

Université de Montréal

Effet de l'antiterminaison de la transcription sur l'expression génique chez  
*Escherichia coli* en absence de topoisomérase I.

Par  
Patrick Sanscartier

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès science (M. Sc.)  
en microbiologie et immunologie

Avril 2005

© Patrick Sanscartier, 2005



W

4

U58

2005

v. 130

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Effet de l'antitermination de la transcription sur l'expression génique chez  
*Escherichia coli* en absence de topoisomérase I.

Présenté par  
Patrick Sanscartier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr George Szatmari  
Dr Marc Drolet  
Dr Patrick Hallenbeck

Mémoire accepté le : .....

# 1. Sommaire

## 1.1. En français

Le surenroulement de l'ADN est essentiel et il est contrôlé par l'action des topoisomérases qui le maintiennent à un niveau acceptable pour le bon déroulement de toutes les fonctions cellulaires. Plusieurs études ont consolidé le rôle de la topoisomérase I dans la régulation du surenroulement négatif généré par la transcription. En effet, la transcription génère du surenroulement local et transitoire dans l'ADN selon le modèle du «twin-domain model». Ce surenroulement est contrôlé par l'action de la topoisomérase I et de la gyrase. En absence de topoisomérase I, l'excès de surenroulement négatif favorise la formation de R-loops. D'autre part, les 7 opérons *rrn* chez *Escherichia coli* contiennent une séquence d'antiterminaison leur permettant d'être transcrit sans être affectés par la terminaison prématurée. Des études précédentes ont montré que ce système d'antiterminaison était impliqué dans la formation de surenroulement négatif généré par la transcription, et conséquemment de R-loops, sur des plasmides. Grâce à l'utilisation de souches isogéniques *topA<sup>-</sup>*, les effets de ce système d'antiterminaison ont été étudiés sur l'expression génique de *lac* à partir de fusions transcriptionnelles chromosomiques. L'expression de *lac* s'est avérée grandement affectée en absence de topoisomérase I par la séquence d'antiterminaison *boxA*, à moins que la RNase HI ne soit surproduite. Il a été proposé que la séquence *boxA* crée un découplage entre la transcription et la traduction, favorisant alors la formation de R-loops qui sont à leur tour responsables des difficultés d'expression de *lac*.

**Mots clés:** Topoisomérase I, R-loops, antiterminaison, transcription, surenroulement, RNase HI

## 1.2. En anglais

DNA supercoiling is essential and is regulated by the activity of topoisomerases, which maintain it at an appropriate level for optimal cellular functions. Several studies showed the role of topoisomerase I in the regulation of transcription-induced supercoiling. Indeed, transcription generates local and transient supercoiling into DNA according to the «twin-domain model». This supercoiling is regulated by the opposing enzymatic activity of topoisomerase I and gyrase. On the other hand, the 7 *rrn* operons of *Escherichia coli* possess an antitermination sequence allowing them to be transcribed without being affected by premature termination. Recent studies have shown that this antitermination system was implicated in both transcription-induced negative supercoiling and associated R-loops formation on plasmids. The use of isogenic *topA* null mutant has allowed us to evaluate the role of this antitermination system on *lac* expression using chromosomal transcriptional fusions. The expression of *lac* has been greatly impaired by the *boxA* antitermination sequence in the absence of topoisomerase I, unless RNase HI is overproduced. It has been proposed that the *boxA* sequence creates uncoupling between transcription and translation, thus promoting formation of R-loops, which, in turn, inhibits *lac* expression.

**Key words:** Topoisomerase I, R-loops, antitermination, transcription, supercoiling, RNase HI

<b>1. Sommaire</b>	<b>III</b>
<b>1.1. En français</b>	<b>III</b>
<b>1.2. En anglais</b>	<b>IV</b>
<b>2. Table des matières</b>	<b>V</b>
<b>3. Liste des tableaux et des figures</b>	<b>VIII</b>
<b>4. Liste des sigles et des abréviations</b>	<b>IX</b>
<b>5. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>5.1. Surenroulement de l'ADN</b>	<b>1</b>
5.1.1. Structure et topologie de l'ADN	1
5.1.2. Le «twin-domain model»	3
5.1.3. Le surenroulement global vs local	4
5.1.4. Les ADN topoisomérases chez <i>E. coli</i>	5
5.1.5. Activités et rôles des topoisomérases	6
5.1.6. Évidence de la formation des R-loops et leurs conséquences	11
<b>5.2. Terminaison de la transcription</b>	<b>15</b>
5.2.1. Terminaison intrinsèque	16
5.2.1.1. Séquences des terminateurs	16
5.2.1.2. Fonctionnement des terminateurs intrinsèques	17
5.2.1.3. Rôle de NusA dans la terminaison intrinsèque	18
5.2.2. Terminaison Rho-dépendante (facteur-dépendante)	19
5.2.2.1. Séquences des terminateurs	19
5.2.2.2. La protéine Rho	21

5.2.2.3. Rôles de NusA et NusG dans la terminaison Rho-dépendante	22
5.2.2.4. Fonctions de Rho dans la cellule	24
<b>5.3. Antiterminaison de la transcription</b>	<b>26</b>
5.3.1. Système d'antiterminaison du bactériophage $\lambda$	26
5.3.2. Fonctionnement du système d'antiterminaison du phage $\lambda$	27
5.3.3. Mécanisme d'action du système d'antiterminaison du phage $\lambda$	28
5.3.4. Système d'antiterminaison des opérons <i>rrn</i> chez <i>E. coli</i>	29
5.3.5. Fonctionnement du système d'antiterminaison des opérons <i>rrn</i>	32
5.3.6. Mécanisme d'action du système d'antiterminaison des opérons <i>rrn</i>	32
5.3.7. Rôles alternatifs du système d'antiterminaison des opérons <i>rrn</i>	33
5.3.8. Régulation de l'antiterminaison	33
<b>5.4. Maturation et dégradation des ARNm</b>	<b>35</b>
5.4.1. Enzymes impliquées dans la maturation et la dégradation des ARNm	36
5.4.1.1. Les exonucléases	36
5.4.1.2. Les endoribonucléases	38
5.4.1.3. Autres enzymes et protéines impliquées dans la dégradation des ARNm	41
5.4.2. Caractéristiques structurelles importantes des ARNm	43
5.4.2.1. Régions 3' non traduites	43
5.4.2.2. Régions 5' non traduites	43
5.4.3. Complexes multiprotéiques associés à la dégradation des ARNm	44



5.4.3.1. Dégradosome	44
5.4.3.2. Autres complexes multiprotéiques	46
5.4.4. Rôle de la polyadénylation dans la dégradation des ARNm	47
5.4.5. Régulation de la maturation et de la dégradation des ARNm	48
5.4.6. Relation entre la maturation et la dégradation des ARNm	50
5.4.7. Modèle sur la dégradation des ARNm	51
5.4.8. Importance du couplage transcription/traduction sur la stabilité des ARNm	53
<b>6. Projet de maîtrise</b>	<b>55</b>
<b>7. Article</b>	<b>56</b>
7.1. Abstract	59
7.2. Introduction	60
7.3. Results	62
7.4. Discussion	81
7.5. Experimental procedures	86
7.6. Acknowledgments	89
7.7. References	89
<b>8. Discussion</b>	<b>94</b>
<b>9. Conclusion</b>	<b>105</b>
<b>10. Bibliographie</b>	<b>107</b>
<b>11. Remerciements</b>	<b>127</b>

### 3. Liste des tableaux et des figures

#### Introduction

Figure 1. Le «Twin-domain model».	4
Figure 2. La terminaison Rho-dépendante.	21
Figure 3. L'antiterminaison de la transcription.	31
Figure 4. Initiation de la dégradation des ARNm par le dégradosome.	52
Figure 5. Initiation de la dégradation des ARNm par les endonucléases.	53

#### Article

Figure 6. A schematic drawing of the <i>lac</i> fusions used in the present study.	71
Figure 7. <i>lacZ</i> mRNA expression from the various <i>lac</i> fusions as detected with the PTRC probe.	72
Figure 8. <i>lacZ</i> mRNA expression from the various <i>lac</i> fusions as detected with probes hybridizing to the 3' side of <i>lacZ</i> .	73
Figure 9. Stability of <i>lacZ</i> mRNA synthesized from the <i>boxA-lac</i> and the <i>boxA4UG-lac</i> fusions.	74
Figure 10. Stability of <i>lacZ</i> mRNA synthesized from the <i>boxA-rrnB-lac</i> fusion.	76
Figure 11. <i>lacA</i> mRNA expression from the <i>boxA-lac</i> and the <i>boxA4UG-lac</i> fusions.	77
Figure 12. Effect of the translation inhibitor spectinomycin on <i>lac</i> expression from the <i>boxA-lac</i> and the <i>boxA4UG-lac</i> fusions in <i>topA</i> null mutant.	78
Figure 13. Effect of the <i>rneΔ14</i> mutation on <i>lac</i> expression from the <i>boxA-lac</i> fusion.	79
Table 1. The effect of <i>boxA</i> on $\beta$ -galactosidase synthesis in the absence of topoisomerase I	80

## 4. Liste des abréviations

A : Adénine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

C : Cytosine

G : Guanine

K : Potassium

Lk : «Linking number»

Mg : Magnésium

nt : Nucléotides

NTPs : Nucléotides triphosphates

nt/s : Nucléotides par secondes

pb : Paires de bases

P<sub>i</sub> : Phosphate inorganique

T : Thymine

Ts : Thermosensible

U : Uracile

## 5. Introduction

### 5.1. Surenroulement de l'ADN

#### 5.1.1. Structure et topologie de l'ADN

Chez les organismes vivants, deux brins d'ADN antiparallèles et complémentaires sont reliés et enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice d'ADN. Ces brins peuvent être extrêmement longs, chez *Escherichia coli* la taille de l'ADN est environ 1000 fois plus importante que la bactérie elle-même, pour former une molécule d'ADN, le chromosome bactérien. De cette façon, l'ADN doit être condensé pour être contenu dans la cellule, mais doit également être replié de manière à être accessible pour les différentes fonctions biologiques de la bactérie, comme par exemple la réplication de l'ADN, la transcription et la recombinaison. Le chromosome bactérien est donc organisé en ce qu'on appelle le nucléoïde, qui est composé de plusieurs boucles d'ADN émergeant d'une région encore plus condensée, le noyau. Une des caractéristiques importantes du nucléoïde est que les boucles d'ADN sont enroulées sur elles-mêmes. La torsion est le résultat du surenroulement de l'ADN.

Il existe deux types de surenroulement, le surenroulement positif et le surenroulement négatif. Le surenroulement positif réfère à une torsion de l'ADN dans le même sens que l'hélicité de l'ADN, alors que le surenroulement négatif réfère à une torsion de l'ADN dans le sens opposé de l'hélicité. Généralement, l'ADN des procaryotes a un «linking number» négatif,  $\Delta Lk < 0$ , et est ainsi surenroulé négativement.

Environ 50% du surenroulement chez *E. coli* est contraint par la fixation de protéines à l'ADN qui empêche la diffusion de celui-ci (Bensaid *et al.* 1996; Bliska et Cozzarelli 1987; Pettijohn et Pfenninger 1980; Rahmouni et Wells 1989). Une source majeure de cette contrainte provient des protéines qui séparent les brins d'ADN, incluant les protéines de l'appareil de réplication de l'ADN et l'ARN polymérase. Des protéines architecturales comme HNS, IHF et les protéines HU (semblables à des histones retrouvées chez les eucaryotes) restreignent aussi le surenroulement négatif (Hatfield et Benham 2002).

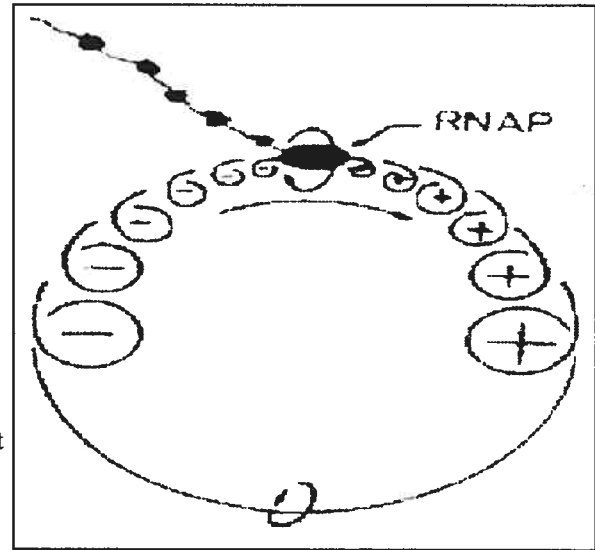
Le surenroulement de l'ADN est essentiel pour la viabilité cellulaire et est étroitement régulé dans la cellule. Plusieurs enzymes se liant à l'ADN sont non seulement affectées par le niveau de surenroulement de celui-ci, mais peuvent également l'altérer. Par exemple, l'initiation de la réplication de l'ADN nécessite une matrice surenroulée négativement (Marians *et al.* 1986; Funnell *et al.* 1987). Similairement, l'initiation de la transcription d'une multitude de gènes nécessite un surenroulement négatif (Arnold et Tessman 1988; Pruss et Drlica 1989; Chen *et al.* 1994). Plusieurs systèmes de recombinaison à spécificité de sites requièrent ou sont influencés par le surenroulement négatif (Mizuuchi *et al.* 1978; Nash 1990) et peuvent transformer les supertours de l'ADN en caténanes ou nœuds topologiques (Mizuuchi *et al.* 1980; Wasserman et Cozzarelli 1986). Le surenroulement de l'ADN affecte la séparation des brins et la fixation des protéines, mais condense également l'ADN et favorise l'interaction de séquences distantes aussi lointaines que 2500 pb (Liu *et al.* 2001). Sans cette condensation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes n'aurait pas lieu (Zechiedrich et

Cozzarelli 1995; Zechiedrich *et al.* 1997). Finalement, l'expression des enzymes qui contrôlent et maintiennent le surenroulement de l'ADN, les topoisomérases, est elle-même fortement régulée par le niveau de surenroulement de l'ADN (Menzel et Gellert 1983; Tse-Dinh 1985).

### **5.1.2. Le « twin-domain model »**

D'après ce modèle (figure 1), l'élongation de la transcription génère des domaines de surenroulement positif et négatif, respectivement, à l'avant et à l'arrière du complexe de transcription (Liu et Wang 1987). En effet, à cause de la structure de la molécule d'ADN, pour que la transcription ait lieu il faut soit que le complexe de transcription tourne autour de la double hélice d'ADN ou bien soit que la molécule d'ADN tourne sur elle-même. Lors de la transcription, l'ARN polymérase et le transcrit d'ARN naissant ont de la difficulté à tourner autour de la double hélice d'ADN. En effet, il s'agit d'un gros complexe protéique et le problème de rotation est encore plus important si on considère que des ribosomes peuvent être fixés sur l'ARN naissant pour effectuer la traduction, étant donné que la transcription et la traduction sont couplées chez les procaryotes. Ainsi, c'est plutôt la molécule d'ADN qui tourne sur son axe de rotation alors que le complexe transcriptionnel avance sur celle-ci. Ceci provoque de la tension de surenroulement dans l'ADN qui se traduit par la formation de domaines de surenroulement de chaque côté de l'ARN polymérase. Ces domaines de surenroulement forment un gradient (surenroulement plus important près du complexe) qui peut diffuser et éventuellement s'annuler si la transcription a lieu sur un plasmide circulaire (Wu *et al.* 1988).

**Figure 1.** «Twin-domain model». La translocation de l'ARN polymérase (RNAP) avec son ARN naissant, ainsi que les ribosomes et les polypeptides qui y sont associés, génère des domaines de surenroulement positif à l'avant du complexe transcriptionnel (signe +) et négatif (signe -) à l'arrière de celui-ci. Les domaines de surenroulement peuvent s'annuler l'un à l'autre par la rotation de l'ADN si la molécule d'ADN est relativement petite et circulaire. Tiré de Wu *et al.* 1988.



### 5.1.3. Le surenroulement global vs local

Le surenroulement global représente la densité de surenroulement moyenne de tous les domaines du chromosome bactérien (Drolet *et al.* 2003). Il a été démontré qu'un niveau global de surenroulement négatif doit être maintenu dans un intervalle de +/- 15% pour assurer la bonne croissance d'*E. coli* (Drlica 1992). De son côté, le surenroulement local représente la densité de surenroulement à certains endroits particuliers du chromosome bactérien. Ce type de surenroulement est transitoire et peut atteindre des niveaux de variation beaucoup plus importants que ceux du surenroulement global (Drolet *et al.* 2003). L'élongation de la transcription (le «twin-domain model») et, dans une importance moindre, la réplication de l'ADN peuvent générer des fluctuations du surenroulement local. Le niveau de surenroulement de l'ADN dans la cellule est très important et il est régulé par l'action d'enzymes très spécifiques, les topoisomérases (voir section suivante 5.1.4.).

#### **5.1.4. Les ADN topoisomérases chez *E. coli***

Les topoisomérases sont des enzymes qui régissent le niveau de surenroulement de l'ADN dans la cellule. Les topoisomérases sont essentielles dans la cellule et ceci dérive de la structure de la double hélice d'ADN. Pour la plupart des processus qui doivent avoir accès à l'information emmagasinée dans l'ADN, les deux brins doivent être séparés soit temporairement, comme dans la transcription ou la recombinaison, ou en permanence, comme dans la réplication. Ainsi, durant la transcription, la translocation des ARN polymérase génère de la tension de surenroulement dans l'ADN qui doit être relaxée, et durant la réplication, les deux brins de l'ADN doivent être complètement séparés par les topoisomérases (Champoux 2001). De plus, comme précédemment mentionné, la transcription à partir de certains promoteurs requiert un certain niveau de surenroulement négatif, mais trop de surenroulement, peu importe le sens, est désastreux pour la cellule (Wang *et al.* 1990).

Le clivage de l'ADN par les topoisomérases est accompagné par la formation d'un lien transitoire phosphotyrosine entre un résidu tyrosine de la protéine et l'extrémité phosphate du brin d'ADN clivé. Ensuite, l'enzyme modifie la topologie de l'ADN, puis soit elle est relâchée lorsqu'elle effectue la religation de l'ADN ou soit elle procède à une nouvelle ronde d'activité. Elles accomplissent ce rôle soit en passant un brin d'ADN dans une coupure du brin opposé de la molécule d'ADN (type I), soit en passant un duplex d'ADN de la même ou d'une autre molécule dans une brèche double brin générée dans l'ADN (type II). Les topoisomérases sont aussi divisées en type A lorsque la protéine établit un lien avec le phosphate en 5' et type B lorsque la protéine établit un lien



avec le phosphate en 3' (Champoux 2001). Les topoisomérases de type IA ont besoin d'une région d'ADN simple brin pour se fixer, alors que celle de type IB ont besoin d'ADN double brin, et elles peuvent altérer le «linking number» d'un facteur de 1. Quant à elles, les topoisomérases de type II peuvent l'altérer d'un facteur de 2. Le «linking number» représente le nombre de fois que les deux brins d'ADN sont intercroisés, il s'agit donc d'un moyen de comparer le surenroulement de diverses molécules d'ADN.

Les 4 topoisomérases trouvées chez *E. coli* consistent en 2 enzymes de type IA, les ADN topoisomérases I et III, et 2 enzymes de type IIA, la gyrase et la topoisomérase IV. Les 2 topoisomérases de type II sont des hétérotétramères et utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP pour procéder à leurs fonctions. Même si des activités communes ont été démontrées génétiquement et *in vitro*, chacune des topoisomérases semblent avoir une fonction optimale et accomplir des manipulations topologiques spécifiques *in vivo* (Champoux 2001; Drolet *et al.* 2003). D'ailleurs, peut-être que certains facteurs cellulaires inconnus jouent un rôle en limitant ces enzymes à leur rôle spécifique (Deibler *et al.* 2001).

#### **5.1.5. Activités et rôles des topoisomérases**

La topoisomérase I, encodée par le gène *topA*, est une enzyme qui relaxe le surenroulement négatif, puis *in vitro*, elle peut également effectuer la caténation/décaténation (la formation/séparation de nœuds topologiques reliant deux molécules d'ADN) et le «knotting/unknotting» (la formation/résolution de nœuds topologiques présents dans la même molécule d'ADN) de molécules d'ADN s'il y a

présence de régions d'ADN simple brin (Champoux 2001). La spécificité du substrat de la topoisomérase I pour l'ADN surenroulé négativement provient du fait que cette enzyme se fixe aux régions d'ADN simple brin près de régions d'ADN double brin (Kirkegaard et Wang 1985; Wang 1996). Un niveau approprié de surenroulement négatif du chromosome bactérien peut promouvoir la formation de telles structures car le surenroulement négatif favorise l'ouverture des brins d'ADN (Drolet *et al.* 2003). Ainsi, l'élongation de la transcription («twin-domain model») peut générer un «hot spot» pour l'action de la topoisomérase I. Le rôle principal de la topoisomérase I est donc de relaxer le surenroulement négatif généré par la transcription et non de contrôler le niveau de surenroulement global de la cellule (Massé et Drolet 1999a). En effet, ceci est d'ailleurs supporté par la démonstration de l'interaction de la topoisomérase I avec la sous-unité  $\beta'$  de l'ARN polymérase (Cheng *et al.* 2003). La délétion du gène *topA* chez *E. coli* provoque une augmentation du surenroulement négatif et est tolérée seulement en présence de mutations compensatoires qui surviennent ailleurs, principalement dans les gènes codant pour la gyrase, réduisant alors le niveau de surenroulement du chromosome bactérien (DiNardo *et al.* 1982; Raji *et al.* 1985).

La gyrase, un tétramère constitué de 2 sous-unités GyrA et 2 sous-unités GyrB (les produits des gènes *gyrA* et *gyrB*), est une enzyme qui introduit du surenroulement négatif (activité ATP-dépendante) et qui peut également relaxer le surenroulement négatif (activité ATP-indépendante), et *in vitro*, elle peut aussi accomplir la caténation/décaténation et le «knotting/unknotting» de molécules d'ADN (Champoux 2001; Deibler *et al.* 2001; Drlica et Zhao 1997). La gyrase est l'enzyme qui maintient le

surenroulement négatif à un niveau acceptable pour la survie de la cellule. Elle élimine également le surenroulement positif généré à l'avant des fourches de réplication et des complexes transcriptionnels (Champoux 2001; Drolet *et al.* 2003).

La topoisomérase III, encodée par le gène *topB*, aurait un rôle à jouer dans la caténation/décaténation de molécules d'ADN (Harmon *et al.* 2003). *In vitro*, la topoisomérase III relaxe l'ADN surenroulé négativement, mais seulement à température élevée (favorise l'ouverture des brins) car sa spécificité pour l'ADN simple brin est encore plus importante que celle de la topoisomérase I. Elle est également capable de participer à la décaténation de molécules d'ADN *in vitro*. Elle est également capable de cliver et d'effectuer la décaténation de molécules d'ARN (Champoux 2001). De plus, une interaction a été démontrée entre l'hélicase RecQ et la topoisomérase III dans laquelle l'hélicase produit un substrat pour la caténation/décaténation de molécules d'ADN par la topoisomérase III (Harmon *et al.* 1999).

La topoisomérase IV, un tétramère constitué de 2 sous-unités ParC et 2 sous-unités ParE (les produits des gènes *parC* et *parE*), est une enzyme qui participe à la décaténation (principalement la séparation des deux chromosomes à la fin de la réplication de l'ADN) et également au «unknotting» des molécules d'ADN (Deibler *et al.* 2001; Espeli *et al.* 2003a). Elle participerait aussi à la résolution de caténanes générées par la recombinaison à spécificité de sites (Zechiedrich *et al.* 1997). Finalement, il semblerait qu'elle participe aussi à la relaxation du surenroulement positif généré à l'avant des

fourches de réplication avec la gyrase (Khodursky *et al.* 2000), malgré que cette hypothèse ne fait pas l'unanimité.

Le niveau de surenroulement global de l'ADN dans la cellule serait régulé par l'action de la gyrase dont l'activité est contrôlée par le ratio ATP/ADP (Westerhoff *et al.* 1988; Drlica 1992; Kampranis et Maxwell 1996; van Workum *et al.* 1996; Drlica et Zhao 1997), son activité de surenroulement (introduction de surenroulement négatif) étant favorisée à un ratio ATP/ADP élevé. De son côté, le surenroulement local de l'ADN l'est par l'action de la topoisomérase I et la gyrase (Drolet *et al.* 2003). La gyrase est la seule enzyme capable d'introduire du surenroulement négatif sur le chromosome nécessaire à l'initiation de la réplication et l'initiation de la transcription à partir de certains promoteurs (Baker *et al.* 1986; Champoux 2001) et élimine le surenroulement positif généré à l'avant de la fourche de réplication pour permettre sa progression (Zechiedrich *et al.* 2000; Champoux 2001). Même si la gyrase et la topoisomérase IV peuvent effectuer la décaténation et le «unknotting» des molécules d'ADN *in vitro*, seule la topoisomérase IV accomplit ces fonctions dans la cellule (Levine *et al.* 1998; Zechiedrich *et al.* 2000). La gyrase participe indirectement à la décaténation d'intermédiaires de réplication ou de recombinaison en générant un niveau de surenroulement favorable pour la fixation de la topoisomérase IV (Zechiedrich et Cozzarelli 1995; Zechiedrich *et al.* 1997). D'ailleurs, les sous-unités ParC et GyrA, les sous-unité catalytiques, puis ParE et GyrB, responsables de l'hydrolyse d'ATP, sont très homologues en fonctions et en séquence (ParC et ParE sont 36% et 40% homologues à GyrA et GyrB, respectivement) (Deibler *et al.* 2001).

Enfin, il a été proposé qu'une partie du surenroulement positif, généré par la réplication de l'ADN et s'accumulant dans la région non répliquée à l'avant de la fourche de réplication, puisse diffuser à l'arrière de celle-ci et mener à la formation de précatéanes entre les molécules nouvellement synthétisées (Peter *et al.* 1998; Sogo *et al.* 1999; Champoux 2001). Si ces précatéanes ne sont pas enlevées, elles deviendraient éventuellement des barrières empêchant la progression de la fourche de réplication. L'activité de la topoisomérase IV serait responsable de la résolution de ces précatéanes (Levine *et al.* 1998; Peter *et al.* 1998; Champoux 2001), mais cette action serait optimisée par la protéine SeqA (Kang *et al.* 2003). La protéine SeqA stimulerait la topoisomérase IV afin d'éliminer les précatéanes et affecterait aussi sa localisation («amènerait» la topoisomérase IV au bon endroit). De plus, SeqA stimulerait également l'activité de décatéation des chromosomes nouvellement synthétisés par la topoisomérase IV (Kang *et al.* 2003). En fait, le groupe de Kang *et al.* suggère que la protéine SeqA, qui est localisée en foyer à la fourche de réplication, est nécessaire au bon fonctionnement de toutes les activités de la topoisomérase IV. Cependant, un autre groupe (Espeli *et al.* 2003a) a montré que la topoisomérase IV n'était assemblée (les sous-unités) que tard dans le cycle cellulaire, alors que la réplication de l'ADN est essentiellement complétée. Ainsi, il semblerait que la topoisomérase IV n'ait un rôle à jouer que dans la ségrégation des chromosomes. D'ailleurs, la topoisomérase IV et la protéine FtsK interagissent physiquement pour effectuer la décatéation des chromosomes bactériens (Espeli *et al.* 2003b). La protéine FtsK réside au site de formation du septum et est indispensable à la résolution du dimère de chromosomes. Donc, si la topoisomérase IV n'est pas active avant la fin du cycle cellulaire, elle ne participe probablement pas à la régulation du

niveau de surenroulement dans la cellule, ni à l'élimination du surenroulement positif à l'avant des fourches de réplication. Dans ce cas, quelle topoisomérase est responsable de la résolution des précatéanes près des fourches de réplication? La topoisomérase III serait plutôt responsable de cette action. En effet, l'hélicase RecQ produit des régions d'ADN simple brin qui sont fixées par la protéine SSB («Single-stranded DNA-binding protein»), pour prévenir le réappariement des paires de bases, et dirige possiblement la fixation de la topoisomérase III (Harmon *et al.* 2003). La protéine SSB stimule les activités de RecQ et de la topoisomérase III. La topoisomérase III possède une activité de caténation/décaténation (Harmon *et al.* 2003). Ainsi, la topoisomérase III agirait aux intermédiaires de recombinaison (les jonctions de Holliday) et aux fourches de réplication pour éliminer les précatéanes (Harmon *et al.* 2003). D'ailleurs, il y a plusieurs régions d'ADN simple brin qui sont présentes aux fourches de réplication et la topoisomérase III pourrait même y agir sans l'aide de l'hélicase RecQ.

#### **5.1.6. Évidence de la formation des R-loops et leurs conséquences**

Comme mentionné précédemment, le rôle de la topoisomérase I est de relaxer le surenroulement négatif généré durant la transcription dans le cadre du «twin-domain model». En absence de topoisomérase I, il y a accumulation excessive de surenroulement négatif à l'arrière du complexe transcriptionnel, on parle alors de surenroulement hypernégatif. Jusqu'à tout récemment, on ne comprenait pas comment l'excès de surenroulement négatif affecte la physiologie cellulaire et pourquoi l'absence de la topoisomérase I inhibe la croissance bactérienne.

Une conséquence majeure de l'accumulation de surenroulement négatif semble être la formation de R-loops derrière le complexe de transcription (Drolet *et al.* 1994; Massé et Drolet 1999b; Drolet *et al.* 2003). Un R-loop est un hybride ADN-ARN entre le brin d'ARN naissant et le brin d'ADN matrice, laissant le brin d'ADN complémentaire simple brin. De cette manière, les R-loops peuvent également être des «hots spots» pour l'action de la topoisomérase I car il y a présence d'une région d'ADN simple brin près d'ADN double brin, d'ailleurs cette hypothèse a été confirmée *in vitro* (Phoenix *et al.* 1997). Des évidences de la formation des R-loops ont été obtenues à partir d'expériences de transcription *in vitro* et *in vivo* en absence de topoisomérase I et en présence de gyrase (Massé *et al.* 1997; Phoenix *et al.* 1997; Massé et Drolet 1999b). Le fait que les mutants *topA* acquièrent des mutations compensatoires dans les gènes *gyrA* ou *gyrB* (DiNardo *et al.* 1982) a été expliqué par l'activité de surenroulement de la gyrase qui favorise la formation des R-loops (Drolet *et al.* 1995; Phoenix *et al.* 1997), alors que l'activité de surenroulement de la topoisomérase I inhibe la formation de ceux-ci (Phoenix *et al.* 1997; Drolet *et al.* 2003). En effet, le surenroulement négatif facilite l'ouverture des brins d'ADN et favorise ainsi potentiellement la formation de R-loops (Drolet *et al.* 2003).

La formation de R-loops a été détectée *in vitro* lorsque la gyrase est présente en excès suffisant par rapport à la topoisomérase I, de cette façon le surenroulement négatif peut s'accumuler. Dans ces expériences, la formation des R-loops est révélée par l'extraction de plasmides ayant un surenroulement hypernégatif sensible à la RNase HI. Le surenroulement hypernégatif est dû à la présence des R-loops puisqu'on n'extrait pas de plasmides ayant du surenroulement hypernégatif en présence de RNase HI. La RNase HI

est une ribonucléase qui dégrade la partie ARN de l'hybride ARN-ADN et qui élimine donc les R-loops. De plus, une corrélation fut établit entre le niveau d'activité de la gyrase et la quantité de RNase HI nécessaire pour assurer la croissance des mutants *topA* (Drolet *et al.* 1995).

Il a récemment été démontré qu'il y a aussi une corrélation entre la formation des R-loops durant la transcription et l'inhibition de la croissance des mutants *topA* (Massé et Drolet 1999b). Les R-loops inhibent la croissance bactérienne car la surproduction de RNase HI corrige partiellement les problèmes de croissance des mutants *topA* (Drolet *et al.* 1995; Massé et Drolet 1999b; Massé et Drolet 1999c). D'ailleurs, la RNase HI et l'hélicase RecG sont les seules enzymes capables de démanteler les R-loops (par hydrolyse et par déroulement, respectivement) et le fait que les doubles mutants *rnhA recG* sont inviables suggère que les R-loops surviennent également dans les souches sauvages et peuvent être létaux (Kogoma 1997). De plus, le surenroulement négatif généré par la transcription, et non le surenroulement global, est responsable de l'initiation de la formation des R-loops. Ainsi, le rôle majeur de la topoisomérase I est d'inhiber la formation des R-loops soit en réduisant le niveau de surenroulement négatif pour prévenir leur formation ou en agissant dès leur formation pour les déstabiliser (Drolet *et al.* 2003).

Le couplage de la transcription et de la traduction chez les bactéries permet de minimiser l'apparition de R-loops sur le chromosome bactérien (Massé et Drolet 1999b; Massé et Drolet 1999c; Broccoli *et al.* 2004). En effet, la présence de ribosomes sur l'ARN naissant très près de l'ARN polymérase devrait prévenir le ré-appariement de cet ARN



naissant avec le brin d'ADN matrice derrière le complexe transcriptionnel en mouvement. En accord avec l'inhibition de la formation des R-loops par le couplage transcription/traduction est la démonstration que l'ajout d'inhibiteur de traduction, comme la spectinomycine, le chloramphénicol ou la kanamycine, stimule le surenroulement hypernégatif chez les mutants *topA* (Massé et Drolet 1999b; Massé et Drolet 1999c; Broccoli *et al.* 2004). De plus, une délétion en 5' du gène *tetA* sur un plasmide (pBR322 $\Delta$ *tet5'*) inactivant sa traduction (séquence Shine-Dalgarno, codon ATG initiateur et attachement de TetA à la membrane), mais pas sa transcription, stimule la formation de R-loops en absence de topoisomérase I (Massé et Drolet 1999b).

Puisque la formation des R-loops n'a toujours pas été directement démontrée, il n'est pas possible de complètement comprendre le mécanisme de formation des R-loops chez les mutants *topA*. Une question fondamentale concerne l'origine des R-loops. Est-ce que la formation du R-loop est initiée à partir de la bulle de transcription et ainsi est-ce que les R-loops sont simplement une extension de l'hybride de 8-9 pb existant dans l'ARN polymérase (Mooney *et al.* 1998), ou est-ce que les R-loops sont initiés à l'arrière du complexe de transcription par le ré-appariement de l'ARN naissant au brin matrice d'ADN (Drolet *et al.* 2003)? Peu importe le mécanisme, il faut tenir compte du fait que les R-loops sont accessibles à la RNase HI, ce qui n'est pas le cas pour l'hybride ARN-ADN à l'intérieur de la bulle de transcription (Drolet *et al.* 2003). De plus, on ne sait pas réellement à quoi ressemble le ou les R-loops derrière le complexe de transcription, quant à savoir s'il s'agit d'un très long R-loop ou de plusieurs petits R-loops.

Finalement, même si les raisons de la toxicité des R-loops ne sont toujours pas complètement comprises, certaines hypothèses ont été avancées. Les R-loops présents sur le chromosome pourraient entraver le bon déroulement de la transcription. Effectivement, il a été suggéré qu'ils bloquent la progression des ARN polymérase suivantes ce qui causerait un empilement des ARN polymérase (Hraiky *et al.* 2000; Drolet *et al.* 2003) et que ce mécanisme serait évidemment plus important chez les gènes activement transcrits. De plus, une étude récente démontre d'ailleurs que la formation de R-loops interfère au niveau de la synthèse d'ARNm pleine longueur, ce qui affecte la viabilité cellulaire, et que ce problème est corrigé par la surproduction de RNase HI (Baaklini *et al.* 2004). Il fut également démontré que les R-loops affectent significativement la synthèse des ARNr au niveau de l'élongation de la transcription, ce qui affecte nécessairement la croissance bactérienne (Hraiky *et al.* 2000). Il a aussi été suggéré que les complexes transcriptionnels bloqués par les R-loops pourraient interférer avec la progression des fourches de réplication menant à l'effondrement de celles-ci et à de l'instabilité génomique (Drolet *et al.* 1995; Drolet *et al.* 2003; Huertas et Aguilera 2003). Les R-loops pourraient aussi médier l'initiation aberrante de la réplication de l'ADN («constitutive stable DNA replication, cSDR») chez les bactéries (Kogoma 1997).

