

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

MARIO POLSINELLI

**Gli elementi trasponibili del materiale genetico**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 76 (1984), n.1, p. 63–82.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1984\\_8\\_76\\_1\\_63\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1984_8_76_1_63_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>



MARIO POLSINELLI

GLI ELEMENTI TRASPONIBILI DEL MATERIAIE  
GENETICO (\*)

In questi ultimi anni è stato dimostrato che non tutto il materiale genetico occupa sempre la stessa posizione nel genoma. Esistono infatti segmenti di DNA che possono spostarsi ed inserirsi in punti diversi del genoma e che pertanto sono stati chiamati *ELEMENTI TRASPONIBILI* o *ELEMENTI MOBILI* o *TRASPOSONI*.

I primi elementi trasponibili furono descritti nel mais negli anni '40 da Barbara McCLINTOCK, la quale aveva osservato che alcuni geni erano sotto controllo di elementi genetici, che avevano la proprietà di muoversi da un punto all'altro del genoma. Questi elementi (da lei chiamati *CONTROLLING ELEMENTS*), quando si inserivano in prossimità di un gene, ne inibivano la funzione, quando invece lasciavano il sito di inserzione, il gene riacquistava la sua funzione con ricomparsa del fenotipo originario, eventi questi che accadevano con frequenze molto più alte di quelle della mutazione spontanea. Per le sue ricerche sugli elementi mobili, la McCLINTOCK ha ricevuto il premio Nobel nel 1983.

I risultati degli esperimenti della McCLINTOCK apparvero subito in contrasto con la convinzione allora diffusa della stabilità della organizzazione del genoma.

L'analisi genetica eseguita sul genoma dei diversi organismi aveva portato infatti alla conclusione che la struttura del materiale genetico è caratterizzata da una forte stabilità. Le mappe genetiche del resto dimostravano che ogni gene occupava la sua specifica posizione sul cromosoma e quindi ogni carattere aveva le sue basi fisiche ben fisse sul cromosoma.

I meccanismi molecolari del fenomeno scoperto dalla McCLINTOCK sono diventati chiari solo parecchi anni più tardi, quando fenomeni simili sono stati trovati nei batteri ed in altri organismi.

Gli elementi trasponibili sono sequenze di DNA costituite, come vedremo più avanti, da un numero di paia di basi che può variare da circa 500 a circa 10.000, possono muoversi ed inserirsi in punti diversi del genoma, dando origine così a quel processo che prende il nome di *TRASPOSIZIONE*, la quale costituisce un potente mezzo per lo studio dell'espressione e dell'evoluzione del genoma. La trasposizione infatti può determinare attivazione o inattivazione di geni della cellula ospite e costituisce un meccanismo di produzione di variabilità genetica.

(\*) Conferenza tenuta nella seduta del 14 gennaio 1984.

## GLI ELEMENTI TRASPONIBILI DEI PROCARIOTI

Il meccanismo che è alla base della trasposizione non è la ricombinazione *omologa* o *generale*, ma la ricombinazione detta *illegittima*.

La ricombinazione illegittima non richiede le funzioni *rec* della ricombinazione *omologa*; non richiede omologia, infatti la sequenza del sito di inserzione non è specifica; richiede duplicazione di DNA e pertanto viene anche detta *ricombinazione illegittima duplicativa*; avviene per azione di enzimi specifici (*trasposasi*), codificati dall'elemento trasponibile stesso e di cui riconoscono sequenze specifiche.

La trasposizione richiede la duplicazione della sequenza trasponibile; la copia originale conserva la sua posizione e la copia di nuova sintesi si sposta in un nuovo sito. La trasposizione comporta quindi un aumento di copie del trasposone. Ciò si dimostra mettendo due plasmidi nello stesso batterio, uno fornito dell'elemento e l'altro senza; riestraendo poi i due plasmidi, si trova che entrambi portano l'elemento trasponibile.

La frequenza di trasposizione varia tra lo  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  per generazione; invece la frequenza di reversione, cioè la perdita dell'elemento, è più bassa e può variare fra  $10^{-6}$  e  $10^{-10}$ ; anche la escissione non richiede le funzioni *rec* e sembra che non dipenda neanche dalle funzioni necessarie per la trasposizione (*trasposasi*).

I primi elementi trasponibili nei batteri sono stati scoperti verso la fine degli anni 60 in mutanti dell'operone galattosio di *E. coli* e sono stati i primi ad essere caratterizzati dal punto di vista molecolare.

Questi mutanti avevano proprietà piuttosto insolite: le mutazioni infatti inattivavano il gene per la galattochinasi (*galK*) pur mappando a monte di esso, la mutazione aveva cioè un forte effetto polare che però non era assimilabile a quello dei soppressori tipo *amber*. La frequenza di reversione spontanea a *gal*<sup>+</sup>, pari a  $10^{-6}$ - $10^{-8}$ , faceva escludere che si trattasse di delezioni; inoltre, il fatto che trattamenti mutageni non aumentavano la frequenza di reversione a *gal*<sup>+</sup> faceva escludere che si fosse in presenza di mutazioni puntiformi; si pensò allora a mutazioni tipo inserzione che potevano portare segnali di arresto per la trascrizione.

Nel 1968 JORDAN *et al.* dimostrarono che la mutazione era dovuta alla inserzione di una sequenza di DNA nell'operone *gal*.

La possibilità di trasferire dette mutazioni sul batteriofago lambda, che come sappiamo si integra vicino all'operone *gal*, ne facilitò la caratterizzazione.

Infatti, il DNA del fago che portava la mutazione poteva essere separato in gradiente di CsCl dal DNA del fago di tipo normale perché portava in più una lunga sequenza; inoltre, denaturando e rinaturando DNA di lambda che portava l'inserzione e DNA di lambda di tipo selvatico, ed osservando le molecole al microscopio elettronico, si trovò che sul DNA con la mutazione *gal* era presente una sequenza che era assente sul filamento del DNA di tipo selvatico

(*gal*<sup>+</sup>); si osservò inoltre che la sequenza poteva inserirsi in entrambe le direzioni (fig. 1).

Queste sequenze furono chiamate IS (insertion sequence).

Gli elementi trasponibili dei batteri possono essere distinti in tre classi: *elementi IS* o *trasposoni semplici*, *trasposoni composti* e *trasposoni complessi*.

Gli *elementi IS* sono gli elementi trasponibili più semplici. In *E. coli* le IS meglio definite vengono distinte in cinque gruppi, da IS1 a IS5, le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella I.

Sono noti altri elementi con caratteristiche simili a quelle delle IS (Tabella II); in questi casi però, come vedremo più avanti, le sequenze IS non si trovano mai da sole, ma facenti parte invece di un trasposone composto.

