

Batteri ed epigenetica

Epigenetica è un fenomeno presente solo negli eucarioti?

Grande rilevanza negli eucarioti ma cosa succede nei procarioti?

I batteri sono stati visti come popolazioni clonali geneticamente identiche con fenotipi che riflettevano perfettamente il contenuto genetico della cellula .

Negli anni si sono accumulati numerosi esempi di differenziamento nei batteri:

- formazione dell'endospora in *Bacillus subtilis*
- formazione dei batteroidi azoto fissatori in *Rhizobium*
- divisione asimmetrica in *Caulobacter*
- formazione dei corpi fruttiferi in *Myxococcus*
- formazione delle eterocisti nei cianobatteri
- formazione dei biofilm in molte specie batteriche.
- Formazione dei persisters

In tutti questi fenomeni si vengono a formare cellule con proprietà morfologiche e fisiologiche ben distinte all'interno di una popolazione pur mantenendo la sequenza genomica intatta.

La bistabilità nei batteri

Oltre al differenziamento nei batteri si assiste al fenomeno della bistabilità, ovvero alla separazione all'interno di una popolazione di due fenotipi.

La bistabilità reversibile, definita anche **variazione di fase** si può ottenere attraverso:

1. Eventi di ricombinazione sito-specifica
2. Meccanismi epigenetici che coinvolgono la propagazione di regolazioni tipo feedback o la formazione di diversi pattern di metilazione che sono reminescenti delle modificazioni nella cromatina eucariotica.
3. Eventi di mutazione in sequenze ripetute

La formazione di sottopopolazioni batteriche fenotipicamente distinte è particolarmente rilevante in natura sia

- come strategia adattativa (per evadere il sistema immune o altri sistemi di difesa dell'ospite durante l'infezione)
- come strategia per facilitare la sopravvivenza ai cambiamenti ambientali.

Il modello di Waddington e la formazione di diverse linee cellulari durante lo sviluppo degli eucarioti multicellulari

Epigenetica si rivolge allo studio della formazione delle linee cellulari con meccanismi che pur essendo ereditabili non alterino la sequenza di DNA

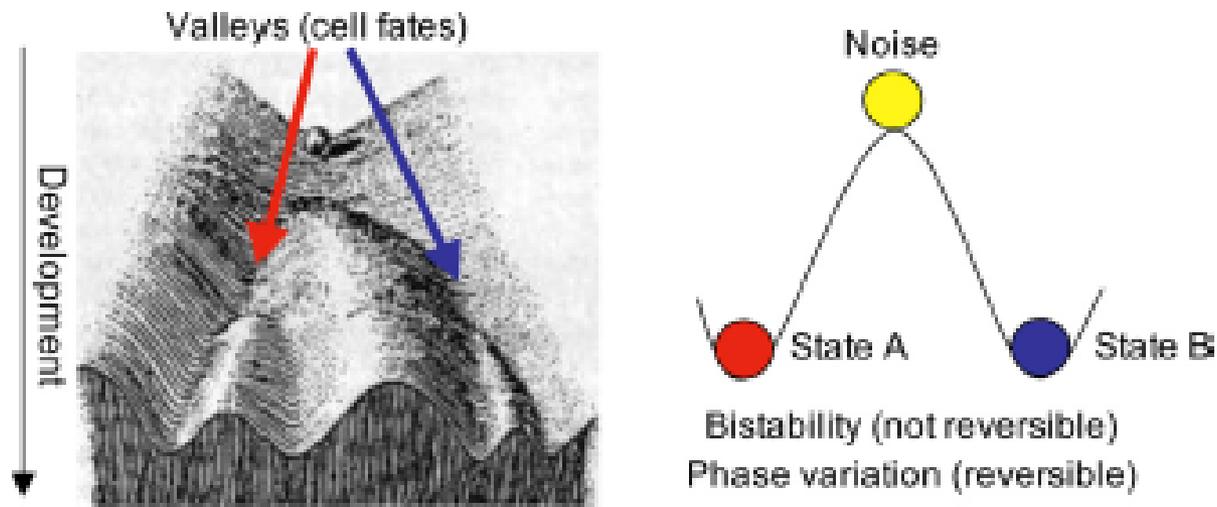
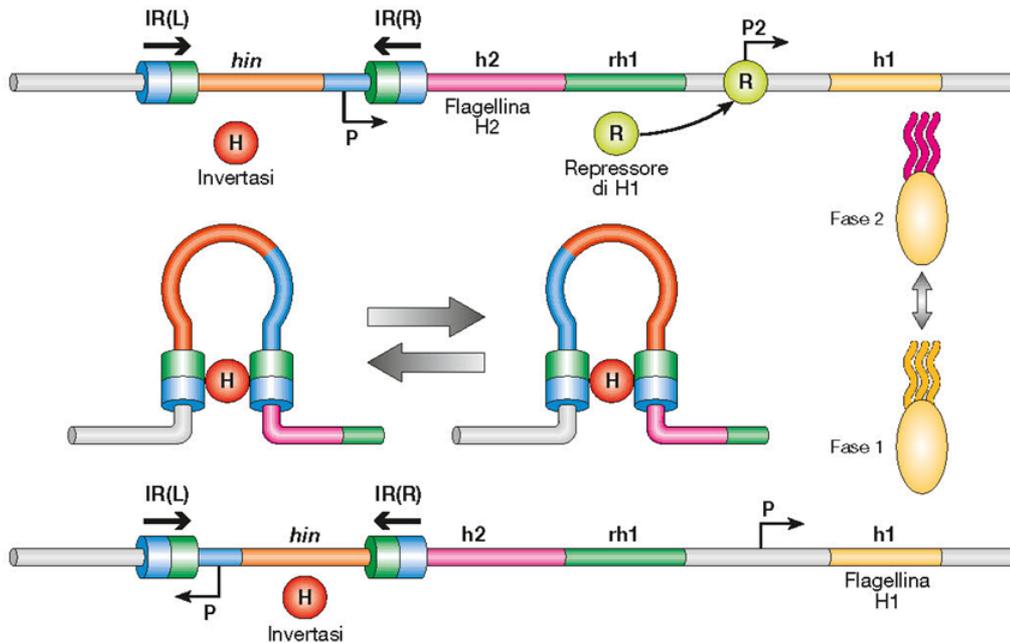


FIGURE 1. Left panel, Waddington's artistic drawing of an "epigenetic landscape" as a ball that falls to stable valleys from unstable ridges (adapted from Ref. 1). Right panel, bistability viewed as the fall of a ball from an unstable state on a ridge to a stable state in a valley. In phase variation, the valley state is metastable, and the ball periodically returns to the ridge.

La variazione di fase è un esempio di bistabilità reversibile

Variazione di fase in Salmonella (classico esempio di ricombinazione sito-specifica)



Hin è un invertasi sito specifica che determina un'inversione del frammento contenente il gene hin e il promotore di h2-rh1. La proteina Fis coadiuvina Hin nell'inversione

Fase 2: il promotore dell'operone che codifica sia la flagellina H2 (h2) che il repressore della flagellina H1 (rh1) è nell'orientamento corretto per la trascrizione. Il repressore di H1 blocca la trascrizione della fase 1 e viene espressa la flagellina H2

Fase 1: il repressore della flagellina di fase 1 (rH1) non viene prodotto in quanto il promotore dell'operone che codifica sia la flagellina H2 che il repressore di h1 è nell'orientamento inverso

Alcuni esempi di eterogeneità fenotipica in ambienti naturali

- la formazione dei **persisters** (cellule dormienti che resistono agli antibiotici)
- la formazione di **nuove ceppi** di *Salmonella* durante la colonizzazione di animali
- l'espressione **bistabile degli esopolissacaridi** durante la formazione di biofilm in *B. subtilis*.

Eventi stocastici e formazione di sottopopolazioni

Nella formazione di sottopopolazioni all'interno di una popolazione batterica possono svolgere un ruolo importante **EVENTI STOCASTICI**

Fluttuazioni casuali dell'espressione genica (un fenomeno definito NOISE "rumore") può determinare la differenza tra le singole cellule all'interno di una popolazione.

Le variazioni **quantitative** possono diventare **QUALITATIVE** nel senso che l'espressione di un determinato fattore al di sopra di un determinato livello determinerà **un segnale che sarà completamente diverso** dal segnale generato se quel fattore è espresso al di sotto di un certo livello.

Bistabilità e feedback positivo : l'operone lac

Bisogna considerare cosa succede se una cultura cresciuta in presenza di alti livelli di IPTG viene trasferita in un terreno contenente bassissimo livello di IPTG.

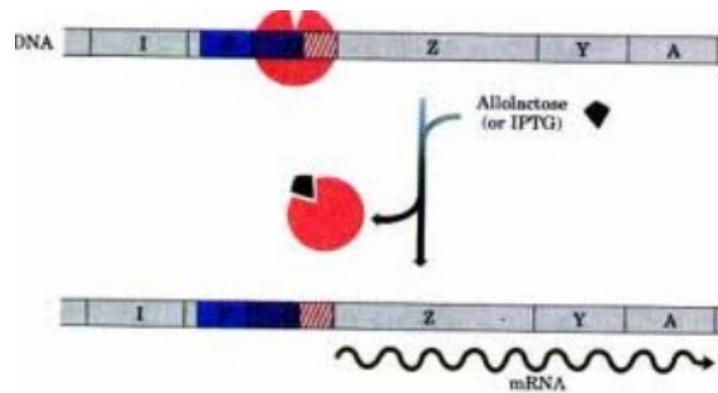
Alcune cellule all'interno della popolazione riusciranno a mantenere l'operone indotto. Il mantenimento dell'induzione è dovuto alla quantità di PERMEASI presente nelle diverse cellule .

Se il livello di permeasi è alto riusciranno a far entrare e concentrare IPTG e quindi l'operone si manterrà nello stato attivato (Lac+).

Se in alcune cellule il livello di PERMEASI è più basso risentiranno subito della diminuzione di IPTG e quindi l'operone in breve tempo sarà silenziato.

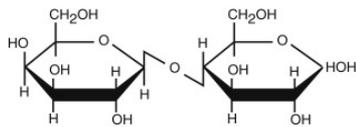
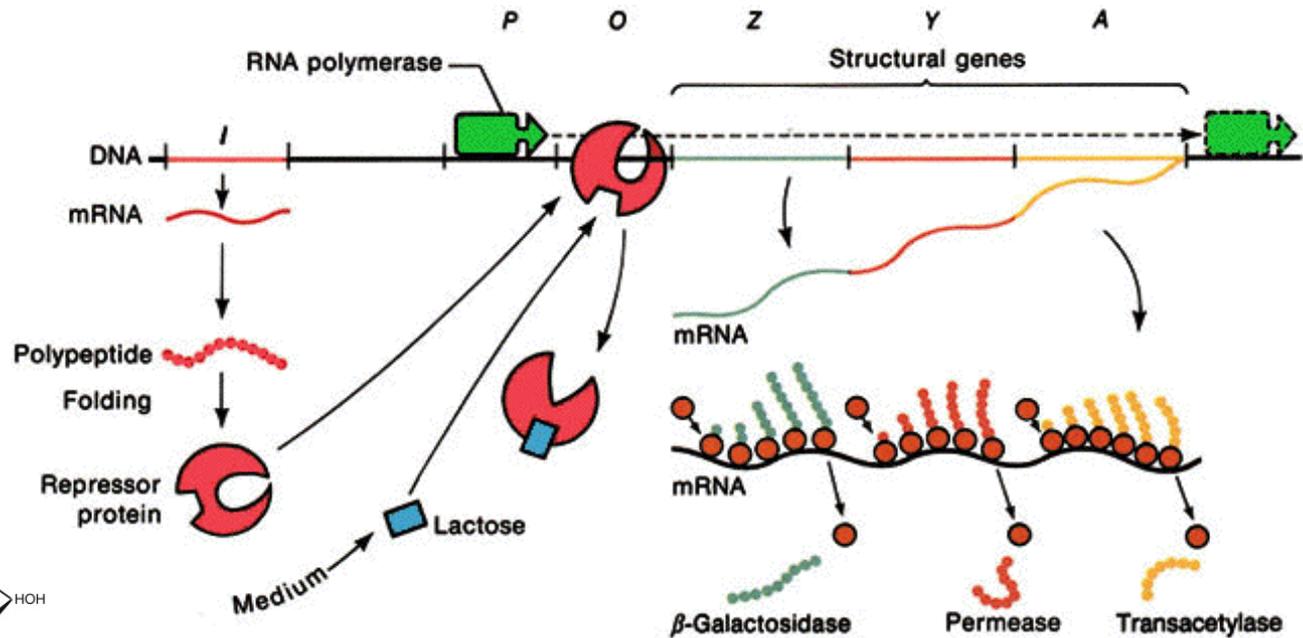
La conseguenza sarà che una cultura pienamente indotta si dividerà in indotta e repressa.

Le fluttuazioni individuali nel livello di permeasi fanno la differenza

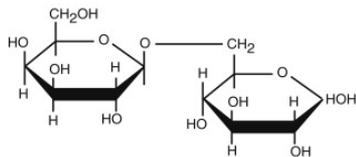


*Allolattosio o IPTG
sono induttori
dell'operone lattosio*

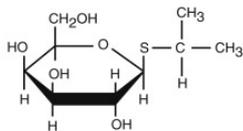
L'operone Lac contiene il gene *lacY* che codifica la lattosio permeasi sotto controllo del repressore LacI



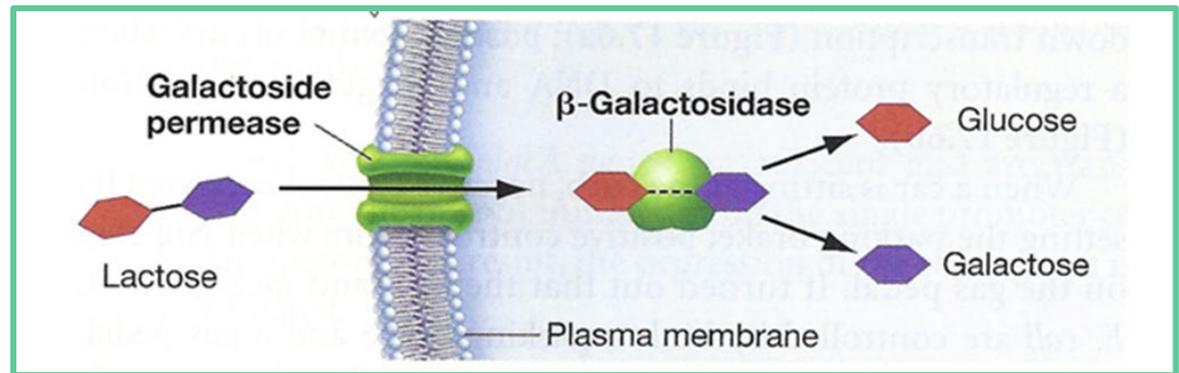
LACTOSE
(galactose & glucose)



ALLO-LACTOSE



ISOPROPYL- β -D-THIOGALACTOSIDE
(IPTG)



Bistabilità e feedback positivo : il caso della Competenza

Un altro classico esempio di bistabilità è costituito dal fenomeno della competenza in *B. subtilis* ovvero la capacità di acquisire DNA esogeno

Un fattore cruciale per lo sviluppo della competenza è l'accumulazione di **ComK** che è in grado di attivare il proprio promotore e quello dei geni richiesti per l'acquisizione del DNA.

ComK può venir riconosciuto da MecA e portato al complesso di degradazione ClpCP e degradato.

In presenza di ComS questo si lega a MecA alterandone la struttura e provocando il rilascio di ComK

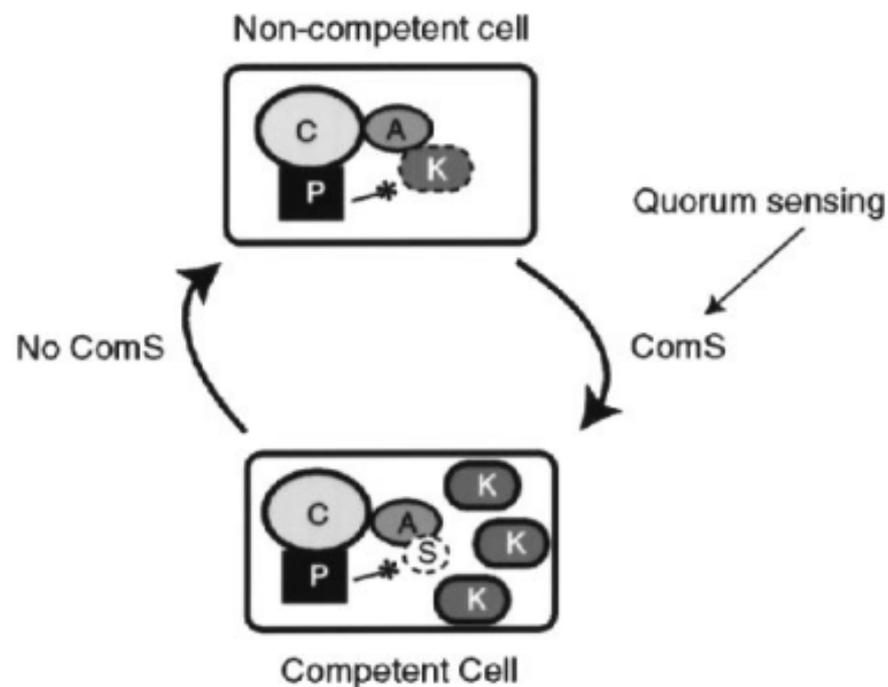
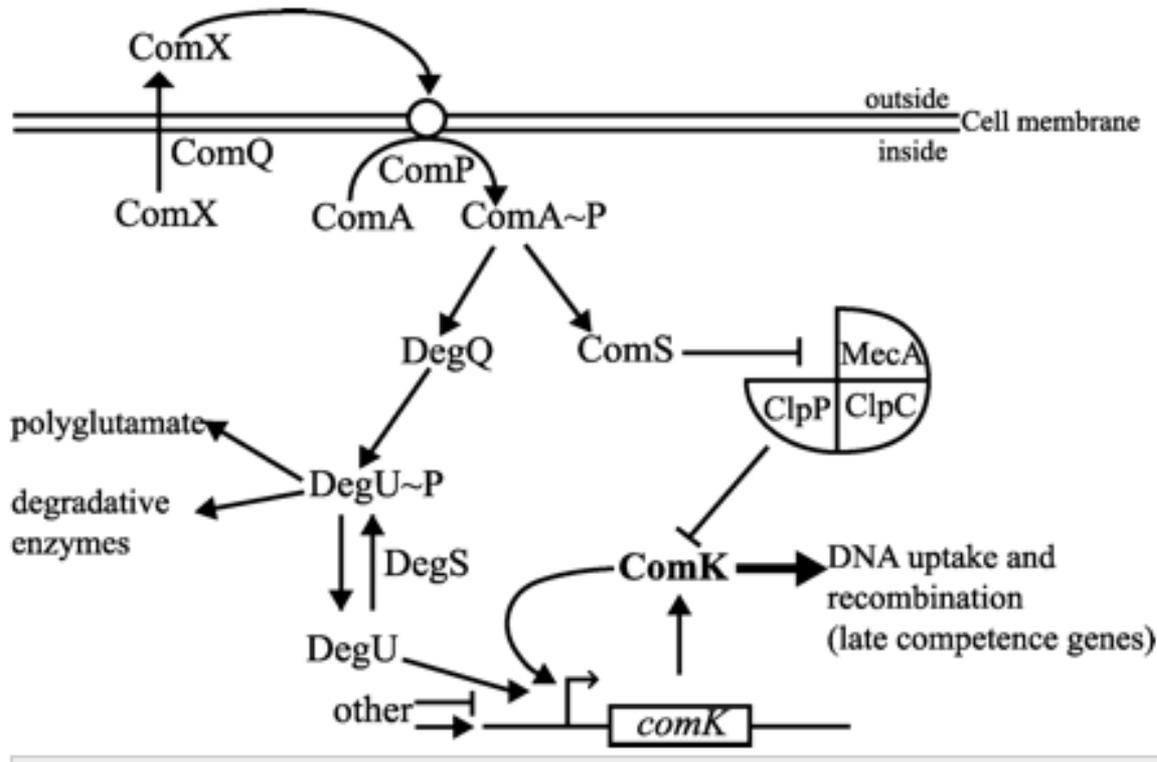


Fig. 7. Model for regulation of competence by proteolysis. In the non-competent cell any ComK (K) synthesized is bound to MecA (A) and targeted for degradation by ClpCP. ComS (S) is synthesized as a consequence of the quorum-sensing pathway and binds to MecA, altering its conformation and resulting in the release of ComK. As a result ComK is stabilized and ComS degradation is accelerated. Instability is indicated by dashed lines and proteolysis by a line terminated by an asterisk.

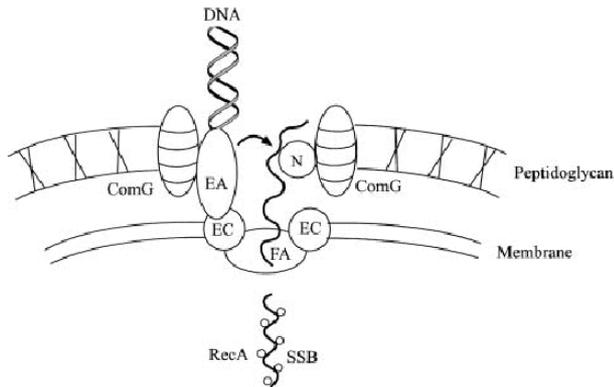
Relazione tra Competenza e quorum sensing : la regolazione di ComK
 Quando viene sintetizzato ComS?



ComK levels are reduced posttranscriptionally at low cell density when MecA recruits ComK to the proteolytic MecA-ClpCP complex, making competence development quorum-sensing dependent

Competenza naturale

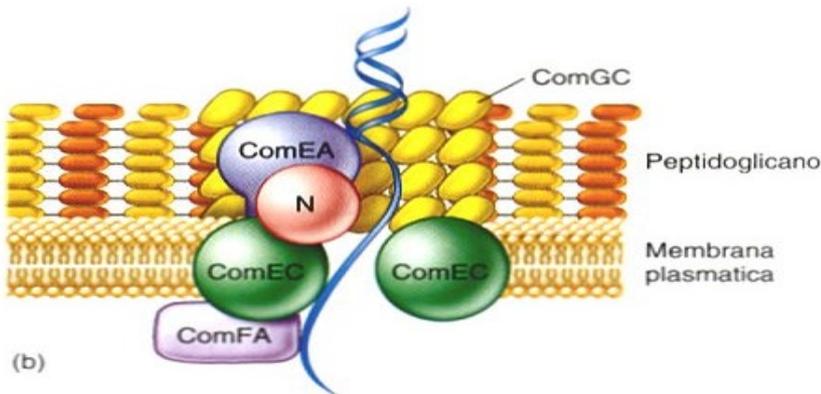
La capacità che alcuni microrganismi hanno di prelevare del DNA dall'ambiente è determinata dal possedere complessi proteici deputati a questo scopo. In *Bacillus subtilis* un complesso di numerose proteine è coinvolto in questo processo.....



ComG forma il canale nella parete cellulare.

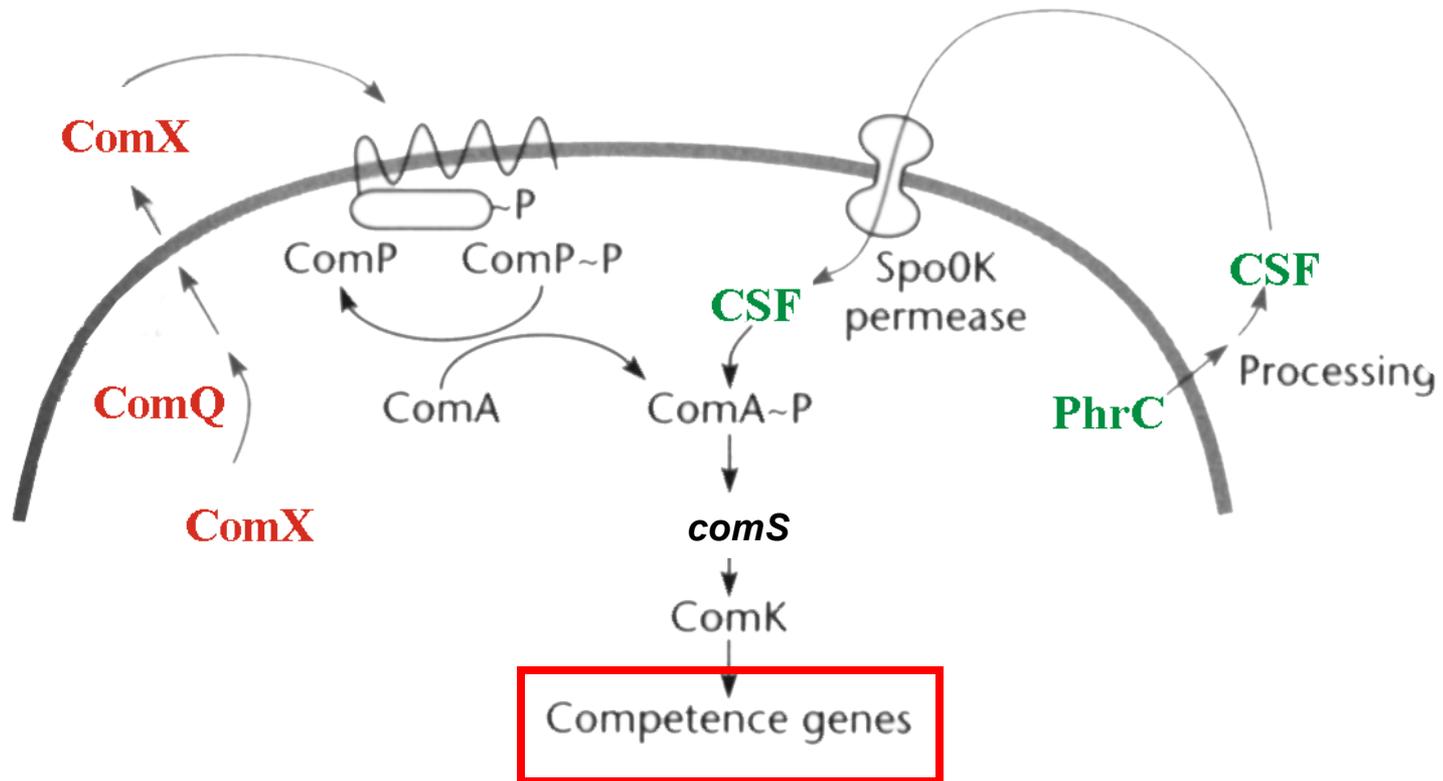
ComEA, EC ed FA sono responsabili del trasporto e del trasferimento del DNA nella cellula.