## **5.2. Terminaison de la transcription**

Après l'initiation de la transcription, l'ARN polymérase perd sa sous-unité sigma ( $\sigma$ ) qui est responsable de la reconnaissance des différents sites promoteurs sur l'ADN. Le noyau de l'ARN polymérase («core enzyme»), qui est constitué de 2 sous-unités alpha,

une sous-unité bêta et une sous-unité bêta prime ( $\alpha_2\beta\beta'$ ), va ensuite entrer dans un état d'élongation de la transcription jusqu'à ce qu'il rencontre une séquence spécifique de terminaison sur le brin matrice d'ADN. La terminaison de la transcription a lieu lorsque l'ARN naissant est relâché de son complexe avec l'ARN polymérase et le brin matrice d'ADN. L'habileté de l'ARN polymérase de cesser l'élongation et de relâcher le transcrit à la fin d'un gène est essentielle à sa bonne expression. La terminaison peut se produire spontanément à certaines séquences ou être médiée par l'action d'un facteur protéique dit de terminaison. On parlera alors de terminaison intrinsèque ou de terminaison Rho-dépendante (facteur-dépendante). Habituellement, les terminateurs intrinsèques se retrouvent à la fin des gènes ou des opérons et à des sites régulateurs précédant les gènes (atténuateurs), alors que la majorité des terminateurs Rho-dépendants sont situés à l'intérieur des gènes (Richardson *et al.* 1996). Dans les deux cas, des éléments importants des sites de terminaison sont transcrits avant que la translocation de l'ARN polymérase ne soit arrêtée, ainsi les ARN produits sont des éléments actifs du mécanisme de terminaison.

### **5.2.1. Terminaison intrinsèque**

#### **5.2.1.1. Séquences des terminateurs**

Un grand nombre de terminateurs intrinsèques ont été identifiés chez *E. coli* et l'analyse de leur séquence a révélée plusieurs motifs très distincts. Ils sont caractérisés par environ 20 pb d'une séquence palindromique riche en G/C suivi d'une série de A sur le brin matrice d'ADN. De plus, la séquence d'ADN devant l'ARN polymérase au site de terminaison pourrait bien également jouer un rôle dans la terminaison intrinsèque

(Reynolds et Chamberlin 1992). Ces séquences pourraient influencer le déroulement de l'ADN ou la progression de l'enzyme le long de l'ADN. Ainsi, lors de la transcription, la région palindromique est transcrite par une ARN polymérase qui aurait rejoint le site de terminaison et ceci donnerait naissance à un segment d'ARN qui aurait la capacité de former une boucle d'appariement très stable dite en épingle à cheveux. Cette épingle à cheveux est suivie d'une série de 7-9 U dans l'ARN naissant. Il y a des évidences considérables que ces motifs sont une partie importante de ces terminateurs. Effectivement, si on empêche la formation de l'épingle à cheveux, soit par l'insertion de mutations (Cheng *et al.* 1991) ou à l'aide d'oligonucléotides complémentaires à celle-ci (Fisher et Yanofsky 1983), l'efficacité de la terminaison est grandement affectée. Il en est de même pour la suite de A dans le brin matrice de l'ADN, si on introduit des mutations dans cette séquence, on affecte également la terminaison (Lynn *et al.* 1988).

#### 5.2.1.2. Fonctionnement des terminateurs intrinsèques

Malgré la simplicité de la morphologie des terminateurs intrinsèques, le mécanisme moléculaire menant au largage du transcrit au point de terminaison n'a été que tout récemment compris. L'ancien modèle stipulait que la formation de l'épingle à cheveux dans l'ARN naissant provoquait une pause dans la transcription et ceci augmentait la probabilité que le complexe transcriptionnel se dissocie. Le largage final de l'ARN se faisait spontanément dû au démantèlement d'une partie de l'hybride dans la bulle de transcription par l'épingle à cheveux, alors que l'instabilité causé par la série de U (les hybrides rU-dA sont beaucoup moins stables que les autres hybrides) menait ultimement au déplacement de l'ARN naissant et à la reformation du duplex d'ADN (Martin et

Tinoco 1980; Farnham et Platt 1981; von Hippel et Yager 1992). Cependant, de récentes études ont plutôt confirmé que le rôle principal de la série de U dans l'ARN naissant serait de provoquer la pause de l'ARN polymérase. Ce type de faible hybride (rU-dA) provoquerait de l'instabilité, ce qui laisserait le temps à l'épingle à cheveux de se former, et elle, à son tour, provoquerait la dissociation du complexe (Wang *et al.* 1995; Gusarov et Nudler 1999). La provocation artificielle de la pause du complexe transcriptionnel au point de terminaison élimine la nécessité de la série de U dans l'ARN. Ainsi, l'épingle à cheveux ne provoque pas la pause au site de terminaison, c'est la pause qui permet la formation de celle-ci (Nudler et Gottesman 2002). Par contre, on ne sait toujours pas si la bulle de transcription a un rôle à jouer dans la terminaison intrinsèque. La rupture de la bulle de transcription pourrait simplement être une conséquence de la terminaison, alors qu'elle pourrait alternativement avoir un rôle actif dans le processus (Nudler et Gottesman 2002).

#### 5.2.1.3. Rôle de NusA dans la terminaison intrinsèque

Finalement, même si la terminaison intrinsèque ne requiert pas de facteurs pour avoir lieu *in vitro*, certaines protéines cellulaires contrôlent de près ce processus *in vivo*. Par exemple, la protéine NusA améliore significativement l'efficacité de certains terminateurs *in vitro* et *in vivo* (Ward et Gottesman 1981; Farnham *et al.* 1982; Schmidt et Chamberlin 1987; Bermudez-Cruz *et al.* 1999). NusA se fixe à l'ARN polymérase peu de temps après l'initiation de la transcription suite à la dissociation du facteur  $\sigma$  (Squires et Zaporozets 2000), elle ne peut pas se lier à l'holoenzyme (Richardson et Greenblatt 1996). Ainsi, NusA remplace le facteur  $\sigma$  durant l'élongation et pourrait occuper le

même site de fixation sur le noyau de l'ARN polymérase. Le mécanisme par lequel NusA stimule la terminaison inclut des composantes cinétiques et mécaniques. NusA réduit le taux d'élongation général *in vitro* (Kingston et Chamberlin 1981; Burns et al. 1998). NusA pourrait donc stimuler la terminaison en prolongeant les pauses au point de terminaison (Farnham *et al.* 1982; Schmidt et Chamberlin 1987; Gusarov et Nudler 2001). Cependant, le rôle majeur de NusA dans la terminaison est dû à un effet direct sur la formation de l'épingle à cheveux. En effet, NusA supprimerait l'empêchement stérique à la formation de l'épingle à cheveux imposé par l'ARN polymérase (Gusarov et Nudler 2001).

## **5.2.2. Terminaison Rho-dépendante (facteur-dépendante)**

### 5.2.2.1. Séquences des terminateurs

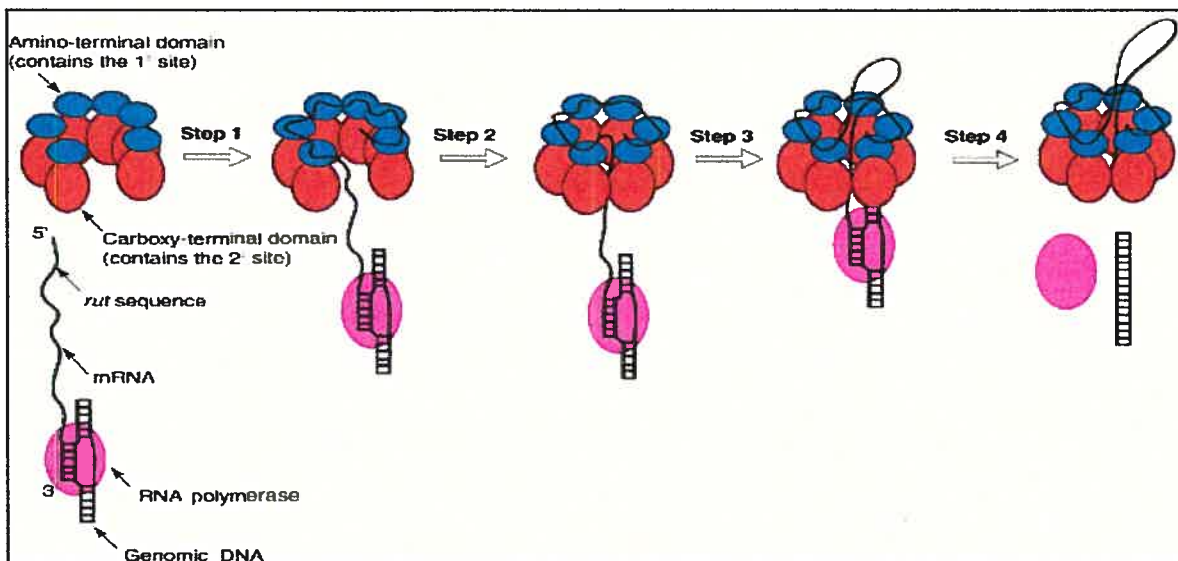
Les terminateurs Rho-dépendants consistent en deux parties distinctes, se chevauchant partiellement, qui s'étendent sur plus de 150-200 pb d'ADN (Richardson 1990). Une partie est la région où la terminaison a lieu, le « transcription stop point » (tsp), alors que l'autre est une région en amont essentielle appelée *rut* (« Rho ut<sup>il</sup>ization sites »). Donc, une différence fondamentale entre les sites de terminaison Rho-dépendants et les terminateurs intrinsèques est que ces premiers s'étendent sur des régions beaucoup plus vastes. Les séquences caractérisant les terminateurs Rho-dépendants sont très diverses et ne forment pas de consensus. Cependant, il existe certaines limites dans le type de séquences formant la région *rut*, puis la position des points de terminaison dans la région tsp est gouvernée par certaines séquences dans cette région.

La séquence *rut* sur le transcrit d'ARN représente le point d'entrée de la protéine Rho. En effet, des expériences utilisant des oligonucléotides complémentaires à cette région ont démontré que ceux-ci bloquent spécifiquement la terminaison Rho-dépendante (Chen et Richardson 1987). Rho est une protéine qui a une forte affinité pour les transcrits contenant des régions poly(C) d'ARN simple brin (Galluppi et Richardson 1980). Ainsi, l'analyse des régions *rut* a démontré qu'elles consistent en des segments qui n'ont pas tendance à former des structures avec d'autres brins et qu'elles comportent une proportion en C plus importante que la moyenne (Morgan *et al.* 1985).

Les exigences des séquences des régions *tsp* sont encore moins bien définies. L'analyse de la cinétique de l'élongation de la transcription dans la région *tsp* sans le facteur Rho a montré que la distribution des sites de pause corrèle très fortement avec la distribution des points de terminaison Rho-dépendants (Morgan *et al.* 1983). Cette corrélation suggère que Rho entraîne l'ARN polymérase à terminer la transcription préférentiellement à des sites de pause naturels en aval d'une séquence *rut*. Ainsi, l'action de Rho semble être cinétiquement liée au déplacement de l'ARN polymérase le long du brin d'ADN matrice (Jin *et al.* 1992). Un mutant Rho qui agit lentement ne termine pas efficacement, mais ceci peut être compensé si on diminue le taux d'élongation de la transcription; soit avec des ARN polymérases mutées ou en diminuant la concentration des NTPs.

### 5.2.2.2. La protéine Rho

Cette protéine est un hexamère (6 sous-unités identiques) constitué d'un polypeptide (1 sous-unité) de 419 acides aminés (Pinkham et Platt 1983). L'hexamère est en fait un dimère de trimère (Bear *et al.* 1985). L'extrémité N-terminale (les 125 premiers acides aminés) possède une activité de liaison de l'ARN et l'extrémité C-terminale un domaine pour lier l'ATP (Richardson 2003). La protéine Rho est une ATPase ARN-dépendante (Lowery et Richardson 1977). En effet, son interaction avec certaine molécule d'ARN lui permet de catalyser l'hydrolyse d'ATP en ADP et  $P_i$ . Fonctionnellement, l'interaction de Rho avec le transcrit d'ARN au site *rut* stimule l'activité ATPase de celle-ci, puis Rho poursuit l'ARN polymérase le long de l'ARN et entraîne finalement la dissociation du transcrit d'ARN et du complexe transcriptionnel au site de pause (figure 2).



**Figure 2.** La terminaison Rho-dépendante. Le domaine N-terminal de Rho (bleu) se fixe à la séquence *rut* sur l'ARNm lorsqu'il n'est pas masqué par des ribosomes. Ensuite, le domaine C-terminal de Rho (rouge) est responsable de la fixation de l'ARNm en aval de la séquence *rut*, puis l'hexamère protéique circulaire Rho se referme. Le domaine C-terminal participe à l'hydrolyse d'ATP qui fournit l'énergie nécessaire à la «propulsion» de Rho de la direction 5' vers 3'. Finalement, l'activité hélicase de Rho lui permet de dissocier l'ARN naissant du brin matrice de l'ADN génomique et de l'ARN polymérase (magenta). Tiré de Kaplan et O'Donnell 2003.



L'activité hélicase ARN-ADN 5' vers 3' A'P-dépendante de la protéine Rho facilite la terminaison en dissociant l'hybride ARN-ADN dans la bulle de transcription (Steinmetz et Platt 1994). La protéine Rho aurait une forme ouverte lorsqu'elle contacte le site *rut*, puis adopterait ensuite une conformation en cercle fermé autour de l'ARN naissant (Richardson 2003).

Cependant, il existe toujours deux modèles sur le fonctionnement de Rho. Dans le premier, nommé le «tethered tracking model», Rho resterait attaché à la séquence *rut* pendant sa translocation vers l'extrémité 3' de l'ARNm (Steinmetz et Platt 1994). Dans le deuxième modèle, le «tracking model», Rho migrerait sur l'ARN sans maintenir son contact initial (Geiselman *et al.* 1993). Il n'y a pas encore de données qui permettent d'apporter des preuves définitives pour ces deux modèles. Cependant, l'attachement de Rho à une séquence *rut* et le couplage cinétique sont essentiels: c'est-à-dire que l'ARN polymérase doit ralentir ou faire une pause afin que Rho la rattrape et provoque la terminaison de la transcription.

#### 5.2.2.3. Rôles de NusA et NusG dans la terminaison Rho-dépendante

Il a été démontré que NusA et NusG interagissent physiquement avec l'ARN polymérase (Greenblatt et Li 1981; Li *et al.* 1992), et que le site de fixation de celles-ci ne se superpose pas. Elles interagissent également avec la protéine Rho (Schmidt et Chamberlin 1984; Li *et al.* 1993).

NusA ralentit le taux d'élongation de l'ARN en augmentant le temps des pauses de l'ARN polymérase à certains sites de pause naturels (Farnham *et al.* 1982; Kassavetis et Chamberlin 1981; Landick et Yanofsky 1984; Lau *et al.* 1983). Un lien entre NusA et Rho *in vivo* a été suggéré par le fait que le gène *nusA* n'est plus essentiel dans des cellules contenant un facteur Rho déficient dans la terminaison de la transcription (Zheng et Friedman 1994). Zheng et Friedman proposent d'ailleurs que le rôle principal de NusA soit d'augmenter le temps des pauses de l'ARN polymérase à certains sites, permettant un couplage serré de la transcription et de la traduction. Ce couplage interfère donc avec l'accès ou le mouvement de Rho sur le transcrit naissant et bloque la terminaison prématurée de la transcription.

Le rôle de NusG dans la terminaison a premièrement été démontré par les travaux de Sullivan et Gottesman qui ont prouvé que certains terminateurs Rho-dépendants ne fonctionnaient plus efficacement chez des cellules qui ont une pénurie de NusG (Sullivan et Gottesman 1992). Leurs travaux ont aussi montré que la déplétion de NusG n'avait pas d'effets sur les terminateurs intrinsèques et moins d'effets sur certains terminateurs Rho-dépendants que sur d'autres. Ainsi, NusG pourrait servir à amener Rho au complexe transcriptionnel et favoriser son interaction avec l'ARN pour provoquer la terminaison.

Cependant, d'autres travaux ont prouvé que NusG réduit le temps des pauses, et que ceci entraîne donc une augmentation du taux de transcription (Burova *et al.* 1995; Burns *et al.* 1998). Si l'ARN polymérase transcrit plus vite, Rho possède donc moins de temps pour agir. Ainsi, ces résultats semblent être en contradiction avec la théorie du simple

couplage cinétique entre l'action de Rho et l'élongation de la chaîne d'ARN. Si NusG réduit le temps des pauses, il ne devrait pas dans ce cas favoriser la terminaison Rho-dépendante. Cependant, même si NusG accélère le taux d'élongation de ~25% (Burns *et al.* 1998), NusG peut tout de même améliorer l'efficacité de la terminaison Rho-dépendante car il favorise le largage du transcrit d'ARN par un facteur encore plus important (Burns *et al.* 1999). En fait, Burns *et al.* affirment que l'interaction de NusG avec l'ARN polymérase provoquerait des changements dans l'état du complexe de transcription qui serait alors plus susceptible à l'action de Rho.

Dans ce contexte, puisque NusG donne moins de temps à Rho pour agir sur un complexe transcriptionnel situé à un site de pause, et NusA plus de temps, Burns *et al.* suggèrent que ces protéines sont probablement impliquées dans d'autres étapes de l'action de Rho, plutôt que de seulement affecter l'étendue des pauses à ces sites. Ils proposent d'ailleurs que NusG et NusA puissent accélérer et retarder, respectivement, le taux de dissociation du transcrit.

#### 5.2.2.4. Fonctions de Rho dans la cellule

Comme précédemment mentionné, les terminateurs Rho-dépendants sont fréquemment retrouvés dans les gènes et non exclusivement à la fin de ceux-ci, leur position attendue. Cependant, ceux situés dans les gènes sont seulement fonctionnels lorsque l'ARNm n'est pas traduit par des ribosomes. Puisque Rho doit se lier à l'ARNm pour effectuer la terminaison, elle ne pourra s'y lier si des ribosomes sont en train de traduire l'ARNm émergeant de l'ARN polymérase. Cette caractéristique de Rho explique la très grande

spécificité de son action: les terminateurs sont situés dans des régions d'ADN qui ne codent pas pour des ARNm fonctionnels, comme par exemple la fin des opérons (Richardson et Greenblatt 1996). C'est aussi pour cette raison que la transcription et la traduction sont intimement couplées chez *E. coli*. De cette manière, la cellule s'assure du bon fonctionnement des deux mécanismes et prévient la terminaison prématurée de la transcription par l'action de la protéine Rho. Ainsi, les ARNm qui ne sont pas traduits, peu importe pour quelles raisons, subiront une terminaison prématurée pour prévenir la synthèse inutile d'un transcrit qui ne sera pas traduit. D'ailleurs, il est possible que la terminaison Rho-dépendante soit également un mécanisme qui permet d'éliminer la possibilité de formation des R-loops, puisque ceux-ci peuvent être très néfastes pour la survie cellulaire. Plusieurs observations génétiques ont fourni des évidences indirectes que les mutants déficients en NusG ou Rho souffrent d'une augmentation de présence de R-loops sur le chromosome (Harinarayanan et Gowrishankar 2003; Gowrishankar et Harinarayanan 2004).

Dans ce cas, qu'est-ce qui protège les transcrits qui ne sont pas traduits de l'action de Rho? Ceci est particulièrement vrai pour les ARNr. Les ARNr ne sont pas affectés par la terminaison Rho-dépendante car ils possèdent une structure secondaire complexe et peu de portions sont libres pour la liaison de la protéine Rho (Richardson et Greenblatt 1996). De plus, les protéines ribosomiques se fixent sur l'ARNr naissant et ceci pourrait leur apporter une protection supplémentaire. Aussi, les 7 opérons *rrn* chez *E. coli* possèdent un mécanisme qui leur procure une immunité face à l'action de Rho (Aksoy *et al.* 1984).

En effet, ces opérons possèdent une séquence au début des gènes qui leur confère un système d'antiterminaison (voir section 5.3.).

### 5.3. Antiterminaison de la transcription

L'antiterminaison de la transcription est un processus qui implique plusieurs protéines cellulaires et qui transforme le complexe transcriptionnel pour le rendre résistant à la terminaison de la transcription. Deux systèmes partageant des similarités sont bien connus, celui du bactériophage lambda ( $\lambda$ ) et celui des opérons ribosomiques (*rrn*) chez *E. coli*. Le système du phage  $\lambda$  a été le premier étudié et est mieux caractérisé.

#### 5.3.1. Système d'antiterminaison du bactériophage $\lambda$

La régulation de la transcription durant le cycle lytique du phage  $\lambda$  implique les protéines phagiques N et Q. Elles participent à une cascade de deux mécanismes d'antiterminaison. La protéine N participe à l'antiterminaison de la transcription des gènes précoces, alors que la protéine Q participe à celle des gènes tardifs. Seule l'antiterminaison par la protéine N sera ici expliquée étant donné sa similarité avec le système d'antiterminaison des opérons *rrn*.

Tout d'abord, la protéine N augmente la vitesse de transcription (Mason *et al.* 1992; Rees *et al.* 1997). L'antiterminaison par N nécessite une séquence spécifique agissant *in cis*, le site *nut* («N utilization»). Un site *nut* est localisé entre le promoteur et le terminateur de chacun des deux opérons précoces du phage  $\lambda$ . Ce type d'arrangement est également

retrouvé chez les phages  $\phi 21$  et P22, qui ont aussi la protéine N et des sites *nut* (Richardson et Greenblatt 1996). Ainsi, N doit affecter l'ARN polymérase de la bactérie hôte près du promoteur de façon à ce qu'elle soit modifiée lorsqu'elle arrive au terminateur qui peut être loin en aval. N permet à l'ARN polymérase de transcrire au travers des terminateurs intrinsèques et Rho-dépendants. Les sites *nut* des phage  $\lambda$ ,  $\phi 21$  et P22 sont caractérisés par deux séquences spécifiques appelées *boxA* et *boxB*. La séquence *boxA* de ces phages, d'une longueur de 12 nt, est très semblable et possède une séquence consensus (CGCTCTTTA). La séquence *boxB*, d'une longueur de 15 nt, varie considérablement d'un phage à l'autre, mais consiste en une séquence palindromique dans l'ADN permettant la formation d'une épingle à cheveux dans l'ARN naissant. Il est important de souligner que c'est l'ARN naissant de ces séquences qui a un rôle actif et non l'ADN. Cependant, d'autres facteurs sont nécessaires pour transformer l'ARN polymérase en un complexe résistant à la terminaison. En effet, certaines protéines cellulaires de l'hôte participent à cette transformation. Les 4 protéines connues participant à l'antiterminaison par la protéine N sont NusA, NusB, NusE (protéine ribosomique S10) et NusG.

### **5.3.2. Fonctionnement du système d'antiterminaison du phage $\lambda$**

Fonctionnellement, la transcription du site *nut* initie la formation d'un complexe ribonucléoprotéique constitué de N, des facteurs Nus, de l'ARN du site *nut* et de l'ARN polymérase. Plusieurs faibles interactions individuelles protéines-protéines et protéines-ARN sont nécessaires à la formation du complexe et il en résulte un assemblage très stable. N se lie d'abord à l'ARN *boxB* lorsqu'il est transcrit et ce complexe se fixe

ensuite à un autre complexe constitué de l'ARN polymérase et de NusA, par la formation d'une boucle dans l'ARN naissant (Richardson et Greenblatt 1996). Finalement, les protéines NusB et NusE forment un hétérodimère et se fixe à la séquence *boxA* (Mason *et al.* 1992), ce qui mène à la fixation des autres facteurs Nus et de la séquence *boxA* du phage  $\lambda$  (CGCTCTTACACA) au complexe ARN polymérase/N/*boxB*/NusA. Ainsi, le complexe transcriptionnel peut maintenant résister aux terminateurs qu'il rencontre (Das 1993).

### 5.3.3. Mécanisme d'action du système d'antiterminaison du phage $\lambda$

Le mécanisme par lequel N supprime la terminaison intrinsèque a été étudié en détail dans un système d'antiterminaison sans NusB, NusE, NusG et la séquence *nut* (Gusarov et Nudler 2001). Des expériences de cinétique ont démontré que la suppression des pauses par N n'était pas suffisante pour justifier ses capacités d'antiterminaison (Rees *et al.* 1997; Gusarov et Nudler 2001), il fallait donc trouver une autre explication. Ainsi, il semblerait qu'en la présence de N, NusA contacterait une section de l'épingle à cheveux de terminaison avant sa formation par un de ses domaines de liaison à l'ARN, le domaine S1. Le domaine S1 serait aussi impliqué dans la liaison au site *nut* (Friedman et Olson 1983; Mah *et al.* 1999). En effet, NusA ne peut pas se fixer à l'ARN par elle-même *in vitro* (Gusarov et Nudler 2001). En plus du domaine S1, deux autres domaines seraient responsables de lier l'ARN, des domaines appelés KH («K homology domains») (Mah *et al.* 1999; Gopal *et al.* 2001; Worbs *et al.* 2001).

Ceci a mené au modèle des 2 molécules de NusA dans le complexe d'antiterminaison qui corroborait alors les anciennes observations effectuées par Greenblatt et associés (Horwitz *et al.* 1987; Gusarov et Nudler 2001). Dans ce modèle, l'ARN polymérase activerait le domaine S1 de la première molécule NusA (liaison au site *nut*), alors que N activerait le domaine S1 de la deuxième molécule de NusA (liaison à une section de l'épingle à cheveux non formée). De cette façon, NusA empêcherait la formation de l'épingle à cheveux et ainsi la terminaison intrinsèque de la transcription. Les autres facteurs Nus stabiliseraient le complexe d'antiterminaison et participeraient au recrutement de N (Gusarov et Nudler 2001). Alternativement, il a aussi été suggéré que N inhibe l'activité de terminaison de NusA en forçant le domaine S1 d'une seule molécule à se lier au site *nut* plutôt qu'à l'extrémité 3' de l'ARN naissant (Mah *et al.* 2000). De son côté, le mécanisme responsable de l'inactivation de la terminaison Rho-dépendante est moins bien compris. Même si les facteurs en jeu sont les mêmes, le mécanisme d'antiterminaison dans ce cas-ci pourrait être relativement différent.

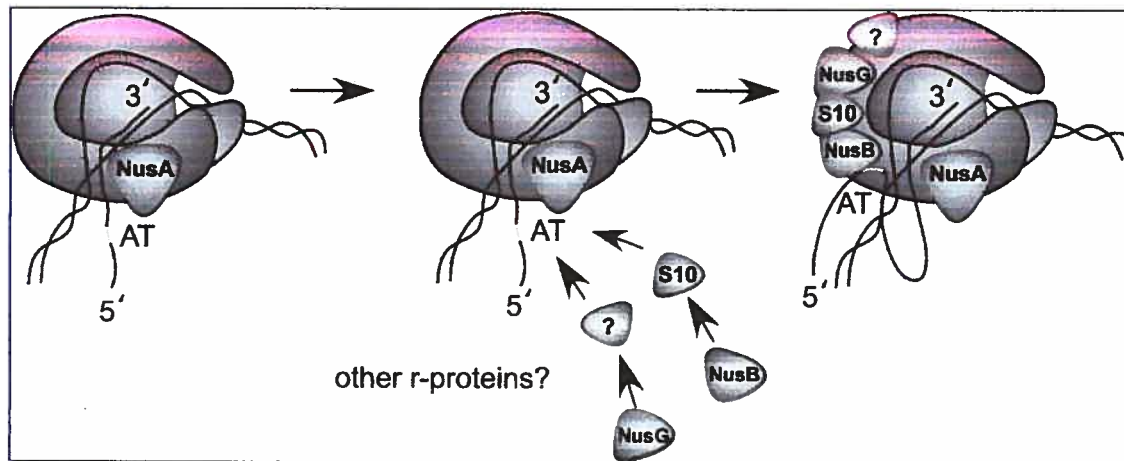
#### **5.3.4. Système d'antiterminaison des opérons *rrn* chez *E. coli***

Il y a 7 opérons *rrn* chez *E. coli*. Chacun d'entre eux est structuré de façon semblable; le premier gène est celui de l'ARNr 16S, suivi de l'ARNr 23S, puis de l'ARNr 5S. De plus, 1 ou 2 gènes différents codant pour des ARNt se retrouvent dans la région séparant l'ARNr 16S et 23S, et ils se retrouvent également quelquefois à l'extrémité des opérons *rrn* (Condon *et al.* 1995). Des séquences homologues au site *nut* du phage  $\lambda$  établissent un système d'antiterminaison chez les opérons *rrn*. Ces séquences d'antiterminaison confèrent une résistance aux terminateurs Rho-dépendants, mais pas aux terminateurs



intrinsèques des opérons *rrn*. Elles sont situées juste à la suite du promoteur P2, et les transcrits à partir de P1 et P2 seront soumis à l'antiterminaison. De plus, une autre séquence est retrouvée entre les gènes des ARNr 16S et 23S, suggérant que le complexe transcriptionnel doit être rechargé après la transcription du gène 16S (Berg *et al.* 1989; Morgan 1986; Pfeiffer et Hartmann 1997). Ces éléments sont divisés en 3 sous-domaines: la *boxB*, la *boxA* et la *boxC*. La *boxA* est une séquence conservée (TGCTCTTTAACA) et à elle seule suffisante pour établir l'antiterminaison *in vivo* et *in vitro*, la *boxB* est une séquence pouvant former une épingle à cheveux ne possédant pas de conservation de séquence apparente, alors que la *boxC* est une séquence conservée dont on ne connaît pas vraiment le rôle (Berg *et al.* 1989; Squires *et al.* 1993; Condon *et al.* 1995). Si la séquence *boxA* est insérée après le promoteur du gène *lacZ*, on passe d'un taux d'élongation de l'ARN de 40-50 nt/s à 70-80 nt/s et l'élongation de la transcription devient insensible au ppGpp, une molécule qui réduit le taux d'élongation à ~20 nt/s durant la réponse stringente (Vogel et Jensen 1995).

Les facteurs Nus impliqués dans l'antiterminaison par la protéine N du phage  $\lambda$  sont aussi en cause dans le système d'antiterminaison des opérons *rrn* (figure 3). D'ailleurs, la protéine NusA semble aussi avoir un rôle important dans ce processus car elle serait responsable de l'augmentation du taux d'élongation (Vogel et Jensen 1997). De plus, d'autres groupes ont trouvé que NusB et NusG participent également à la modulation du taux d'élongation de la transcription de ces opérons (Zellars et Squires 1999; Torres *et al.* 2001; Torres *et al.* 2004).



**Figure 3.** L'antitermination de la transcription. Modification du complexe d'élongation de la transcription, qui est montré avec la protéine NusA qui y est déjà attachée, par l'association des protéines NusB, S10 (NusE) et NusG à la séquence d'antitermination *boxA* (AT) et l'ARN polymérase. D'autres protéines (ribosomiques ?) toujours inconnues pourraient participer à ce mécanisme. Tiré de Squires et Zaporozets 2000.

Cependant, en plus des facteurs NusA, NusB, NusE et NusG, un ou plusieurs facteurs n'ont toujours pas été identifiés car le système d'antitermination ne fonctionne pas *in vitro* (Squires *et al.* 1993). D'ailleurs, il a été démontré que la protéine ribosomique S4 agit comme un facteur général d'antitermination, avec des propriétés très similaires à NusA (Torres *et al.* 2001). S4 se fixe à l'ARN polymérase et augmente la capacité de l'ARN polymérase à continuer de transcrire malgré la présence de terminateurs Rho-dépendants («read-through»), et ce même en absence du motif d'antitermination de la transcription des opérons *rrn* (Torres *et al.* 2001). Tout comme pour le système d'antitermination des opérons *rrn*, S4 agit sélectivement aux terminateurs Rho-dépendants et pas aux terminateurs intrinsèques. En terminant, le ou les facteurs manquants jouent probablement un rôle similaire à celui de la protéine N chez le phage  $\lambda$ .

### 5.3.5. Fonctionnement du système d'antiterminaison des opérons *rrn*

Le système d'antiterminaison des opérons *rrn* est très fonctionnellement semblable à celui du bactériophage  $\lambda$ . Les protéines NusB et NusE interagissent pour former un hétérodimère (Mason *et al.* 1992) et celui-ci est capable de se fixer à l'ARN de la séquence *boxA* (Nodwell et Greenblatt 1993). Il y aurait ensuite la formation d'une boucle dans l'ARN naissant pour contacter l'ARN polymérase, un mécanisme similaire au modèle d'antiterminaison du phage  $\lambda$  par la protéine N, et association des autres facteurs Nus et d'un ou plusieurs facteurs inconnus qui modifient donc l'ARN polymérase en un complexe résistant aux terminateurs Rho-dépendants (Richardson et Greenblatt 1996).

### 5.3.6. Mécanisme d'action du système d'antiterminaison des opérons *rrn*

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la manière dont le complexe transcriptionnel modifié résiste aux terminateurs Rho-dépendants. Ainsi, la présence des autres facteurs Nus dans l'entourage de NusG pourrait empêcher Rho d'interagir avec NusG (Richardson et Greenblatt 1996). Alternativement, NusG, étant associé de façon stable au complexe modifié, pourrait séquestrer la protéine Rho et prévenir son mouvement de translocation vers la bulle de transcription (Li *et al.* 1993). Il a été suggéré que la terminaison Rho-dépendante repose sur le couplage cinétique entre l'ARN polymérase et Rho (Jin *et al.* 1992). Ainsi, il est possible que l'ARN polymérase modifié par le système d'antiterminaison échappe tout simplement à la terminaison Rho-dépendante en fuyant la protéine Rho car elle transcrit plus rapidement les ARNr que les ARNm (Condon *et al.* 1995; Jin *et al.* 1992; Vogel et Jensen 1997).

### 5.3.7. Rôles alternatifs du système d'antiterminaison des opérons *rrn*

En plus de son rôle dans la prévention de la polarité dans les opérons *rrn*, 2 autres rôles ont été proposés pour le système d'antiterminaison des opérons *rrn*. Premièrement, il participerait à la maturation des ARNr 16S et 23S à partir du transcrit d'ARNr précurseur 30S (Morgan 1986). Même s'il n'y a pas d'évidences approuvant cette idée, elle est en accord avec la présence d'une deuxième *boxA* dans la région entre les ARNr 16S et 23S. Deuxièmement, il modulerait le taux d'élongation de la transcription de manière à permettre le bon repliement des ARNr (Squires *et al.* 1993). En effet, si on altère le taux d'élongation en transcrivant un opéron *rrn* avec l'ARN polymérase du phage T7, une polymérase qui transcrit à un taux jusqu'à 5 fois supérieur à celui de l'ARN polymérase d'*E. coli*, on obtient des ribosomes non fonctionnels à cause d'un mauvais repliement de l'ARNr (Lewicki *et al.* 1993).

