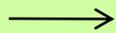


# ELEMENTI TRASPONIBILI

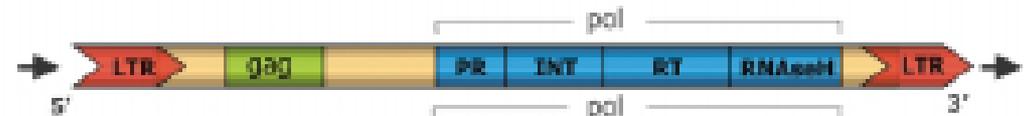


## Class I transposable elements or Retrotransposons

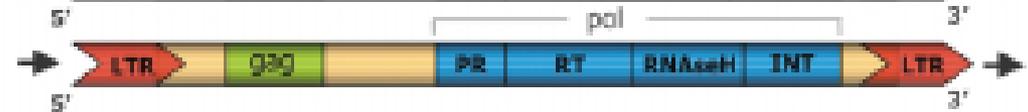


### LTR Retrotransposons

Ty1-copia group



Ty3-gypsy group

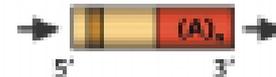


### Non-LTR Retrotransposons

LINE



SINE



## Class II transposable elements



Autonomous element



Non-autonomous element



MITE

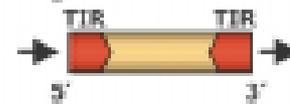
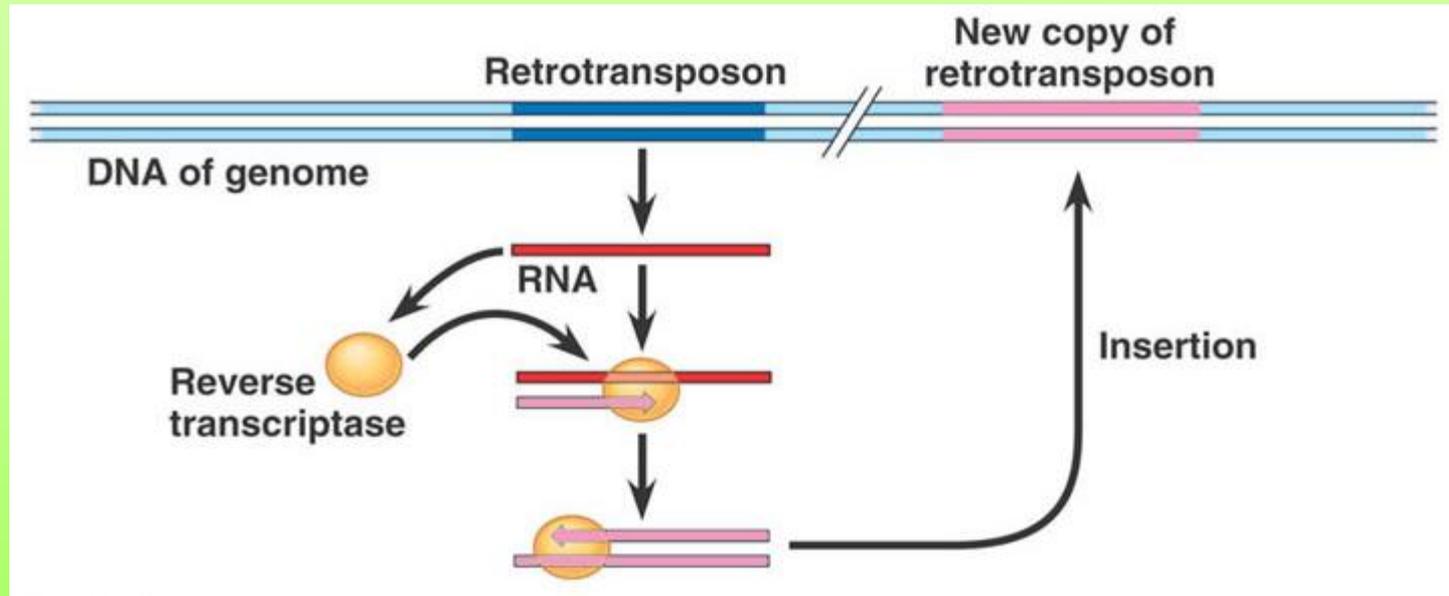


Fig. 1. Structure of the different types of plant transposable elements.

LTR contengono sequenze che regolano la trascrizione

Non-LTR la trascrizione è regolata da promotori interni

# RETROTRASPOSONI



Il modo di replicarsi dei retrotrasposoni "copia e incolla" porta ad aumentare rapidamente il numero di copie nel genoma

**Retrotrasposoni LTR** presentano lunghe sequenze ripetute alle estremità (100-5000 bp)

*retrotrasposoni Ty1-copia*

*retrotrasposoni Ty3-gypsy*

**Retrotrasposoni non-LTR** non presentano sequenze ripetute alle estremità

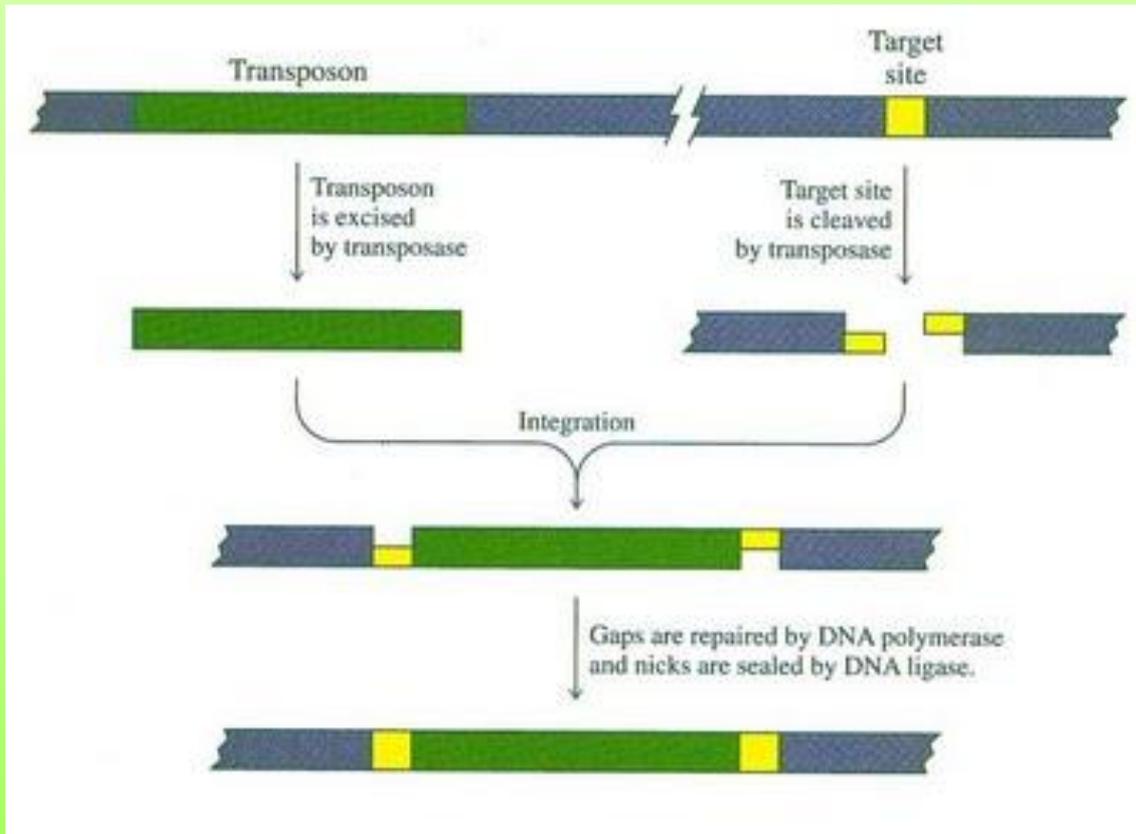
*le LINE sono lunghe sequenze di DNA (di più di 5000 bp)*

*le SINE sono brevi sequenze di DNA (di meno di 500 bp)*

non codificano per la trascrittasi inversa; hanno perciò bisogno delle proteine codificate da altre sequenze (LINE) per trasportare.