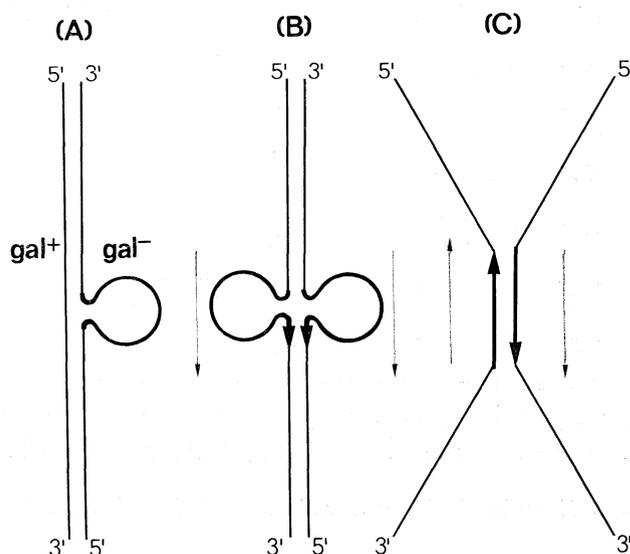


Fig. 1. - Molecole di DNA « ibride » viste al microscopio elettronico. (A) La doppia elica è formata da un filamento normale *gal*<sup>+</sup> e da un filamento che deriva da un mutante *gal*<sup>-</sup>, che porta un'inserzione IS indicata dall'ansa. (B) I due filamenti vengono da due mutanti *gal*<sup>-</sup>, dove le due IS sono inserite con orientamento opposto per cui non possono appaiarsi. (C) È lo stesso DNA di (B) in cui si sono appaiate le due sequenze ma non il resto del DNA.

Le sequenze di inserzione sono costituenti normali del genoma batterico; esse si trovano in siti diversi del cromosoma di *E. coli*, e di quello di altri batteri Gram-negativi, nei plasmidi portanti resistenza agli antibiotici (Fattori R), nel fago P1.

Le IS portano a ciascuna estremità una breve sequenza di basi, ripetuta e invertita (IR); quasi mai le due sequenze sono perfettamente uguali. Inoltre nel sito di inserzione, la IS è affiancata da due brevi sequenze uguali e « dirette » (non invertite), costituite generalmente da 5 o 9 paia di basi; queste due sequenze,

si formano per duplicazione delle basi del sito bersaglio durante la trasposizione (figg. 2 e 3).

La lunghezza della sequenza ripetuta diretta resta costante per un dato trasposone; sarà ad esempio sempre di cinque paia di basi; la sequenza delle

TABELLA I.

*Caratteristiche delle sequenze di inserzione (IS) di E. coli K 12*

	Dimensioni (Paia di basi)	Seq. ripet. invertite (paia di basi)	Seq. ripet. dirette del sito di inserzione (paia di basi)	N. possibili proteine codificate	N. copie per genoma di <i>E. coli</i>
IS 1	768	23	9 (8) (a)	2	6-9 (c)
IS 2	1327	41	5	2	± 5
IS 3	1400	38	3	2?	± 5
IS 4	1426	18	11 o 12 (b)	2	1
IS 5	1195	16	4	4	± 10

(a) Una variante di IS 1 è affiancata da una duplicazione di 8 paia di basi.

(b) IS 4 può essere affiancata da 11 o da 12 paia di basi, a seconda del sito di inserzione.

(c) Il numero di copie di IS 1 può variare con i diversi ceppi di *E. coli*.

TABELLA II.

*Elementi IS-simili*

Elementi	Dimensioni (paia di basi)	Seq. rip. invertite (paia di basi)	N. paia di basi duplicate al sito inserzione	N. possibili proteine
IS 10	1329	22	9	3
IS 50	1531	9	9	3
IS 903	1057	18	9	2

basi, invece, è diversa per ogni evento di trasposizione, cioè i diversi siti di inserzione hanno differenti sequenze. Questo fatto sta ad indicare che la inser-

zione lungo il genoma avviene a caso (o quasi), anche se la IS1 preferisce le zone ricche in AT.

Ricordiamo che in *E. coli*, i ceppi Hfr si formano quando il *fattore F* si integra nel cromosoma; l'integrazione avviene per ricombinazione fra una IS

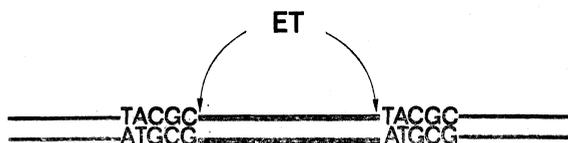


Fig. 2. - L'elemento trasponibile (ET) è affiancato da brevi sequenze ripetute, quasi sempre 5 o 9 paia di basi, orientate nella stessa direzione.

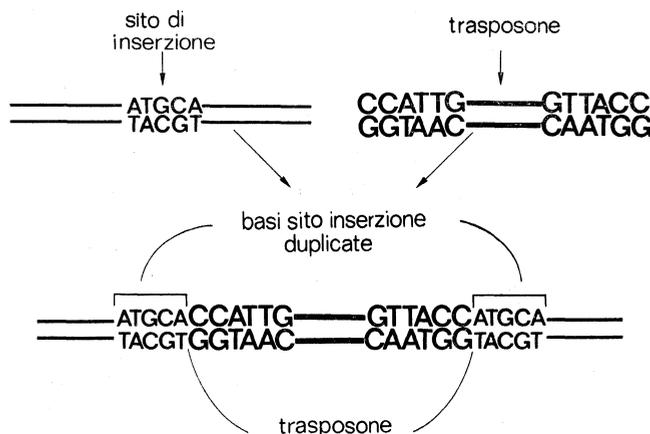


Fig. 3. - Schema di inserzione di un trasposone semplice. La struttura del trasposone è caratterizzata dalla presenza di due sequenze ripetute terminali invertite (IR) che sono indispensabili per la trasposizione. Il trasposone è affiancato da due brevi sequenze ripetute « dirette » (non invertite) del DNA dell'ospite.

portata da F e la rispettiva copia IS presente sul cromosoma (F porta una copia IS2 e due copie IS3). In questo caso però si tratta di ricombinazione omologa, *rec* dipendente.

Il numero di IS per genoma è limitato (Tabella I); ciò fa pensare che vi debba essere un controllo che regola la trasposizione.

