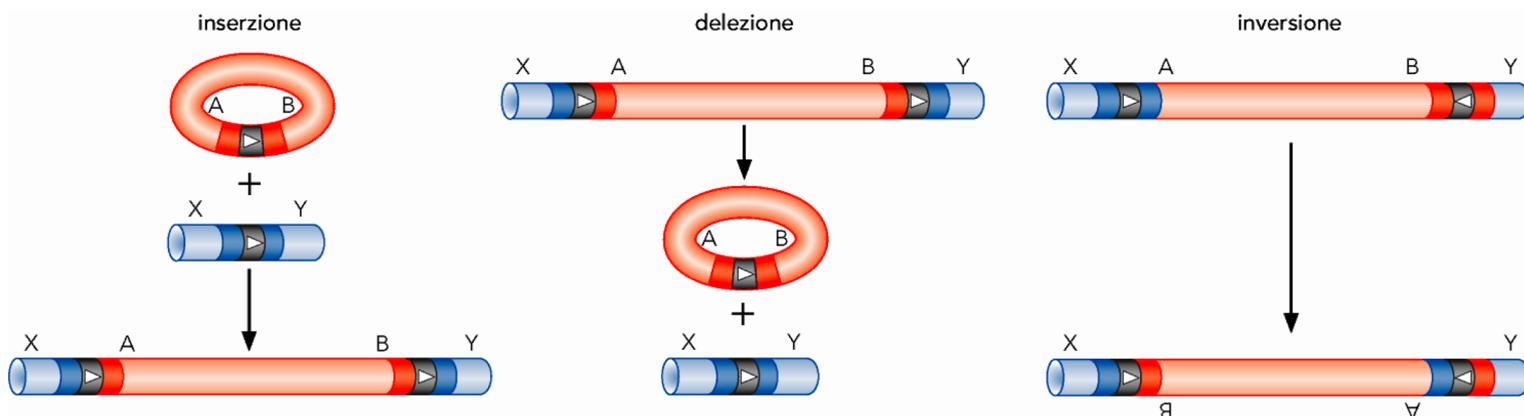
Le sequenze dei siti di ricombinazione
sono corte – 20 bp



CSSR: tipi e meccanismo

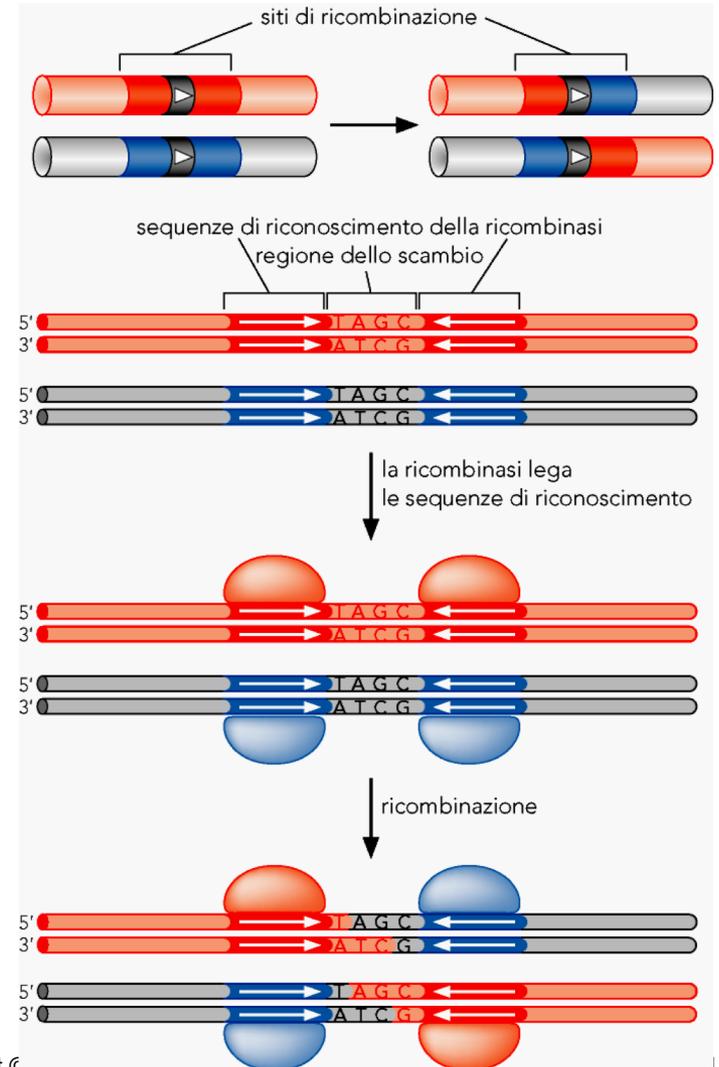
La CSSR può dar luogo a:

- Inserzione in un sito specifico (es. fago λ)
- Delezione di un pezzo di DNA
- Inversione di un pezzo di DNA

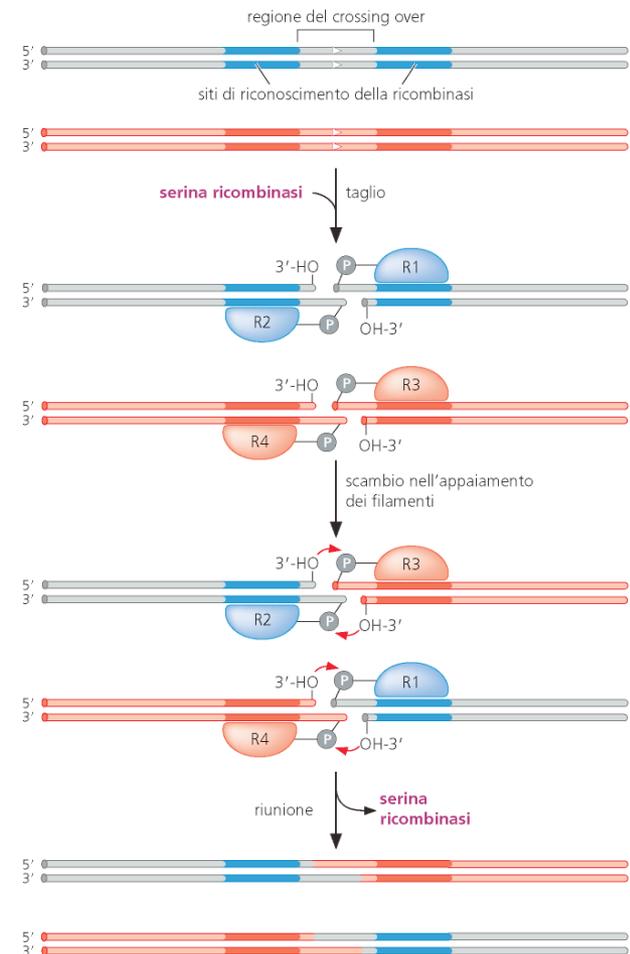
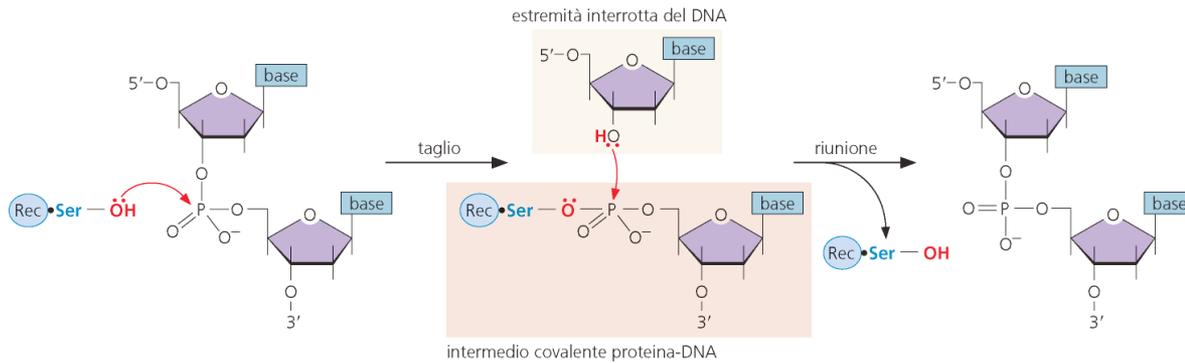


CSSR: tipi e meccanismo

- I **siti di ricombinazione** sono composti da: **sequenze di riconoscimento** della ricombinasi e **regione dello scambio**
- Se hanno la stessa direzione (**ripetizione diretta**) permettono inserzione o delezione
- Se hanno direzione opposta (**ripetizione invertita**) permettono la inversione

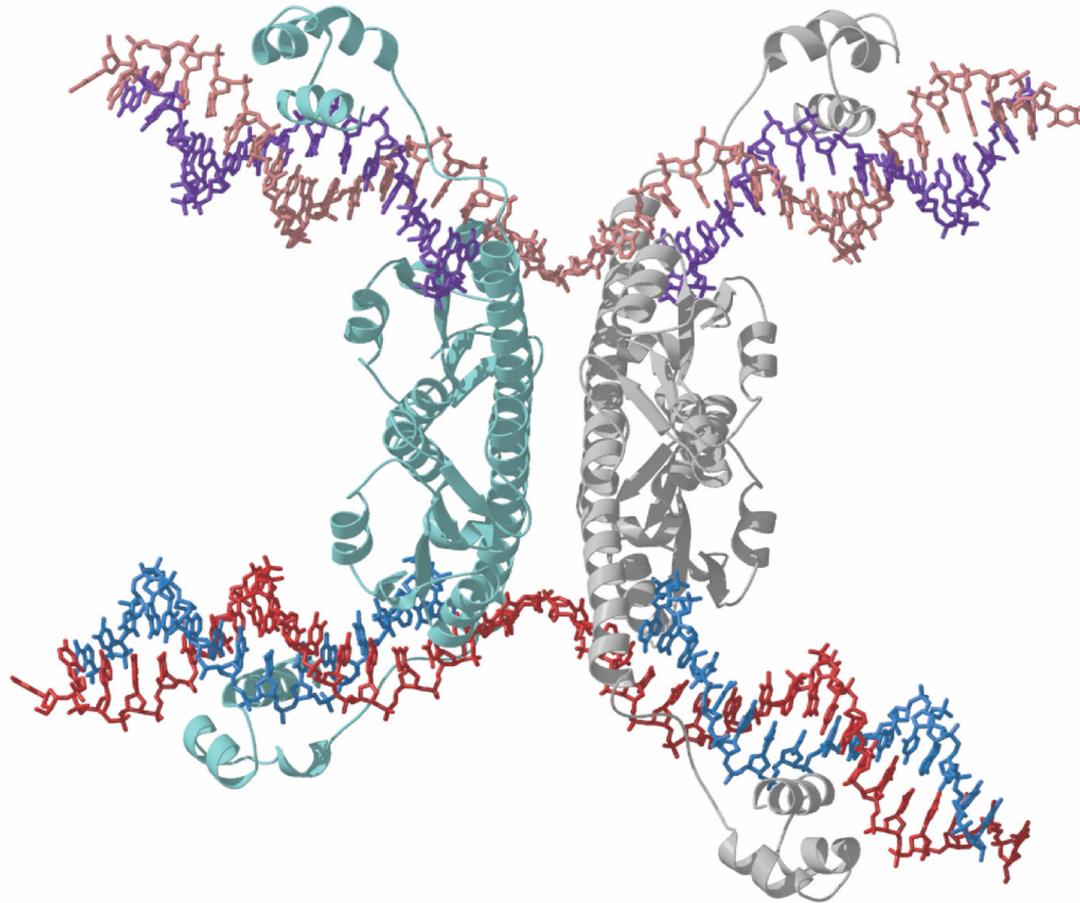


Meccanismo delle ricombinasi: Ricombinasi a Serina



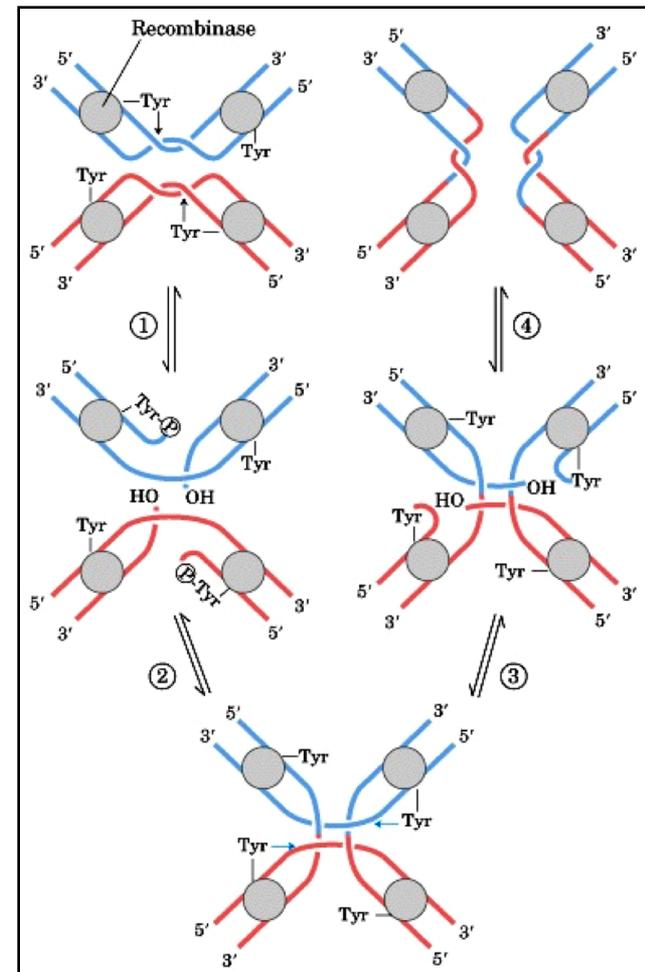
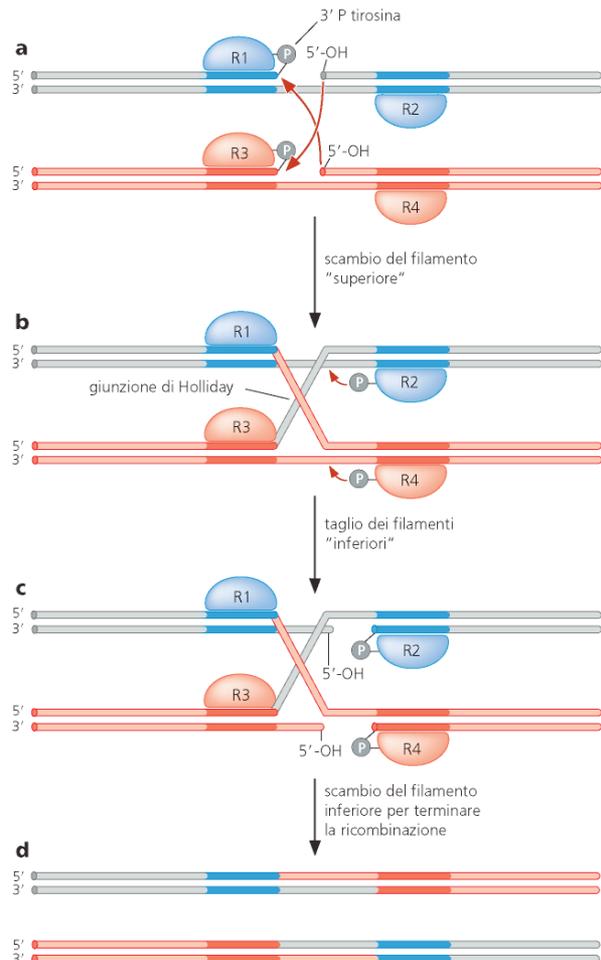
- Una **serina** della ricombinasi attacca il P e libera il 3'OH. Il legame può essere riformato senza richiesta di energia (conservativo).
- Le ricombinasi a serina tagliano contemporaneamente i due filamenti di DNA prima dello scambio. Occorrono 4 subunità.

Struttura di una serin ricombinasi con il DNA



Ricombinasi a Tirosina

Le ricombinasi a **tirosina** tagliano ed uniscono due filamenti, e poi gli altri due. Si ha la formazione di una **Holliday junction**.