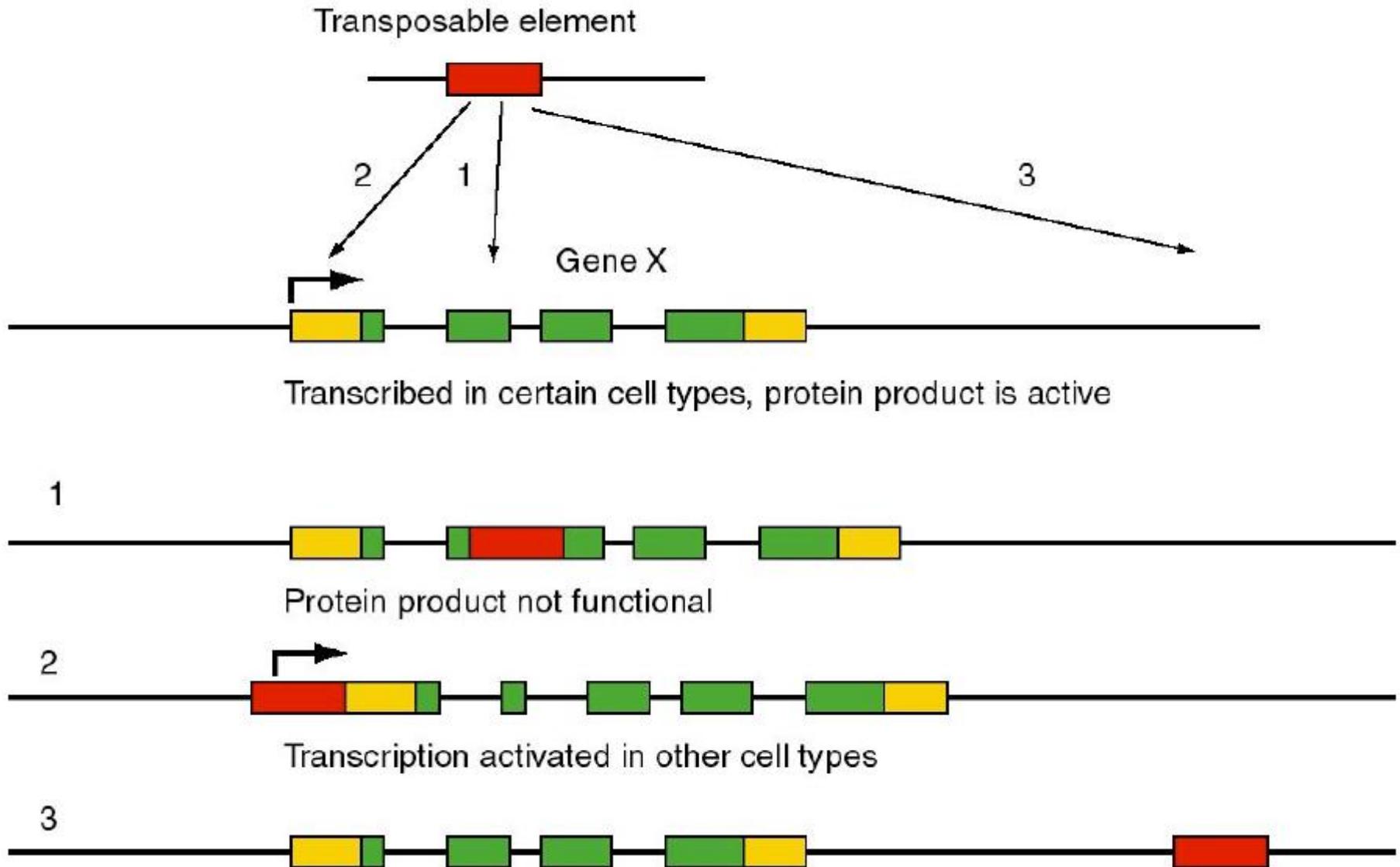
Retrotrasposoni: 50-80 % nei genomi vegetali

# TRASPOSONI



Generalmete presenti in più basso numero di copie rispetto ai retrotrasposoni.

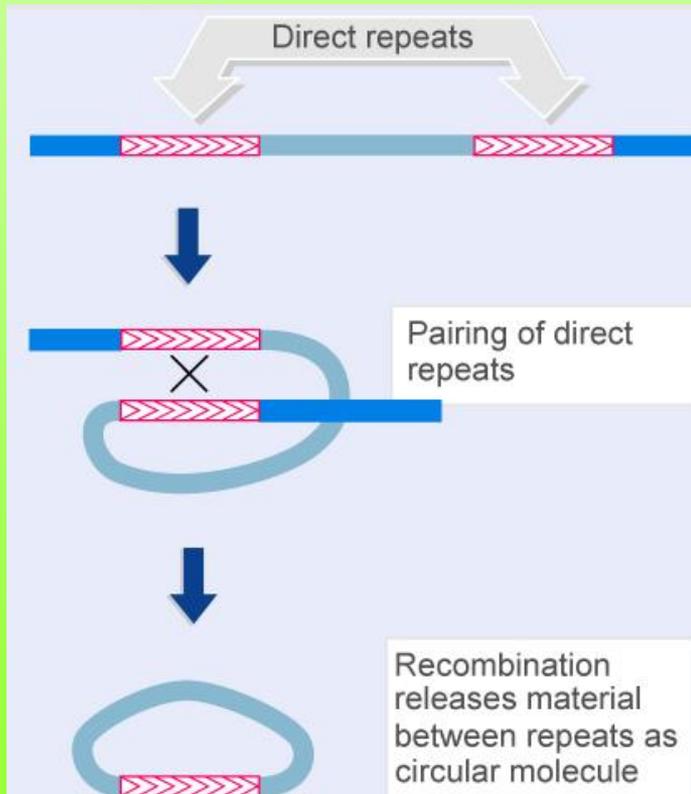
# TE are major forces in the evolution and rearrangement of genomes



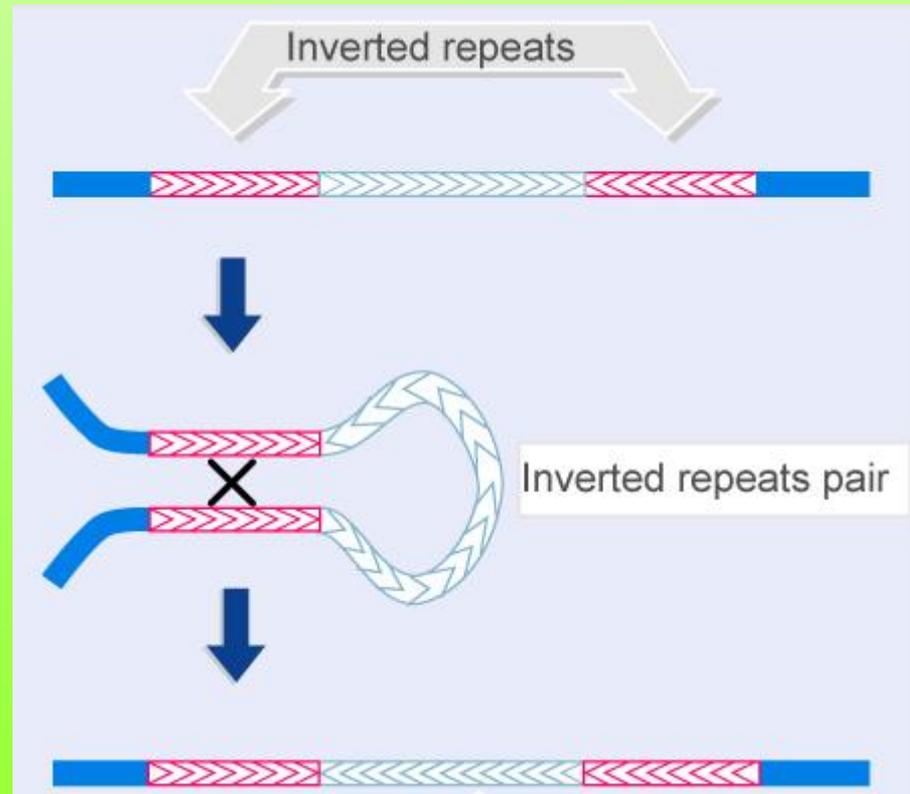
TE può attivare, inattivare o non avere effetto sui geni vicini:

→ dove si inserisce  
dall'orientamento  
dalla sequenza

delezione



inversione



TE costituiscono buona parte del materiale genetico degli eucarioti

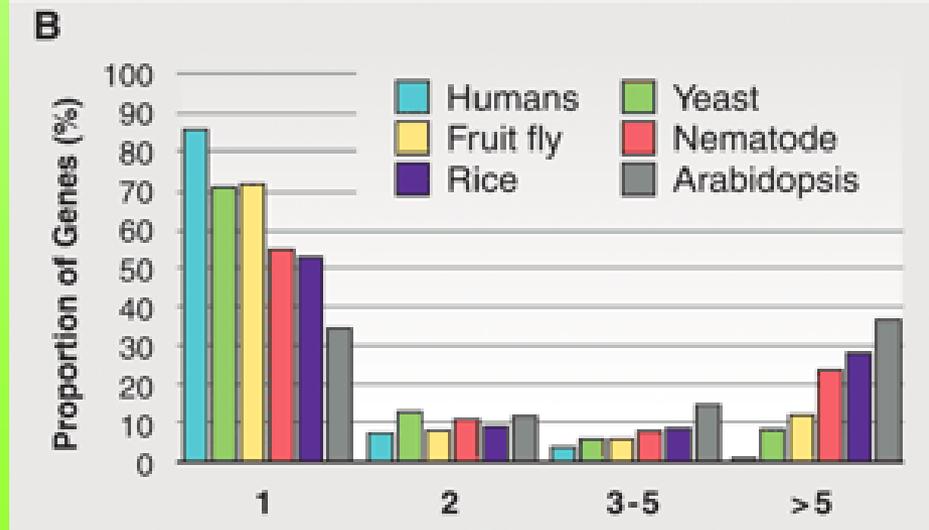
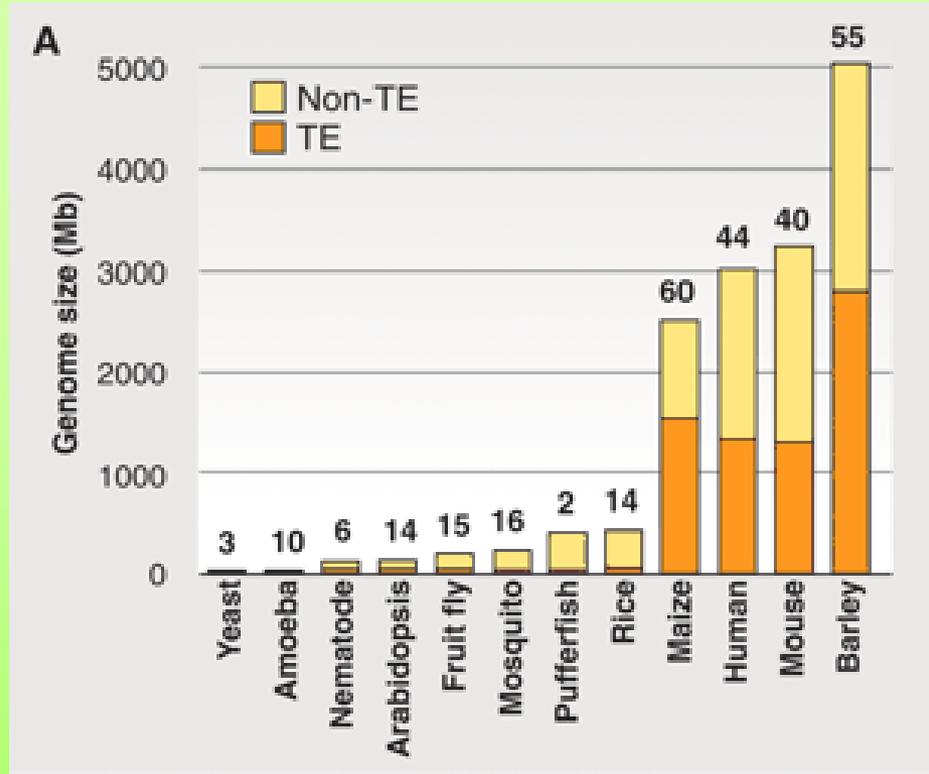
45% del genoma umano

50-80% del genoma dei vegetali

In regioni eterocromatiche ed intergeniche

I TE presenti in alto numero di copie:

- hanno contribuito e contribuiscono all'evoluzione del genoma
- sono soprattutto i TE inattivi



L'abilità di essere controllati da vari stimoli e l'abbondanza di questi elementi nel genoma portano a supporre un loro ruolo nel controllo dell'espressione genica (es. frumento)



Un elemento trasponibile in grado di attivare i geni adiacenti



Sequenze che funzionano da enhancer

*Craterostigma plantagineum* (Schrophulariaceae)

## Resurrection plant

Può sopravvivere allo stato disidratato e riprendere tutte le funzioni quando viene somministrata acqua



hydrated



dehydrated



rehydrated



Callo



Callo  
+  
ABA



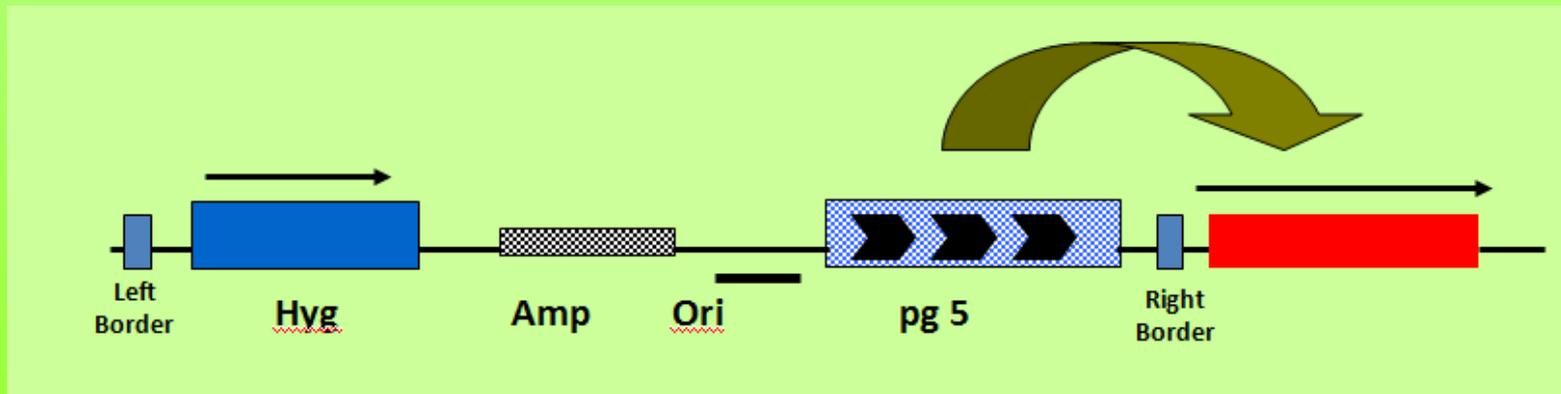
In callus and leaves ABA and dehydration induce drought-responsive genes:

pc 6-19

pc 27-45

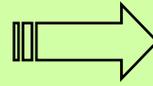
pc 11-24.....

T-DNA tagging to over-expressed flanking plant genes:

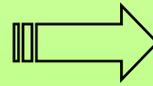


allowed the isolation of desiccation tolerant callus in the absence of ABA

trasformed



wild-type



Il callo trasformato aveva lo stesso aspetto del callo WT trattato con l'ABA



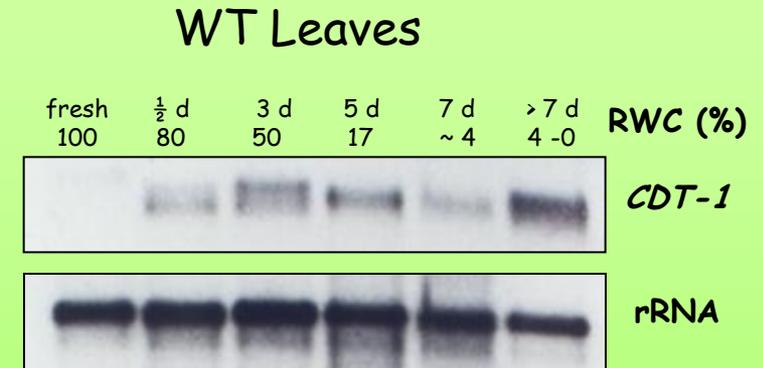
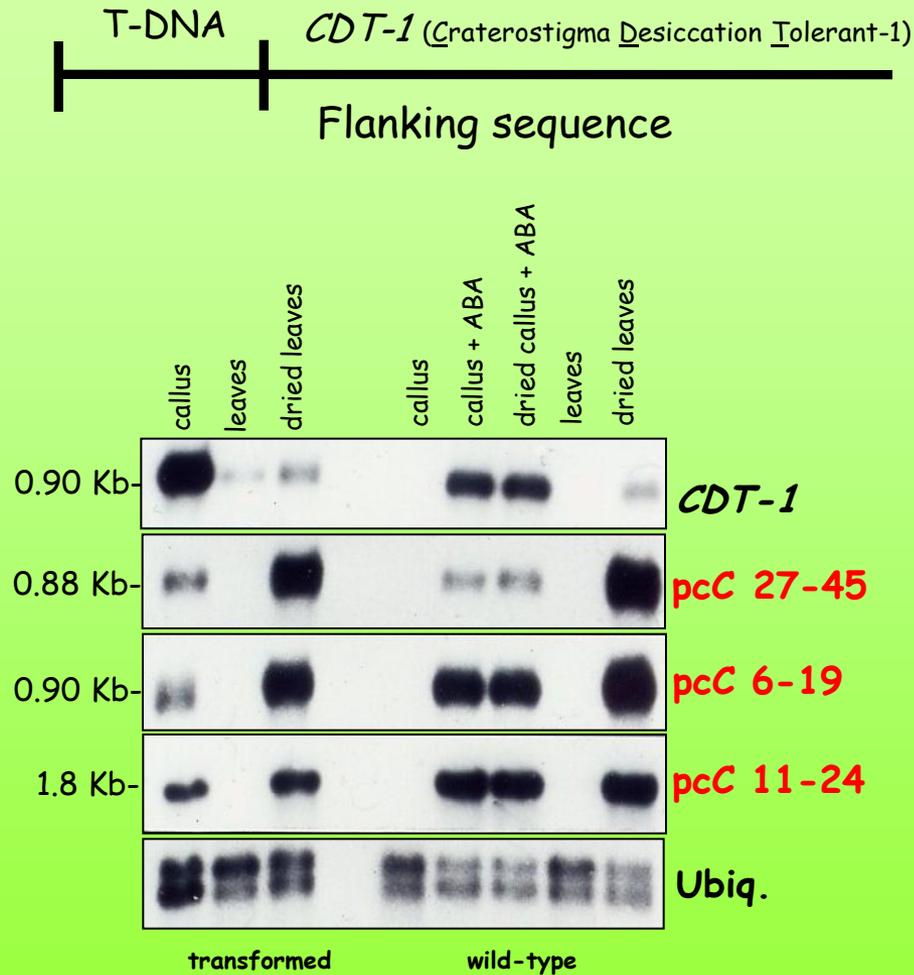
Le piante rigenerate dal callo avevano il fenotipo del WT



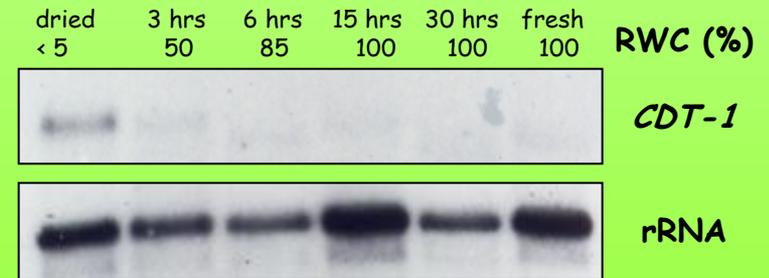
Il callo ottenuto da queste piante aveva il fenotipo del callo WT trattato con ABA

# Analisi della trascrizione

Characteristics of the T-DNA flanking sequence:

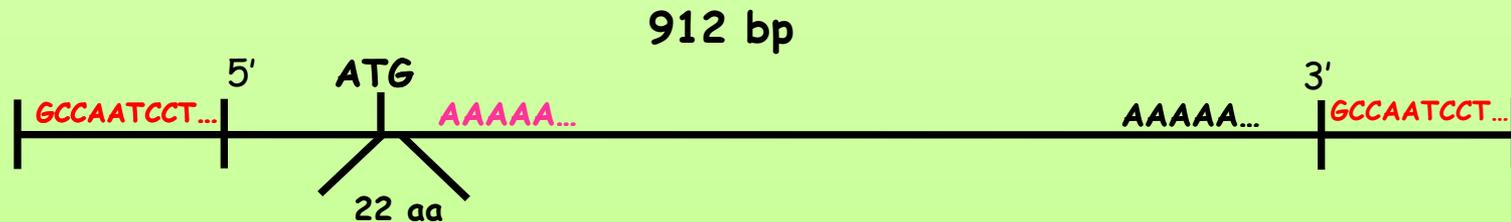


Desiccation



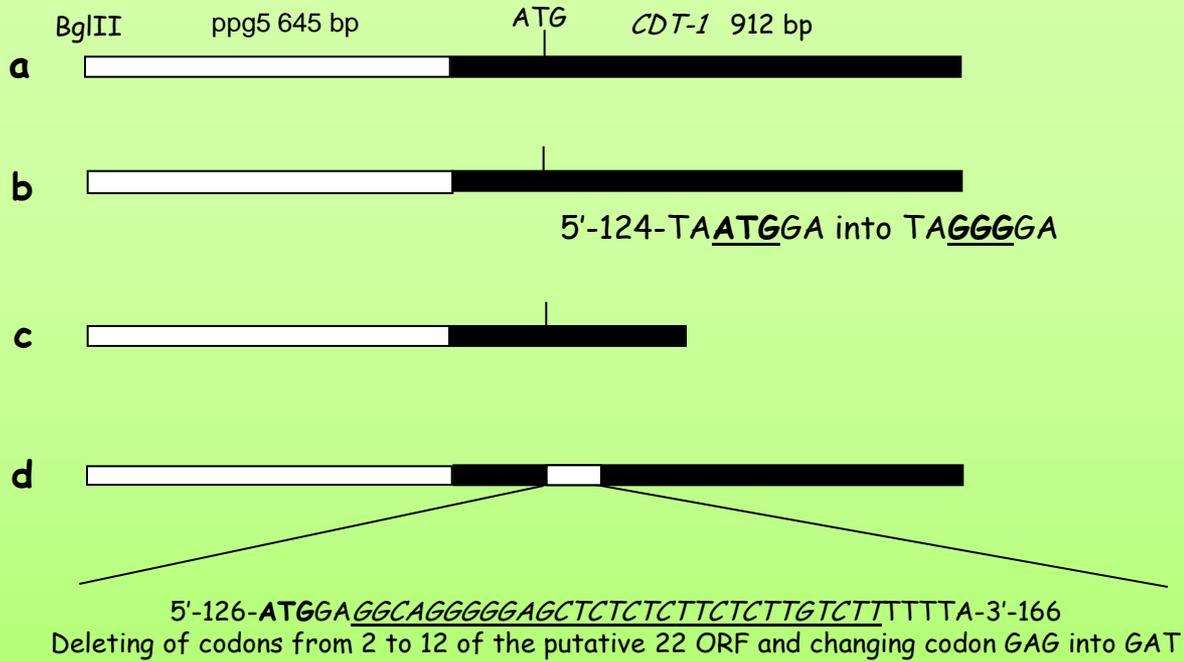
Rehydration

## *CDT-1* is a gene with unusual features:



- 1) 22 aa ORF with an AUG codon
- 2) No translational product was observed
- 3) No sequences homologous to *CDT-1* were found in databases
- 4) An oligo(A) track of 18-21 nucleotides in the 5' region in all cDNA and genomic clones
- 5) Poly(A) tail is present in genomic clones
- 6) It is flanked by direct repeats
- 7) The structure of *CDT-1* is reminiscent of SINE retroposons
- 8) Integration of multiple copies in the genome
- 9) *CDT-1* is inducible by ABA in callus and by dehydration in plant