### 5.3.8. Régulation de l'antiterminaison

La synthèse des ARNr et des protéines ribosomiques («r-proteins») est étroitement régulée dans la cellule. En bref, presque tous les opérons des protéines ribosomiques encodent des facteurs qui sont des répresseurs traductionnels agissant sur leur propre ARNm polycistronique. Ceci mène à l'inhibition de la synthèse de toutes les protéines ribosomiques encodées par l'ARNm. Tant que la synthèse des ARNr continue, les protéines ribosomiques, qui agissent comme répresseurs sur leur propre synthèse, sont incorporées dans les ribosomes et ces opérons continuent donc d'être exprimés. Lorsque la synthèse des ARNr décline, la concentration des répresseurs augmente et l'expression des opérons des protéines ribosomiques est réprimée (Nomura 1999).

Puisqu'il y a une régulation de la synthèse des ARNr et des protéines ribosomiques et que la protéine ribosomique S10 (NusE) est impliquée dans l'antiterminaison de la transcription des opérons *rrn*, il est possible qu'il y ait d'autres protéines de ce type qui affectent l'antiterminaison de la transcription. Ainsi, il a été démontré que la protéine ribosomique S1 se fixe à la séquence *boxA* et empêche donc la liaison de l'hétérodimère NusB-NusE à cette séquence (Mason et Greenblatt 1992; Nodwell et Greenblatt 1993; Mogridge et Greenblatt 1998). Ceci soulève la possibilité d'un rôle de régulation négative de la protéine ribosomique S1 dans l'antiterminaison des opérons *rrn in vivo*. De plus, comme précédemment mentionné, la protéine ribosomique S4 aurait aussi des propriétés d'antiterminaison similaires à NusA et elle peut se lier à l'ARN polymérase (Squires et Zaporjets 2000; Torres *et al.* 2001). Finalement, les protéines ribosomiques S2, L1, L3 et L4 ont aussi été identifiées comme faisant partie d'un complexe de transcription des ARNr en utilisant un extrait cellulaire soluble (Squires et Zaporjets 2000), cependant le rôle de celles-ci n'est pas encore connu.

Alternativement, il se pourrait que ces protéines ribosomiques n'aient pas de rôle direct dans l'antiterminaison de la transcription des opérons *rrn*, mais qu'elles sont simplement «livrées» via le système d'antiterminaison sur leurs sites de fixation sur l'ARN naissant (Torres *et al.* 2001). Ceci faciliterait l'assemblage des ribosomes en augmentant la concentration locale des protéines ribosomiques et en stabilisant le complexe au fur et à mesure que les structures sont transcrites (Torres *et al.* 2001). Il s'agit ainsi peut-être d'une façon de s'assurer de la synthèse équilibrée des composantes des ribosomes, soient les ARNr et les protéines ribosomiques. En terminant, la fixation des protéines

ribosomiques sur l'ARNr permet aussi probablement de le protéger de l'attaque des ribonucléases, un mécanisme qui serait comparable à la protection offerte par les ribosomes sur l'ARNm (voir section 5.4.8.).

## 5.4. Maturation et dégradation des ARNm

Chez tous les organismes, l'ARNm est un intermédiaire dans la conversion de l'information génétique contenu dans l'ADN en protéines fonctionnelles. Chez les procaryotes, les ARNm sont synthétisés et dégradés rapidement, fournissant aux organismes un excellent mécanisme pour réguler l'expression génique et s'adapter aux changements rapides de l'environnement.

Une particularité chez les bactéries est la présence d'ARNm polycistroniques qui forment de larges transcrits de plusieurs gènes à partir d'un promoteur unique. Plusieurs de ces larges transcrits sont ensuite transformés en de plus petits transcrits lors de la maturation de façon à contrôler l'expression de gènes spécifiques à l'intérieur de chaque opéron. De plus, les ARNm peuvent subir des modifications post-transcriptionnelles par l'ajout d'une queue poly(A) qui modifie la stabilité des transcrits. Également, un autre élément qui affecte la stabilité de l'ARNm est le couplage entre la transcription et la traduction chez les bactéries. En effet, le couplage est nécessaire pour plusieurs raisons, incluant la prévention de la formation de structures secondaires dans l'ARNm ainsi que la possibilité de directement protéger les transcrits de la dégradation par des endo- ou exonucléases.

#### **5.4.1. Enzymes impliquées dans la maturation et la dégradation des ARNm**

Les bactéries contiennent plusieurs ribonucléases (RNases), mais elles ne sont pas toutes impliquées dans la maturation et la dégradation des ARNm. De plus, certaines d'entre elles ne sont probablement toujours pas identifiées.

##### 5.4.1.1. Les exonucléases

Les exonucléases sont des enzymes qui dégradent l'ARN à partir de l'extrémité du transcrit, un nucléotide à la fois. Même si elles peuvent commencer la dégradation à partir de l'une ou l'autre des 2 extrémités (3' ou 5'), il ne semble pas y avoir d'exonucléases 5'→3' chez *E. coli* (Deutscher 1993), seulement des exonucléases 3'→5' qui initient donc leur action par la fin du transcrit. Ainsi, la dégradation par les exonucléases ne peut seulement débiter une fois que le transcrit est relargué lors de la terminaison de la transcription, alors que l'extrémité 3' n'est plus protégée par la présence de l'ARN polymérase.

##### *PNPase (pnp)*

La polynucléotide phosphorylase (PNPase) dégrade l'ARNm en employant un mécanisme phosphorolytique générant des nucléotides diphosphates (Godefroy-Colburn et Grunberg-Manago 1972; Soreq et Littauer 1977). Elle est inhibée par les structures secondaires (Spickler et Mackie 2000) et peut remplacer la poly(A) polymérase si cette dernière est inactivée (Mohanty et Kushner 2000). Des analyses couvrant le génome de *E. coli* ont démontré qu'elle est l'exonucléase majeure responsable de la dégradation des ARNm (Mohanty et Kushner 2003).

### RNase II (*rnb*)

La RNase II est aussi une exonucléase 3'→5' mais elle dégrade l'ARN via un processus hydrolytique (Spahr 1964). Pour bien fonctionner, elle nécessite la présence d'ions  $Mg^{2+}$  et  $K^+$  et elle est fortement inhibée par les structures secondaires (Spickler et Mackie 2000). De plus, il a été également démontré que la RNase II peut, d'une certaine façon, protéger les molécules d'ARN de la dégradation en enlevant progressivement les nucléotides de l'extrémité 3' jusqu'à ce qu'elle rencontre une structure d'épingle à cheveux stable. À ce stade l'enzyme se dissocie, mais la molécule d'ARNm n'est maintenant plus un substrat ni pour la RNase II ou la PNPase, ce qui la protège de la dégradation (Coburn et Mackie 1996a).

### RNase R (*rnr*)

En faits, la RNase R a des propriétés catalytiques similaires à celles de la RNase II et est significativement semblable au niveau de sa séquence en acides aminés. Les doubles mutants PNPase et RNase R sont inviables (Chen *et al.* 1998), tout comme les doubles mutants PNPase et RNase II (Donovan et Kushner 1986). La perte de viabilité des doubles mutants PNPase et RNase R est attribuable au défaut de dégradation des ARNr (Cheng et Deutscher 2003). Une étude récente attribue un rôle à la RNase R dans la dégradation des ARNm car elle est exceptionnellement efficace dans la dégradation de molécules contenant des structures secondaires (Cheng et Deutscher 2005). Elle éliminerait les fragments contenant des REP («repetitive extragenic elements», un palindrome d'environ 40 pb) s'il y a présence d'une région d'ARN simple brin, comme les queues poly(A), à laquelle elle peut se fixer.



### Oligoribonucléase (*orn*)

Cette enzyme est une exonucléase 3'→5' qui, contrairement aux autres, est spécifique pour les courts oligonucléotides (Niyogi et Datta 1975; Zhang *et al.* 1998). Elle est essentielle pour la viabilité cellulaire car elle dégrade les courts oligonucléotides qui ne sont plus des substrats pour la PNPase, la RNase II et la RNase R, mais on ne sait toujours pas pourquoi la dégradation de ceux-ci est essentielle pour la survie de la cellule.

#### 5.4.1.2. Les endoribonucléases

Les endoribonucléases ont été traditionnellement définies comme des enzymes qui clivent les liens phosphodiester à distance d'une extrémité du transcrit d'ARN.

### RNase E (*rne*)

La RNase E préfère les séquences riches en A-U d'une longueur de 5 nt présentes dans des régions simples brins de molécules d'ARN (Ehretsmann *et al.* 1992). Cependant, d'autres groupes remettent en question la nature exacte du site de reconnaissance de la RNase E (Kaberdin 2003; McDowall *et al.* 1994; McDowall *et al.* 1995). Plus important encore, l'activité catalytique de la RNase E est fortement stimulée par sa liaison à l'extrémité 5' libre d'une molécule d'ARNm (Mackie 1998) et elle préfère les extrémités 5' monophosphate aux extrémités 5' triphosphate (Spickler *et al.* 2001; Tock *et al.* 2000). Finalement, des études génétiques ont démontré que la RNase E est essentielle à la viabilité cellulaire (Apirion et Lassar 1978; Ono et Kuwano 1979). La RNase E est une grosse protéine pour une RNase (1061 acides aminés), qui est composée de 3 domaines distincts, une région N-terminale catalytique, un domaine central de liaison à l'ARN et

une région C-terminale qui est le site de liaison pour la PNPase, l'ARN hélicase RhlB et l'é nolase (McDowall et Cohen 1996; Vanzo *et al.* 1998; Carpousis 2002).

#### RNase G/CafA (*rng*)

La RNase G a initialement été découverte comme une protéine (CafA) impliquée dans la formation de filaments axiaux cytoplasmiques (Okada *et al.* 1994). Il fut ensuite remarqué que CafA possédait une certaine homologie avec l'extrémité N-terminale de la RNase E (49,5% de similarité et 34,1% d'identité sur les 498 premiers acides aminés (Li *et al.* 1999; Okada *et al.* 1994; Wachi *et al.* 1997)). Des expériences subséquentes ont finalement démontré que *cafA* code pour une endoribonucléase dépendante de l'extrémité 5' (elle doit s'y fixer) possédant une activité catalytique semblable à celle de la RNase E (Li *et al.* 1999; Wachi *et al.* 1999; Tock *et al.* 2000). La RNase G participe à la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 16S avec la RNase E, mais les 2 enzymes clivent à des endroits différents (Li *et al.* 1999; Tock *et al.* 2000; Wachi *et al.* 1999). Cependant, l'inactivation de la RNase G ne mène pas à des altérations phénotypiques majeures chez la cellule. La RNase G peut remplacer la RNase E dans la maturation du précurseur 9S de l'ARNr 5S et la dégradation de plusieurs ARNm, mais ne participe pas à la maturation des ARNt (Ow *et al.* 2003). Finalement, il est clair que la surproduction de la RNase G ne peut pas compléter les mutants RNase E (Deana et Belasco 2004; Ow *et al.* 2003).

#### RNase III (*rnc*)

La RNase III a été initialement découverte comme une enzyme clivant l'ARN double-brin (Robertson *et al.* 1967). Elle est impliquée dans la maturation du précurseur 30S

pour générer les ARNr 16S et 23S (Dunn et Studier 1973). *In vivo*, l'enzyme reconnaît des structures spécifiques en épingle à cheveux et peut cliver d'un des 2 côtés ou de chaque côté de la boucle. Elle initie la dégradation de plusieurs ARNm et la plupart des sites de clivage de la RNase III sont situés en aval ou en amont des séquences codantes. Chez *E. coli*, la délétion du gène *rnc* résulte seulement en un taux de croissance réduit (Babitzke *et al.* 1993; Takiff *et al.* 1989).

#### RNase P (*rnpA/rnpB*)

La RNase P est une enzyme essentielle qui est responsable de la maturation de l'extrémité 5' des précurseurs des ARNt (Altman *et al.* 1995). La RNase P peut cliver les régions intercistroniques des opérons *tna*, *secG*, *rbs*, *his* et *lac*. Un clivage dans ces opérons mène à une altération de la demi-vie des ARNm en aval (Li et Altman 2003). Chez l'opéron *lac*, la RNase P clive dans la région intercistronique entre les gènes *lacY* et *lacA*, ce clivage serait probablement responsable du phénomène de polarité de l'opéron *lac* (Li et Altman 2004).

#### RNase I (*rna*)

La RNase I est une endoribonucléase relativement non spécifique principalement retrouvée dans l'espace périplasmique de *E. coli* (Neu et Heppel 1964). Ainsi, elle n'a jamais été considérée comme jouant un rôle significatif dans la dégradation des ARNm. Cependant, il a été subséquentement découvert qu'une forme modifiée de l'enzyme, appelée RNase I\*, est présente dans le sphéroplaste de la bactérie (Cannistraro et Kennell 1991). Même si ces observations indiquent que l'enzyme pourrait participer à la

dégradation des ARNm, des analyses de mutants comportant l'allèle *rna-19* ont montré qu'il n'y avait pas de changements significatifs dans la dégradation de l'ARN total ou de transcrits particuliers. De plus, un autre groupe n'a pas observé de changements de phénotype chez les mutants ayant une délétion *rna* (Zhu *et al.* 1990).

#### 5.4.1.3. Autres enzymes et protéines impliquées dans la dégradation des ARNm

##### RhlB (*rhlB*)

La protéine RhlB est une ARN hélicase qui a été impliquée dans la dégradation des ARNm car elle co-purifie avec la RNase E et la PNPase (Py *et al.* 1996). Puisque plusieurs molécules d'ARN contiennent des structures secondaires qui inhibent les exonucléases 3'→5', il est justifiable de penser que certains types d'hélicase sont des participants importants de la dégradation des ARNm.

##### Poly(A) polymérase I (PAP I) (*pcnB*)

Cette enzyme est responsable de la polyadénylation (ajout de queue poly(A) à l'extrémité 3' des ARNm) chez *E. coli*. La forme immature de l'ARNr 23S est la cible principale de la PAP I (Mohanty et Kushner 1999). Puisque le niveau de polyadénylation chez *E. coli* est plutôt faible (estimé à 1-2% de l'ARN total), on ne sait pas vraiment si d'autres espèces bactériennes effectuent la polyadénylation de leurs ARNm (Cao et Sarkar 1992; Mohanty et Kushner 1999).

### Hfq (*hfq*)

Hfq a initialement été découverte pour son rôle dans la réplication du bactériophage Q $\beta$  (Franze de Fernandez *et al.* 1968). Cette protéine se lie à l'ADN et à l'ARN, mais semble préférer les séquences riches en A-U. En faits, Hfq contrôle le niveau d'expression d'une variété d'ARNm. Son habileté à se fixer à des séquences riches en A-U, certaines étant des sites de reconnaissance de la RNase E, suggère un rôle de la protéine dans la modulation de la dégradation des ARNm et dans la maturation des ARNt (Moll *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003). Des expériences *in vitro* proposeraient que Hfq protège l'ARN, en particulier les queue poly(A), de la dégradation des exonucléases (Folichon *et al.* 2003). Cependant, les expériences *in vivo* indiquent que Hfq favorise la polyadénylation à des locations spécifiques sur les molécules d'ARNm plutôt que de protéger les queues poly(A) de la dégradation (Mohanty *et al.* 2004).

### RraA

La protéine RraA est capable de se fixer à la RNase E et d'empêcher son activité endonucléolytique (Lee *et al.* 2003). Son mécanisme d'action n'empêche pas la RNase E de se fixer à l'ARN, mais affecte plutôt sa capacité de clivage des liens phosphodiester. En faisant des analyses par microarray, il a été démontré que la surproduction de RraA augmente l'abondance relative d'environ 2000 transcrits (profil similaire obtenu avec des mutants qui ont une délétion *rne*) et que l'absence de RraA provoque une baisse de l'abondance relative de l'ordre de 2X pour environ 80 ARNm (Lee *et al.* 2003). Le fait que ce nombre est relativement faible (80 transcrits) et que les mutants *rraA* ont une croissance normale suggère que l'action de RraA a lieu lors de conditions de croissance

particulières. Par contre, ceci peut également être dû à la présence de facteurs protéiques cellulaires additionnels capable de moduler la fonction catalytique de la RNase E et ayant une fonction commune avec celle de RraA. D'ailleurs, ils ont aussi identifié un autre facteur régissant l'activité de la RNase E qu'ils ont appelés RraB (Lee *et al.* 2003).

## **5.4.2. Caractéristiques structurelles importantes des ARNm**

### 5.4.2.1. Régions 3' non traduites

Chez *E. coli*, plusieurs transcrits se terminent par la formation d'une structure en épingle à cheveux suite à la présence de terminateurs Rho-indépendants (intrinsèques). Ces structures contiennent une très courte région 3' d'ARN simple brin. Puisque la plupart des exonucléases sont non seulement inhibées par les structures secondaires, mais requièrent également un bout significatif d'ARN simple brin (>10 nt) pour se fixer, les terminateurs intrinsèques peuvent de cette façon protéger les molécules d'ARNm de la dégradation. De plus, d'autres éléments, les REP existent dans la région 3' non traduites de plusieurs ARNm (Higgins *et al.* 1982; Stern *et al.* 1984). Ces séquences se retrouvent soit entre les gènes ou après le dernier gène des opérons polycistroniques (Bachellier *et al.* 1996). Certaines de ces séquences REP ont un effet sur la stabilité des ARNm (Newbury *et al.* 1987).

### 5.4.2.2. Régions 5' non traduites

Même s'il ne semble pas y avoir d'exonucléases 5'→3' chez *E. coli*, les extrémités 5' peuvent jouer un rôle soit en stabilisant ou déstabilisant des transcrits particuliers. Par exemple, le gène *rne* contient une région en 5' non traduite de 361 nt qui est requise, en

partie, pour l'autorégulation du transcrit (Jain et Belasco 1995). L'élimination de cette région mène à la perte d'autorégulation et à la stabilisation du transcrit. Une série de structures secondaires présentes dans la région 5' non traduite est nécessaire pour la réalisation de l'autorégulation (Diwa *et al.* 2000). De plus, certaines structures secondaires de la région 5' de certains transcrits, par exemple l'épingle à cheveux retrouvée chez le transcrit *ompA*, sont responsables de la stabilité de ceux-ci (Régnier et Arraiano 2000). D'ailleurs, plusieurs transcrits deviennent stabilisés lorsqu'on fusionne le motif structurel de *ompA* à leur extrémité 5' (Emory *et al.* 1992).

### **5.4.3. Complexes multiprotéiques associés à la dégradation des ARNm**

#### **5.4.3.1. Dégradosome**

La découverte du dégradosome est survenue lorsque plusieurs groupes différents ont rapporté la co-purification de la RNase E et de la PNPase (Carpousis *et al.* 1994; Py *et al.* 1994). Des travaux subséquents ont démontré que le dégradosome est un complexe multiprotéique composé de la RNase E, de la PNPase, de l'ARN hélicase RhlB et de l'enzyme glycolytique émolase (Miczak *et al.* 1996; Py *et al.* 1996; Vanzo *et al.* 1998). Le dégradosome serait responsable de la dégradation de la majeure partie des ARNm (Barlow *et al.* 1998; Rauhut et Klug 1999).

Alors que le rôle de l'enzyme émolase n'est pas clair, la présence de l'ARN hélicase RhlB fournit une réponse quant à l'élimination des structures secondaires des molécules d'ARNm en cours de dégradation. Ceci est particulièrement important car, comme précédemment mentionné, la PNPase et les autres exonucléases 3'→5' chez *E. coli* sont

inhibées par ces structures. Une étude récente démontre l'importance de l'enzyme émolase comme composante du dégradosome dans la régulation de la stabilité de l'ARNm *ptsG* (code pour une composante du transporteur majeur de glucose) en réponse au stress métabolique (Morita *et al.* 2004).

En se basant sur les ratios molaires des protéines présentes dans le dégradosome de différentes préparations (Vanzo *et al.* 1998; Mackie *et al.* 1997; Carpousis *et al.* 1994; Miczak *et al.* 1996; Coburn *et al.* 1999), le dégradosome pourrait contenir au minimum un dimère de la RNase E, un trimère de la PNPase, 2 dimères de l'émolase et un dimère de RhlB. De plus, on ne sait pas si le dégradosome est une structure uniforme, statique ou un complexe dynamique qui se désassemble et se réassemble, peut-être avec des composantes variables, sur les différents substrats d'ARN pour la dégradation ou la maturation de ceux-ci.

Des recherches effectuées par BLAST en utilisant les acides aminés 734 à 1061 de la RNase E (région C-terminale responsable de l'assemblage du dégradosome) ont trouvé relativement peu d'homologues (Kushner 2004). Ainsi, cette région C-terminale, basée sur la séquence en acides aminés retrouvée chez *E. coli*, n'est pas très conservée et est clairement manquante chez plusieurs microorganismes. Ceci laisse donc croire que le dégradosome n'est pas présent chez toutes les bactéries. Cependant, il est tout de même probable dans ce cas que la dégradation des ARNm procède via un mécanisme impliquant simultanément la RNase E, la PNPase et l'ARN hélicase RhlB.



De plus, Ow *et al.* ont construit une série de différents mutants *rne* dont l'extrémité C-terminale est tronquée (Ow *et al.* 2000). Ces mutations RNase E sont déficientes dans l'assemblage du dégradosome, mais contiennent toujours leur activité catalytique et leur domaine de liaison à l'ARN. Les mesures de demi-vie de 7 ARNm individuel ont montré que la dégradation de ces ARNm n'était pas affectée significativement en absence de l'assemblage du dégradosome. Également, le taux de croissance de ces mutants était identique à celui de la souche sauvage. Ainsi, il semblerait que la formation du dégradosome chez *E. coli* n'est pas essentielle à la dégradation normale des ARNm.

#### 5.4.3.2. Autres complexes multiprotéiques

Chez les eucaryotes, plusieurs groupes ont démontré l'existence de complexes multiprotéiques appelés exosomes (Allmang *et al.* 1999; Mitchell *et al.* 1996). Ils contiennent une variété d'exonucléases 3'→5' qui sont homologues à la RNase PH, RNase R et RNase D d'*E. coli*. Alors que ces enzymes sont majoritairement responsables de la maturation des ARNt chez *E. coli* (Deutscher et Li 2000), il n'est pas irraisonnable de penser que certains types d'exosomes bactériens pourraient exister pour promouvoir la dégradation 3'→5' des ARNm.

Finalement, d'autres groupes croient qu'il pourrait exister un complexe protéique contenant au minimum la PAP I et la PNPase. En effet, des cycles continus de polyadénylation favorise la dégradation du transcrit *rpsT* par la PNPase (Coburn et Mackie 1998). Ce complexe pourrait donc mener à la dégradation exonucléolytique rapide du transcrit *rpsT* par plusieurs cycles successifs de polyadénylation/dégradation.

En fait, ce type de complexe pourrait affecter n'importe quel produit de dégradation d'ARNm contenant des structures secondaires qui étaient suffisamment importantes pour inhiber la RNase II et la PNPase.

#### **5.4.4. Rôle de la polyadénylation dans la dégradation des ARNm**

La polyadénylation est impliquée dans la dégradation des ARNm et des ARN non traduits (Coburn et Mackie 1996b; Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995; Xu *et al.* 1993; Xu et Cohen 1995). Certains de ces résultats ont mené à la proposition que l'ajout de queue poly(A), d'une longueur variant de 10-40 nt, est un mécanisme pour cibler l'initiation de la dégradation des ARNm (Kushner 1996; O'Hara *et al.* 1995). Cependant, pour le transcrit *rpsT*, l'initiation de la dégradation est effectuée par la RNase E et est indépendante de la polyadénylation (Coburn et Mackie 1998). La polyadénylation est importante seulement pour la dégradation d'un fragment 3' généré par le clivage initial de la RNase E (Coburn et Mackie 1998). Si tous les ARNm se comportent comme *rpsT*, alors la polyadénylation n'est pas nécessaire pour initier la dégradation mais plutôt pour aider la PNPase et possiblement les autres RNases, comme la RNase R et la RNase II, à dégrader les produits générés par le clivage de la RNase E qui contiennent des structures secondaires. Par contre, ces conclusions semblent prématurées car la demi-vie de plusieurs ARNm est affectée par la délétion du gène de la PAP I. De plus, chez *E. coli*, la dégradation des transcrits n'implique pas toujours la RNase E.

Ainsi, si un ARNm est premièrement dégradé par un mécanisme exonucléolytique et qu'il contient un terminateur intrinsèque (formation d'une structure d'épingle à cheveux

dans l'extrémité 3' de l'ARNm), alors dans ce cas la polyadénylation devient absolument critique pour l'initiation de la dégradation. En effet, comme précédemment mentionné, ces terminateurs génèrent un très court segment d'ARN simple brin après l'épingle à cheveux à l'extrémité 3' qui n'est pas assez long pour que les exonucléases puissent s'y fixer. De cette manière, l'ajout d'une queue poly(A) transforme ces molécules en de meilleurs substrats pour ces enzymes. Puisqu'un nombre significatif de transcrits chez *E. coli* se terminent de façon Rho-indépendante (Lesnik *et al.* 2001), il serait attendu que la dégradation de ces transcrits serait dépendante de la polyadénylation s'ils sont dépourvus de sites de clivage endonucléolytique. L'ajout de queue poly(A) serait essentiel pour la fixation de n'importe laquelle des exonucléases 3'→5'.

Finalement, alors que la PAP I effectue 90% de la polyadénylation dans la cellule (O'Hara *et al.* 1995), la question reste incertaine quant à la nature de l'enzyme responsable de la polyadénylation résiduelle. Il semblerait qu'il s'agit en fait de la PNPase (Mohanty et Kushner 2000). Par contre, on ne sait pas ce qui contrôle le changement entre ces fonctions de dégradation et de synthèse de queues poly(A). En terminant, alors que l'absence totale de polyadénylation mène seulement à un taux de croissance réduit (Mohanty et Kushner 2000), l'augmentation des niveaux de polyadénylation est hautement toxique pour la cellule (Mohanty et Kushner 1999).

#### **5.4.5. Régulation de la maturation et de la dégradation des ARNm**

Plusieurs gènes impliqués dans la dégradation des ARNm, incluant ceux de la RNase E, PNPase et RNase III, sont contrôlés par une autorégulation. Dans le cas de la RNase E,

la région 5' non traduite de la protéine est importante, mais également certaines régions codantes en 3' car des délétions C-terminales de la protéine entraînent la perte d'autorégulation (Diwa *et al.* 2000; Ow *et al.* 2000). De plus, le gène *rne* est transcrit à partir de 3 promoteurs indépendants (Ow *et al.* 2002) et chacun de ceux-ci contribuent significativement à la quantité totale de RNase E produite. La délétion d'un ou plusieurs de ces promoteurs provoque la réduction ou la perte de l'autorégulation (Ow *et al.* 2002).

Les niveaux de poly(A) polymérase sont également régulés. Ils sont relativement gardés bas en raison de la combinaison d'un faible promoteur, une pauvre initiation de la traduction (séquence Shine-Dalgarno) et un codon initiateur de traduction faible UUG (Mohanty et Kushner 1999). De plus, des niveaux élevés de polyadénylation mènent à la stabilisation des transcrits *rne* et *pnp* (Mohanty et Kushner 1999), menant à des taux d'expression plus importants de chaque protéine (Mohanty et Kushner 2000). Ainsi, même si la polyadénylation semble favoriser la déstabilisation d'une grande quantité de transcrits (Hajnsdorf *et al.* 1995; O'Hara *et al.* 1995; Xu *et al.* 1993), l'effet est inverse dans le cas des transcrits de la RNase E et de la PNPase. En fait, en absence de polyadénylation, les transcrits *pnp* et *rne* sont effectivement dégradés plus rapidement que dans des conditions normales (Mohanty et Kushner 2002).

Il semble ainsi que la cellule a la faculté d'altérer sa capacité de dégradation en fonction des circonstances spécifiques intracellulaires. Une telle flexibilité est particulièrement essentielle pour permettre à la cellule de s'adapter aux changements dramatiques de son environnement de croissance.

#### 5.4.6. Relation entre la maturation et la dégradation des ARNm

Il a déjà été mentionné que les bactéries sont uniques car plusieurs gènes sont transcrits comme faisant partie de longs opérons polycistroniques. La maturation de plusieurs de ces larges transcrits en de plus petits ARNm indépendants a lieu avant que la transcription complète de l'opéron ne soit terminée. La maturation est le résultat du clivage de la RNase III aux structures d'épingle à cheveux présente soit dans la région 5' non-traduite de transcrits particuliers ou à l'intérieur de régions intercistroniques des opérons. Dans plusieurs cas, la maturation entraîne également la déstabilisation d'au moins un des produits de la réaction. De plus, la maturation de certains opérons est effectuée par la RNase P (Li et Altman 2003). Ainsi, la maturation des ARNm peut avoir un impact direct sur leur stabilité.

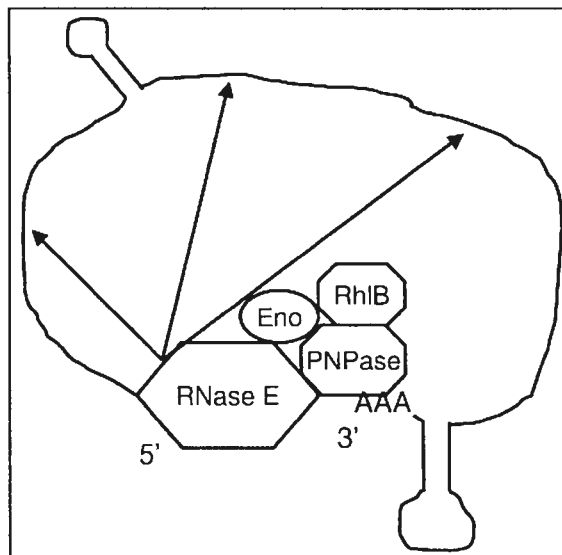
Alors que la RNase E est principalement vu comme une enzyme qui dégrade les ARNm, elle est aussi impliquée dans une quantité importante de réaction de maturation des ARNr. Elle est nécessaire pour la maturation du précurseur 9S en sa forme ARNr 5S (Apirion et Lassar 1978) et de l'extrémité 5' de l'ARNr 16S (Li *et al.* 1999; Tock *et al.* 2000; Wachi *et al.* 1999). Elle participe aussi à la maturation de l'ARNm *rnpB*, la sous-unité catalytique de la RNase P (Lundberg et Altman 1995; Ow et Kushner 2002), puis de *ssrA* (Lin-Chao *et al.* 1999). *ssrA* est un petit ARN stable («small stable RNA») dont la demi-structure est semblable aux ARNt et qui non seulement favorise la dégradation des polypeptides incomplets, mais minimise aussi la synthèse de ceux-ci en facilitant la dégradation des ARNm tronqués produits dans la cellule (Yamamoto *et al.* 2003). De façon plus importante, la RNase E amorce la maturation des ARNt (Li et Deutscher 2002;

Ow et Kushner 2002). Il n'est donc pas impossible de penser que pour certains ARNm, le clivage par la RNase E pourrait initialement agir comme une réaction de maturation.

#### **5.4.7. Modèle sur la dégradation des ARNm**

On ne sait pas si un nombre significatif de transcrits, particulièrement ceux qui sont monocistroniques, sont essentiellement dégradés par un mécanisme exonucléolytique. C'est clairement le cas chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Caponigro et Parker 1996). Puisqu'il y a plusieurs petits ARNm chez *E. coli*, il est possible qu'une enzyme comme la PNPase puisse dégrader ces courts transcrits sans la nécessité préalable d'un clivage endonucléolytique. Cependant, certains petits transcrits, comme par exemple *rpsT*, sont clairement premièrement clivés par la RNase E (Mackie 1991). Ainsi, probablement qu'une infime partie des ARNm chez *E. coli* sont dégradé uniquement par un mécanisme exonucléolytique.

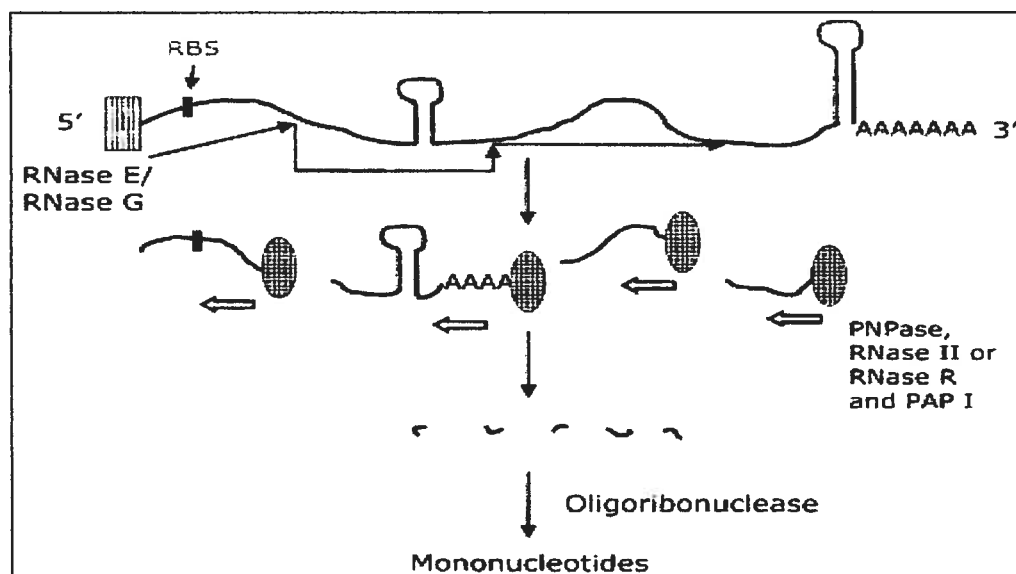
Il semble y avoir 2 modèles menant à la dégradation des molécules d'ARNm. La dégradation pourrait être initiée à l'extrémité 3' par les exonucléases ou à partir de l'extrémité 5' par la liaison de la RNase E. En fait, Coburn et Mackie ont proposé un modèle (le «5' tethering model») pour expliquer l'action du dégradosome (Coburn et Mackie 1999). Leur approche implique la dégradation simultanée des 2 extrémités du transcrit par l'action de la RNase E par sa fixation à l'extrémité 5' et de la PNPase à l'extrémité 3' (figure 4). Dans leur hypothèse, le dégradosome serait amené à l'ARNm par l'association de la PNPase à la queue de poly(A), suivi par la liaison successive de la RNase E à l'extrémité 5' (Mackie 1998) ou à un point d'entrée interne (Baker et Mackie



**Figure 4.** Initiation de la dégradation des ARNm par le dégradosome. Dans ce modèle, le dégradosome, composé de la RNase E, la PNPase, l'ARN hélicase RhlB et l'é nolase (Eno), est associé au transcrit par l'attachement de la PNPase à la queue poly(A), qui a été ajoutée à la suite du terminateur intrinsèque, et la liaison de la RNase E à l'extrémité 5'. Après le clivage endonucléolytique initial (flèches), les étapes subséquentes de dégradation sont similaires à celles de la figure 5. Tiré de Kushner 2002.