*Trasposoni composti.* Questi elementi trasponibili vengono designati con il simbolo *Tn*, seguito da un numero, ad es. *Tn* 5, *Tn* 10. Essi sono costituiti da una regione centrale affiancata da due elementi IS, che possono avere sequenze ripetute dirette oppure invertite. Le IS codificano per le funzioni di trasposizione. Questi trasposoni conferiscono nuove proprietà ereditarie al batterio ospite; nella regione centrale, infatti, essi portano geni diversi; per lo più ri-

guardano la resistenza agli antibiotici, ma possono essere anche geni che codificano funzioni diverse come il metabolismo degli zuccheri (Tn 951) o del toluene, la resistenza a metalli pesanti (mercurio, cadmio), la produzione di enterotossine esocellulari (Tn 1681) in ceppi patogeni di *E. coli*.

Le IS facenti parte di questi trasposoni possono trasporsi anche come elementi autonomi.

Come illustrato nella fig. 4, i trasposoni composti, oltre a se stessi, possono in certe situazioni trasporre qualunque altro gene.

Nella Tabella III sono state riportate le caratteristiche di alcuni trasposoni di questo gruppo.

TABELLA III.

*Trasposoni composti*

Trasposone	Dimensioni (paia di basi)	Marcatore genetico	Elementi IS	Sequenze terminali
Tn 10	9300	TET	IS 10 IS 10	Invertite
Tn 5	5700	KAN	IS 50 IS 50	Invertite
Tn 903	3100	KAN	IS 903	Invertite
Tn 9	2500	CAM	IS 1	Dirette
Tn 1681	2100	Enterotossine	IS 1	Invertite

TET, KAN, CAM = resistenza alla tetraciclina, kanamicina, cloramfenicolo, rispettivamente.

*Trasposoni complessi.* Questi trasposoni, a differenza di quelli composti non sono affiancati da IS, ma da corte sequenze ripetute invertite (IR) formate da circa 40 paia di basi; nella regione compresa fra le due sequenze terminali, si trovano geni per la trasposizione e geni per la resistenza agli antibiotici. I trasposoni complessi meglio noti fanno parte della famiglia detta TnA.

Nella Tabella IV sono indicate alcune caratteristiche di trasposoni di questa famiglia.

I trasposoni complessi sono molto diffusi. Essi presentano diverse proprietà comuni: le sequenze invertite terminali hanno dimensioni simili ed un notevole grado di omologia; quando c'è la trasposizione, questa riguarda sempre l'intero trasposone; nei trasposoni composti invece, come abbiamo già detto, le sequenze IS possono trasporsi anche come unità indipendenti.

Questi trasposoni creano grossi problemi per il trattamento delle infezioni batteriche nell'uomo e negli animali, poiché rappresentano la via più frequente attraverso la quale i batteri patogeni acquisiscono la resistenza agli antibiotici. Essi, infatti, si trovano su una vasta gamma di plasmidi di batteri diversi. Nella Tabella V sono elencati alcuni plasmidi che, pur essendo molto diversi, portano

TABELLA IV.

*Trasposoni complessi, famiglia TrA.*

Trasposone	Dimensioni (paia di basi)	Marcatore genetico	Sequenze rip. inv. (paia di basi)	N. paia di basi duplicate al sito inserzione
Tn 3	4957	AMP	38	5
Tn 1	5000	AMP	?	5
	5800	?	37	5
Tn 501	8200	Hg	38	5
Tn 551	5200	ERY	35	—

AMP, Hg, ERY = resistenza all'ampicillina, al mercurio e all'eritromicina, rispettivamente.

tutti trasposoni TnA; situazioni simili si trovano anche per altri tipi di trasposoni che portano geni per la resistenza agli antibiotici.

Tra i trasposoni complessi, il Tn 3 è quello più studiato (fig. 5) e ben caratterizzate sono le proteine da esso codificate. Esso porta tre geni, *bla*, *TnpA* e *TnpR*.

Il gene *bla* codifica per l'enzima beta-lattamasi, che conferisce resistenza all'ampicillina.

Il gene *tnpA* codifica per una proteina di peso molecolare di circa 110 mila; esso occupa circa il 60% di tutto il trasposone e comprende anche 5 paia di basi della sequenza terminale invertita di sinistra; la proteina codificata da *tnpA* (trasposasi) è essenziale per il processo di trasposizione.

Il gene *tnpR* codifica per una proteina, di peso molecolare 20 mila, che svolge più di una funzione.

Mutazioni nel gene *tnpR* portano ad un aumento della frequenza di trasposizione. Questa osservazione ha fatto pensare che la proteina codificata da *tnpR*

potesse avere una funzione di regolazione della trasposizione. Esperimenti eseguiti a questo fine hanno invero dimostrato che la proteina agisce come repressore del gene *tnpA* e che la regolazione avviene secondo un meccanismo riconducibile a quello noto per l'operone lattosio. È stato inoltre visto che la proteina si comporta anche come repressore *autogeno*, cioè controlla la propria sintesi

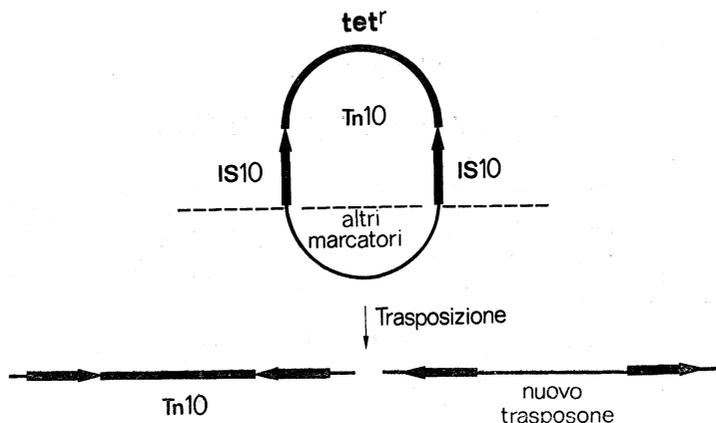


Fig. 4. - Quando il trasposone Tn 10 si trova inserito in una piccola molecola di DNA circolare non troppo grande, i suoi elementi IS 10 possono determinare la trasposizione sia del trasposone stesso che dell'altro DNA. In questo modo, come illustrato nella figura, si forma un nuovo trasposone; quindi gli elementi IS 10 possono « trasportare » un qualunque breve segmento di DNA che si trovi fra di essi.

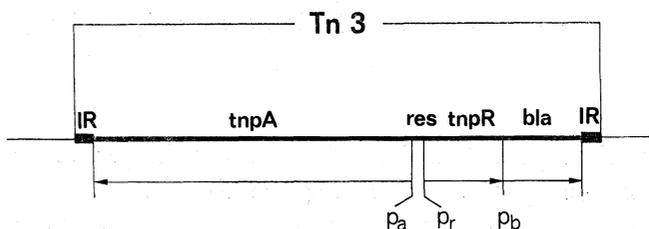


Fig. 5. - Schema della struttura del trasposone Tn 3. IR, sequenze terminali ripetute invertite; *tnpA*, gene che codifica la trasposasi; *tnpR*, gene che codifica repressore-resolvasi; *bla*, gene che codifica la  $\beta$ -lattamasi; *ret*, sito per la ricombinazione sito-specifica; *pa*, *pn*, *pb* sono, rispettivamente, i promotori di *tnpA*, *tnpR* e *bla*; le frecce indicano la direzione della trascrizione.