# Transformation with mutated versions of *CDT-1*



# Callus phenotype

Desiccation tolerant

Desiccation tolerant

Desiccation sensitive

Desiccation tolerant

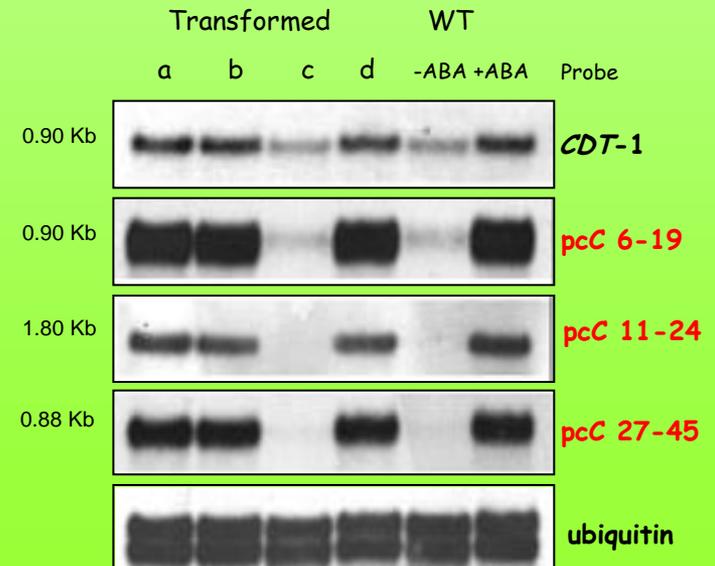
desiccation tolerant



desiccation sensitive



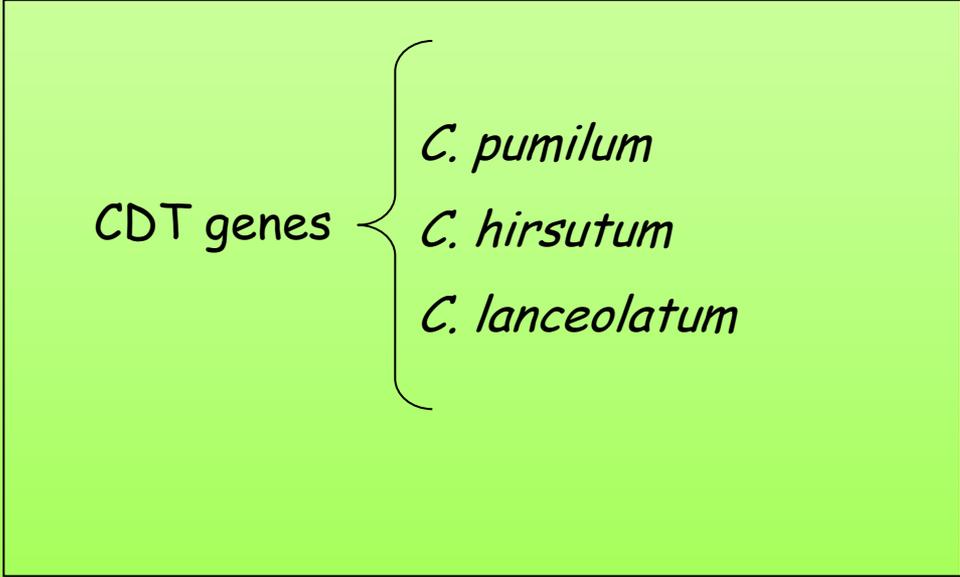
# callus



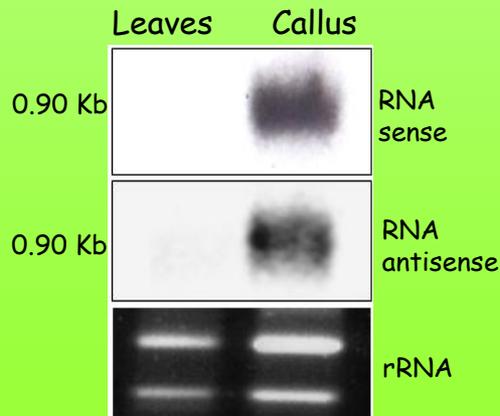
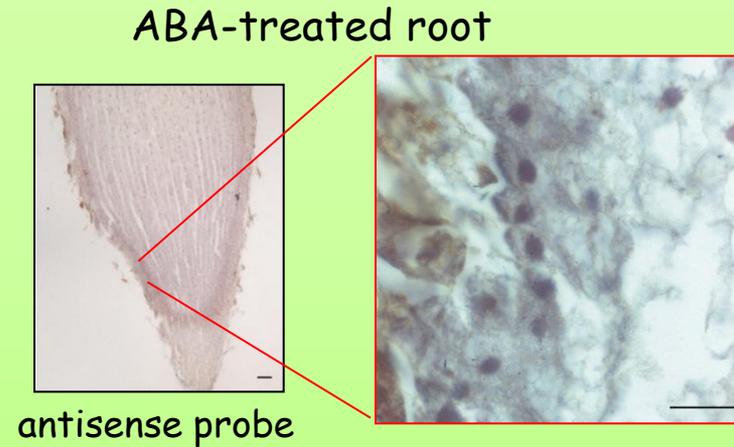
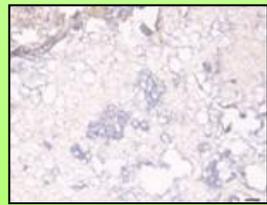
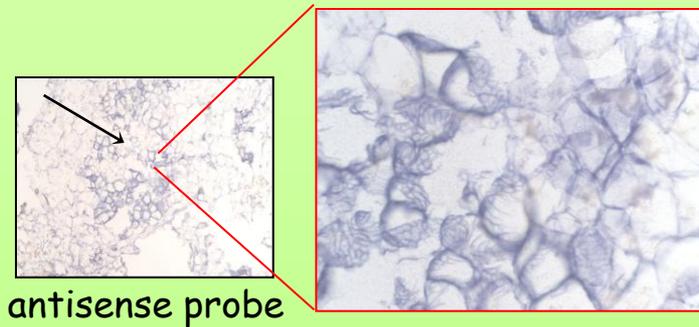
# T-DNA tagging: identification of *CDT-2* and *CDT-3* *Craterostigma* genes

## Allineamento di cDNA CDT-1-CDT-2

CDT-1	TTGAAATACGGCTGTCTCAAAAACCGCTCTCTCTTATTTCCTCCCATCTCACTA	60
CDT-2	-----	
CDT-1	AAAACCCCTACCTCCACCGCGCCACACACAACCAAACCTTCCTCCTCCCTCCTC	120
CDT-2	-----	
CDT-1	CATTAATCGAGGCGAGGGAGCTCTCTCTCTCTCTTTTATTGCTTTCTGTITTT	180
CDT-2	-----G	1
CDT-1	ATATATTCAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAATGTGCGCCACCAACCCTCGC-CC	239
CDT-2	GCACGAGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAATTCCTCACCCCGCCGCTGCCACCACCAAGCC	61
	* * *	
CDT-1	ACCACCGTTGCCACCATCGCCAACCGCTACTGCCTGTCGCCACCGACGCCACATCC	299
CDT-2	CCCAACGCTGCCACCAACA--AGCCGCT-CTGCT-TCGCCCTCTCGCAGCCGCTGC	117
	*** ** *	
CDT-1	ACGGTCTTCATCCACAGTTACATCCACCGCTACGACCAACGCCCTCACCTGTCCGCT	359
CDT-2	GC---CTCCGCTTC--TCGTTGCCATCGCCGCCCTCGCTTTC-TTGGCCCGCTC	171
	** * * *	
CDT-1	CTCGTCCGCTCATCTGCTGCCCGCC--CCCTGTCGCCACGCCG--CGCC	416
CDT-2	TTCCCGCCAG--ATCTGCCACAGATCTGCCCTGCCCGCCGCCACCACTGCCGCTG	229
	** * * *	
CDT-1	CCAAGGGAAGCCGCCAGCTAAGCAGCTCGCGTGTG-CGCTGTG-CGCCAGCTCGCC	474
CDT-2	CCCTCTGCTGCCCGCCGCTGCCACCTCACTCGCTAGACTCGCCATAACT-ACAG	288
	** * * *	
CDT-1	GCAGCA-CTGCTTCGCCCGCTGCTGCCCGCCCTCATATCGCTGTGCACTCTCCAC	533
CDT-2	TCGCCACATCGCACTATCTGCCCGCCGCTGCCCGTGGGAGCTCTTCTCCCGG	348
	* **** ** * *	
CDT-1	TTTGTGGAGCTCGTCTCTCCGATCTCGATCTGAGCCTTTCTCCCTTGTGGAGCC	593
CDT-2	CCATTAGCTCGGAGCTTTTCTCCGCTGTG---GAGCCAATCTCCCTTGTGGAGCC	404
	** * * *	
CDT-1	CTCAGTCCACCTAGACAA-ACCCTAGCAAGTCGAAAACCAAGTTAAAATGAAGATATCG	652
CDT-2	TCT--TCGCATGAAAGCATAACTCGAGCGCTGCAAAAATAA--TCTAGACTACTG	460
	*** * *	
CDT-1	TAGATTTAGCTTAAAGCTTTTCTGTTATAGCTTCTTTAGTCTTGCTAGATAATGG	712
CDT-2	TAGATTTGGATTAAACCTTCTCTGCTATCTCTATAGATTTT-----TGG	509
	***** * * * *	
CDT-1	GTTAGTTTTCTGTGGTTTTTCTGCCCTGTGGACCTTTTCTCAGTCTGTACCC	772
CDT-2	TCCAAGTTCGAGCTT--TATTTCTTTCTGCTCGCTGTAT--TTTCTTTTC-	559
	*** ** *	
CDT-1	CTTGTGGTCTCTCTCTGCTCCCTGTGAGCCTTTCT--CTCCGCTTTTCTGCTAC	829
CDT-2	-----CTGATGCTTCTCTTATGAGCCTTTCTTCTACCGATCTGTGTAC	612
	** * * *	
CDT-1	GCTGAGACTCGCTGGCTATTTAGCC--TGTATCTTTGTT-ATTAAATAAAGTATCCCTT	887
CDT-2	CGAGAGACTTTTGGCTATTTAGCCCTGATCTTTGTTAATAAAGTATCCCTT	672
	** * * *	
CDT-1	TCCGGGAAAAAAAAAAAAAAAAA	911
CDT-2	TACCGAAAAAAAAAAAAAAAAA-	695
	* * *	