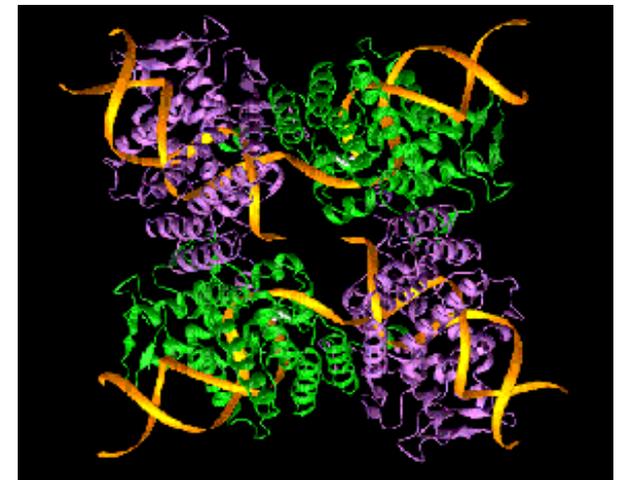
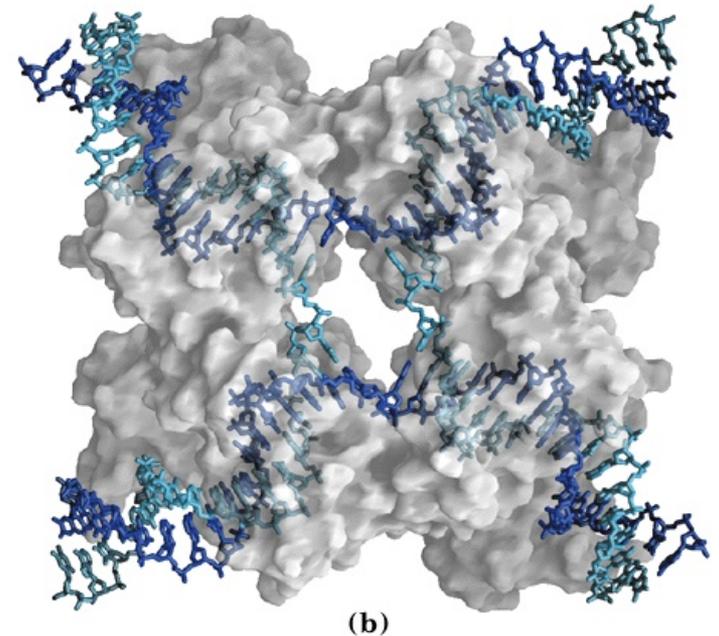


Cre-Lox

Un sistema semplice di ricombinasi a **tirosina** si trova nel batteriofago P1. La **Cre ricombinasi** codificata dal fago catalizza la ricombinazione tra due sequenze bersaglio.

Le sequenze ricombinanti del fago P1 sono identiche, sono di 34 bp- chiamati ***loxP***. La Cre ricombinasi è sufficiente per la reazione; nessuna proteina accessoria è richiesta.

Per la sua semplicità ed efficienza, il sistema **Cre//lox** è stato adattato per le cellule eucariotiche, dove è diventato una tecnica standard per site-specific recombination.



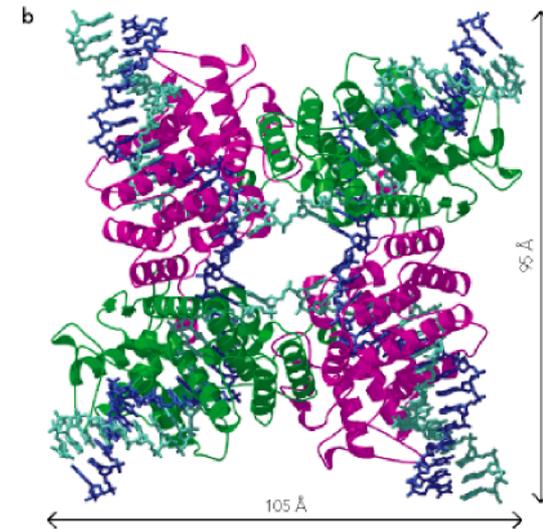
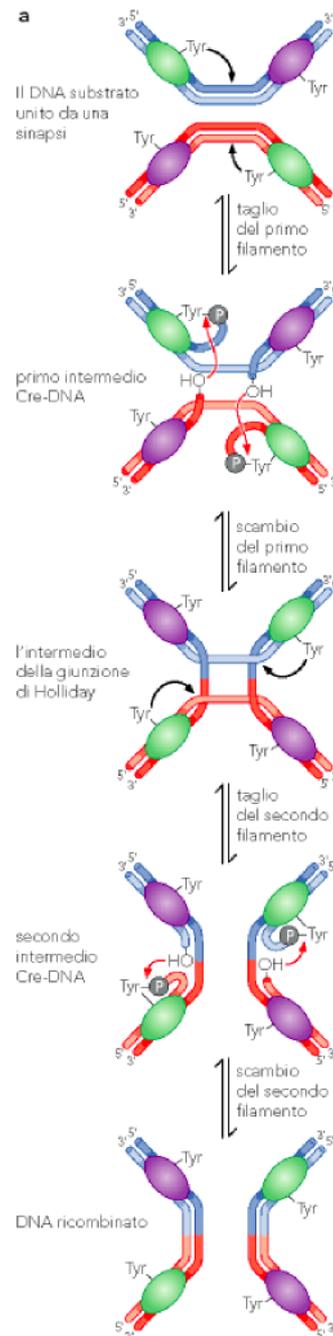
Struttura di Cre

Cre-lox

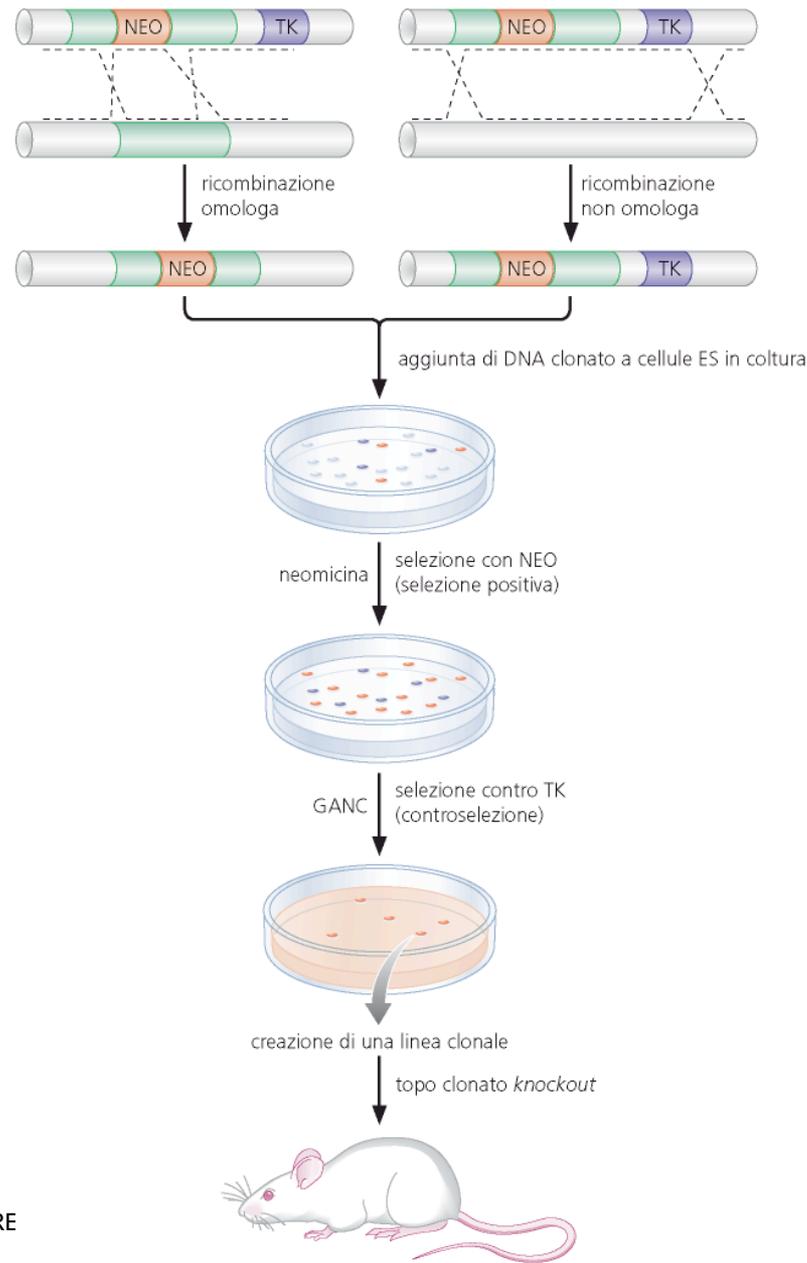
Ogni subunità di Cre si lega alla sequenza di riconoscimento.

Si ha un tetramero sul DNA cruciforme

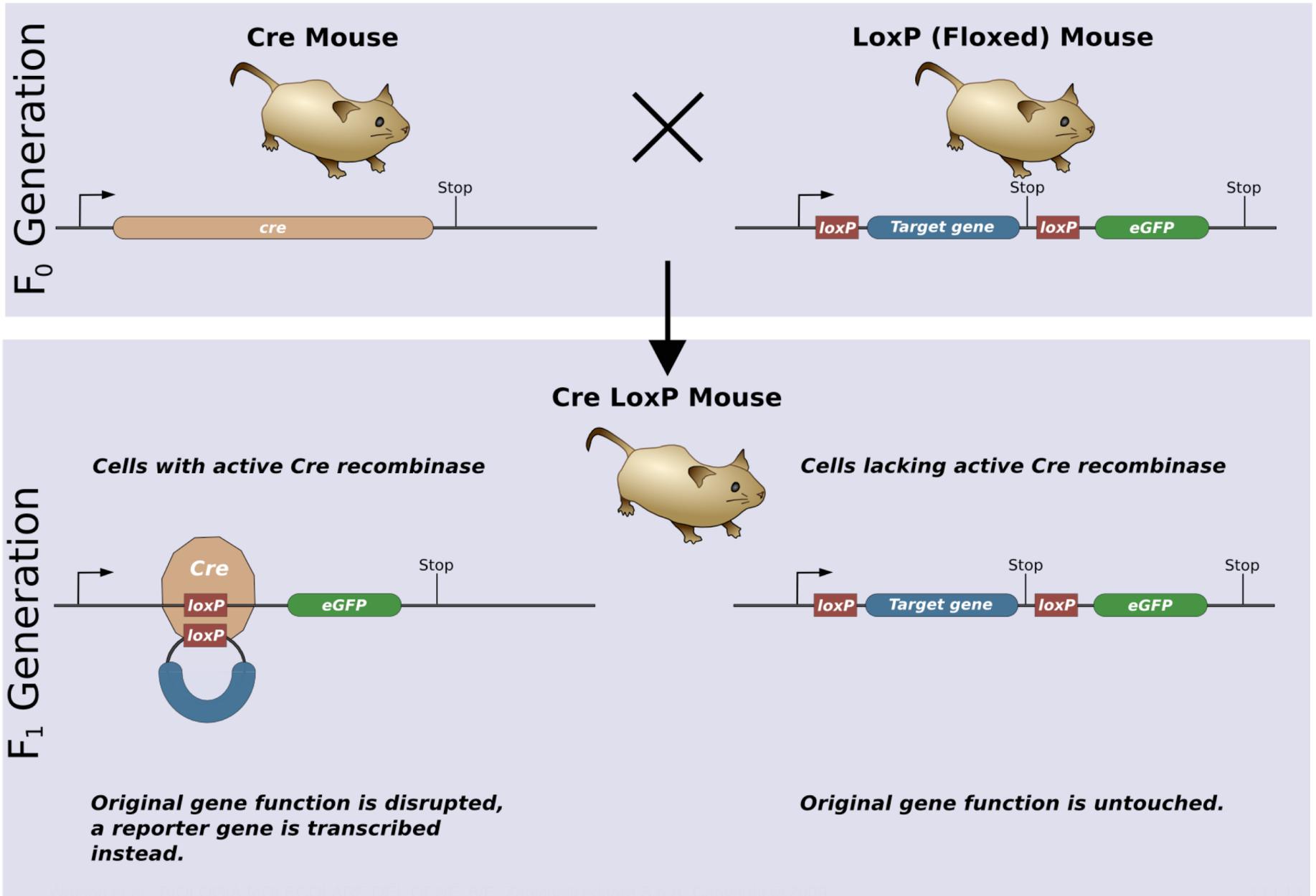
Cre ha due conformazioni quella verde può tagliare il DNA. Cambiando la coppia di subunità attive si taglia anche il secondo filamento



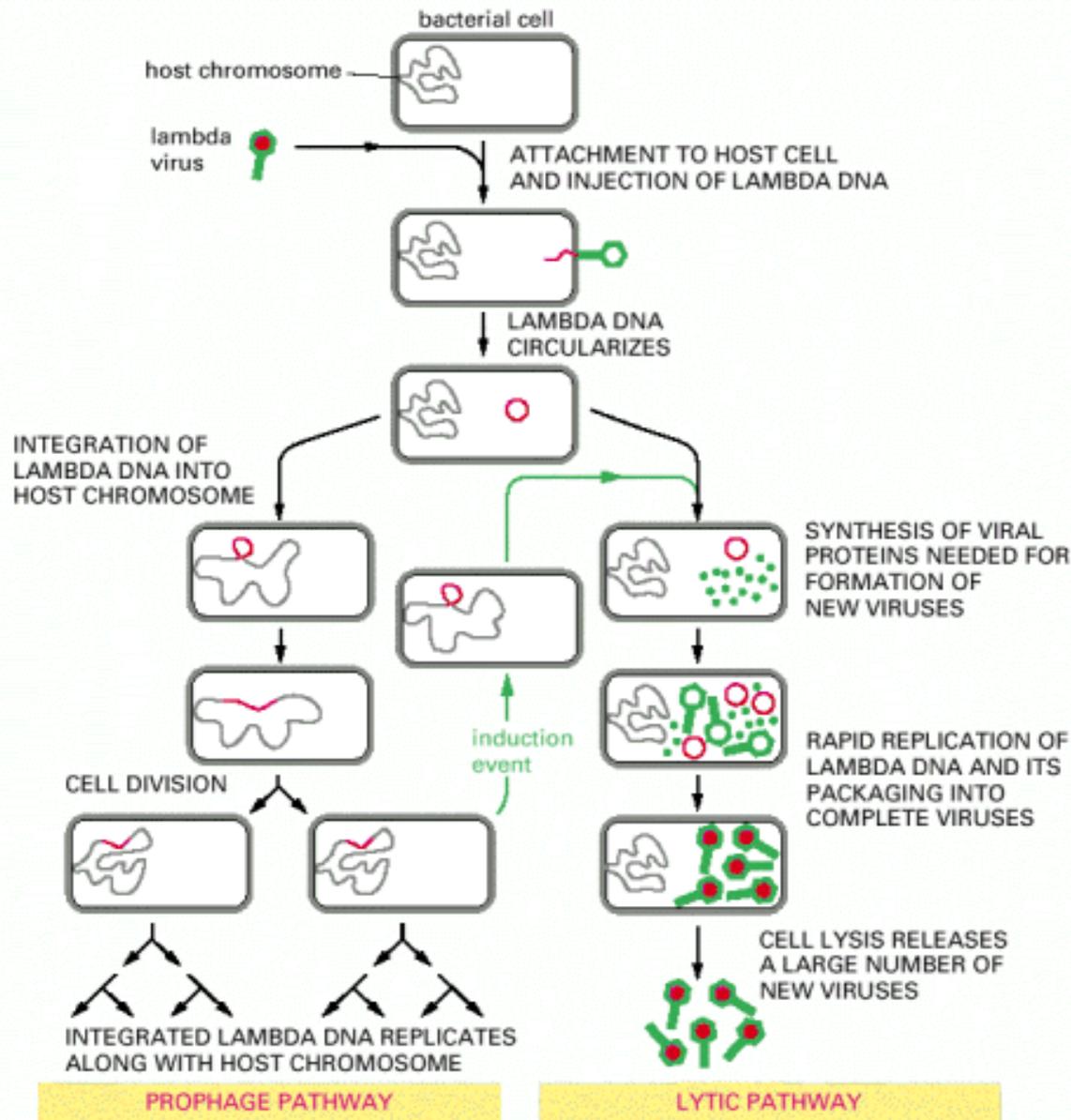
Manipolazione di cellule ES per ottenere topi KO