I trasposoni possono determinare la fusione di due repliconi con formazione di una struttura detta « cointegrato » sul quale si trovano due copie del trasposone, orientate nella stessa direzione (fig. 6). Si pensa che il « cointegrato » rappresenti una fase del processo di trasposizione.

Il cointegrato rompendosi dà origine a due repliconi, uno identico al donatore e l'altro considerato un prodotto della trasposizione (fig. 6). Nel caso di Tn 3 si pensa che responsabile della rottura del « cointegrato » sia il prodotto del

TABELLA V.

*Alcuni dei plasmidi che portano trasposoni TnA.*

Plasmide	Gruppo di compatibilità	Origine
R 1	F	<i>Salmonella paratyphi</i> (Sud Africa)
RP 1	P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Regno Un.)
R 7 K	W	<i>Proteus rettgeri</i> (Grecia)
R 6 K	X	<i>Escherichia coli</i> (Grecia)
R 648	I <sup>a</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i> (Regno Unito)
R 746	C	<i>Providencia sp.</i> (Canada)
R 390	N	<i>Proteus rettgeri</i> (Sud Africa)

Dati da Heffron *et al.* (1975).

gene *tnpR*; vi sono indicazioni (ARTHUR e SHERRAT, 1979) che il prodotto di *tnpR* si comporti come un enzima capace di catalizzare la ricombinazione fra le due copie del trasposone, con conseguente rigenerazione dei due repliconi. L'enzima, chiamato *resolvasi*, richiede che su entrambi i trasposoni sia presente una specifica sequenza di nucleotidi; questa sequenza, detta IRS (sito risoluzione interno) o *res*, è formata da 128 paia di nucleotidi e si trova tra i geni *tnpA* e *tnpR*, sovrapposta ai due promotori adiacenti di *tnpA* e *tnpR*. Si può quindi ipotizzare che l'enzima, legandosi a *res*, possa bloccare entrambi i promotori, funzionare cioè come un doppio repressore.

#### VARIAZIONE DI FASE ANTIGENICA IN SALMONELLA

I batteri mobili portano delle appendici dette flagelli, i quali sono costituiti da una proteina nota come *flagellina*.

In certi ceppi di *Salmonella*, la proteina flagellare cambia, per cui cambia anche la sua specificità antigenica; si ha così il fenomeno noto come variazione di fase antigenica, fase 1 e fase 2. Questi ceppi sono detti *bifasici*. Il passaggio da una fase all'altra è molto frequente ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ), per cui è difficile spiegare la variazione come solo effetto della mutazione.

Il fenomeno della variazione di fase in *Salmonella*, noto da molti anni, è stato chiarito solo recentemente. Esistono due geni designati *h 1* e *h 2* che map-

pano in regioni diverse del cromosoma e che codificano due proteine (flagelline) diverse, H 1 e H 2. Accanto al gene *h 2* si trova il gene *rh 1* che codifica una proteina che reprime l'attività del gene *h 1*; l'espressione di questi due geni è coordinata, cioè, insieme ad *h 2* si esprime anche *rh 1*; in questa situazione quindi viene repressa l'attività di *h 1* e non si ha sintesi della proteina H 1.

Vediamo in che modo avviene la variazione di fase, come ad esempio si inattiva il gene *h 2* e si attiva il gene *h 1* con produzione della flagellina H 1. Come si vede nella fig. 7, adiacente al gene *h 2* vi è un segmento di DNA lungo

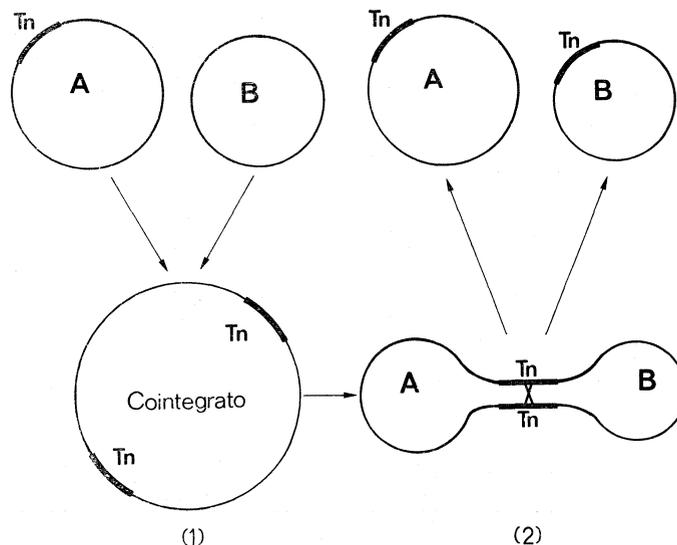


Fig. 6. - (1) Per trasposizione si ha fusione tra il plasmide A, che porta il trasposone (Tn) ed il plasmide ricevente B con formazione di un « cointegrato ». (2) Tra le due copie del trasposone si può avere ricombinazione con rigenerazione del plasmide A originale e del plasmide B che però ha acquisito una copia del trasposone.

995 paia di basi che termina con due sequenze ripetute invertite (IR), sul quale si trova il gene *hin*, che codifica un enzima per la ricombinazione sito specifica; l'inversione di questo segmento, come illustrato nella fig. 7, porta alla inattivazione del gene *h 2* ed alla espressione di *h 1*.

Da quanto abbiamo detto appare chiaro che la variazione antigenica di *Salmonella* costituisce un interessante esempio di regolazione di espressione genica dovuta ad una inversione, cioè ad un riarrangiamento del DNA.

#### TRASPOSIZIONE DEL FAGO MU

Mu è un fago temperato di *E. coli*. Ha un genoma lineare di 37,3 mila paia di basi. A differenza di altri fagi temperati, Mu può inserire il suo genoma in punti diversi del cromosoma di *E. coli*; ciò è possibile in quanto la sua integrazione non richiede omologia di sequenza tra DNA virale e DNA batterico.

Oltre alla propria trasposizione, Mu provoca delezioni, inversioni, fusione di repliconi, si comporta quindi come un trasposone. Le mutazioni determinate, praticamente, non danno reversioni.