# CDT-1 sense and antisense RNA are detectable:



- 1) Sense and antisense RNA are present;
- 2) It is transcribed in metabolically active ABA-treated root cells;
- 3) It is transcribed only in particular cells type.

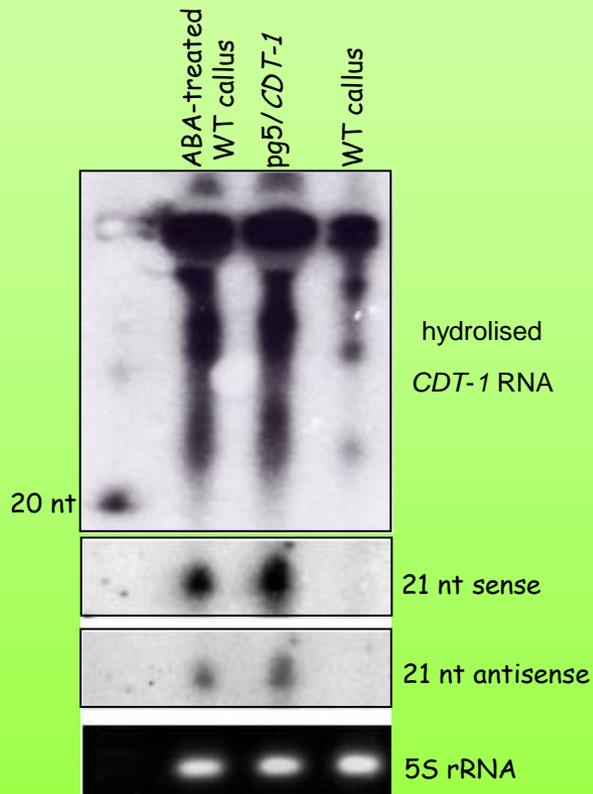
Clone	5' flanking sequence	CDT-1 element	3' flanking sequence
1	TTGCATCGTTGAACAATGGCTTCGAAAAAA →	aaaaaac cctt...A(25)	GAACAATGCCTTCGAAATT →
2	AAGAGAGAGAGAATCTGATACTCCA <b>CGCTTGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(17)	GAGAGAGAATCTGATGCCT →
3	<b>ACTCAACTTTTTTCTCTACTCACGGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(15)	TTTTTTCTCTATTACA →
4	AAATGACACGTTT <b>GAAATTACGCTTGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(10)	GAAATTACGCTTGCCTCGT →
5	<b>ACTCAACTTTTTTCTCTACTCACGGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(15)	CTTTTTTCTCTACTCACAAAGG →
6	GGTATTGAATATTGTTGTATTCTT <b>TCACGGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(10)	GAATATTGTTGTATTCTTTCAAAC →
7	TTCAACTAGGAATGGACTC <b>GAAATTACGCTTGTCTC</b> →	aaaaaac cctt...A(15)	CTAGGAATGGACTCAAGGCCA →
8	GCAAGTATT →	aaaaaac cctt...A(10)	GTATTAAGAATAAGAACT →
9	TATCAAGTAA <b>TAACCCCGAGAA</b> →	ccctccc atct...A(≥60)	TAATAACCCCGAGAAGAATCGATCC →
10	<b>TGACACGTTT<b>GAAATTACGCTT</b>GTTCT</b> →	aaaaaac cctt...A(10)	GAAATTACGCTTGTTCGCTG →

Le sequenze ripetute permettono in parte di ricostruire gli eventi di trasposizione

La sequenza conservata del retrotrasposone CDT-1 ci indica che svolge una funzione

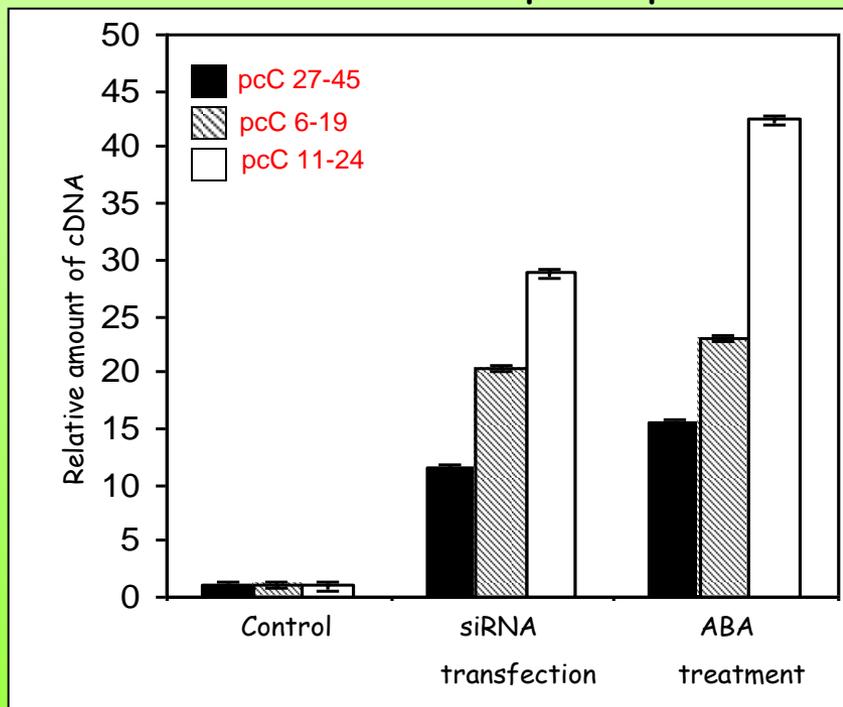
# Double-stranded *CDT-1* RNA and small interfering RNA