2003). Vu la préférence de la RNase E pour les extrémités 5' monophosphate, la liaison initiale de la RNase E serait l'étape limitante de la réaction dans ce modèle, car les extrémités 5' nouvellement formées suite au clivage de la RNase E seraient monophosphate. La RNase E agirait de façon processive dans la direction 5'→3', dégradant l'ARNm en une série d'oligoribonucléotides ayant des extrémités 3' libres, qui seraient susceptibles à l'action de la PNPase, RNase II ou RNase R. L'association en dégradosome optimiserait la dégradation des fragments d'ARNm en permettant l'accès immédiat de la PNPase à ces extrémités 3' générées par les clivages de la RNase E. La polyadénylation de l'extrémité 3' ainsi que l'action de l'ARN hélicase RhlB seraient nécessaire pour effectuer la dégradation de l'extrémité 3' s'il y a présence initiale d'une structure secondaire stable. En effet, l'ARN hélicase RhlB éliminerait les structures secondaires qui nuisent à la processivité de la PNPase. Par contre, la dégradation de

structures en 3' moins stables ne nécessiterait que l'action de la PNPase et de la PAP I (Coburn et Mackie 1998). Des rondes successives de polyadénylation et de dégradation progressive par la PAP I et la PNPase raccourciraient progressivement l'ARN et affaibliraient la structure secondaire, générant une molécule d'ARN pouvant finalement être dégradé par la PNPase (figure 5). L'étape finale serait la dégradation, par l'oligoribonucléase, des petits oligoribonucléotides (4-7 nt de long) qui sont résistants à l'action de la PNPase, RNase II et RNase R.



**Figure 5.** Initiation de la dégradation des ARNm par les endonucléases. Dans ce modèle, la RNase E et la PNPase ne sont pas associées dans le dégradosome. La RNase E ou G (rectangle ligné) effectue des clivages qui génèrent des fragments d'ARN plus courts qui seront pris en charge par une combinaison de la PNPase, de la RNase II et de la RNase R. Les structures secondaires sont éliminées par l'action de l'hélicase RhlB ou l'addition de queue poly(A) par la PAP I. La dégradation finale est exécutée par l'oligoribonucléase. RBS, site de fixation des ribosomes («ribosome binding site»). Tiré de Kushner 2002.

#### 5.4.8. Importance du couplage transcription/traduction sur la stabilité des ARNm

Le couplage de la transcription et de la traduction affecte aussi la stabilité des ARNm. En effet, la présence de ribosomes sur les transcrits d'ARNm les protège de l'attaque des endoribonucléases car les sites de clivage présents sur ceux-ci sont masqués. Les effets



de l'arrêt prématuré de la traduction, soit par l'ajout d'un codon stop ou en modifiant la fréquence de traduction, sur la stabilité des ARNm suggèrent que les ARNm deviennent moins stables lorsqu'il manque de ribosomes (Nilsson *et al.* 1987; Yarchuk *et al.* 1992). Par exemple, le couplage transcription/traduction est responsable de la stabilité du transcrit *lacZ*. En effet, lorsque la transcription du gène *lacZ* est effectuée par l'ARN polymérase du phage T7 (transcrit l'ARNm *lacZ* environ 8 fois plus rapidement que l'ARN polymérase de *E. coli*), on produit beaucoup moins de  $\beta$ -galactosidase dû à la faible stabilité du transcrit (Iost et Dreyfus 1995). Le découplage, dans ce cas, révèle un site de clivage RNase E qui est normalement masqué par les ribosomes, ce qui entraîne la dégradation du transcrit généré par l'ARN polymérase de T7. Le fait qu'on réussisse à stabiliser le transcrit *lacZ* produit par l'ARN polymérase du phage T7, libre de ribosomes, par l'inactivation de la RNase E suggère que l'ARNm nu est effectivement plus sensible à l'attaque de cette RNase (Iost et Dreyfus 1995). D'ailleurs, des conclusions très similaires ont été tirées pour le transcrit *rpsO* (Braun *et al.* 1998). En absence de ribosomes, un clivage RNase E élimine une structure d'épingle à cheveux en 3' protégeant le transcrit de l'attaque des exonucléases et celui-ci est ensuite dégradé par la PNPase (Braun *et al.* 1996).

## 6. Projet de maîtrise

Des travaux effectués dans le laboratoire avaient mis en évidence la formation de R-loops dans un fragment de l'opéron *rrnB* en absence de topoisomérase I. Ce fragment était précédé d'une séquence *boxA* responsable de l'assemblage d'un système d'antiterminaison. La formation de ces R-loops était peut-être liée à la présence de cette séquence *boxA* et nous avons voulu étudier le lien entre la topoisomérase I et l'antiterminaison de la transcription dans la formation des R-loops. D'ailleurs, lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle, la transcription se déroule surtout dans les opérons *rrn*, et l'interaction de la topoisomérase I avec l'ARN polymérase suggère que la topoisomérase I est peut-être importante pour la synthèse efficace des ARNr.

Pour étudier le rôle de la topoisomérase I dans l'antiterminaison de la transcription, des fusions transcriptionnelles, contenant une séquence *boxA* fonctionnelle ou mutée fusionnée au gène rapporteur *lacZ*, furent construites. De cette façon, nous pouvons directement étudier l'effet de la séquence d'antiterminaison sur l'expression du gène *lacZ* (synthèse d'ARNm et de  $\beta$ -galactosidase) chez les mutants *topA* qui surproduisent ou non la RNase HI.

De plus, nous savons que la séquence *boxA* augmente la vitesse de transcription de l'ARN polymérase et que ceci peut causer un découplage entre la transcription et la traduction. Les ARNm seraient alors plus susceptibles à la formation des R-loop. Mon projet de maîtrise cherchait donc à établir un rôle possible de la topoisomérase I dans l'antiterminaison lors de la transcription des opérons *rrn*.

## 7. Article

**«Rôle de la topoisomérase I dans la synthèse d'ARN dirigée par la séquence d'antiterminaison *boxA*» par Sanscartier et al. 2005**

### **Résumé**

Il a été précédemment démontré que la synthèse d'ARNr était déficiente en absence de topoisomérase I à moins que la RNase HI, une enzyme enlevant les R-loops, ne soit surproduite. De façon intéressante, le surenroulement négatif induit par la transcription et en conséquence la formation des R-loops sur les plasmides ont été montrés être favorisés par le système d'antiterminaison *boxA*.

dépendant des ARNr. Dans cette étude, nous avons examiné les effets de ce système d'antiterminaison *boxA*-dépendant sur l'expression de l'opéron *lac* à partir de fusions chromosomiques. Nous démontrons que l'expression de *lac* dirigée par la séquence *boxA*, mesurée par des dosages de  $\beta$ -galactosidase et l'analyse de northern blot de *lacZ* et *lacA*, est affectée de façon dramatique en absence de topoisomérase I, à moins que la RNase HI ne soit surproduite. Un tel effet sur l'ARN *lacA*, malgré qu'il soit moins prononcé, est également observé lorsque l'expression de *lac* est dirigée par une séquence *boxA* mutée et inactive, mais seulement lorsque la transcription est découplée de la traduction par l'ajout de spectinomycine. Une mutation de la RNase E, précédemment montrée comme empêchant la dégradation des ARN *lac* non traduits, n'a pas rétabli l'accumulation fonctionnelle d'ARN *lac* dans le mutant *topA* nul ne surproduisant pas la RNase HI. Puisqu'il est connu que le système d'antiterminaison *boxA* augmente le taux de transcription, nous suggérons que l'expression de *lac* dirigée par *boxA* crée un découplage entre la transcription et la traduction libérant ainsi l'ARN naissant qui est alors disponible pour la formation de R-loops. Le couplage serré de la transcription et de la traduction est ainsi important non seulement pour prévenir la terminaison prématurée de la transcription ou le clivage des ARNm par la RNase E, mais également pour inhiber la formation des R-loops, tout particulièrement lorsque l'excès de surenroulement négatif peut s'accumuler. De plus, les résultats présentés dans cette étude supportent nos précédentes conclusions que la transcription dirigée par la séquence *boxA* est plus prédisposée à la formation des R-loops.

**Role of topoisomerase I in *boxA*-directed RNA synthesis.**

Patrick Sanscartier, Josiane Demers and Marc Drolet<sup>1</sup>.

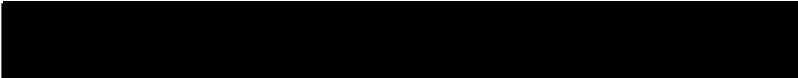
Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, C.P.

6128, Succ. Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : 514-343-5796

FAX: 514-343-5701



## 7.1. Abstract

It has been shown previously that rRNA synthesis was defective in the absence of topoisomerase I unless RNase HI, an enzyme removing R-loops, was overproduced. Interestingly, both transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation on plasmids were shown to be promoted by the *boxA*-directed rRNA antitermination system. Here, we have investigated the effects of this *boxA*-directed antitermination system on *lac* expression from chromosomal fusions. We show that *boxA*-directed *lac* expression as measured by  $\beta$ -galactosidase activity and northern blot analysis of *lacZ* and *lacA* is dramatically impaired in the absence of topoisomerase I, unless RNase HI is overproduced. Such an effect on *lacA* RNA, though less severe, is also observed when *lac* expression is directed from a mutated and inactive *boxA* sequence, but only when transcription is uncoupled from translation by the addition of spectinomycin. A mutation in RNase E previously shown to impair the degradation of *lac* RNA did not restore functional *lac* RNA accumulation in the *topA* null mutant not overproducing RNase HI. As the *boxA* antitermination system is known to increase the rate of transcription, we suggest that *boxA*-directed *lac* expression uncouples transcription from translation thus freeing the nascent RNA for R-loop formation. The tight coupling of transcription and translation is therefore important not only to prevent premature termination of transcription or mRNA cleavage by RNase E, but also to inhibit R-loop formation, especially when excess negative supercoiling can accumulate. In addition, the results presented here support our previous conclusion that *boxA*-directed transcription is more prone to R-loop formation.

## 7.2. Introduction

DNA topoisomerase I, encoded by *topA*, removes excess negative supercoiling generated by the process of transcription (Massé and Drolet, 1999a). This function of topoisomerase I is facilitated by its direct interaction with the  $\beta'$  subunit of RNA polymerase (Cheng *et al.*, 2003). One major consequence of transcription-induced negative supercoiling is the re-annealing of the nascent RNA with the template strand behind the moving RNA polymerase, to form an R-loop (Massé and Drolet, 1999b). Such an R-loop can inhibit gene expression. Indeed, overproduction of RNase HI, an enzyme removing the RNA of an R-loop, can suppress both the growth defect and the inhibition of gene expression in the absence of topoisomerase I (Drolet *et al.*, 1995). Accordingly, RNase HI overproduction in *topA* null mutants was shown to stimulate the synthesis of 16S and 23S rRNA (Hraiky *et al.*, 2000) and to promote the accumulation of full-length mRNAs (Baaklini *et al.*, 2004). Interestingly, R-loops have been shown to be responsible for transcription elongation impairment in a *Saccharomyces cerevisiae hpr1* $\Delta$  mutant (Huertas and Aguilera, 2003). RNase HI has also been shown to stimulate RNA synthesis *in vitro* from supercoiled templates at high molecular ratios of RNA polymerase to template (Gopal *et al.*, 1999; Drolet *et al.*, 2003; Bentin *et al.*, 2005). All together, these results support the hypothesis that the R-loops can act as roadblocks for transcribing RNA polymerases.

In *Escherichia coli*, there are 7 *rm* operons from which 16S, 23S and 5S rRNAs can be synthesized (Condon *et al.*, 1995). Unlike mRNA, rRNA synthesis is not coupled to translation and therefore the nascent rRNA can be available for

the binding of the transcription termination factor Rho. To avoid premature termination of transcription, RNA polymerase is modified by host proteins (Nus factors) that interact with a specific sequence in the leader region of *rrn* operons, to form a termination-resistant RNA polymerase. *boxA* is the minimal sequence required for this antitermination system that also increases the velocity of RNA polymerase (Condon *et al.*, 1995; Vogel and Jensen, 1995; Squires and Zaporozhets, 2000). We have recently found that R-loop-dependent hypernegative supercoiling due to transcription of a *rrnB* fragment in a *topA* null mutant, was significantly enhanced by the presence of a properly positioned *boxA* sequence on the plasmid (Broccoli *et al.*, 2004). In the present work, we have investigated the effect of this *boxA*-directed antitermination system on RNA synthesis in the absence of topoisomerase I, by using chromosomal *lac* fusions. We found that *boxA*-directed *lac* RNA synthesis is dramatically impaired unless RNase HI is overproduced. A mutated and inactive *boxA* sequence is also shown to inhibit *lac* RNA synthesis, though less severely, and only when transcription is uncoupled from translation by the addition of translation inhibitors. Our results suggest that the *boxA*-directed antitermination system inhibits *lac* RNA synthesis in the absence of topoisomerase I both indirectly, by uncoupling transcription from translation, thus promoting R-loop formation, and directly by rendering RNA polymerase more prone to R-loop formation.



### 7.3. Results

*boxA*-dependent inhibition of  $\beta$ -galactosidase synthesis in the absence of topoisomerase I and its correction by RNase HI overproduction.

We have previously described a system (Massé *et al.*, 1997) from which the IPTG-inducible *P<sub>trc</sub>* promoter can drive transcription through a DNA sequence inserted downstream of either a wild-type *boxA* sequence or a mutated and inactive one (*boxA4UG*; Albrechtsen *et al.*, 1990; Squires *et al.*, 1993; Vogel and Jensen, 1995). The *P<sub>trc</sub>* promoter is tightly regulated by the presence of the *lac<sup>f</sup>* gene on the same multicopy plasmid. With this system, we have been able to demonstrate R-loop formation in the absence of topoisomerase I due to transcription of the 567 bp *HindIII* fragment from the *rnbB* operon, preceded by the *boxA* sequence (Massé *et al.*, 1997). R-loop-dependent hypernegative supercoiling due to transcription of this *HindIII* fragment was also shown to be stimulated by the presence of the *boxA* sequence as compared to the *boxA4UG* one (Broccoli *et al.*, 2004). Although these results revealed a possible link between the *boxA*-directed antitermination system and R-loop formation, they neither provided clues about the mechanism(s) at play, nor did they indicate how R-loop formation is related to the inhibition of rRNA synthesis. Moreover, the use of multicopy plasmids could potentially mitigate the RNase HI effect. In addition, the fate of transcription-induced supercoiling and how it is translated into R-loop formation is likely different on a plasmid as compared to the chromosome, with its large supercoiling domains (Higgins, 2005). Therefore, we modified our system with the IPTG-inducible *P<sub>trc</sub>* promoter followed by *boxA* or *boxA4UG* to

allow the construction of transcriptional fusions with the *lac* operon and their transfer to the bacterial chromosome (see *Experimental procedures*). Figure 6 shows a schematic drawing of the fusions used in the present studies. These fusions were transferred on the chromosome of two isogenic strains, RFM445 (*gyrB*(Ts)) and RFM480 (*topA*::Tn10 *gyrB*(Ts)). This set of strains was previously used to study the consequence of losing *topA* function on cell physiology (Baaklini et al., 2004). The *topA* null cells can grow at 37°C (permissive temperature) because gyrase activity is low enough, owing to the thermo-sensitive *gyrB* allele, to compensate for the absence of topoisomerase I. At 28°C and below (non-permissive temperatures), gyrase regains its full activity and can no longer compensate for the absence of topoisomerase I. Exponentially dividing *topA* null cells (RFM480) rapidly stop growing upon being transferred from 37°C to 28°C, unless they overproduce RNase HI (Baaklini et al., 2004).

Initially, our results suggested to us that *boxA*-directed transcription through the 567 bp *rrnB* *Hind*III fragment causes R-loop formation in the absence of topoisomerase I. Indeed, it can be seen that the ability to synthesize  $\beta$ -galactosidase from *lacZ* inserted after this *Hind*III fragment (*boxA-rrnB* fusion) was decreased by almost 15-fold in the *topA* null mutant at the non-permissive temperature, unless RNase HI was overproduced (49 units, no RNase HI overproduced vs 692 units, RNase HI overproduced). To further study the involvement of the *Hind*III fragment in the inhibition of *lacZ* expression, we deleted it to give the *boxA-lac* fusion. To our surprise,  $\beta$ -galactosidase synthesis was still inhibited by about 15-fold in the *topA* null mutant at the non-permissive

temperature, unless RNase HI was overproduced (29 units, no RNase HI overproduced vs 480 units, RNase HI overproduced). This result showed that *lacZ* in this chromosomal fusion was more susceptible to R-loop formation in a *boxA*-dependent or –independent manner. To test this, we constructed a fusion in which *lacZ* is preceded by the mutated and inactive *boxA4UG* sequence (*boxA4UG-lac* fusion). The results shown in Table 1 clearly show that *boxA* inactivation almost completely restored *lacZ* expression in the *topA* null mutant at the non-permissive temperature (833 units, no RNase HI overproduction vs 1208 units, RNase HI overproduction). We conclude that the *boxA* sequence and not the *rrnB HindIII* fragment, is the main contributor of R-loop formation in this system.

*boxA-dependent inhibition of functional lacZ RNA accumulation and its correction by RNase HI overproduction.*

By using oligonucleotide probes hybridizing to the 5' region of various genes, we have recently shown that *topA* null mutants have a reduced ability to accumulate full-length mRNAs at the non-permissive temperature, unless RNase HI was overproduced (Baaklini *et al.*, 2004). The very high ratio of short length to full length RNAs observed in these *topA* null mutants was not only due to the inhibition of gene expression by R-loops, but also apparently to a shortage of both PNPase and RNase II, the two main exoribonucleases involved in the degradation of short RNAs (Kushner, 2005). Indeed, by overproducing these ribonucleases from multicopy plasmids several of the short RNAs were found to

be degraded (Hraiky and Drolet, unpublished results). We performed northern blot analysis of RNAs produced from our fusions by using an oligonucleotide probe complementary to the extreme 5' region (Fig. 6). It can be seen in Fig. 7 that whether the strain is *topA*<sup>+</sup> or *topA*<sup>-</sup> and whether or not it overproduces RNase HI, a very small amount of full-length *lacZ* mRNA is detected with this probe. However, a much larger amount of the short RNAs is detected. This is especially true for the *topA* null strains not overproducing RNase HI (Fig. 7a lanes 4 and 8, Fig. 7b lane 2), which probably reflects a shortage of PNPase and RNase II in these strains (see above). These short RNAs are likely produced by rapid cleavages of the RNA in the 5' region. In fact, two of the short RNAs (~400 and ~550 nt) are cleavage products of RNase E (Fig. 6). The shorter and more abundant one (Fig. 7a, ~160 nt which corresponds to ~720 nt in the *boxA-rrnB-lac* fusion, Fig. 7b) also reflects cleavage by an endoribonuclease (Fig. 6 and see below). Since these short RNAs accumulate to the same levels whether they include the *boxA* or the *boxA4UG* sequence, their production is unlikely related to the RNase HI effect that is only observed with the *boxA* fusions (Table 1). We conclude that this 5' probe is not appropriate to reveal the effect of RNase HI on *lac* expression in our fusions.

With a random-primed probe hybridizing to the 3' region of *lacZ*, a much stronger signal was observed for the full-length *lacZ* mRNA for both the *boxA-lac* and the *boxA4UG-lac* fusions (Fig. 8a) as compared to the 5' probe (Fig. 7a). However, for the *topA* null strain not overproducing RNase HI a smear, instead of a sharp band, is observed for the *boxA-lac* fusion (for example compare lane 7,

RNase HI overproduced with lane 8, RNase HI not overproduced). This is better seen on a polyacrylamide gel hybridized with the LACZEND oligonucleotide probe recognizing the 3' end of *lacZ* (Fig. 8b, compare lane 3, RNase HI overproduced with lane 4, RNase HI not overproduced). In fact, one can see a smear overlapping the normal product of RNase E cleavage between *lacZ* and *lacY* (Fig. 6) for the *boxA-lac* fusion in the *topA* null strain not overproducing RNase HI (Fig. 8b, lane 4). A similar situation is also observed for the *lacY-lacA* intergenic region (see below). We next used the random-primed probe to evaluate the stability of *lacZ* following the addition of rifampicin (Fig. 9a and b). Instead of a sharp band slowly decaying with an half-life between 9 and 12 minutes (Fig. 9c), a smear rapidly decaying with an half-life of ~4 minutes is observed for the *boxA-lac* fusion in the *topA* null strain not overproducing RNase HI (see Fig. 9a and Fig. 9c top panel, x). The apparent two stages decay of *lacZ* in the other strains likely reflects both the cleavage of longer RNAs within the *lacZ-lacY* intergenic region and the removal of the 160 nt fragment from the 5' region. The removal of this 5' end fragment (~720 nt) is more readily observed when the decay of *lacZ* from the *boxA-rrnB-lac* fusion is followed. This is observed in all the strains except the *topA* null one not overproducing RNase HI (Fig. 10, compare lanes 1 to 5, *topA* null, RNase HI overproduced, with lanes 6 to 10, *topA* null, RNase HI not overproduced). It is important to mention that following the removal of this 5' end fragment, the 3' end long RNA (processing product in Fig. 10) still retains the Shine-Dalgarno sequence of *lacZ*. It is therefore fully competent for translation. This likely contributes to the strong

RNase HI effect on  $\beta$ -galactosidase synthesis from the *boxA-lac* fusion in the *topA* null mutant (Table 1). From these studies with 3' probes we conclude that the poor yield in terms of  $\beta$ -galactosidase production with the *boxA-lac* fusion in the *topA* null mutant, is related, at least in part, to both the rapid degradation and the absence of normal processing of the *lacZ* mRNA.

*boxA-dependent inhibition of functional lacA RNA accumulation and its correction by RNase HI overproduction.*

The large size of the *lacZ* mRNA (more than 3 kb) makes the analysis of its processing and decay more difficult, especially when one considers the removal of the ~160 nt fragment. Indeed, this cleavage only slightly reduces the size of *lacZ* in such a way that it remains undetected in an agarose gel (see above). The *lacA* mRNA, which is the result of two successive endonucleolytic cleavages within the *lacY-lacA* intergenic region, by RNase P followed by RNase E (Li and Altman, 2004), is less than 1 kb in size (Fig. 6). When we use a random-primed probe hybridizing to *lacA*, a sharp band is detected in most of the strains carrying either the *boxA-lac* or the *boxA4UG-lac* fusion. However, this is not the case for the *topA* null strain with the *boxA-lac* fusion that does not overproduce RNase HI (Fig. 11, compare lane 3, *topA* null, RNase HI overproduced and lane 4, *topA* null, RNase HI not overproduced). Indeed, instead of a sharp band, a smear overlapping the normal product of *lacA* processing and RNA products shorter than the full-length *lacA* mRNA was observed. This is highly reminiscent to *lacZ* (see above) and demonstrates, once

again, that *boxA*-directed synthesis in the absence of topoisomerase I causes abnormal processing and rapid degradation of RNA, unless RNase HI is overproduced.

*The uncoupling of transcription and translation partially mimics the boxA-dependent inhibition of lac RNA accumulation in topA null mutant.*

It has been shown previously that the uncoupling of translation and transcription can cause the rapid degradation of the nascent RNA by RNase E, the major endoribonuclease in *Escherichia coli* (Yarchuk *et al.*, 1992; lost and Dreyfus, 1995). Indeed, when translation is tightly coupled to transcription, ribosomes protect the nascent RNA from RNase E attack. For example, it has been shown that transcription of *lacZ* by the fast T7 RNA polymerase exposes long naked regions on the nascent RNA. This renders the RNA highly unstable due to its rapid degradation by RNase E (lost and Dreyfus, 1995). If the rapid degradation of *lac* RNA from the *boxA-lac* fusion in the *topA* null mutant was related to transcription-translation uncoupling, the addition of a translation inhibitor to growing cells should render *lac* RNA sensitive to degradation in all the strains, irrespective of the fusion. However, when we performed such an experiment by adding spectinomycin to growing cells before IPTG induction, RNase HI overproduction was still able to promote the accumulation full-length *lacZ* and *lacA* RNAs (Fig. 12, top and bottom panel respectively). Interestingly, degradation of *lacA*, though less severe, was also observed for the *boxA4UG-lac* fusion in the *topA* null mutant not overproducing RNase HI (Bottom panel,

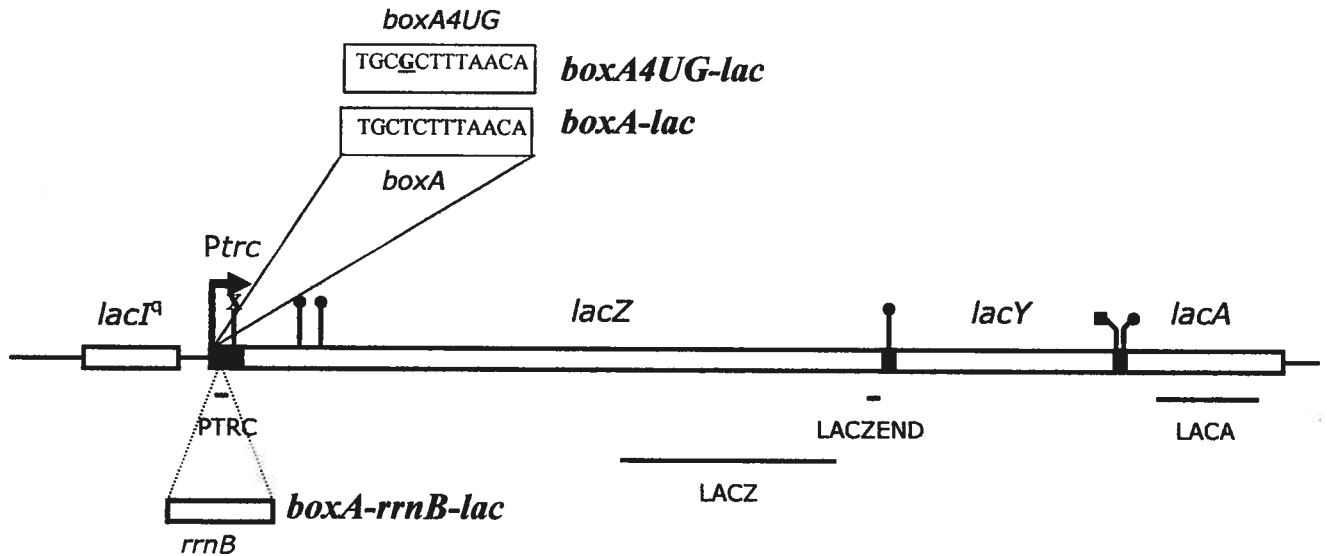
compare lane 4, *boxA* with lane 8, *boxA4UG*). Therefore, it appears that transcription-translation uncoupling in our system can expose *lac* RNA to degradation, but only in *topA* null mutants not overproducing RNase HI. Note that the addition of spectinomycin caused a significant reduction in the amount of RNA detected with the *lacA* probe in all the strains (Fig. 12, lanes 3, 4, 7 and 8). We attribute this reduction to the polarity effect (premature termination, Adhya and Gottesman, 1978; Yarchuk *et al.*, 1992) which is expected to affect *lacA*, more severely, since it is the last gene of the operon.

*An rne mutation previously shown to stabilize lacZ RNA fails to correct the boxA-dependent inhibition of functional lac RNA accumulation.*

*lacZ* RNA was recently shown to be significantly stabilized by an RNase E mutation, when the *lacZ* gene was preceded by a *boxA* sequence (Komarova *et al.*, 2005). As *boxA* is known to double the velocity of RNA polymerase (Vogel and Jensen, 1995), this result was interpreted to mean that *boxA*-directed *lacZ* synthesis causes transcription-translation uncoupling, thus rendering the RNA more susceptible to RNase E. We therefore considered the possibility that, for an unknown reason, more RNase E activity was available in the *topA* null mutant not overproducing RNase HI, to degrade naked nascent RNA when transcription and translation are uncoupled. To test this hypothesis, we introduced the *rneΔ14* mutation in RFM445 (*gyrB*(Ts)) and RFM475 ( $\Delta$ *topA*, *gyrB*(Ts)) carrying the *boxA-lac* fusion. This mutation was chosen because it was recently shown to be the best one among other viable mutations to increase the

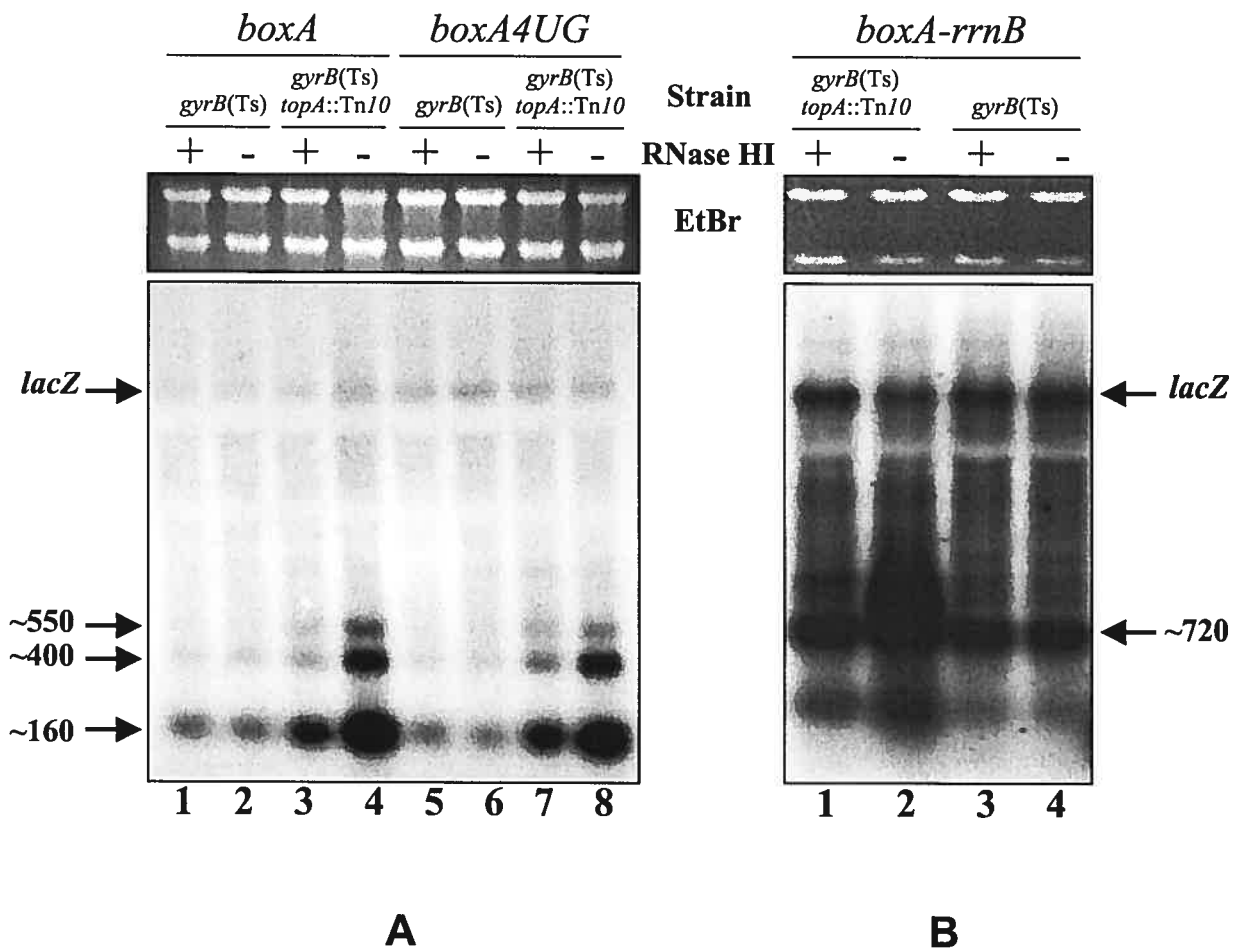


$\beta$ -galactosidase yield (by about 14-fold) from *lacZ* RNA synthesized by the T7 RNA polymerase (Leroy *et al.*, 2002). We initially found that the *rne $\Delta$ 14* mutation reproducibly increased by 1.4 fold the  $\beta$ -galactosidase yield from our *boxA* fusion at 37<sup>0</sup>C in both RFM445 and RFM475 (not shown). However, the *rne $\Delta$ 14* mutation failed to increase the  $\beta$ -galactosidase activity at 28<sup>0</sup>C in RFM475 (about 10 units were obtained whether or not the strain carried the *rne $\Delta$ 14* mutation). Northern blot analysis also demonstrated that the *rne $\Delta$ 14* mutation had no effect on the quality of the RNA pattern for both *lacZ* and *lacA* (Fig. 13, top and bottom panel respectively). Indeed, it is apparent that only the amount of the different RNA species is increased by the *rne $\Delta$ 14* mutation, not their size. We conclude that the major endoribonuclease involved in RNA decay, namely RNase E, is not responsible for *lac* RNA degradation in *topA* null mutants not overproducing RNase HI.

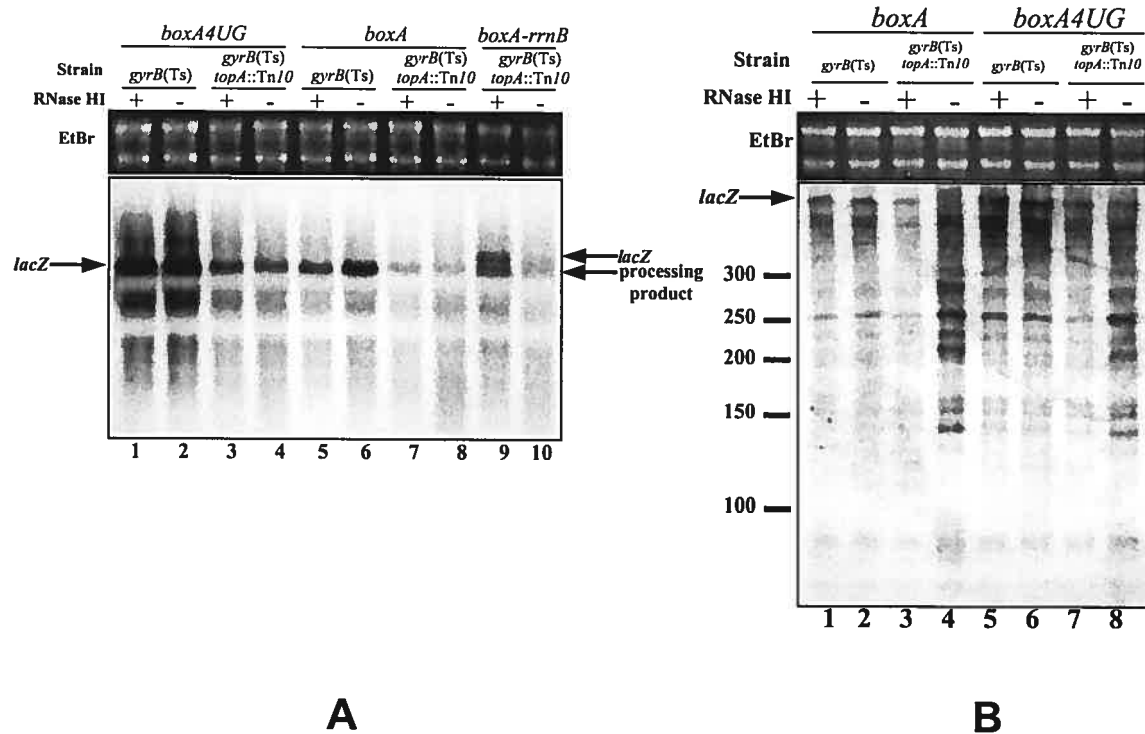


**Figure 6. A schematic drawing of the *lac* fusions used in the present study.**

The localization on the *lac* RNA of the various probes used in our studies is indicated. Sites of cleavage by RNase E (●), RNase P (■) and an unidentified endoribonuclease (x) are indicated. The sites of cleavage by RNase E and RNase P have been previously determined (see Joyce and Dreyfus, 1998; Li and Altman, 2004; Khemici *et al.*, 2005). The x site was mapped in the present study by measuring the size of the 5' generated RNA fragment following electrophoresis in a denaturing polyacrylamide gel and by primer extension analysis (data not shown). Note that following this cleavage, the 3' side RNA fragment contains the Shine-Dalgarno sequence of *lacZ* and is thus fully competent for  $\beta$ -galactosidase synthesis. *rrnB* indicates the 567 bp *rrnB* HindIII fragment.