Se si esamina la struttura del genoma contenuto nella particella fagica, si trova che essa porta alle due estremità brevi sequenze di DNA dell'ospite, circa 100 paia di basi da una parte e circa 1500 dall'altra (fig. 8 b). Le sequenze sono

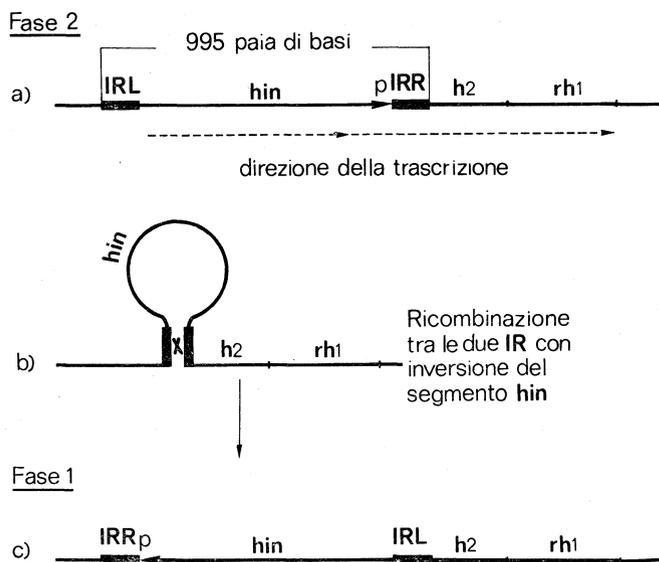


Fig. 7. - La variazione di fase è dovuta all'alternanza di attivazione dei geni *h1* e *h2*, alternanza che è causata dalla inversione di un segmento di DNA lungo 995 paia di basi che termina con due sequenze ripetute invertite, lunghe 14 paia di basi. Lo schema illustra le basi molecolari della variazione di fase antigenica in *Salmonella*: a) Nella fase 2 viene prodotto l'antigene H 2 ed il repressore, infatti a partire dal promotore *p* di *h2* si ha trascrizione di *h2* e di *rh1*. Il repressore va ad inattivare il gene *h1* situato in un'altra regione del genoma. b) Il prodotto del gene *hin* causa la ricombinazione tra le due IR con conseguente inversione del segmento di 995 paia di basi. c) Nella fase 1, i geni *h2* ed *rh1* non possono esprimersi perché l'inversione del segmento *hin* ha privato *h2* del suo promotore. In questa situazione si esprime il gene *h1* e si produce l'antigene H 1. IRL = sequenza ripetuta invertita di sinistra; IRR = sequenza ripetuta invertita di destra; p = promotore.

diverse nelle diverse particelle; esse possono essere osservate al microscopio elettronico denaturando e rinaturando una miscela di DNA fagico; gli eteroduplici che si formano presentano alle estremità filamenti singoli di DNA non appaiati di origine batterica. Con questo stesso procedimento è possibile mettere in evidenza che metà delle molecole rinaturate portano una regione non appaiata, detta « bolla G » (fig. 8 c). La formazione della bolla è dovuta ad una inversione di un segmento di DNA chiamato G; essa si forma nei casi in cui si rinaturano

due filamenti che derivano da due genomi che portavano il segmento G in opposto orientamento, cioè invertito.

Quando si induce il profago Mu, a differenza di quanto avviene nel fago lambda, il genoma non fuoriesce dal sito di inserzione, ma viene duplicato con accumulo nel batterio di molecole di DNA di dimensioni diverse. Durante la replicazione, il DNA di Mu si integra in siti diversi del cromosoma batterico e

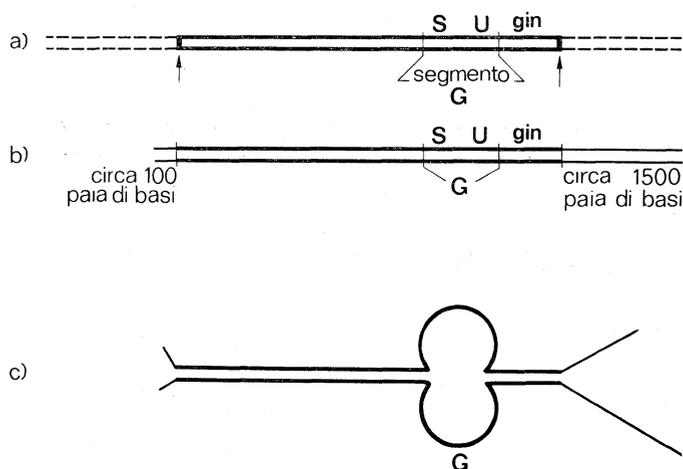


Fig. 8. - a) DNA del profago di Mu. Nel segmento G, invertibile, sono indicati i geni S ed U; nella zona adiacente si trova il gene *gin*, il cui prodotto è necessario per l'inversione di G. b) DNA contenuto nella particella fagica. Il genoma di Mu porta alle due estremità del DNA batterico, circa 100 paia di basi da una parte e circa 1.500 dall'altra. c) L'osservazione al microscopio elettronico di DNA di Mu, denaturato e rinaturato, rivela la presenza di molecole che portano una zona non appaiata; ciò è dovuto al fatto che si sono rinaturati due filamenti che portano il segmento G con orientamento opposto.

Mu è l'unico elemento trasponibile che non ha sequenze terminali ripetute.

di plasmidi presenti nella cellula. Il DNA che viene « montato » nel capsido porta sequenze di DNA batterico, come abbiamo già detto.

Quando si infetta il batterio con il fago, solo circa il 10% dei genomi si integrano nel cromosoma dell'ospite. Il DNA che si integra nel cromosoma batterico non è quello infettante, ma una sua copia.

Questi fatti indicano che in questo fago esiste una stretta relazione tra replicazione del DNA ed integrazione. È stato dimostrato che mutanti non capaci di replicarsi perdono anche la capacità di integrarsi, ciò che fa pensare che la integrazione dipenda dalle funzioni di replicazione e non da enzimi della ricombinazione.

Il genoma di Mu inserito nel DNA dell'ospite è affiancato da 5 paia di basi ripetute dirette. Non è noto come avvenga la trasposizione (fig. 8 a).

Un'altra caratteristica particolare del genoma di Mu è la presenza del segmento invertibile G, lungo 3 mila paia di basi affiancato da sequenze ripetute

invertite (IR) di 50 paia di basi. Accanto a questo segmento si trova il gene *gin* responsabile dell'inversione. L'inversione è un processo di ricombinazione sito-specifica tra le IR e *rec* indipendente, simile a quello visto in *Salmonella*.