Infine NucA (N) è la nucleasi che trasforma il dsDNA in ssDNA



(b)

Quorum sensing ed induzione della competenza in *Bacillus subtilis*

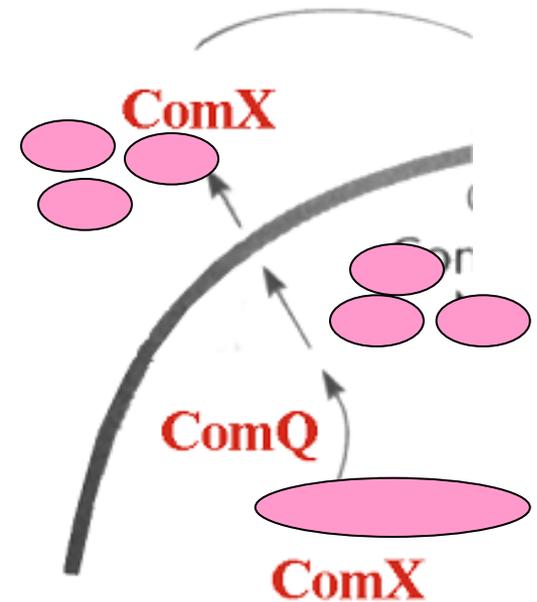


Induzione della competenza in *B. subtilis*.

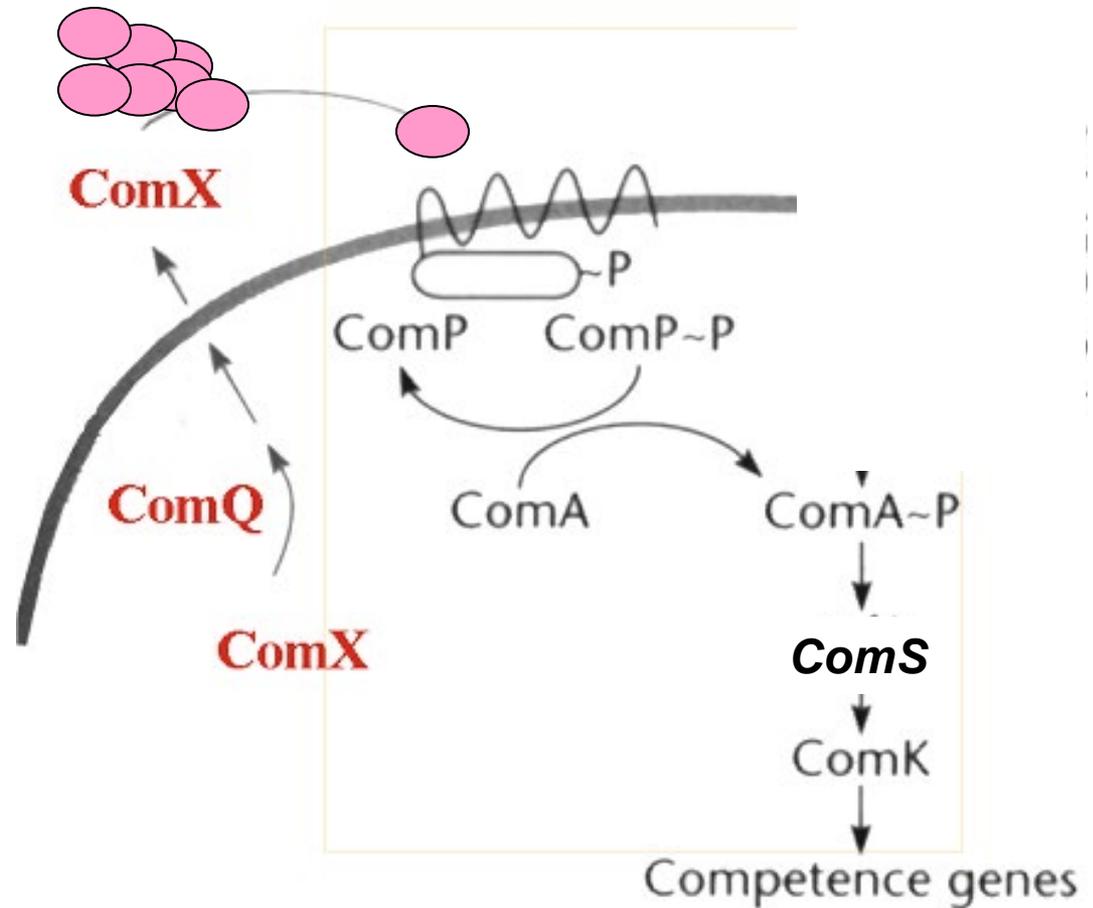
ComX è un piccolo peptide che viene attivamente secreto dalle cellule

ComX viene sintetizzato nel citoplasma come una molecola più grande che viene tagliata e modificata da ComQ.

ComX matura viene secreta e raggiunge un'alta concentrazione extracellulare solo quando vi sono molte cellule batteriche

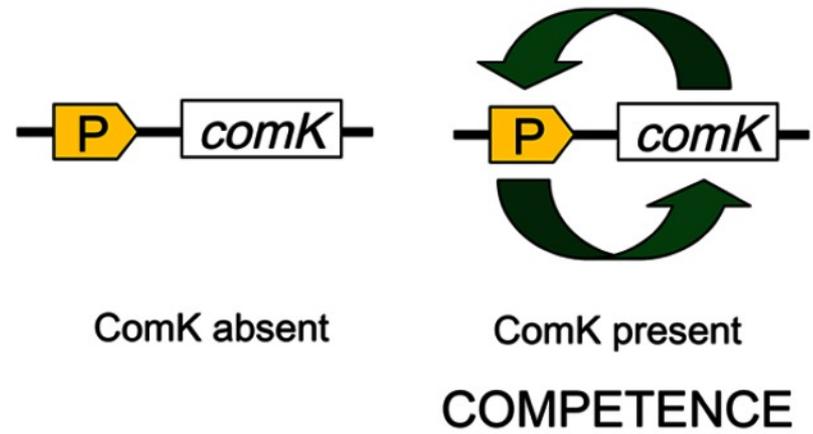


Quando i livelli di ComX diventano elevati Com X si lega al sensore di un sistema a due componenti costituito da ComP e ComA. ComP si autofosforila e ComP-P fosforila il regolatore della risposta ComA. ComA-P va ad attivare tramite l'attivazione di altri due geni , tutti i geni di competenza



Durante la fase esponenziale ComK viene sintetizzato e poi degradato.

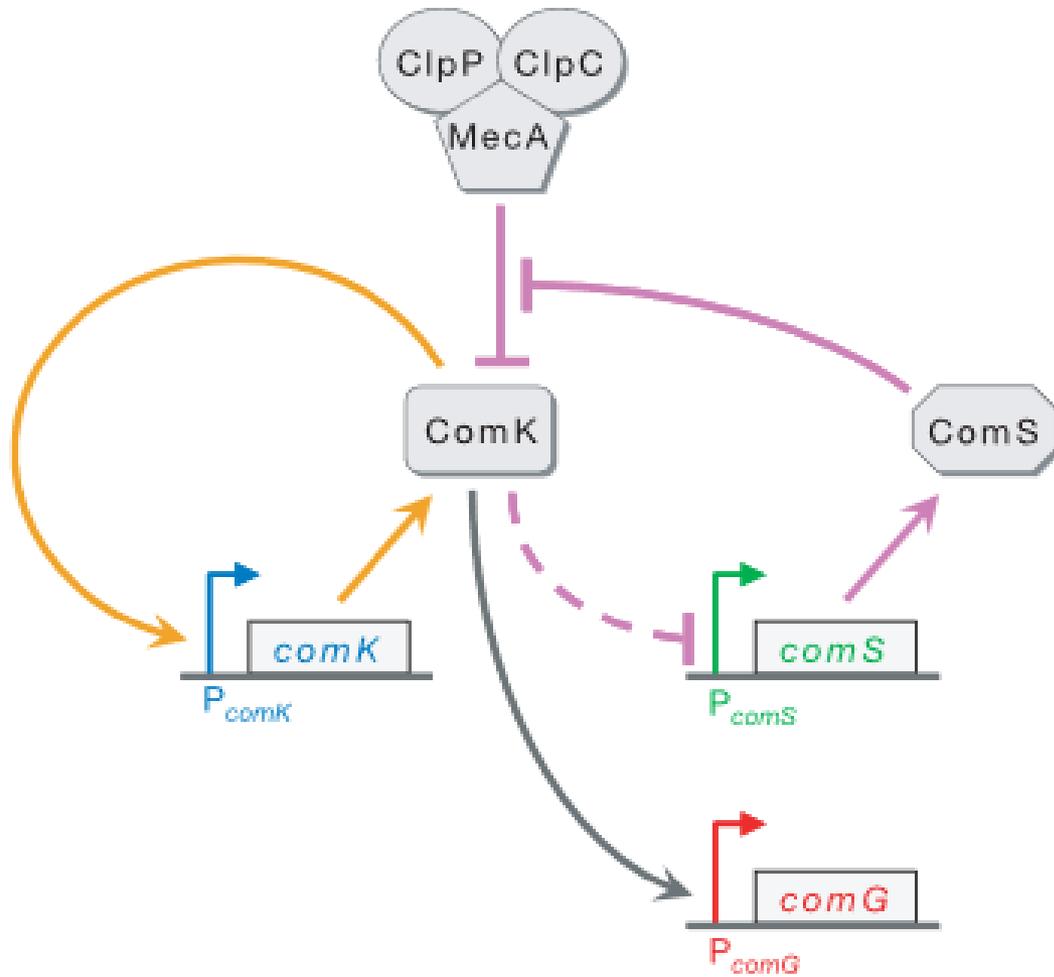
Quando la cultura si avvicina alla fase stazionaria il fattore ComS sensibile al QS stabilizza ComK. A questo punto inizia la competizione tra ComK e dei repressori sul promotore di *comK*. Il legame di ComK da luogo ad un feedback positivo in quanto si attiva la trascrizione di ComK e successivamente quella dei geni di competenza. Il legame dei repressori al contrario inibisce la sintesi di ComK e di conseguenza la cellula non raggiunge lo stato di competenza.



La bistabilità è determinata dalla fluttuazione dei livelli di ComK che determinano un rumore di fondo stocastico.

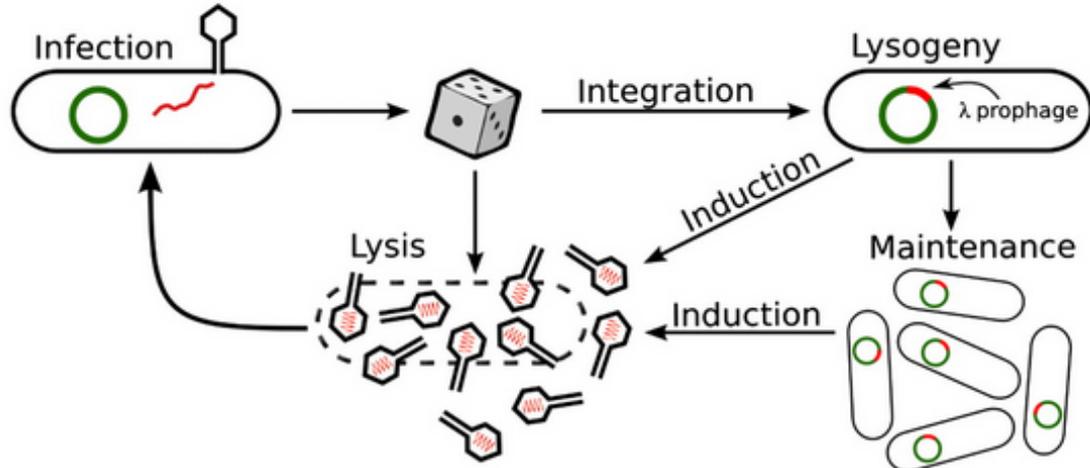
La variazione quantitativa si ripercuote in una variazione qualitativa ovvero attivazione o meno dello stato di competenza.

b



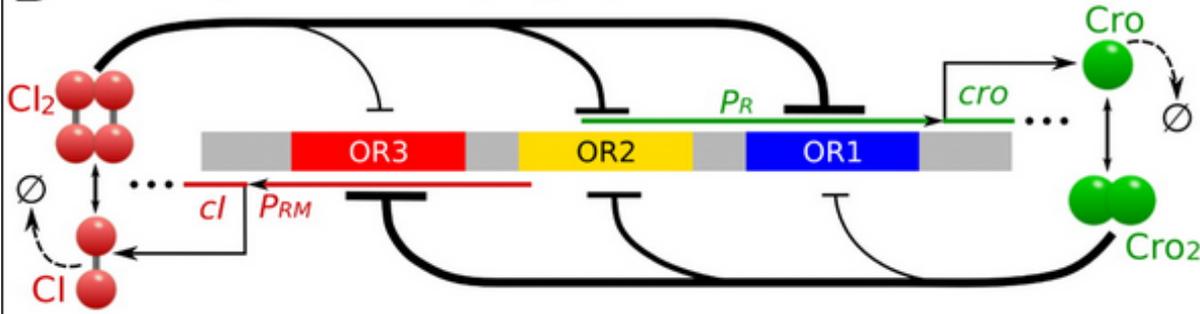
Bistabilità e doppio feedback negativo : il caso della scelta tra ciclo litico e ciclo lisogenico

A Life cycle of phage λ



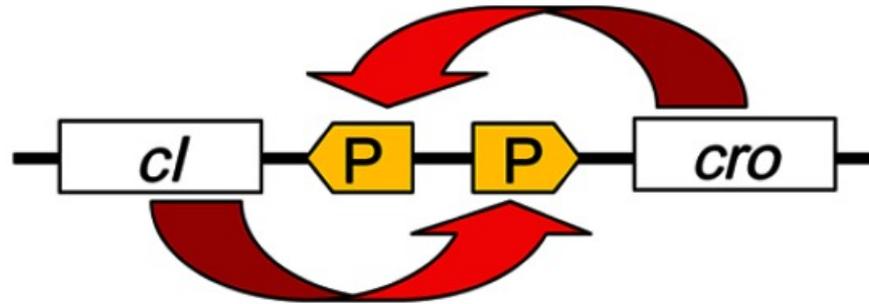
L'infezione con il fago λ può seguire due diversi programmi di sviluppo :
uno è la lisi della cellula
l'altro è la lisogenia

B Switching network for lysogeny maintenance



Sebbene la decisione tra lisi /lisogenia dipenda dallo stato fisiologico della cellula e da parametri ambientali, a livello di singola cellula il destino della singola infezione da parte di λ è imprevedibile e può essere considerato stocastico

Il risultato di un feedback positivo o di una doppio negativo è analogo



Il destino dell' infezione di lambda non è prevedibile e può essere considerato stocastico

cl present,
Cro absent

LYSOGENY

cl absent,
Cro present

LYSIS

La decisione tra ciclo litico e lisogenico può essere considerato come una gara tra i due repressori cro e CI

Il fago λ ha due repressori CI e cro e ciascuno reprime l'altro.

Al momento dell'infezione entrambi i repressori vengono prodotti e la scelta lisi / lisogenia può esser vista come una competizione. Il repressore che per primo riesce ad occupare dei siti di regolazione comuni reprimerà la sintesi del proprio antagonista.

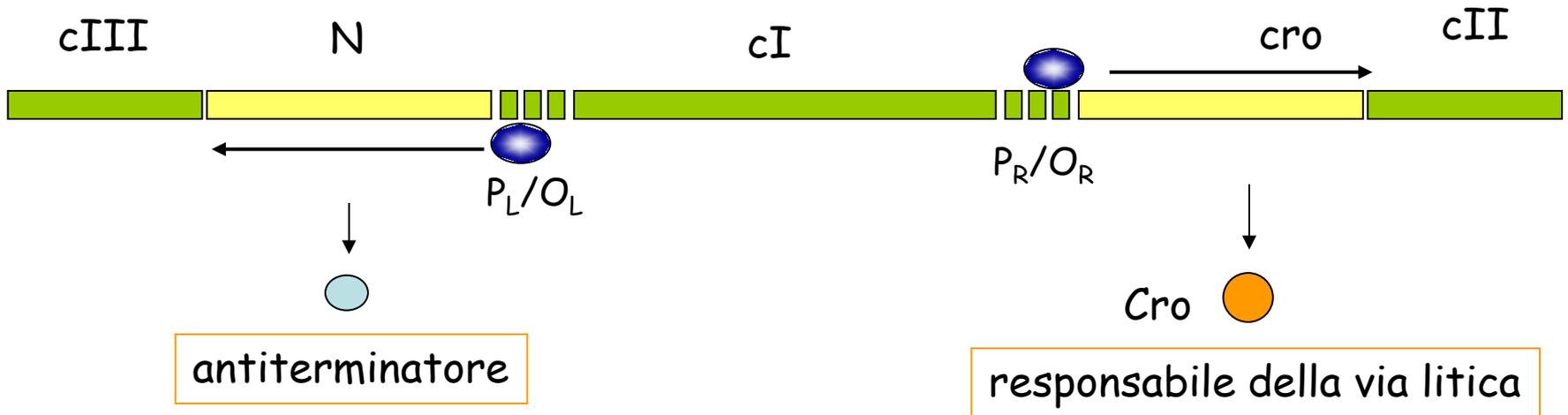
Se il vincitore sarà cro la sintesi di CI sarà repressa e λ liserà la cellula.

Se il vincitore sarà CI la sintesi di cro sarà repressa e λ lisogenizzerà la cellula,

Nel caso di λ , il prevenire la sintesi di cro da parte di CI equivale ad una positiva autoregolazione di cI e viceversa.

La regione di immunità di λ

Fase precoce immediata

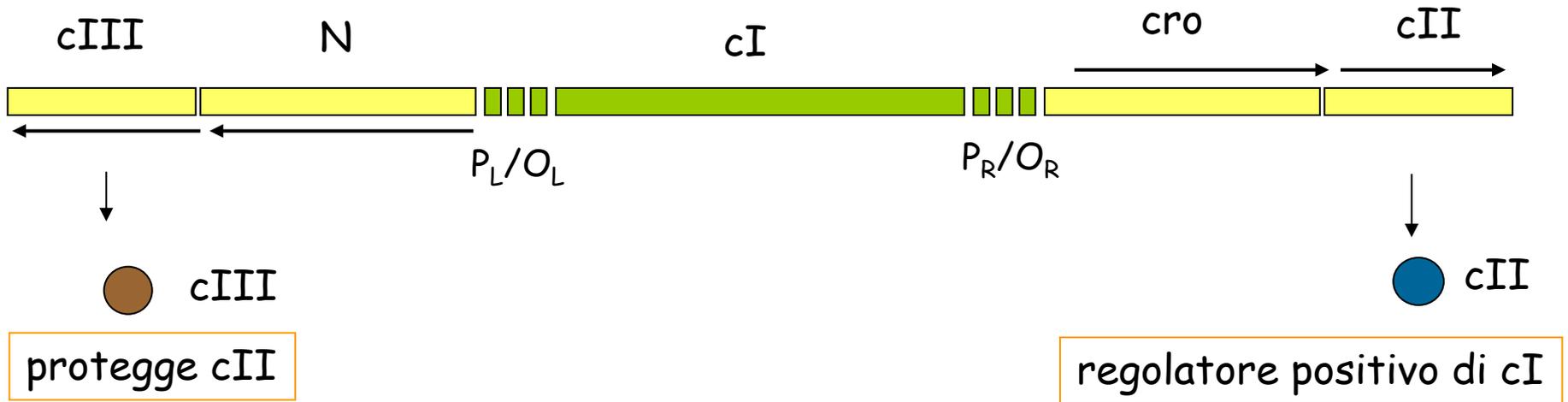


I promotori P_R/O_R e P_L/O_L sono riconosciuti dalla RNA polimerasi batterica

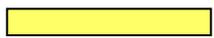
-  gene spento
-  gene trascritto
-  RNA polimerasi batterica

La regione di immunità di λ

Fase precoce ritardata

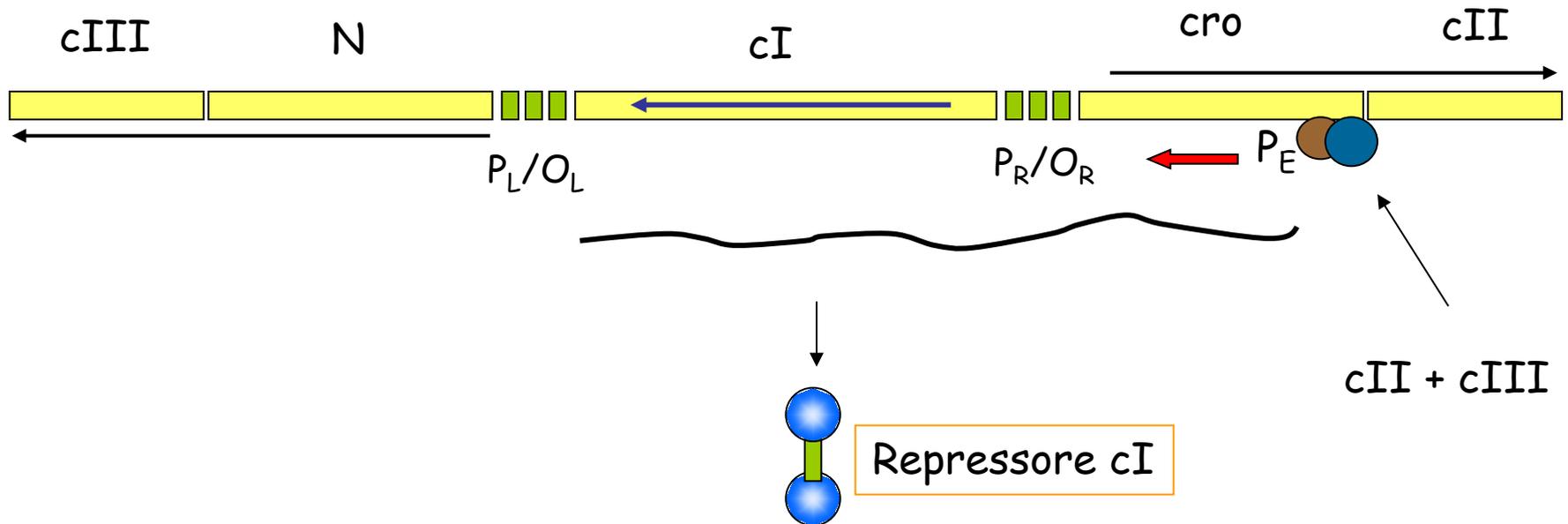


La proteina cII è una proteina delicata e molto sensibile alle proteasi batteriche; verrebbe rapidamente degradata se non fosse protetta dalla proteina cIII.

-  gene spento
-  gene trascritto

La regione di immunità di λ

Fase precoce ritardata



La proteina cII è un regolatore positivo della trascrizione: riconosce in modo specifico il promotore PE permettendo il legame della RNA polimerasi e la trascrizione verso sinistra. In questo modo potrà iniziare la trascrizione del gene cI che codifica per il repressore responsabile del mantenimento dello stato lisogenico.

La proteina cIII serve solo a proteggere cII dall'azione delle proteasi batteriche.

Come vedrete dalle prossime diapositive, il gene cI può essere trascritto anche a partire dal promotore PRM situato nella regione PR/OR ma questo promotore non viene riconosciuto in modo efficiente dalla RNA Polimerasi a meno che.....

In conclusione, per la sintesi iniziale di cI sono necessari cII+cIII e la trascrizione parte da PE.

Metilazione e controllo epigenetico

Un meccanismo in comune a molti sistemi per regolare gli scambi di fase coinvolge la formazione di pattern di metilazione nel DNA.

Quando un sito di metilazione del DNA si sovrappone ad un sito di riconoscimento per una proteina, la metilazione viene bloccata.

Molti siti *GATC* sul cromosoma di *E. coli* sono pienamente metilati eccetto che per un breve periodo durante la replicazione nel quale si vengono a trovare in uno stato di emimetilazione.

Alcuni siti permangono in uno stato di emimetilazione a causa del legame di proteine sui siti *GATC* o adiacenti impedendo così l'accesso alla Dam metilasi e bloccando la metilazione .

.

La metilazione viene effettuata da Metiltransferasi di 2 tipi

- quelle appartenenti al sistema di restrizione e modificazione
- quelle orfane (ovvero prive del corrispondente sistema di restrizione).