Knock-out o Knock-in condizionale



Ricombinazione fago λ



Ricombinazione fago λ

- Il ciclo del fago lambda:
- Per essere **lisogenico** deve essere **integrato** nel DNA ospite
- Per entrare nel ciclo **litico** deve esser **exciso** dal cromosoma.
- I siti di integrazione (**attP** e **attB**) differiscono da quelli di excisione (**attL** e **attR**)

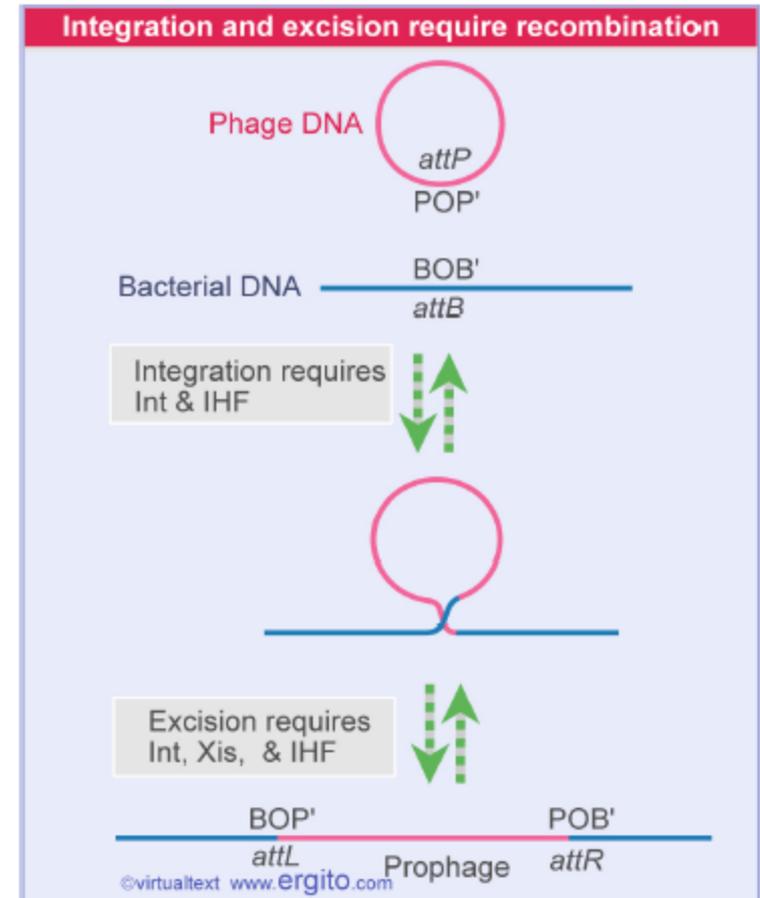
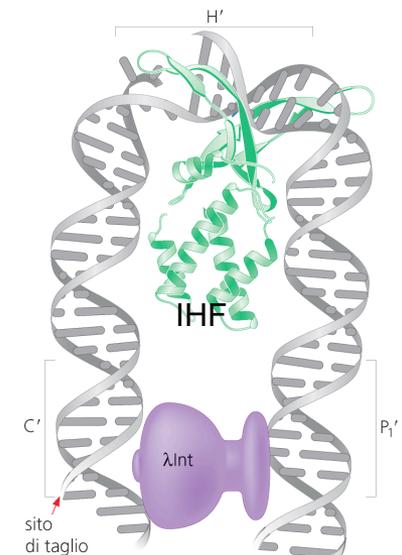
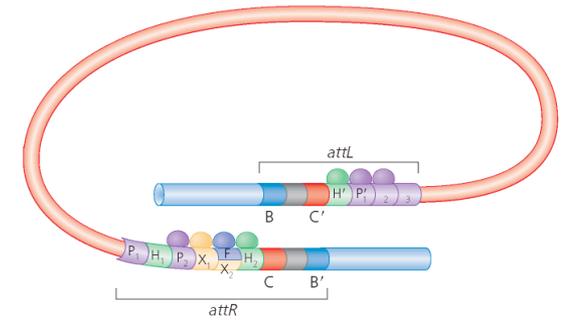
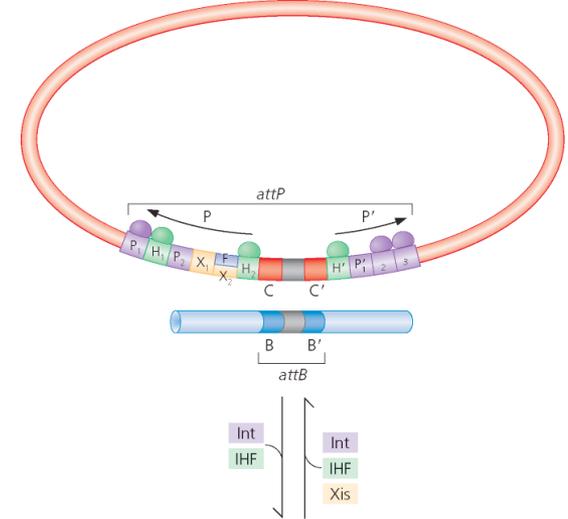


Figure 15.25 Circular phage DNA is converted to an integrated prophage by a reciprocal recombination between *attP* and *attB*; the prophage is excised by reciprocal recombination between *attL* and *attR*.

Integrasi di λ

- Il passaggio tra lo stato lisogenico e la crescita litica del fago λ richiede la integrazione o escissione del DNA fagico.
- L'**integrasi** λ (λ Int, tirosina ricombinasi) catalizza la ricombinazione tra i siti **attP** (phage) e **attB** (batterio)
- **attB** di 30 bp ha i due siti di legame di λ Int e la regione del crossing-over
- **attP** (240 bp) ha due braccia per il legame di λ Int e del fattore di integrazione dell'ospite **IHF** (un fattore architetonico)
- L'escissione richiede il fattore architetonico **Xis**



Ricombinasi Hin inverte il DNA

Nella *Salmonella* la serin ricombinasi **Hin** inverte una regione di 1000 bp fiancheggiata da siti invertiti ***hixL*** e ***hixR***.

In una posizione il promotore attiva i geni per la flagellina H2 (***fljB***) ed il repressore per flagellina H1 (***flyA***).

Nell'altra induce flagellina H1 (che si trova molto distante).

Il sistema necessita di un **enhancer** a DNA che lega la proteina **Fis** che curva il DNA.

Evento stocastico, per “ingannare” il sistema immunitario dell'ospite. Flagellina, componente proteica del flagello contro cui si sviluppa reazione immunitaria.

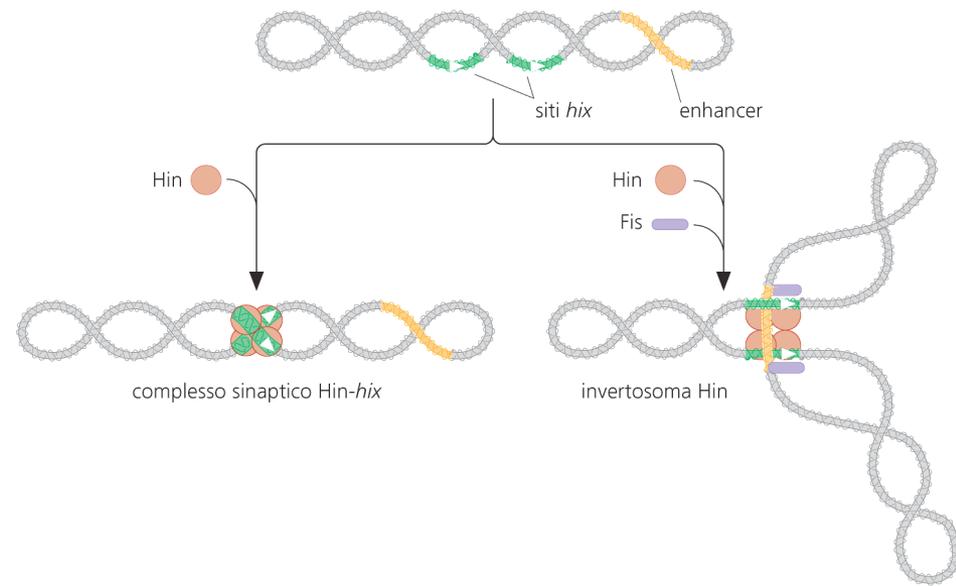
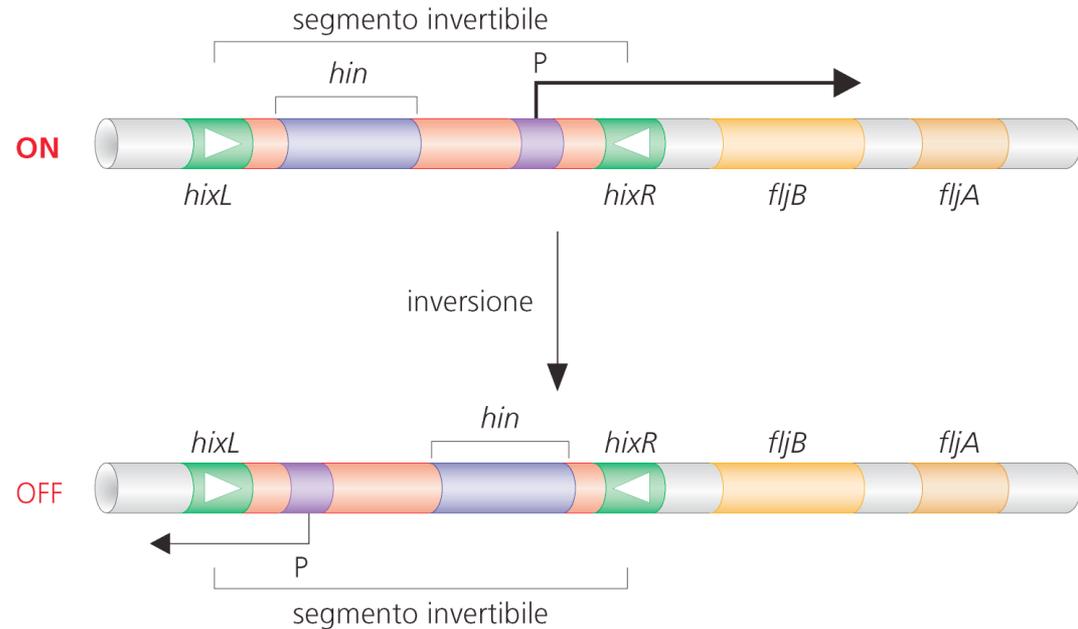


TABELLA 12.1 Le ricombinasi classificate per famiglia e funzione

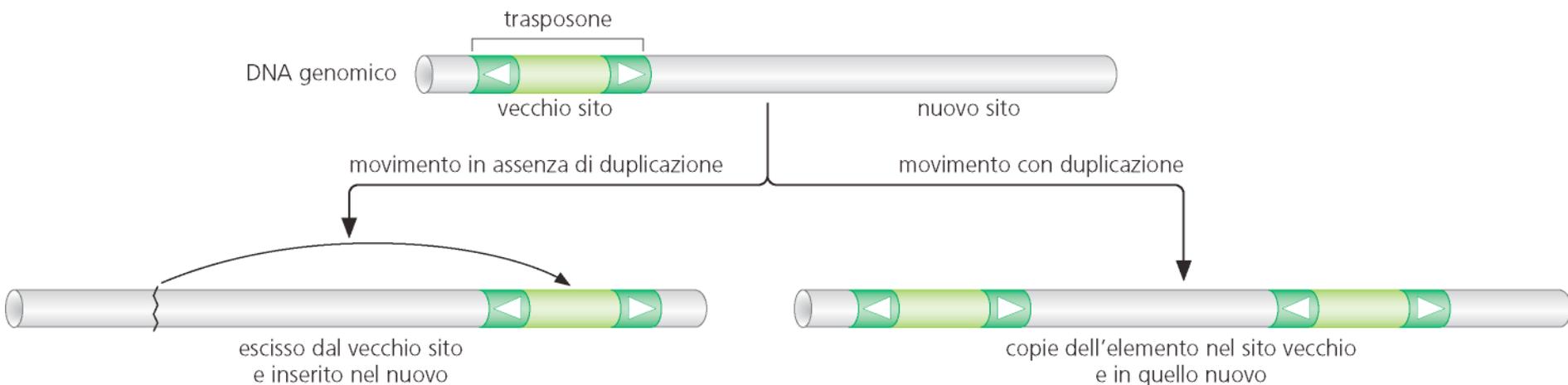
Ricombinasi	Funzione
La famiglia delle serina ricombinasi	
L'invertasi Hin della <i>Salmonella</i>	Riconoscendo i siti <i>hix</i> inverte una regione cromosomica cambiando l'orientamento di un promotore. Permette l'espressione di due diversi antigeni di superficie.
Il trasposone Tn3 e le resolvasi $\gamma\delta$	Promuove la delezione di un tratto di DNA per risolvere un evento di fusione che deriva dalla trasposizione replicativa. I siti di ricombinazione sono chiamati <i>res</i> .
La famiglia delle tirosina ricombinasi	
L'integrasi del batteriofago λ	Promuove l'integrazione e l'escissione del genoma di λ dentro e fuori da una specifica sequenza del cromosoma di <i>E. coli</i> . I siti di ricombinazione sono detti <i>att</i> .
Cre del fago P1	Durante l'infezione, media la circolarizzazione del genoma virale riconoscendo su di esso dei siti detti <i>lox</i> .
XerC e XerD di <i>Escherichia coli</i>	Sono responsabili di diverse reazioni di delezione che convertono molecole circolari di DNA dimeriche in monomeri. Riconoscono sia siti originatisi sul plasmide (<i>cer</i>) che siti cromosomici (<i>dif</i>).
FLP di lievito	Inverte una regione del plasmide di lievito 2μ per permettere una reazione di amplificazione del DNA detta replicazione a cerchio rotante. I siti di ricombinazione sono detti siti <i>prt</i> .

CSSR

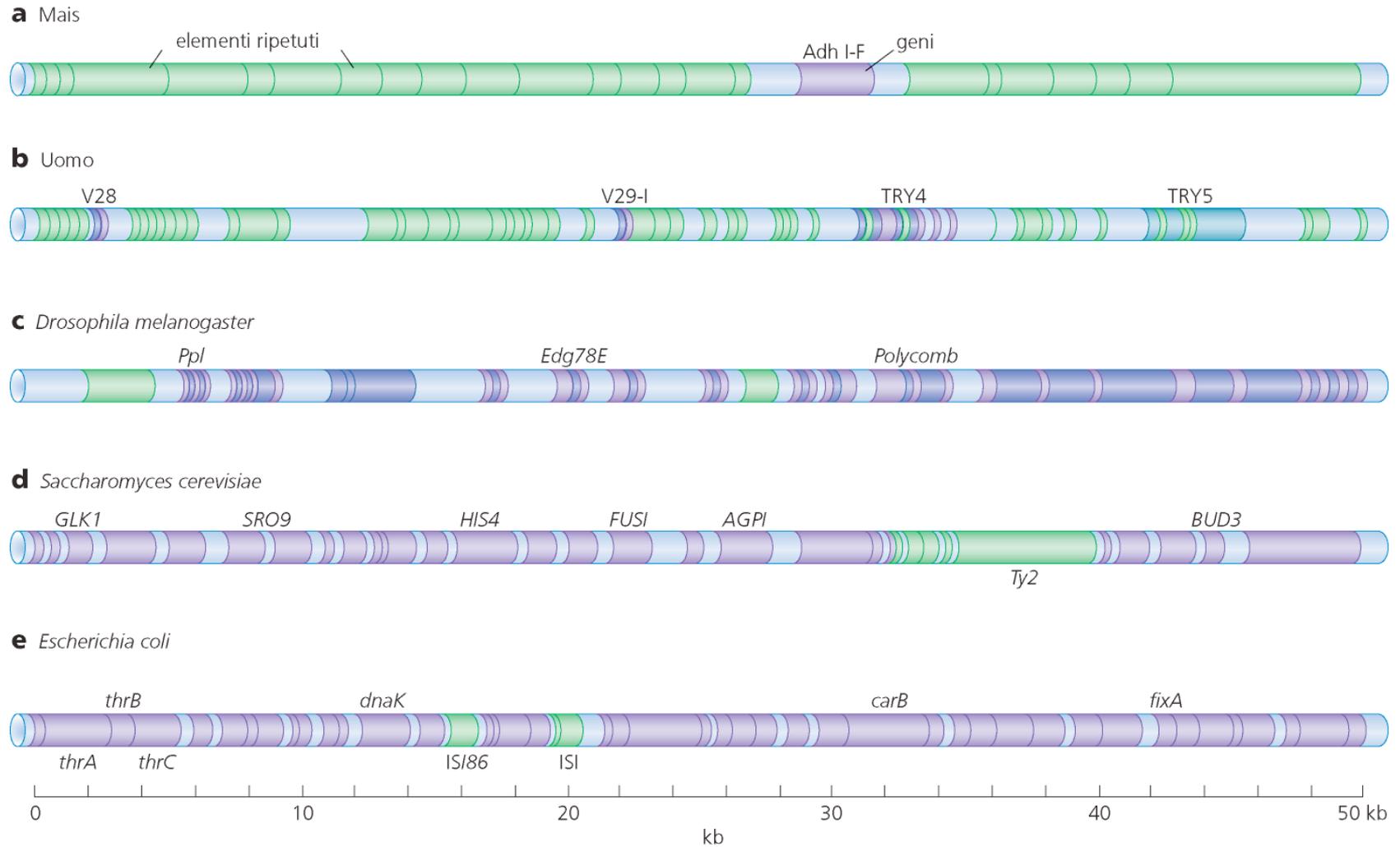
<https://www.youtube.com/watch?v=wtWkTSPub0Y>

La trasposizione

- Elementi trasponibili o trasposoni.
- Il movimento avviene per una ricombinazione tra le estremità dell'elemento trasponibile e una sequenza di DNA della cellula.



