



HAL
open science

Etude fonctionnelle et structurale des ADN topoisomérases de type II et de leurs modifications post-traductionnelles

Christophe Lotz

► **To cite this version:**

Christophe Lotz. Etude fonctionnelle et structurale des ADN topoisomérases de type II et de leurs modifications post-traductionnelles. Génétique. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ058 . tel-03934672

HAL Id: tel-03934672

<https://theses.hal.science/tel-03934672>

Submitted on 11 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

IGBMC – CNRS UMR 7104 – Inserm U 1258

THÈSE

Présentée par

Christophe LOTZ

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Biophysique et Biologie Structurale

Étude fonctionnelle et structurale des ADN Topoisomérases de type II et de leurs modifications post-traductionnelles

Soutenue publiquement le **24 Novembre 2020** à IGBMC, Illkirch, France

THÈSE dirigée par :

Docteure Valérie LAMOUR

Maître de conférence-Praticien Hospitalier, HDR,
IGBMC, Illkirch, Hôpitaux Universitaires de
Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Professeure Adriana Miele

Professeure, ICBMS, Lyon

Professeur Marc NADAL

Professeur, Institut Jacques Monod, Paris

EXAMINATEUR interne

Docteur Christian GAIDDON

Directeur de recherche CNRS, Inserm U1113 IRFAC,
Strasbourg

« On peut trouver le bonheur même dans les endroits les plus sombres.

Il suffit de se souvenir d'allumer la lumière.»

Albus Dumbledore

Harry Potter et le prisonnier d'Azkaban

Remerciements

Mon parcours universitaire et ma thèse n'auraient pas été une réussite sans les personnes qui m'ont entouré pendant toutes ces années. Ces quelques lignes sont là pour les remercier.

Valérie, mes premières lignes sont pour toi. Je ne sais pas par où commencer, tu m'as donné la chance de pouvoir poursuivre mon cursus en faisant une thèse dans ton équipe. Grâce à toi j'ai acquis la confiance en moi et la maturité qui me manquaient. Je me souviendrai toujours de nos discussions formelles et informelles, mais toujours dans la bienveillance. Ta présence m'a permis de me sentir soutenu et épaulé en toute circonstance. Je suis très ému en écrivant ces quelques lignes car je réalise qu'une page se tourne... Même si je sais que nous garderons contact ! Merci de m'avoir donnée l'occasion de m'impliquer dans des projets toujours intéressants et de m'avoir fait confiance pour les mener à bien sous ta supervision. Merci pour tout !!

Je remercie les organismes qui ont financé ma thèse : Le LabEx INRT du PhD Programme de l'IGBMC pour mes 3 premières années de thèse et la fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer pour ma quatrième année et son extension

Je remercie les membres de mon jury le Prof. Adriana Miele, le Prof. Marc Nadal, le Dr. Christian Gaidon. Je remercie également le Dr. Robert Drillien qui se joint à eux en tant que membre invité pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie mon jury de mi thèse, Dr. Petra Hellwig, Dr. Gilles Travé et Dr. Eduardo Howard pour le suivi de mes travaux et leurs conseils avisés.

Je remercie l'IGBMC et plus particulièrement la plateforme de Spectrométrie de Masse et de Biologie Structurale et Intégrative pour l'expertise dont j'ai pu bénéficier et les équipements qui ont été mis à ma disposition.

Robert, je te remercie pour le temps que tu m'as consacré à me former aux techniques d'expression en cellules de mammifère. Sans toi nous n'aurions jamais pu accumuler tous ces

résultats. Merci pour tes conseils et tes relectures d'article toujours bienveillantes. Je suis content d'avoir pu échanger et partager mes travaux lors de discussions enrichissantes.

Je remercie Arnaud et Claire pour le travail collaboratif que nous avons réalisé ensemble, je suis heureux de voir ce que nous avons pu accomplir. Merci pour vos conseils qui ont été la pierre angulaire de ma thèse.

Claire Batisse merci pour tes conseils avérés sur la manipulation des Topoisomérases ainsi que de nos discussions d'après thèse. Te côtoyer m'a fait mûrir, j'en suis persuadé. Je te souhaite tout le bonheur du monde à toi et toute ta famille !

Léa et Marlène, comme tous les anciens doctorants de l'équipe du Labo Lamour c'est à mon tour de vous passer le flambeau. Je suis sûr que vous allez faire de superbes découvertes. Léa c'était un plaisir pour moi de te montrer les techniques dans le laboratoire en particulier les gels dieu sais qu'il y en avait 😊. J'espère que tu as pu vaincre ta peur des centrifugeuses et de l'AKTA à mes côtés

Je remercie l'équipe Ruff pour leur aide et les (nombreux) coups de main lorsque j'avais un souci sur l'AKTA. Nico et Julien (Oui toi aussi ^^) vous êtes les McGyvers de l'étage. Enfin, je remercie Marc pour nos discussions, plus souvent autour d'une bière que sans mais c'est ce qui fait le charme de nos conversations. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes résultats aux USA :D et surtout, et je crois que c'est le plus important, d'avoir participé activement à la cohésion de groupe par l'organisation de lunch ou dinner lab à coup de superbes chansons comme « Jolie bouteille, Sacrée bouteille ... » (Désolé, je ne connais toujours pas la suite).

Alex et Elodie, mes colocataires de module, merci. Merci d'avoir supporté mes râleries quotidiennes, lors de mes créations de poster (Ah Illustrator une passion !) et quand mes expériences rataient (fréquemment disons). Vous avez été des supers colocataires je n'aurais pas pu rêver mieux. Merci pour ces fous rires et ce soutien dont j'ai bénéficié.

Camille... Oh, Camille merci pour tout, sans toi je n'aurais pas terminé ma thèse en aussi bon état. Sache que j'ai apprécié faire ta rencontre, ton initiation au rhum était nécessaire et ces moments partagés étaient de vraies bouffés d'air frais puis bon gustativement on est un peu « Partner in

Crime » (sauf pour les crêpes). Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite avec Anna (et Moumousse ainsi que le Petit Auguste :D).

Anna !!! Tu es la première étudiante que j'ai rencontrée quand je suis arrivé. Je pense que l'on a pu se confier en toute franchise sur nos joies et nos craintes et que l'on a su s'entraider l'un et l'autre. Je suis un peu nostalgique quand je repense à nous en 2016 (Jadis quand nous étions innocents et jeunes). Plein de bonnes choses pour la suite !

Je tiens à remercier Syrine, Pauline et Auguste pour les moments de complicité avec qui j'ai passé au labo et en dehors.

Pernelle, le rayon de soleil, la licorne de l'étage. Te côtoyer tous les jours m'a changé moi le Black Cloud de l'étage je n'ai pu qu'être illuminé par ta bonne humeur. Néanmoins je n'approuve toujours pas Jason Derulo, ni Boom Boom Tam Tam (quoi que...?). L'organisation de la retraite avec toi était un super moment, une retraite organisée par la « Positive attitude » et « Hello darkness my old friend » ça ne peut que marcher. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite et rappelle-toi chaque jour peu importe ce qu'il se passe il faut « Shine bright like a diamond in the sky » (Ah Riri...).

Je remercie encore de nombreuses personnes, notamment le lunch crew pour cette pause régulière autour d'un (bon ?) repas et nos soirées (Avec et sans souvenirs...). Ayesha, Robert, Pau, Dimitra, Thorben, Beatriz : Thank you for everything it has been a pleasure to meet all of you guys. I wish you all the best for the last years you'll share in IGBMC (For you Bea: I'm happy that you let Christmas come a little bit in your heart even if it's just a tiny bit ☺).