A quest'ultima classe appartiene sia la Dam metilasi che CcrM (Cell cycle regulator methyltransferase) di *Caulobacter*

Le Metilazioni più classiche sono

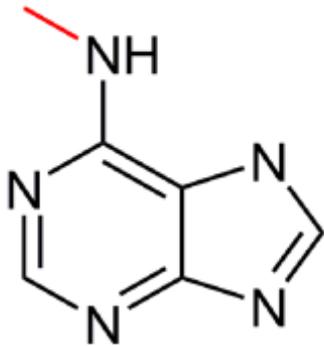
C⁵ methyl citosine

N⁶ methyl adenina

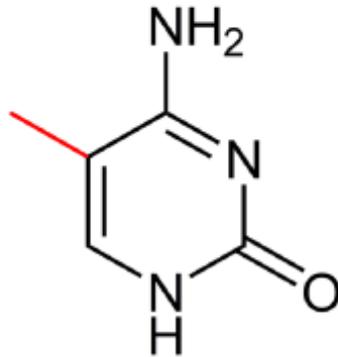
N⁴ methyl citosina

La metilazione del DNA: un processo epigenetico fondamentale

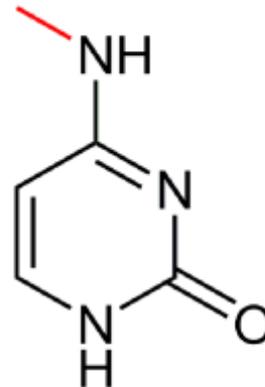
6mA



5mC

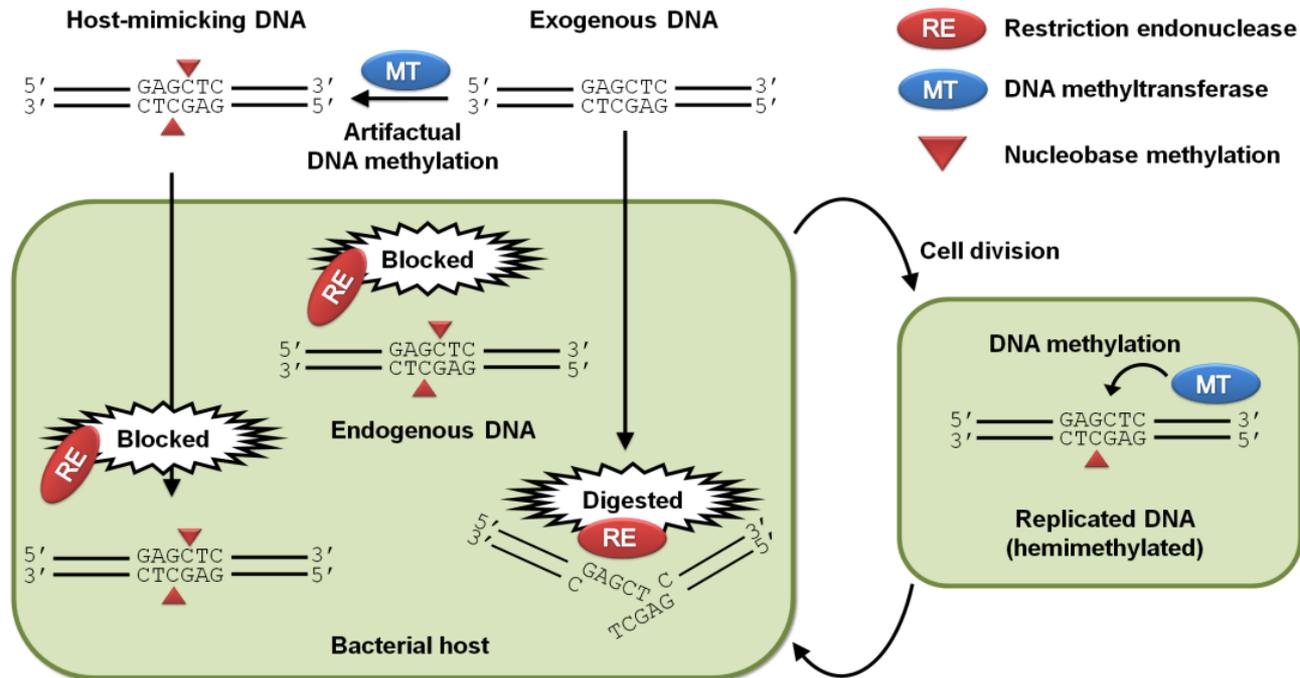


4mC



Sistemi R-M

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



Dam metilasi

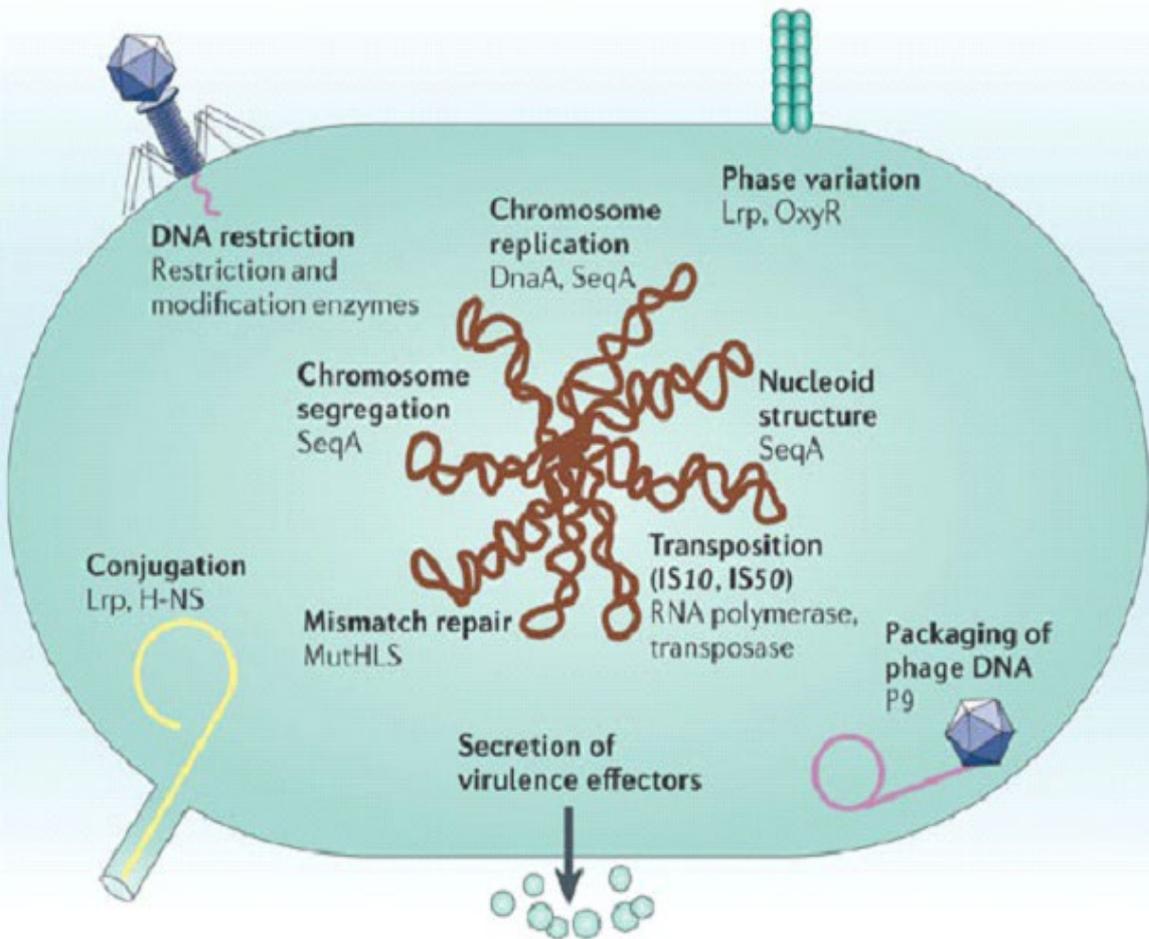
Dam metilasi trasferisce un gruppo metilico dalla S-adenosyl-metionina al gruppo aminico dell'adenina nei siti 5'-GATC-3'.

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

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

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

Ruolo della Dam metilasi nei batteri.



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

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

Evidenze tecniche della metilazione

Uso di isoschizomeri e metodo del bisolfito per l'analisi di genomi di dimensioni contenute pesantemente metilati

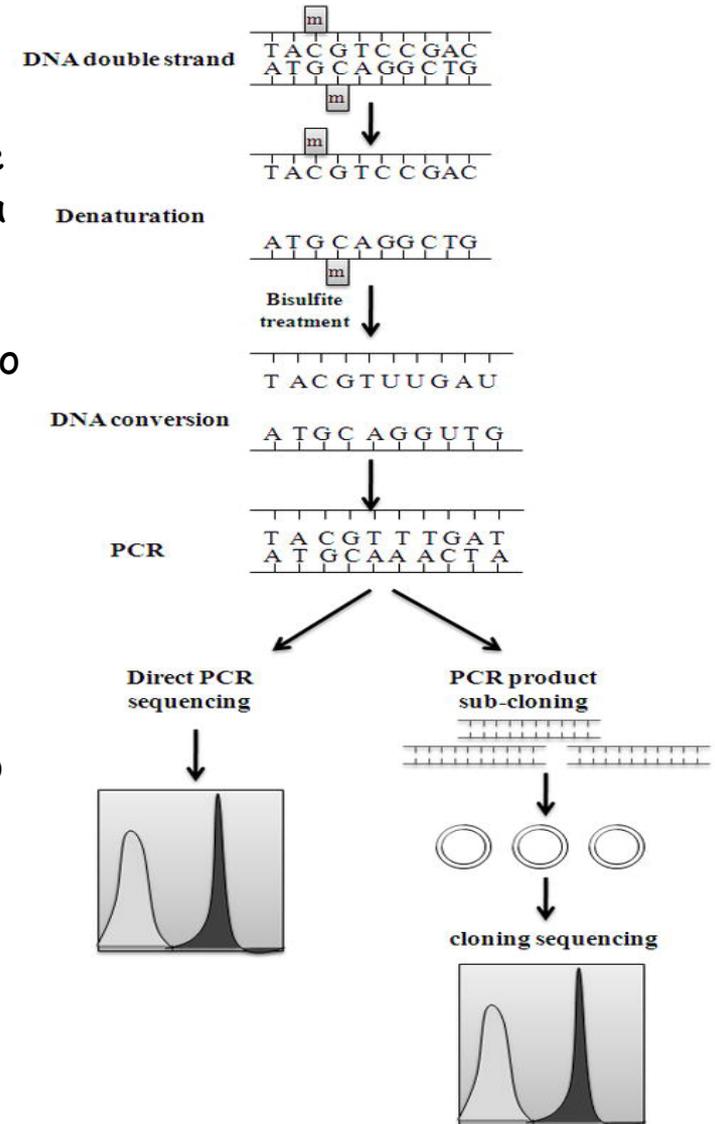
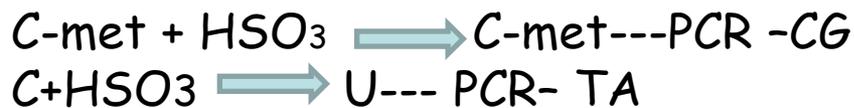
Il metodo del sequenziamento mediante trattamento del DNA con bisolfito (HSO_3^-) è considerato una delle tecniche migliori per l'individuazione della metilazione a livello delle 5-metilcitosine.

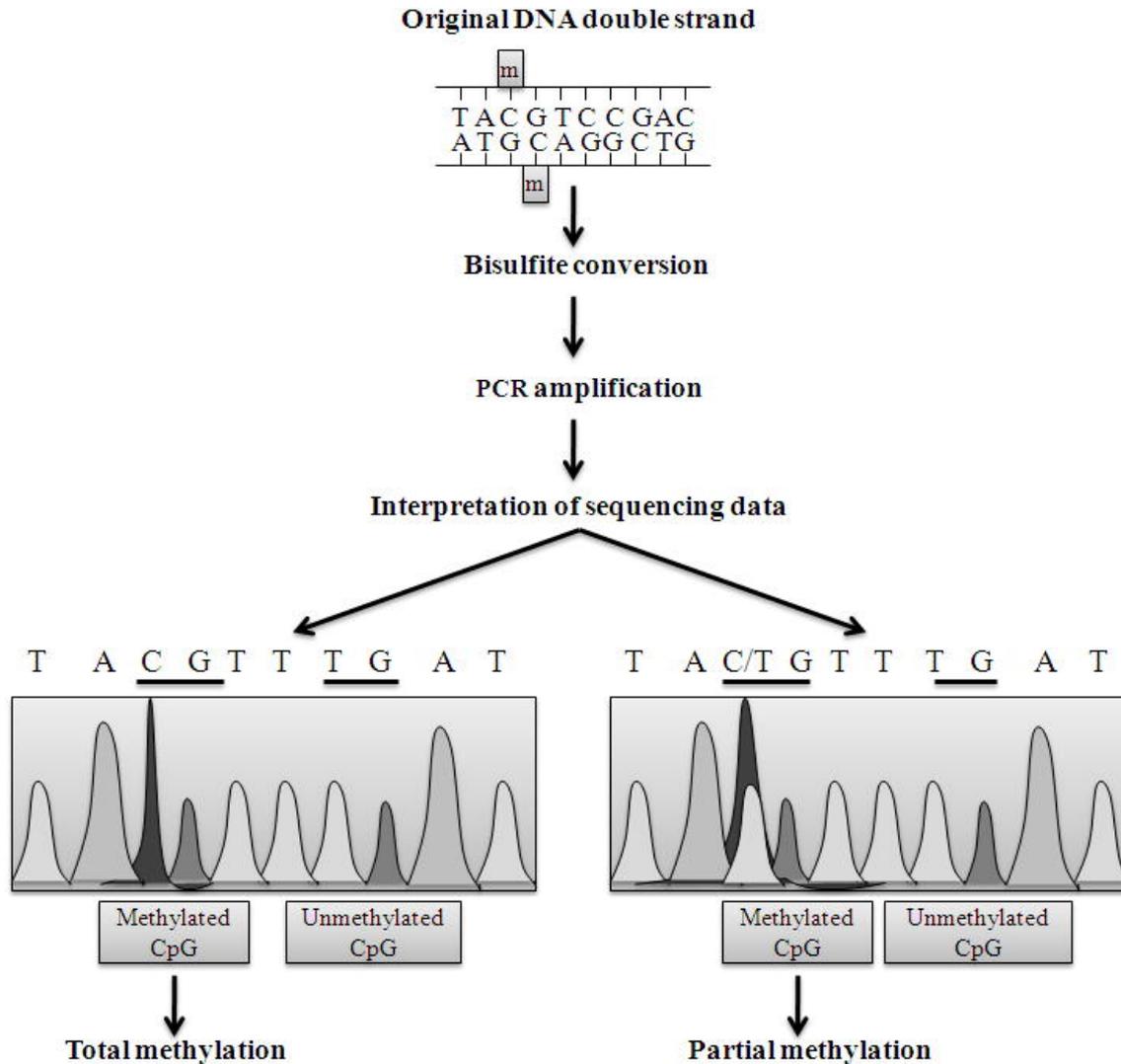
Questa tecnica permette di distinguere il DNA metilato dal non metilato tramite PCR.

Il trattamento del DNA con bisolfito converte per Deaminazione i residui di **Citosina NON METILATI** in URACILE. Questi saranno amplificati come Timine. I residui invece metilati rimarranno come invariati anche dopo il trattamento.

A questo punto la metilazione può venir determinata direttamente tramite sequenziamento oppure clonaggio e poi sequenziamento.

Metodo molto preciso ma solo per METIL CITOSINE





Interpretation of methylation sequencing results. After bisulfite treatment, all unmethylated cytosines (C) convert to thymine (T) and the presence of a C-peak indicates the presence of 5mC in the genome. Total methylation or complete conversion of a single residue shows a single peak. The presence of both C- and T-peaks indicates partial methylation or potentially incomplete bisulfite conversion.

Metodo degli isoschizomeri.

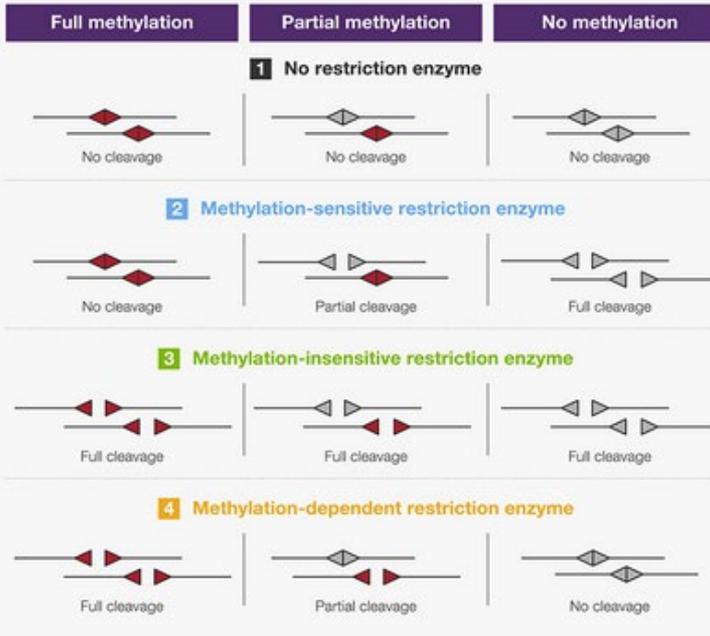
Un'altra tecnica consiste nell'analizzare frammenti di DNA mediante Enzimi di Restrizione Metilazione -Sensibili in parallelo ad isoschizomeri metilazione insensibili o metilazione dipendenti. Gli isoschizomeri sono enzimi provenienti da ceppi diversi che riconoscono i medesimi siti di restrizione ma la cui attività non è influenzata dalla presenza di gruppi metilici sulle basi riconosciute.

Dopo la digestione è quindi possibile confrontare i pattern ottenuti e individuare i siti di metilazione.

Dal momento che nei batteri vi è un un 'abbondanza di residui di metil adenina rispetto a quelli di metil citosina, gli enzimi di restrizione sensibili alla metilazione sono DpnI e MboI che rilevano le metil adenine a livello del sito di restrizione *GATC*

Questo metodo come quello del bisolfito non sono adeguati per un'analisi globale dei siti di metilazione del genoma.

A Restriction digestion

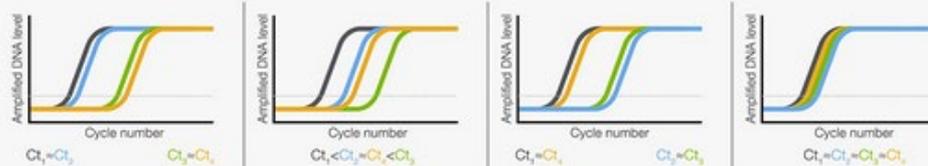


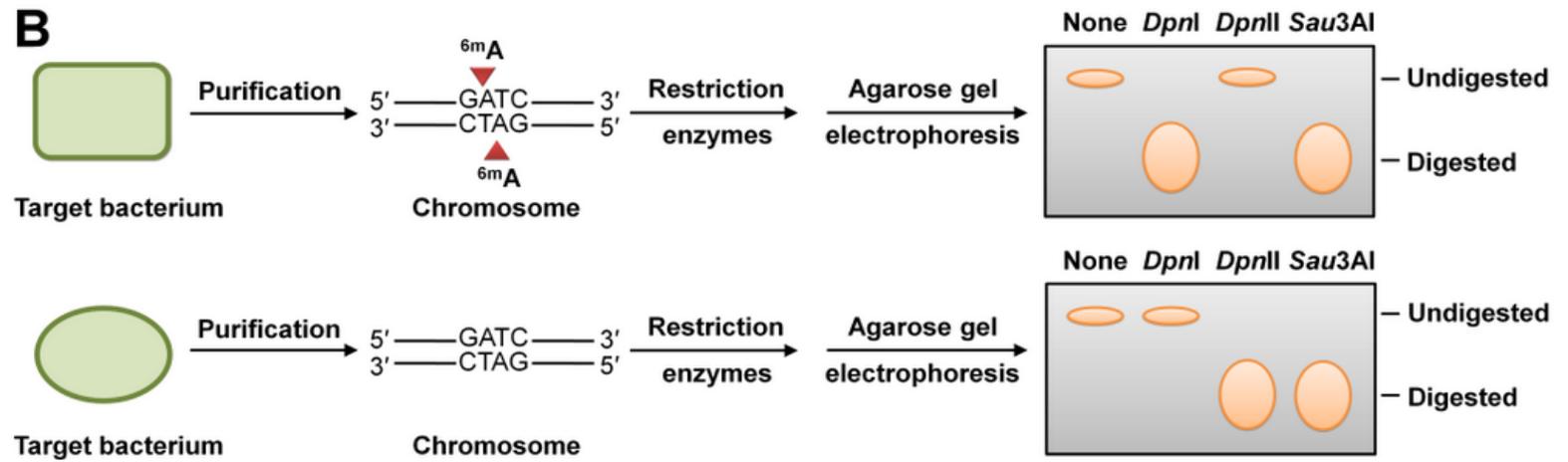
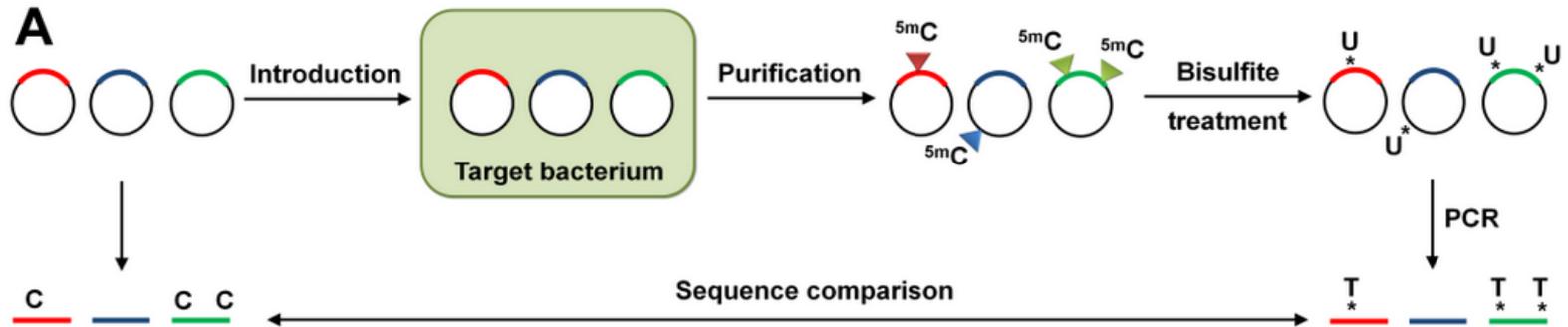
B Gel electrophoresis analysis



Digestion failure

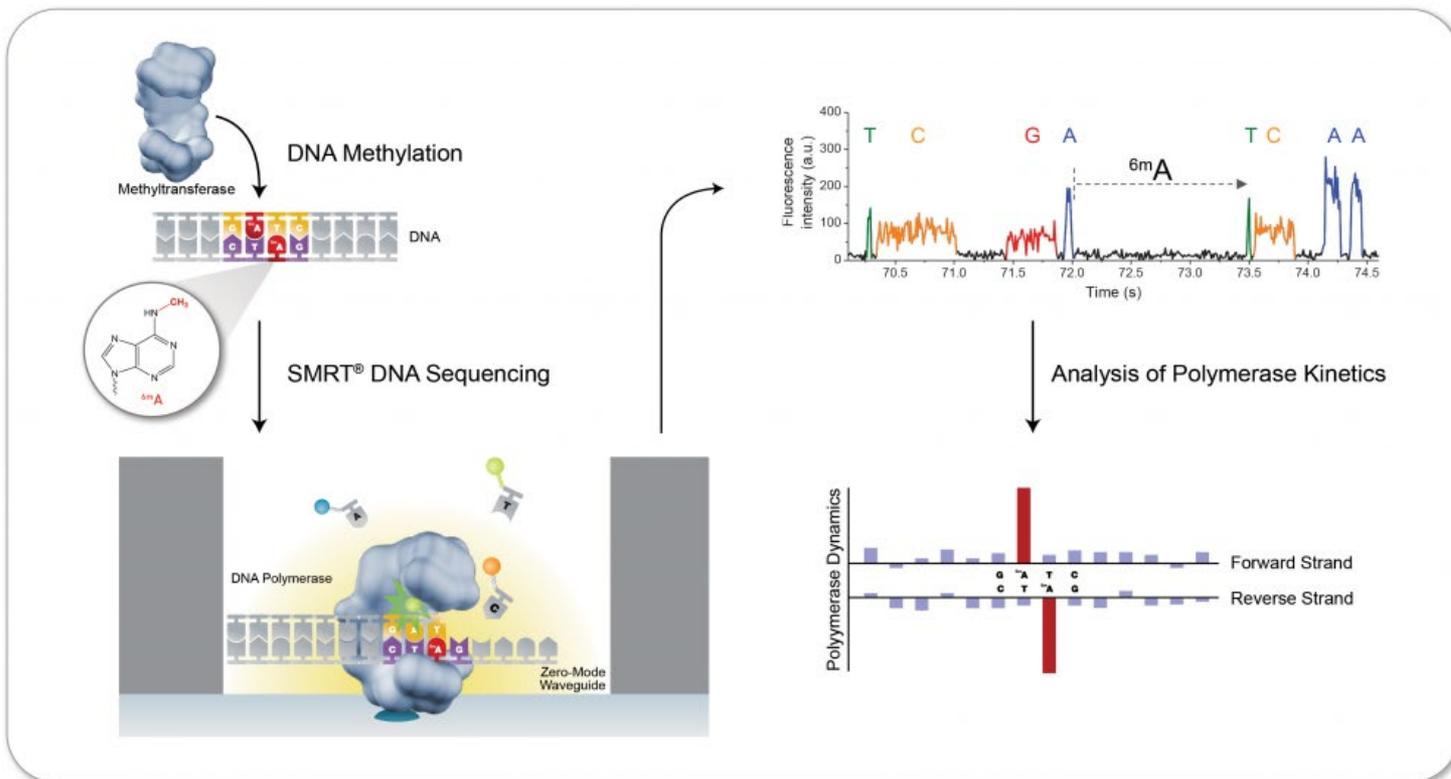
C Real-time PCR analysis





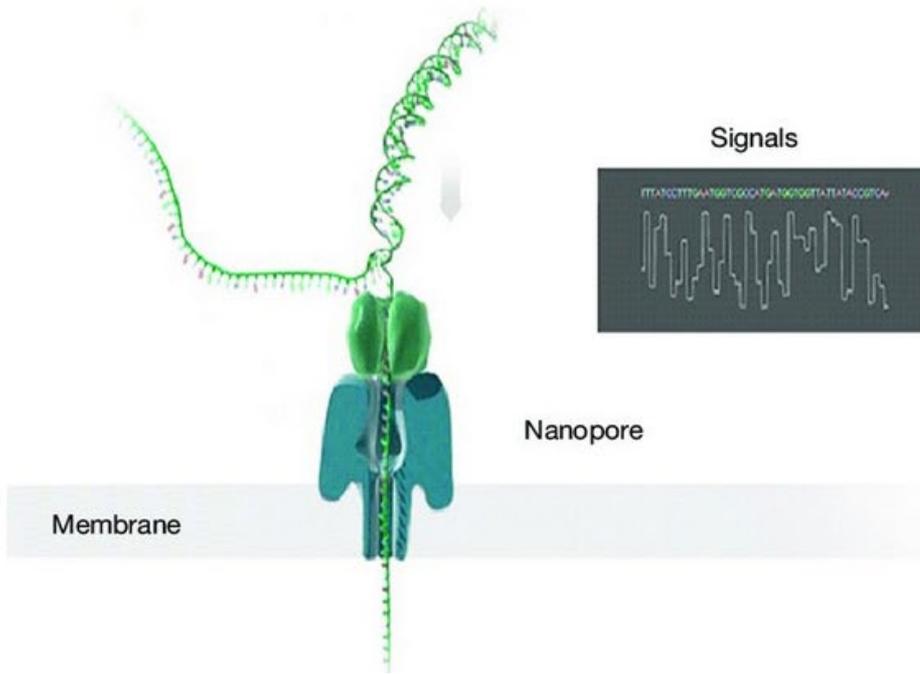
Methylation site analysis in target bacterium. (A) Bisulfite-based analysis to determine 5mC consensus sites. Bisulfite treatment converts methyl-free cytosine to uracil without affecting 5mC. Therefore, 5mC positions can be determined by comparing bisulfite-treated and -untreated DNA sequences. (B) Chromosomal digestion by methyl-sensitive restriction enzymes is used to analyze 5'-G6mATC-3' methylation. The restriction enzyme DpnI cuts 5'-G6mATC-3' but not 5'-GATC-3', DpnII cuts 5'-GATC-3' but not 5'-G6mATC-3', and Sau3AI cuts 5'-GATC-3' and 5'-G6mATC-3'