I trasposoni nei genomi: frequenza e distribuzione

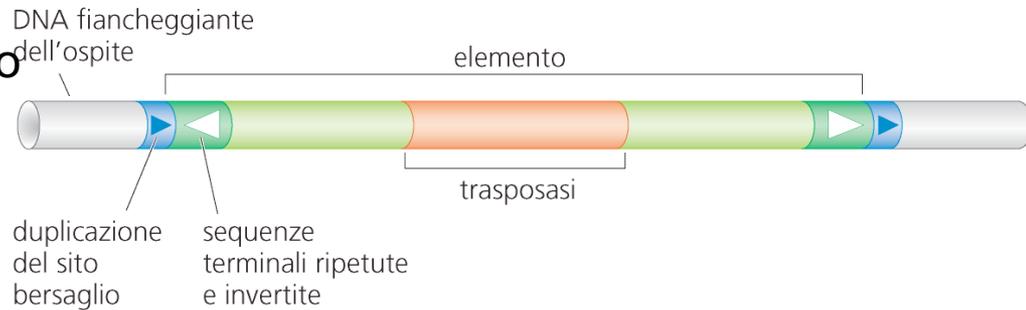


Tre classi di elementi trasponibili

A) Trasposoni a DNA

Portano sia delle sequenze di DNA (invertite e ripetute da 25 a centinaia di pb) che servono come **siti per la ricombinazione** sia geni che codificano proteine che partecipano alla ricombinazione come la **trasposasi** (integrasi) ma anche **altre proteine** (resistenza ad antibiotici).

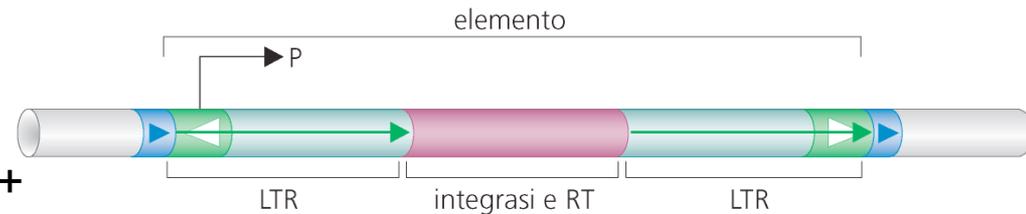
a trasposoni a DNA



B) Retrotrasposoni tipo virus/retrovirus

Siti per ricombinasi all'interno di **sequenze LTR**. **Integrasi** (trasposasi) + trascrittasi inversa (**RT**).

b retrotrasposoni tipo virus/retrovirus



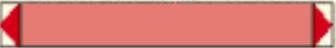
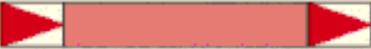
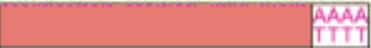
C) Retrotrasposoni poli-A

Senza ripetizioni terminali invertite. Sequenza 5' UTR, 3' UTR e poli-A. **ORF1** codifica per RNA binding protein. **ORF2** fattore con attività Trascrittasi inversa ed endonucleasica.

c retrotrasposoni poli-A



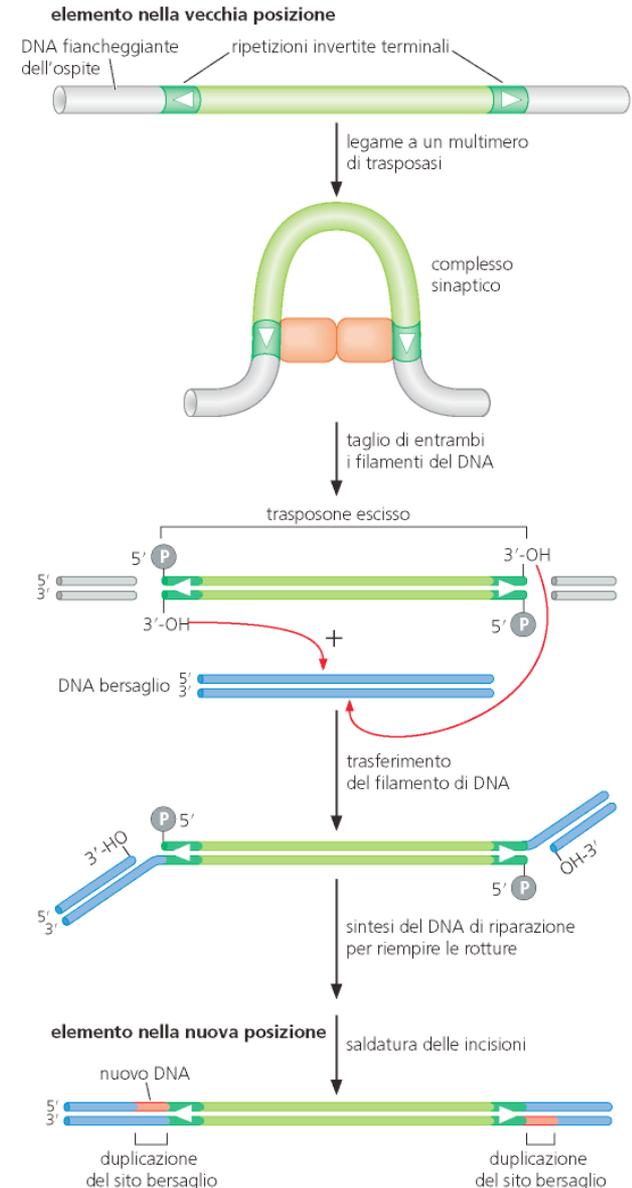
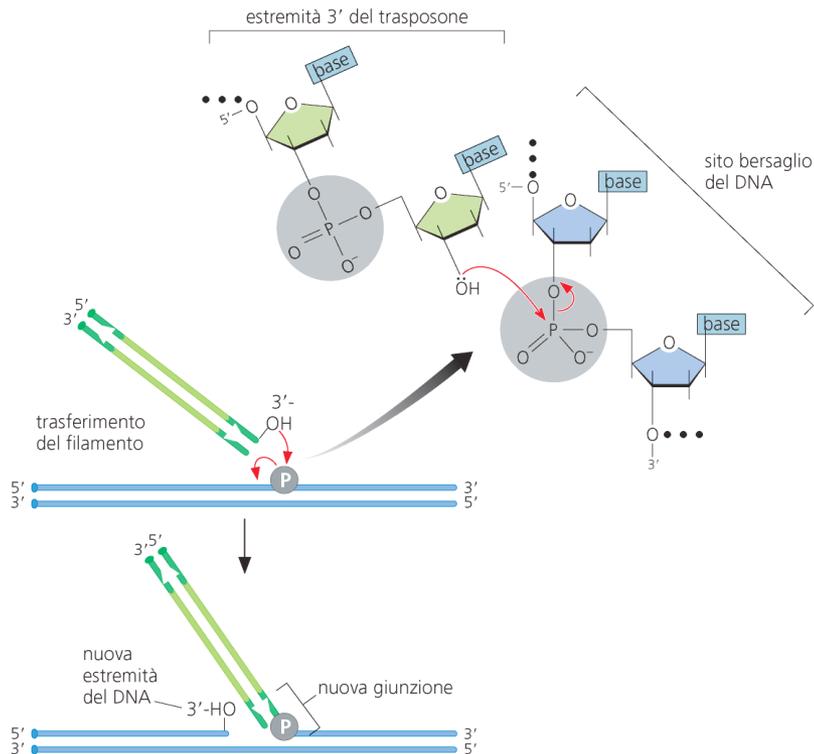
Major classes of transposable elements

CLASS DESCRIPTION AND STRUCTURE	GENES IN COMPLETE ELEMENT	MODE OF MOVEMENT	EXAMPLES
<p>DNA-only transposons</p>  <p>short inverted repeats at each end</p>	<p>encodes transposase</p>	<p>moves as DNA, either excising or following a replicative pathway</p>	<p>P element (<i>Drosophila</i>) Ac-Ds (maize) Tn3 and IS1 (<i>E.coli</i>) Tam3 (snapdragon)</p>
<p>Retroviral-like retrotransposons</p>  <p>directly repeated long terminal repeats (LTRs) at ends</p>	<p>encodes reverse transcriptase and resembles retrovirus</p>	<p>moves via an RNA intermediate produced by promoter in LTR</p>	<p>Copia (<i>Drosophila</i>) Ty1 (yeast) THE-1 (human) Bsl1 (maize)</p>
<p>Nonretroviral retrotransposons</p>  <p>Poly A at 3' end of RNA transcript; 5' end is often truncated</p>	<p>encodes reverse transcriptase</p>	<p>moves via an RNA intermediate that is often produced from a neighboring promoter</p>	<p>F element (<i>Drosophila</i>) L1 (human) Cin4 (maize)</p>

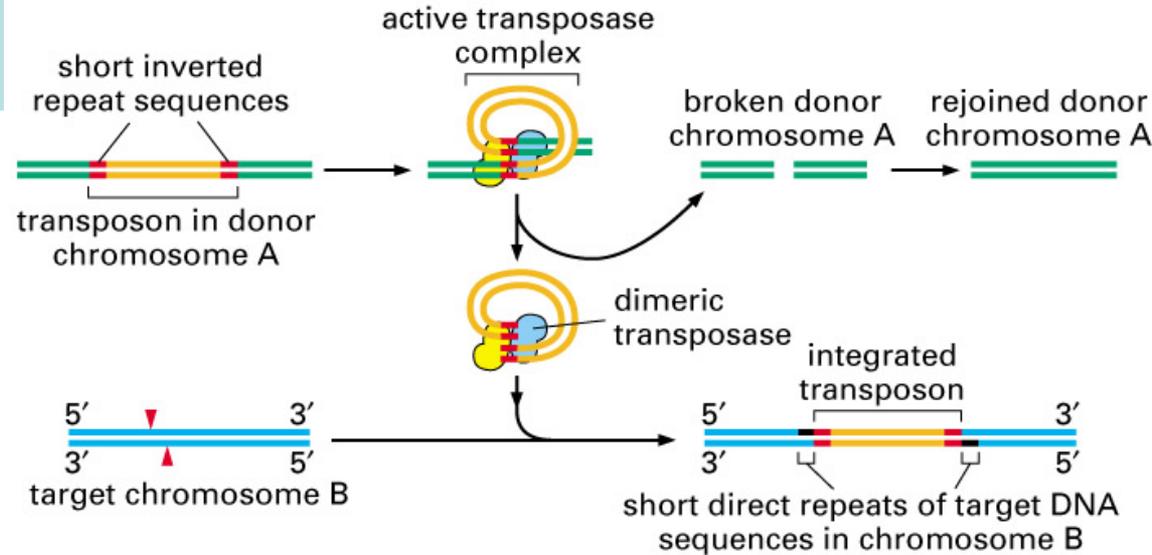
These elements range in length from 1000 to about 12,000 nucleotide pairs; each family contains many members, only a few of which are listed here. In addition to transposable elements, there are selected viruses that can move in and out of host cell chromosomes; these viruses are related to the first two classes of transposons.

A) TRASPOSONI A DNA: TAGLIA E INCOLLA

Il DNA con ripetizioni invertite viene escisso.
Si forma il **complesso sinaptico** o **trasposoma**. Nel DNA bersaglio viene fatto un nick, e si ha una trans-esterificazione: trasferimento del filamento di DNA.
E' un movimento di trasposizione con meccanismo non replicativo.



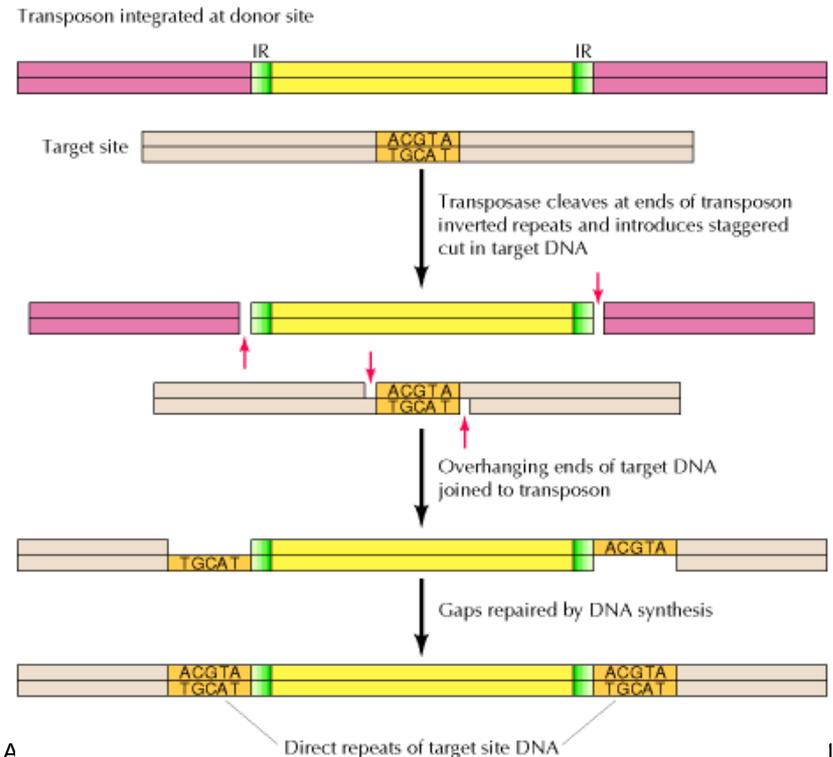
Il transposoma



La **transposasi** è codificata dal **transposone**.

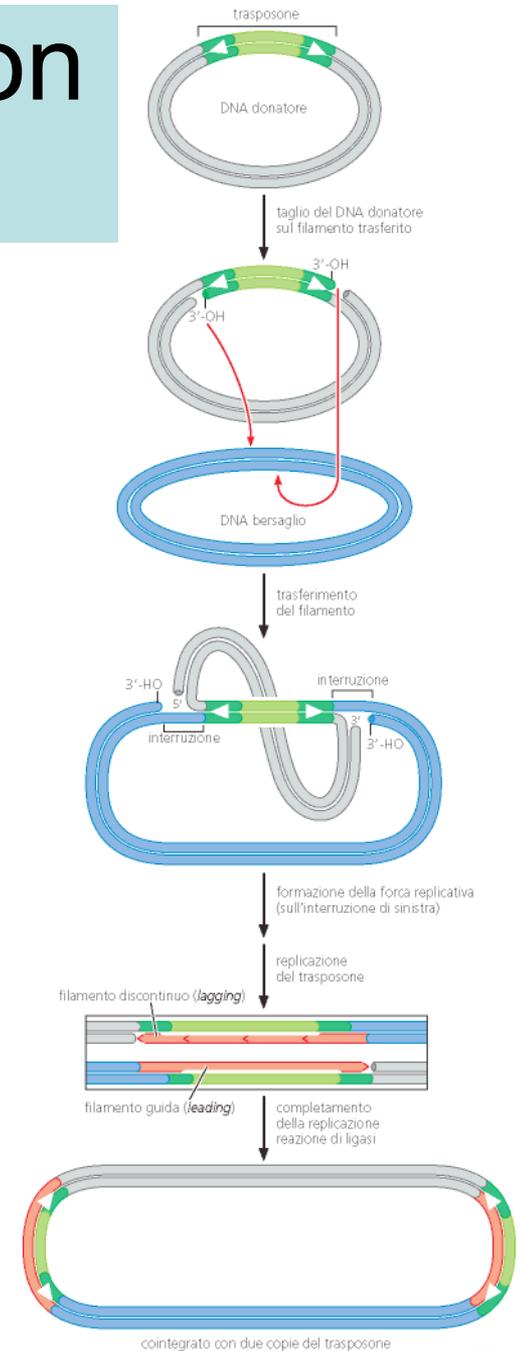
Occorrono almeno **2 subunità**.