Jordi, Xenia: Gracias también por vuestro apoyo y especialmente por vuestra amabilidad. Creo que sois una pareja muy hermosa y veros juntos me hizo sonreír con tantas "good vibes" (buenas vibraciones). Si me muevo más al ur me gustaría volver a veros y por qué no descubrir España. Un abrazo a los dos

PS agradece a Deepl y Anna por la traducción

Severine !! Sache que notre expérience OpenLab était géniale, nous sommes de supers profs (bon on n'est pas trop fan du premier rang et on préfère le dernier). Je n'aurai pas pu rêver mieux comme partenaire pour cette aventure. Sache que tu es une belle personne !

Nemanja, Salvatore même si on se côtoie seulement depuis la fin de ma thèse je suis content de vous connaître et j'espère que l'on pourra garder contact, merci pour votre soutien !

Je souhaite remercier ma grande famille et en particulier mes cousins, cousines : Myriam, Claire, Hélène, Pierre, Hervé, Luc, Maxime, Sonia, Stéphanie, j'ai toujours pu tout vous raconter et me confier à vous, la famille c'est important et c'est quelque chose que l'on a compris.

Une mention spéciale à ma cousine Cécile, nous deux on a plus que le même sang tu es ma grande sœur spirituelle s'il y a quelqu'un à qui je dis tout c'est bien toi. Merci d'être présente dans ma vie.

Je souhaite remercier les amis d'enfance Sarah, Christelle, Hélène, Cynthia, Robin, Loïc, Julie, Thibault et Aurélien, vous m'avez donné la confiance nécessaire pour m'assumer et m'avez appris à m'aimer, sans vous je n'aurais pas eu le courage de faire le parcours universitaire qui est aujourd'hui le mien. Merci pour ces leçons de vies.

Je tiens à remercier mes amis de fac et de DUT : Hélène, Sabine Florine, Marion, Etienne, Florian, Gaultier et Marine. Malgré que l'on ne se voit que 2 ou 1 fois par an vous étiez une vraie bouffée d'oxygènes toujours à me soutenir ! Amis pour la vie !!

Je remercie la team : Colmar Emma, Seydoux, Nicolas, Claire et le reste de la famille Vauchey. Merci pour votre accueil toutes ces années c'est toujours un plaisir de vous voir autour d'un bon barbecue ou de pizza. Une dédicace spéciale à Emma, des fous rire en permanence quoi qu'on fasse ! Promis les USA nous y reviendrons ensemble 😊.

Merci à mes voisins : Vincent, Marion, Franck et Julie. J'ai eu de la chance de vous avoir autour de moi quand je rentrais le soir, nos soirées jeux de société étaient palpitantes et divertissantes. J'ai été content d'être le témoin de 3 événements marquant dans votre vie et de voir grandir les petits Olivia, Lucas et Lucie. J'espère qu'ils deviendront de grands scientifiques :p.

Enfin, pour finir je souhaite remercier mes parents. Maman, Papa j'espère que vous êtes fiers de moi, j'ai eu une chance inouïe de vous avoir comme parents vous m'avez donné toutes les chances

de réussir. Tant de chance c'est presque indécent, je mesure pleinement les sacrifices que vous avez fait pour nous élever moi et Vincent. Vincent, petit frère ma dernière phrase sera pour toi mon meilleur soutien sache que je te soutiendrai dans tout ce que tu entreprends et je serai toujours là pour toi.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Résumé de la Thèse	4
Introduction	13
1. L'ADN ou Acide désoxyribonucléique	14
2. La topologie de l'ADN.....	15
2.1. Les paramètres conditionnant la topologie de l'ADN.....	15
2.2. Influence de la topologie de l'ADN dans le cycle cellulaire	19
2.2.1. Les domaines TADs	20
2.2.2. La transcription et la réplication de l'ADN	23
2.2.3. La ségrégation des chromosomes	24
2.3. Impact de la topologie de l'ADN sur l'apparition de pathologies.....	24
3. Les ADN topoisomérases.....	26
3.1. Les Topoisomérases de type 2A.....	28
3.2. Mécanisme réactionnel des Top2A	29
3.3. Organisation structurale des TopII eucaryotes	30
3.3.1. Le corps catalytique.....	30
3.3.2. Le domaine C-terminal des TopII humaines	35
3.4. Diversité des domaines C-terminaux des Top2As	36
3.5. Topoisomérase IV.....	38
3.6. ADN gyrase.....	39
3.7. Action de la topoisomérase de type II α durant le cycle cellulaire	41
3.8. Implication des topoisomérases de type II humaines dans la différenciation cellulaire et dans l'organisation de la chromatine.....	44
4. Les Molécules thérapeutiques anti-topoisomérase de type 2A	47
4.1. Les molécules « poisons ».....	47
4.2. Les inhibiteurs catalytiques	51
4.3. Les NBTIs : une nouvelle classe d'inhibiteur pour l'ADN gyrase	53
4.4. Les toxines et protéines régulatrices	53

4.5. Spécificité des molécules anti-TopII α humaines	55
5. Les modifications post-traductionnelles	56
5.1. Phosphorylation	57
5.1.1. La famille CMGC.....	59
5.1.2. La famille Caséine kinase 1 (CK1)	60
5.1.3. La famille Caséine kinase 2	60
5.1.4. La famille AGC.....	61
5.1.5. La famille PLK.....	62
5.2. Acétylation	62
5.3. SUMOylation et Ubiquitylation.....	64
6. Influence des inhibiteurs de PTM sur les ADN-Topoisomérases	68
7. Revue Lotz, C. Lamour, V Cancer drug resistance 2020 “The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational modifications and drug resistance”	69
8. Objectifs de thèse.....	70
Chapitre I : Analyse des phosphorylations et des acétylations des TopIIα et β et de leurs impacts sur le couplage structure/fonction	73
1. Introduction et objectifs.....	74
2. Production de la TopII α et de la TopII β	75
2.1. Clonage des nouvelles constructions des TopII α et β	75
2.2. Analyse de la production en cellule de mammifère par Western-Blot	76
2.3. Purification de la TopII α et β	79
2.4. Tests fonctionnels	82
3. Identification des sites de phosphorylation et d’acétylation chez la TopII α	84
4. Publication Bedez.C, Lotz.C et al. Scientific Reports 2018 “Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain”	88
5. Identification des sites de phosphorylation et des acétylation chez la TopII β	90
6. Analyses comparatives des PTM trouvés en cellules cancéreuses et dans les cellules BHK21/ <i>S.cerevisiae</i> pour chaque isoforme.....	93
7. Étude de l’influence des phosphorylations sur les TopII α et β	107
7.1. Étude de l’influence des phosphorylations sur les TopII α et β entières	108
7.1.1. Mise au point de la production des TopII α et β déphosphorylées	108