Sequenziamento Single molecule real Time SMRT per il rilevamento di metilcitosine e metiladenine nei genomi integrali di qualsiasi tipo di organismo



Monitoraggio l'attività di singole molecole di DNA polimerasi mentre sintetizzano i filamenti di DNA complementari. Prende in considerazione due parametri: l'ampiezza dell'impulso luminoso e la durata dell'intervallo di tempo tra la registrazione di due impulsi diversi. La durata è più lunga quando il template contiene una base metilata. Inoltre i segnali sono diversi e permettono distinguere C o N metilcitosina e la N metil adenina

I) The Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) has been used for years, mostly in eukaryotes. In this approach, unmethylated cytosines are converted into uracils by the bisulfite treatment. After sequencing (usually short-read Illumina sequencing) and alignment, m5C can then be identified ([Carless, 2009](#)). This tool which is specific to the detection of m5C has found scarce application for the bacterial methylome analysis so far ([Kahramanoglou et al., 2012](#)). (II) The possibility to use the long-range method SMRT sequencing (for Single Molecule Real Time) to detect DNA methylation at a genomic scale was described in 2010 ([Flusberg et al., 2010](#); [Cloney, 2016](#)). This technology makes use of a DNA polymerase sensitive to base modifications. Upon recognition of a modified base on the ssDNA matrix, a delay in polymerization is generated during the recording of the DNA sequence (InterPulse Duration or IPD). While it can easily detect m4C and m6A, this technology has strong limitations to detect m5C (requires a substantial coverage rate). Therefore, performing both WGBS and SMRT sequencing can allow to determine an exhaustive methylome, something rarely done ([Payelleville et al., 2018](#); [Vandenbussche et al., 2021](#)). (III) More recently, another long-range sequencing method, the Oxford Nanopore technology (ONT), was shown to efficiently detect modified bases. While ssDNA crosses nanopores embedded in a lipid membrane, a voltage potential is applied. Analysis of the electrolytic current signals, which are sensitive to base modifications, reveals both the DNA sequence and the methylation state of the DNA matrix ([Rand et al., 2017](#); [Simpson et al., 2017](#)). The earliest studies using ONT were focused on m5C detection of CpG islands, found in some eukaryotes ([Laszlo et al., 2013](#)), but various bioinformatic models have been developed since to increase the accuracy of other DNA methylation predictions. In certain DNA motifs, such models are now able to detect m5C and m6A using a low read coverage (as low as twofold) ([Ni et al., 2019](#)) with a significant precision on *E. coli* data ([Liu et al., 2019](#)). Recently, the methylomes of eight microbial reference species have been validated using various methods, including ONT sequencing for m6A detection ([McIntyre et al., 2019](#)).



Figure

Caption

Figure 3 Nanopore sequencing and current signals (Image adapted from Oxford Nanopore Technologies website).

This figure was uploaded by [Wenhao Zhou](#)

Content may be subject to copyright.

While ssDNA crosses nanopores embedded in a lipid membrane, a voltage potential is applied. Analysis of the electrolytic current signals, which are sensitive to base modifications, reveals both the DNA sequence and the methylation state of the DNA matrix

La variazione di fase come esempio di epigenetica mediato dai pattern di metilazione

La variazione di fase è un fenomeno diffuso nei batteri che determina la generazione reversibile di varianti di antigeni di superficie.

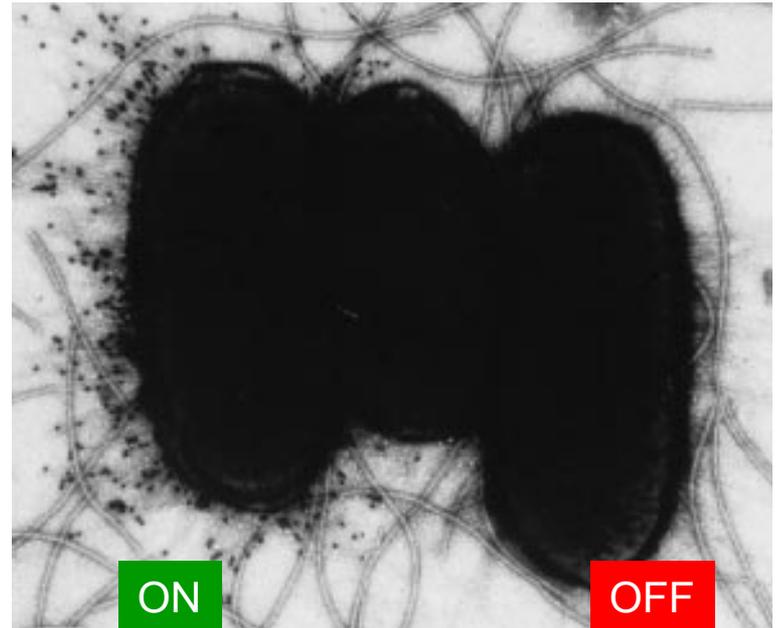
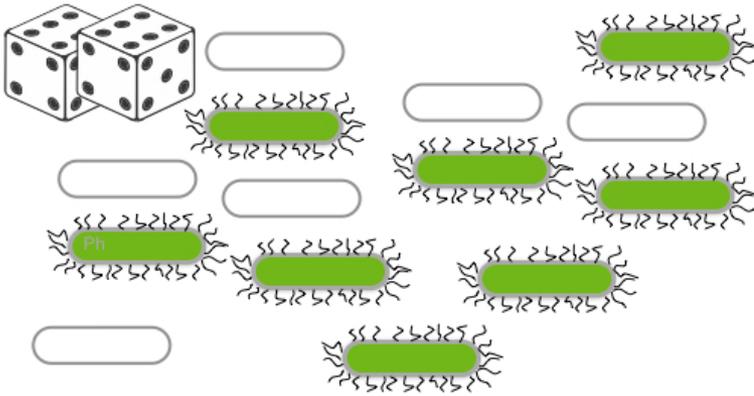


FIG. 1. Pap phase variation in uropathogenic *E. coli*. Pap17 pilus phase variation of uropathogenic *E. coli* strain C1212 was visualized with anti-Pap17 antibodies labeled with 10-nm colloidal gold particles. The bacterium at the left is in the ON-phase state for Pap17 expression, whereas the two bacteria at the right are in the OFF phase. Note

I pili di tipo Pap (Pylonephritis-Associated pili) degli *E. coli* uropatogeni mediano l'adesione all'epitelio del tratto intestinale.

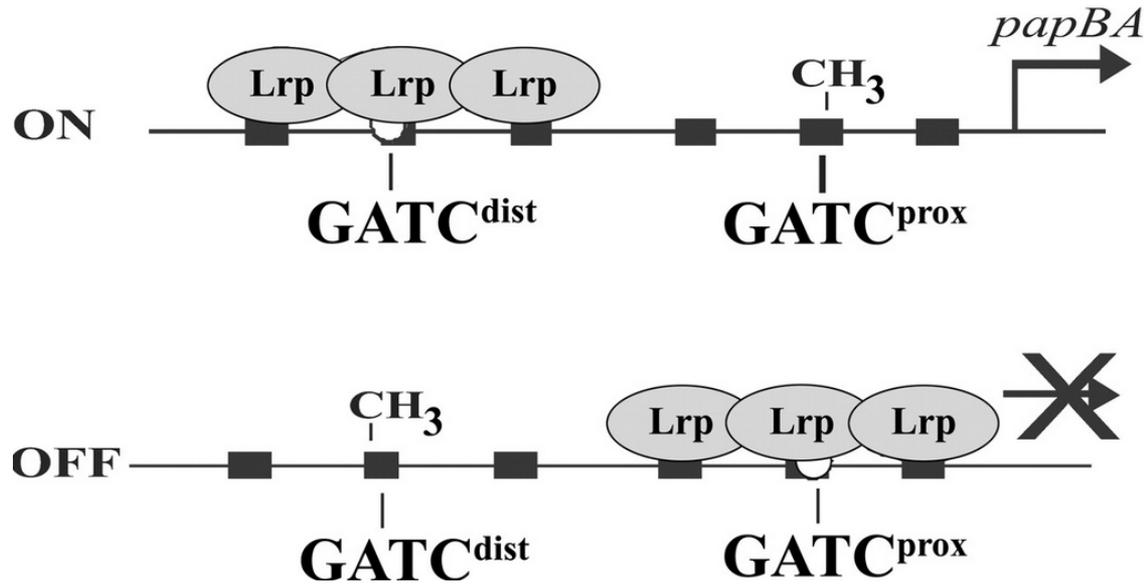
La sintesi dei pili PAP è attivata o meno da un meccanismo che fa sì che le cellule possano sintetizzare o meno i pili PAP.

Lo switch ON verso OFF è 100 volte più efficiente di quello OFF verso ON



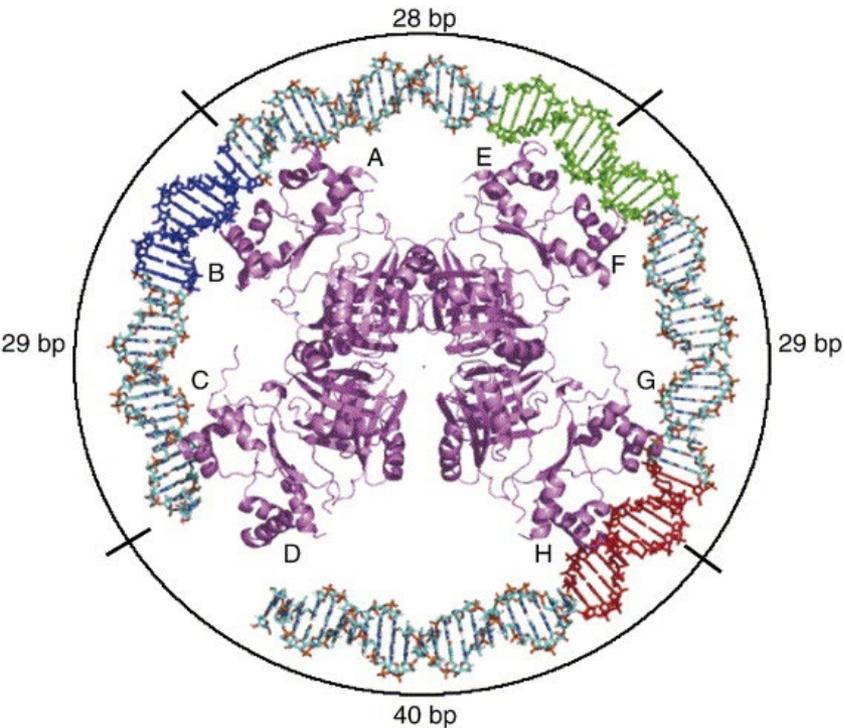
Quindi alcune cellule saranno in grado di produrre i PAP pili mentre altre no all'interno della medesima popolazione

Il sistema *pap* è costituito da due operoni divergenti che contengono nella regione regolatrice 6 siti di legame per la proteina regolatrice Lrp.



Un ruolo cruciale nella switch tra ON e OFF dei pap pili viene svolto dalla proteina LRP, considerata una delle proteine associate al nucleotide (NAP)

Lrp Leucine responsive regulatory protein



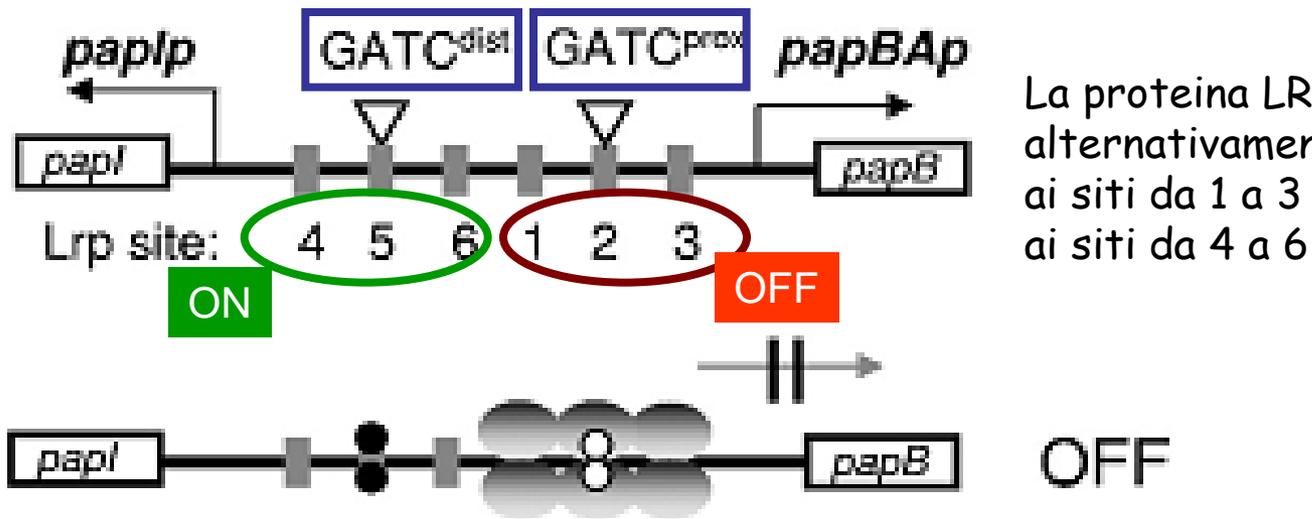
Ottamero di LRP

influenza la trascrizione del 10% dei geni di *E. coli* e a seconda del target il suo effetto può essere potenziato o meno dalla presenza di leucina.

I geni regolati comprendono geni coinvolti nell'acquisizione e metabolismo degli AA oltre a geni di virulenza quali quelli coinvolti nella sintesi di alcuni pili.

Lrp riconosce una sequenza consenso degenerata sul DNA e modifica la struttura del DNA con il suo legame.

Esiste in diversi stati oligomeric, dimero, ottamero o esadecamero.

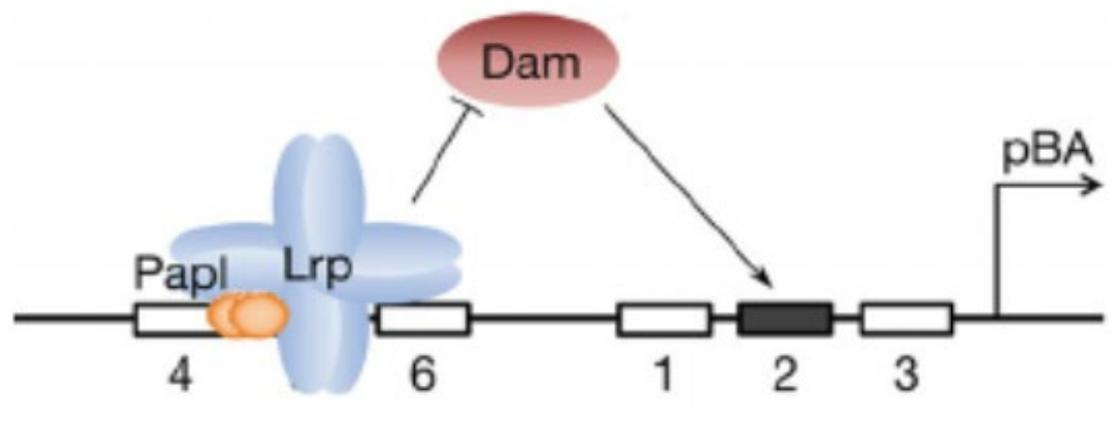
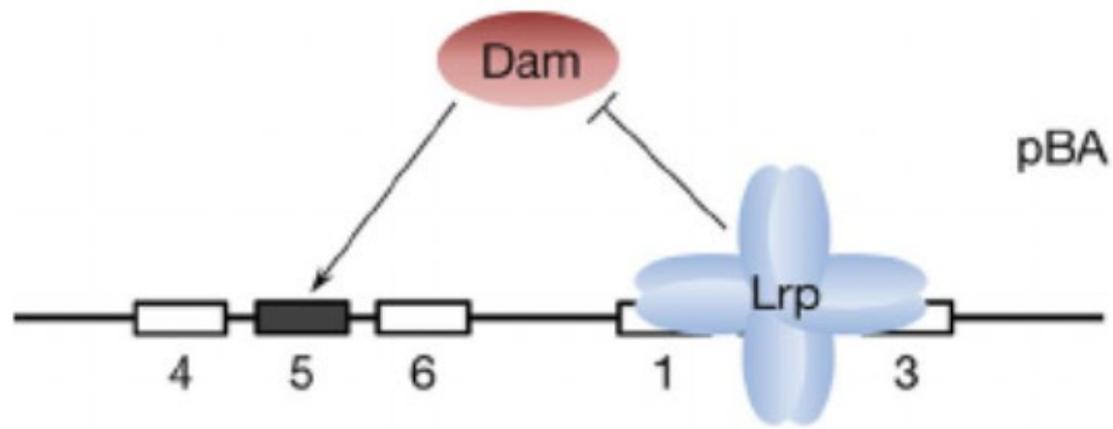


Due siti *GATC* per la Dam metilasi localizzati nell'operone *pap* sono responsabili della variazione di fase dei pili di tipo Pap (pyelonephritis associated pili).

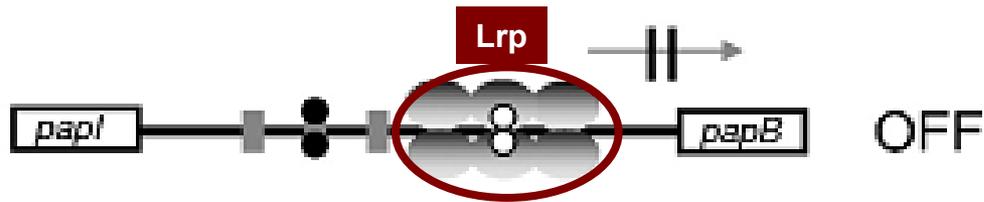
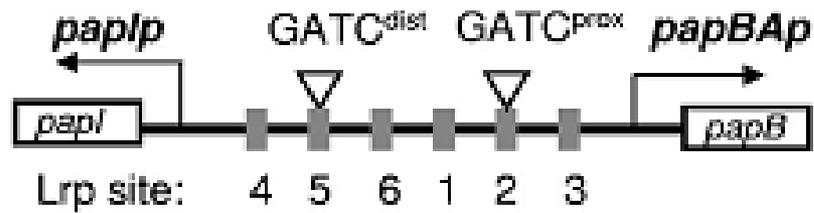
Lo switch ON/OFF è determinato dalla capacità o meno della proteina regolatrice LRP (Leucine-response regulatory protein) di legarsi all'interno della regione regolatrice *pap*.

Lrp è preminentemente un tetramero di dimeri (ottamero) con 3 dimeri di LRP che si legano a 3 siti *pap* (1-3 o 4-6) lasciando un dimero non legato.

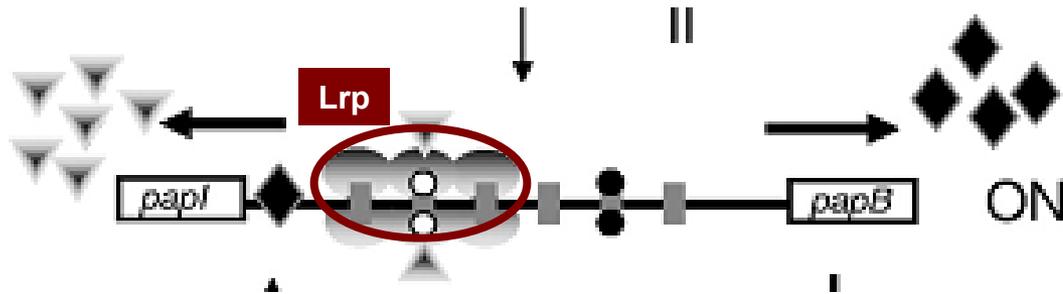
I 2 siti *GATC* sono presente - all'interno del sito 2 (*GATC prox*)
 - all'interno del sito 5 (*GATC dix*)



Lo switch OFF/ON

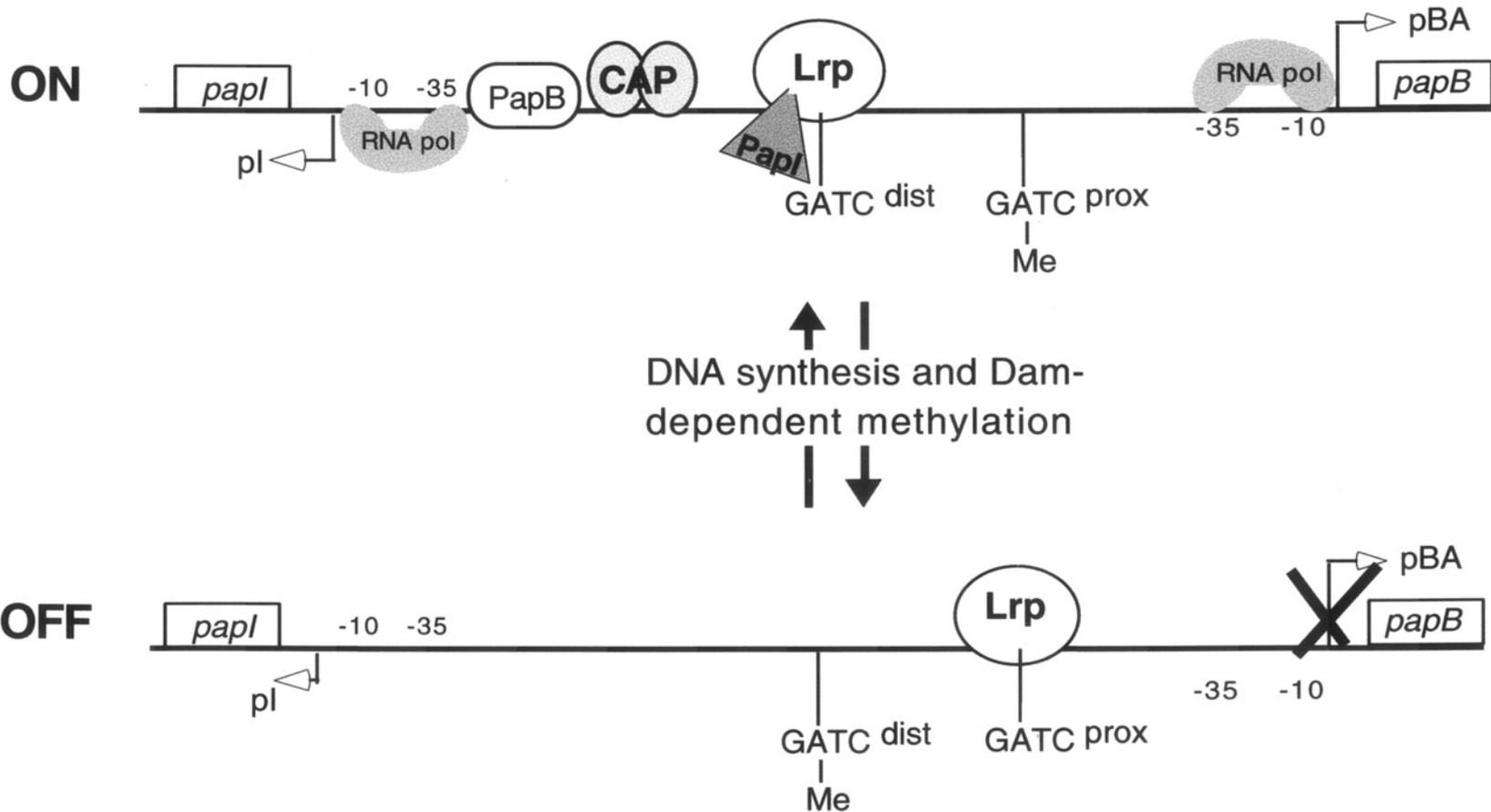


Il legame di LRP ai siti 1-3 blocca la metilazione di *GATC^{prox}* e anche la trascrizione dell'operone *pap* perché il sito di riconoscimento della RNA polimerasi è in questa regione.