Ha il ruolo di riconoscere le estremità, unirle, tagliarle per fare il transposoma, ed inserire nel DNA bersaglio.



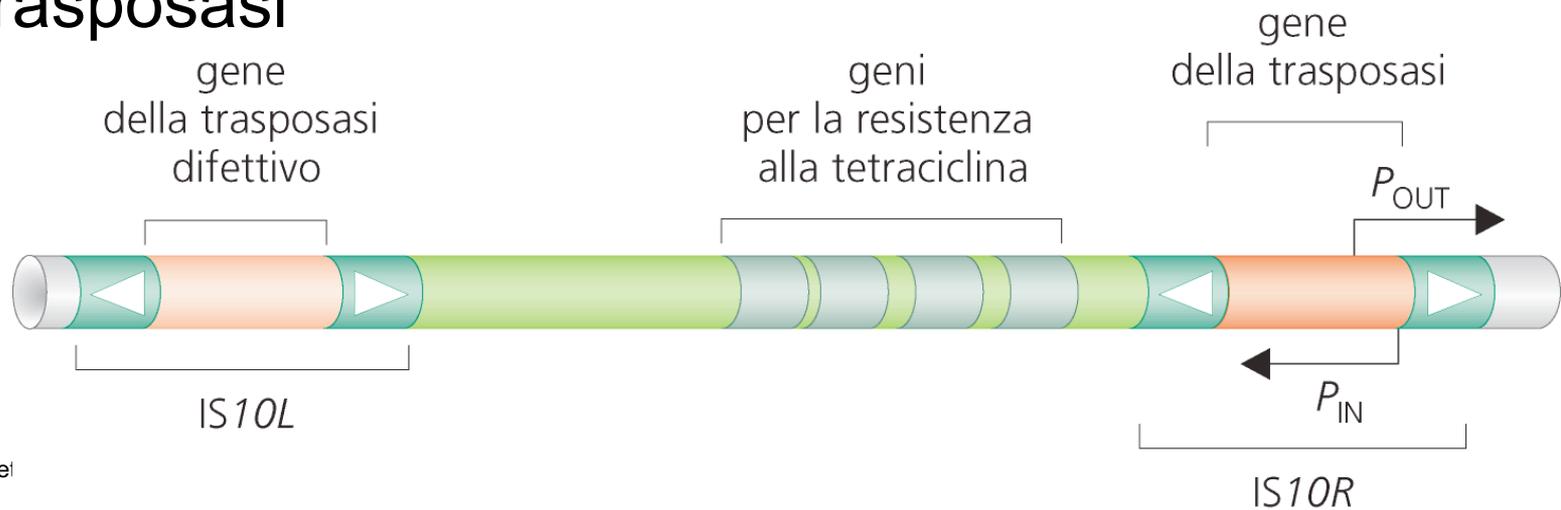
La transposizione a DNA con meccanismo replicativo

- Dopo il trasferimento del filamento si forma una struttura con due ramificazioni, che può fungere da **forca replicativa**.
- La replicazione termina sulla seconda forca e produce due copie del trasposone

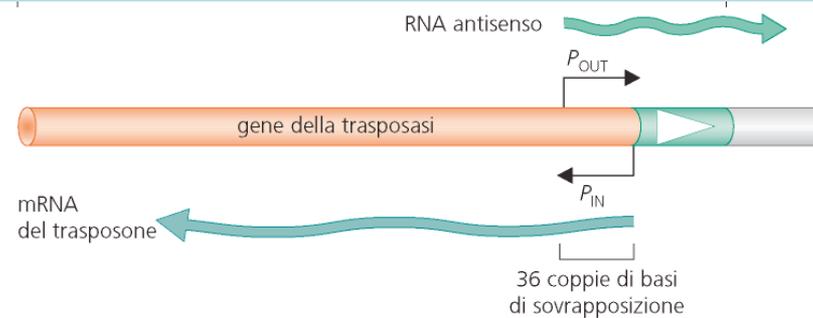


Tn10 batterico

- Appartiene alla famiglia IS4, con **sistema *taglia e incolla***
- Di 9 kb, contiene la **trasposasi** e la **resistenza alla tetraciclina**
- Alle estremità ha IS10R (con la trasposasi) e IS10L (IS = insertion sequence; R = right).
- Usa RNA antisenso per regolare l'espressione della trasposasi

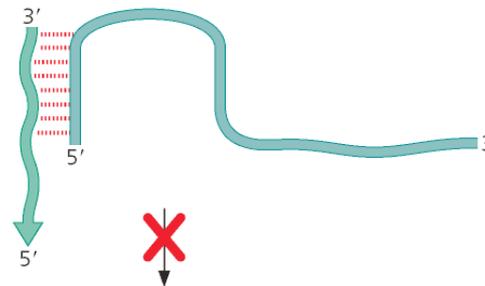


Esempio: Regolazione antisenso dell'espressione di Tn10



b alto numero di copie di Tn10

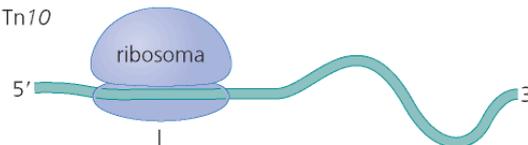
l'appaiamento RNA-RNA è frequente



la traduzione dell'mRNA per la trasposasi è bloccata

c basso numero di copie di Tn10

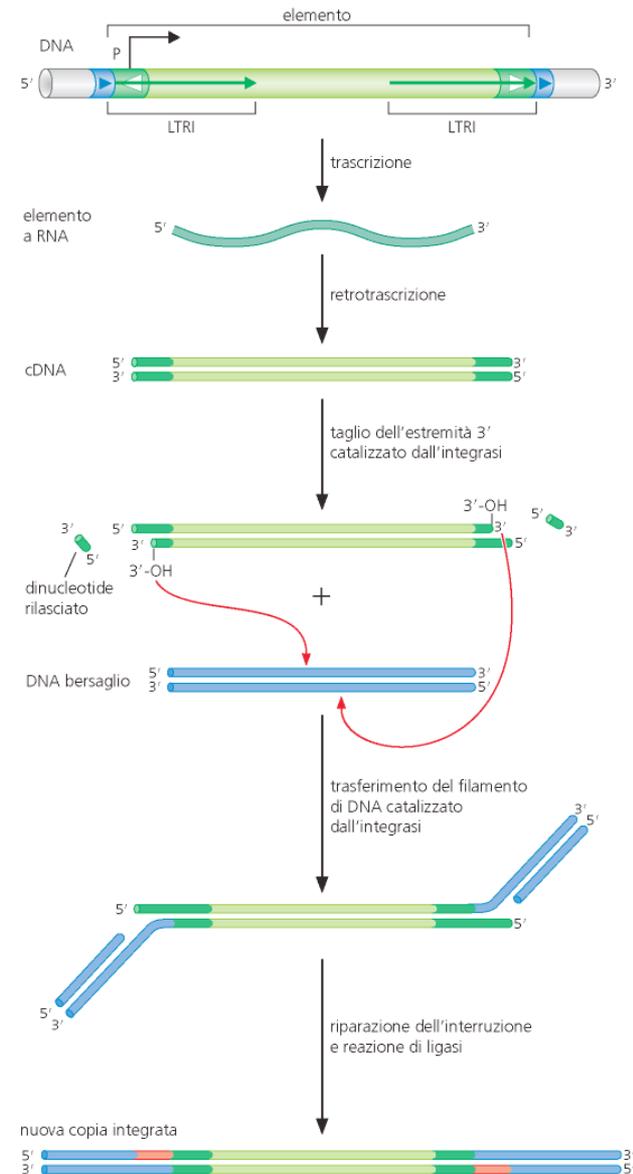
l'appaiamento RNA-RNA è raro



la traduzione dell'mRNA per la trasposasi è efficiente

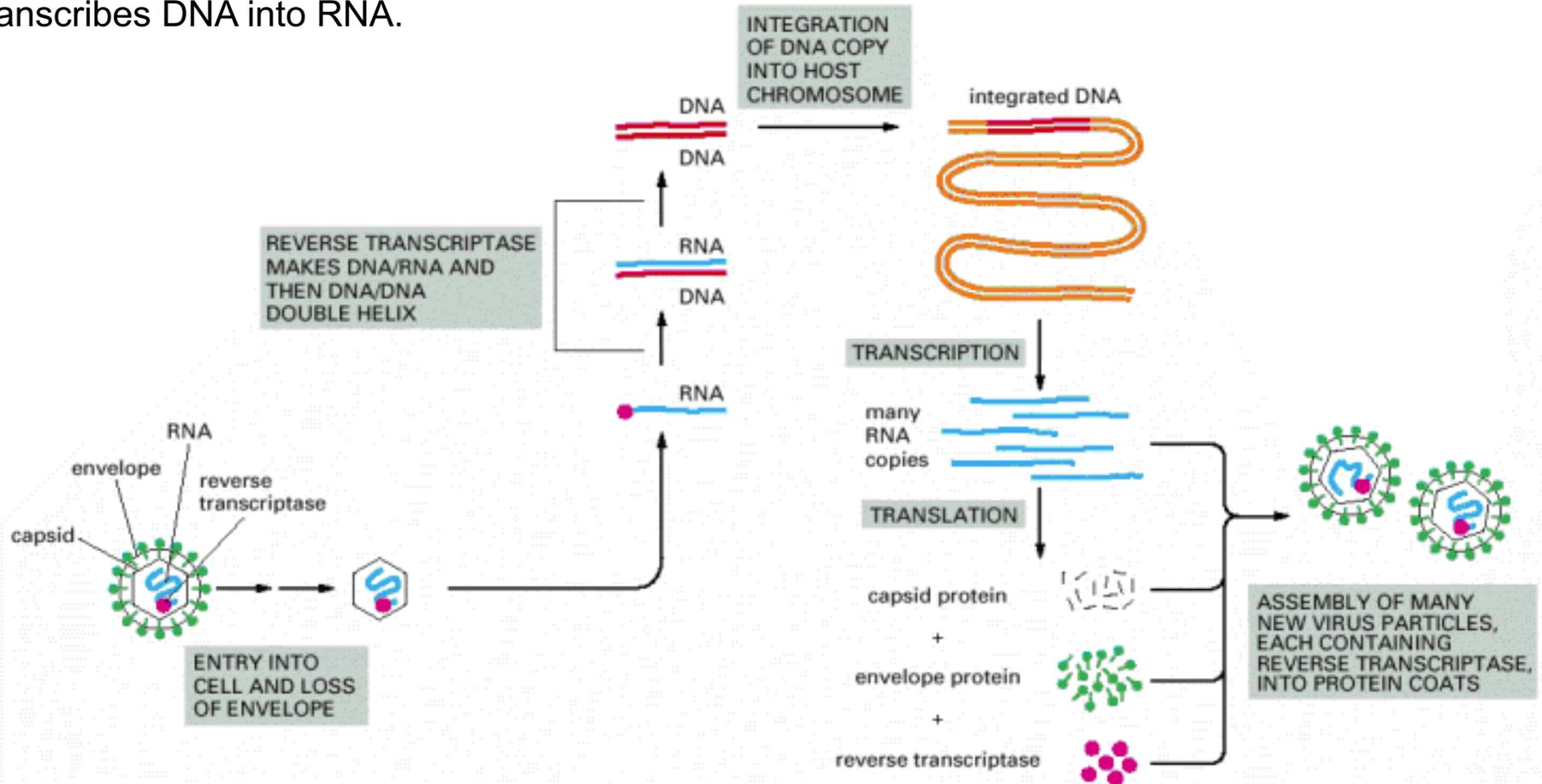
B) RETROTRASPOSONI SIMILI AI VIRUS

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



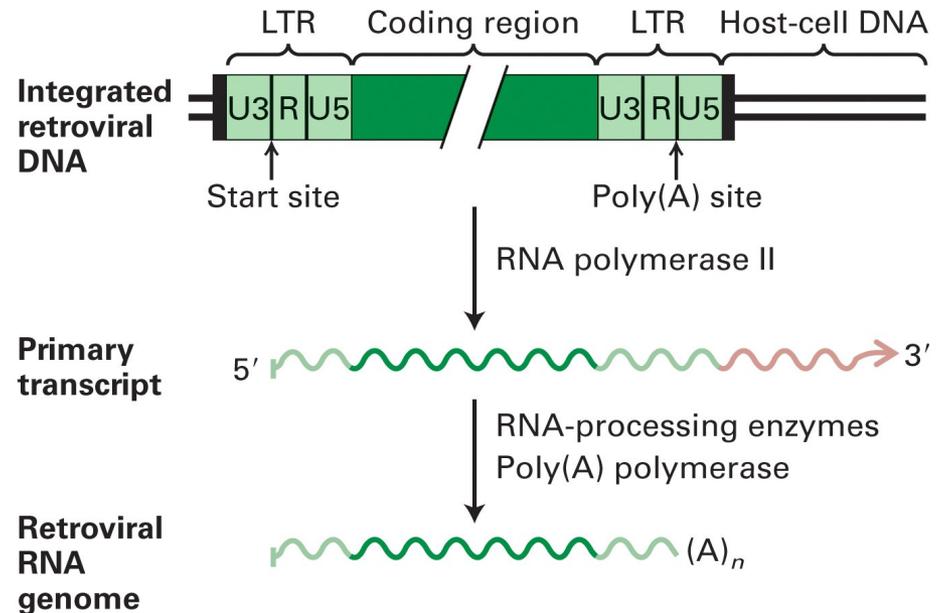
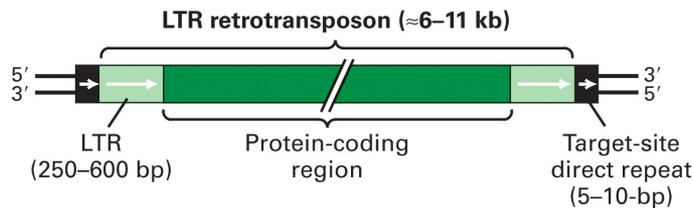
The life cycle of a retrovirus

The retrovirus genome consists of an RNA molecule of about 8500 nucleotides; two such molecules are packaged into each viral particle. The enzyme *reverse transcriptase* first makes a DNA copy of the viral RNA molecule and then a second DNA strand, generating a double-stranded DNA copy of the RNA genome. The integration of this DNA double helix into the host chromosome is then catalyzed by a virus-encoded *integrase* enzyme. This integration is required for the synthesis of new viral RNA molecules by the host cell RNA polymerase, the enzyme that transcribes DNA into RNA.