7.1.2.	Production à grande échelle des TopII α et β sous leurs formes phosphorylée et déphosphorylée.....	111
7.1.3.	Influence des phosphorylations sur l'activité catalytique des TopIIs	117
7.2.	Étude de l'influence des phosphorylations sur les domaines C-terminaux α et β	120
7.2.1.	Purification du CTD de la TopII α et β	120
7.2.2.	Production à grande échelle des domaines C-terminaux α et β sous leurs formes phosphorylée et déphosphorylée.....	124
7.2.3.	Analyse des sites de phosphorylation de la caséine kinase II α	131
8.	Discussion et Conclusion	133
9.	Perspectives.....	135
Chapitre II : Détermination de l'architecture moléculaire des TopIIs humaines en complexe avec de l'ADN.....		138
1.	Introduction et objectifs.....	139
2.	Etude structural de l'ADN topoisomérases de type II α en complexe avec de l'ADN et de l'étoposide.....	141
2.1.	Publication Vanden Broeck. A, Lotz. C, Drillien. R, Bedez. C, Lamour. V en revision disponible sur BioRxiv 2020 "Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α ".	141
2.2.	Discussion.....	142
2.3.	Perspectives	144
3.	Le complexe TopII β -ADN-Etoposide	149
3.1.	Formation du complexe	149
3.2.	Optimisation de la quantité de BS3 et préparation de l'échantillon.....	151
3.3.	Acquisition d'images au Titan Krios	154
3.4.	Influence du sel dans la stabilisation du complexe	157
3.5.	Analyse de la distribution des lysines en surface	159
3.6.	Conclusion.....	161
Chapitre III : Architecture moléculaire de l'ADN Gyrase en complexe avec de l'ADN et la gépotidacine		163
1.	Introduction et objectifs.....	164
2.	Publication Vanden Broeck, A. ; Lotz, C. ; Ortiz, J. ; Lamour, V. Nature Communication 2019 "Cryo-EM structure of the complete <i>E. coli</i> DNA gyrase nucleoprotein complex"	165
3.	Discussion	166

4. Conclusion	167
Conclusion Générale	171
Matériel et Méthodes	174
1. Constructions Plasmidiques-Méthode du Gibson Assembly	175
2. Culture de cellule mammifère BHK21.....	182
3. Production des TopIIs dans le système d'expression <i>S.cerevisiae</i>	186
4. Purification des TopIIs	186
5. Test topologiques	187
5.1. Test de relâchement d'un ADN surenroulé négativement.....	187
5.2. Test de décaténation d'un ADN.....	188
5.3. Test de clivage.....	188
6. Test d'activité ATPase	189
7. Production de la λ -Phosphatase	191
8. Production de la Caséine kinase II α	194
9. Analyse par spectrométrie de masse.....	196
9.1. Préparation de l'échantillon	196
9.2. Analyse LC-MS/MS.....	197
Bibliographie	200
Annexe 1	234

Liste des abréviations

2Strep : Tag de purification double Streptavidine

10his : Tag de purification 10 histidine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AGC : Famille de kinases regroupant les sous familles protéine kinase A, G et C

ATP : Adénosine TriPhosphate

BET : Bromure d'ETHidium

BHK21 : Baby Hamster Kidney cells 21

BS3 : subérate de bis(sulfosuccinimidyle)

CHAPSO : 3-([3-Cholamidopropyl]dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate

CMGC : Famille de kinases regroupant les sous familles CDK, MAPK, GDK3, CLK

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CTD : Domaine C-terminal

CK1 : Caséine kinase 1

CK2 : Caséine kinase 2 α

Cryo-EM : Cryo microscopie électronique

DUB : DeUBiquitinating enzyme

ERK : Extracellular Regulated Kinase

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

GHKL : Gyrase ; Hsp90 ; histidine Kinase; mut L)

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

GTP : Guanosine Triphosphate

HDAC : Histone DéACétylase

ICRF : Imperial Cancer Research Fund

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

KAT : Lysine acétyltransférase

Kcat : Constante catalytique

KD : Constante de dissociation
kDNA : Kinetoplast DNA
KDAC : Lysine déacétylases
Km : Constante de Michaelis-Menten
Lk : Linking Number
LPP : λ Phosphatase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite
NAT : Nt-acétyltransférase
NBTI : Novel Bactériale Topoisomerase Inhibitor
NLS : Nuclear Localisation Signal
P3C : HRV 3C Protease
PDB : Protein Data Bank
pKa : Constante d'acidité
PKA, PKC : Protein Kinase A et C
PLK : Famille Polo like kinase
PTM : Modification post traductionnelle
SUMO : Small Ubiquitin MOdifier
TAD : Topologically Associated Domain
TBE : Tris-Borate-EDTA
TCI : Titration Calorimétrique Isotherme
Top2 : Topoisomérase de type 2A
Top2cc : complexe de clivage impliquant la topoisomérase de type 2
TopII : Topoisomérase de type 2A eucaryote
TOPRIM : TOPoisomerase-PRImase
Ub : Ubiquitine
UBC : UBiquitin Conjugating
WHD : Winged Helix Domain

Résumé de la Thèse

Contexte Scientifique et objectifs du projet de thèse

Les ADN topoisomérases de type II (TopII) sont des enzymes essentielles au bon déroulement des processus cellulaires comme la réplication de l'ADN, la transcription et la ségrégation des chromosomes. Durant ces processus, la double hélice d'ADN accumule des surenroulements ou forme des caténanes, qui nécessitent l'intervention des TopII. Les TopII humaines sont des enzymes dimériques de 350 kDa, composées d'un corps catalytique formé d'un domaine ATPase (porte N) et d'un domaine de liaison de l'ADN (porte à ADN) ainsi qu'un domaine C-terminal variable (CTD).

La résolution des contraintes topologiques se fait par un mécanisme de coupure-religation de la double hélice d'ADN couplé à l'hydrolyse de l'ATP et conduisant à l'ouverture et la fermeture des portes de l'enzyme selon un mécanisme allostérique.

Chez l'homme il existe deux isoformes pour les TopII : la TopII α et β . L'isoforme α est indispensable à la prolifération cellulaire et une cible importante des traitements anticancéreux². L'isoforme β est impliqué dans les mécanismes de transcription activée³ et dans le développement neuronal⁴. Les molécules utilisées en chimiothérapie des cancers empêchent l'étape de religation de l'ADN, faisant des TopII des cibles thérapeutiques majeures. Cependant, l'utilisation des molécules anti-Top2 peut être à l'origine de cancers secondaires². **L'amélioration des thérapeutiques et des composés anti-Top2 dépend donc grandement de la connaissance des mécanismes catalytiques des Top2s et de leur architecture tridimensionnelle.**

De plus, les deux isoformes sont régulés par des modifications post-traductionnelles (PTMs) qui influent sur leur stabilité, leurs activités et leurs localisations cellulaires⁵. **Cependant l'implication des PTMs dans la régulation des activités des TopII et leur impact sur les mécanismes allostériques sont encore mal caractérisés.**

Durant ma thèse je me suis intéressé à l'étude structure-fonction des complexes des ADN topoisomérases de type II et à l'impact des PTMs sur leur structure et leurs activités enzymatiques. Ces projets ont mobilisé des techniques biochimiques, biophysiques et structurales pour caractériser les complexes moléculaires des TopII.

Ce travail a été réalisé en 3 parties :

- 1) Analyse des phosphorylations et des acétylations des TopII α et β et de leurs impacts sur la relation structure/fonction
- 2) Étude structure-fonction des mécanismes allostériques des complexes nucléoprotéiques des TopII α/β
- 3) Analyse structure-fonction de l'homologue bactérien ADN Gyrase en complexe avec de l'ADN et la gépotidacine

Résultats

- 1) Analyse des phosphorylations et des acétylations des TopII α et β et de leurs impacts sur la relation structure/fonction

Nous nous sommes intéressés aux phosphorylations et acétylations présentes sur les isoformes TopII α et β produites dans des systèmes eucaryotes. Nous avons mis en place la production des TopIIs dans des cellules de mammifère BHK21 et dans la levure *S.cerevisiae* permettant l'obtention de grandes quantités d'enzymes avec une pureté compatible avec des études biochimiques et structurales. L'identification des phosphorylations et des acétylations sur les TopIIs recombinantes par spectrométrie de masse a montré une répartition de ces modifications sur des domaines structuraux distincts, similaire pour les deux isoformes avec des acétylations concentrées sur les domaines catalytiques et les phosphorylations sur les domaines C-terminaux non conservés. D'autre part, le niveau de PTM retrouvé dans les protéines surexprimées en levure ou en cellule de mammifère est équivalent pour les deux isoformes.