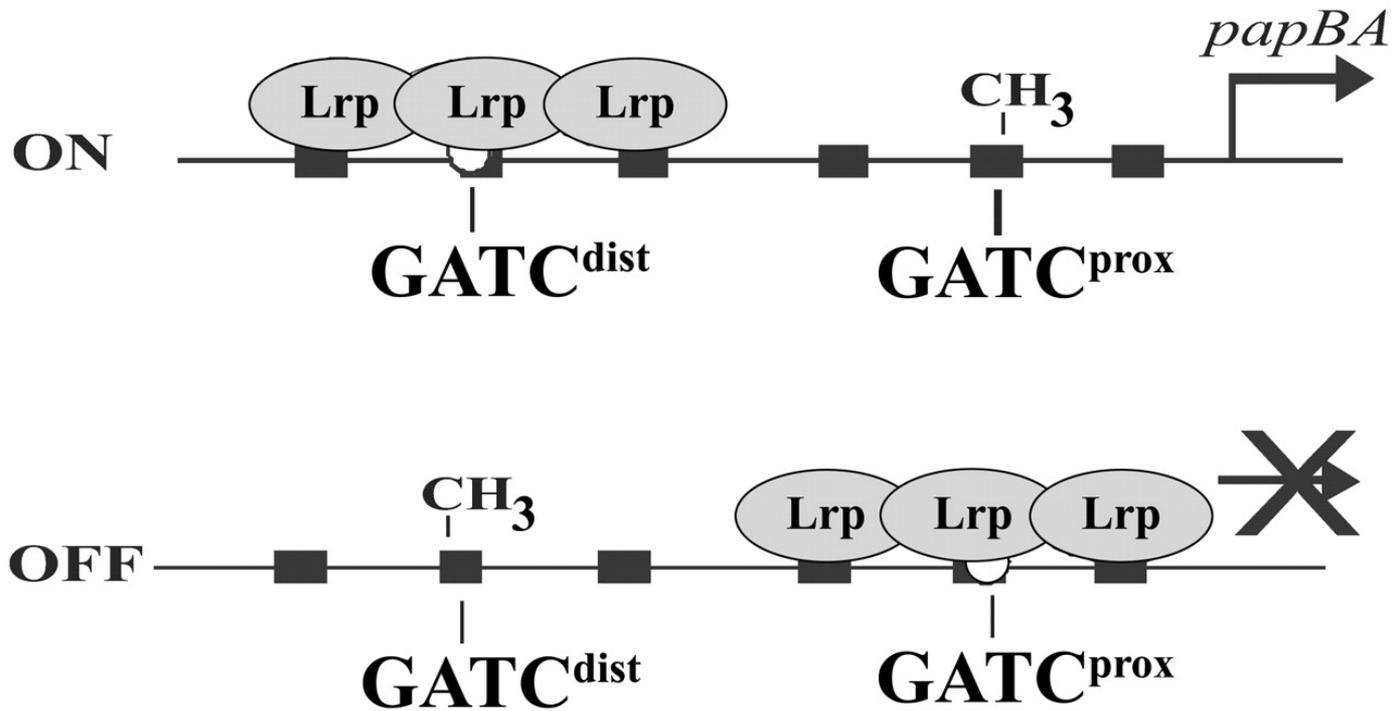


Se invece LRP si lega ai siti 4-6 blocca la metilazione di *GATC^{dist}* e facilita la trascrizione degli operoni *pap*.

Il ruolo di Lrp come regolatore quando si lega al sito distale è quello di indurre curvatura nel DNA facilitando il legame di CAP alla subunità α della RNA polymerase



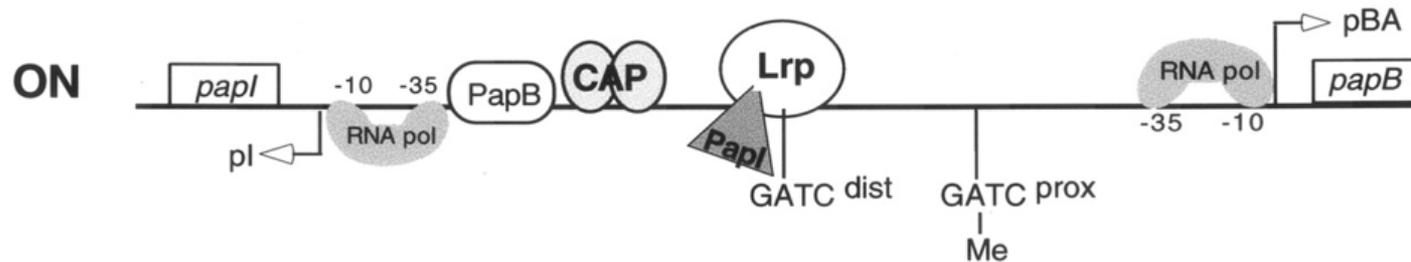
Cambiamento nello stato di metilazione tra ON e OFF



Oltre alla proteina LRP nella regolazione entrano in gioco altre 2 proteine

Pap I che aumenta l'affinità di LRP per il sito 2 e 5

PapB che si lega vicino al gene *papI* per favorirne la trascrizione.



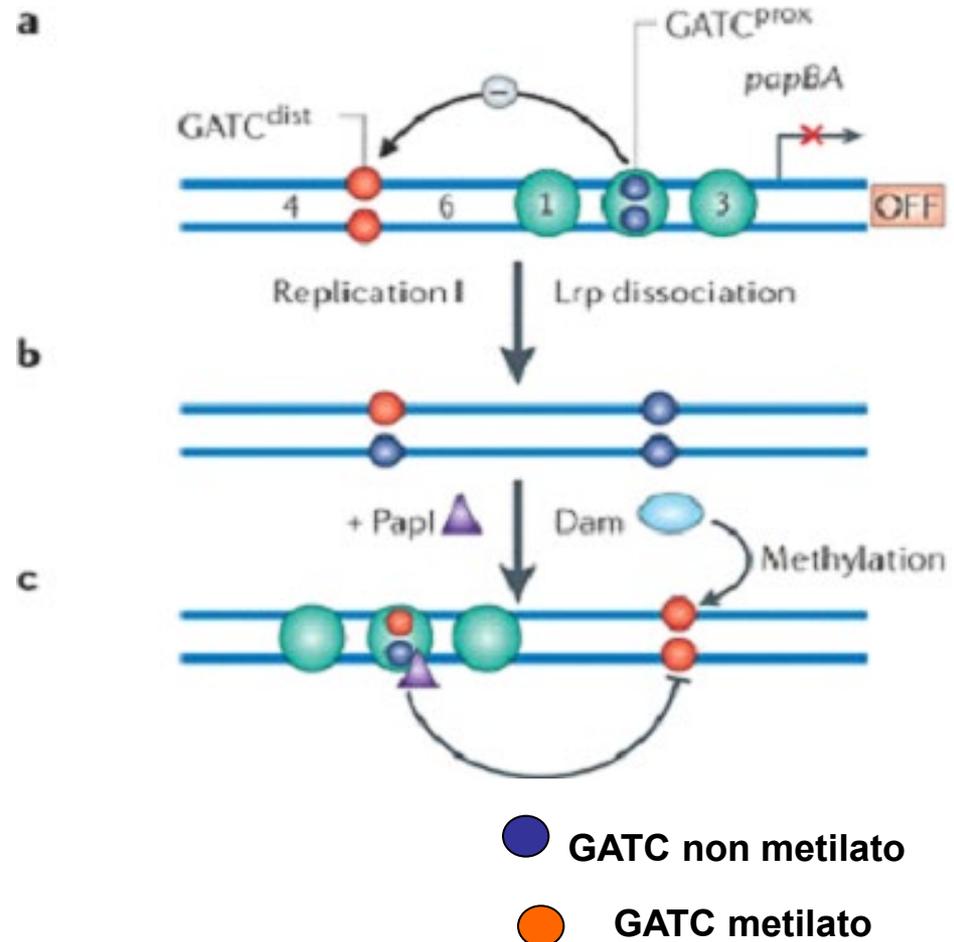
La metilazione nello stato OFF

Nello stato OFF Lrp si lega cooperativamente e con alta affinità ai siti 1,2,e 3 e previene la RNA polimerasi dal legarsi e trascrivere l'operone *papBA*.

Il legame di Lrp ai siti 1-3 reduce l'affinità di LRP per i siti 4,5,6.

A causa del legame di Lrp ai siti 1-3 , la metilazione della molecola di DNA nascente dopo il passaggio della forza di replicazione è prevenuta e la sequenza $GATC^{prox}$ diviene non metilata dopo due turni di replicazione.

In contrasto il $GATC^{dist}$ che è localizzato nel sito 5 libero da LRP può subire il normale ciclo di emimetilazione/metilazione



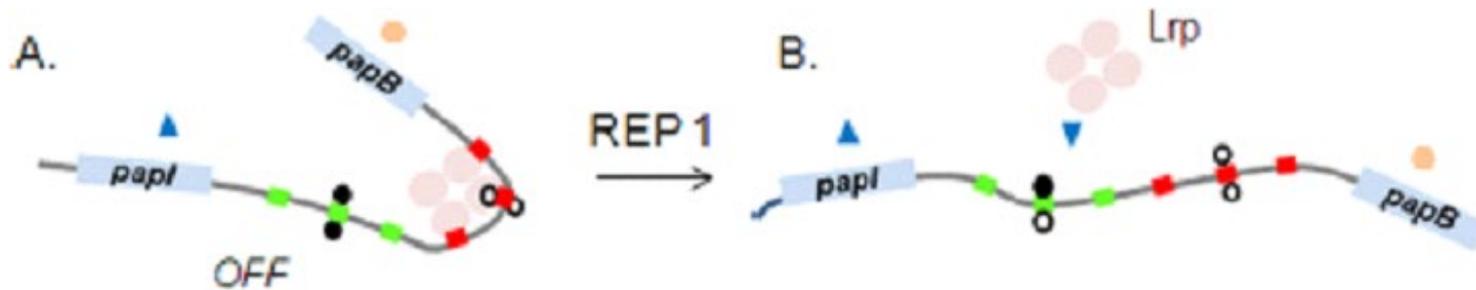
L' affinità di Lrp per il sito $GATC^{prox}$ e la sua incapacità a legarsi al sito $GATC^{dist}$ metilato creano un circuito che mantiene lo stato OFF.

Quindi la non metilazione di $GATC^{prox}$ e la metilazione del $GATC^{dist}$ sono le caratteristiche dello stato OFF

Per il passaggio allo stato ON Lrp deve essere traslocata ai siti 4-6.

La traslocazione richiede la proteina PapI che aumenta l'affinità di Lrp sia per i siti 4-6 (che per i siti 1-3) probabilmente legandosi ad una sequenza contenente $GATC$ all'interno di questa regione

Transizione da OFF a ON



Per questo sono necessarie due proteine regolatrici PapI e PapB

PapI aumenta l'affinità di LRP per i siti 2 e 5 grazie ad una sequenza ACGATC presente all'interno di questi due siti.

PapB che è prodotto dal primo gene dell'operone *pap* si lega vicino a *papI* e attiva la trascrizione di *papI* formando così un'ansa positiva di regolazione.

La metilazione di **GATC**^{prox} è richiesta per la transizione da OFF a ON perché se il sito **GATC**^{prox} è metilato diminuisce l'affinità di Lrp/PapI al sito 2 aumentando la probabilità che Lrp/PapI si leghino ai siti 4-6 iniziando così la trascrizione delle fase ON

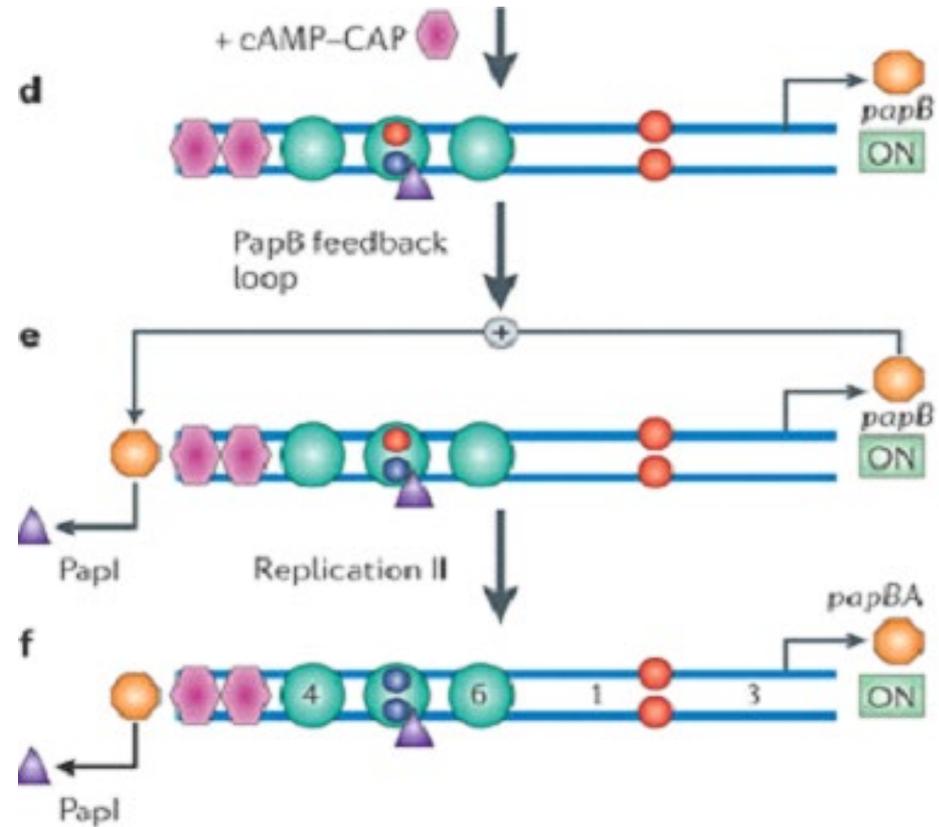
La metilazione nello stato ON

L'affinità di Lrp/PapI per i siti 4-6 è molto più elevata di quanto lo sia per i siti 1-3 e questo tende a muovere il complesso Lrp/PapI verso i siti 4-6 a bassa concentrazione di PapI.

La metilazione del sito *GATC*^{prox} inibisce il legame di Lrp/PapI facilitando lo spostamento di Lrp ai siti 4-6.

Quindi

la nonmetilazione del sito *GATC*^{dist} e la metilazione del sito *GATC*^{prox} sono le caratteristiche dello stato ON.

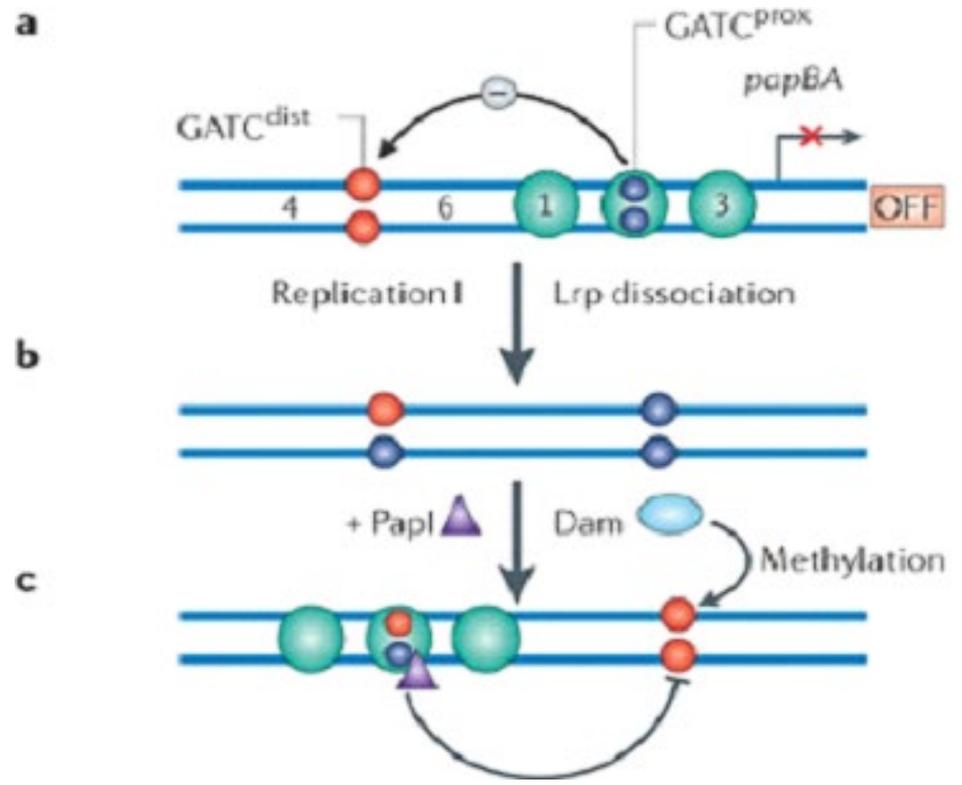


La proteina **PapB** attiva la trascrizione di *papI* (che legandosi a Lrp ne aumenta l'affinità ai siti 4-6) creando un'ansa di feedback positiva che mantiene lo stato ON

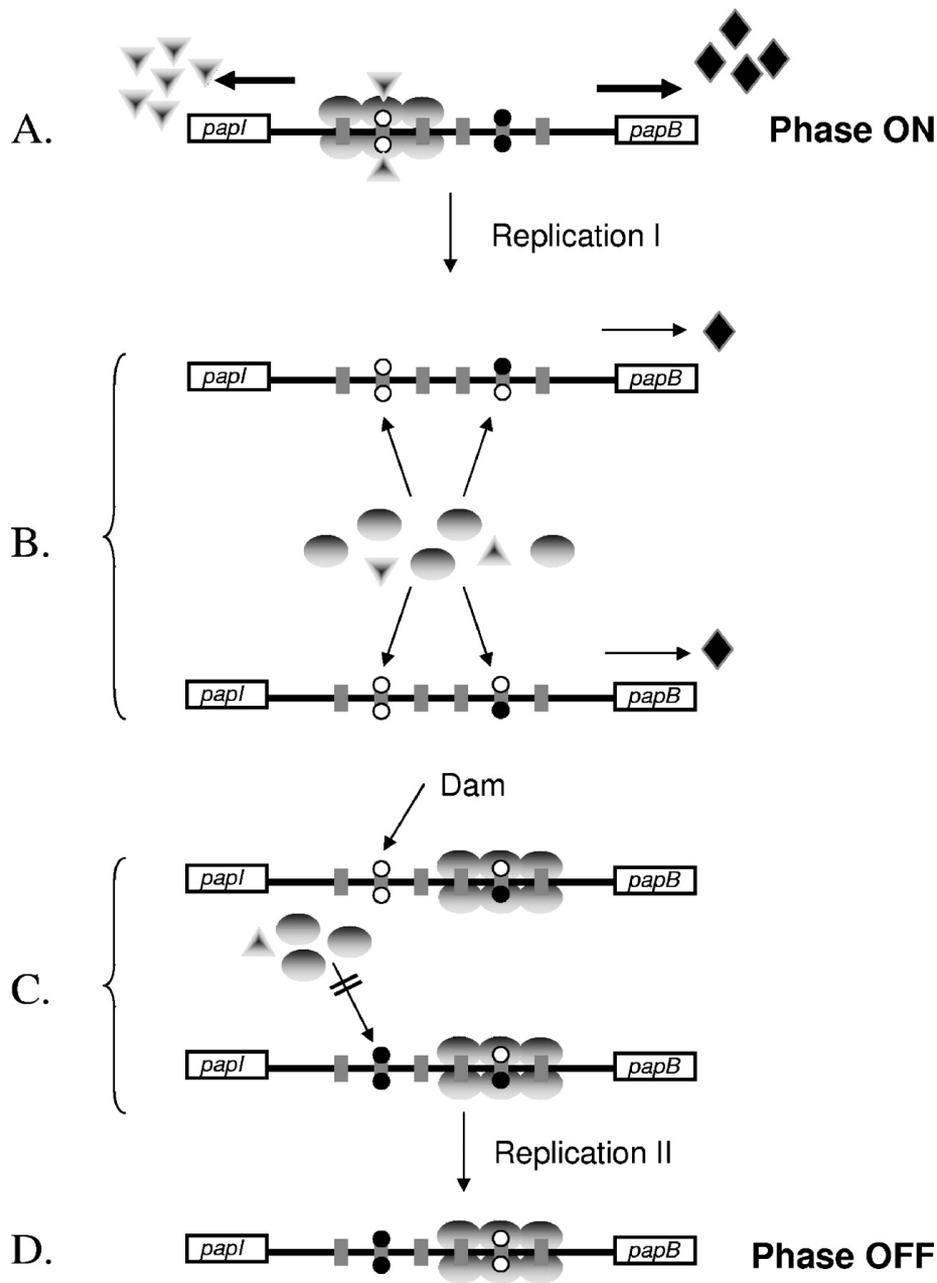
Per la transizione da OFF a ON è richiesta la metilazione del sito $GATC^{prox}$ perché questo diminuisce l'affinità di Pap/Lrp per il sito 2 aumentando quindi la probabilità che il complesso si sposti verso i siti 4-6 e possa dar inizio alla trascrizione.

Perché questo avvenga LRP che è legata ai siti 1-3 si deve dissociare permettendo alla Dam metilasi di metilare il sito $GATC^{prox}$.

Al momento della replicazione si viene a generare un sito $GATC^{dist}$ emimetilato.



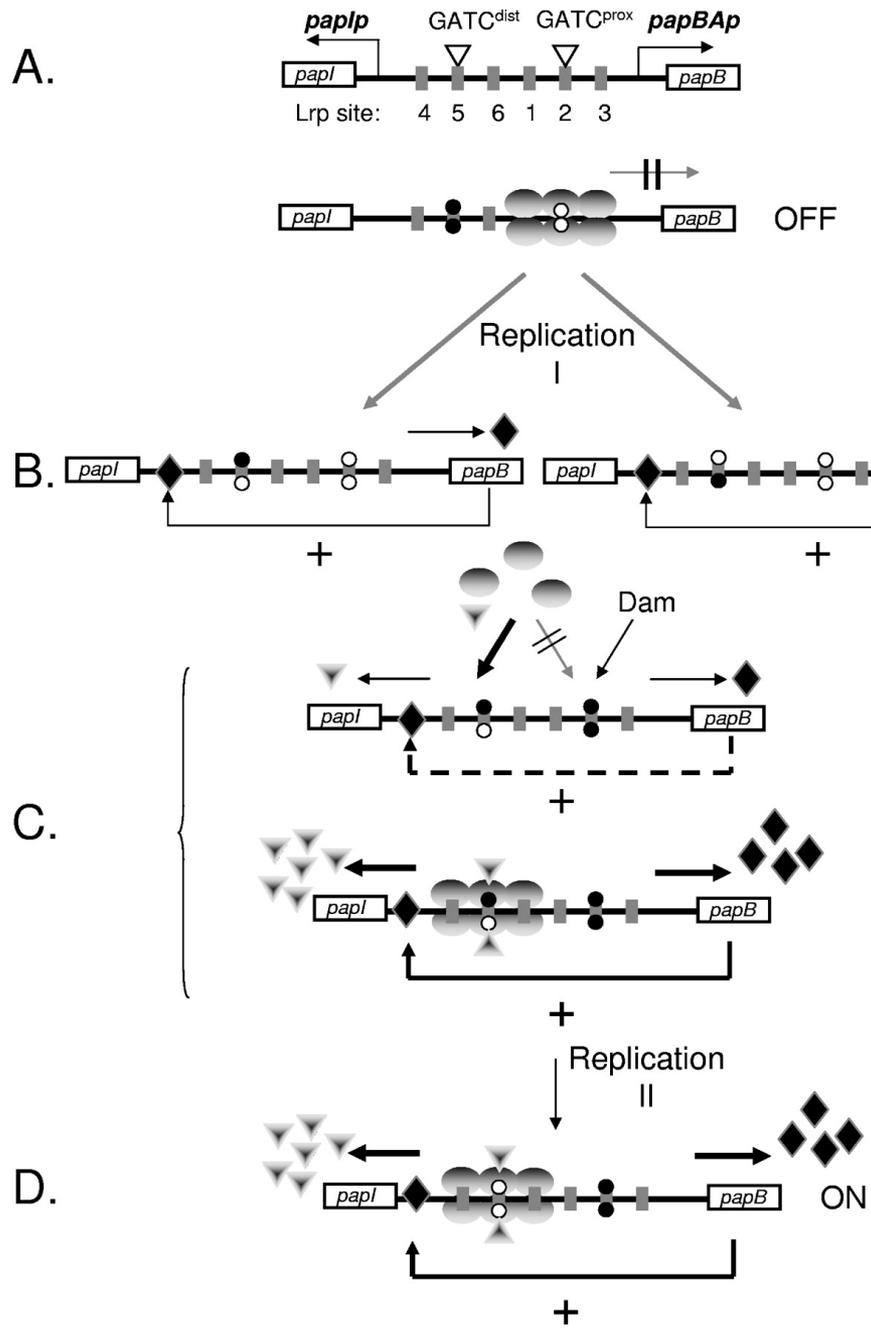
L'affinità di LRP /Pap per i siti 4-6 emimetilati è molto più elevata. Se Lrp /Pap riesce a legarsi ai siti 4-6 prima che la Dam metilasi li metili potrà attivare la transizione alla fase ON. Questa transizione dipende anche dalla dissociazione di LRP dai siti 1-3 e dalla metilazione di $GATC^{prox}$.