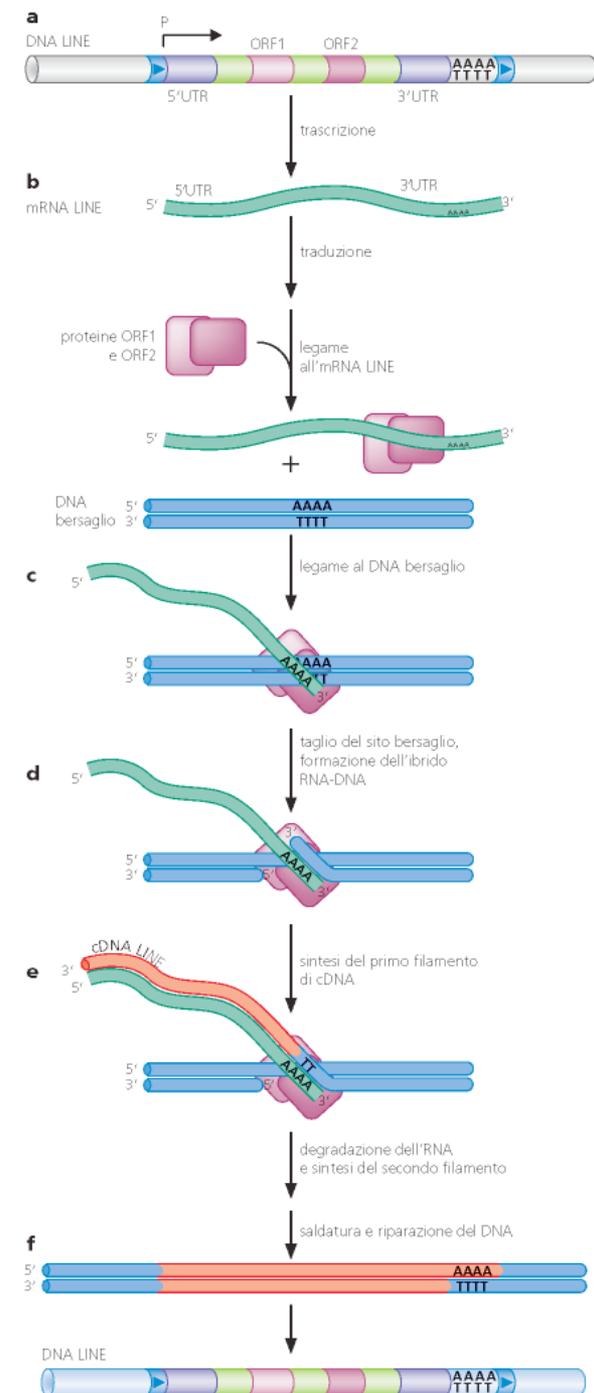
Esempio: LTR retrotransposons

- 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 da retrovirus endogeni (**ERV**)



C) RETROTRASPOSONI poli-A

- Usano un meccanismo chiamato **trascrizione inversa innescata dal sito bersaglio**
- L' RNA codifica per due proteine: **ORF1** lega l'RNA, **ORF2** ha attività di **trascrittasi inversa e endonucleasi**. Portano l'RNA sul bersaglio
- Dopo il taglio il 3'OH del DNA fa da primer e RNA da templat.
- Siti ricchi di T sono preferenziali perché la coda di poli-A si può appaiare.



Esempio: LINE e SINE

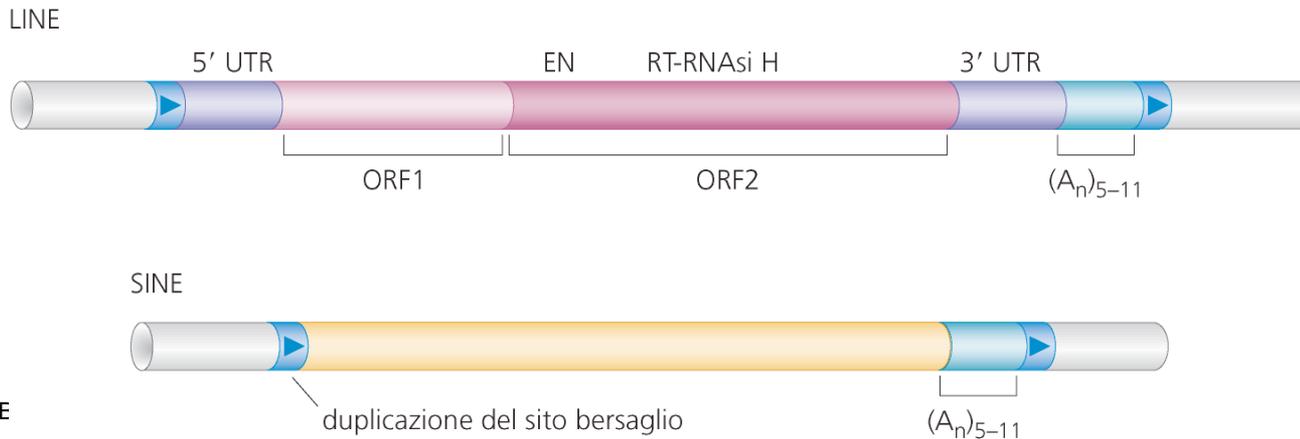
Chiamati anche retrotransposoni non virali.

Formano **due classi**:

- *Long interspersed nuclear elements (LINE)* (6 kb), promuovono la loro mobilità e forniscono le proteine per la mobilità di **SINE**.
- *Short interspersed nuclear elements (SINE)* (300 bp).

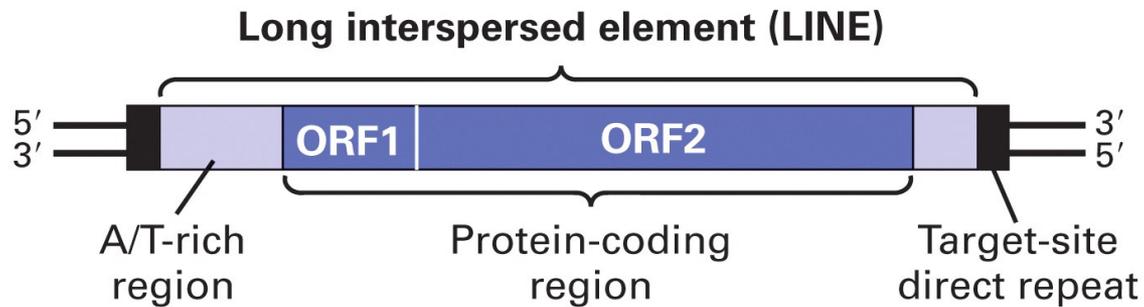
Hanno sequenze simili ai geni: un promotore e poliA.

Nel genoma esistono retropseudogeni (geni processati) derivano da mRNA che vengono trasposti grazie a proteine codificate da LINE (poco efficiente perché si legano ad alta affinità a RNA LINE).

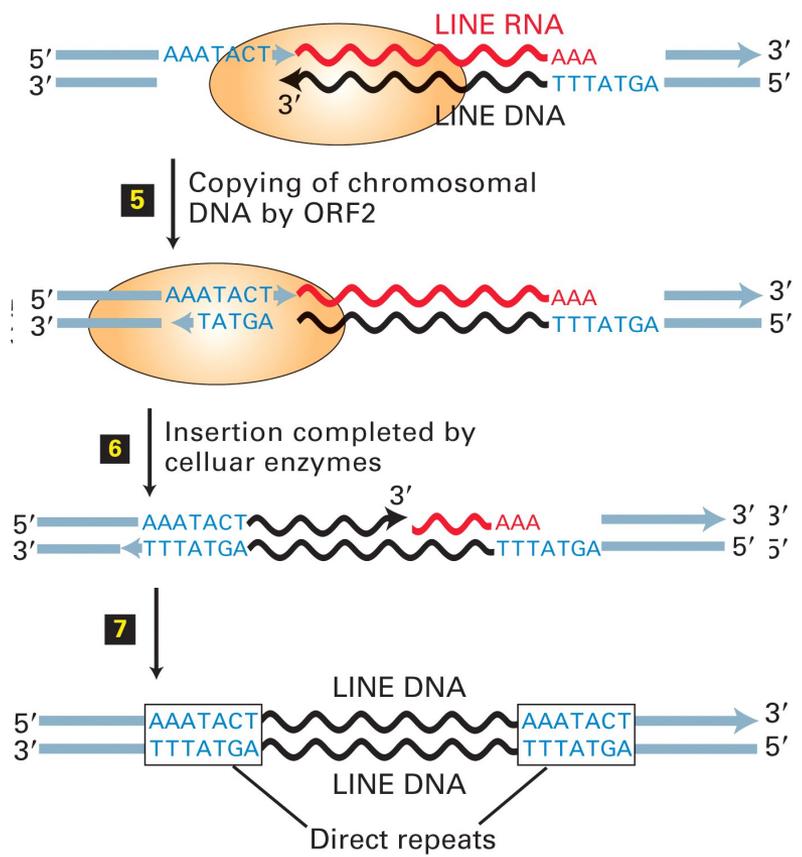
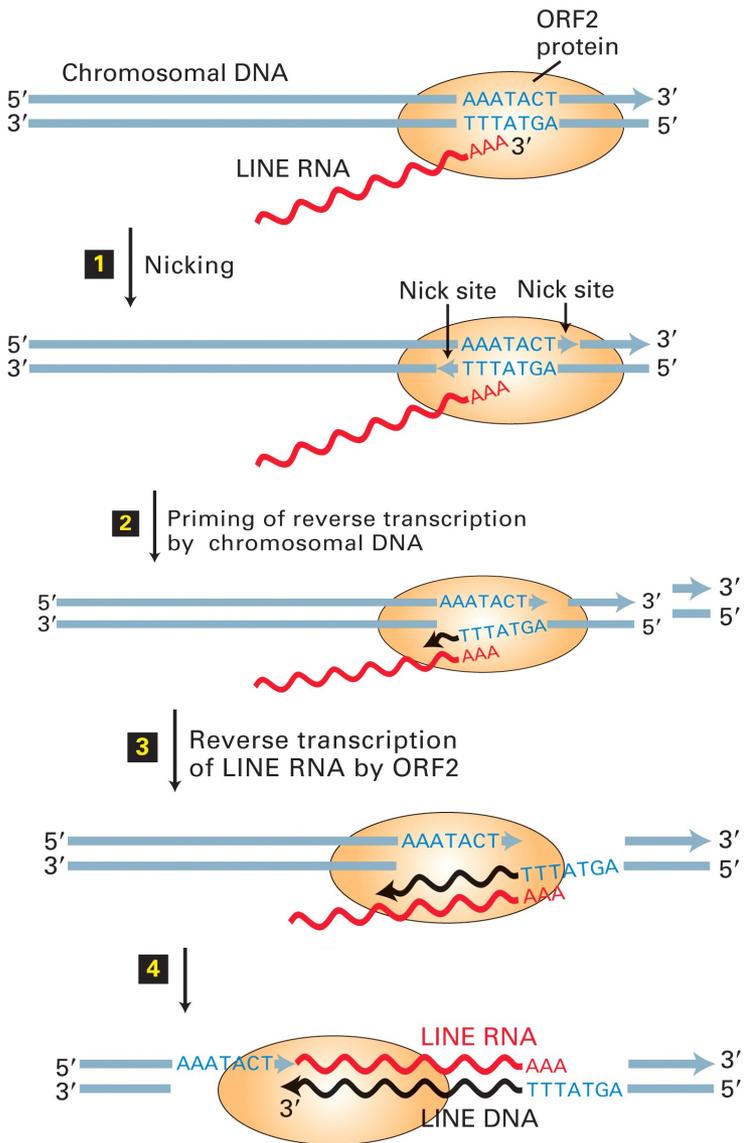


LINE

- Tre maggiori famiglie: L1, L2 ed L3
- L1 è la più abbondante (21% genoma umano)
- Codifica: RNA-binding protein (ORF1) e rev transcriptase/DNA endonuclease (ORF2).

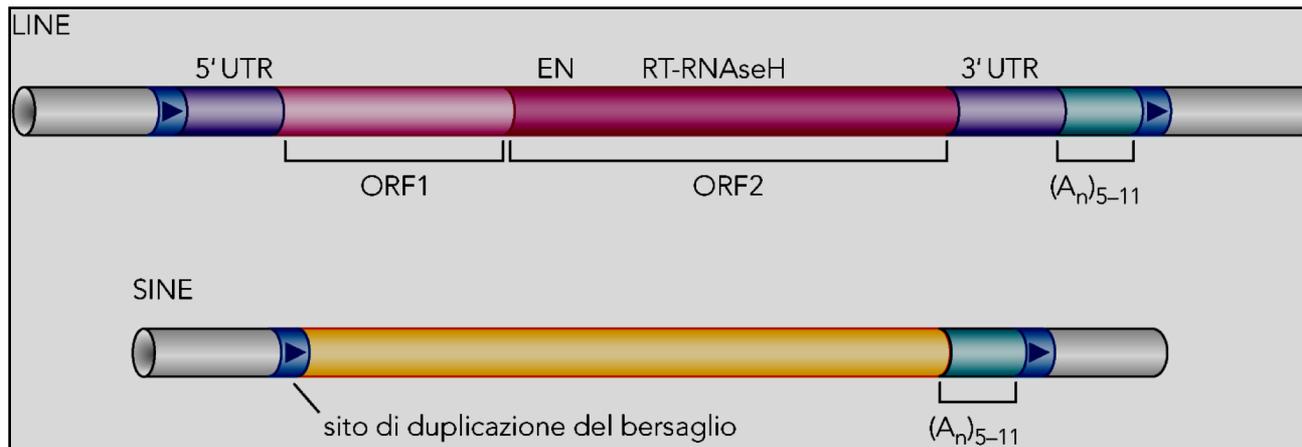
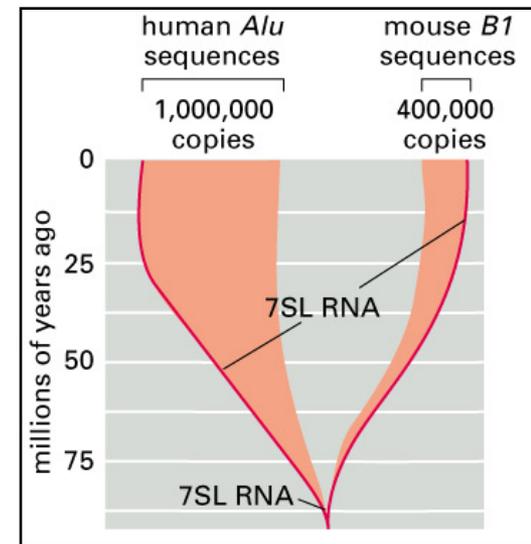


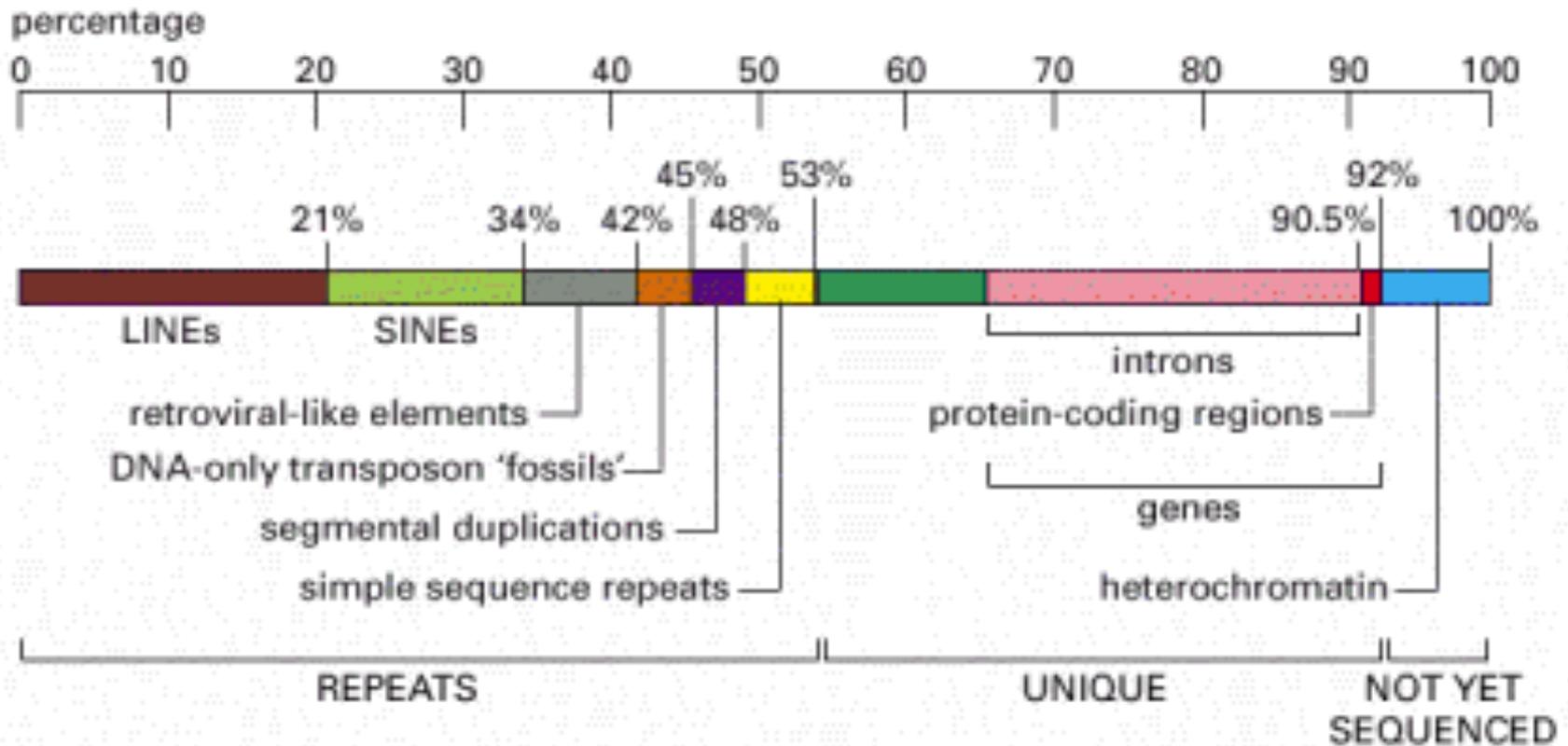
LINE



SINE

- 13% DNA umano
- 100-400 bp., non codificano proteine, dipendono da altri elementi.
- Hanno una sequenza ricca in A/T, come LINE
- 1.6 milioni di siti, di cui 1.1 sono elementi *Alu*





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.