## Low MW RNA



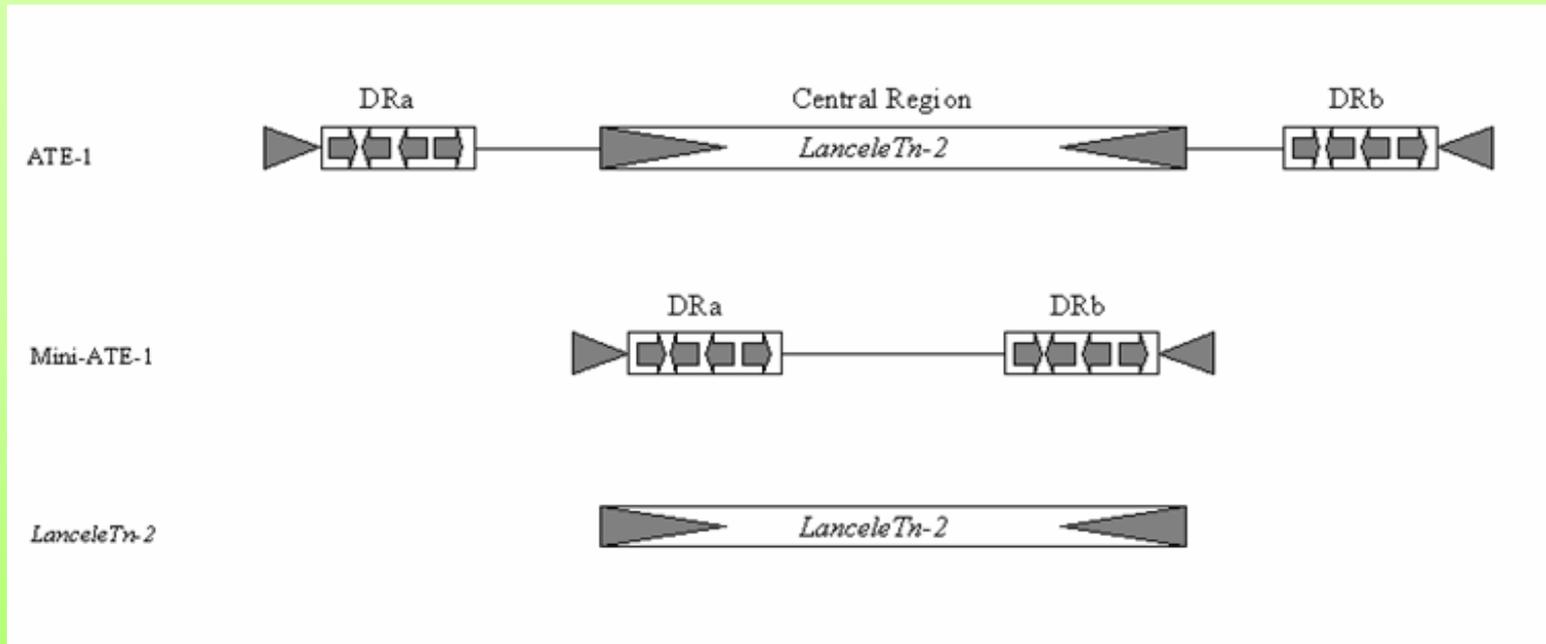
5'-GTTAAAATGAAGAGTATCGTA-3'

## Real time RT-PCR WT callus-derived protoplasts



- CDT-1 ha le caratteristiche di un retrotrasposone **SINE**
- In assenza di ABA, la trascrizione di CDT-1 in callo porta all'acquisizione della tolleranza alla disidratazione
- Conferisce a *Craterostigma* la capacità di mantenere l'integrità fisiologica durante il periodo di siccità
- La sintesi di RNA a doppio filamento e si RNA attivano il pathway che porta alla tolleranza alla disidratazione
- Questo carattere di adattamento si è acquisito durante l'evoluzione, ciò è dimostrato dalla conservazione delle sequenze
- In pianta le continue trasposizioni e reinserzioni del **SINE** portano ad una **amplificazione del fenomeno della tolleranza alla disidratazione**

# MITES: Miniature Inverted-repeat Transposable Elements

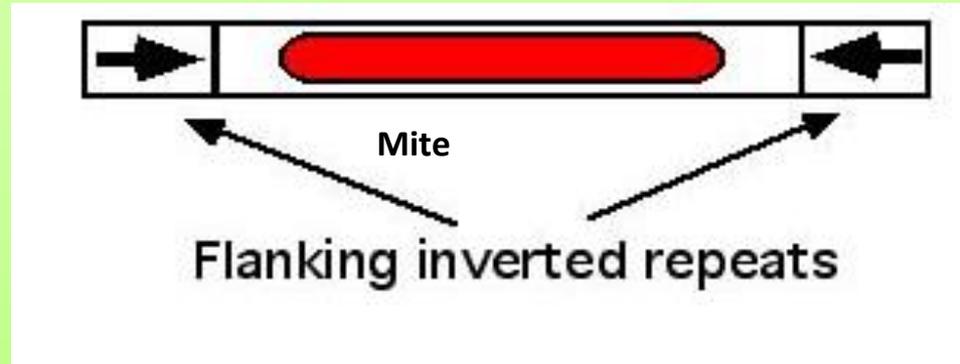


**Mites:** un particolare tipo di TE con caratteristiche comuni alle due classi

Caratteristiche strutturali simili agli elementi difettivi della classe II

Elevato numero di copie e presenza di subfamiglie con sequenze conservate

Il sequenziamento di alcuni genomi ha rivelato la presenza di migliaia di copie di motivi ricorrenti. Sequenze quasi identiche di circa 400 bp affiancate da IR di 15 bp



Troppo piccoli per essere codificanti.

Non è chiaro come possono essere copiati e reinseriti. Probabilmente trasposoni autonomi codificanti enzimi necessari alla trasposizione riconoscono le stesse IR?

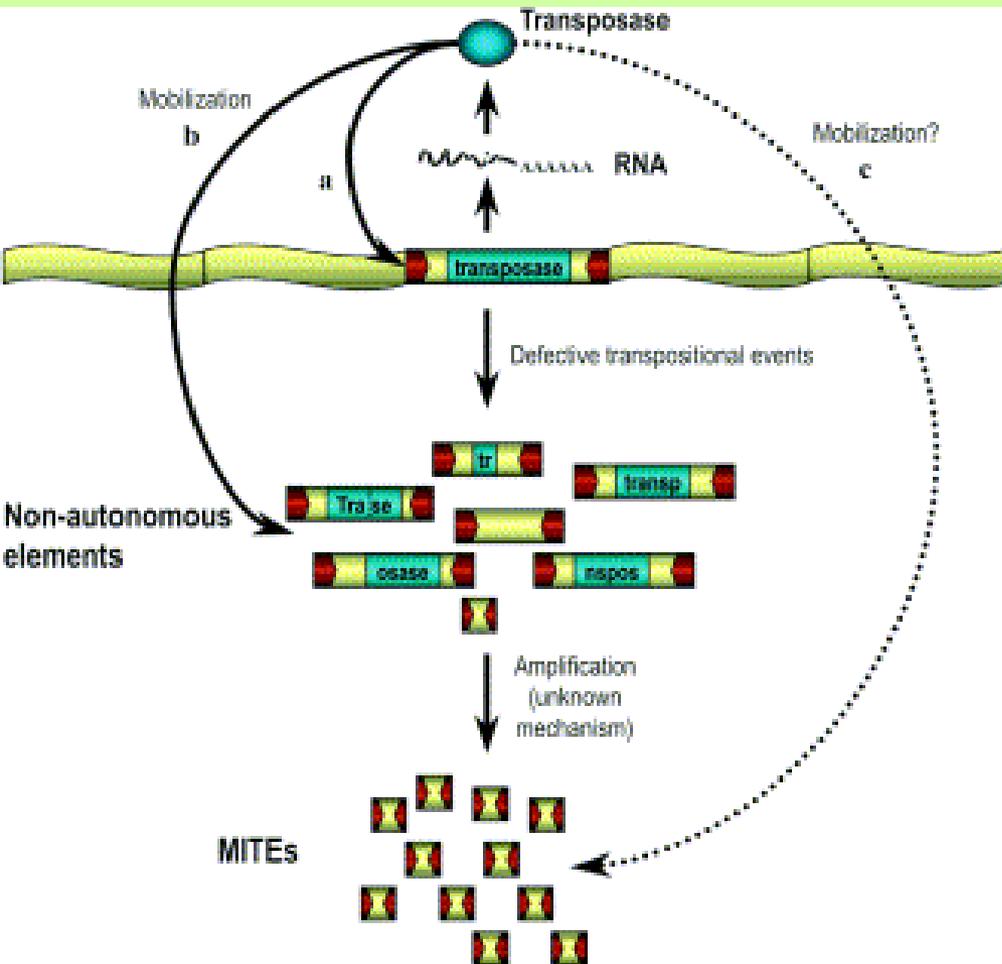
Più di 100.000 Mites nel genoma di riso (6%)

Alcune mutazioni trovate in certe popolazioni di riso sono causate da inserzioni di MITES nei geni

Molto comuni nei genomi finora sequenziati

# MITEs

## Modello per l'origine dei MITEs



## Ipotesi:

- A.** Trasposone codifica per una trasposase che induce la trasposizione
- B.** La trasposizione incompleta può aver generato delle copie difettive, non più autonome. Questi possono ancora essere mobilizzati in trans da altri elementi autonomi
- C.** Corti elementi non-autonomi potrebbero amplificarsi per mezzo di un meccanismo sconosciuto e generare una famiglia di MITEs

# MITEs

Negli anni 90 in genomi di mono e dicotiledoni:

- piccoli elementi non autonomi
- predominanti in regioni non codificanti
- piccole dimensioni (< 600 bp)
- sequenze terminali invertite ripetute

Si distinguono per:

- l'elevato n. di copie
- preferenza nel target site
- altre caratteristiche di uniformità

in seguito identificati in altri genomi vegetali, genoma umano, *Drosophila* ecc.