Partendo da una cellula nello stato ON, la replicazione provoca la dissociazione del complesso Pap/Lrp dai siti 4-6 e quindi Dam può competere con Lrp/Pap per il legame al $GATC^{dist}$.

Se una cellula rimane nello stato ON o passa verso lo stato OFF dipende dalla capacità di Lrp di legarsi ai siti 1-3 o 4-6.

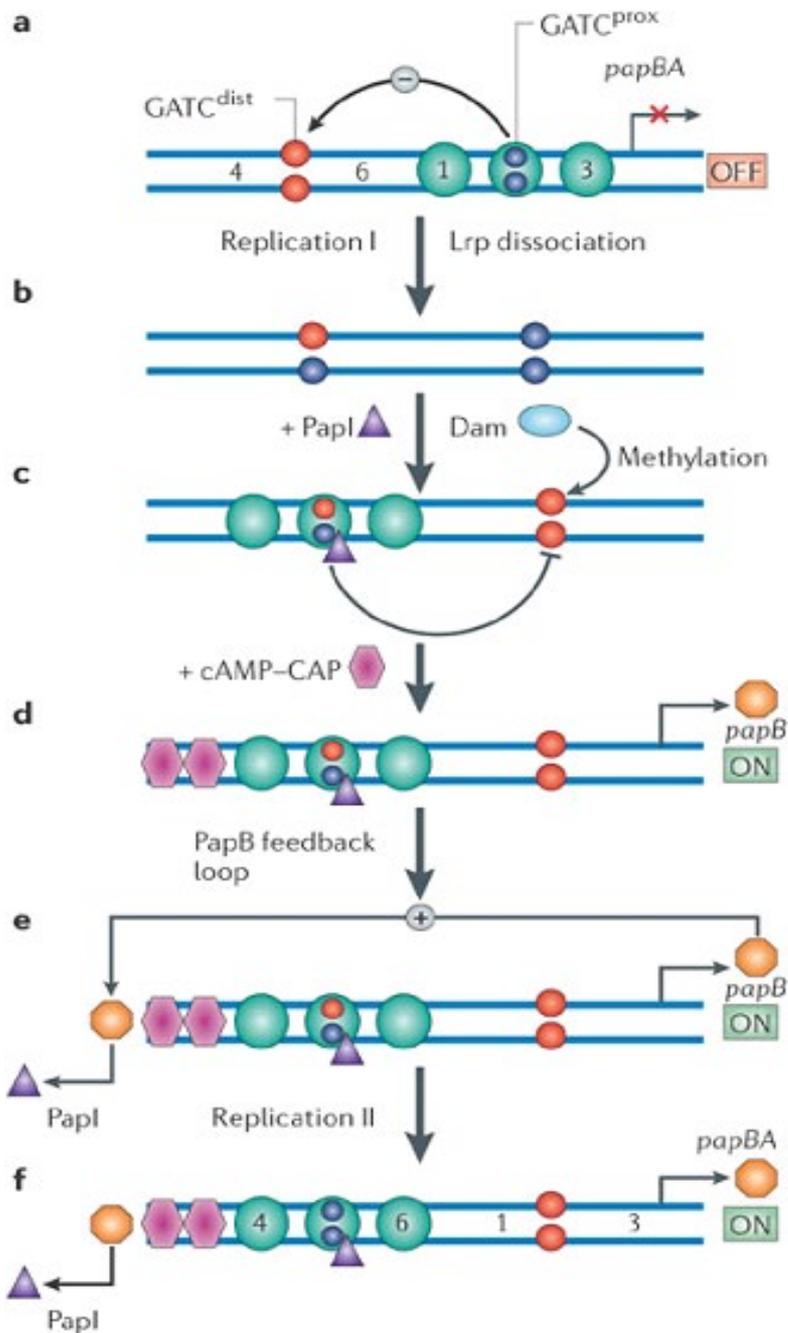
Lrp ha più affinità per i siti 1-3 che distali (4-6) ma soprattutto la metilazione nel sito $GATC^{dist}$ inibisce il legame del complesso Lrp/Pap. Questo spiega la maggiore percentuale di cellule nello stato OFF.



In seguito alla replicazione, le cellule in fase ON contengono un sito **GATC**^{dist} emimetilato e il sito **GATC**^{prox} metilato.

Se Dam metila il sito **GATC**^{dist}, il legame di LRP verrà inibito offrendo così un'opportunità per legarsi ai siti 1-3.

Formazione del pattern di metilazione necessario per l'instaurarsi della fase OFF richiede 2 turni di replicazione per convertire il sito pienamente metilato **GATC**^{prox} in un sito completamente NON METILATO.

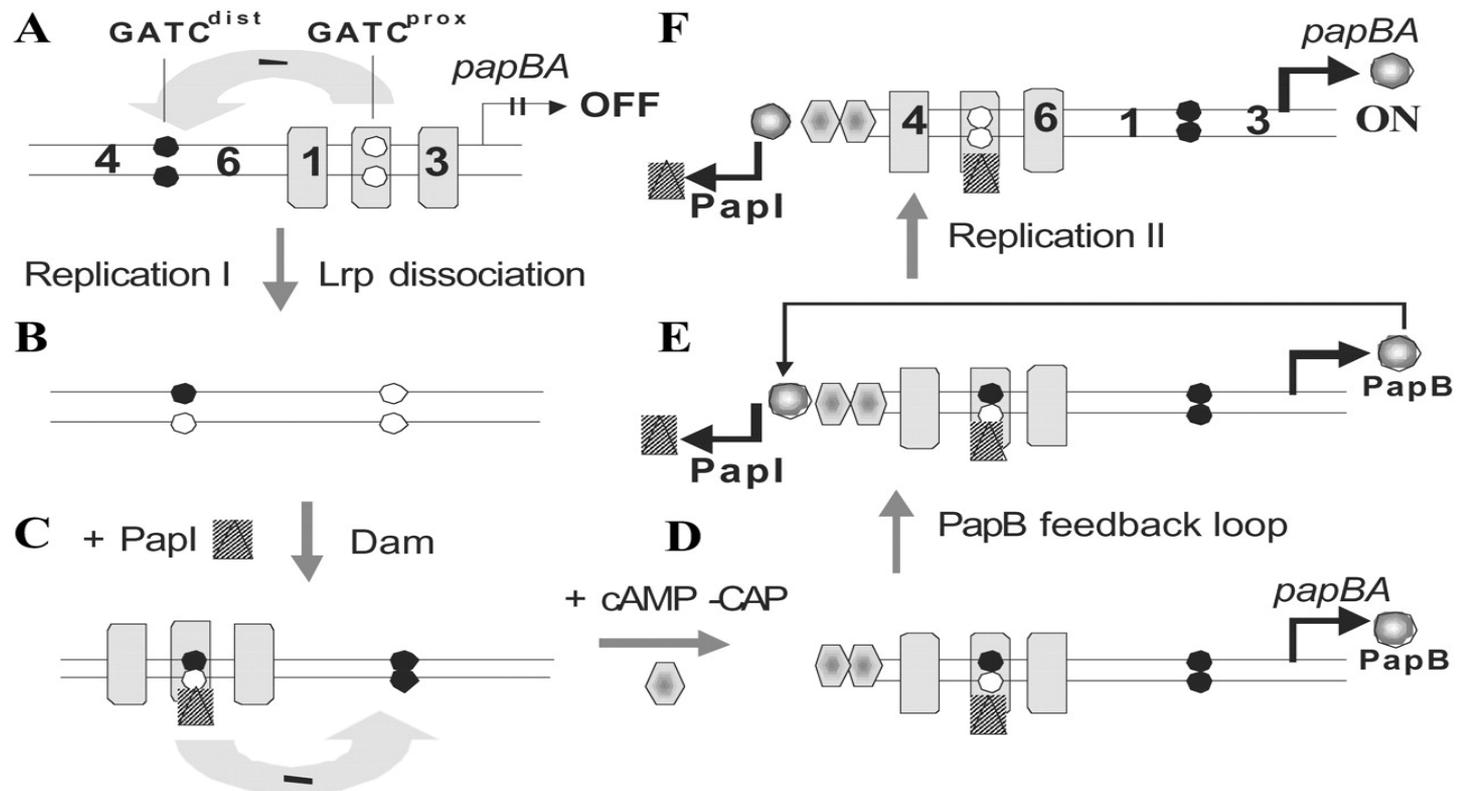


In the OFF state, Lrp (green oval) binds to sites 1–3 and prevents methylation of GATC^{prox}. Unmethylated GATCs are shown as blue circles, and methylated GATCs are shown as red circles. Binding of Lrp to sites 1–3 reduces the affinity of Lrp for sites 4–6. b | Every replication round offers an opportunity for switching if PapI becomes available. c | In the presence of PapI, Lrp translocates from sites 1–3 to sites 4–6. Lrp binding to GATC^{dist} prevents methylation of GATC^{dist} on the nascent DNA strand, while the unbound GATC^{prox} undergoes methylation. d | If the intracellular concentration of cAMP is high, the global regulator catabolite gene activator protein (CAP) activates *papB* transcription. e–f | PapB stimulates *papI* transcription, which creates a positive feedback loop that perpetuates the ON state.

Il meccanismo epigenetico di switch tra Pili in fase ON e OFF è complesso e coinvolge sia stati di Metilazione che legame di DNA binding protein. In ogni caso gli stati ON e OFF sono auto perpetuabili ed ereditabili

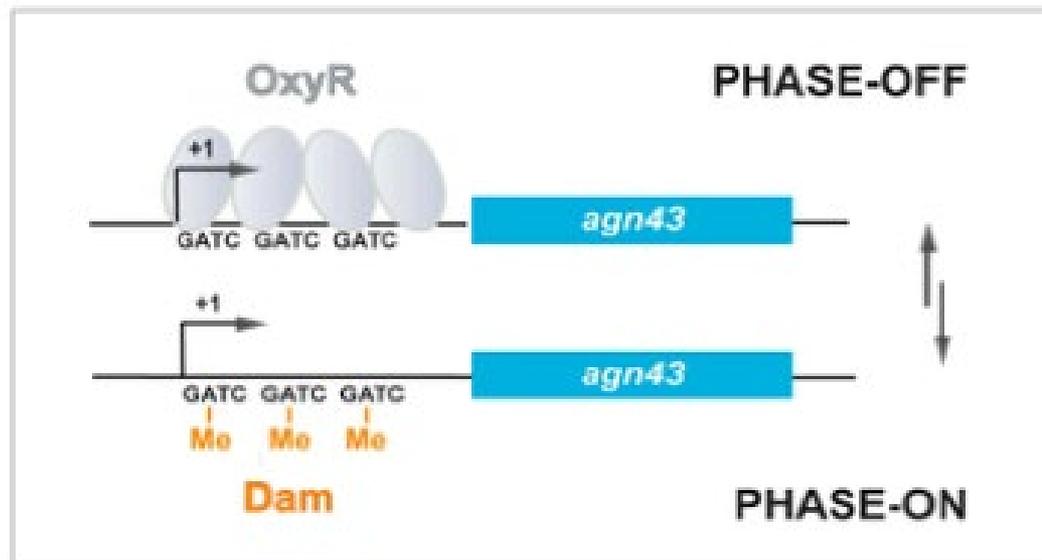
Nello stato OFF $GATC^{dist}$ è pienamente metilato e previene quindi il legame di Lrp/Pap ai siti 4-6

Nello stato ON l'espressione di PapI è elevata dovuta al feedback positivo di PapB e $GATC^{prox}$ è metilato inibendo così il legame di Pap/Lrp ai siti 1-3



La regolazione del gene *agn43*

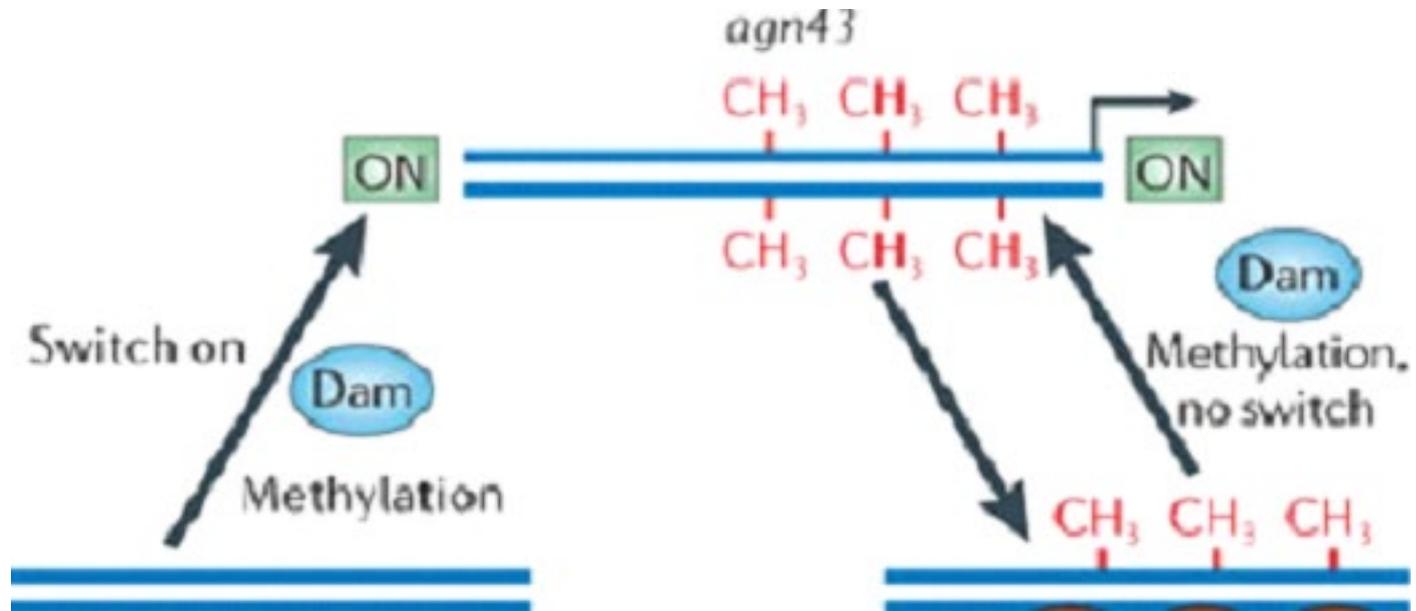
Gli stati ON e OFF del gene *agn43* sono caratterizzati da differenti *pattern* di metilazione che ne consentono o meno la trascrizione



Lo switch del sistema agn43

Altri sistemi di switch basati sulla metilazione utilizzano regolatori globali quali OxyR e Fur.

Un sistema ben caratterizzato è agn43 che controlla l'espressione dell'antigene 43, una proteina della membrana esterna coinvolta nella formazione di biofilm e nella patogenesi.



FASE ON

La metilazione dei 3 siti GATC localizzati all'interno della regione regolatrice di agn43 previene il legame del repressore OxyR permettendo la trascrizione :

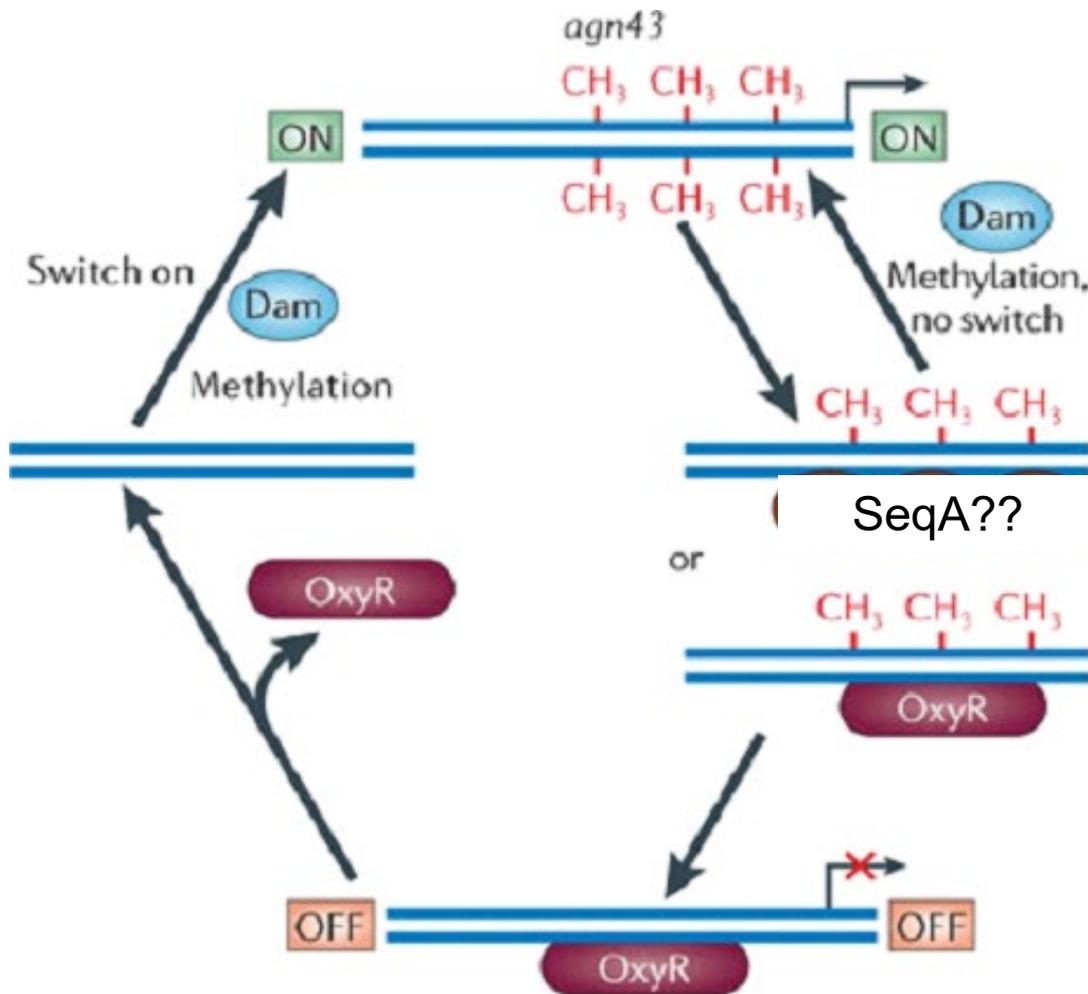


OxyR si lega a tre siti *GATC* nella regione regolatrice *agn43*. il legame di OxyR blocca la metilazione dei tre siti *GATC* e inibisce la trascrizione di *agn43* formando così la fase OFF.

La transizione alla fase ON avviene in seguito alla replicazione del DNA quando Dam può metilare su entrambe le eliche i 3 siti *GATC* prima che siano riconosciuti e legati da OxyR.

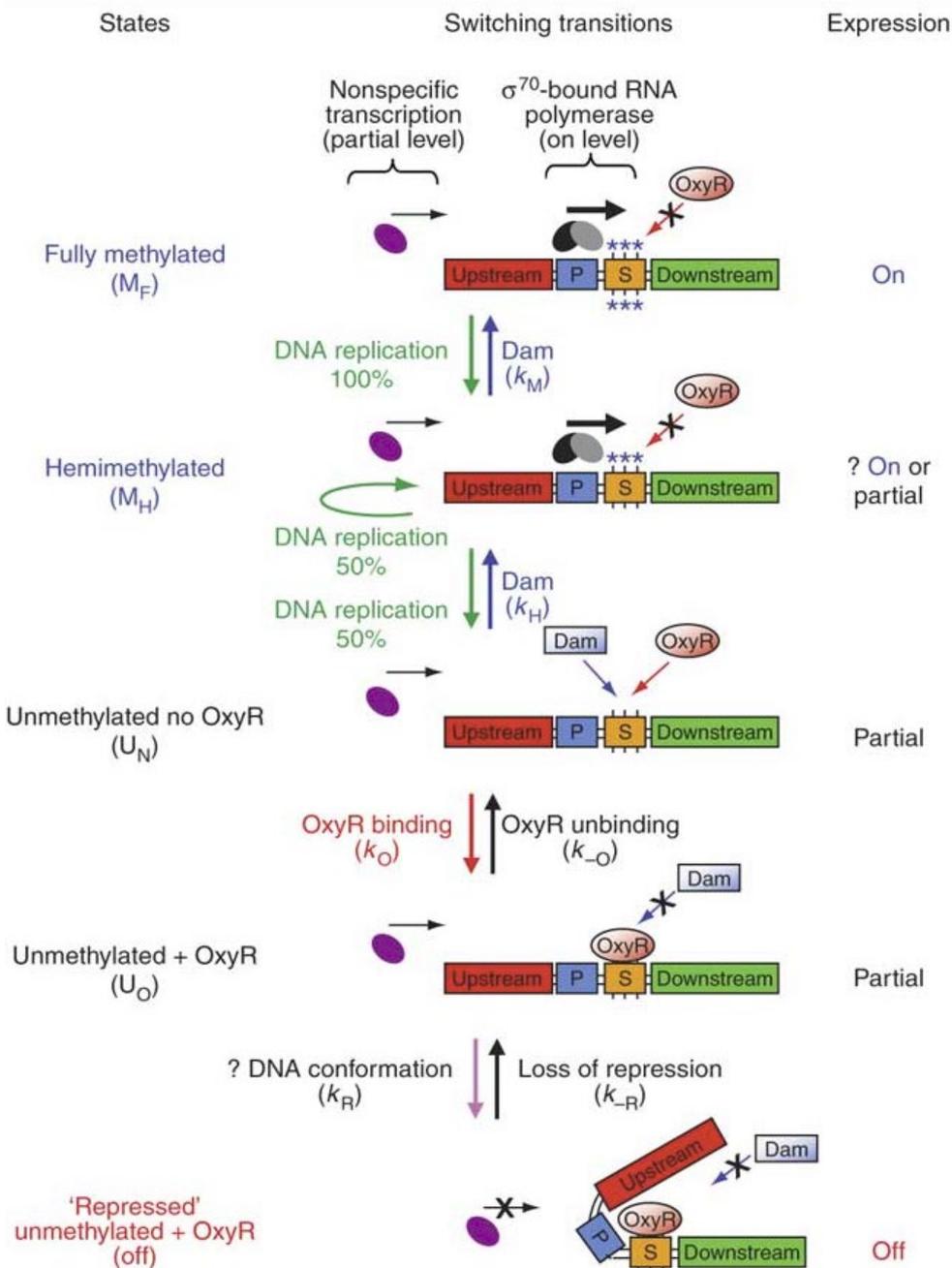
OxyR ha un'affinità più elevata per il promotore di *agn43* quando questo si trova in uno stato emimetilato rispetto a metilato.

La metilazione dei siti GATC previene il legame di OxyR e definisce lo stato ON.



Se OxyR si lega ai siti GATC prima che questi siano metilati dalla Dam metilasi si viene a creare una fase OFF intermedia e dopo un altro round di replicazione per convertire i siti emimetilati in non metilati si potrà avere la fase OFF.

La transizione ON-OFF è determinata dalla concentrazione di OxyR, infatti aggiungendo artificialmente dei siti per OxyR si ha il passaggio permanentemente ad una fase OFF.



Partial transcription arising from non-specific RNA polymerase activity is indicated by the purple ellipse. Transcription in the on state occurs from the promoter site containing the -35 and -10 sites for σ^{70} (black and gray ellipses) when the switch region is fully methylated (blue asterisks on both sides of the switch region). At DNA replication, the fully methylated switch region becomes hemimethylated (blue asterisks on an arbitrary side). The hemimethylated switch can block OxyR binding (less effectively than full DNA methylation); it is unknown whether this transient state has partial or on expression. The hemimethylated switch can be converted to the fully methylated state by Dam; if this does not occur, then half of the hemimethylated switch regions will become unmethylated (U_N state) at the next round of DNA replication. Dam and OxyR compete for binding to the unmethylated switch region. Binding of OxyR to the unmethylated switch region (U_O state) blocks Dam, thereby preventing DNA methylation. The U_O state can undergo a conformational change in DNA, resulting in the off state

Un punto essenziale di questo processo è l'affinità intermedia di OxyR per il DNA agn43 emimetilato

Immediatamente dopo la replicazione OxyR si dissocia dal DNA dal promotore di agn43 lasciando aperta una possibilità a Dam di competere con OxyR tenendo conto della diminuita affinità di OxyR per il DNA emimetilato.

La metilazione dei siti GATC può avvenire in un singolo step bloccando il legame di OxyR e permettendo l'espressione del gene agn43.

In modo analogo , l'emimetilazione può facilitare la transizione dallo stato ON allo stato OFF nel caso si leghi prima OxyR della Dam metilasi.

Dopo un ulteriore round di replicazione la situazione viene stabilizzata.

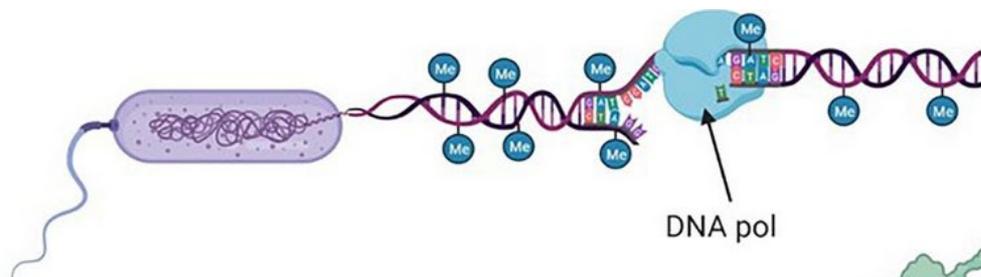
Non è chiaro qual siano i fattori che coadiuvano la transizione da uno stato all'altro ma la proteina SeqA potrebbe svolgere un ruolo.