Nei fagi ottenuti da infezione litica di *E. coli* K 12, il segmento G ha orientamento detto G (+), mentre nei fagi ottenuti per induzione l'orientamento può essere G (+) o quello opposto, G (—). Il segmento G porta i geni che codificano proteine necessarie per l'assorbimento del fago al batterio; il diverso orientamento di G comporta l'espressione di geni diversi, con la conseguenza

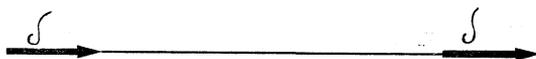


Fig. 9. — Schema della struttura di elementi Ty. Le due sequenze  $\delta$  sono ripetute ma non invertite.

che i fagi G (+) e G (—) hanno specificità diversa per differenti ceppi batterici.

Nell'orientamento (G +) vengono espressi i geni *S* e *U* ed il fago si assorbe all'*E. coli* K 12 ma non di *E. coli* C; nell'orientamento G (—) vengono espressi i geni *S'* e *U'* ed i fagi si assorbono all'*E. coli* C e non a K.

L'inversione, conferendo al fago la capacità di adsorbirsi selettivamente ad ospiti diversi, esercita una funzione regolativa sulla sua riproduzione.

#### GLI ELEMENTI TRASPONIBILI DEGLI EUCARIOTI

Gli elementi trasponibili degli eucarioti hanno caratteristiche non molto dissimili da quelli dei procarioti; essi, infatti, si trovano in siti diversi del genoma, hanno sequenze terminali ripetute, sono affiancati da 5–9 paia di basi del sito di inserzione, provocano riarrangiamenti cromosomici. I meccanismi molecolari della trasposizione negli eucarioti, però, non sono stati definiti nei dettagli come nei procarioti.

#### ELEMENTI TRASPONIBILI DEL LIEVITO SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Gli elementi trasponibili dei lieviti (Ty) sono abbastanza simili a quelli batterici. Gli elementi Ty vengono raggruppati in due principali classi, Ty 1 e Ty 917. Costituiti da circa 6.300 paia di basi, portano alle due estremità sequenze ripetute « dirette » (non invertite) di 330 paia di basi, note come  $\delta$  (fig. 9).

Il segmento  $\delta$  è presente nel genoma anche come entità separata; se ne trovano circa 100 copie per genoma. Non è mai stata osservata trasposizione di  $\delta$ .

Il numero di copie di Ty per genoma varia, con i diversi ceppi, generalmente da 30 a 35. I siti di inserzione variano con i differenti ceppi. La trasposizione richiede la replicazione dell'elemento; al sito di inserzione, inoltre, si ha la duplicazione di 5 paia di basi; ciò fa pensare che il meccanismo di trasposizione sia simile a quello dei procarioti.

Anche nel lievito è stata osservata trasposizione di geni strutturali; un esempio è dato dal gene *his 4* che viene trasposto lasciando una sua copia nel sito originario.

Per ricombinazione tra i segmenti  $\delta$ , gli elementi Ty possono lasciare il sito di inserzione.

Gli elementi Ty vengono trascritti, ma non è noto se l'RNA venga poi « tradotto » in proteine.

Non si conoscono ancora le basi molecolari della trasposizione di questi elementi.

#### GLI ELEMENTI TRASPONIBILI DEL MAIS

I primi elementi trasponibili, come abbiamo già detto, sono stati scoperti negli anni '40 nel mais, dove i loro effetti sono stati molto studiati.

Le caratteristiche generali di questi elementi sono simili a quelle di altri elementi mobili sia per quanto riguarda gli aspetti strutturali e che gli effetti che essi hanno sul genoma.

A differenza però di quanto avviene in altri sistemi, spesso i trasposoni del mais lasciano il sito originario quando si ha trasposizione.

Gli elementi autonomi hanno la capacità di trasportare da un sito ad un altro del genoma, cioè possono lasciare, in via autonoma, il sito cromosomico in cui

TABELLA VI.

*Elementi trasponibili del mais.*

Famiglia	Elementi autonomi	Elementi non autonomi
<i>Ac - Ds</i>	<i>Ac</i> : Attivatore	<i>Ds</i> : dissociazione
<i>Spm</i>	<i>Spm</i> : soppressore-	non specificato
<i>Dt</i>	<i>Dt</i> : « dotted »	non specificato

sono localizzati ed integrarsi in altro sito dello stesso cromosoma o di cromosomi diversi. Gli elementi non autonomi sono in grado di trasportare solo se attivati da un fattore autonomo. La capacità di attivazione è specifica: viene esercitata solo su elementi della stessa famiglia. È importante notare che la trasposi-

zione viene indotta sia in *cis* che in *trans*, per cui è logico supporre che l'elemento autonomo controlli la produzione di un fattore diffusibile che agisce sul DNA dell'elemento non autonomo, come per esempio una trasposasi.

L'inserzione o l'escissione di un elemento di controllo in un dato sito del genoma può determinare eventi genetici diversi: la rottura dal cromosoma nel sito interessato (l'elemento Ds è chiamato per questo motivo dissociazione), l'alterazione dello stato allelico (mutazione in avanti e reversione) e variazioni dell'espressione genica.

#### ELEMENTI TRASPONIBILI DI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Nel genoma della *Drosophila* e di altri eucarioti sono presenti sequenze ripetute che possono essere disposte in tandem in grosse zone ridondanti, spesso eterocromatiche oppure possono essere disperse nei cromosomi in siti diversi.

Alcune classi di sequenze ripetute, che rappresentano oltre il 10% del genoma di *Drosophila*, hanno caratteristiche simili a quelle degli elementi traspo-

TABELLA VII.

*Elementi trasponibili in Drosophila Melanogaster.*

	Dimen- sioni (paia di basi)	Sequenze ripetute dirette (paia di basi)	Sequenze ripetute invertite (paia di basi)	Sequenze ripetute dirette sito ins. (paia di basi)	N. copie per Genoma
<i>Copia</i> (*)	5000	276	17	5	20-60
<i>FB</i>	500-5000	NO	250-1250	9	20-60
<i>P</i>	500-2900	NO	31	?	30
					50 oppure assente

(\*) Elementi simili a copia sono: 412, 297, mgd 1, mgd 3, B 104, gypsy.

nibili. Nella Tabella VII sono riportate le caratteristiche di tre note famiglie di trasposoni di *Drosophila*, *copia*, *FB* e *P*; la loro struttura è schematizzata nella fig. 10.

La posizione degli elementi nel genoma varia da un tipo cellulare all'altro, come hanno dimostrato esperimenti di ibridazione *in situ* con i cromosomi politenici.

La trasposizione determina un aumento del numero di copie di trasposoni per genoma; ciò fa pensare che la trasposizione, come nei procarioti, sia legata alla replicazione.