Ces identifications ont révélé la présence de nouveaux sites non répertoriés, notamment des acétylations, dont une lysine K168 chez la TopII α conservée spécifiquement chez les eucaryotes. L'inactivation de ce résidu K168 par mutagenèse dirigée ainsi que la modélisation de son acétylation par dynamique moléculaire, a révélé que ce seul résidu est crucial pour la dimérisation du domaine ATPase et son activité enzymatique *in vitro*. Afin d'évaluer l'impact de la mutation *in vitro*, des tests enzymologiques et de régulation topologique de l'ADN ont été réalisés, ainsi que des caractérisations biophysiques telles que la chromatographie d'exclusion stérique et des analyses de la stabilité thermique. À travers cette analyse, ces expériences montrent que les PTMs

modifient des résidus clés pour l'activité catalytique des TopII α s, et pas seulement des positions dans des zones spécifiques moins conservées de l'enzyme.

Ces travaux ont conduit à la publication d'un article dans le journal *Scientific Reports* en 2018 (**Bedez, C* ; Lotz, C* et al. 2018, *co-premiers auteurs**).

Vu le grand nombre de modifications retrouvées chez les TopII α s, nous avons ensuite entrepris d'étudier l'impact global des phosphorylations sur leurs activités catalytiques. Les TopII α s recombinantes ont été produites dans les cellules mammifères et déphosphorylées *in vitro*, réaction suivie par un colorant spécifique des phosphoprotéines et par spectrométrie de masse. Les résultats préliminaires des tests fonctionnels de régulation de la topologie de l'ADN et enzymologiques montrent que la déphosphorylation de la TopII α pourrait conduire à une modulation de son activité induisant des coupures d'ADN aberrantes.

Un autre aspect du projet consiste à déterminer si les PTMs et plus particulièrement les phosphorylations ont un rôle dans le repliement des CTDs alors qu'ils sont prédits comme désordonnés en l'absence de toute modification. Nous avons identifié par spectrométrie de masse les sites de phosphorylation à la caséine kinase II α (CK2) présents au niveau des CTDs pour les deux isoformes. CK2 est une kinase mitotique importante pour le bon déroulement du cycle cellulaire dont l'action stimule l'activité de la TopII α ⁶. Cette étude sera poursuivie par la production des CTD phosphorylés par CK2 qui permettra à moyen terme de déterminer si les phosphorylations ont un impact sur la structure des CTDs.

Ces travaux ont également amené à la publication d'une revue scientifique portant sur la corrélation entre la résistance aux traitements anti-cancéreux et les PTMs de la TopII α , publiée dans le journal *Cancer Drug Resistance* en 2020 en tant que premier auteur (**Lotz C, Lamour V, 2020**).

2) Étude structure-fonction des mécanismes allostériques des complexes nucléoprotéiques des TopII α/β

Les structures des domaines catalytiques isolés des TopII α s ont été résolues par cristallographie aux rayons X⁷. Cependant les structures des protéines entières et leurs conformations à chaque étape du cycle catalytique n'étaient pas encore connues.

L'architecture moléculaire complète de la TopII α humaine en complexe avec de l'ADN et de l'étoposide, un agent anti-tumoral, a été récemment obtenue par cryo-microscopie électronique dans l'équipe. Ces informations structurales ont mis en évidence deux conformations ouvertes et fermées ainsi que les connexions entre les domaines ATPase et de liaison de l'ADN spécifiques aux eucaryotes. Cette structure a aussi révélé une partie du domaine CTD pour lequel aucune donnée n'était encore disponible. Cette région des résidus 1193 à 1217 est positionnée sous le segment d'ADN G et possède plusieurs résidus soumis potentiellement à des PTMs.

Sur la base de ces informations structurales, nous avons exploré les spécificités du mécanisme catalytique de la TopII α par une étude ciblée de mutagenèse dirigée *in vitro*. Les résultats font apparaître le rôle crucial de ces éléments structuraux de connexion entre domaines dans les mécanismes allostériques permettant la modulation de l'activité de relâchement de l'ADN.

Ce travail concernant la TopII α a abouti à la soumission d'un article en août 2020, actuellement en révision (**Vanden Broeck, A ; Lotz, C ; Drillien, R ; Bedez C. ; Lamour V, article en révision**).

Grâce à la qualité des échantillons obtenus, nous avons pu initier une étude structurale comparative de l'isoforme β par cryo-microscopie électronique. Avec les protocoles de microscopie mis en place, nous avons pu reconstruire un premier modèle de la TopII β avec une résolution locale à 9Å sur le corps catalytique mais sans la présence d'ADN. Ce travail devra être poursuivi au sein de l'équipe pour étudier plus précisément les différences structurales entre les 2 isoformes.

3) Analyse structure-fonction de l'homologue bactérien ADN Gyrase en complexe avec de l'ADN et la gépotidacine

L'ADN Gyrase est une topoisomérase de type II bactérienne qui présente une forte homologie structurale sur ces domaines catalytiques avec les topoisomérases eucaryotes. La gyrase est un hétérotétramère de 380 KDa composée des sous-unités GyrA et GyrB. En 2013 le laboratoire avait produit la première structure de l'ADN Gyrase de *Thermus Thermophilus*, en complexe avec de l'ADN et la ciprofloxacine⁸. Cette structure a permis d'observer que les sous-unités GyrB sont entrelacées et que les β -pinwheels du domaine C-terminal maintiennent le brin d'ADN courbé, grâce aux charges positives disposées en surface de ces domaines. Cependant la résolution limitée de cette structure avec les technologies de l'époque, ne permettait pas de distinguer les différentes

conformations de cette enzyme lors d'autres étapes du cycle catalytique. L'évolution technologique de la microscopie électronique a permis à l'équipe d'obtenir la structure à haute résolution de l'ADN Gyrase du modèle génétique *E.coli* en complexe avec de l'ADN et la gépotidacine. Cette structure a révélé un réseau d'interaction dans le domaine ATPase important pour la transmission du signal allostérique jusqu'au domaine de liaison à l'ADN. Nous avons pu mener l'étude par mutagenèse dirigée d'un réseau d'interaction présent chez *E.Coli* et absent chez *T.Thermophilus* faisant apparaître des spécificités structurales fines entre les différentes ADN Gyrase bactériennes.

Ce travail a abouti à la publication d'un article dans le journal *Nature communications* en 2019 (**Vanden Broeck, A ; Lotz, C ; Ortiz, J ; Lamour V, 2019**).

Conclusion et perspectives

L'obtention par l'équipe des structures de TopII α et de l'ADN Gyrase en complexe avec de l'ADN et des agents anti-Top2 a permis durant cette thèse de mener l'analyse fine des relations structure-fonction menant à la compréhension des mécanismes allostériques des Top2s eucaryote et procaryote, ainsi que la contribution d'éléments structuraux dont certains n'avaient jamais été analysés. Ces projets pourront être poursuivis pour analyser les interactions entre les Top2s et des substrats d'ADN plus complexes rencontrés dans le contexte physiologique.

L'identification des modifications post-traductionnelles, plus particulièrement des phosphorylations et des acétylations sur les topoisomérases de type II humaines a permis de révéler une distribution des phosphorylations et des acétylations commune aux deux isoformes. Ces identifications ont permis l'étude ciblée d'un résidu conservé important pour la relation structure-fonction et plus particulièrement le mécanisme allostérique des TopIIs.