SeqA infatti si lega alla regione regolatrice di agn43 emimetilata ma non quando è pienamente o per niente metilata. Nei mutanti SeqA la transizione OFF -ON è ridotta.

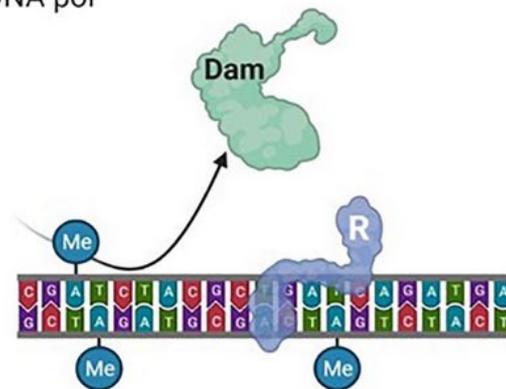
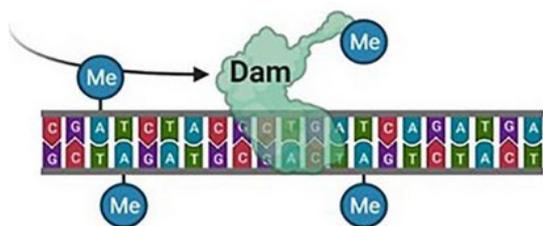
Omologie con il sistema pap e agn43:

- In entrambi i sistemi il legame di un regolatore globale alle regioni regolatrici blocca la metilazione dei siti GATC e influenza direttamente la trascrizione.
- Lo stato di metilazione viene trasmesso generando sottopopolazioni distinte all'interno della stessa popolazione batterica.

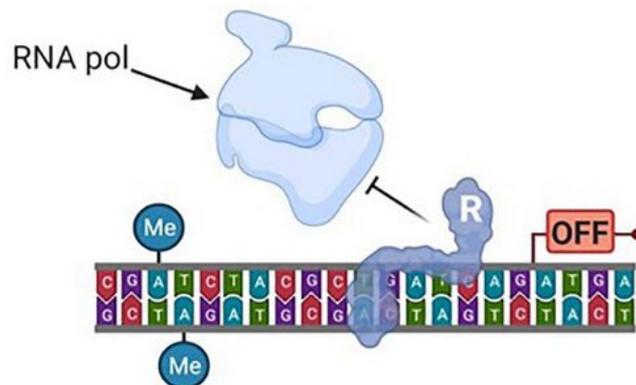
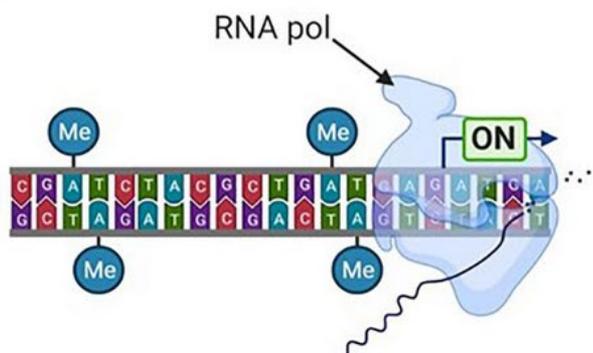
A



B



C

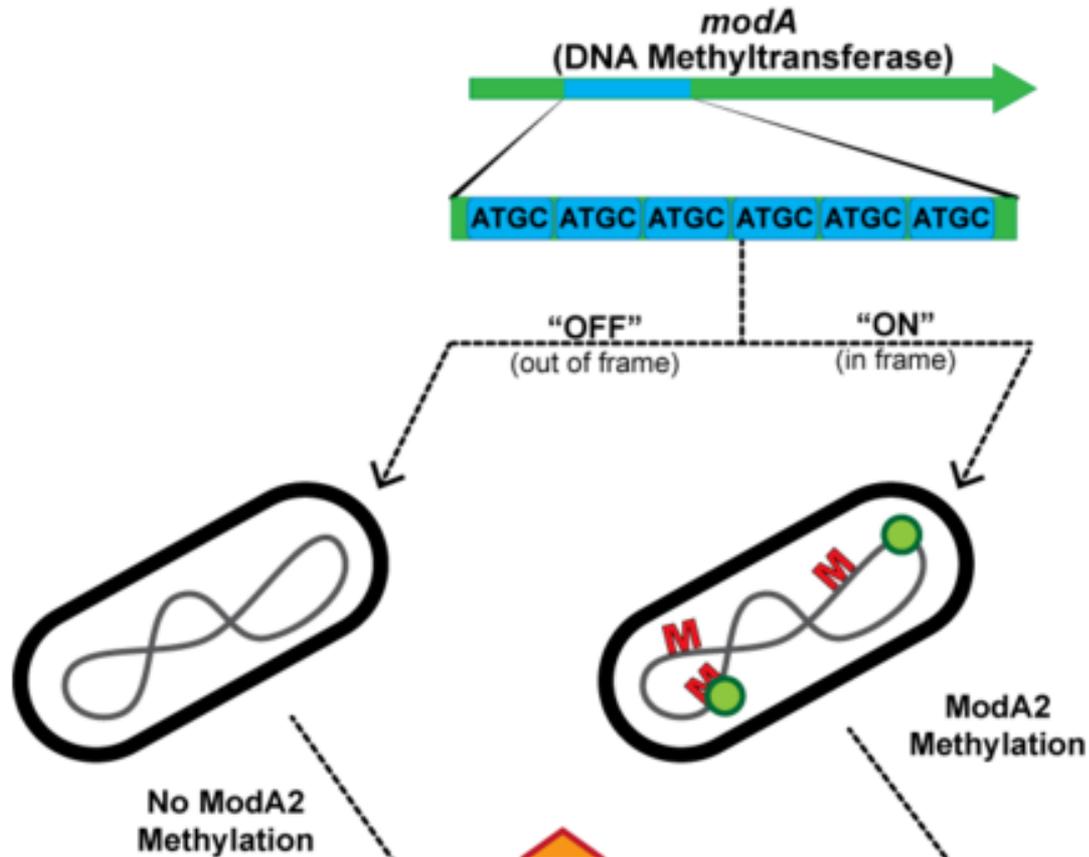


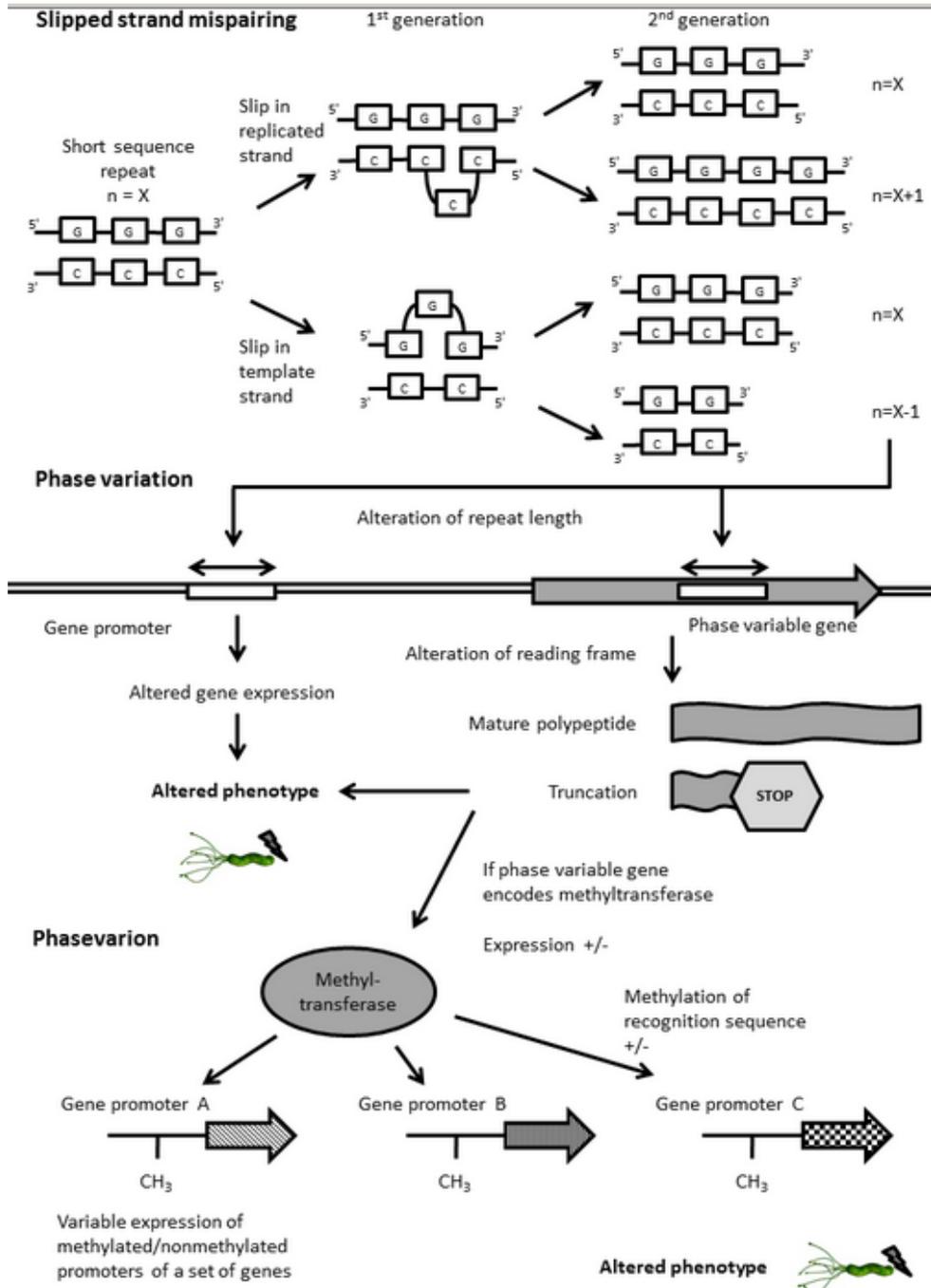
D

	Gene
	<i>pap</i>
	<i>agn43</i> <i>opvAB</i>
	<i>std</i>
	<i>sci1</i>

Transcription can depend on the DNA-methylation pattern. **(A)** The bacterial genome is usually broadly methylated. It is transiently hemimethylated after DNA-replication. **(B)** DNA-Methyltransferases methylate DNA on particular motifs. Here an Adenine in GATC motif is being methylated by Dam (left), unless a transcriptional regulator (R) hinders its access to the motif (right). After a second replication step, the DNA can become unmethylated. **(C)** Transcription is initiated by the RNA-polymerase (left) unless a transcriptional regulator is bound in the promoter region (right). **(D)** Examples (detailed in the text) of transcriptional regulators sensitive to DNA methylation.

Phasevarion (Phase Variable Regulon)





Phasevarion: formazione di linee epigenetiche dovute alla variazione di fase della sintesi delle DNA metilasi.

Alcuni sistemi di restrizione e modificazione mostrano variazione di fase. Il passaggio dallo stato ON e OFF dipende dall'espansione o contrazione di sequenze ripetute.

La variazione di fase dei sistemi di restrizione e modificazione può generare delle sottopopolazioni di cellule batteriche che differiscono nella sensibilità ai fagi o nella capacità di acquisire DNA esogeno.

Phasevarion: gli enzimi Mod

I sistemi di metilazione (dell'adenina) di alcuni sistemi di modificazione/restrizione fase-variabili sono detti PHASEVARION in quanto oltre a conservare la loro attività di restrizione/modificazione hanno capacità di regolazione di tipo epigenetico.

In alcuni PHASEVARION il gene che codifica per l'enzima di restrizione è mutato mentre il gene di modificazione (Mod) rimane attivo funzionando come un metiltransferasi.

In alcuni batteri patogeni quali *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis/gonorrhoeae*, et al. il processo di metilazione dell'adenina mediato dagli enzimi Mod regola l'espressione di alcuni geni che sono coinvolti nella sintesi di strutture di superficie o di fattori di virulenza.

Se la sintesi degli enzimi Mod è fase variabile si verranno a creare due tipi di popolazioni: una popolazione conterrà l'enzima Mod (N6 metiladenina) un'altra ne sarà priva.

In conseguenza della presenza o meno dell'enzima Mod si avranno o meno pattern di metilazione con conseguente espressione differenziale di alcuni geni.

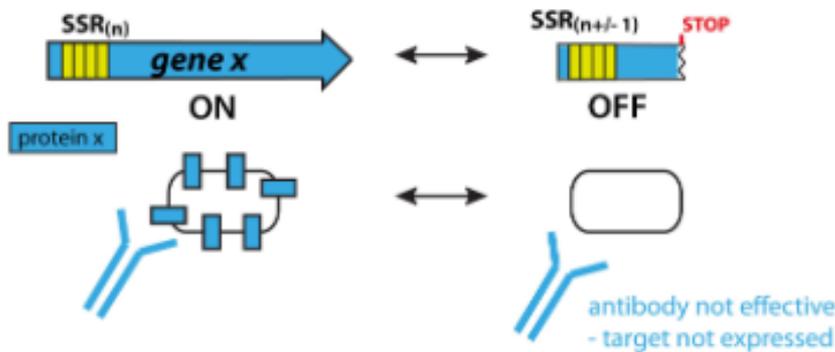
A differenza del sistema *pap* o del sistema *agn43* dove l'eterogeneità che viene generata dal pattern di metilazione riguarda 1 singolo tratto fenotipico i cambiamenti indotti dai PHASEVARION riguardano più tratti fenotipici.

Se si considera che alcune specie possono contenere più di un sistema Mod di tipo Phasevarion , il cambiamento di fase indipendente dei singoli può generare grande eterogeneità

La frequenza di variazione di fase dipende dal numero di repeats per gene.

Per esempio in *H. influenzae*, la variazione di fase del gene *modA* avviene ad una frequenza di $4-7 \times 10^6$ mutazioni per divisione per repeat

A
Phase variable outer membrane protein Altered *expression* of a **single** protein



B
Phasevarion Altered *expression* of **multiple** proteins due to epigenetic regulation

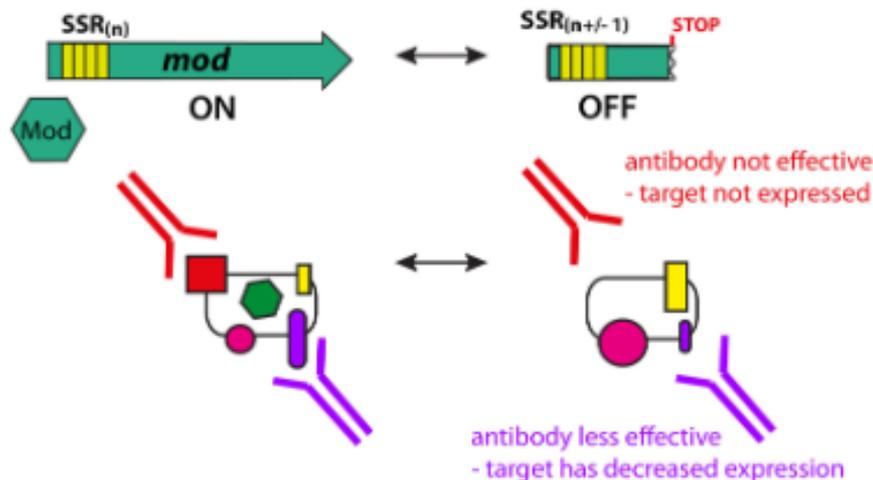
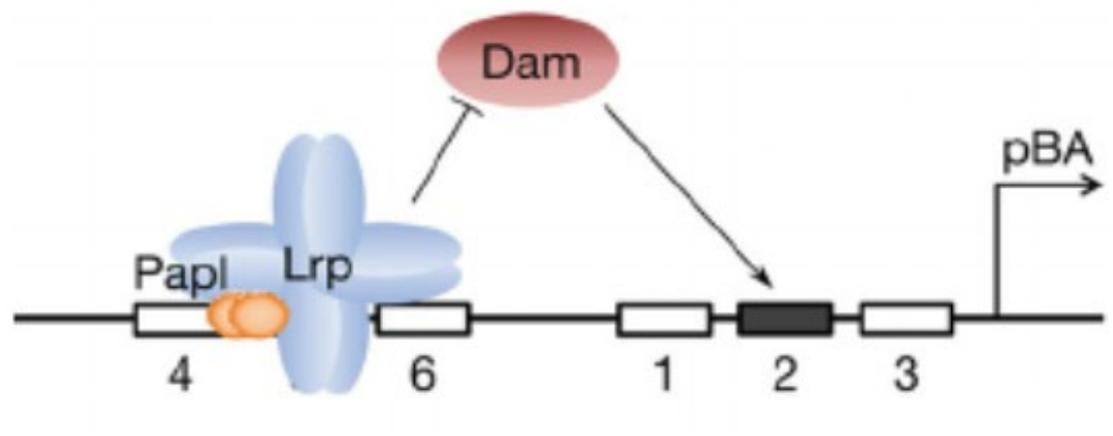
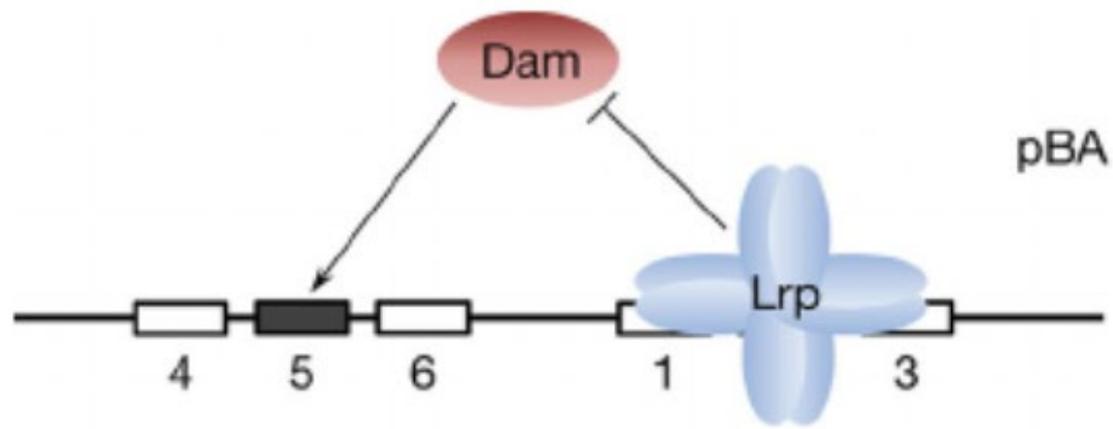
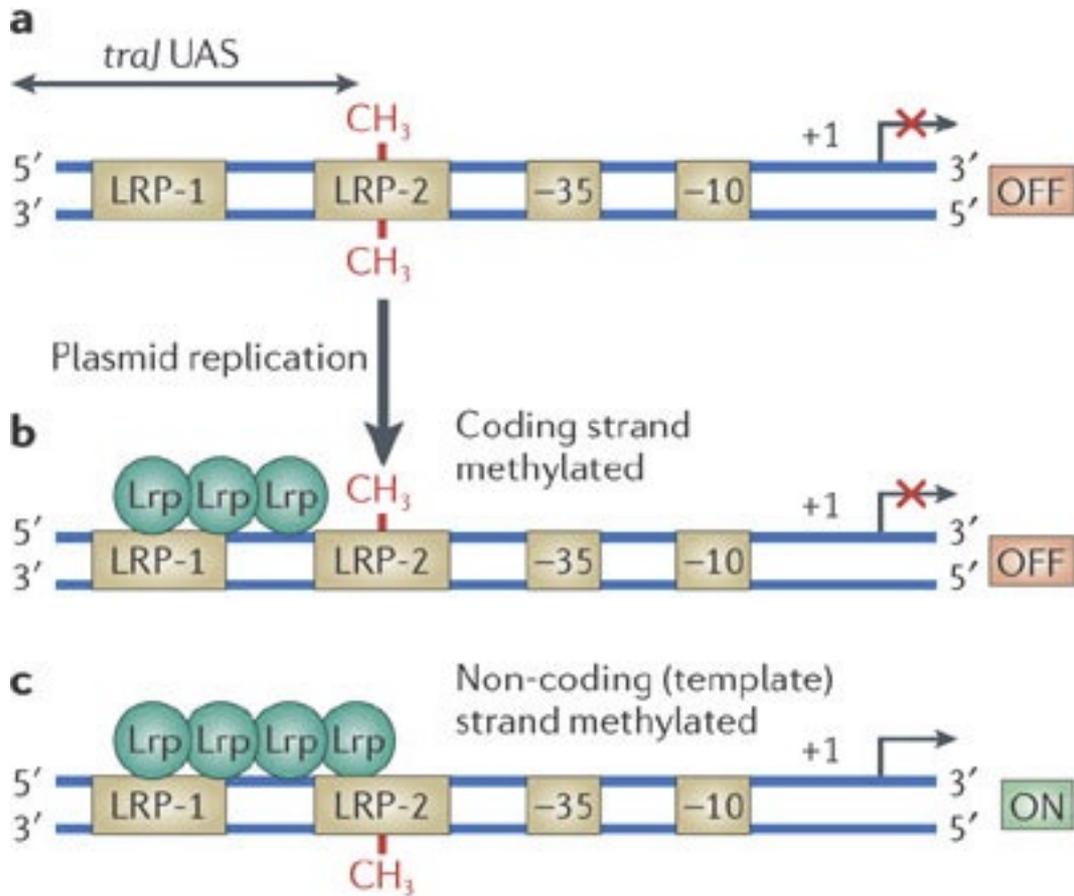


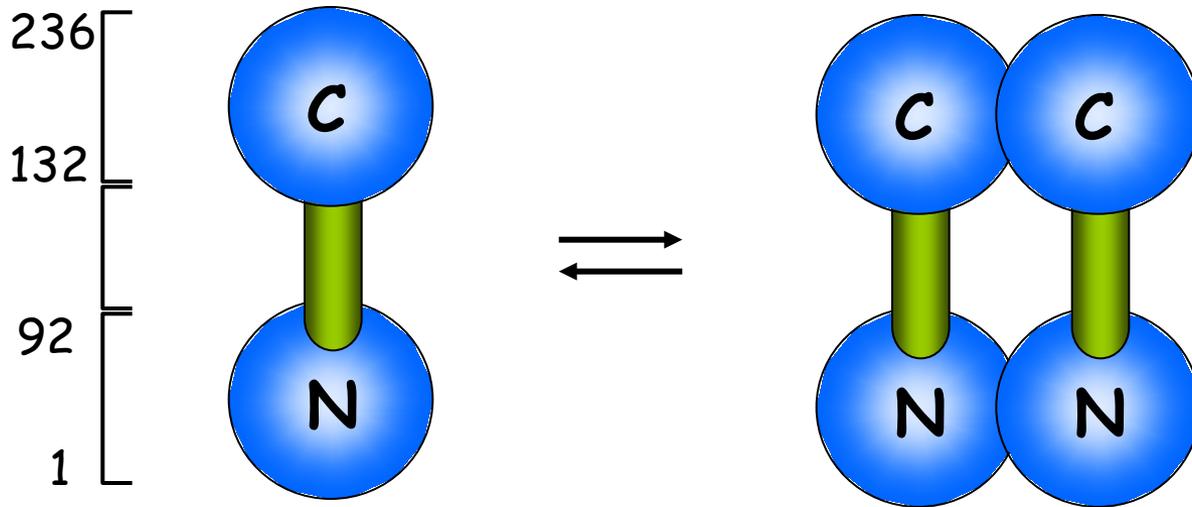
FIGURE 1 | Phase variation and immune evasion. (A) For a phase-variable outer-membrane protein, slipped strand mispairing and changes in DNA sequence repeats in the gene during genome replication lead to ON/OFF expression of the encoded protein (blue). Antibodies to this antigen will not be effective if the protein has phased varied OFF. It is typically easy to predict phase-variable expression of these proteins due to the presence of DNA repeats (simple sequence repeat) in the coding region of the gene. **(B)** In phasevarions, phase-variable expression of a DNA methyltransferase causes genome-wide changes in DNA methylation, and expression differences in multiple genes due to epigenetic regulation. If these genes encode antigenic proteins/vaccine candidates, then methylation-dependent loss of expression (red protein) or reduced expression (purple protein) can lead to immune evasion as antibodies lose efficacy. However, due to the epigenetic nature of the phase-variable regulation, it is difficult to predict which proteins will have altered expression.





The transcriptional activator Lrp binds to two cognate sites in the *traJ* upstream activating sequence (UAS). Lrp binding to the downstream site is inhibited by GATC methylation. As a consequence, *traJ* is not transcribed in a non-replicating plasmid. Passage of the replication fork leaves the *traJ* UAS hemimethylated. However, activation of transcription occurs only in one daughter-plasmid DNA molecule, because methylation of the coding strand does not permit formation of the Lrp–DNA activating complex.