#### TRASPOSIZIONE, RETROVIRUS ED ONCOGENI

I retrovirus sono virus oncogeni ad RNA. Per azione dell'enzima trascrittasi inversa, dall'RNA del virus si forma il DNA che si inserisce nel genoma dell'ospite. La struttura del DNA di alcuni retrovirus ricorda quella degli elementi trasponibili.

I retrovirus inducono trasformazione tumorale quando infettano cellule di roditori o di uccelli. Responsabile della trasformazione è un singolo gene, detto *oncogene*. Il prodotto dell'oncogene è una proteina che ha una funzione regola-

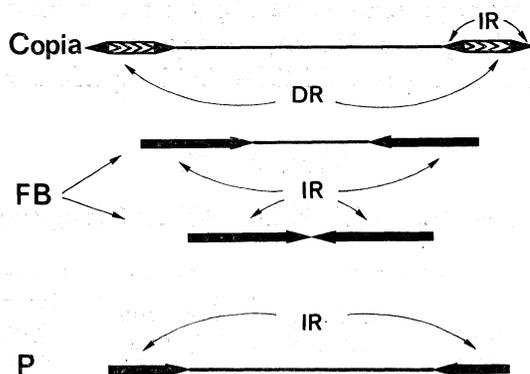


Fig. 10. - Struttura di elementi trasponibili di *Drosophila* appartenenti a tre diverse famiglie (*copia*, FB e P). DR = sequenze ripetute non invertite; IR = sequenze ripetute invertite.

tiva cruciale nel sistema di controllo dei processi cellulari; infatti un'abbondante produzione di questa proteina induce la trasformazione tumorale.

Ad ogni oncogene virale corrisponde un gene cellulare, detto *proto-oncogene*; una volta trasferito sul virus, il proto-oncogene diventa cancerogeno.

I virus, comportandosi come un trasposone, potrebbero catturare l'oncogene in seguito a ricombinazione tra il DNA del proto-oncogene ed il DNA prodotto dalla trascrittasi inversa.

L'analisi del DNA virale ha messo in evidenza una struttura che presenta sequenze terminali tipiche degli elementi trasponibili. Ad esempio, il DNA del retrovirus del pollo (SNV) ha alle due estremità una sequenza ripetuta non invertita di 569 paia di basi. Il DNA, inserendosi nel genoma, provoca la duplicazione di cinque paia di basi nel sito bersaglio.

A differenza degli altri elementi trasponibili, che possono esistere solo come strutture integrate nel genoma, i retrovirus si trovano sia come elementi integrati sotto forma di DNA che come particelle libere ad RNA.

Quando la trasposizione avviene in determinati siti prossimi ad un proto-oncogene, questo può essere attivato e avviene così il processo che porta alla trasformazione. I retrovirus quindi possono provocare il tumore attraverso due modi:

- a) cattura un oncogene e lo trascrive a livelli troppo alti;
- b) si inserisce nel genoma ed attiva un proto-oncogene dell'ospite.

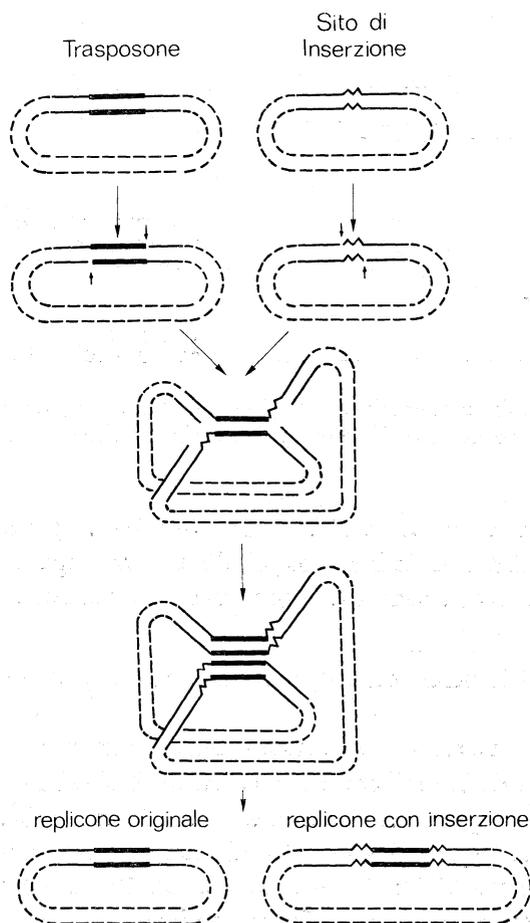


Fig. 11. - Schema di un modello di trasposizione. *a)* Il replicone a sinistra porta il trasposone; sul replicone di destra si trova il sito per l'inserzione del trasposone. *b)* Un enzima sito specifico fa due rotture a singola elica alle due estremità del trasposone (indicate dalle frecce). Sul replicone ricevente (in corrispondenza del sito di inserzione) vengono prodotte due rotture a singola elica, sfasate generalmente di cinque o nove paia di basi. *c)* Due delle estremità rotte del trasposone si uniscono a due estremità del sito di inserzione; si forma così una struttura con due regioni a filamento singolo. *d)* La replicazione del DNA ristabilisce la struttura a doppia elica con formazione del «cointegrato». *e)* Per ricombinazione tra le sequenze ripetute dei due trasposoni del «cointegrato» si ottiene il replicone donatore originario ed il replicone ricevente, con una copia del trasposone (da Lewin, ridisegnato).

Nell'uomo non sono noti tumori da virus ad RNA; sono però presenti proto-oncogeni che possono essere coinvolti nella formazione dei tumori. È stato dimostrato che la traslocazione di un segmento di DNA che porta un oncogene provoca la formazione di tumore. Ad esempio, quando l'oncogene *myc*

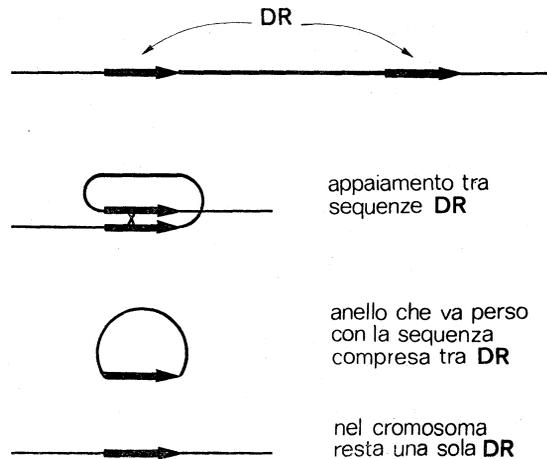


Fig. 12. - La ricombinazione reciproca tra le due sequenze ripetute dirette (DR) causa delezione della regione compresa fra le DR (da Lewin).

viene traslocato dal cromosoma 8 al cromosoma 14 in prossimità di un locus coinvolto nella biosintesi delle immunoglobuline, si sviluppa il linfoma di Burkitt, forse perché nella nuova sede l'oncogene viene attivamente espresso.