La suite de ce projet porte sur la caractérisation de l'impact des phosphorylations sur les activités enzymatiques de TopII. Nous avons pour cela mis en place la production et la caractérisation de TopIIs entièrement déphosphorylées. Les résultats préliminaires montrent que le niveau de phosphorylation influe sur l'activité catalytique de la TopII α . Nous avons également identifié par spectrométrie de masse les sites de phosphorylation à la caséine kinase II α dans les domaines C-terminaux des deux isoformes. Les perspectives de ce projet seront de caractériser l'influence des phosphorylations sur l'activité catalytique de la TopII β et de déterminer si les CTDs adoptent une

structure tridimensionnelle particulière sous l'influence des phosphorylations et d'étudier leur interaction avec la chromatine.

Articles scientifiques :

- Vanden Broeck, A ; Lotz, C ; Drillien, R ; Bedez C. ; Lamour, V. “Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α ” **article soumis** consultable sur la plateforme BioRxiv, DOI : <https://doi.org/10.1101/2020.08.23.26355>)
- Vanden Broeck, A ; Lotz, C ; Ortiz, J ; Lamour, V. “Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA Gyrase nucleoprotein complex” Nature Communications, volume 10, Article number : 4935, DOI : [10.1038/s41467-019-12914-y](https://doi.org/10.1038/s41467-019-12914-y) (2019)
- Bedez, C *; Lotz, C* ; Vanden Broeck, A ; Stote, R.H ; Howard, E ; Pradeau-Aubretton, K ; Ruff, M ; Lamour, V. “Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain.” * equally contributed. Scientific Reports, volume 8, Article number: 9272, DOI : [10.1038/s41598-018-28936-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-28936-3) (2018)

Article de revue:

- Lotz, C ; Lamour, V. “The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational modifications and drug resistance” Cancer drug resistance, 3:149-160, DOI : [10.20517/cdr.2019.114](https://doi.org/10.20517/cdr.2019.114) (2020)

Communications orales:

- Présentation : Lotz, C ; Bedez, Vanden Broeck, A ; Drillien, M ; Lamour, V. “Structural and functional studies of Human type II Topoisomerases and their post-translational modifications”, Journées jeunes chercheurs Fondation ARC (2020)
- Poster : Lotz, C ; Bedez, C; Batisse, C ; Vanden Broeck, A ; Drillien, R ; Ruff, M ; Lamour, V. “Structural and functional studies of Human type II Topoisomerases and their post-translational modifications”, Biophysical Society, San Diego, Californie, États-Unis, DOI : [10.1016/j.bpj.2019.11.2920](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.2920) (2020)

- Poster : Lotz, C ; Howard, E ; Vanden Broeck, A ; Lamour, V. “Structural analysis of the post-translational modifications identified of human TopII isoforms” EMBO DNA topology and topoisomerases in genome dynamics, Les Diablerets, Suisse (2019)
- Poster : Bedez, C ; Lotz, C ; Batische, C ; Vanden Broeck, A ; Stote, R ; Howard, E ; Pradeau-Aubreton, K ; Ruff, M ; Lamour, V. “Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain of the α isoform” Association Française de Cristallographie (AFC), Lyon, France (2018)
- Poster : Lotz, C ; Vanden Broeck A ; Bedez, C ; Drillien, R ; Lamour, V. “Structural and functional studies of Human type II Topoisomerases and their post-translational modification” Journée Campus d’illkirch (JCI), Illkirch-Graffenstaden, France (2017)

Introduction

1. L'ADN ou Acide désoxyribonucléique

L'ADN ou Acide Désoxyribonucléique est une macromolécule contenant l'information génétique. Chez les eucaryotes, l'ADN est essentiellement localisé dans le noyau des cellules.

La structure de l'ADN a été obtenue par James Watson et Francis Crick en 1953 par cristallographie aux rayons X, grâce aux clichés de diffraction obtenus par Rosalind Franklin⁹. Ces travaux ont mis en lumière une structure en double hélice de deux brins d'ADN. Chaque brin d'ADN est constitué de nucléotides composés des bases azotées suivantes : Adénine A, Thymine T, Cytosine C ou Guanine G, d'un sucre : le désoxyribose et d'un groupement phosphate. La succession de ces bases azotées code l'information génétique.

Les deux brins d'ADN sont liés entre eux par appariement des bases azotées. En effet, ces dernières sont liées via des liaisons hydrogènes. Ainsi, l'adénine est liée à la thymine par deux liaisons hydrogène-hétéroatome. La cystéine est liée à la guanine par trois liaisons hydrogène-hétéroatome. La somme de ces interactions induit la structure en double hélice de la molécule d'ADN appelée « B-form », dans sa forme naturelle (**Figure 1**).

Après l'obtention de la structure de l'ADN, Watson et Crick se sont demandés comment l'information génétique pouvait être accessible pour les processus cellulaires de transcription et de division cellulaire.

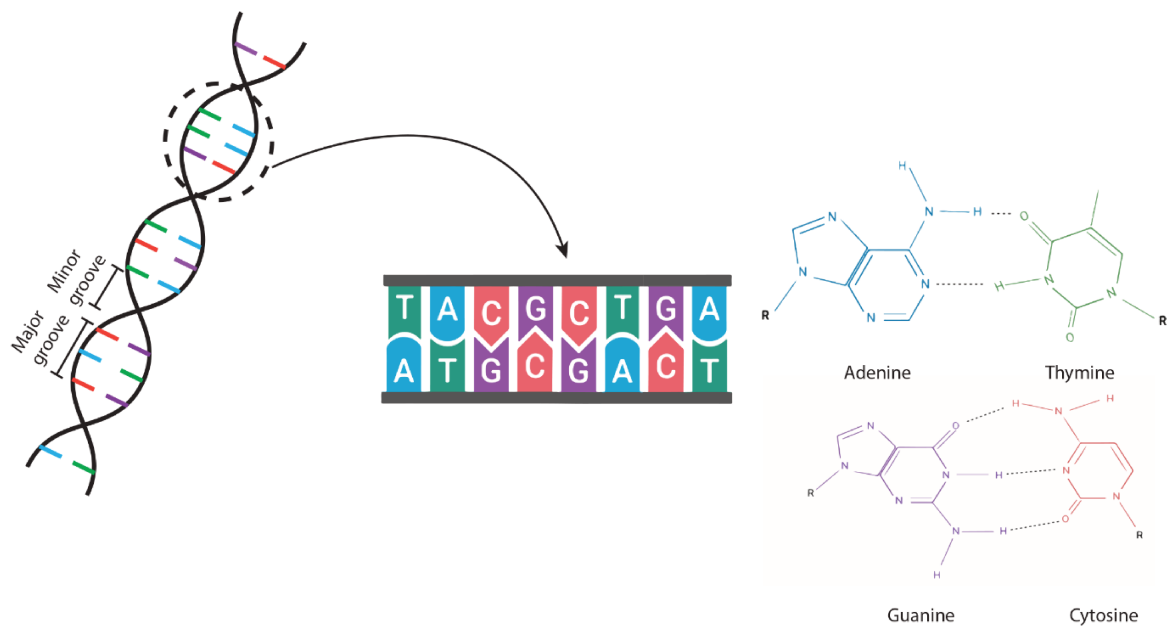


Figure 1 Schéma de la structure en double hélice de la molécule d'ADN. Les bases azotées : Adénine, Thymines, Guanine et Cytosine sont représentées respectivement en bleu, vert, violet et rouge.

Le génome humain mesure environ 2 m, il est compacté dans un noyau cellulaire de 10 – 20 μm soit un ordre de compaction de 10^6 . De même, l'ADN du micro-organisme *E.coli* mesure approximativement 1,2 mm et doit être compacté 10^3 fois¹⁰. Lors de certains processus cellulaires nécessitant l'accès à l'information génétique, les brins complémentaires se séparent conduisant à une déformation de la molécule d'ADN. La compaction, la séparation des deux brins complémentaires ainsi que les contraintes imposées par la structure en double hélice de l'ADN ont une influence sur la topologie de ce dernier.