**Figure 7.** *lacZ* mRNA expression from the various *lac* fusions as detected with the PTRC probe. Cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. 15 µg of RNA were used for Northern blot analyses in agarose gels with the PTRC probe. The ethidium bromide stained gel shows the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003.

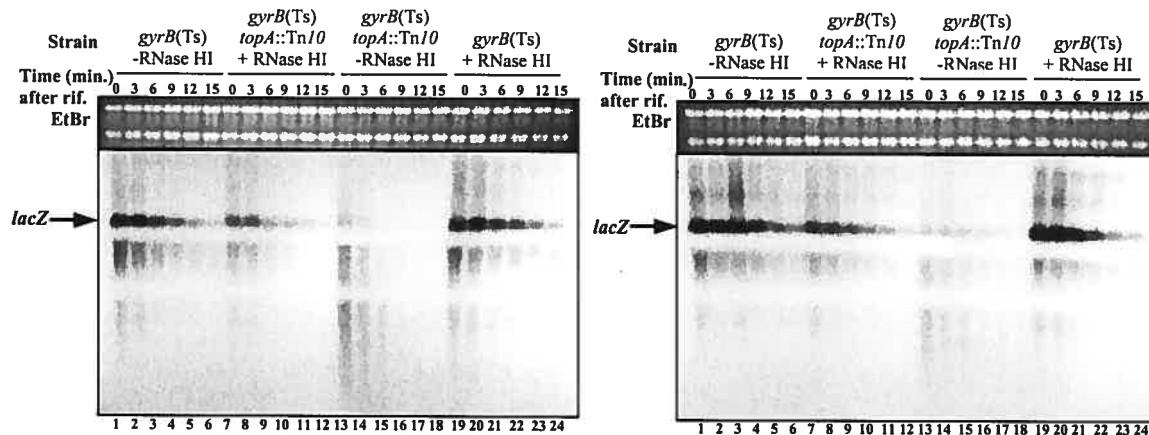


**Figure 8.** *lacZ* mRNA expression from the various *lac* fusions as detected with probes hybridizing to the 3' side of *lacZ*. Cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction.

A. 15 µg of RNA were used for Northern blot analysis in an agarose gel with the random-primed LACZ probe.

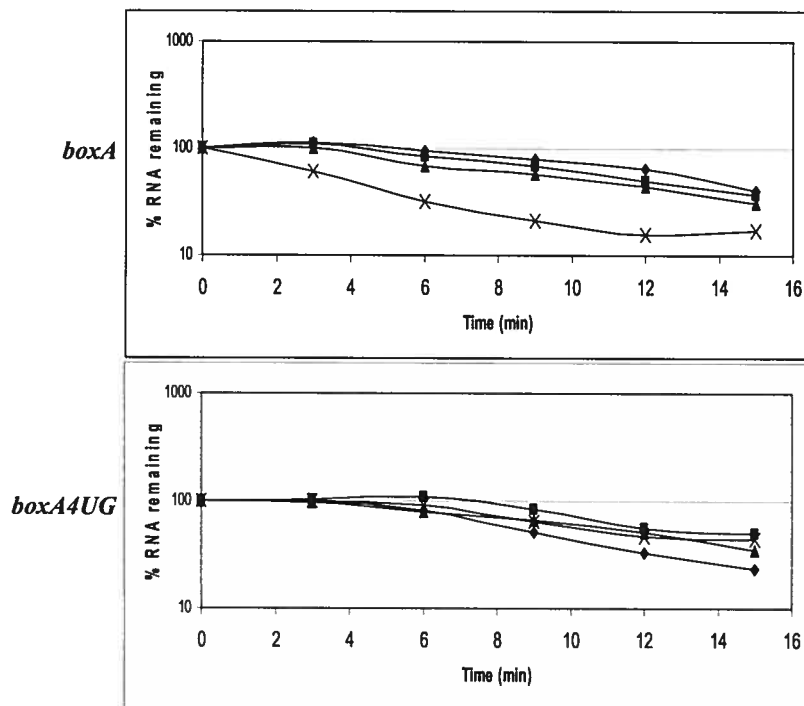
B. 15 µg of RNA were used for Northern blot analysis in a denaturing polyacrylamide gel with the LACZEND probe.

The ethidium bromide stained gels show the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003.



A

B



C

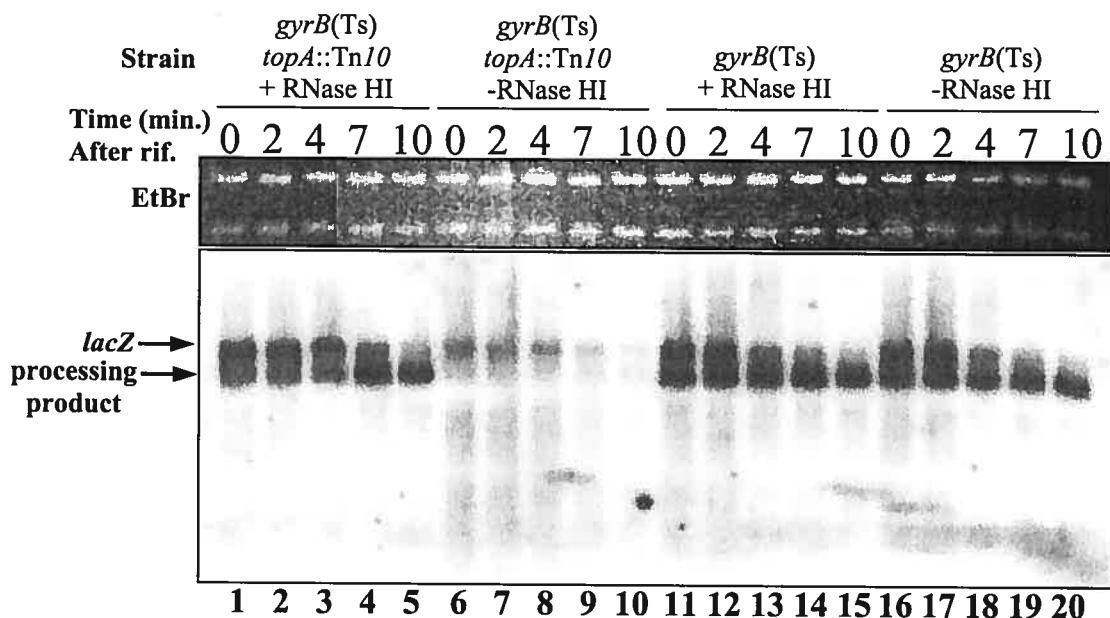
**Figure 9. Stability of *lacZ* mRNA synthesized from the *boxA-lac* and *boxA4UG-lac* fusions.** Cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later an aliquot of cells was taken (time 0) immediately before the addition of rifampicin at 250 µg/ml. Three, 6, 9,

12 and 15 minutes later aliquots of cells were taken for RNA extraction. 15  $\mu$ g of RNA were used for Northern blot analyses in agarose gels with the random-primed LACZ probe. The ethidium bromide stained gels show the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003.

A. RNA samples from strains carrying the *boxA-lac* fusion.

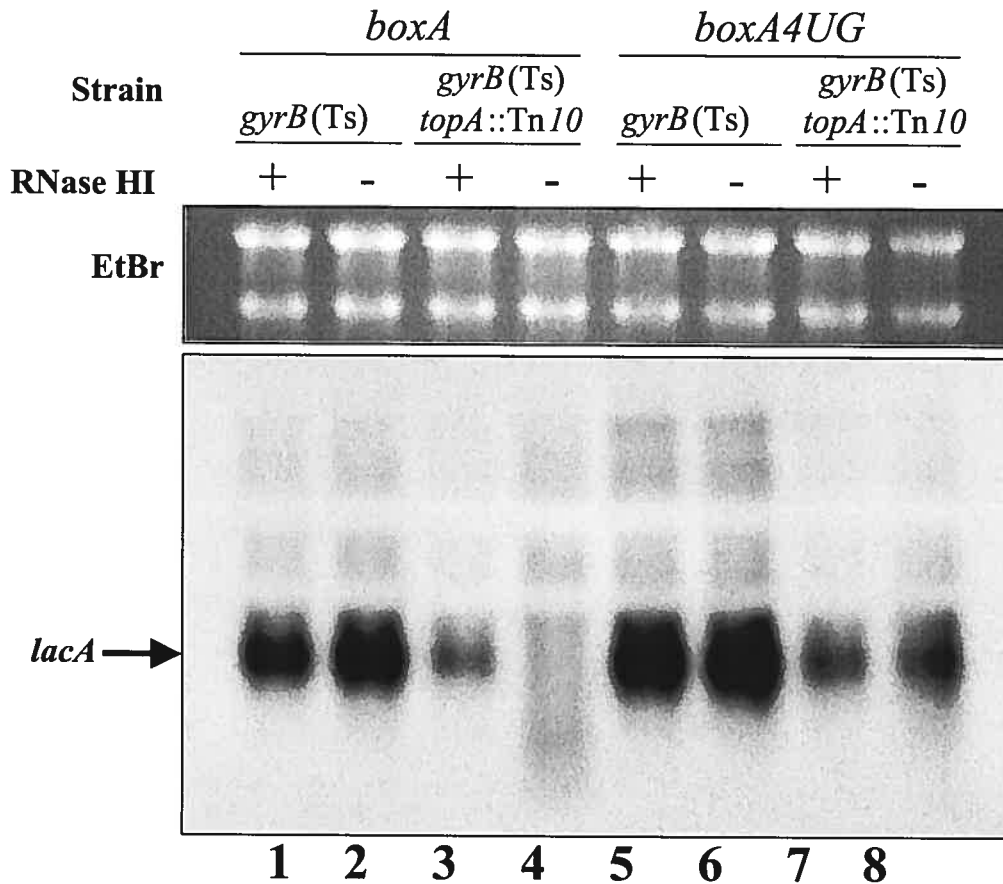
B. RNA samples from strains carrying the *boxA4UG-lac* fusion.

C. The bands corresponding to the full-length *lacZ* mRNA in the Northern blots shown in A and B were quantified using a Phosphorimager as described in *Experimental procedures*.  $\blacklozenge$ , *gyrB*(Ts) + pEM001;  $\blacksquare$ , *gyrB*(Ts) + pEM003;  $\blacktriangle$ , *gyrB*(Ts) *topA::Tn10* + pEM001;  $\mathbf{X}$ , *gyrB*(Ts) *topA::Tn10* + pEM003.



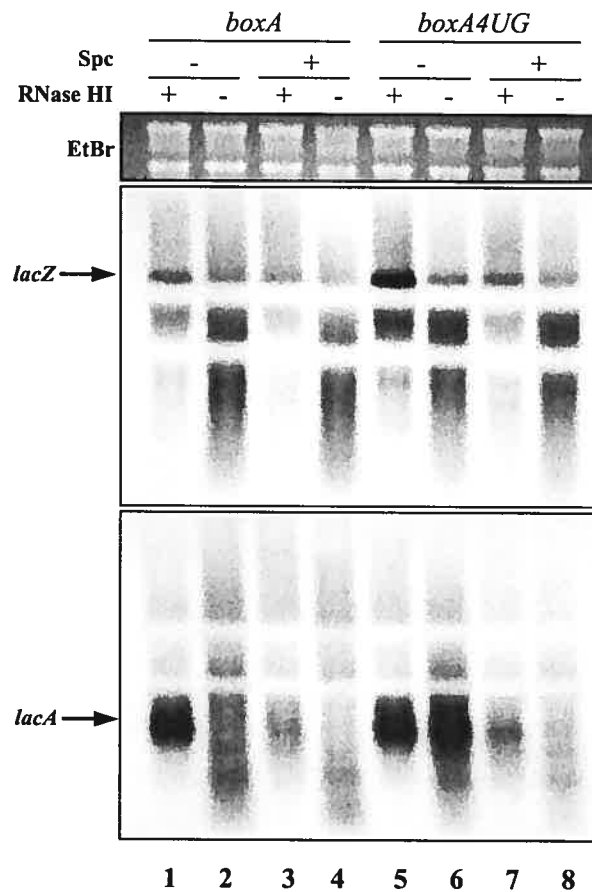
**Figure 10. Stability of *lacZ* mRNA synthesized from the *boxA-rrnB-lac***

**fusion.** Cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later an aliquot of cells was taken (time 0) immediately before the addition of rifampicin at 250 µg/ml. Two, 4, 7, and 10 minutes later aliquots of cells were taken for RNA extraction. 15 µg of RNA were used for Northern blot analysis in an agarose gel with the random-primed LACZ probe. The ethidium bromide stained gel shows the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003.



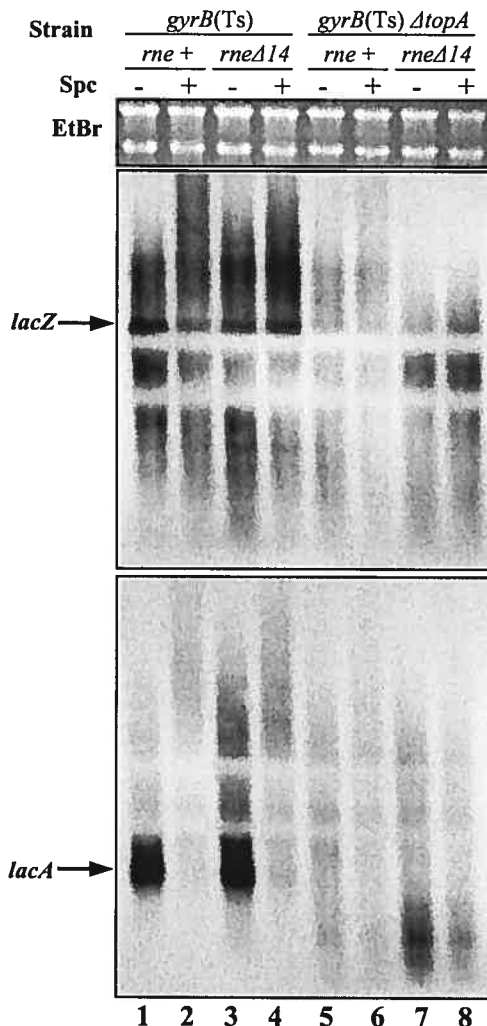
**Figure 11. *lacA* mRNA expression from the *boxA-lac* and *boxA4UG-lac* fusions.** Cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5 and transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. 15 µg of RNA were used for Northern blot analysis in an agarose gel with the random-primed LACA probe. The ethidium bromide stained gels show the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003.





**Figure 12. Effect of the translation inhibitor spectinomycin on *lac* expression from the *boxA-lac* and *boxA4UG-lac* fusions in *topA* null mutants.** *topA* null cells were grown in VB Casa at 37°C to an OD<sub>600</sub> of 0.5.

Spectinomycin at 400 µg/ml was added to one-half of the culture and 5 minutes later the cells were transferred to 28°C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. 15 µg of RNA were used for Northern blot analysis in an agarose gel with either the random-primed LACZ probe (top panel) or the random-primed LACA probe (bottom panel). The ethidium bromide stained gel shows the integrity of the RNA samples. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003. Spc is spectinomycin.



**Figure 13. Effect of the *rne* $\Delta$ 14 mutation on *lac* expression from the *boxA-lac* fusion.** Cells were grown in VB Casa at 37<sup>0</sup>C to an OD<sub>600</sub> of 0.5. Spectinomycin at 400  $\mu$ g/ml was added to one-half of the culture and 5 minutes later the cells were transferred to 28<sup>0</sup>C. Five minutes following this transfer, IPTG was added to a final concentration of 1 mM and 30 minutes later aliquots of the cell cultures were taken for RNA extraction. 15  $\mu$ g of RNA were used for Northern blot analysis in an agarose gel with either the random-primed LACZ probe (top panel) or the random-primed LACA probe (bottom panel). The ethidium bromide stained gel shows the integrity of the RNA samples. Spc is spectinomycin.

**Table 1.** The effect of *boxA* on  $\beta$ -galactosidase synthesis in the absence of topoisomerase I.

Strains	Fusions	RNase HI	Temperature	
			37°C	28°C
<i>gyrB(Ts)</i>	<i>boxA</i>	+	377 ( $\pm$ 61)	593 ( $\pm$ 45)
		-	416 ( $\pm$ 70)	624 ( $\pm$ 26)
	<i>boxA4UG</i>	+	2497 ( $\pm$ 190)	1939 ( $\pm$ 110)
		-	2540 ( $\pm$ 113)	2138 ( $\pm$ 178)
	<i>boxA-rmB-lac</i>	+	— <sup>a</sup>	662 ( $\pm$ 14)
		-	— <sup>a</sup>	679 ( $\pm$ 39)
<i>gyrB(Ts) topA::Tn10</i>	<i>boxA</i>	+	315 ( $\pm$ 26)	480 ( $\pm$ 51)
		-	251 ( $\pm$ 32)	29 ( $\pm$ 8)
	<i>boxA4UG</i>	+	1718 ( $\pm$ 2)	1208 ( $\pm$ 57)
		-	1697 ( $\pm$ 8)	833 ( $\pm$ 55)
	<i>boxA-rmB-lac</i>	+	— <sup>a</sup>	692 ( $\pm$ 14)
		-	— <sup>a</sup>	49 ( $\pm$ 6)

Samples from growing cells were taken at 37°C before the transfer (when cell densities reached an OD<sub>600</sub> of about 0.5) and 5 minutes after being transferred to 28°C.  $\beta$ -galactosidase synthesis was induced by adding IPTG (1 mM) for 30 minutes at the temperature from which the samples were taken.  $\beta$ -galactosidase activity was measured as described in *Experimental procedures*. The results of at least three independent experiments are included in this table. + and – RNase HI means that the cells respectively carry pEM001 and pEM003. <sup>a</sup>, not done.

## 7.4. Discussion

*Topoisomerase I is required for the accumulation of full-length RNA synthesized by an antiterminated RNA polymerase*

In this paper, we have shown that *lac* RNA synthesized by a *boxA*-antiterminated RNA polymerase is rapidly degraded in the absence of topoisomerase I. This at least partly explains the poor yield of  $\beta$ -galactosidase synthesis from the *boxA-lac* fusion in *topA* null mutants. Although changes in the level of supercoiling in these mutants may indirectly affect *boxA*-directed *lac* expression, we favour a model whereby topoisomerase I more directly participates in antitermination. In this context, it is important to mention that in our experiments to test the effect of transcription-translation uncoupling (Fig. 12), spectinomycin was added at 37<sup>0</sup>C, the permissive temperature where the *boxA-lac* fusion is correctly expressed. Since protein synthesis was immediately inhibited upon the addition of spectinomycin, the failure to correctly express this fusion upon transferring the cells to 28<sup>0</sup>C (Fig. 12), cannot be attributed to changes in cellular protein concentrations mediated by supercoiling fluctuations (Steck *et al.*, 1993). Moreover, apart from the fact that topoisomerase I is required for rRNA synthesis (Hraiky *et al.*, 2000), we have recently shown that R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *topA* null mutants was significantly stimulated by *boxA*-directed transcription as compared to the mutated and inactive *boxA4UG* sequence (Broccoli *et al.*, 2004). We have also found that *boxA*- but not *boxA4UG*-directed transcription confers plasmid instability in *topA*

null mutants, unless RNase HI was overproduced (Drolet *et al.*, 2003). All these results, including those presented here, point to the involvement of topoisomerase I in antitermination in the context of its function related to the inhibition of R-loop formation during transcription (Massé and Drolet, 1999b).

We have previously shown that the uncoupling of transcription and translation promotes R-loop formation by freeing the nascent RNA, thus allowing its re-annealing with the template strand behind the moving RNA polymerase (Massé and Drolet, 1999bc, Broccoli *et al.*, 2004). The results presented here also point to transcription-translation uncoupling as an important factor in *boxA*-mediated R-loop formation during *lac* transcription. We propose that the enhanced transcription velocity promoted by *boxA* but not *boxA4UG*, exposes naked regions on the nascent *lac* RNA that, in addition to be potential targets for RNase E action (Komarova *et al.*, 2005), can facilitate R-loop formation, especially when negative supercoiling is high (e.g. in the absence of topoisomerase I). This model is also supported by the finding that R-loop-dependent inhibition of *lacZ* expression can be observed with the *boxA4UG-lac* fusion, if transcription-translation uncoupling is provoked by the addition of a translation inhibitor.

Our results with the *rneΔ14* mutation suggest that R-loop formation in *topA* null mutants, a *cis*-acting event, is probably more rapid than RNase E cleavage, which is initiated by a *trans*-acting event, i.e. the binding of RNase E to its substrate. This *rneΔ14* mutation was previously shown to significantly stabilize a *lacZ* mRNA extensively exposed to RNase E action. Transcription-translation

uncoupling in this system was provoked by transcription with the very fast T7 RNA polymerase (Leroy *et al.*, 2002). In our system this mutation failed to alter the degradation pattern of both *lacZ* and *lacA* mRNA, strongly suggesting that RNase E was not involved. We have made similar observations for *fis* mRNA when transcription was uncoupled from transcription by the addition of spectinomycin (Baaklini and Drolet, unpublished observation). However, the degradation products are probably themselves subject to the action of RNase E since they accumulate in larger amounts when the *rneΔ14* mutation is present (Fig. 13). We propose that transcription from the *boxA-lac* fusion in the absence of topoisomerase I lead to the formation of long R-loops that are degraded by RNase HI. The resulting degradation products bear 5' monophosphate termini making them much better substrates for RNase E activity than newly synthesized RNAs with 5' triphosphate termini (Mackie, 1998). They are therefore rapidly degraded, which can explain their rapid turnover (Fig. 9). Interestingly, RNAs with 5' monophosphate termini used to demonstrate the substrate preference of RNase E can be prepared *in vitro* by using RNase HI (Spickler *et al.*, 2001). For the moment, we cannot exclude the possibility that other ribonucleases apart from RNase HI and RNase E are involved in the rapid degradation of *lac* RNA in the *topA* null mutant bearing the *boxA-lac* fusion.

Following the uncoupling of transcription and translation by the addition of spectinomycin, we found that both *lacA* and *lacZ* RNA were still more extensively degraded when they were synthesized from the *boxA-lac* fusion as compared to the *boxA4UG-lac* fusion (Fig. 12). This result suggests that the *boxA*-mediated

antitermination system makes the RNA polymerase more prone to R-loop formation. Although we have no explanation for this phenomenon, it may explain, at least in part, why rRNA synthesis is subject to R-loop formation. The enhanced transcription velocity promoted by this antitermination system might increase transcription-induced negative supercoiling and its associated R-loop formation. This hypothesis was recently proposed to explain the stimulation of R-loop-dependent hypernegative supercoiling due to transcription of the untranslated *HindIII* fragment from the *rrnB* operon (Broccoli *et al.*, 2004).

*Mechanism(s) of RNase HI compensation in the absence of topoisomerase I*

In this paper, we have also shown that overproduction of RNase HI was very effective at suppressing the *lac* expression defect from the *boxA-lac* fusion in *topA* null mutants. At first glance, this might seem surprising if RNase HI was responsible for *lac* RNA degradation as we propose (see above). This very efficient suppression can be rationalized if RNase HI overproduction acts by *preventing* extensive R-loop formation. One key factor for R-loop formation is the negative supercoiling level, whether local, being generated by transcription, or global, being the result of topoisomerases activity. Hypernegative supercoiling during *in vitro* transcription in the presence of gyrase but in the absence of topoisomerase I can be prevented by sufficient amounts of RNase HI (Phoenix *et al.*, 1997). More recently, we have found a correlation between the presence of hypernegative supercoiling, the failure to accumulate full-length RNAs and growth inhibition in the absence of topoisomerase I, at the non-permissive

temperature (Broccoli and Drolet, unpublished results). In fact, hypernegative supercoiling was rapidly eliminated when RNase HI was overproduced, which also allowed growth and the accumulation of full-length RNAs. On the other hand, hypernegative supercoiling as well as shorter than full-length RNAs were detected as long as growth was inhibited when RNase HI was not overproduced, i.e. for about 90 minutes at 28<sup>0</sup>C. In addition, we have recently been able to construct a double *topA mhA* null mutant when both topoisomerase III and topoisomerase IV were overproduced and in the presence of the *gyrB(Ts)* mutation (Broccoli and Drolet, unpublished results). The DNA in these cells was found to be extensively relaxed, even at the usual non-permissive temperature, with a negative supercoiling level significantly lower than the one of a wild-type cell DNA. Interestingly, cell growth was not inhibited upon transferring these cells at the non-permissive temperature, nor was the accumulation of full-length RNAs altered. Therefore, it appears that by rapidly eliminating (e.g. by RNase HI overproduction) or by preventing (e.g. by topoisomerase IV overproduction) hypernegative supercoiling, extensive R-loop formation leading to RNA degradation can be prevented. Also, RNase HI overproduction can probably act by rapidly removing otherwise persistent R-loops, that can sometimes be roadblocks for RNA polymerases, when the gene is heavily transcribed (e.g. *rm* operons).



## 7.5. Experimental procedures

### *Escherichia coli strains and plasmids*

RFM445 (*gyrB* (Ts)), RFM475 (*gyrB* (Ts)  $\Delta$ *topA*) and RFM480 (*gyrB*(Ts) *topA*::Tn10) have been previously described (Drolet *et al.*, 1995). The *me* $\Delta$ 14 derivatives of RFM445 and RFM475 were constructed by transduction with P1vir phage grown on AC28 (MC1061, *zce-726*::Tn10, *me* $\Delta$ 14 (aa $\Delta$  636-845), obtained from A.J. Carpousis; Leroy *et al.*, 2002). Tetracycline resistant transductants were selected and the presence of the *me* $\Delta$ 14 mutation was confirmed by PCR using the RNE1 d(CTGGAAATGTCCCGTCAG) and the RNE2 d(CACTTCCGGTTGCGGTTC) oligonucleotides. The chromosomal *lac* fusions were obtained by using the system previously described by Simons *et al.* (1987). When required, Pfu polymerase (Stratagene) was used for PCR to obtain the various DNA fragments to construct the fusions. pMD217 and pMD306 have been previously described (Massé *et al.*, 1997). These pTrc99a derivatives contain a *boxA* antitermination regulatory sequence inserted immediately downstream of the IPTG-inducible *P**trc* promoter. The 567 bp *Hind*III fragment from the *mB* operon was inserted downstream of the *boxA* sequence in pMD217, to give pMD306. pMD227 is identical to pMD217 but carries the mutated and inactive *boxA*4UG sequence (Squires *et al.*, 1993) instead of *boxA*. Oligonucleotides d(GCATAGATCTGCATTTACGTTGACACC) and d(CTGAAGATCTATCCGCCAAAACAGCC) were used in PCR reactions with pMD217, pMD227 and pMD306 to amplify DNA segments located between

nucleotides 2982 and 327 of the pTrc99a sequence. This region also includes the *lacI<sup>q</sup>* gene. The PCR products were digested with *Bgl*II (*Bgl*II sites are present in both oligonucleotides) and cloned in pRS550 digested with *Bam*HI to give the *boxA-lac*, *boxA4UG-lac* and *boxA-rrnB-lac* fusions (Fig. 6). Sequencing was performed to confirm the integrity of the fusions. The fusions were transferred on the chromosome by using  $\lambda$ RS45 phage as described (Simons *et al.*, 1987). Single copy integrations were confirmed by PCR as previously performed (Powell *et al.*, 1994). pEM001 and pEM003 are pACYC184 derivatives that, respectively, carry the wild-type *mhA* gene or a mutated and inactive version of this gene (Massé *et al.*, 1997).

#### *Media and growth conditions*

Unless otherwise indicated, cells were grown in VB Casa: Vogel-Bonner minimal medium (Drolet *et al.*, 1995) supplemented with casamino acids (0.1%), glucose (0.2%), thiamine (5  $\mu$ g/ml) and cysteine (10  $\mu$ g/ml). When needed, kanamycin was added at 25  $\mu$ g/ml, chloramphenicol at 30  $\mu$ g/ml and tetracycline at 10  $\mu$ g/ml. Bacteria from overnight cultures on plates were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.1 in liquid VB Casa medium and grown as indicated.

### *$\beta$ -galactosidase assays*

$\beta$ -Galactosidase activity was assayed as described in Miller (1992) with the following modifications: 1 ml of cells were disrupted with 50  $\mu$ l of lysis buffer (2.5 ml of  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5 ml of toluene, 0.5 ml of 0.02 M  $\text{MnSO}_4$ , 0.5 ml of 10% SDS) for 10 min at 28°C. Next, 75  $\mu$ l of the disrupted cells were mixed with 725  $\mu$ l of  $\text{NaPO}_4$  buffer (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , pH 7.0) and 200  $\mu$ l of ONPG (o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) at 4 mg/ml.

### *RNA extraction*

RNA extraction was performed by using the TRIZOL reagent (Invitrogen) as described (Baaklini *et al.*, 2004).

### *Northern blots*

Northern blots of RNA samples (15  $\mu$ g) separated by electrophoresis in 1.2% agarose gels containing formaldehyde were performed as described (Hraiky *et al.*, 2000). Northern blots of RNA samples separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide denaturing gels were performed as described (Baaklini *et al.*, 2004). The random primed LACZ probe (~900 bp) was obtained by PCR using the oligonucleotides LACPCR5, d(CCGTCATAGCGATAACG) and LACPCR3, d(GCTGTTGACTGTAGCGG). The random primed LACA probe (~570 bp) was obtained by PCR using the oligonucleotides LACA5', d(GATCGCATTGAACATGCC) and LACA3', d(CCGGTCGTTTATTTTCGCG).

The probes were labeled using a Ready-To-Go DNA Labeling Kit (Amersham Biosciences) with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP. Non incorporated nucleotides were removed by using Quick Spin columns (Roche). PTRC oligonucleotide, d(AAATTGTTAAAGAGCAGTGTCTGACTCTAGAGGATCCCGAAATTGTTATCCGCTCA) and LACZEND oligonucleotide, d(GTAGCGACCGGCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATACTGACGGGCTCCAGGAGTCG), were used to detect respectively the 5' and the 3' region of *lacZ*. These oligonucleotides were labeled with  $\gamma$ - $^{32}$ P using T4 polynucleotide kinase from New England BioLabs. When indicated, band densities were quantified using a Phosphorimager Typhoon 9400 (Amersham Biosciences) with the ImageQuant image analysis software (Molecular Dynamics).

## 7.6. Acknowledgments

We thank Patrick Hallenbeck for critical reading of the manuscript. This work was supported by grant MOP-12667 from the CIHR.

## 7.7. References

- Adhya, S and Gottesman, M.** (1978) Control of transcription termination. *Annu Rev Biochem*, **47**, 967-996.
- Albrechtsen, B, Squires, C.L., Li, S. and Squires, C.** (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rmG* leader region. *J Mol Biol*, **213**, 123-134.
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.-C. and Drolet, M.** (2004) RNase HI is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**, 198-211.

- Bentin, T., Cherny, D., Larsen, H.J. and Nielsen, P.E.** (2005) Transcription arrest caused by long nascent RNA chains. *Biochim Biophys Acta* **1727**, 97-105.
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M.** (2004). Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced supercoiling and associated R-loop formation. *Mol Microbiol*, **52**, 1769-1779.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C.** (2003) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **278**, 30705-30710.
- Condon C, Squires, C. and Squires, C. L.** (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**, 623-645.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F. and Crouch, R.J.** (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3526-3530.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E. and Baaklini, I.** (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci*, **8**, D210-221.
- Gopal, V., Brieba, L.G., Guajardo, R., McAllister, W.T. and Sousa, R.** (1999) Characterization of structural features important for T7 RNAP elongation complex stability reveals competing complex conformations and a role for the non-template strand in RNA displacement. *J Mol Biol*, **290**, 411-431.
- Higgins, N.P., Deng, S., Pang, Z., Stein, R.A., Champion, K. and Manna, D.** (2005) Domain behavior and supercoil dynamics in bacterial chromosomes. In *The Bacterial Chromosome*. Higgins, N.P. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 133-153.
- Huertas, P. and Aguilera, A.** (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell*, **12**, 711-721.

- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M.** (2000) RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **275**, 11257-11263.
- lost, I. and Dreyfus, M.** (1995) The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*, **14**, 3252-3261.
- Joyce, S.A. and Dreyfus, M.** (1998) In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **282**, 241-254.
- Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I. and Carpousis, A.J.** (2005) Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 6913-6918.
- Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Dreyfus, M. and Boni, I.V.** (2005) AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187**, 1344-1349.
- Kushner, S.R.** (2005) mRNA decay and processing. In *The Bacterial Chromosome*. Higgins, N.P. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 133-153.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M. and Carpousis, A.J.** (2002) Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol Microbiol*, **45**, 1231-1243.
- Li Y. and Altman, S.** (2004) Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **339**, 31-39.
- Mackie, G.A.** (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature*, **395**, 720-723.
- Massé, E., Phoenix, P. and Drolet, M.** (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rmB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **272**, 12816-12823.
- Massé, E. and Drolet, M.** (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **274**, 16654-16658.

- Massé, E. and Drolet, M. (1999b)** *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, **274**, 16659-16664.
- Massé, E. and Drolet, M. (1999c)** R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol*, **294**, 321-332.
- Miller, J. H. (1992)** *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M. (1997)** Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**, 1473-1479.
- Powell, B.S., Rivas, M.P., Court, D.L., Nakamura, Y. and Turnbough, C.L. Jr. (1994)** Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1278.
- Simons, R.W., Houtman, F. and Kleckner, N. (1987)** Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, **53**, 85-96.
- Squires, C.L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C. and Squires, C. (1993)** Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 970-974.
- Spickler, C., Stronge, V. and Mackie, G.A. (2001)** Preferential cleavage of degradative intermediates of *rpsT* mRNA by the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J Bacteriol*, **183**, 1106-1109.
- Squires, C.L. and Zaporozets, D. (2000)** Proteins shared by the transcription and translation machines. *Annu Rev Microbiol*. **54**, 775-798.
- Steck, T.R., Franco, R.J., Wang, J.Y. and Drlica, K. (1993)** Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol Microbiol*, **10**, 473-481.
- Vogel, U. and Jensen, K.F. (1995)** Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and (p)ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 18335-18340.

**Yarchuk, O., Jacques, N., Guillerez, J. and Dreyfus, M. (1992)**  
Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ*  
gene. *J Mol Biol*, **226**, 581-596.



## 8. Discussion

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'antiterminaison de la transcription sur l'expression génique en absence de topoisomérase I. Les souches isogéniques *topA* utilisées dans cette étude possèdent une mutation compensatoire thermosensible dans le gène *gyrB*. Cette mutation *gyrB*(Ts) s'exprime à 37°C et diminue ainsi considérablement l'activité de la gyrase à cette température. Elle permet ainsi aux mutants *topA* de pouvoir croître normalement à 37°C (température permissive). Cependant, à 28°C (température restrictive) et à des températures plus basses, la mutation *gyrB*(Ts) ne s'exprime plus et la gyrase devient pleinement active. Les souches *gyrB*(Ts)*topA* se comportent alors comme de vrais mutants *topA*.