#### MODELLI MOLECOLARI DELLA TRASPOSIZIONE

Gli elementi trasponibili presentano delle caratteristiche generali comuni che sono state ben definite. Invece i meccanismi molecolari che sono alla base del processo di trasposizione non sono ancora noti. Sono stati proposti alcuni modelli con i quali si è cercato di interpretare i diversi aspetti della trasposizione (SHAPIRO 1979; ARTHUR *et al.*, 1979; CHACONAS *et al.*, 1981) ma nessuno ha trovato completa conferma sperimentale. Nella fig. 11 è illustrato un modello di trasposizione. Il modello è in accordo con il fatto che la trasposizione riguarda una copia dell'elemento trasponibile; prevede la duplicazione delle basi del sito di inserzione, la aspecificità della sequenza del sito di inserzione ed il passaggio attraverso la formazione del « cointegrato ».

#### EFFETTI DEGLI ELEMENTI TRASPONIBILI SULLA STRUTTURA DEL GENOMA

Una proprietà importante degli elementi trasponibili è data dalla loro capacità di aumentare sensibilmente la frequenza dei riarrangiamenti cromosomici.

I riarrangiamenti vengono causati attraverso delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni e fusione di repliconi.

IS 1, ad esempio, provoca delezioni in prossimità dei siti di inserzione con frequenze di  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ . Se due copie di uno stesso trasposone vengono a trovarsi nello stesso genoma, esse creano omologia e quindi possibilità di ricombinazione; le conseguenze possibili sono le alterazioni cromosomiche sopra ricordate.

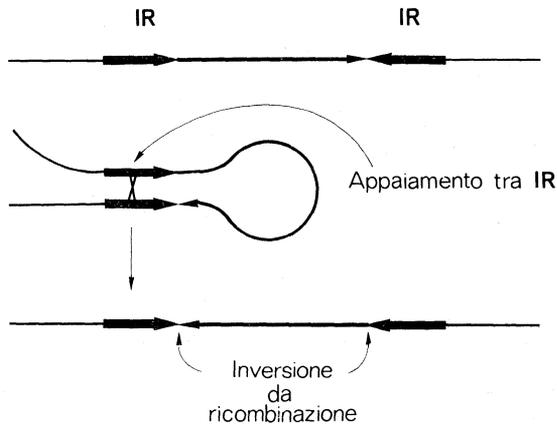


Fig. 13. - La ricombinazione reciproca fra le due sequenze ripetute invertite (IR) provoca l'inversione della regione compresa tra le IR (da Lewin).

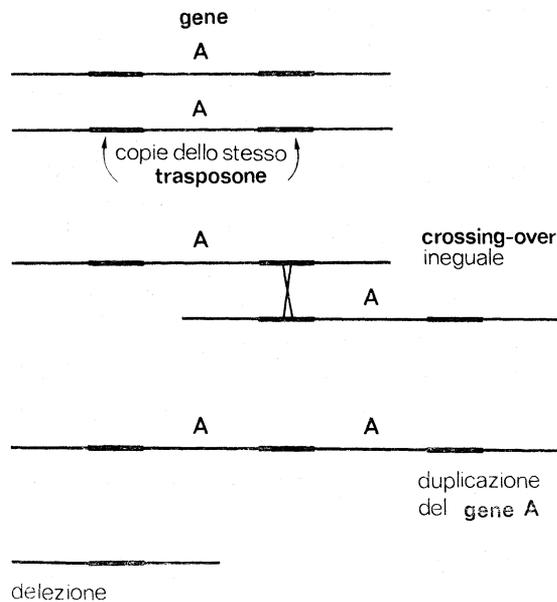


Fig. 14. - Duplicazione e delezione determinate da crossing-over ineguale in seguito ad appaiamento anomalo tra i due cromosomi.

Nelle figg. 12, 13 e 14 sono riportati dei modelli proposti per spiegare l'origine di alcuni riarrangiamenti cromosomici.

La notevole diffusione degli elementi trasponibili e la grande varietà di riarrangiamenti cromosomici, che essi determinano, fanno pensare che devono aver avuto un ruolo importante nell'evoluzione del materiale genetico.

Ricordiamo che le *duplicazioni* del materiale genetico sono ritenute *fondamentali e indispensabili* nel processo evolutivo. Sappiamo che anche mediante *delezioni, inversioni, trasposizioni* si formano nuove sequenze di nucleotidi ed anche nuovi geni nei punti di fusione.

Inoltre, la rottura di sistemi di regolazione e la formazione di nuovi sistemi possono rendere più flessibile la capacità adattativa dell'organismo.

La trasposizione, quindi, insieme alla mutazione e ricombinazione omologa crea variabilità genetica sulla quale opera la selezione naturale.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARTHUR A. and SHERRATT D.J. (1979) - *Dissection of the transposition process: a transposon-enclosed site-specific recombination system*. « Mol. Gen. Genet. », 175, 267-274.
- CHACONAS G., HARSHY R.M., SARVETNIK N. and BUKHARI A. (1981) - *Mechanism of bacteriophage Mu DNA transposition*. « Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. » 45, 311-322.
- COHEN S.N. e SHAPIRO J.A. (1980) - *Elementi genetici trasponibili*. « Le Scienze », 13 (140), 52-64.
- KLEIN K. (1983) - *Specific chromosomal translocations and the genesis of B-cell derived tumors in mice and men*. « Cell », 32, 311-315.
- COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANT. BIOL. 45 - *Movable genetic elements*. « Publ. C.S.H. », Laboratory (1981).
- HEFFRON F., SUBLETTE R., HEDGES R.W., JACOB A. and FALKOW S. (1975) - *Origin of the REM beta-lattamase gene found on plasmids*. « J. Bacteriol. » 122, 250-256.
- JORDAN E., SAEDLER H. and STARLINGER P. (1968) *O<sup>c</sup> and strong polar mutations in the gal operon are insertions*. « Mol. Gen. Genet. », 102, 353-363.
- KLECKNER N. (1981) - *Transposable elements in procaryotes*. « Ann. Rev. Genet. », 15, 341-404.
- LEWIN B. (1983) - *Genes*. J. Wiley and Sons, N.Y.
- MCCCLINTOCK B. (1952) - *Chromosome organization and genic expression*. « Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. », 16, 13-47.
- SHAPIRO J.A. (1979) - *Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements*. « Proc. Nat. Ac. Sci. », 76, 933-1937.