2. La topologie de l'ADN

2.1. Les paramètres conditionnant la topologie de l'ADN

Pour étudier la régulation de la topologie de l'ADN, il faut savoir que dans le contexte cellulaire, cette molécule est contrainte et ses extrémités sont fixées, par des machineries moléculaires, ou dans la membrane cellulaire. Par conséquent la modification de la topologie ne peut se faire que par rupture d'un ou des deux brins d'ADN. L'ADN est présent sous la forme d'un plasmide chez les bactéries, ou bien lié à des complexes protéiques comme les octamères d'histones pour l'ADN

eucaryote^{11,12}. L'ADN bactérien est également attaché directement à la membrane cytoplasmique¹³. Des modèles mathématiques permettent de caractériser la topologie de l'ADN. Le « Linking number » (Lk) représente l'indice d'entrelacement de la molécule qui est égale à la somme des torsions et des surenroulements¹⁴.

$$Lk = Tw + Wr$$

Tw : facteur de torsion. Il représente le nombre de fois qu'un brin passe au-dessus d'un autre sur un segment d'ADN.

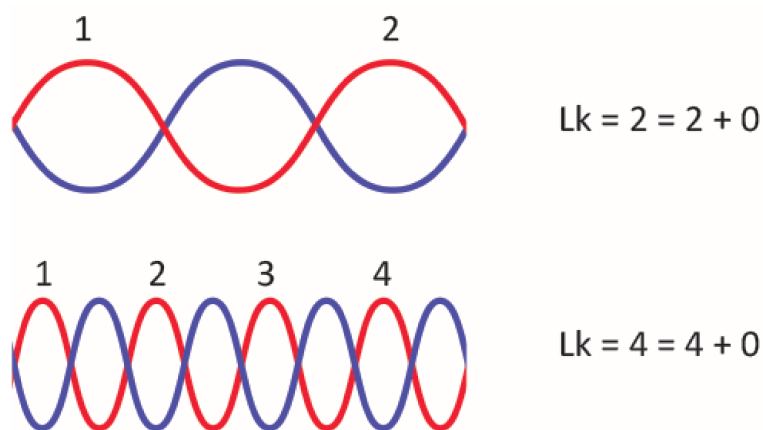
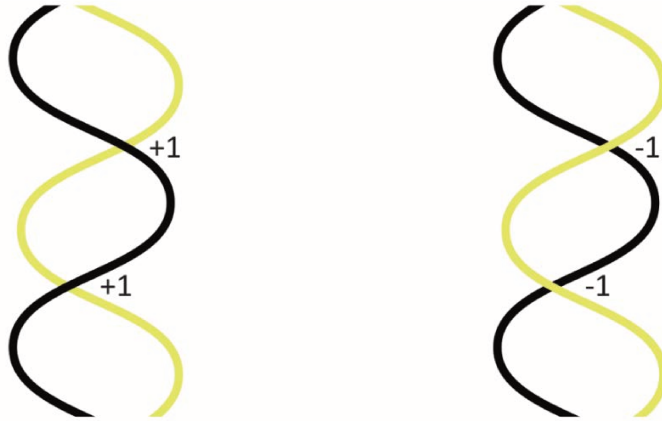


Figure 2 Illustration du facteur de torsion. Deux brins d'ADN sont représentés en rouge et en bleu.

W_r : facteur de surenroulement. Il représente le nombre de fois où un segment d'ADN passe au-dessus d'un autre segment. La valeur peut être positive ou négative suivant l'orientation de l'axe de l'ADN.

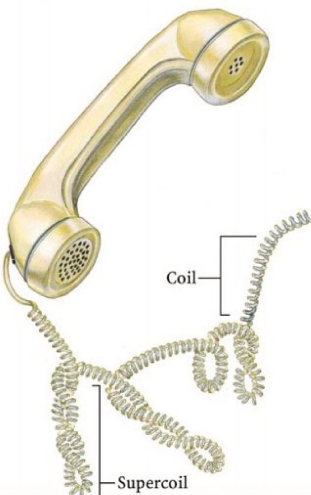


$$Lk = +2 = 0 + 2$$

$$Lk = -2 = 0 + (-2)$$

Figure 3 Illustration du facteur de surenroulement. Deux molécules ADN double brin sont représentées en jaune et en noir.

Le calcul de l'indice d'entrelacement est dépendant de deux paramètres : le « twist » T_w (**Figure 2**) et la « writhe » W_r (**Figure 3**). L'indice d'entrelacement est invariable s'il n'y a pas de coupure simple ou double brin de l'ADN et que la molécule n'est pas libre de rotation. En conséquence, toute différence est traduite par une interconversion entre les facteurs de torsion et de surenroulement.



Afin de mieux représenter le comportement physique de la structure en double hélice de l'ADN, ce dernier peut être représenté par un cordon téléphonique du siècle dernier (**Figure 4**). Par endroit, la tension et la distance qui s'opère entre la prise téléphonique et le téléphone induit un surenroulement du câble. D'un point de vue mathématique, le surenroulement se traduit un coefficient W_r différent de 0.

Les surenroulements peuvent donc être positifs ou négatifs selon l'orientation de l'axe de l'ADN. Un ADN relâché de 1050 bp avec un nombre de paires de bases par tour d'hélice de 10,5, possède une valeur

Lk égale à Lk_0 qui est l'indice d'entrelacement d'un ADN

Figure 4 Cordon téléphonique contenant des tours (coil) et des surenroulements (supercoil.).

relâché sans contraintes topologiques. Pour un ADN sous la forme B, $Lk_0 = 100 = Tw$. Le même ADN avec un facteur de surenroulement de -4 aura un indice $Lk = 100 - 4 = 96$. La différence $\Delta Lk = Lk - Lk_0 = -4$, ce qui traduit un surenroulement négatif de l'ADN.

La majorité de l'ADN du génome humain est naturellement surenroulé négativement d'environ 6%¹⁵⁻¹⁷. Chez les bactéries¹⁸, certaines portions d'ADN sont considérées comme hyper-surenroulées négativement (**Figure 5**).

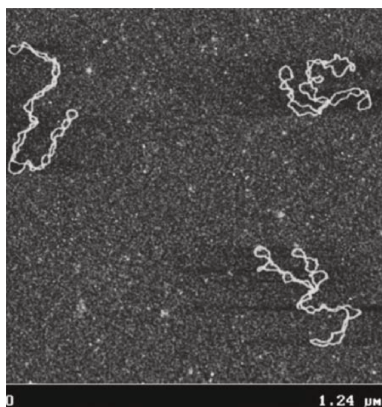


Figure 5 Image issue d'un microscope à force atomique (AFM) de trois molécules d'ADN surenroulées. Photographie issue de Lyubchenko Y.L et al.¹

L'ADN est surenroulé négativement *in vivo* pour trois raisons :

- Le surenroulement permet la compaction de l'ADN
- Les surenroulements négatifs sont plus stables que les positifs car ils possèdent une enthalpie libre ΔG plus faible d'après l'équation dérivée de la relation thermodynamique de Gibbs-Helmoltz s'appliquant pour les segments d'ADN de plus de 2000 bp¹⁹:

$$\Delta G \left(\frac{\text{kcal}}{\text{bp}} \right) = 700 \times \frac{\Delta Lk}{N}$$

- Le surenroulement négatif facilite la séparation de la des deux brins de l'ADN lors de la fixation des machineries de transcription et de réplication, et l'interaction avec des protéines régulatrices^{14,20-22}

2.2. Influence de la topologie de l'ADN dans le cycle cellulaire

Pendant plusieurs décennies, seule la structure primaire de l'ADN, c'est à dire sa séquence nucléotidique, était considérée comme capitale dans le traitement de l'information génétique. Depuis, il a été démontré que la conformation et la topologie de l'ADN joue un rôle dans ces processus^{14,23-25} (**Figure 6**). Ainsi, Niehus et al. ont par exemple démontré, que la transcription chez *Chlamydia trachomatis*, un pathogène responsable d'IST, peut être influencée par le degré de surenroulement de l'ADN au niveau des promoteurs²⁶.