Les fusions transcriptionnelles utilisées dans cette étude consistent en des fusions entre la séquence minimale d'antiterminaison des opérons *rrn* chez *E. coli*, la séquence *boxA*, et l'opéron *lac* contenant le gène rapporteur *lacZ*. Deux fusions transcriptionnelles furent construites, une contenant la séquence *boxA* sauvage («wild type») et l'autre contenant une séquence *boxA* mutée (*boxA4UG*). Il a été précédemment démontré que cette mutation abolit le système d'antiterminaison *in vivo* et *in vitro*, incluant son effet sur la vitesse de la transcription par l'ARN polymérase (Albrechtsen *et al.* 1990; Squires *et al.* 1993; Vogel et Jensen 1995). Une troisième fusion fut utilisée, la fusion *boxA-rrnB-lac*. Cette fusion contient un fragment *HindIII* de 567 pb de l'opéron *rrnB* dans son orientation physiologique et il fut précédemment démontré qu'il y a formation de R-loops dans ce fragment chez le mutant *topA* (Massé *et al.* 1997). Le gène rapporteur *lacZ* a

donc été utilisé pour étudier l'effet de l'antiterminaison de la transcription sur l'expression génique chez le mutant *topA*.

Ces fusions transcriptionnelles ont été insérées en une seule copie sur le chromosome bactérien de souches *gyrB(Ts)* et *gyrB(Ts)topA*, grâce à des transductions effectuées à l'aide du bactériophage  $\lambda$ . De cette façon, nous pouvons bien comparer les différences d'expression en ayant une copie unique de la fusion, chose qui n'aurait pas été possible avec des fusions plasmidiques. Finalement, les plasmides pEM001 (surproduit la RNase HI) et pEM003 (identique à pEM001 mais contient un gène *rnhA* inactivé) ont été ensuite introduits dans ces souches par transformation.

Il a été démontré que les mutants *topA* ont des problèmes d'expression génique (Baaklini *et al.* 2004) et les résultats des dosages de  $\beta$ -galactosidase effectués dans cette étude le démontrent également. En effet, si on compare les valeurs obtenus à 28°C (température restrictive) pour la fusion transcriptionnelle contenant la séquence *boxA4UG*, qui mime en quelque sorte la situation normale de l'expression des ARNm, car le système d'antiterminaison n'est pas fonctionnel, on remarque que le mutant *topA* produit moins de  $\beta$ -galactosidase que la souche témoin *gyrB(Ts)* (tableau 1; 833 unités pour *gyrB(Ts)topA* vs 2138 unités pour *gyrB(Ts)*). De plus, la surproduction de RNase HI par le plasmide pEM001 permet de corriger partiellement les problèmes de synthèse du mutant *topA* (tableau 1; 1208 unités). Pour ce qui est de la fusion transcriptionnelle avec *boxA*, les problèmes d'expression du mutant *topA* sont exacerbés (tableau 1; 29 unités pour *gyrB(Ts)topA* vs 624 unités pour *gyrB(Ts)*). Encore une fois, la surproduction de

RNase HI corrige en partie (cependant beaucoup mieux en proportion que pour *boxA4UG*) les difficultés du mutant *topA* (29 unités sans surproduction de la RNase HI vs 480 unités avec surproduction de la RNase HI). La surproduction de RNase HI augmente la synthèse de  $\beta$ -galactosidase de la fusion *boxA* par un facteur de 16,7 chez le mutant *topA*. Les résultats obtenus pour la fusion transcriptionnelle *boxA-rrnB-lac* sont similaires car l'amélioration fournie par la RNase HI est d'un facteur de 14,1. De plus, la correction par la RNase HI est supérieure avec cette fusion (corrige à 100%), ce qui n'est pas le cas avec les deux autres fusions transcriptionnelles. La correction est peut-être supérieure avec cette fusion parce que les R-loops dégradés par la RNase HI sont principalement situés dans le fragment *Hind III*, une portion d'ARN qui n'est pas essentielle à l'expression fonctionnelle de *lacZ*. Pour ce qui est de la fusion *boxA4UG*, l'amélioration n'est que d'un facteur de 1,5 car la synthèse de  $\beta$ -galactosidase à partir de cette fusion n'est pas très problématique chez le mutant *topA* qui ne surproduit pas la RNase HI.

Les contrôles effectués à 37°C (température permissive) démontrent bel et bien que l'expression génique est moins problématique pour le mutant *topA* lorsque la mutation compensatoire *gyrB(Ts)* est exprimée. Les différences obtenues en valeurs de  $\beta$ -galactosidase à 28°C ne sont pas dues à des variations au niveau de l'initiation de la transcription à partir du promoteur *P<sub>trc</sub>*, tel que démontré par des expériences d'extension d'amorce («primer extension») (résultat non montré).

L'utilisation d'une sonde en 5' (PTRC) de nos fusions transcriptionnelles nous a permis de constater que les mutants *topA* qui ne surproduisent pas la RNase HI accumulaient des ARNm courts en proportion plus importante, et ce peu importe la fusion transcriptionnelle utilisée (voir figure 7). D'ailleurs, ce résultat est en accord avec la démonstration récente que les mutants *topA* ont de la difficulté à accumuler des ARNm pleine longueur si la RNase HI n'est pas surproduite (Baaklini *et al.* 2004).

La proportion importante de courts ARN par rapport au pleine longueur chez les mutants *topA* est non seulement due à l'inhibition de l'expression génique par la présence de R-loops, mais semblerait-il également à une pénurie de PNPase et de RNase II qui n'arrivent pas à dégrader efficacement ce surplus important de courts ARN lié à la présence de ces R-loops. Ainsi, les courts ARN détectés en 5' chez les mutants *topA* ne surproduisant pas la RNase HI sont probablement le reflet d'un manque de PNPase et de RNase II. Ces ARN sont les produits d'un clivage rapide de l'ARNm dans la région 5' (figure 6). Puisqu'ils s'accumulent à des niveaux similaires que ce soit avec la fusion *boxA* ou *boxA4UG*, leur production n'est pas liée à l'effet RNase HI observé avec la fusion *boxA* chez le mutant *topA* (Tableau 1). En d'autres termes, les différences de valeurs de  $\beta$ -galactosidase obtenus entre la fusion *boxA4UG* et la fusion *boxA* chez le mutant *topA* ne sont pas expliquées par la présence de ces ARNm courts détectés en 5'.

De plus, très peu d'ARNm *lacZ* pleine longueur est détecté avec cette sonde, et ce peu importe les différentes souches (même avec la souche témoin *gyrB(Ts)*). Ceci est dû au rapide clivage dans la région 5' par différentes endoribonucléases (figure 6). Puisque notre sonde s'hybride au fragment 5' de ce clivage (et non le fragment 3' qui contient la suite de l'opéron *lac*), nous ne pouvons détecter la quantité d'ARNm pleine longueur

produite. Nous avons ainsi par la suite conclu que l'utilisation de cette sonde n'était pas appropriée pour déterminer l'effet de la RNase HI sur l'expression de *lac* à partir de nos fusions.

Suite à ce résultat, nous avons vérifié par northern blot la synthèse du transcrit *lacZ* à l'aide d'une sonde «random primed» en 3' (LACZ). Le mutant *topA* peine à synthétiser des ARNm pleine longueur et ce problème est plus spécifique à la fusion comportant la séquence *boxA* (figure 8a). En effet, le résultat obtenu est similaire avec la fusion transcriptionnelle *boxA-rrnB-lac*. Non seulement la quantité d'ARNm pleine longueur est plus faible, mais également la présence d'un «smear» vers des ARN plus courts est plus importante. C'est-à-dire qu'en proportion, le «smear» est plus important que la quantité d'ARNm pleine longueur. D'ailleurs, le «smear» détecté avec une sonde en 3' du gène *lacZ* indique la présence d'une population d'ARNm possédant des extrémités 5' hétérogènes, donc des ARNm de longueurs différentes. Ce résultat est particulier puisqu'il n'y a toujours pas d'exonucléases connues qui dégradent les ARNm de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' chez *E. coli*. Ces ARNm de longueurs différentes ne sont donc pas issus d'une attaque exonucléolytique. Une explication à la présence de ce «smear» en 3' peut être apportée par la formation de R-loops. Les R-loops surviennent aux hasard lors de la transcription (et non à des endroits précis) lorsque les conditions sont favorables à leur formation, principalement s'il y a accumulation de surenroulement négatif transitoire à l'arrière du complexe transcriptionnel. Ils peuvent probablement s'étendre sur des distances variables avant qu'ils ne soient dénoués soit par un clivage de la RNase HI ou par l'hélicase RecG. Les ARNm issus d'un clivage de la RNase HI, qui

détruit ainsi le R-loop, auront alors des extrémités 5' hétérogènes car les clivages n'ont pas tous lieu au même endroit sur l'ARNm, d'où la détection d'un «smear» avec une sonde en 3'. Cependant, la sonde utilisée est relativement longue (~900 pb) et aurait pu fausser l'interprétation de ces résultats. Nous avons donc utilisé une autre sonde beaucoup plus courte (oligonucléotide LACZ-3) qui s'hybride dans la région couverte par la sonde «random primed» LACZ pour vérifier notre hypothèse. Les résultats obtenus avec cette sonde ont été identiques (résultat non montré). D'ailleurs, nous avons également utilisé un autre oligonucléotide (LACZEND) qui s'hybride complètement à l'extrémité 3' du gène *lacZ* et nous avons également détecté la présence de ce «smear» (figure 8b). Ceci laisse donc croire que la transcription se rend jusqu'à la fin du gène *lacZ*, mais que la présence aléatoire de R-loops chez le mutant *topA* entraîne la formation d'une population d'ARNm avec des extrémités 5' hétérogènes car la maturation de l'opéron est altérée. Le fragment généré en 5' par le clivage de la RNase HI est ensuite probablement rapidement dégradé par les exonucléases 3'→5' de la cellule.

La stabilité différentielle du transcrit *lacZ* des fusions *boxA* et *boxA4UG* dans les souches utilisées pourrait expliquer partiellement les variations de valeurs de  $\beta$ -galactosidase. L'ARNm *lacZ* est moins stable chez le mutant *topA* comportant la fusion *boxA* ne surproduisant pas la RNase HI (figures 9a et 9b). On remarque d'ailleurs que la quantité d'ARNm *lacZ* dans la cellule chute immédiatement après l'ajout de rifampicine (antibiotique qui inhibe l'initiation de la transcription, mais pas les complexes transcriptionnels qui sont en train de transcrire), ce qui n'est pas le cas avec les autres souches (figure 9c). Ceci laisse supposer qu'il n'y a pas beaucoup de ribosomes sur

l'ARNm *lacZ* ou qu'ils sont bloqués à cause de la présence de R-loops, ce qui expliquerait alors la dégradation rapide du transcrit chez *topA* ayant la fusion *boxA*. Les résultats avec la fusion *boxA-rrnB-lac* sont similaires (figure 10).

Il ne faut pas oublier que le découplage produit par la séquence *boxA* entraîne aussi probablement une diminution de la stabilité du transcrit chez le mutant *topA*. Puisque la surproduction de la RNase HI corrige partiellement la stabilité du transcrit, les R-loops sont probablement la cause de l'instabilité de *lacZ* dans cette souche. En effet, la présence de R-loops pourrait bloquer la progression des ribosomes sur le transcrit, celui-ci étant alors plus susceptible à l'attaque des ribonucléases. Chez les gènes activement transcrits, la présence de R-loops aurait plutôt des répercussions directement sur la transcription puisque les ARN polymérase suivantes seraient bloquées («roadblocks»), une hypothèse qui a d'ailleurs été avancée pour expliquer les problèmes de transcription des opérons *rrn* chez le mutant *topA* (Hraiky *et al.* 2000). De plus, la dégradation du R-loop par la RNase HI entraîne inévitablement une perte d'ARN. C'est d'ailleurs pour cette raison que la surproduction de la RNase HI ne rétablit pas complètement les valeurs de  $\beta$ -galactosidase et les quantités d'ARNm pleine longueur. Évidemment, la dégradation d'ARNm est néfaste pour la cellule, mais favorise dans ce cas la transcription complète de l'opéron qui était entravée par la présence de R-loops.

D'un autre côté, la stabilité de *lacZ* dans les différentes souches est relativement importante. En effet, la présence de la séquence d'antiterminaison, qu'elle soit fonctionnelle (*boxA*) ou inactive (*boxA4UG*), a certainement un rôle à jouer dans la stabilité du messenger *lacZ*. Les valeurs typiques de demi-vie de l'ARNm *lacZ* qu'on

retrouve habituellement sont moins importantes que celles que nous obtenons pour nos fusions transcriptionnelles. Le groupe de Komarova *et al.* a démontré que la protéine ribosomique S1, une composante essentielle de la machinerie de traduction chez *E. coli*, possède une affinité pour les régions d'ARN simple brin A-U riche et qu'elle peut se lier à la séquence d'antiterminaison *boxA* (qui est d'ailleurs une séquence A-U riche) (Komarova *et al.* 2005). Ceci aurait pour effet d'augmenter le rendement de la traduction et ainsi la stabilité de *lacZ*, d'où la stabilité accrue observée avec nos fusions. Probablement que S1 peut également se fixer à la séquence *boxA4UG*, ce qui favoriserait grandement l'expression de *lacZ* à partir de cette fusion.

Des phénotypes semblables à ceux observés avec *lacZ* chez le mutant *topA* avaient été précédemment observés avec d'autres ARNm (Baaklini *et al.* 2004). Puisque *lac* est un opéron, nous avons décidé de vérifier un peu plus en 3' de celui-ci pour voir si nous allions obtenir des observations similaires ou des phénotypes plus importants avec une sonde «random primed» LACA (le gène *lacA* étant le dernier de l'opéron *lac*). Les difficultés à synthétiser des ARNm pleine longueur pour le mutant *topA* sont encore plus évidentes avec cette sonde (figure 11). En effet, on détecte peu d'ARNm *lacA* chez le mutant *topA* et le problème est amplifié avec la fusion *boxA*. Encore une fois, la surproduction de la RNase HI corrige en partie l'incapacité du mutant *topA* à synthétiser de l'ARNm pleine longueur. La situation est encore plus grave avec *lacA* par rapport à *lacZ*, parce que *lacA* est situé plus en 3' de l'opéron. Ainsi, la probabilité qu'il y ait formation et élongation d'un R-loop dans ou en amont de *lacA* est plus élevée que pour le gène *lacZ* puisque celui-ci est situé au début de l'opéron (plus en 5').



Les effets observés dans *lacA* avec la fusion transcriptionnelle *boxA* peuvent aussi être reproduits avec la fusion transcriptionnelle *boxA4UG*, mais seulement lorsqu'on ajoute de la spectinomycine à la culture bactérienne. La spectinomycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 30S du ribosome, mais qui n'affecte pas la transcription. En ajoutant cet antibiotique, on crée volontairement un découplage entre la transcription et la traduction et on observe des phénotypes semblables, quoique moins prononcés, avec *boxA4UG* qu'avec *boxA* chez le mutant *topA* ne surproduisant pas la RNase HI (figure 12). Ainsi, les phénotypes associés à la fusion *boxA* du mutant *topA* sont donc provoqués par un découplage entre la transcription et la traduction, qui expose l'ARN de *lac* à la formation de R-loops et éventuellement à la dégradation.

Comme précédemment mentionné, le découplage entre la transcription et la traduction peut favoriser la dégradation des ARNm par les différentes ribonucléases de la cellule. Il a été démontré que la RNase E est responsable d'un clivage endonucléolytique dans l'opéron *lac* lorsqu'il n'est pas traduit (Iost et Dreyfus 1995). La mutation *rneΔ14* (Leroy *et al.* 2002) que nous avons utilisée altère la dégradation de l'ARN *lac* qui n'est pas traduit (l'ARN serait habituellement dégradé par la RNase E dans de telles conditions). Donc, lorsqu'on ajoute de la spectinomycine et qu'on provoque ainsi un découplage, la mutation *rneΔ14* devrait stabiliser *lac* si les problèmes d'expression observés sont dus à l'action de la RNase E. Cette mutation n'a pas réussi à rétablir des quantités fonctionnelles d'ARNm chez le mutant *topA* ne surproduisant pas la RNase HI, elle ne fait que stabiliser les quantités d'ARN courts (figure 13). D'ailleurs, le résultat est

similaire pour *lacA* aussi dans la souche témoin *gyrB*(Ts). En fait, la mutation *rneΔ14* ne fait que tout simplement stabiliser les ARNm qui sont produits. Ainsi, nous nous sommes assurés avec la mutation *rneΔ14* que la difficulté à synthétiser des ARNm pleine longueur associée à la fusion *boxA* du mutant *topA* ne surproduisant pas de RNase HI n'est pas due à l'action de la RNase E.

L'expression génique à partir de la fusion *boxA* est plus laborieuse car le système d'antiterminaison augmente la vitesse de transcription, mais pas la vitesse de traduction, ce qui provoque un découplage entre ces deux processus. Le découplage peut avoir plusieurs effets négatifs pour la cellule. Il peut favoriser la terminaison prématurée de la transcription par l'action de la protéine Rho, favoriser la dégradation ou altérer la maturation des ARNm et finalement favoriser la formation de R-loops. Il est clair que plusieurs phénotypes observés chez le mutant *topA* sont liés à la formation de R-loops (indirectement révélé par l'accumulation de surenroulement hypernégatif de l'ADN). Tout d'abord, il ne semble pas y avoir plus de terminaison prématurée avec la fusion *boxA*, par rapport à *boxA4UG*, car on ne détecte pas en proportion plus de courts ARNm. De plus, les phénotypes associés au mutant *topA* ne sont pas le résultat d'une dégradation des ARNm de la part des ribonucléases comme démontré avec l'utilisation de la mutation *rneΔ14*. Il est donc évident que le découplage favorise plus fortement la formation de R-loops chez le mutant *topA* avec la fusion *boxA* par rapport aux deux autres mécanismes. Aussi, puisque la surproduction de RNase HI améliore l'expression génique des mutants *topA*, ceci laisse croire que la formation de R-loops est responsable de leur difficulté à synthétiser des ARNm pleine longueur. D'ailleurs, notre hypothèse du découplage est

corroborée par les travaux d'un autre groupe (Komarova *et al.* 2005) qui spécule que la séquence d'antiterminaison *boxA* provoque la formation d'une région dénudée dans l'ARN naissant entre l'ARN polymérase et le premier ribosome traduisant, suite à l'augmentation de la vitesse de transcription.

Finalement, nous avons auparavant effectué des extractions topologiques de plasmides contenant une fusion entre la séquence *boxA* ou *boxA4UG* et le fragment *HindIII* de 567 pb de l'opéron *rrnB*, sous le contrôle du promoteur *P<sub>trc</sub>*. Nous avons détecté la présence de R-loops dans ce fragment *HindIII* (révélés par l'extraction d'ADN surenroulé hypernégativement) s'il était précédé par la séquence *boxA*, mais pas de la séquence *boxA4UG* (Broccoli *et al.* 2004). Ce surenroulement hypernégatif disparaît si on surproduit la RNase HI. De plus, l'instabilité des plasmides contenant une séquence *boxA* avait été précédemment constatée lors de l'induction de la transcription du fragment *HindIII* si la RNase HI n'était pas surproduite chez le mutant *topA* (Drolet *et al.* 2003). Suite à ces observations, nous avons voulu étudier plus en détail le rôle intrinsèque de la séquence *boxA* sur l'expression génique. Nous avons découvert que l'effet majeur de la séquence d'antiterminaison *boxA* en est un plutôt indirect, soit qu'elle provoque un découplage entre la transcription et la traduction, qui à son tour favorise la formation des R-loops. Cependant, même en ajoutant de la spectinomycine, où on provoque un découplage dans toutes les souches, on observe tout de même un peu plus de problèmes d'expression avec la séquence *boxA* par rapport à la séquence *boxA4UG*. Ainsi, une certaine partie des difficultés d'expression sont inhérente et attribuable à la séquence d'antiterminaison *boxA*.

La séquence *boxA* augmente la vitesse de la transcription. La vitesse de la transcription influence indirectement la formation de R-loops en modulant le niveau de surenroulement derrière l'ARN polymérase. En augmentant la vitesse, il est possible qu'il y ait génération d'une plus grande quantité de surenroulement négatif, et chez le mutant *topA*, le réappariement de l'ARN naissant au brin d'ADN matrice initiant alors la formation du R-loop pourrait être facilité (Broccoli *et al.* 2004). Alternativement, il est possible que l'assemblage des protéines qui constituent le système d'antiterminaison favorise la formation de structures particulières dans l'ARN. À leur tour, ces structures pourraient favoriser la formation et l'élongation des R-loops.

## 9. Conclusion

Les résultats de ce travail ont permis de consolider le rôle de la topoisomérase I dans l'antiterminaison de la transcription. L'association de la topoisomérase I avec l'ARN polymérase permet d'avancer plusieurs hypothèses sur sa fonction dans la cellule. Il a été démontré que la topoisomérase I est nécessaire à la transcription efficace de plusieurs gènes chez *E. coli* (Baaklini *et al.* 2004) et qu'elle joue un rôle dans l'antiterminaison de la transcription en empêchant l'accumulation de surenroulement négatif qui favorise la formation des R-loops. Ainsi, le couplage serré entre la transcription et la traduction est important non seulement pour empêcher la terminaison prématurée et la dégradation des ARNm, mais également pour empêcher la formation et l'élongation des R-loops qui peuvent avoir des conséquences aussi néfastes que les deux mécanismes précédents. Le

couplage de la transcription et de la traduction est tout spécialement important lorsque le surenroulement négatif peut s'accumuler.

En terminant, il serait intéressant de vérifier exactement la nature et les effets de l'accumulation de courts ARN chez le mutant *topA*. Puisque le mutant *topA* accumulent des courts ARN, il se peut que certaines nucléases soient attirer vers des cibles inhabituelles et l'utilisation de différents mutants pour ces nucléases permettrait d'en connaître un peu plus sur cette hypothèse et sur leur redistribution. Pour confirmer l'hypothèse du découplage, il serait possible d'étudier l'expression de gènes dont la région Shine-Dalgarno a été mutée, empêchant ainsi la traduction de ces gènes particuliers.

## 10. Bibliographie

- Aksoy, S., Squires, C.L. and Squires, C.** 1984. Evidence for antitermination in *Escherichia coli* rRNA transcription. *J. Bacteriol.* **159**:260-264
- Albrechtsen, B., Squires, C.L., Li, S. and Squires, C.** 1990. Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J. Mol. Biol.* **213**:123-134
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D. and Mitchell, P.** 1999. The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'→5' exonucleases. *Genes Dev.* **13**:2148-2158
- Altman, S., Kirsebom, L. and Talbot, S.** 1995. Recent studies of RNase P, p. 67-78. In D. Soll and U.L. RajBhandary (ed.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. ASM Press, Washington, D.C.
- Apirion, D. and Lassar, A.B.** 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.* **253**:1738-1742
- Arnold, G.F. and Tessman, I.** 1988. Regulation of DNA superhelicity by *rpoB* mutations that suppress defective Rho-mediated transcription termination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:4266-4271
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.C. and Drolet, M.** 2004. RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:198-211
- Babitzke, P., Granger, L., Olszewski, J. and Kushner, S.R.** 1993. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* multiple mutants carrying a deletion in RNase III. *J. Bacteriol.* **175**:229-239
- Bachelier, S., Gilson, E., Hofnung, M. and Hill, C.W.** 1996. Repeated sequences, p. 2012-2040. In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
- Baker, K.E. and Mackie, G.A.** 2003. Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **47**:75-88

- Baker, T.A., Sekimizu, K., Funnell, B.E. and Kornberg, A.** 1986. Extensive unwinding of the plasmid template during staged enzymatic initiation of DNA replication from the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Cell* **45**:53-64
- Barlow, T., Berkmen, M., Georgellis, D., Bayr, L., Arvidson, S. and von Gabain, A.** 1998. RNase E, the major player in mRNA degradation, is down-regulated in *Escherichia coli* during a transient growth retardation (diauxic lag). *Biol. Chem.* **379**:33-38
- Bear D.G., Andrews C.L., Singer J.D., Morgan W.D., Grant R.A., von Hippel P.H. and Platt, T.** 1985. *Escherichia coli* transcription termination factor Rho has a two-domain structure in its activated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1911-1915
- Bensaid, A., Almeida, A., Drlica, K. and Rouviere, J.** 1996. Cross-talk between topoisomerase I and HU in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256**:292-300
- Berg, K.L., Squires, C. and Squires, C.L.** 1989. Ribosomal RNA operon antitermination: function of leader and spacer region *boxB-boxA* sequences and their conservation in diverse micro-organisms. *J. Mol. Biol.* **209**:345-358
- Bermudez-Cruz, R.M., Chamberlin, M.J. and Montanez, C.** 1999. NusA is involved in transcriptional termination on lambda tI. *Biochimie* **81**:757-764
- Bliska, J.B. and Cozzarelli, N.R.** 1987. Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**:205-218
- Braun, F., Le Derout, J. and Régnier, P.** 1998. Ribosomes inhibit an RNase E cleavage which induces the decay of *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**:4790-4797
- Braun, F., Hajnsdorf, E. and Régnier, P.** 1996. Polynucleotide phosphorylase is required for the rapid degradation of the RNase E processed *rpsO* mRNA of *Escherichia coli* devoid of its 3' hairpin. *Mol. Microbiol.* **19**:997-1005
- Broccoli, S., Rallu, F., Sanscartier, P., Cerritelli, S.M., Crouch, R.J. and Drolet, M.** 2004. Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation. *Mol. Microbiol.* **52**:1769-1779
- Burns, C.M., Richardson, L.V. and Richardson, J.P.** 1998. Combinatorial effects of NusA and NusG on transcription elongation and Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **278**:307-316

- Burns, C.M., Nowatzke, W.L. and Richardson, J.P.** 1999. Activation of Rho-dependent transcription termination by NusG. Dependence on terminator location and acceleration of RNA release. *J. Biol. Chem.* **274**:5245-5251
- Burova, E., Hung, S.C., Sagitov, V., Stitt, B.L. and Gottesman, M.E.** 1995. *Escherichia coli* NusG protein stimulates transcription elongation rates *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **177**:1388-1392
- Cannistraro, V.J. and Kennell, D.** 1991. RNase I\*, a form of RNase I, and mRNA degradation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:4653-4659
- Cao, G.J. and Sarkar, N.** 1992. Poly(A) RNA in *Escherichia coli*: nucleotide sequence at the junction of the *lpp* transcript and the polyadenylate moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7546-7550
- Caponigro, G. and Parker, R.** 1996. Mechanism and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **60**:233-249
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C. and Krisch, H.M.** 1994. Copurification of *E. coli* RNase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**:889-900
- Carpousis, A.J.** 2002. The *Escherichia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:150-155
- Champoux, J.J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:369-413
- Chen, C-Y.A. and Richardson, J.P.** 1987. Sequence elements essential for  $\rho$ -dependent transcription termination at  $\lambda$ R1. *J. Biol. Chem.* **262**:11292-11299
- Chen, D., Bowater, R. and Lilley, D.M.** 1994. Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: delta *topA*-dependent activation of the *leu-500* promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.* **176**:3757-3764
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C.** 2003. Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **278**:30705-30710



- Cheng, S-W., Lynch, E.C., Leason, K.R., Court, D.L., Shapiro, B.A. and Friedman, D.I.** 1991. Functional importance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science* **254**:1205-1207
- Cheng, Z.F., Zuo, Y., Li, Z., Rudd, K.E. and Deutscher, M.P.** 1998. The *vacB* gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *J. Biol Chem.* **273**:14077-14080
- Cheng, Z.F. and Deutscher, M.P.** 2003. Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:6388-6393
- Cheng, Z.F. and Deutscher, M.P.** 2005. An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol. Cell.* **17**:313-318
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A.** 1996a. Overexpression, purification, and properties of *Escherichia coli* ribonuclease II. *J. Biol. Chem.* **271**:1048-1053
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A.** 1996b. Differential sensitivities of portions of the mRNA for ribosomal protein S20 to 3'-exonucleases dependent on oligoadenylation and RNA secondary structure. *J. Biol. Chem.* **271**:15776-15781
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A.** 1998. Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes. *J. Mol. Biol.* **279**:1061-1074
- Coburn, G.A. and Mackie, G.A.** 1999. Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res.* **62**:55-108
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J. and Mackie, G.A.** 1999. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev.* **13**:2594-2603
- Condon, C., Squires, C. and Squires, C.L.** 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**:623-645
- Das, A.** 1993. Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:893-930
- Deana, A., and Belasco, J.G.** 2004. The function of RNase G in *Escherichia coli* is constrained by its amino and carboxyl termini. *Mol. Microbiol.* **51**:1205-1217
- Deibler, R.W., Rahmati, S. and Zechiedrich, E.L.** 2001. Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev.* **15**:748-761

- Deutscher, M.P.** 1993. Promiscuous exoribonucleases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:4577-4583
- Deutscher, M.P. and Li, Z.** 2000. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog. Nucleic Acids Res.* **66**:67-105
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E. and Wright, A.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**:43-51
- Diwa, A., Bricker, A.L., Jain, C. and Belasco, J.G.** 2000. An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev.* **14**:1249-1260
- Donovan, W.P. and Kushner, S.R.** 1986. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:120-124
- Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**:425-433
- Drlica, K. and Zhao, X.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, É., Liu, L.F. and Crouch, R.J.** 1995. Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3526-3530
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, É. and Baaklini, I.** 2003. The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front. Biosci.* **8**:D210-D221
- Dunn, J.J. and Studier, F.W.** 1973. T7 early RNAs and *Escherichia coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs *in vivo* by ribonuclease III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3296-3300
- Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J. and Krisch, H.M.** 1992. Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: *in vivo* and *in vitro* analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. *Genes Dev.* **6**:149-159
- Emory, S.A., Bouvet, P. and Belasco, J.G.** 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **6**:135-148

- Espeli, O., Levine, C., Hassing, H. and Marians, K.J.** 2003a. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol. Cell* **11**:189-201
- Espeli, O., Lee, C. and Marians, K.J.** 2003b. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **278**:44639-44644
- Farnham, P.J. and Platt, T.** 1981. Rho-independent termination :dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription in vitro. *Nucleic Acids Res.* **9**:563-577
- Farnham, P.J., Greenblatt, J. and Platt, T.** 1982. Effects of NusA protein on transcription termination in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Cell* **29**:945-951
- Fisher, R. and Yanofsky, C.** 1983. A complementary DNA oligomer releases a transcription pause complex. *J. Biol. Chem.* **258**:9208-9212
- Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Regnier, P. and Hajnsdorf, E.** 2003. The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res.* **31**:7302-7310
- Franze de Fernandez, M.T., Eoyang, L. and August, J.T.** 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219**:588-590
- Friedman, D.I. and Olson, E.R.** 1983. Evidence that a nucleotide sequence, 'boxA', is involved in the action of the NusA protein. *Cell* **34**:143-149
- Funnell, B.E., Baker, T.A. and Kornberg, A.** 1987. *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**:10327-10334
- Galluppi, G.R. and Richardson, J.P.** 1980. ATP-induced changes in the binding of RNA synthesis termination protein Rho to RNA. *J. Mol. Biol.* **138**:513-539
- Geiselman, J., Wang, Y., Seifried, S.E. and von Hippel, P.H.** 1993. A physical model for the translocation and helicase activities of *Escherichia coli* transcription termination protein Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7754-7758
- Godefroy-Colburn, T. and Grunberg-Manago, M.** 1972. Polynucleotide phosphorylase, p. 533-574, In P.D. Boyer (ed.), *The enzymes*, vol. 7. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

- Gopal, B., Haire, L.F., Gamblin, S.J., Dodson, E.J., Lane, A.N., Papavinasundaram, K.G., Colston, M.J. and Dodson, G.** 2001. Crystal structure of the transcription elongation/anti-termination factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **314**:1087-1095
- Greenblatt, J. and Li, J.** 1981. Interaction of the sigma factor and the *nusA* gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription. *Cell* **24**:421-428
- Gowrishankar, J. and Harinarayanan, R.** 2004. Why is transcription coupled to translation in bacteria? *Mol. Microbiol.* **54**:598-603
- Gusarov, I. and Nudler, E.** 1999. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* **3**:495-504
- Gusarov, I. and Nudler, E.** 2001. Control of intrinsic transcription termination by N and NusA: the basic mechanisms. *Cell* **107**:437-449
- Hajnsdorf, E., Braun, F., Haugel-Nielsen, J. and Regnier, P.** 1995. Polyadenylation destabilizes the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3973-3977
- Harinarayanan, R. and Gowrishankar, J.** 2003. Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for runaway plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **332**:31-46
- Harmon, F.G., DiGate, R.J. and Kowalczykowski, S.C.** 1999. RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol. Cell* **3**:611-620
- Harmon, F.G., Brockman, J.P. and Kowalczykowski, S.C.** 2003. RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **278**:42668-42678
- Hatfield, G.W. and Benham, C.J.** 2002. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **36**:175-203
- Higgins, C.F., Ames, G.F., Barnes, W.M., Clement, J.M. and Hofnung, M.** 1982. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**:760-762

- Horwitz, R.J., Li, J. and Greenblatt, J.** 1987. An elongation control particle containing the N gene transcriptional antitermination protein of bacteriophage lambda. *Cell* **51**:631-641
- Hraiky, C., Raymond, M.A. and Drolet, M.** 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:11257-11263
- Huertas, P. and Aguilera, A.** 2003. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell* **12**:711-721
- Iost, I. and Dreyfus, M.** 1995. The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J.* **14**:3252-3261
- Jain, C. and Belasco, J.G.** 1995. RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev.* **9**:84-96
- Jin, D.J., Burgess, R.R., Richardson, J.P. and Gross, C.A.** 1992. Termination efficiency at Rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and Rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:1453-1457
- Kaberdin, V.R.** 2003. Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res.* **31**:4710-4716
- Kampranis, S.C. and Maxwell, A.** 1996. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:14416-14421
- Kang, S., Han, J.S., Park, J.H., Skarstad, K. and Hwang, D.S.** 2003. SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **278**:48779-48785
- Kaplan, D.L. and O'Donnell, M.** 2003. Rho factor: transcription termination in four steps. *Curr. Biol.* **13**:R714-716
- Kassavetis, G.A. and Chamberlin M.J.** 1981. Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **256**:2777-2786
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Schmid, M.B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R.** 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9419-9424

- Kingston, R.E. and Chamberlin, M.J.** 1981. Pausing and attenuation of *in vitro* transcription in the *rrnB* operon of *E. coli*. *Cell* **27**:523-531
- Kirkegaard, K. and Wang, J.C.** 1985. Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J. Mol. Biol.* **185**:625-637
- Kogoma, T.** 1997. Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:212-238
- Komarova, A.V., Tchufistova, L.S., Dreyfus, M. and Boni, I.V.** 2005. AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:1344-1349
- Kushner, S.R.** 1996. mRNA decay, p. 849-860. In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed., vol. 2. ASM Press, Washington, D.C.
- Kushner, S.R.** 2004. mRNA decay and processing, p. 327-345, In N.P. Higgins (ed.), *The bacterial chromosome*, ASM Press, Washington, D.C.
- Landick, R. and Yanofsky, C.** 1984. Stability of an RNA secondary structure affects *in vitro* transcription pausing in the *trp* operon leader region. *J. Biol. Chem.* **259**:11550-11555
- Lau, L.F., Roberts, J.W. and Wu, R.** 1983. RNA polymerase pausing and transcript release at the  $\lambda_{RI}$  terminator *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **258**:9391-9397
- Lee, K., Zhan, X., Gao, J., Qiu, J., Feng, Y., Meganathan, R., Cohen, S.N. and Georgiou, G.** 2003. RraA: a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell* **114**:623-634
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M. and Carpousis, A.J.** 2002. Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of Rnase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Mol. Microbiol.* **45**:1231-1243
- Lesnik, E.A., Sampath, R., Levene, H.B., Henderson, T.J., McNeil, J.A. and Ecker, D.J.** 2001. Prediction of rho-independent transcriptional terminators in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **29**:3583-3594