Alcune considerazioni sugli elementi trasponibili

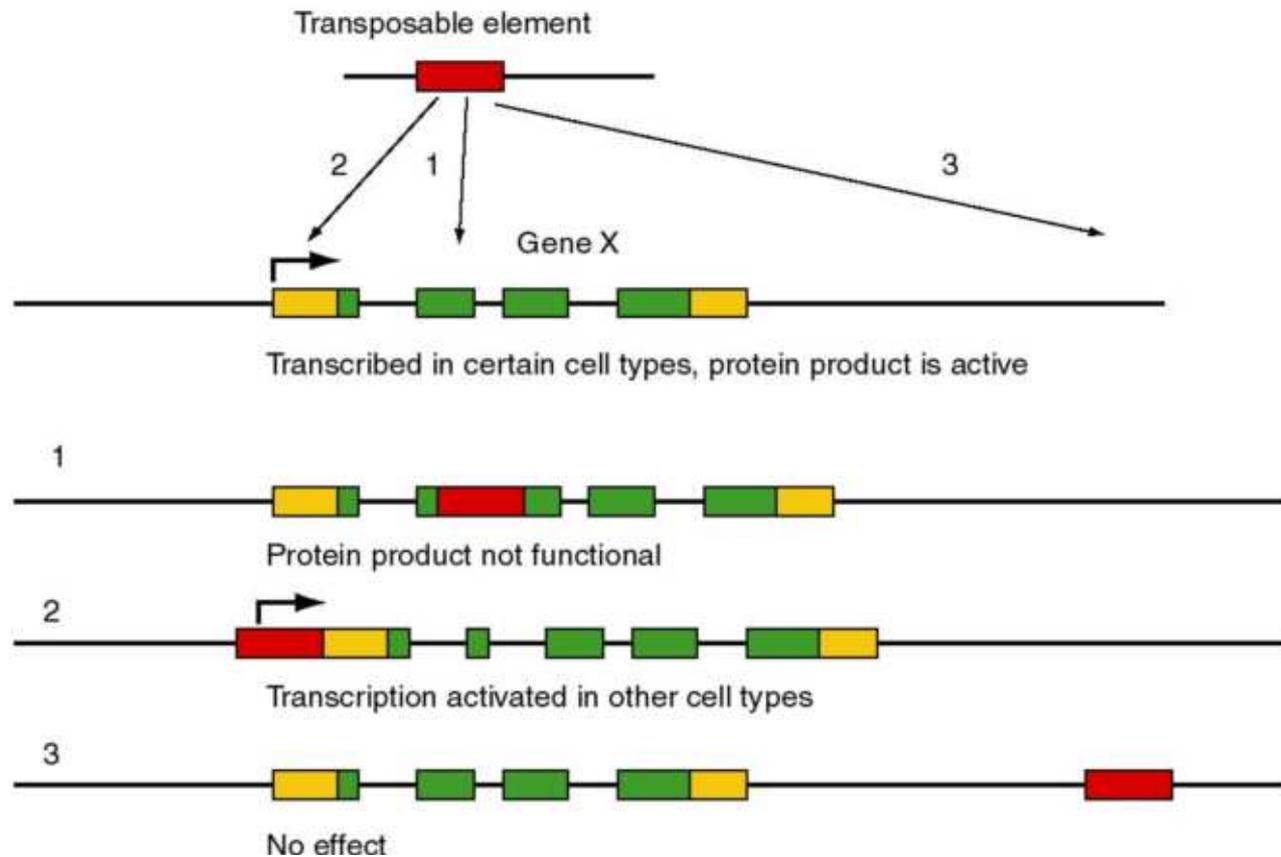
I trasposoni sono presenti nei genomi di tutte le forme viventi. Questo “successo” è dovuto anche al fatto che la **trasposizione è regolata** in modo da non compromettere la cellula ospite. Sono importanti per la plasticità e l'evoluzione del genoma ma possono essere “distruttivi” -> equilibrio!!!!

I genomi delle piante sono molto ricchi di trasposoni -> variazioni del colore. Sono stati scoperti nelle piante. Nel 1940 **Barbara McClintock** (Nobel per la Medicina nel 1983) scoprì gli “elementi di controllo” nel mais.



- 1) I trasposoni **controllano il numero delle proprie copie** -> limitano l'impatto sul genoma.
- 2) I trasposoni **controllano la scelta del sito bersaglio** (siti non “pericolosi” per l'ospite).

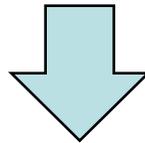
Possibili effetti della trasposizione



Alcune considerazioni sugli elementi trasponibili

Sotto certi aspetti possono essere considerati come **elementi parassitari**, e in effetti alcuni di essi sono imparentati con particolari famiglie di virus (retrovirus). Tuttavia rappresentano un formidabile **fattore positivo per i processi evolutivi**. Non a caso circa il 45% del genoma umano e' costituito da residui di trasposoni.

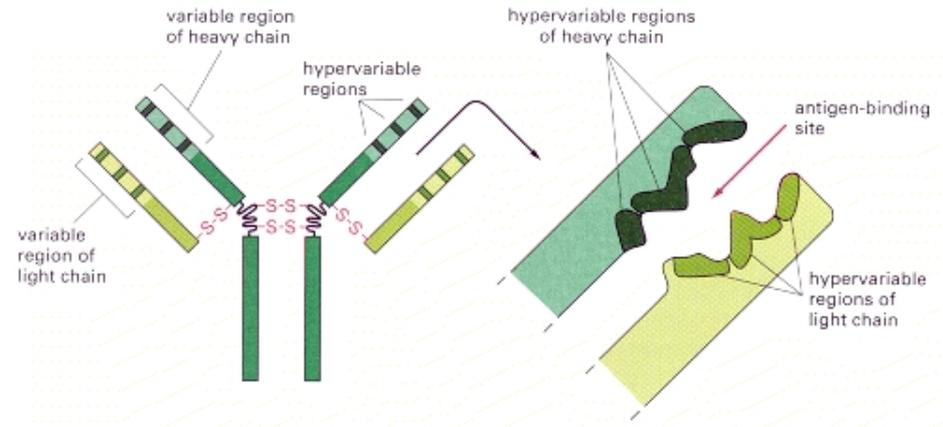
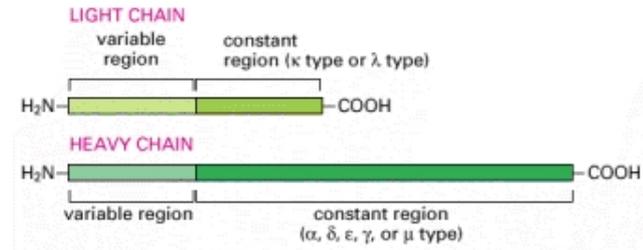
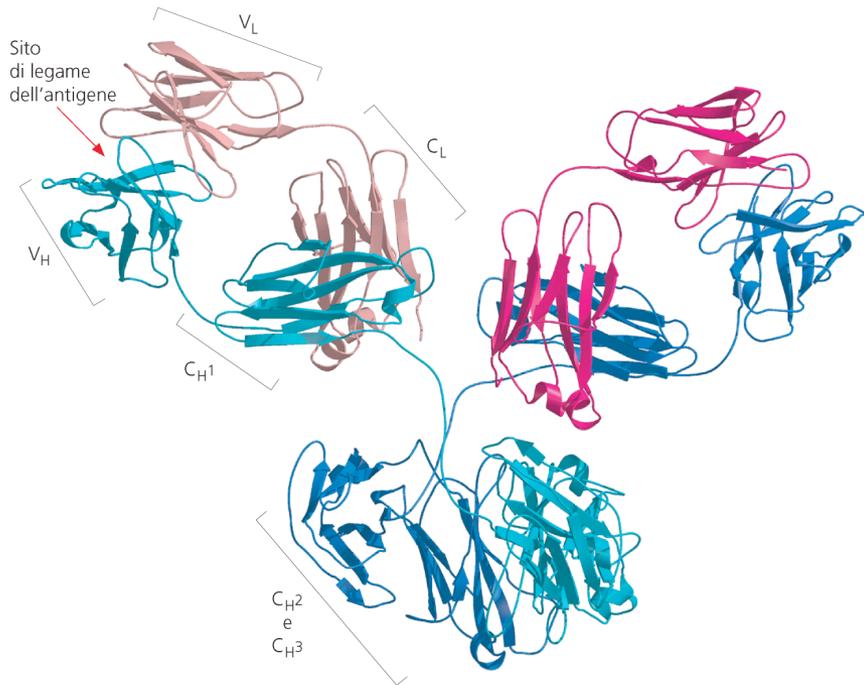
La mobilità dei trasposoni nella linea germinale aumenta le probabilità di avere organismi con nuove caratteristiche che possono rivelarsi vincenti in rapporto alle condizioni ambientali



Evoluzione del genoma

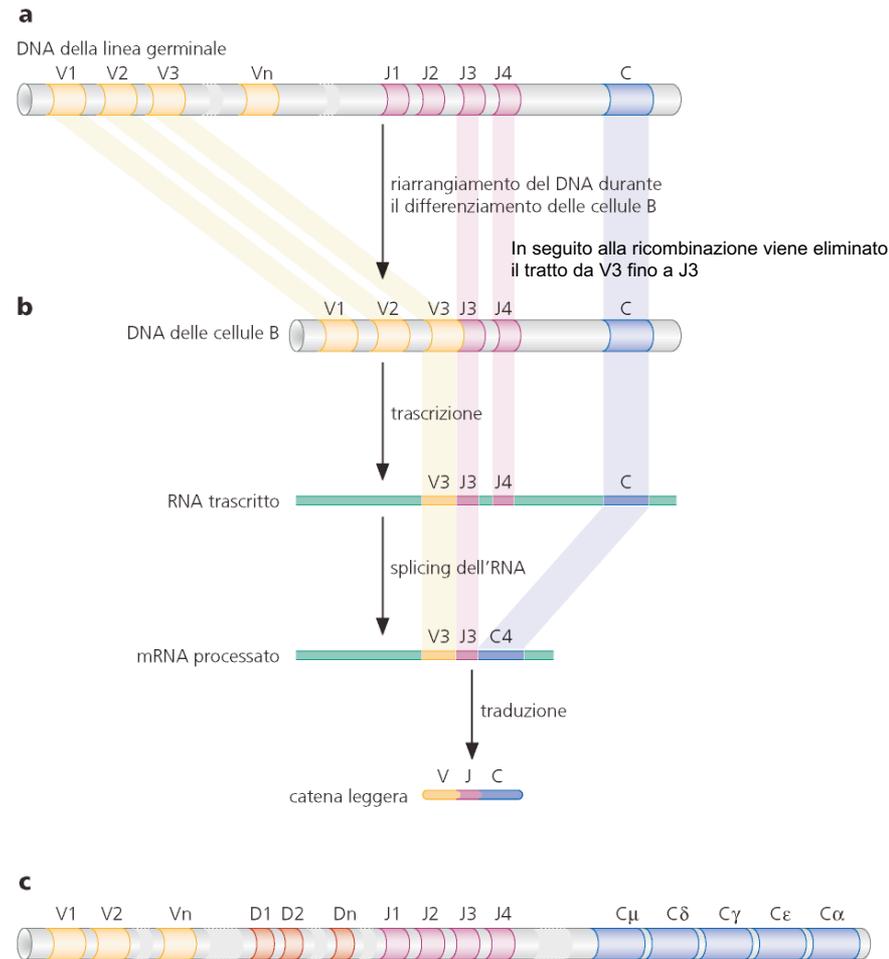
Ricombinazione V(D)J

Avviene nelle cellule del sistema immunitario. Gli anticorpi ed i recettori delle cellule T devono riconoscere molti antigeni diversi -> **ricombinazione V(D)J**.



Ricombinazione V(D)J

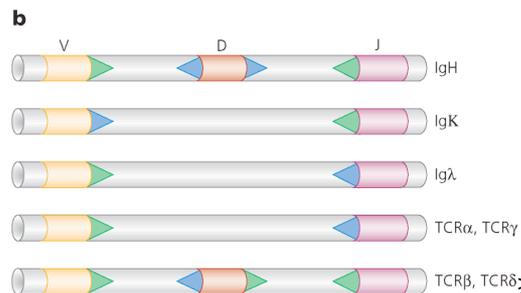
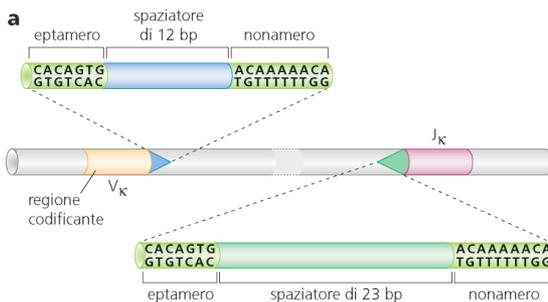
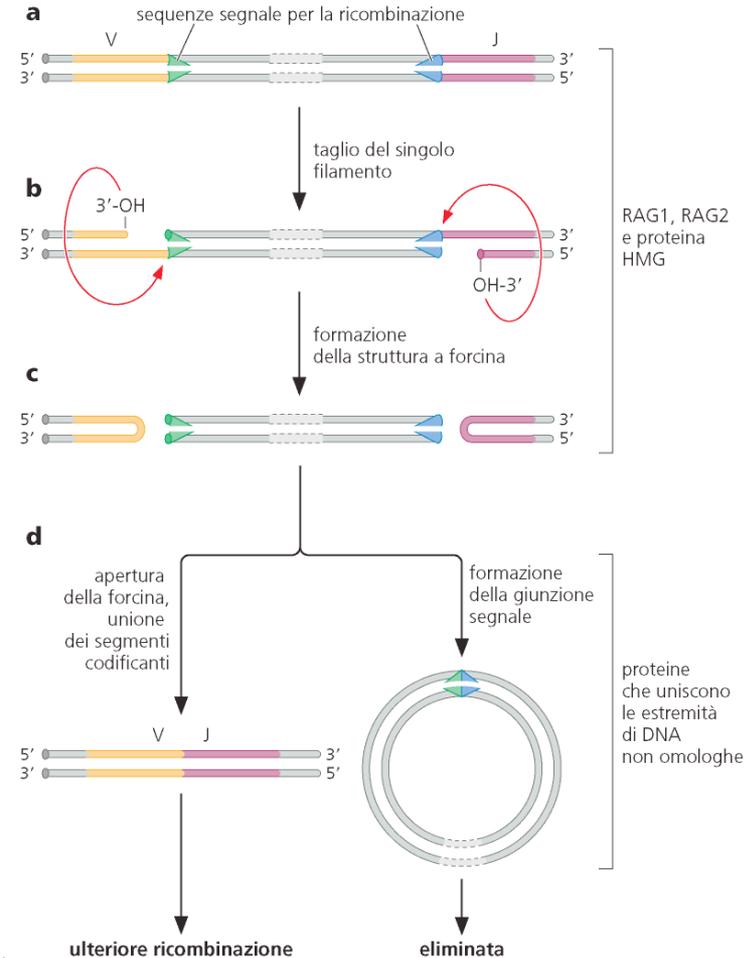
- Regione genomica codificante una **catena leggera** di un anticorpo, **locus kappa** nel topo. Circa 300 segmenti genici **V**, 4 **J** ed 1 **C** -> **1200** versioni diverse di catene leggere a partire da questa unica regione genomica attraverso la ricombinazione.
- Per la **catena pesante** in aggiunta c'è il segmento genico **D** (diversity). Un locus nel topo 100 segmenti **V**, 12 **D** e 4**J** -> **4800** combinazioni. L'anticorpo si forma fra qualsiasi catena pesante e qualsiasi leggera -> elevata diversità.