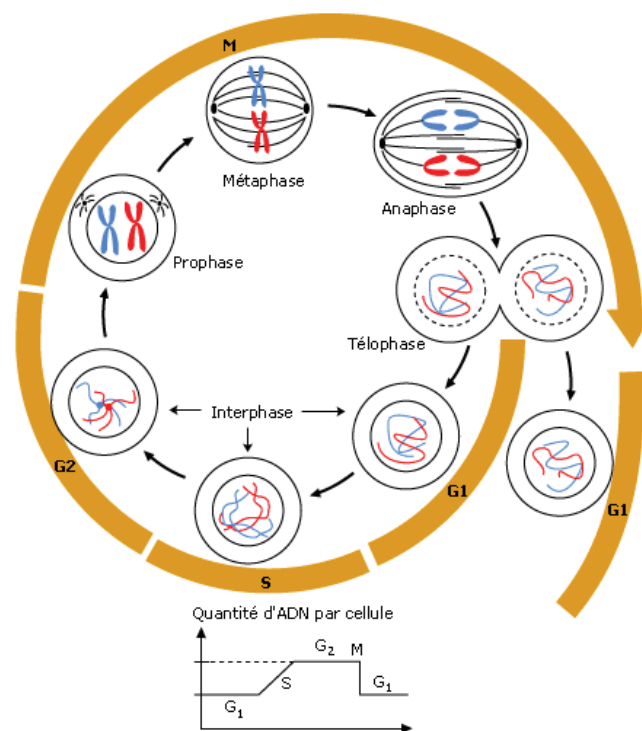


Figure 6 Illustration du cycle cellulaire et de la quantité d'ADN par cellule durant le cycle.

2.2.1. Les domaines TADs

Le repliement de l'ADN chez les eucaryotes suit un modèle hiérarchique. La structure en double hélice s'enroule autour d'octamères d'histones pour former le nucléosome. Les nucléosomes sont assemblés sous formes de fibres de 30 nm, puis en chromonéma de 120 nm, puis en chromatide de 300 à 700 nm pour adopter une structure chromosomique durant la mitose²⁷ (**Figure 7**).

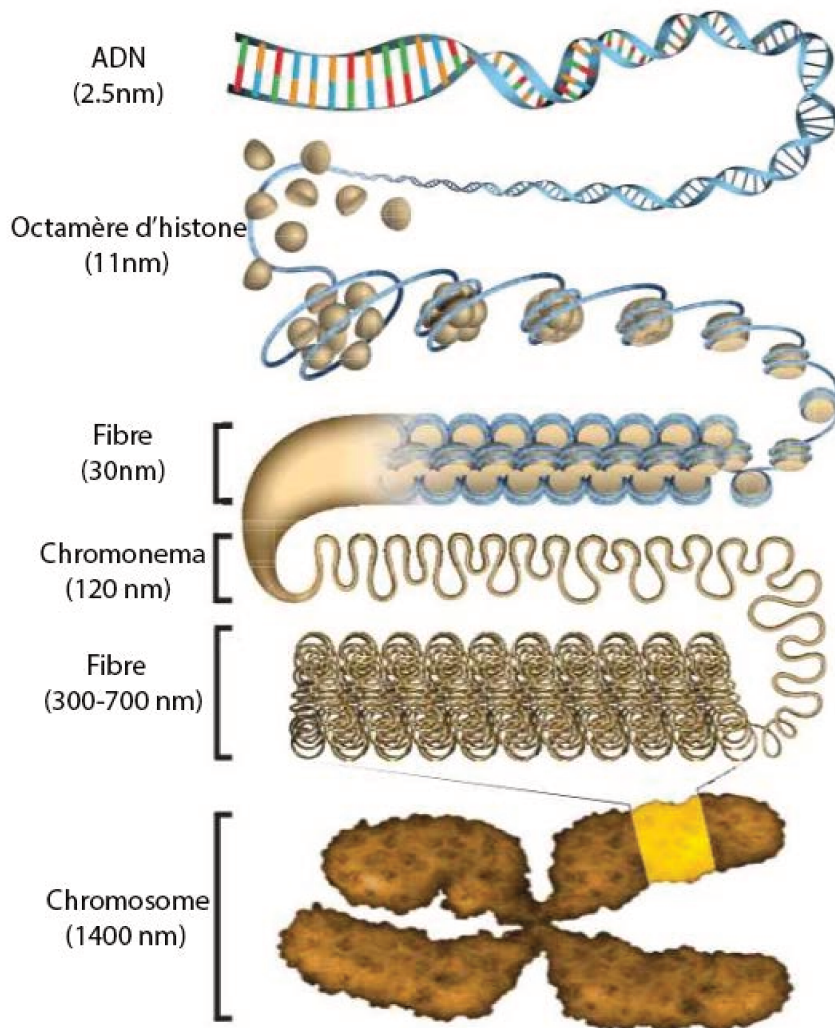


Figure 7 Modèle hiérarchique du repliement de l'ADN. Image issue de Ou, H. D. et al.²⁸

En 1885, des chercheurs allemands révèlent pour la première fois l'ADN lors de l'interphase, condensé sous forme de pelote non organisée avec des différences de contraste observable au

microscope optique²⁹. Des études ont été menées pour comprendre comment l'apparente absence d'organisation de l'ADN durant l'interphase pouvait conduire à une architecture chromosomique hautement structurée permettant la division d'une cellule en deux cellules filles identiques. Des expériences de coloration spécifique de chaque chromosome par la méthode d'hybridation *in situ* fluorescence FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) (**Figure 8**) ont mis en évidence une organisation en territoire chromosomique de la pelote d'ADN de fibroblaste³⁰.

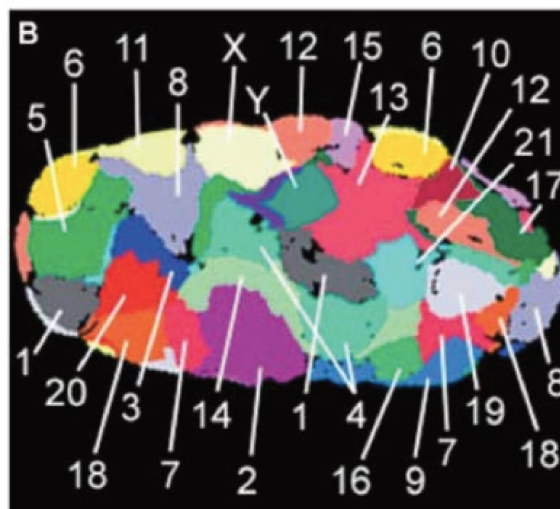


Figure 8 Coloration des régions chromosomiques par la méthode FISH de l'ADN au stade G0. Image issue de Bolzer et al.³⁰

Plus tard, les nouvelles méthodes de capture de conformation chromosomique, ou Hi-C, ont permis de déterminer la présence d'interaction entre des brins d'ADN inter-chromosomique dans ces territoires chromosomiques que sont les TADs (Topologically Associated Domains)³¹ (**Figure 9**).