Il repressore cI di lambda



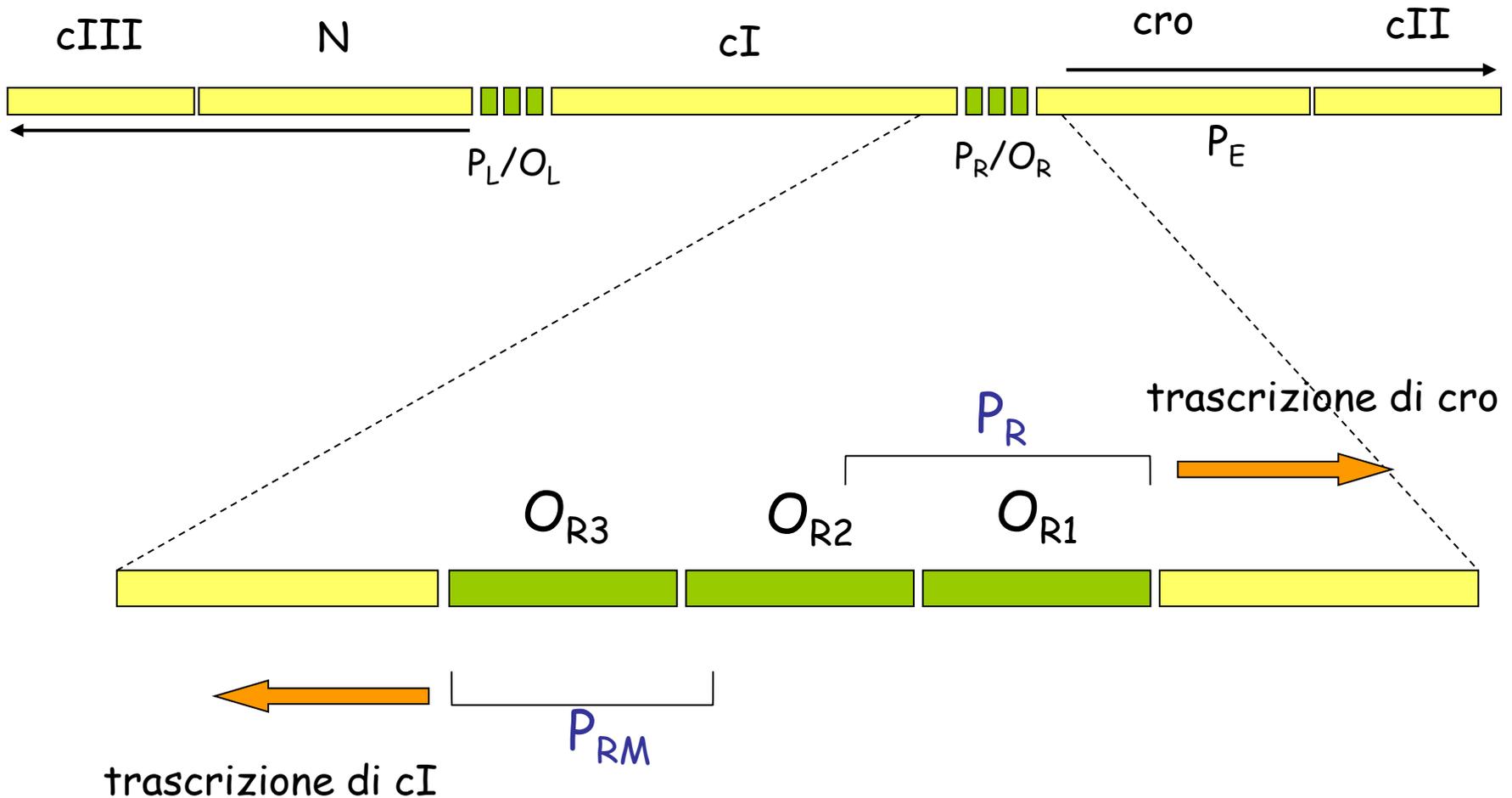
Il dominio N-terminale costituisce il sito di legame all'operatore

Il dominio C-terminale è responsabile della formazione del dimero

Il repressore è capace di legarsi al DNA solamente come dimero

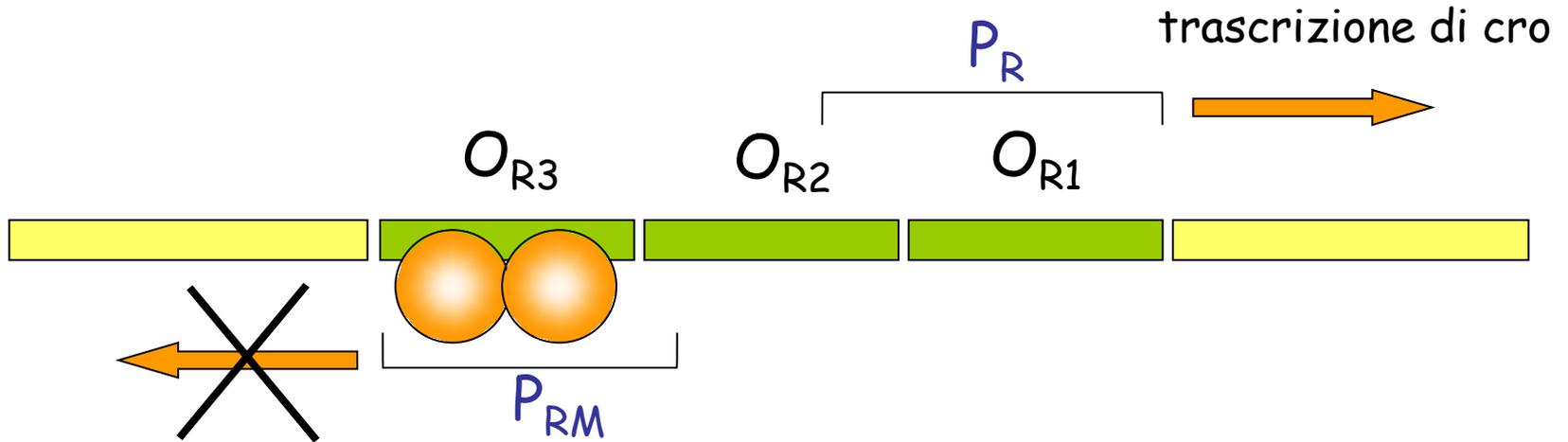
La regione di immunità di λ

La scelta tra il ciclo litico e il ciclo lisogenico avviene a livello della regione PR/OR evidenziata in basso. In questa regione è presente il promotore PR per la trascrizione di cro e degli altri geni verso destra, e il promotore PRM, orientato verso sinistra, per la trascrizione di cI. Sovrapposte ai due promotori vi sono le sequenze di tre siti operatori: le sequenze sono molto simili tra loro ma non identiche. I tre operatori vengono riconosciuti sia dalla proteina Cro che dalla proteina cI ma con diversa affinità



L'interruttore genetico di λ

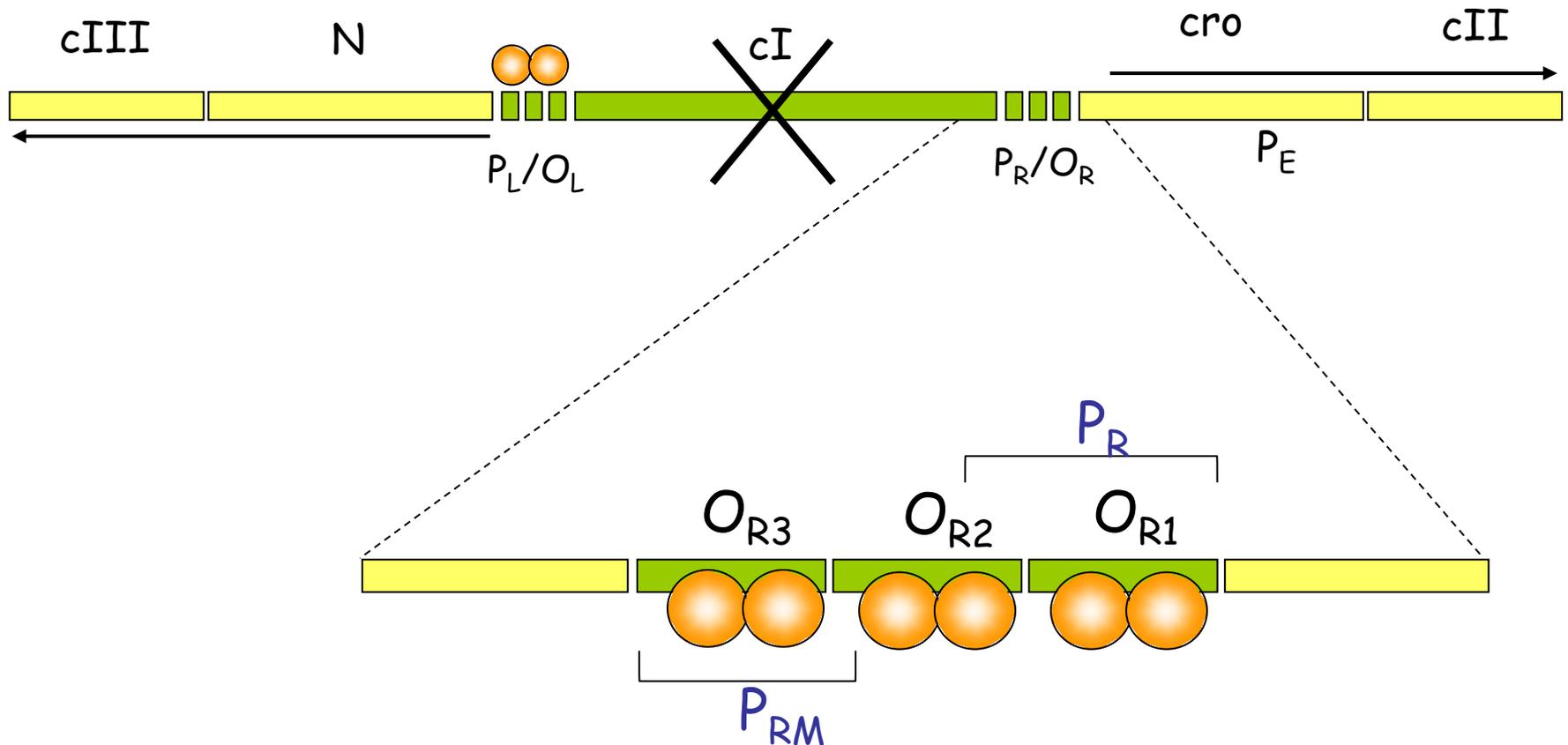
La proteina Cro riconosce con maggiore affinità l'operatore O_{R3} . In questo modo si comporta come un repressore per la trascrizione di cI a partire da P_{RM} . La RNA Polimerasi potrà continuare a legarsi a P_R e trascrivere i geni verso destra (la stessa proteina Cro e i geni precoci ritardati). Quando la proteina Cro si lega alla regione PR/OR prima della proteina cI , si procede inesorabilmente verso la via litica.



trascrizione di cI

Il legame di un dimero di Cro in O_{R3} blocca la sintesi del repressore cI .
E' stata scelta la via litica

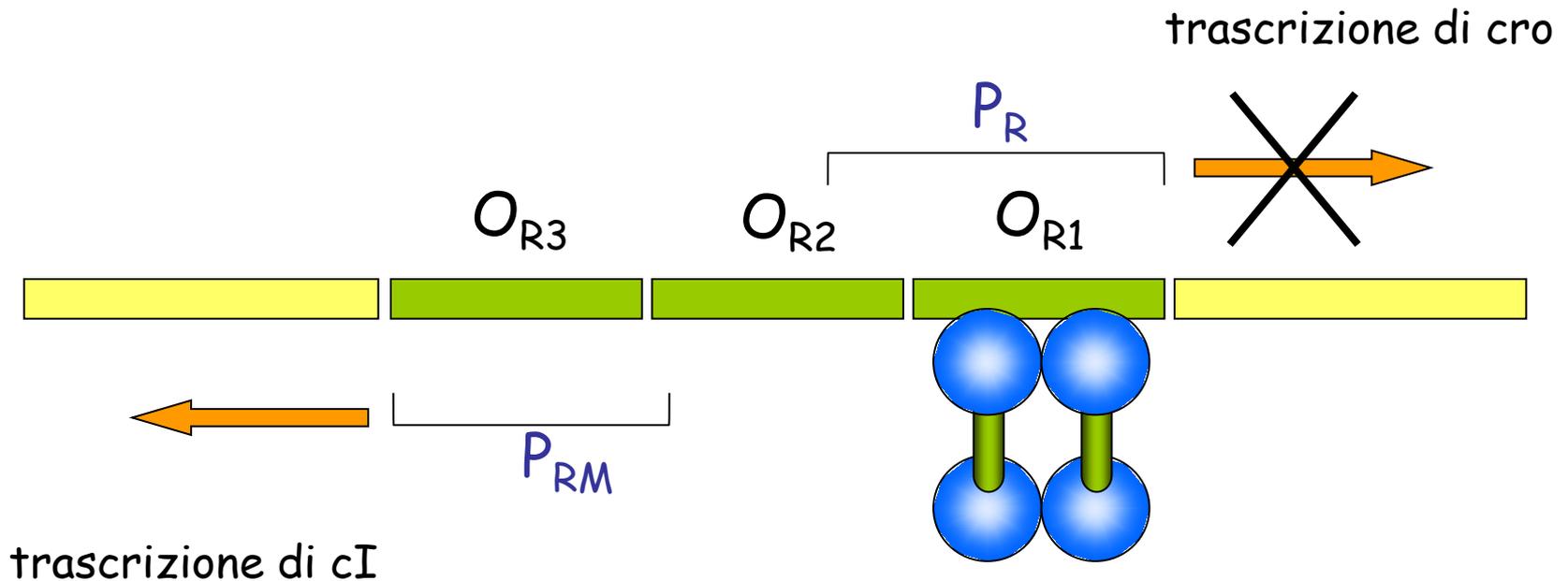
Ciclo litico



Verso la fine della fase precoce ritardata Cro si lega anche a O_{R2} e O_{R3} come pure a P_L/O_L bloccando la trascrizione dei geni precoci. A questo punto verranno trascritti solo i geni tardivi responsabili della sintesi della testa e della coda (**vedi diapositiva 18**).

L'interruttore genetico di λ

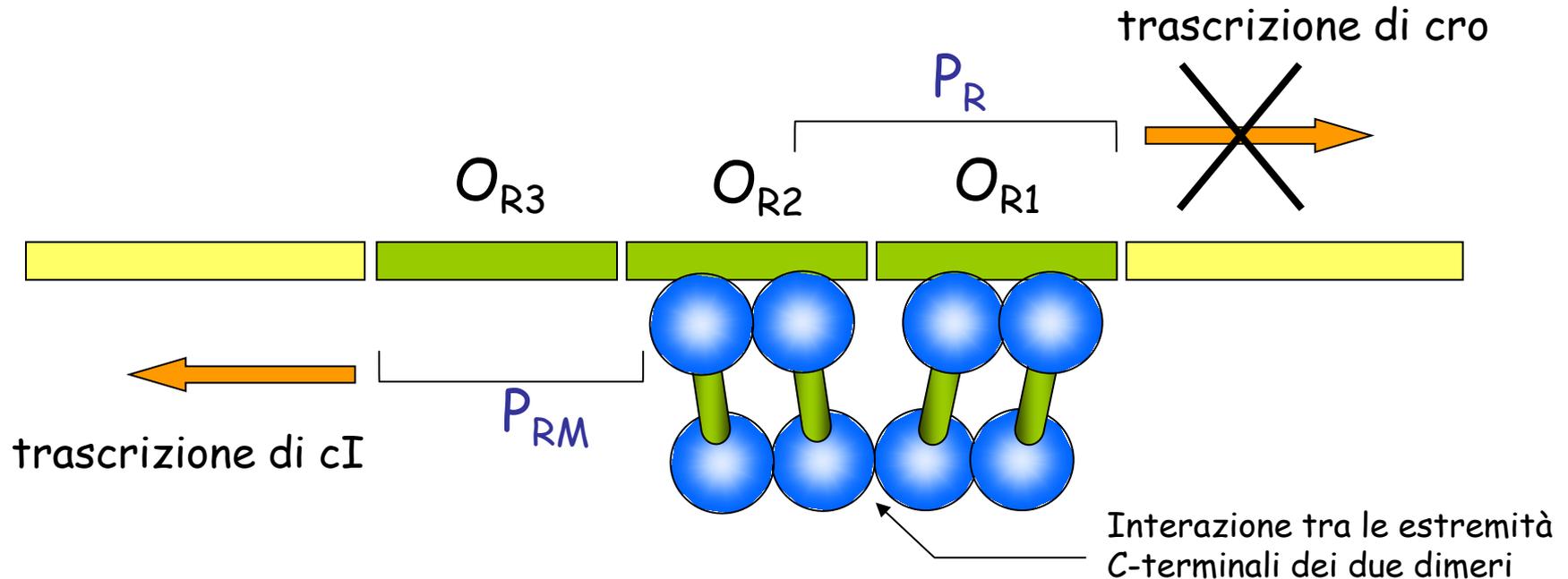
Se invece è la proteina cI a riconoscere prima la regione PR/OR gli effetti saranno diversi. La proteina cI riconosce con maggiore affinità l'operatore O_{R1} : questo legame impedisce alla RNA Polimerasi di legarsi al promotore PR con il risultato di impedire la trascrizione di Cro e dei geni a destra. Quindi la proteina cI in posizione O_{R1} si comporta da repressore (regolazione negativa).



- Il repressore cI ha una maggiore affinità per il sito O_{R1}
- Il legame del repressore cI in O_{R1} blocca la sintesi di Cro.

L'interruttore genetico di λ

Il dimero di cI può legarsi anche a OR2 ma con affinità minore rispetto a OR1. Il legame a OR2 diventa possibile solo quando è già presente un dimero di repressore in OR1: responsabile dell'aumento dell'affinità per OR2 è l'interazione che si stabilisce a livello delle estremità C-terminali dei due dimeri. Quindi il legame del dimero in posizione OR1 favorisce il legame del secondo dimero in OR2: questo è un esempio di legame cooperativo.

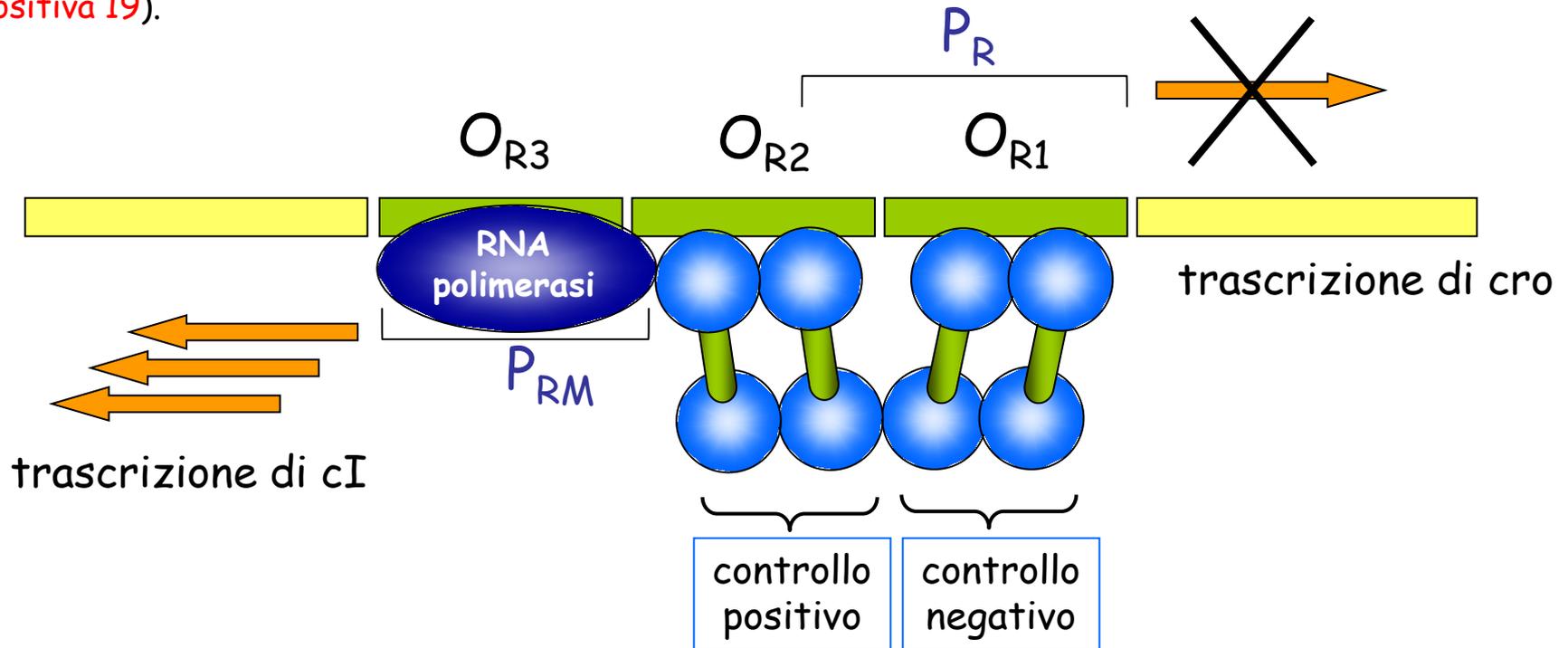


- L'affinità per O_{R2} è inferiore all'affinità per O_{R1}
- Il legame del dimero in posizione O_{R1} favorisce il legame di un secondo dimero in posizione O_{R2} (**legame cooperativo**)

L'interruttore genetico di λ

Il dimero di cI in posizione O_{R2} svolge una funzione diversa da quello in O_{R1} : è un regolatore positivo della trascrizione in quanto favorisce il legame della RNA Polimerasi al promotore P_{RM} . Da questo promotore viene trascritto solo il gene cI. E' un esempio di regolazione autogena in quanto una proteina è regolatrice della propria sintesi.

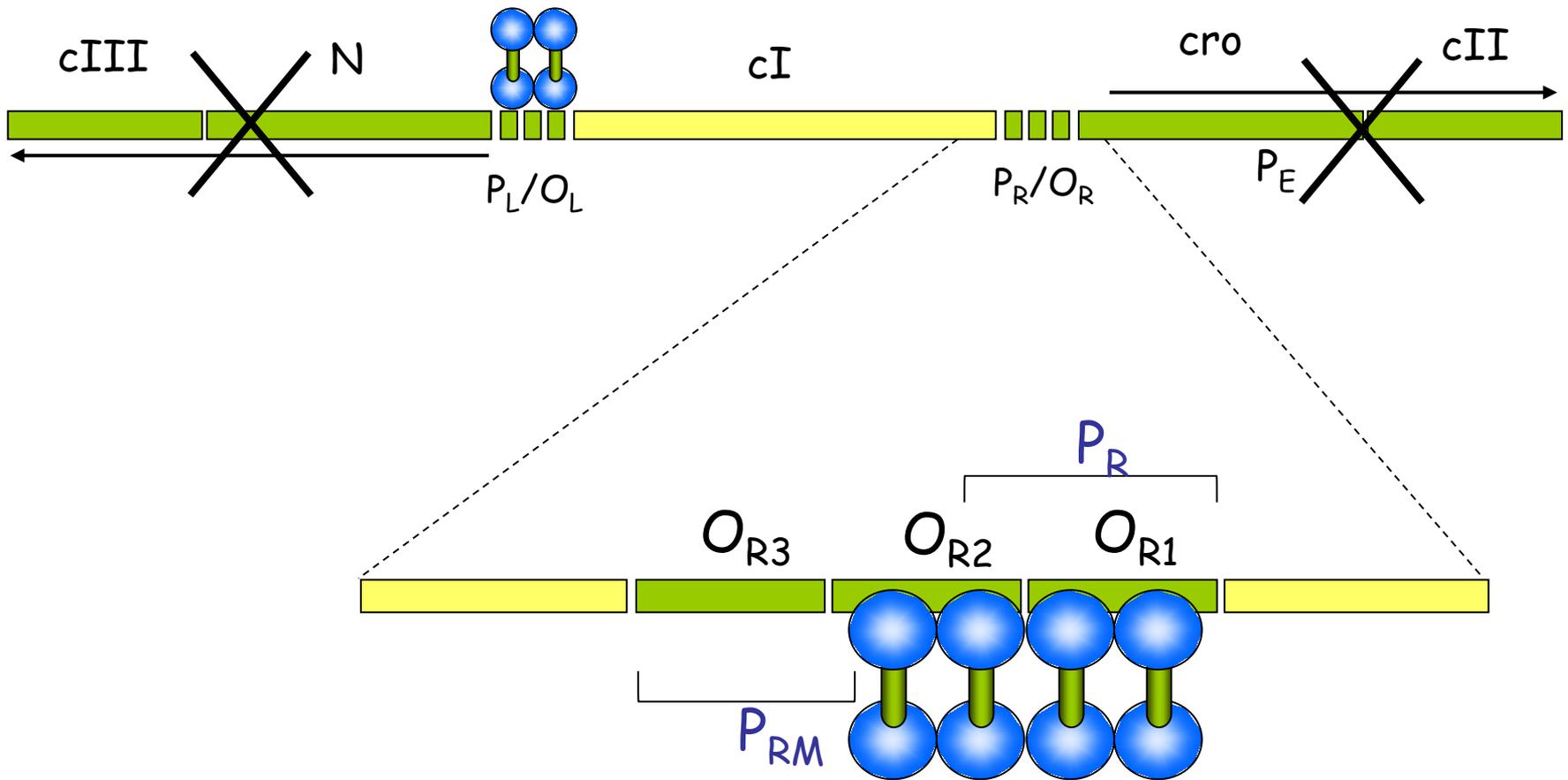
D'ora in poi la trascrizione di cI avverrà solo a partire da P_{RM} e non più da PE anche perchè cI blocca la trascrizione dei geni precoci e quindi anche di cII e cIII come si può vedere nella prossima diapositiva. E' stata scelta la via lisogenica e il DNA di lambda si integrerà nel cromosoma batterico (vedi diapositiva 19).



Il legame del dimero in posizione O_{R2} regola positivamente la trascrizione del repressore stesso (regolazione autogena)

Ciclo lisogenico

Questa è la situazione tipica di un batterio lisogeno per lambda: l'unico gene a essere trascritto è il gene cI . Fin tanto che il repressore cI sarà presente in concentrazioni adeguate sarà assicurato il blocco a livello di PL/OL e PR/OR e verrà mantenuto lo stato lisogenico.



La continua trascrizione di cI assicura il mantenimento dello stato lisogenico. Un eccesso di cI viene ricondotto alla norma grazie al legame in posizione O_{R3}