Oltre a ricombinazione si ha utilizzo di un singolo promotore e splicing -> un trascritto con 1V, 1J e 1C.

Ricombinazione V(D)J

- Adiacenti ai segmenti genici V(D)J vi sono le sequenze segnale per la ricombinazione: l'eptamero e il nonamero.
- Ci sono **2 classi** di sequenze segnale per la ricombinazione (spaziatore da 12 e spaziatore da 23). La ricombinazione avviene sempre fra classi diverse.
- Le ricombinasi sono **RAG1** e **RAG2** (recombination-activating gene 1 e 2).
- Durante l'unione del DNA si ha spesso aggiunta o delezione di nucleotidi -> ulteriore fattore di diversità.



Meccanismi di ricombinazione

Tabella riassuntiva

Tipo	Meccanismo	Esempi
Ricombinazione omologa	Avviene fra sequenze omologhe	Riparazione di danno al DNA da rottura a doppio filamento (principalmente procarioti ed eucarioti subito dopo la fase S) Crossing over durante la meiosi (eucarioti)
Ricombinazione conservativa sito specifica (CSSR)	Avviene a livello di specifiche sequenze	Integrazione/escissione del DNA fagico nel genoma batterio Cre/Lox (escissione) Segmento <i>hin</i> in Salmonella (inversione)
Ricombinazione per trasposizione	Avviene senza bisogno di omologia di sequenza	a) Trasposoni a DNA (taglia e incolla). Ad es. Tn10 batteri. b) Retrotrasposoni tipo virus/retrovirus. Ad es. retrotrasposoni LTR. c) Retrotrasposoni poli-A. Ad es. LINE e SINE.
Ricombinazione V(D)J	Avviene fra 2 classi di sequenze segnale	Locus per la catena pesante e leggera delle immunoglobuline (linfociti B) e TCR (linfociti T)

Alcuni video

Trasposoni

<https://www.youtube.com/watch?v=xfN8eFwzoK0>

<https://www.youtube.com/watch?v=CroyUMRpbxg>

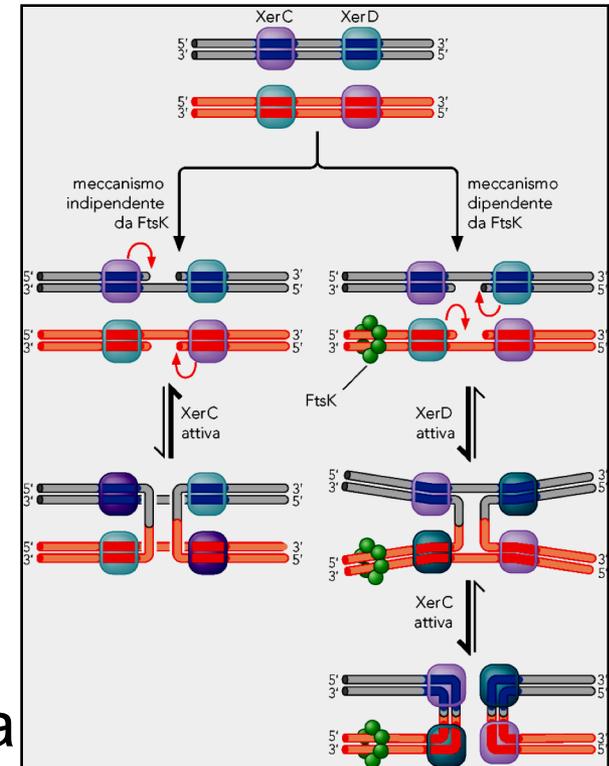
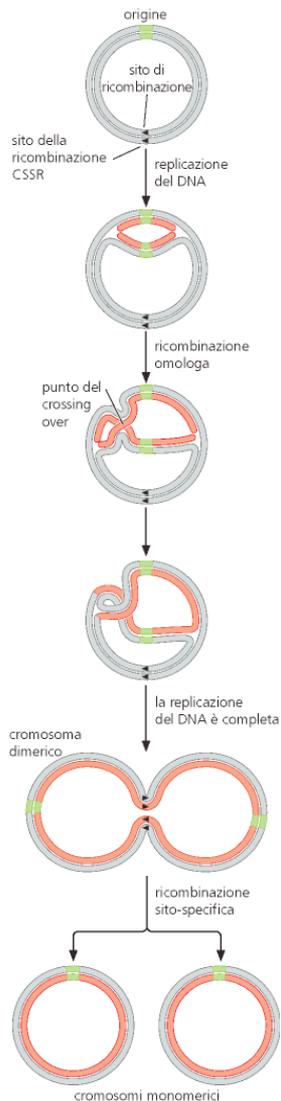
Myzanichelli

La ricombinazione conservativa sito-specifica

La ricombinazione per trasposizione

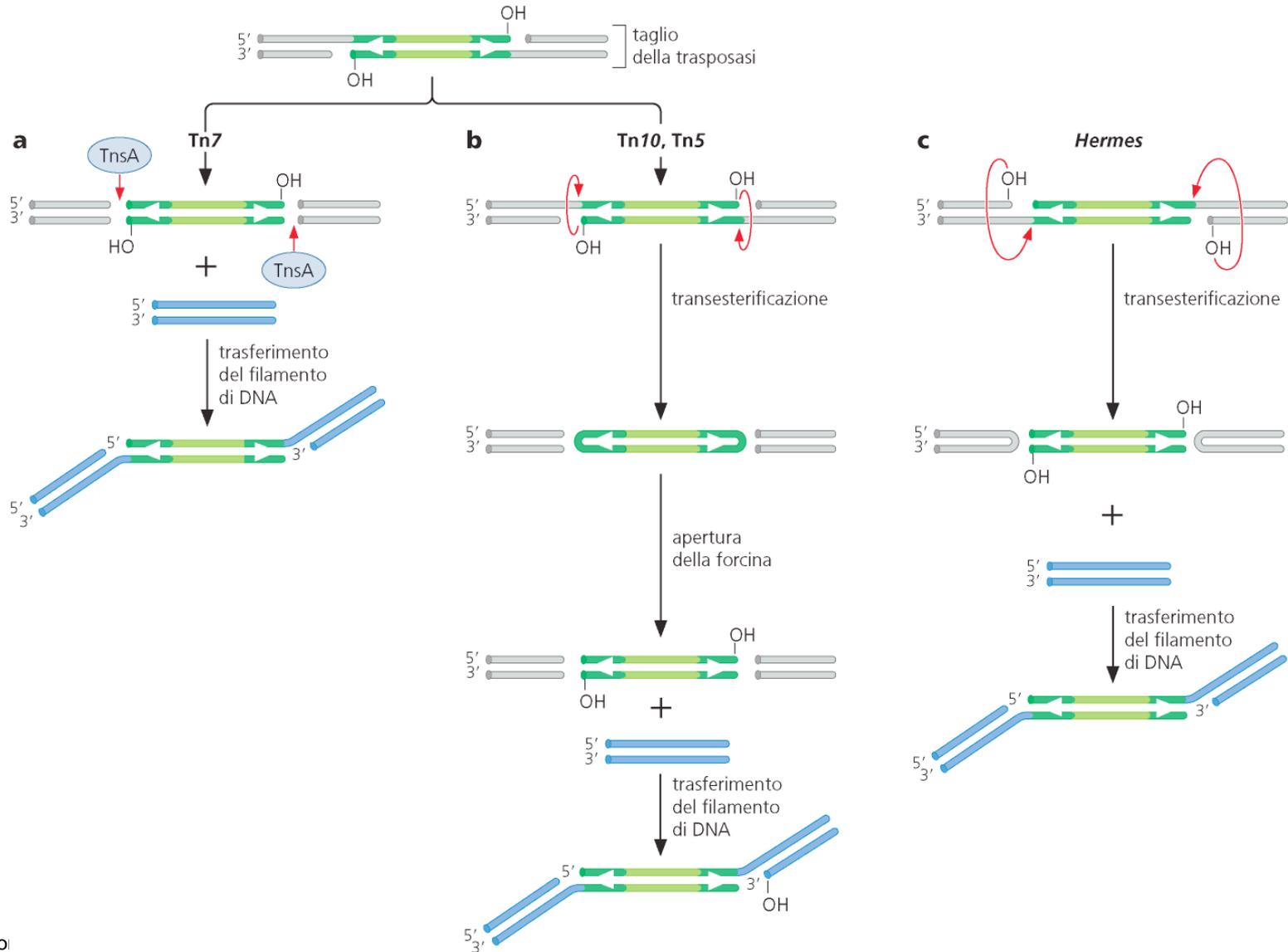
Le resolvasi

- I DNA circolari dopo la ricombinazione omologa formano dimeri od oligomeri.
- Le ricombinasi chiamate **resolvasi** generano i monomeri.
- In *E. coli* la resolvasi **XerCD** riconosce il sito **dif**
- Durante la replicazione cellulare è aiutata da **FtsK**, una ATPasi.



Xer (2 C + 2 D). C sono attive sempre, D solo in presenza di FtsK (proteina legata alla membrana dove avviene la divisione cellulare → sincronizzazione con il ciclo di divisione cellulare).

Meccanismi di taglio del filamento non trasferito



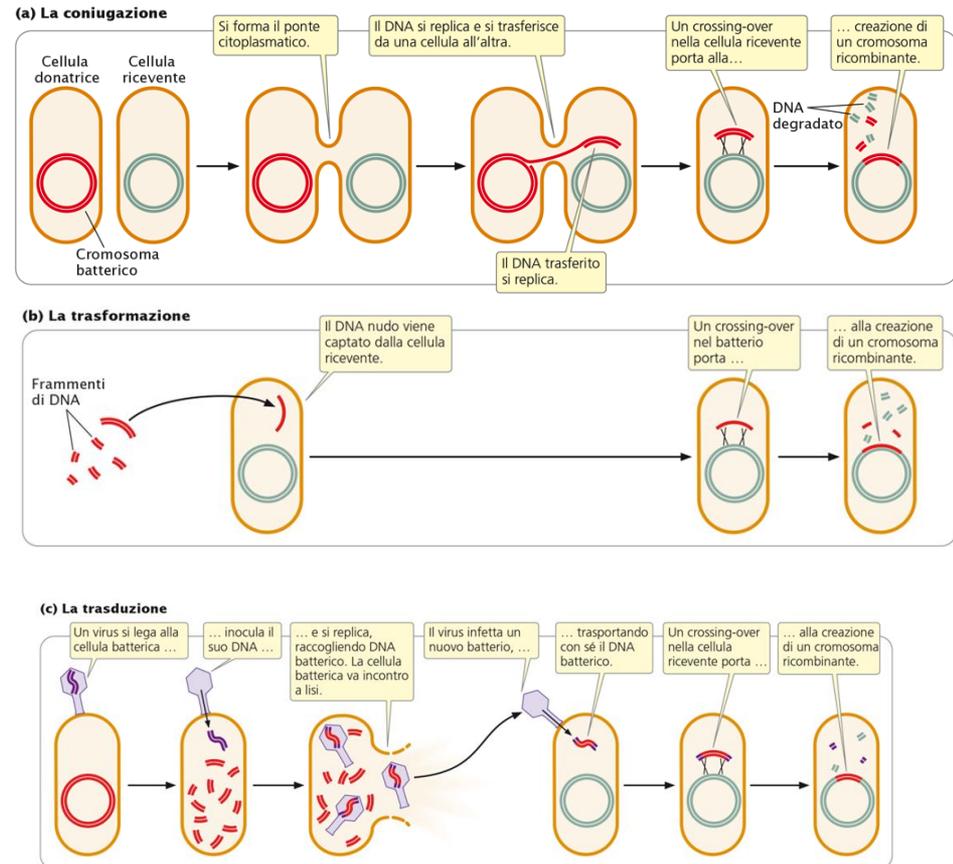
I batteri scambiano DNA

LA CONIUGAZIONE si verifica quando il materiale genetico passa direttamente da un batterio all'altro.

LA TRASFORMAZIONE ha luogo quando un batterio accoglie materiale genetico presente nel terreno di coltura (esp. Griffith).

LA TRASDUZIONE quando virus batterici (i batteriofagi) trasportano materiale genetico da un batterio a un altro.

(Trasferimento orizzontale)

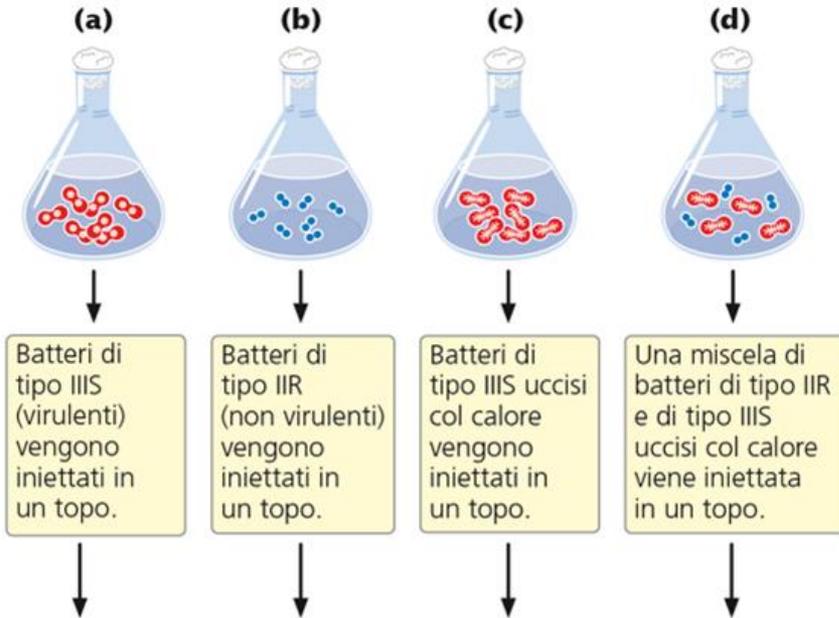


ESPERIMENTI DI GRIFFITH

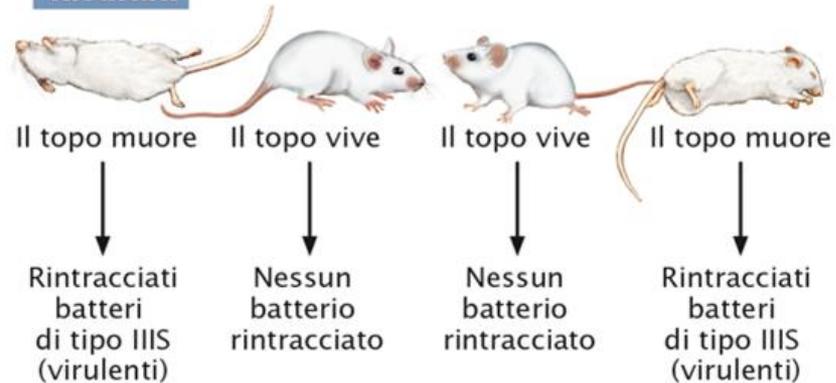
Esperimento

Domanda: Un estratto proveniente da cellule batteriche morte può trasformare geneticamente cellule vive?

Metodi



Risultati



Conclusione: Una sostanza presente nei batteri virulenti uccisi col calore ha trasformato geneticamente i batteri di tipo IIR in batteri di tipo III S, vivi e virulenti.

Modello della retrotrascrizione di RNA retrovirale genomico in DNA

PBS = primer binding site
U3 = estremità unica al 3'
R = ripetizione
U5 = estremità unica al 5'