- Levine, C., Hiasa, H. and Marians, K.J.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**:29-43
- Lewicki, B.T.U., Margus, T., Remme, J. and Nierhaus, K.H.** 1993. Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly *in vivo*. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **231**:581-593
- Li, J., Horwitz, S., McCracken, S. and Greenblatt, J.** 1992. NusG, a new *Escherichia coli* elongation factor involved in transcription antitermination by the N protein of phage lambda. *J. Biol. Chem.* **267**:6012-6019
- Li, J., Mason, S.W. and Greenblatt, J.** 1993. Elongation factor NusG interacts with termination factor  $\rho$  to regulate termination and antitermination of transcription. *Genes Dev.* **7**:161-172
- Li, Y. and Altman, S.** 2003. A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:13213-13218
- Li, Y. and Altman, S.** 2004. Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **239**:31-39
- Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M.P.** 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**:2878-2885
- Li, Z. and Deutscher, M.P.** 2002. RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *RNA* **8**:97-109
- Lin-Chao, S., Wei, C.L. and Lin, Y.T.** 1999. RNase E is required for the maturation of *ssrA* RNA and normal *ssrA* RNA peptide-tagging activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:12406-12411
- Liu, L.F. and Wang, J.C.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7024-7027
- Liu, Y., Bondarenko, V., Ninfa, A. and Studitsky, V.M.** 2001. DNA supercoiling allows enhancer action over a large distance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14883-14888

- Lowery, C. and Richardson, J.P.** 1977. Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) activity of RNA synthesis termination factor  $\rho$ . I. Enzymatic properties and effects of inhibitors. *J. Biol. Chem.* **252**:1375-1380
- Lundberg, U. and Altman, S.** 1995. Processing of the precursor to the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *RNA* **1**:327-334
- Lynn, S.P., Kasper, L.M. and Gardner, J.F.** 1988. Contributions of RNA secondary structure and length of the thymidine tract to transcription termination at the *thr* operon attenuator. *J. Biol. Chem.* **263**:472-479
- Mackie, G.A.** 1991. Specific endonucleolytic cleavage of the mRNA for ribosomal protein S20 of *Escherichia coli* requires the products of the *ams* gene *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* **173**:2488-2497
- Mackie, G.A., Genereaux, J.L. and Masterman, S.K.** 1997. Modulation of the activity of RNase E *in vitro* by RNA sequences and secondary structures 5' to cleavage sites. *J. Biol. Chem.* **272**:609-616
- Mackie, G.A.** 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**:720-723
- Mah, T.F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., Severinov, K. and Greenblatt, J.** 2000. The alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA. *Genes Dev.* **14**:2664-2675
- Mah, T.F., Li, J., Davidson, A.R. and Greenblatt, J.** 1999. Functional importance of regions in *Escherichia coli* elongation factor NusA that interacts with RNA polymerase, the bacteriophage lambda N protein and RNA. *Mol. Microbiol.* **34**:523-537
- Marians, K.J., Minden, J.S. and Parada, C.** 1986. Replication of superhelical DNAs *in vitro*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**:111-140
- Martin, F.H. and Tinoco, I. Jr.** 1980. DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic Acids Res.* **8**:2295-2299
- Mason, S.W. and Greenblatt, J.** 1992. Direct interaction between two *Escherichia coli* transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *J. Mol. Biol.* **223**:555-566



- Mason, S.W., Li, J. and Greenblatt, J.** 1992. Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage lambda. *J. Biol. Chem.* **267**:19418-19426
- Massé, É., Phoenix, P. and Drolet, M.** 1997. DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**:12816-12823
- Massé, É. and Drolet, M.** 1999a. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **274**:16654-16658
- Massé, É. and Drolet, M.** 1999b. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.* **274**:16659-16664
- Massé, É. and Drolet, M.** 1999c. R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J. Mol. Biol.* **294**:321-332
- McDowall, K.J., Lin-Chao, S. and Cohen, S.N.** 1994. A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J. Biol. Chem.* **269**:10790-10796
- McDowall, K.J., Kaberdin, V.R., Wu, S.W., Cohen, S.N. and Lin-Chao, S.** 1995. Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* **374**:287-290
- McDowall, K.J. and Cohen, S.N.** 1996. The N-terminal domain of the *rne* gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J. Mol. Biol.* **255**:349-355
- Menzel, R. and Gellert, M.** 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**:105-113
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L. and Lin-Chao, S.** 1996. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:3865-3869

- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. and Tollervey, D.** 1996. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**:57-66
- Mizuuchi, K., Gellert, M. and Nash, H.A.** 1978. Involvement of supercoiled DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **121**:375-392
- Mizuuchi, K., Gellert, M., Weisberg, R.A. and Nash, H.A.** 1980. Catenation and supercoiling in the products of bacteriophage lambda integrative recombination *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **141**:485-494
- Mogridge, M. and Greenblatt, J.** 1998. Specific binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to *boxA* transcriptional antiterminator RNA. *J. Bacteriol.* **180**:2248-2252
- Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.** 1999. Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism. *Mol. Microbiol.* **34**:1094-1108
- Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.** 2000. Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3'→5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:11966-11971
- Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.** 2002. Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Mol. Microbiol.* **45**:1315-1324
- Mohanty, B.K. and Kushner, S.R.** 2003. Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Mol. Microbiol.* **50**:645-658
- Mohanty, B.K., Maples, V.F. and Kushner, S.R.** 2004. The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:905-920
- Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V.R. and Blasi, U.** 2003. Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**:1308-1314
- Mooney, R.A., Artsimovitch, I. and Landick, R.** 1998. Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J. Bacteriol.* **180**:3265-3275

- Morgan, E.A.** 1986. Antitermination mechanisms in rRNA operons of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**:1-5
- Morgan, W.D., Bear, D.G. and von Hippel, P.H.** 1983. Rho-dependent termination of transcription. II. Kinetics of mRNA elongation during transcription from the bacteriophage lambda PR promoter. *J. Biol. Chem.* **258**:9565-9574
- Morgan, W.D., Bear, D.G., Litchman, B.L. and von Hippel, P.H.** 1985. RNA sequence and secondary structure requirements for Rho-dependent transcription termination. *Nucleic Acids Res.* **13**:3739-3754
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. and Aiba, H.** 2004. Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:1063-1075
- Nash, H.A.** 1990. Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem. Sci.* **15**:222-7
- Neu, H.C. and Heppel, L.A.** 1964. Some observations on the "latent" ribonuclease of *Escherichia coli*. *Biochem.* **51**:1267-1274
- Newbury, S.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., Hiles, I.D. and Higgins, C.F.** 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* **48**:297-310
- Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N. and von Gabain, A.** 1987. Effect of premature termination of translation on mRNA stability depends on the site of ribosome release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4890-4894
- Niyogi, S.K. and Datta, A.K.** 1975. A novel oligoribonuclease of *Escherichia coli*. I. Isolation and properties. *J. Biol. Chem.* **250**:7307-7312
- Nodwell, J.R. and Greenblatt, J.** 1993. Recognition of *boxA* antiterminator RNA by the *E. coli* antitermination factors NusB and ribosomal protein S10. *Cell* **72**:261-268
- Nomura, M.** 1999. Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles. *J. Bacteriol.* **181**:6857-6864
- Nudler, E. and Gottesman, M.E.** 2002. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes to Cells* **7**:755-768

- O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner Z.R., Peters, E. and Kushner, S.R.** 1995. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1807-1811
- Okada, Y., Wachi, M., Hirata, A., Suzuki, K., Nagai, K. and Matsubishi, M.** 1994. Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. *J. Bacteriol.* **176**:917-922
- Ono, M. and Kuwano, M.** 1979. A conditional lethal mutation in an *Escherichia coli* strain with a longer chemical lifetime of messenger RNA. *J. Mol. Biol.* **129**:343-357
- Ow, M.C., Liu, Q. and Kushner, S.R.** 2000. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol. Microbiol.* **38**:854-866
- Ow, M.C. and Kushner, S.R.** 2002. Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in *E. coli*. *Genes Dev.* **16**:1102-1115
- Ow, M.C., Liu, Q., Mohanty, B.K., Andrew, M.E., Maples, V.F. and Kushner, S.R.** 2002. RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the *rne* gene from three promoters. *Mol. Microbiol.* **43**:159-171
- Ow, M.C., Perwez, T. and Kushner, S.R.** 2003. RNase G of *Escherichia coli* exhibits only limited functional overlap with its essential homologue, RNase E. *Mol. Microbiol.* **49**:607-622
- Peter, B.J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K.J. and Cozzarelli, N.R.** 1998. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**:819-827
- Pettijohn, D.E. and Pfenninger, O.** 1980. Supercoils in prokaryotic DNA restrained *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1331-1335
- Pfeiffer, T. and Hartmann, R.K.** 1997. Role of the spacer *boxA* of *Escherichia coli* ribosomal RNA operons in efficient 23S rRNA synthesis *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **265**:385-393
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E. and Drolet, M.** 1997. Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **272**:1473-1479

- Pinkham, J.L. and Platt, T.** 1983. The nucleotide sequence of the *rho* gene of *E. coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **11**:3531-3545
- Pruss, G.J. and Drlica, K.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**:521-523
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A. and Higgins, C.F.** 1994. A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14**:717-729
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M. and Carpousis, A.J.** 1996. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381**:169-172
- Rahmouni, A.R. and Wells, R.D.** 1989. Stabilization of Z DNA *in vivo* by localized supercoiling. *Science* **246**:358-363
- Raji, A., Zabel, D.J., Laufer, C.S. and Depew, R.E.** 1985. Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **162**:1173-1179
- Rauhut, R. and Klug, G.** 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:353-370
- Rees, W.A., Weitzel, S.E., Das, A. and von Hippel, P.H.** 1997. Regulation of the elongation-termination decision at intrinsic terminators by antitermination protein N of phage lambda. *J. Mol. Biol.* **273**:797-813
- Reynolds, R. and Chamberlin, M.J.** 1992. Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA polymerase. II. Construction and analysis of hybrid terminators. *J. Mol. Biol.* **224**:53-63
- Richardson, J.P. and Greenblatt, J.** in: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umberger H.E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 2nd Ed., Washington, DC, 1996, p. 822-848
- Richardson, J.P.** 1990. Rho-dependent transcription termination. *Biochim. Biophys. Acta.* **1048**:127-138
- Richardson, J.P.** 2003. Loading Rho to terminate transcription. *Cell* **114**:157-159
- Robertson, H.D., Webster, R.E. and Zinder, N.D.** 1967. A nuclease specific for double-stranded RNA. *Virology* **32**:718-719

- Schmidt, M.C. and Chamberlin, M.J.** 1984. Binding of Rho factor to *Escherichia coli* RNA polymerase mediated by NusA protein. *J. Biol. Chem.* **259**:15000-15002
- Schmidt, M.C. and Chamberlin, M.J.** 1987. NusA protein of *Escherichia coli* is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J. Mol. Biol.* **195**:809-818
- Sogo, J.M., Stasiak, A., Martinez-Robles, M.L., Krimer, D.B., Hernandez, P. and Schwartzman, J.B.** 1999. Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **286**:637-643
- Soreq, H. and Littauer, U.Z.** 1977. Purification and characterization of polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. Probe for the analysis of 3' sequences of RNA. *J. Biol. Chem.* **252**:6885-6888
- Spahr, P.F.** 1964. Purification and properties of ribonuclease II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**:3716-3726
- Spickler, C. and Mackie, G.A.** 2000. Action of RNase II and polynucleotide phosphorylase against RNAs containing stem-loops of defined structure. *J. Bacteriol.* **182**:2422-2427
- Spickler, C., Stronge, V. and Mackie, G.A.** 2001. Preferential cleavage of degradative intermediates of *rpsT* mRNA by the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J. Bacteriol.* **183**:1106-1109
- Squires, C.L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C. and Squires, C.L.** 1993. Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:970-974
- Squires, C.L. and Zaporozets, D.** 2000. Proteins shared by the transcription and translation machines. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:775-798
- Steinmetz, E. J. and Platt, T.** 1994. Evidence supporting a tethered tracking model for helicase activity of *Escherichia coli* Rho factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1401-1405
- Stern, M.J., Ames, G.F., Smith, N.H., Robinson, E.C. and Higgins, C.F.** 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* **37**:1015-1026
- Sullivan, S.L. and Gottesman, M.E.** 1992. Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell* **68**:989-994

- Takiff, H.E., Chen, S.M. and Court, D.L.** 1989. Genetic analysis of the *rnc* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:2581-2590
- Tock, M.R., Walsh, A.P., Carroll, G. and McDowall, K.J.** 2000. The CafA protein required for the 5'-maturation of 16 S rRNA is a 5'-end-dependent ribonuclease that has context-dependent broad sequence specificity. *J. Biol. Chem.* **275**:8726-8732
- Torres, M., Balada, J-M., Zellars, M., Squires, C. and Squires, C.L.** 2004. *In vivo* effects of NusB and NusG on rRNA transcription antitermination. *J. Bacteriol.* **186**:1304-1310
- Torres, M., Condon, C., Balada, J-M., Squires, C. and Squires, C.L.** 2001. Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non-ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *EMBO J.* **20**:3811-3820
- Tse-Dinh, Y.C.** 1985. Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res.* **13**:4751-4763
- van Workum, M., van Dooren, S.J., Oldenburg, N., Molenaar, D., Jensen, P.R., Snoep, J.L. and Westerhoff, H.V.** 1996. DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **20**:351-360
- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M. and Carpousis, A.J.** 1998. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes Dev.* **12**:2770-2781
- Vogel, U. and Jensen, K.F.** 1995. Effects of the antiterminator *boxA* on transcription elongation kinetics and ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:18335-18340
- Vogel, U. and Jensen, K.F.** 1997. NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA. *J. Biol. Chem.* **272**:12265-12271
- von Hippel, P.H. and Yager, T.D.** 1992. The elongation-termination decision in transcription. *Science* **255**:809-812
- Wachi, M., Umitsuki, G. and Nagai, K.** 1997. Functional relationship between *Escherichia coli* RNase E and the CafA protein. *Mol. Gen. Genet.* **253**:515-519

- Wachi, M., Umitsuki, G., Shimizu, M., Takada, A. and Nagai, K.** 1999. *Escherichia coli cafA* gene encodes a novel RNase, designated as RNase G, involved in processing of the 5' end of 16S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**:483-488
- Wang, D., Meier, T.I., Chan, C.L., Feng, G., Lee, D.N. and Landick R.** 1995. Discontinuous movements of DNA and RNA in RNA polymerase accompany formation of a paused transcription complex. *Cell* **81**:341-350
- Wang, J.C., Caron, P.R. and Kim, R.A.** 1990. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell* **62**:403-406
- Wang, J.C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:635-692
- Ward, D.F. and Gottesman, M.E.** 1981. The *nus* mutations affect transcription in *Escherichia coli*. *Nature* **292**:212-215
- Wasserman, S.A. and Cozzarelli, N.R.** 1986. Biochemical topology: applications to DNA recombination and replication. *Science* **232**:951-960
- Westerhoff, H.V., O'Dea, M.H., Maxwell, A. and Gellert, M.** 1988. DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys.* **12**:157-181
- Worbs, M., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D., Huber, R. and Wahl, M.C.** 2001. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA. *Mol. Cell.* **7**:1177-1189
- Wu, H.Y., Shyy, S., Wang, J.C. and Liu, L.F.** 1988. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**:433-440
- Xu, F., Lin-Chao, S. and Cohen, S.N.** 1993. The *Escherichia coli pcnB* gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids *in vivo* and degradation of RNAI decay intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6756-6760
- Xu, F. and Cohen, S.N.** 1995. RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation. *Nature* **374**:180-183
- Yamamoto, Y., Sunohara, T., Jojima, K., Inada, T. and Aiba, H.** 2003. SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. *RNA* **9**:408-418
- Yarchuk, O., Jacques, N., Guillerez, J. and Dreyfus, M.** 1992. Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the *lacZ* gene. *J. Mol. Biol.* **226**:581-596



- Zechiedrich, E.L. and Cozzarelli, N.R.** 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**:2859-2869
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B. and Cozzarelli, N.R.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**:2580-2592
- Zechiedrich, E.L., Khodursky, A.B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D.M.J. and Cozzarelli, N.R.** 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:8103-8113
- Zellars, M. and Squires, C.L.** 1999. Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. *Mol. Microbiol.* **32**:1296-1304
- Zhang, A., Wassarman, K.M., Rosenow, C., Tjaden, B.C., Storz, G. and Gottesman, S.** 2003. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol. Microbiol.* **50**:1111-1124
- Zhang, X., Zhu, L. and Deutscher, M.P.** 1998. Oligoribonuclease is encoded by a highly conserved gene in the 3'→5' exonuclease superfamily. *J. Bacteriol.* **180**:2779-2781
- Zheng, C. and Friedman, D.I.** 1994. Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7543-7547
- Zhu, L., Gangopadhyay, T., Padmandabha, K.P. and Deutscher, M.P.** 1990. *Escherichia coli rna* gene encoding RNase I: cloning, overexpression, subcellular distribution of the enzyme, and use of an *rna* deletion to identify additional RNases. *J. Bacteriol.* **172**:3146-3151

## 11. Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr. Marc Drolet, qui m'a fait confiance et m'a accepté dans son laboratoire. Il a su m'encourager et m'orienter dans la réussite de ce projet de maîtrise. L'univers de la recherche a été pour moi une découverte stimulante et cette expérience fut très enrichissante.

J'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire, avec qui j'ai passé des moments mémorables et qui m'ont permis de passer au travers des embûches :

Chadi Hraiky

Imad Baaklini

Charles Fortin

Julie-Annick Desabrais

Sonia Broccoli

Fabien Rallu

J'aimerais aussi particulièrement remercier ma conjointe, Tricia, qui a su m'endurer (et surtout m'attendre le soir) durant ces années et me supporter lorsque j'en avais besoin.

Sans toi, la réalisation de ma maîtrise aurait été totalement différente.

En terminant, j'aimerais également remercier ma famille qui m'a toujours encouragé à poursuivre mes études et qui a toujours été là pour moi.

Merci à tous

# Effects of RNA polymerase modifications on transcription-induced negative supercoiling and associated R-loop formation

Sonia Broccoli,<sup>1</sup> Fabien Rallu,<sup>1</sup> Patrick Sanscartier,<sup>1</sup> Susana M. Cerritelli,<sup>2</sup> Robert J. Crouch<sup>2</sup> and Marc Drolet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, P. Québec, Canada, H3C 3J7.

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Genetics, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

## Summary

Transcription in the absence of topoisomerase I, but in the presence of DNA gyrase, can result in the formation of hypernegatively supercoiled DNA and associated R-loops. In this paper, we have used several strategies to study the effects of elongation/termination properties of RNA polymerase on such transcription-induced supercoiling. Effects on R-loop formation were exacerbated when cells were exposed to translation inhibitors, a condition that stimulated the accumulation of R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Translation inhibitors were not acting by decreasing (p)ppGpp levels as the absence of (p)ppGpp in *spoT relA* mutant strains had little effect on hypernegative supercoiling. However, an *rpoB* mutation leading to the accumulation of truncated RNAs considerably reduced R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Transcription of an *rrnB* fragment preceded by a mutated and inactive *boxA* sequence to abolish the *rrnB* antitermination system also considerably reduced R-loop-dependent supercoiling. Taken together, our results indicate that RNA polymerase elongation/termination properties can have a major impact on R-loop-dependent supercoiling. We discuss different possibilities by which RNA polymerase directly or indirectly participates in R-loop formation in *Escherichia coli*. Finally, our results also indicate that what determines the steady-state level of hypernegatively supercoiled DNA in *topA* null mutants is likely to be complex and involves a multitude of factors, including the status of RNA

polymerase, transcription–translation coupling, the cellular level of RNase HI, the status of DNA gyrase and the rate of relaxation of supercoiled DNA.

## Introduction

DNA topoisomerase I, encoded by the *topA* gene, is a type IA topoisomerase involved in relaxation of negative supercoiling in *Escherichia coli* (Tse-Dinh, 1998; Wang, 2002). Transcription has been shown to be a major source of supercoiling in the cell (Drolet *et al.*, 2003). The twin-domain model predicts that any situation that hinders rotation of RNA polymerase as transcription proceeds will cause the DNA to rotate upon itself, leading to an accumulation of negative and positive supercoiling, respectively, behind and ahead of the moving transcription complex (Liu and Wang, 1987). Topoisomerase I relaxes negative supercoiling, whereas gyrase relieves positive supercoiling. This model has been supported by the results of many experiments, although there remain some questions about the mechanism(s) by which rotation of RNA polymerase can be sufficiently impaired for transcription-induced supercoiling to occur (for example, see Lynch and Wang, 1993; Albert *et al.*, 1996). A recent study showed that growth inhibition of *topA* null mutants correlates with transcription-induced negative supercoiling, and therefore that the major function of this enzyme is to relax such supercoiling (Massé and Drolet, 1999a). One important consequence of transcription-induced negative supercoiling is R-loop formation as RNase HI overproduction partially complements the growth defect of *topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995; Massé and Drolet, 1999b). Moreover, the sensitivity of *topA* null mutants to heat shock (Qi *et al.*, 1996) was shown recently to be alleviated by RNase HI overproduction (Cheng *et al.*, 2003a). A functional interaction between topoisomerase I and transcription is also supported by the recent demonstration of its physical interaction with RNA polymerase (Cheng *et al.*, 2003b).

Evidence for R-loop formation in the absence of topoisomerase I both *in vitro* and *in vivo* is based on the formation of RNase HI-sensitive hypernegatively supercoiled plasmids and R-looped plasmids (Drolet *et al.*, 1994; Massé *et al.*, 1997; Phoenix *et al.*, 1997; Massé and

Accepted 19 February, 2004. \*For correspondence. [REDACTED] Tel. (+1) 514 343 5796; Fax (+1) 514 343 5701.

Drolet, 1999b). When topoisomerase I is present, anchoring of the TetA protein to the membrane does not lead to hypernegative supercoiling. However, topological changes are noted when *topA* mutant strains express the TetA protein. With the wild-type *tetA* gene, co-transcription–translation generates hypernegatively supercoiled pBR322 DNA in accordance with the twin-domain model, because anchoring of the nascent TetA peptide to the membrane completely blocks rotation of the transcribing RNA polymerase (Fig. 1A; Lynch and Wang, 1993). Similar hypernegative supercoiling is observed in *topA* mutant strains when translation of the TetA protein is inhibited by either mutation or addition of protein synthesis inhibitors (Massé and Drolet, 1999b). This latter result indicates that tight coupling of translation and transcription in bacteria should inhibit R-loop formation. In addition, R-loop formation *in vivo* has been demonstrated using a *HindIII* fragment from the *rrnB* operon (Massé *et al.*, 1997). Altogether, these results were interpreted to mean that extensive R-loop formation occurs in the absence of topoisomerase I, when the *tetA* gene is transcribed but not translated. In this model, the nascent mRNA, free of ribosomes, is available to reanneal with the template strand behind the moving RNA polymerase (Fig. 1B).

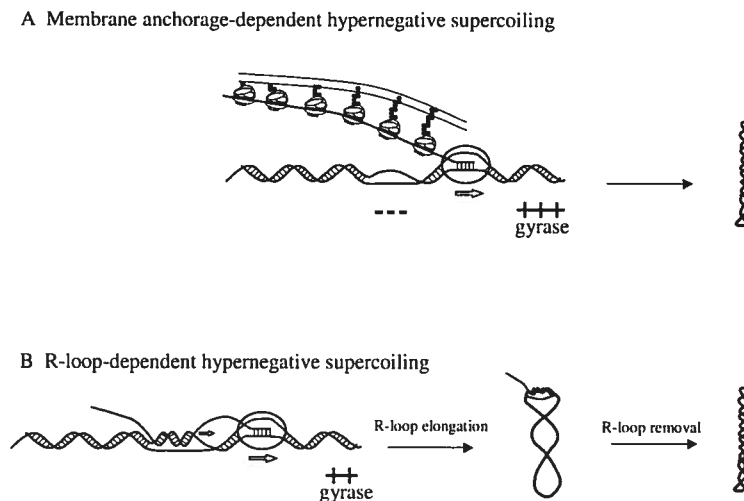
One important unresolved issue is the role that RNA polymerase plays in R-loop formation in *topA* null strains. Indeed, nothing is known about the properties, if any, of

RNA polymerase that influence R-loop formation in the absence of topoisomerase I. In this work, we have used different approaches to address this question. Our results demonstrate that elongation/termination properties of RNA polymerase can dramatically influence R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Moreover, we found that the relaxation activity of DNA gyrase on negatively supercoiled DNA is considerably reduced upon addition of translation inhibitors, which can explain the accumulation of hypernegatively supercoiled DNA under conditions in which all the transcripts are free to form R-loops.

## Results

### *A mutated and inactive antitermination system considerably reduces R-loop-dependent hypernegative supercoiling as a result of transcription of an *rrnB* DNA fragment*

We have shown previously that transcription of the 567 bp *HindIII* fragment from the *rrnB* operon, in its physiological orientation, results in R-loop formation as detected by hypernegative supercoiling and gel retardation, during *in vitro* transcription with either T7 or *Escherichia coli* RNA polymerases and in the presence of DNA gyrase (Massé *et al.*, 1997; Phoenix *et al.*, 1997). Similar results were obtained *in vivo* in *topA* null mutants with *E. coli* RNA polymerase (Massé *et al.*, 1997). These *in vivo* results



**Fig. 1.** Mechanisms for the formation of hypernegatively supercoiled plasmid DNA in *Escherichia coli topA* null mutants.

A. Co-transcription–translation generates hypernegatively supercoiled plasmid DNA in accordance with the twin-domain model. Anchoring of the nascent peptide to the membrane completely blocks rotation of the transcribing RNA polymerase, thus efficiently promoting the formation of negatively and positively supercoiled domains. The action of DNA gyrase on positive supercoiling in front of the moving RNA polymerase allows the formation of such hypernegatively supercoiled plasmid DNA.

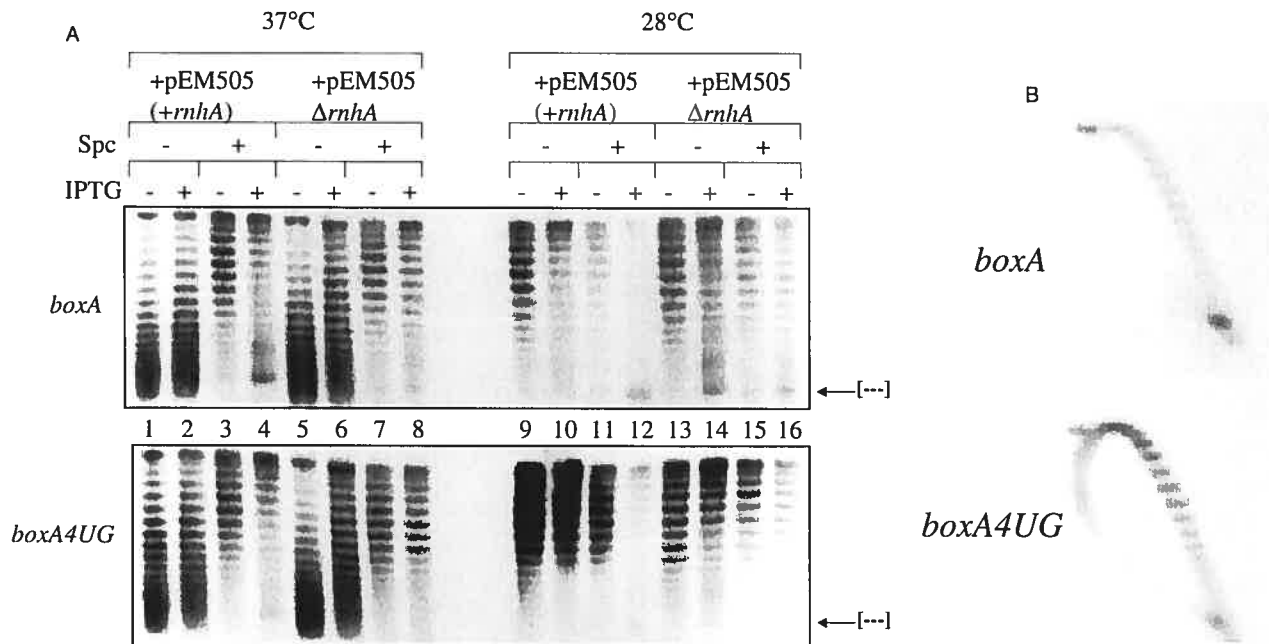
B. Transcription-induced negative supercoiling promotes unwinding of the DNA strands behind the transcribing RNA polymerase. Nascent RNA can then reanneal with the template strand to initiate R-loop formation. The action of DNA gyrase in front of the moving RNA polymerase provides the driving force for R-loop elongation. Upon R-loop removal by RNase HI *in vivo*, or during plasmid extraction, hypernegatively supercoiled DNA is revealed. – and + are negative and positive supercoiling respectively. Arrows indicate the direction of transcription. On the right, DNA is hypernegatively supercoiled.

were obtained using a pTrc99a derivative, pMD306, in which the *Hind*III *rrnB* fragment preceded by a *boxA* element is under the control of the IPTG-inducible *P*<sub>trc</sub> promoter. The vector also carries the *lacI<sup>n</sup>* gene efficiently to repress transcription of this fragment in the absence of IPTG. *boxA* is the minimal sequence acting *in cis* at the RNA level to build an antitermination system for rRNA synthesis. Such a system, which also increases the velocity of RNA polymerase (Vogel and Jensen, 1995), is required to prevent *rho*-dependent premature transcription termination of this untranslated RNA (Condon *et al.*, 1995).

As we found that *lacI<sup>n</sup>* transcription was also contributing to R-loop-dependent hypernegative supercoiling (data not shown), we constructed a pMD306 derivative bearing a deletion of the 5' section of the *lacI<sup>n</sup>* gene including its promoter, thus yielding pMD306Δ*lacI<sup>n</sup>*. This plasmid was introduced in a *topA* null *gyrB*(Ts) strain (Drolet *et al.*, 1995). DNA gyrase in this strain has wild-type levels of activity at 28°C but is compromised enough to compensate for the absence of topoisomerase I at 37°C. Two pACYC184 derivatives carrying the *lacI<sup>n</sup>* gene and a wild-type (pEM505) or inactivated (pEM505Δ*rrnHA*) *rrnHA* gene under the control of the *P*<sub>trc</sub> promoter were introduced individually into this *topA* null strain. R-loop-dependent

hypernegatively supercoiled DNA occurs upon addition of IPTG at 28°C (Fig. 2A, top, compare lanes 13 and 14) and is significantly reduced by overproduction of RNase HI (Fig. 2A, top, compare lanes 10 and 14). To support our conclusion further that the effect of pEM505 versus pEM505Δ*rrnHA* on hypernegative supercoiling is related to RNase HI overproduction, we inhibited protein synthesis, and therefore RNase HI overproduction, before the addition of IPTG to induce transcription of the *rrnB* DNA fragment. The results presented in Fig. 2A, top, clearly show that the negative effect of pEM505 on hypernegative supercoiling is lost when spectinomycin is added before IPTG (Fig. 2A, top, compare lane 12, pEM505, with lane 16, pEM505Δ*rrnHA*). In fact, the proportion of hypernegatively supercoiled pMD306Δ*lacI<sup>n</sup>* is even greater when the *topA* null cells carry pEM505 rather than pEM505Δ*rrnHA*. These results support our conclusion that the effect of pEM505 on hypernegative supercoiling is mediated through RNase HI overproduction.

Plasmid instability was noted previously when transcription of the *rrnB* 567 bp *Hind*III fragment included a wild-type *boxA* sequence (pMD306) unless RNase HI was overproduced in the *topA* null strain (Drolet *et al.*, 2003). In order to correlate this observation better with R-loop formation, we analysed hypernegative supercoiling of



**Fig. 2.** Effects of the *boxA* antitermination sequence on R-loop-dependent hypernegative supercoiling. RFM475 cells carrying a plasmid with either a wild-type (pMD306Δ*lacI<sup>n</sup>*) or a *boxA4UG* mutated (pMD315Δ*lacI<sup>n</sup>*) *boxA* sequence and pEM505 (+RNase HI) or pEM505Δ*rrnHA* (–RNase HI) were grown as described in *Experimental procedures* except that LB was used instead of MOPS. Plasmid DNAs were extracted and analysed by one-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (A). The presence (+Spc) or absence (–Spc) of spectinomycin at 400 μg ml<sup>–1</sup> is noted. When indicated, IPTG was added at a final concentration of 1 mM, 5 min before transferring the cells to 28°C. The gels were probed by *in situ* hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. – indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. Plasmid DNAs extracted from spectinomycin-treated IPTG-induced *rrnHA*<sup>+</sup> cells (the same samples used in Fig. 2A, lane 12) were analysed by two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (B).

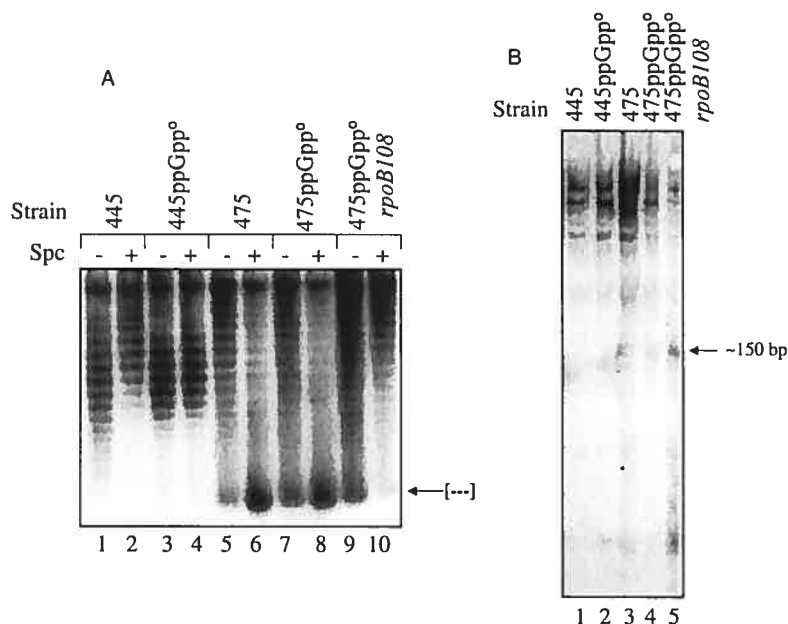
pMD315 $\Delta$ lacI<sup>q</sup>, the *boxA* sequence of which has been inactivated by mutation. The *boxA4UG* mutation was shown previously to abolish the antitermination system both *in vivo* and *in vitro*, including its effect on transcription velocity (Albrechtsen *et al.*, 1990; Squires *et al.*, 1993; Vogel and Jensen, 1995). Figure 2A, bottom, shows that hypernegative supercoiling is much less efficient when the *boxA* sequence is mutated (Fig. 2A, compare lane 14 at the top, *boxA* wild type, with lane 14 at the bottom, *boxA4UG*). This difference is also evident when spectinomycin is added before IPTG (Fig. 2A, compare lanes 12 and 16 at the top, *boxA* wild type, with lanes 12 and 16, respectively, at the bottom, *boxA4UG*). Two-dimensional gel analysis also confirms this result and the presence of hypernegatively supercoiled DNA (Fig. 2B).