Nonostante la presenza in molte specie:

- ◆ non chiara l'origine
- ◆ non chiaro il meccanismo di trasposizione
- ◆ non si trovava l'omologia con sequenze note di TE

In assenza di informazioni difficile determinare l'origine e capire in quale modo si fossero moltiplicati nel genoma

In anni recenti:

Ipotesi: anche i MITE come i TE non autonomi si sono originati da elementi autonomi

Casualmente si è scoperto che DNA di trasposoni attivi in mais ha sequenza simile ad una famiglia di MITE

- 14 basi identiche di inverted repeats
- simili sequenze subterminali
- stesso target site

Ciò dimostra che i due elementi usano la stessa trasposasi o simile trasposasi

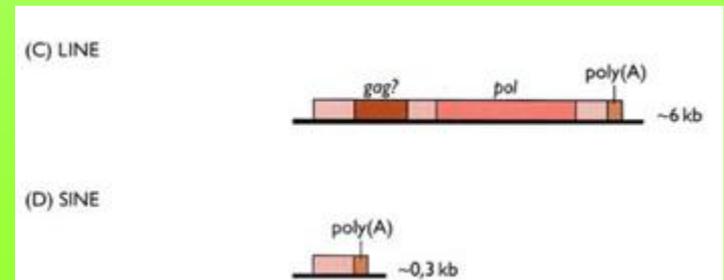
Caratteristica di tutti i **TE** attivi è di essere presenti in un numero di copie relativamente basso (<100 copie)

**mutageni**

Il DNA altamente ripetitivo predomina nei genomi

Qual è la natura di questi elementi se non sono TE mutageni?

Nel genoma umano e vegetale sono molto comuni i **LINES** e **SINES**



# Numero di copie e dimensione dei genomi

Es. Elementi di tipo LTR-retrotrasposons sono presenti in mais e orzo da 20.000 a 200.000 copie

Elemento di tipo LINE Del2 è presente nel lillium 250.000 copie

Il sequenziamento del genoma dei vegetali ha rivelato:

- ▶ grande diversità di TE
- ▶ 2 tipi sono importanti ed hanno contribuito all'evoluzione e organizzazione dei genomi

**MITE**

**LTR-retrotransposons**

Potenzialmente hanno una grande capacità di essere mutageni ... ma non lo sono



La poliploidia funziona come buffer

La > parte degli elementi sono difettivi

# la ragione principale delle differenze in dimensione dei genomi nelle piante

Confronto

Mais  
sorgo



La differenza nelle dimensioni dei genomi è principalmente dovuta all'accumulo di retroelementi in mais dopo la divergenza delle 2 specie

*O. Sativa* e *O. australiensis* la variazione nel numero dei RIRE spiega la differenza in dimensioni del genoma

Il n. di copie aumenta con l'attività dei retrotrasposoni e questo ha giocato un ruolo importante nell'espansione dei genomi dei vegetali

Nei genomi dei vegetali divergenze intraspecifiche e interspecifiche suggeriscono:

trasposizione è avvenuta in un passato recente

E' possibile isolare continuamente trasposoni attivi??  
Come è regolata l'attività dei TE??

Alcuni LTR-retrotransposons sono inattivi durante lo sviluppo  
trascrizione e trasposizione in condizioni di stress biotici e abiotici

Tnt1 il primo retroelemento attivo isolato in pianta

non è attivato durante lo sviluppo

attivo quando le cellule sono sottoposte a digestione enzimatica

Successivamente si sono isolati:

Tto1 Tto2 da tabacco,  
Tos17 da riso

Tnt1  
Tto1



Attivati da ferita  
Da stress idrico  
Infezione da patogeni  
Infezione microbica

La limitata trascrizione dei LTR-retroelements

- scarsamente rappresentati in collezioni di EST
- In mais l'analisi di 400.000 EST solo 56 derivano da LTR-RE

La > parte di sequenze trascritte derivano da LTR-retroelements presenti in basso n. di copie

LTR-retroelements presenti con alto n. di copie (100.000, 200.000)

responsabili per le dimensioni del genoma in mais non sono presenti in EST

Trascrizione non necessariamente correlata all'inserzione.

Ciclo di replicazione è lungo

es: Ty1 presentano un'abbondante trascrizione ma nuova integrazione rara.

# RISTRUTTURAZIONE DEL GENOMA

**BARE (confronto tra popolazioni selvatiche di *Hordeum spontaneum*)**



**correlazione tra dimensione del genoma e condizioni ambientali**

**> n. di elementi in condizioni di stress idrico**

**Esiste una correlazione tra l'amplificazione di TE e l'adattamento evolutivo del suo ospite**

**n. di copie di BARE varia tra specie del genere *Hordeum* e tra popolazioni selvatiche di *Hordeum***

**OARE la trascrizione attivata da stress biotici e abiotici  
l'amplificazione di OARE dipende dalle condizioni ambientali**

**Correlazione tra la plasticità del genoma e l'amplificazione di TE**

# Meccanismi epigenetici

In mais: recente amplificazione del genoma  
attraverso la trasposizione

non si sono isolati LTR-trasposoni attivi

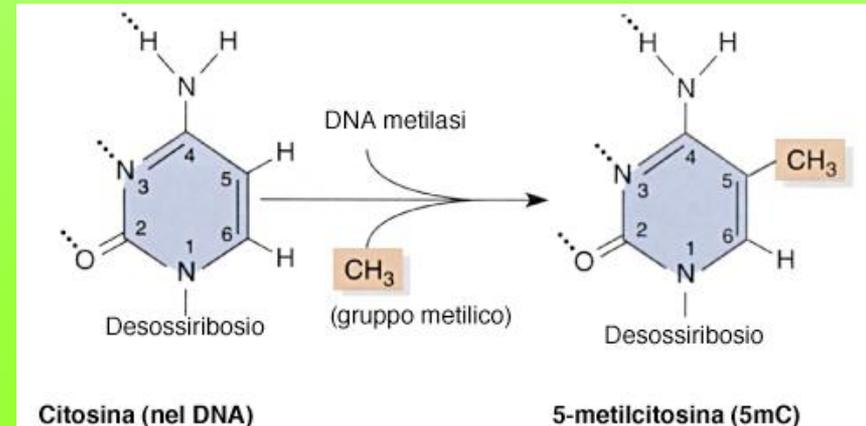
poche EST derivate da retrotrasposoni

Tutto ciò fa supporre che meccanismi, probabilmente epigenetici, siano stati efficienti nel controllare la trascrizione di buona parte del genoma

Es. TE inattivi sono spesso ipermetilati

TE trascritti sono ipometilati

Produzione di 5-metilcitosina nel DNA per  
opera della DNA metilasi



**IPOTESI** meccanismi epigenetici di regolazione genica si siano evoluti come sistemi di difesa



**Invasione di DNA (es. TE)  
Invasione di virus**

**Non necessariamente l'ospite trae beneficio dalla presenza di TE**

**Studi**



**Silenziamento del transgene  
Resistenza ai virus in pianta  
Regolazione di TE**



**Identificazione di 2 meccanismi epigenetici distinti**



**PTGS**

**TGS**

**In PTGS (co-suppression) il silenziamento del TE è causato dalla degradazione degli RNA**

**In TGS inibita l'espressione genica a livello trascrizionale**

**PTGS fenomeno molto frequente in pianta soprattutto di difesa contro i virus**

**TGS meccanismo principale di silenziamento dei TE in pianta**

**Non si può escludere che i due meccanismi si sovrappongano o si combinino nella regolazione di alcuni TE**

**McClintock anni 40: ipotesi molto dibattuta sulla ristrutturazione del genoma in condizioni di stress**