*A mutation in RNA polymerase causing accumulation of prematurely terminated tetA mRNAs dramatically reduces R-loop-dependent hypernegative supercoiling of pBR322*

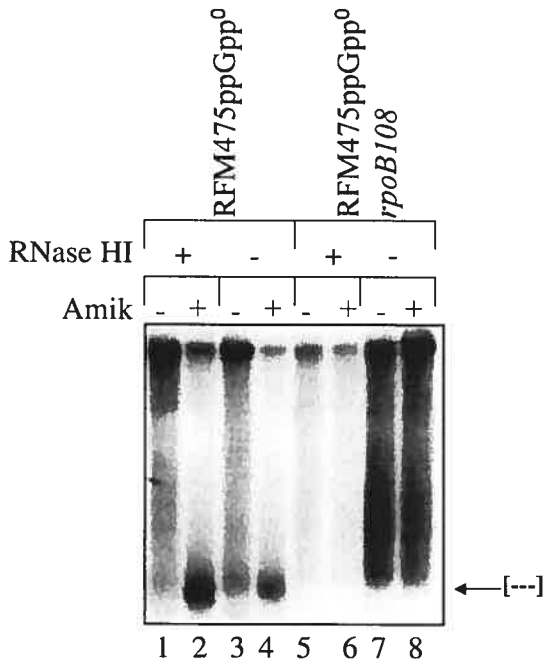
We pursued our studies on the effects of RNA polymerase modifications on hypernegative supercoiling by testing the involvement of (p)ppGpp in transcription-induced supercoiling. This small effector acts by binding to RNA polymerase, altering its properties during transcription initiation and elongation (Chatterji and Ojha, 2001). Upon addition of translation inhibitors, intracellular (p)ppGpp concentrations drop to nearly zero (Cashel *et al.*, 1996). As we have found that translation inhibitors stimulate hypernegative supercoiling, we considered the possibility that (p)ppGpp could negatively affect transcription-induced supercoiling. To test this, we constructed a

ppGpp<sup>0</sup> derivative of our *topA* null mutant by deleting both its *relA* and *spoT* genes (see *Experimental procedures*). In addition, we isolated a spontaneous stringent *rpoB* mutant (Rif<sup>r</sup>) of this *topA* null ppGpp<sup>0</sup> strain on minimal medium (see *Experimental procedures*). Figure 3A shows that elimination of (p)ppGpp had no effect on either membrane anchorage- or R-loop-dependent supercoiling (Fig. 3A, lanes 5 and 6, RFM475; lanes 7 and 8, RFM475 ppGpp<sup>0</sup>). Strains carrying the *rpoB* mutation exhibited hypernegative supercoiling as a result of anchoring of the TetA protein similarly to that with wild-type *rpoB* strains (Fig. 3A, lane 5, RFM475; lane 7, RFM475 ppGpp<sup>0</sup>; lane 9, RFM475 ppGpp<sup>0</sup> *rpoB108*). In contrast, R-loop-dependent hypernegative supercoiling is not induced upon addition of spectinomycin especially when compared with the effect on other strains (Fig. 3A, lane 6, RFM475; lane 8, RFM475 ppGpp<sup>0</sup>; lane 10, RFM475 ppGpp<sup>0</sup> *rpoB108*).

We also extracted RNA from the cells carrying pBR322 in order to evaluate the amount and size of the *tetA* mRNA produced by the various strains. Figure 3B clearly shows that the strain carrying the *rpoB* mutation produces large amounts of prematurely terminated *tetA* mRNA (Fig. 3B, lane 5). Taken together, these results suggest that the *rpoB108* mutation causes a termination defect which, in turn, considerably impedes R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Consistent with this interpretation is the finding that our *topA* null strain requires less RNase HI activity for growth at the non-permissive temperature (28°C) when it carries the *rpoB108* rather than a wild-type allele (data not shown). It is known that only the amino-terminal section of the TetA peptide that is involved in



**Fig. 3.** Effects of RNA polymerase modifications on membrane anchorage- and R-loop-dependent hypernegative supercoiling. Various strains carrying pBR322 were grown as described in *Experimental procedures*. A. Plasmid DNAs were extracted and analysed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing chloroquine. Plasmids shown here were extracted from cultures incubated at 28°C in the presence (+) or absence (-) of spectinomycin (Spc) at 400  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. The gel was probed by *in situ* hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. - indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. B. Culture samples of 2 ml were taken, and total RNA was extracted as described in *Experimental procedures*. RNA (10  $\mu$ g) from cultures exposed to spectinomycin (+Spc) at 28°C was loaded on a denaturing polyacrylamide gel for Northern blot analysis. The membrane was probed with a 55-mer oligonucleotide that hybridizes with the 5' region of the pBR322 *tetA* gene.



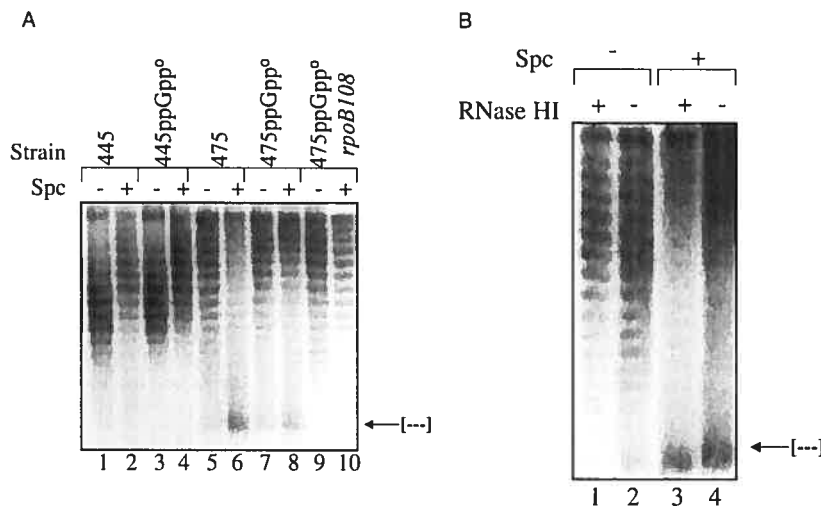
**Fig. 4.** The effect of the *rpoB108* mutation on R-loop-dependent hypernegative supercoiling is not restricted to ColE1-type plasmids. Cells carrying pEM301 and pSK760 (+RNase HI) or pSK762c (-RNase HI) were grown as described in *Experimental procedures*. Plasmid DNAs were extracted and analysed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing chloroquine. Plasmids shown here were extracted from cultures incubated at 28°C in the presence (+) or absence (-) of amikacin at 400 µg ml<sup>-1</sup>. The dried gel was probed by *in situ* hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled fragment of the *spc* gene from pEM301 obtained by PCR amplification. - indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. For unknown reasons, the yield of pEM301 recovery from the *rpoB108* strain was always very low when RNase HI was overproduced.

membrane anchorage is required for hypernegative supercoiling by the anchor-dependent mechanism (Lodge *et al.*, 1989). We believe that even the prematurely terminated *tetA* mRNA can produce this peptide, thus

accounting for the absence of an effect of the *rpoB108* on membrane anchorage-dependent hypernegative supercoiling. Fig. 4 shows the formation of hypernegatively supercoiled pEM301, a pSC101-based replicon, at 28°C (Fig. 4, lane 3) that is significantly reduced by overproduction of RNase HI (i.e. is R-loop dependent) (Fig. 4, lane 1). It also demonstrates, once again, stimulation of R-loop-dependent hypernegative supercoiling by the addition of a protein synthesis inhibitor (amikacin; Fig. 4, lanes 2 and 4), as well as the failure to produce a significant amount of R-loop-dependent hypernegatively supercoiled DNA when the *rpoB108* mutation is present (Fig. 4, lanes 5-8). Therefore, the effects of translation inhibitors and the *rpoB108* mutation on R-loop-dependent hypernegative supercoiling are not restricted to ColE1-like replicons.

*Stabilization of untranslated mRNAs resulting from addition of protein synthesis inhibitors correlates with hypernegative supercoiling*

Our results demonstrate that translation inhibitors significantly stimulate hypernegative supercoiling, even when the transcribed gene encodes an untranslated RNA (Fig. 2, pMD306Δ*lac*<sup>R</sup> and pMD315Δ*lac*<sup>R</sup>). To demonstrate this point further, we measured hypernegative supercoiling of a pBR322 derivative, pBR322Δ*tet*5', which carries a deletion removing both the ribosome binding site and the ATG initiation codon of the *tetA* gene (Massé and Drolet, 1999a). R-loop-dependent hypernegative supercoiling of this plasmid was shown to occur in a *topA* null mutant with an active DNA gyrase and was found to be dependent on the transcription of this modified *tetA* gene (Massé and Drolet, 1999b). Figure 5A demonstrates the stimulation of hypernegative supercoiling by the addition of spectinomycin to all the *topA* null mutant strains, except for the one carrying the *rpoB108* allele (Fig. 5A, lane 10), confirming the results obtained with the wild-type pBR322 (Fig. 3A).



**Fig. 5.** Spectinomycin stimulates R-loop-dependent hypernegative supercoiling as a result of transcription of an untranslatable *tetA* gene. Various strains carrying pBR322Δ*tet*5' in (A) or RFM475 cells carrying pBR322Δ*tet*5' and pEM001 (+RNase HI) or pEM003 (-RNase HI) in (B) were grown as described in *Experimental procedures*. Plasmid DNAs were extracted from cultures incubated at 28°C and analysed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing chloroquine. The dried gel was probed by *in situ* hybridization with a <sup>32</sup>P-labelled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. - indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA. Spc indicates the presence (+) or absence (-) of spectinomycin at 400 µg ml<sup>-1</sup>.

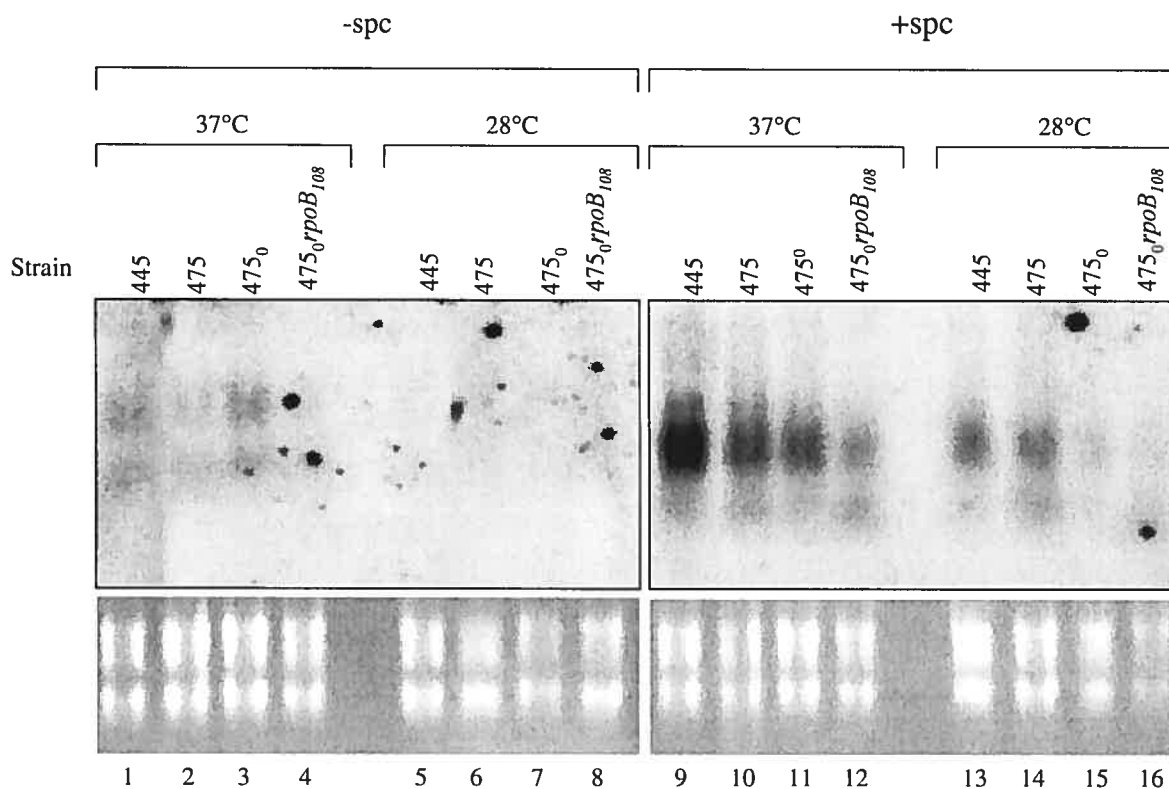
Figure 5B shows the loss of sensitivity of hypernegative supercoiling to RNase HI overproduction when spectinomycin is added to the cell culture (Fig. 5B, compare lane 3, overproduction of RNase HI, with lane 4, no overproduction of RNase HI). This is not related to RNase HI instability, as we found that the levels of activity of this enzyme were unaltered by the spectinomycin treatment (not shown). In the presence of spectinomycin, all the transcripts are not translated and therefore are free to form R-loops. Thus, we believe that even the excess RNase HI produced from pEM001 is insufficient to eliminate all the R-loops formed when protein synthesis inhibitors are added. In agreement with this interpretation is our finding that hypernegative supercoiling of pBR322 in the presence of translation inhibitors is sensitive to RNase HI when the *rnhA* gene is placed under the control of a very strong promoter to achieve high levels of RNase HI (not shown).

Previous studies have demonstrated the very low stability of mRNAs that had been modified to make them untranslatable. For example, when the Shine–Dalgarno sequence of the *lacZ* mRNA is inactivated, full-length *lacZ* mRNAs are not produced even when transcription originates from a very strong promoter (Lopez *et al.*, 1998). Upon addition of translation inhibitors, full-length *lacZ*

transcripts are then found to accumulate as a result of their dramatic increase in stability resulting from the ability of the nascent mRNAs to escape degradation. Stabilization of RNAs when protein synthesis is arrested by translation inhibitors is related to a depletion of RNases involved in RNA decay (Lopez *et al.*, 1998). Degradation of an untranslatable nascent *tetA* mRNA can certainly affect R-loop-dependent hypernegative supercoiling considering the fact that this nascent RNA actively participates in R-loop formation. In this context, the addition of a translation inhibitor is expected to stimulate hypernegative supercoiling by this mechanism (Figs 3 and 5) as *tetA* transcripts should be stabilized. The results shown in Fig. 6 demonstrate accumulation of *tetA* mRNA transcripts in all the strains when spectinomycin is added to the cell culture. Using rifampicin, we found that this results from the increased stability of the *tetA* transcript in the presence of spectinomycin (not shown).

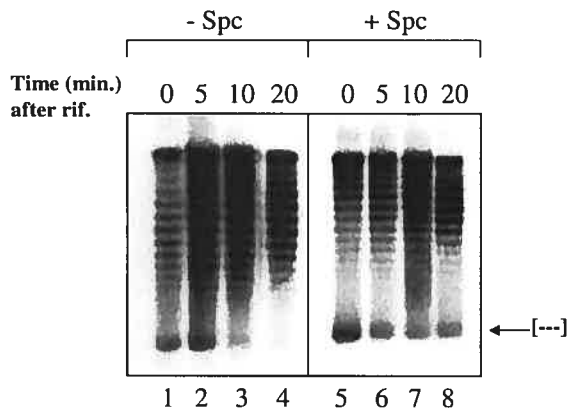
*Translation inhibitors stabilize hypernegatively supercoiled DNA in a manner depending upon DNA gyrase activity*

An important determinant of the steady-state level of



**Fig. 6.** Spectinomycin stabilizes *tetA* mRNAs. RNA (10  $\mu$ g) from cultures grown for Fig. 3 were loaded on a denaturing agarose gel for Northern blot analysis. After transfer of the RNA, the membrane was probed with a 55-mer oligonucleotide that hybridizes with the 5' region of the pBR322 *tetA* gene. Bottom, photograph of the ethidium bromide-stained agarose gel.





**Fig. 7.** Spectinomycin stabilizes hypernegatively supercoiled DNA. RM475 cells carrying pBR322 were grown at 37°C to an  $OD_{600}$  of 0.4, at which time the cultures were split and spectinomycin was added (+) or not (-) at a concentration of  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ . After a 1 h incubation period at 28°C, rifampicin was added at  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ , and plasmids were extracted at the indicated times after rifampicin addition. Plasmid DNAs were extracted and analysed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing chloroquine. The dried gels were probed by *in situ* hybridization with a  $^{32}\text{P}$ -labelled fragment of the *bla* gene from pBR322 obtained by PCR amplification. – indicates hypernegatively supercoiled plasmid DNA.

hypernegatively supercoiled DNA is its rate of relaxation. To study the stability of hypernegatively supercoiled pBR322, rifampicin was added to inhibit transcription and hence stop the formation of such topoisomers. DNA was then extracted at different time intervals after the addition of rifampicin to follow the relaxation of hypernegatively supercoiled pBR322. Figure 7 shows that more than half the hypernegatively supercoiled pBR322 was relaxed 10 min after the addition of rifampicin to the cell culture (Fig. 7, compare lane 1 with lane 3). However, when a protein synthesis inhibitor was added before rifampicin, the stability of hypernegatively supercoiled pBR322 was found to be considerably enhanced. Indeed, more than half of such topoisomers were still present 20 min after the addition of rifampicin (Fig. 7, compare lane 5 with lane 8). This result clearly demonstrates that a major effect of protein synthesis inhibitors on hypernegative supercoiling is to increase their stability. In RFM475, the most likely controller of the steady-state level of hypernegative supercoiling is gyrase. To provide supporting evidence that gyrase influences the steady-state level of hypernegative supercoiling, we examined the effect of *gyrB225* on the stability of hypernegative supercoiling. Previously, we reported that the steady-state level of hypernegative supercoiling in a *gyrB225*  $\Delta topA$  strain was considerably lower than that of *gyrB<sup>-</sup>*  $\Delta topA$  or *gyrB(Ts)*  $\Delta topA$  strains at 28°C (Massé and Drolet, 1999c). Using the *gyrB225*  $\Delta topA$  strain, we noted a rather rapid decay of hypernegative supercoils after the addition of rifampicin (not shown). The difference in stability of the hypernegative

supercoils in these otherwise isogenic strains suggests that gyrase is involved in both formation and relaxation of these topoisomers.

## Discussion

In this paper, we have extended our studies on R-loop formation in *topA* null mutants by investigating the role(s) of RNA polymerase in this phenomenon. RNA polymerase could potentially influence R-loop formation in different ways (for a review, see Drolet *et al.*, 2003). First, transcription velocity can indirectly affect R-loop formation by modulating the level of transcription-induced supercoiling behind the moving RNA polymerase. At higher velocities, greater levels of negative supercoiling are likely to be generated, and the reannealing of the nascent RNA with the template strand to initiate R-loop formation could be facilitated. Secondly, premature termination of transcription may also indirectly affect R-loop formation if it occurs before the initiation of R-loops. If the nascent RNA is too short, the level of negative supercoiling behind the transcribing RNA polymerase might be too low to promote R-loop formation. Thirdly, for the moment, we cannot exclude the possibility that R-loop formation might originate from the RNA–DNA hybrid within the transcription bubble. In this context, RNA polymerase would be directly involved in R-loop formation, and any alteration in its elongation/termination properties could potentially influence R-loop formation.

The results presented in this paper demonstrate that the elongation/termination properties of RNA polymerase significantly influence R-loop formation. First, by inactivating an antitermination system, we found that R-loop-dependent hypernegative supercoiling was considerably reduced. However, as this antitermination system was also shown previously to modulate transcription velocity (Vogel and Jensen, 1995), we cannot simply attribute this finding to termination properties. Interestingly, we have found that *lacZ* expression in our *topA* null mutant is almost completely inhibited unless RNase HI is overproduced when the *lacZ* gene is preceded by a wild-type but not a mutated *boxA* sequence (P. Sanscartier *et al.*, manuscript in preparation).

Secondly, results obtained with the *rpoB108* mutation suggest that altered termination properties of RNA polymerase can profoundly affect R-loop formation. We have tested the *rpoB3370* mutation for its effect on hypernegative supercoiling and found it to behave similarly to the *rpoB108* allele (F. Rallu and M. Drolet, unpublished results). Interestingly, the *rpoB3370* mutation has been shown to affect termination and antitermination properties of RNA polymerase and to suppress the *rho15* mutation (Jin *et al.*, 1988). We have shown previously that *rpoB8* and *rpoB3595* have divergent effects on the growth of

*topA* null mutants (Drolet *et al.*, 1995). The *rpoB8* allele improves growth and behaves like *rpoB108* in R-loop-dependent hypernegative supercoiling (S. Broccoli and M. Drolet, unpublished result). This *rpoB8* mutation makes RNA polymerase more prone to terminate, whereas the *rpoB3595* allele has the opposite effect (Jin *et al.*, 1992). Unfortunately, we have been unable to evaluate hypernegative supercoiling in a *topA* null *rpoB3595* double mutant because of rapid accumulation of (an) additional compensatory mutation(s) in this strain (S. Broccoli and M. Drolet, unpublished results). Together, these results suggest an interesting link between the termination properties of RNA polymerase and R-loop formation. The isolation of the *rpoB108* allele offers a unique opportunity to investigate this intriguing link further using an *in vitro* transcription system.

The results presented in this paper also reveal the complexity associated with hypernegative supercoiling. This is particularly true when the effect of translation inhibitors on hypernegative supercoiling is analysed. First, our results indicate that, in the presence of translation inhibitors, R-loop formation may occur at multiple sites as a result of uncoupling of transcription and translation, generating RNA–DNA hybrids in excess of the capacity of RNase HI to remove them (Fig. 5). Interestingly, evidence has been presented recently that *rho* and *nusG* mutants also increase RNA–DNA hybrids to levels beyond which RNase HI is unable to eliminate all of them (Harinarayan and Gowrishankar, 2003). Secondly, dramatic stabilization of RNAs after the addition of translation inhibitors may significantly contribute to R-loop-dependent hypernegative supercoiling by promoting the synthesis of long nascent RNAs. In this context, it is worth mentioning that a correlation between the length of the nascent RNA and R-loop formation during transcription was demonstrated recently in *Saccharomyces cerevisiae* (Huertas and Aguilera, 2003). For the moment, we cannot exclude the possibility that hypernegative supercoiling resulting from the synthesis of long nascent RNAs may precede R-loop formation. *In vitro* transcription reactions have shown clearly that transcription-induced supercoiling correlates with the length of the nascent RNA (Tsao *et al.*, 1989; Leng and McMacken, 2002).

Thirdly, we have provided evidence that stimulation of

hypernegative supercoiling by translation inhibitors is largely related to an inhibition of the relaxation activity of DNA gyrase. It is known that the supercoiling and relaxation activities of DNA gyrase are influenced both *in vitro* and *in vivo* by the ATP/ADP ratio (Westerhoff *et al.*, 1988; Drlica, 1992; Kampranis and Maxwell, 1996; van Workum *et al.*, 1996), with supercoiling activity being favoured at higher ratios. The twofold increase in ATP concentrations induced by complete inhibition of protein synthesis (Schneider *et al.*, 2002) would thus be expected to favour formation rather than relaxation of hypernegative supercoils. A bias of DNA gyrase towards formation of hypernegative supercoils would explain the observed stabilization of hypernegative supercoils (Fig. 7) and could also contribute to the abundance of R-loops formed in the presence of protein synthesis inhibitors. Interestingly, we have tested many translation inhibitors and found a perfect correlation between the minimal concentration required to inhibit protein synthesis completely and that required to observe the maximum amount of hypernegatively supercoiled DNA (not shown). Finally, the fact that hypernegatively supercoiled DNA might be relatively stable could explain several phenotypes associated with the loss of topoisomerase I activity.

## Experimental procedures

### Escherichia coli strains

*Escherichia coli* strains used in this study are listed and described in Table 1. The RFM445 (*gyrB* (Ts)) and RFM475 (*gyrB* (Ts)  $\Delta$ *topA*) have been well described (Drolet *et al.*, 1995). The double  $\Delta$ *relA251::km*  $\Delta$ *spoT207::cat* (ppGpp<sup>0</sup>) (Xiao *et al.*, 1991) derivatives of RFM445 and RFM475 were constructed by P1 *vir* transduction (Miller, 1992). The ppGpp<sup>0</sup> phenotype was confirmed by observing their growth on minimal medium (Xiao *et al.*, 1991) and measuring (p)ppGpp synthesis as follows. Strains were grown in MOPS medium (Neidhardt *et al.*, 1974) at 0.3 mM phosphate concentration to exponential phase at 37°C. At an OD<sub>600</sub> of 0.2, 150  $\mu$ Ci ml<sup>-1</sup> [<sup>32</sup>P]-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Amersham Biosciences) was added, and the cells were grown for one doubling at 37°C. After the addition of one volume of 13 M formic acid, the cells were lysed by three successive freeze–thaw cycles. Samples were centrifuged (13 000 r.p.m. for 5 min), and an aliquot of the supernatant was spotted on a polyethyleneimine–cellulose plate (Machery–Nagel) for the separation of the phosphorylated

**Table 1.** List of *E. coli* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source or reference
RFM445	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta$ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> (1995)
RFM475	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta$ ( <i>topA cysB</i> )204, $\Delta$ <i>lac74</i>	Drolet <i>et al.</i> (1995)
RFM445ppGpp <sup>0</sup>	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta$ <i>relA251::km</i> , $\Delta$ <i>spoT207::cat</i> , $\Delta$ <i>lac74</i>	This work
RFM475ppGpp <sup>0</sup>	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta$ ( <i>topA cysB</i> )204, $\Delta$ <i>relA251::km</i> , $\Delta$ <i>spoT207::cat</i> , $\Delta$ <i>lac74</i>	This work
RFM475ppGpp <sup>0</sup> <i>rpoB108</i>	<i>rpsL</i> , <i>galK2</i> , <i>gyrB221</i> (cou <sup>R</sup> ), <i>gyrB203</i> (Ts), $\Delta$ ( <i>topA cysB</i> )204, $\Delta$ <i>relA251::km</i> , $\Delta$ <i>spoT207::cat</i> , $\Delta$ <i>lac74</i> , <i>rpoB108</i>	This work

guanosine nucleotides by thin-layer chromatography in 1.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The *rpoB108* mutant was isolated by plating the RFM475  $\Delta\text{relA251::km } \Delta\text{spoT207::cat}$  (ppGpp<sup>0</sup>) strain on minimal VB medium supplemented with rifampicin at a final concentration of 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The *rpoB108* mutation, a new Rif<sup>r</sup> mutation, is an isoleucine insertion after the isoleucine at position 530 of the *rpoB* gene, resulting from the insertion of three nucleotides (ATC).

### Plasmids

pMD306 has been described previously (Massé *et al.*, 1997). Briefly, it is a pTrc99a derivative that contains an IPTG-inducible 567 bp *HindIII* fragment from *rrnB* preceded by a *boxA* antitermination regulatory sequence. pMD315 is identical to pMD306 but carries the *boxA4UG* mutation (Squires *et al.*, 1993), which inactivates the *boxA* antitermination regulatory element. A 872 bp *BssHII* deletion was performed on both pMD306 and pMD315 to eliminate the 5' portion of the *lacF* repressor gene including its promoter region, thus yielding pMD306 $\Delta\text{lacF}$  and pMD315 $\Delta\text{lacF}$ . pEM505 is a pACYC184 derivative bearing an IPTG-inducible *rnhA* gene. An *NdeI* (blunted)-*BspHI* fragment containing *lacF*, the promoter sequence and the *rnhA* sequence from pPH310 (Drolet *et al.*, 1995), a pTrc99a derivative with an IPTG-inducible *rnhA* gene, was subcloned into the *HincII*-*BspHI* sites of pACYC184. An internal *BamHI* deletion was performed to inactivate the *rnhA* gene, thus yielding pEM505 $\Delta\text{rnhA}$ . pBR322 $\Delta\text{tet5'}$  is a pBR322 derivative in which a *HindIII*-*EcoRV* deletion removed the 5' portion of the *tetA* gene bearing the transmembrane domain responsible for membrane anchorage of the TetA protein (Massé and Drolet, 1999a). During construction of this plasmid, a promoter sequence was reconstituted. The *tetA* gene is therefore transcribed but not translated. pEM301 is a pGB2 derivative (pSC101 replicon) also bearing an IPTG-inducible *rnhA* gene. Like pEM505, the *NdeI* (blunted)-*BspHI* fragment containing *lacF*, the promoter sequence and the *rnhA* sequence from pPH310 was subcloned into pGB2. pSK760 and pSK762c are pBR322 derivatives that carry the wild-type or a mutated and inactive version of the *rnhA* gene (Drolet *et al.*, 1995). pEM001 and pEM003 are the equivalents of pSK760 and pSK762c, respectively, but are pACYC184-based replicons (Massé *et al.*, 1997).

### Plasmid extraction for supercoiling analysis

Unless otherwise indicated, cells containing plasmids of interest were grown overnight in MOPS medium (Neidhardt *et al.*, 1974) at 37°C. MOPS minimal medium was supplemented with all 20 amino acids at a concentration of 0.2%. When required, antibiotics were added as follows: ampicillin at 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , kanamycin at 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , chloramphenicol at 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , spectinomycin at 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . When required, IPTG was added at a final concentration of 1 mM. Overnight cultures were diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.02 in prewarmed, adequately supplemented MOPS medium. Cells were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.4 at 37°C, at which time cultures were split, and protein synthesis inhibitors such as spectinomycin or amikacin were added at a concentration of 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Cul-

tures were incubated further at 37°C for 15 min before being transferred to 28°C for 1 h or maintained at 37°C for 1 h. Growth was arrested by transferring cells into a tube filled with ice, thus immediately lowering the temperature of the culture to 0°C. Plasmid DNAs were extracted by alkaline lysis as described previously (Massé *et al.*, 1997). When the stability of hypernegative supercoiling was evaluated, rifampicin was added at 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  after incubation for 1 h at the indicated temperatures before plasmid extraction.

### Electrophoresis

One-dimensional and two-dimensional agarose gel electrophoresis in the presence of chloroquine (7.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for second dimension of two-dimensional gels) were performed in 0.5× TBE as described previously (Massé *et al.*, 1997). After electrophoresis, the gels were dried and prepared for *in situ* hybridization as described previously (Massé *et al.*, 1997). The presence of hypernegatively supercoiled DNA was confirmed by two-dimensional gel analysis for at least two DNA samples in each experiment. An example is shown in Fig. 2B.

### RNA extraction

RNA was extracted from the same cultures as those for plasmid extractions described above. When cells were collected for plasmid extractions, 2 ml samples were also collected for RNA extractions. RNA extraction was performed using the TRIzol reagent (Invitrogen) as described previously (Wassarman and Storz, 2000). For RNA analysis, 10  $\mu\text{g}$  of RNA was loaded on denaturing agarose or polyacrylamide gels (Jerome *et al.*, 1999). Membranes were probed with a 55-mer oligo d(CGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGCCG), which hybridizes to the 5' region of the pBR322 *tetA* gene.

### Acknowledgements

This work was supported by grant FNR 12667 from the CIHR to M.D. M.D. is a chercheur-boursier senior from the FRSQ. S.B. holds a studentship award from the CIHR. We thank Patrick Hallenbeck and Russell J. DiGate for critical reading of the manuscript.

### References

- Albert, A.C., Spirito, F., Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., and Rahmouni, A.R. (1996) Hyper-negative template DNA supercoiling during transcription of the tetracycline-resistance gene in *topA* mutants is largely constrained *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **24**: 3093–3099.
- Albrechtsen, B., Squires, C.L., Li, S., and Squires, C. (1990) Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J Mol Biol* **213**: 123–134.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., and Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt,

- F.C., Curtiss, R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458–1496.
- Chatterji, D., and Ojha, A.K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**: 160–165.
- Cheng, B., Rui, S., Ji, C., Gong, V.W., Van Dyk, T.K., Drolet, M., and Tse-Dinh, Y.C. (2003a) RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 237–242.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A., and Tse-Dinh, Y.C. (2003b) Direct interaction between *E. coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **278**: 30705–30710.
- Condon, C., Squires, C., and Squires, C.L. (1995) Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **59**: 623–645.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425–433.
- Drolet, M., Bi, X., and Liu, L.F. (1994) Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J Biol Chem* **269**: 2068–2074.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Massé, E., Liu, L.F., and Crouch, R.J. (1995) Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli* delta *topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3526–3530.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Massé, E., and Baaklini, I. (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci* **8**: D210–D221.
- Harinarayanan, R., and Gowrishankar, J. (2003) Host factor titration by chromosomal R-loops as a mechanism for run-away plasmid replication in transcription termination-defective mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **332**: 31–46.
- Huertas, P., and Aguilera, A. (2003) Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol Cell* **12**: 711–721.
- Jerome, L.J., van Biesen, T., and Frost, L.S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease. *E. J Mol Biol* **285**: 1457–1473.
- Jin, D.J., Walter, W.A., and Gross, C.A. (1988) Characterization of the termination phenotypes of rifampicin-resistant mutants. *J Mol Biol* **202**: 245–253.
- Jin, D.J., Burgess, R.R., Richardson, J.P., and Gross, C.A. (1992) Termination efficiency at *rho*-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and *rho*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1453–1457.
- Kampranis, S.C., and Maxwell, A. (1996) Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14416–14421.
- Leng, F., and McMacken, R. (2002) Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9139–9144.
- Liu, L.F., and Wang, J.C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7024–7027.
- Lodge, J.K., Kazic, T., and Berg, D.E. (1989) Formation of supercoiling domains in plasmid pBR322. *J Bacteriol* **171**: 2181–2187.
- Lopez, P.J., Marchand, I., Yarchuk, O., and Dreyfus, M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs independently of ribosome protection. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6067–6072.
- Lynch, A.S., and Wang, J.C. (1993) Anchoring of DNA to the bacterial cytoplasmic membrane through cotranscriptional synthesis of polypeptides encoding membrane proteins or proteins for export: a mechanism of plasmid hypernegative supercoiling in mutants deficient in DNA topoisomerase I. *J Bacteriol* **175**: 1645–1655.
- Massé, E., and Drolet, M. (1999a) Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* **274**: 16654–16658.
- Massé, E., and Drolet, M. (1999b) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem* **274**: 16659–16664.
- Massé, E., and Drolet, M. (1999c) R-loop-dependent hypernegative supercoiling in *Escherichia coli topA* mutants preferentially occurs at low temperatures and correlates with growth inhibition. *J Mol Biol* **294**: 321–332.
- Massé, E., Phoenix, P., and Drolet, M. (1997) DNA topoisomerases regulate R-loop formation during transcription of the *rrnB* operon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 12816–12823.
- Miller, J.H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., and Smith, D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**: 736–747.
- Phoenix, P., Raymond, M.A., Massé, E., and Drolet, M. (1997) Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation *in vitro*. *J Biol Chem* **272**: 1473–1479.
- Qi, H., Menzel, R., and Tse-Dinh, Y.C. (1996) Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol Microbiol* **21**: 703–711.
- Schneider, D.A., Gaal, T., and Gourse, R.L. (2002) NTP-sensing by rRNA promoters in *Escherichia coli* is direct. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8602–8607.
- Squires, C.L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C., and Squires, C. (1993) Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 970–974.
- Tsao, Y.P., and Wu, H.-Y., and Liu, L.F. (1989) Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. *Cell* **56**: 111–118.
- Tse-Dinh, Y.-C. (1998) Bacterial and archeal type I topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 19–27.
- Vogel, U., and Jensen, K.F. (1995) Effects of the antiterminator BoxA on transcription elongation kinetics and (p)ppGpp inhibition of transcription elongation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 18335–18340.
- Wang, J.C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**: 430–440.

- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000) 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* **101**: 613–623.
- Westerhoff, H.V., O'Dea, M.H., Maxwell, A., and Gellert, M. (1988) DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. *Cell Biophys* **12**: 157–181.
- van Workum, M, van Dooren, S.J., Oldenburg, N., Molenaar, D., Jensen, P.R., Snoep, J.L., and Westerhoff, H.V. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 351–360.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., and Cashel, M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**: 5980–5990.