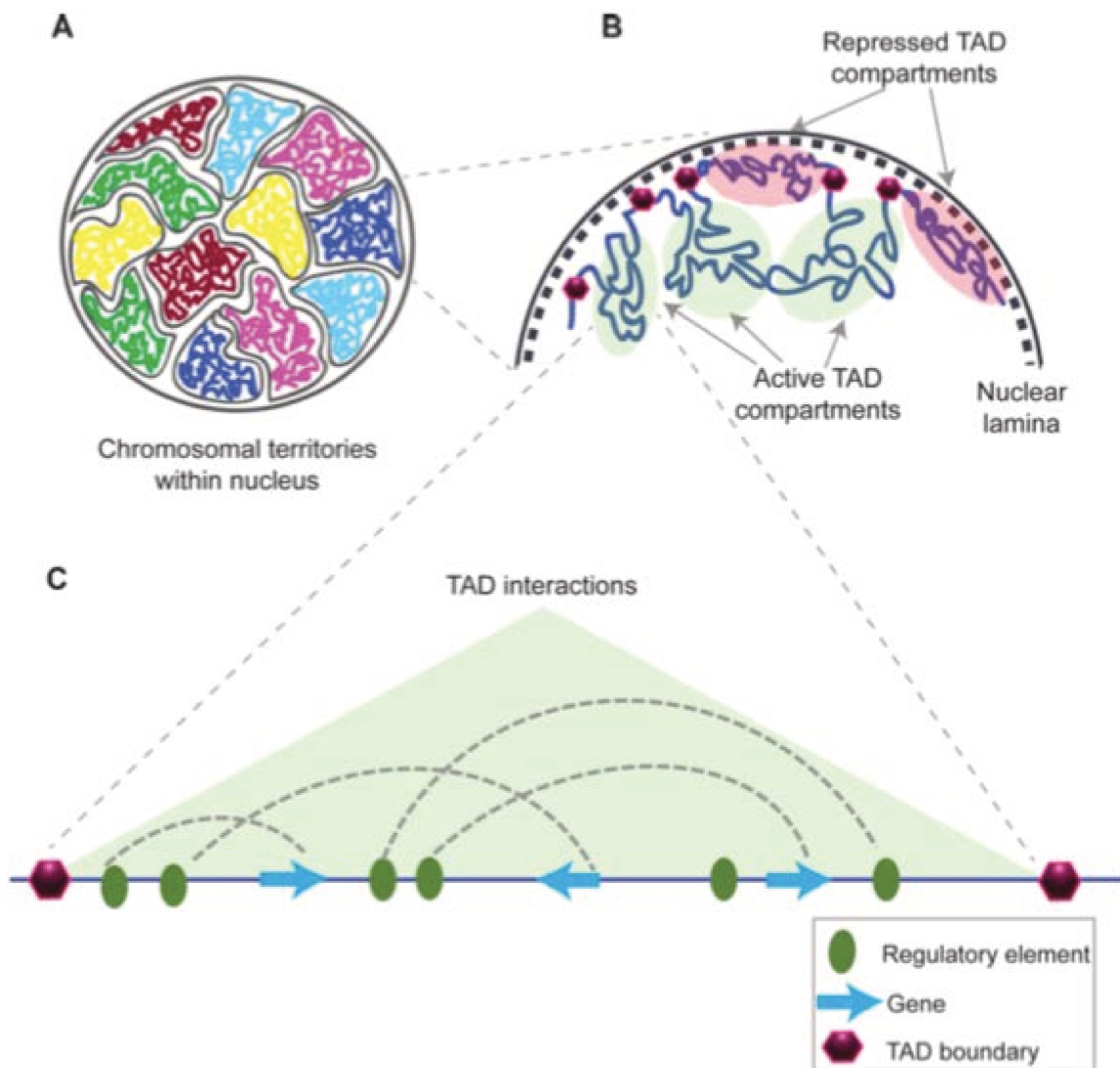


Figure 9 Illustration de la localisation des domaines TADs. (A) Régions chromosomiques au sein du noyau. (B) Visualisation des interactions possibles entre les domaines TADs. (C) Organisation d'un domaine TAD et de ces interactions internes. Image issues de Matharu N. et al.³²

Les TADs ont une taille allant d'une centaine de kilobases à quelques mégabases. De par leurs nombreuses interactions ADN-ADN, ils sont impliqués dans le contrôle de la régulation génétique³³. Il a été récemment démontré que les TADs sont surenroulés et que ce surenroulement participe à leurs formations. Cependant, peu d'informations sont disponibles à ce jour sur les conséquences qu'entraînerait un manque de surenroulement de ces domaines³⁴.

2.2.2. La transcription et la réplication de l'ADN

Durant la transcription et la réplication de l'ADN, les machineries moléculaires « ouvrent » la double hélice d'ADN pour avoir accès à l'information génétique, et procèdent à la lecture du code génétique (**Figure10**). Le mouvement de lecture de l'ADN par ces complexes protéiques est linéaire et non rotationnel, ce qui a pour effet de compresser la double hélice augmentant le facteur de torsion. Par compensation, la topologie de l'ADN change, favorisant la formation de surenroulement positif en amont de la fourche de réplication et de la bulle de transcription³⁵. Cette compaction de l'ADN et donc ce surenroulement positif a pour conséquence d'inhiber voire de stopper les processus de transcription et de réplication. L'avancée de la fourche de réplication conduit à la formation de supertours positifs, en aval et de précaténanes entre les deux doubles brins d'ADN en amont^{36,37}. En amont de la bulle de transcription, des supertours négatifs se forment afin que l'indice d'entrelacement reste constant sur cette portion de l'ADN. Il est donc important de réguler finement la topologie de l'ADN durant ces étapes pour le bon fonctionnement des processus cellulaires. Enfin, l'ADN étant extrêmement compacté, il a été montré que les variations topologiques locales ont des répercussions jusqu'à 100 kbp en amont ou en aval des machineries moléculaires³⁸.

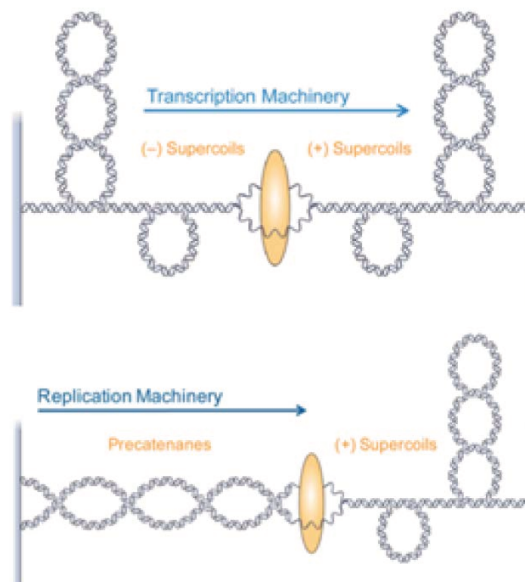


Figure 10 Avancée des machineries de transcription et de réplication ouvrant la double hélice d'ADN et la génération de leurs conséquences topologiques. Image issue de Ashley R. E. et al.³⁹

2.2.3. La ségrégation des chromosomes

La ségrégation des chromosomes se produit lors de l'anaphase : elle correspond à la séparation ordonnée et synchrone de deux chromatides sœurs. Les bras chromosomiques se rejoignent en un point précis appelé centromère et l'ensemble forme un chromosome. Le rapprochement des deux chromatides favorise l'apparition de caténanes, qui se définissent par l'imbrication de deux boucles d'ADN l'une dans l'autre⁴⁰. Durant la ségrégation des chromosomes, chaque chromatide est tirée vers l'un des deux pôles opposés de la cellule via le fuseau mitotique. Les caténanes, s'ils sont conservés, induisent une mauvaise séparation, favorisant la formation d'aberrations chromosomiques comme les ponts anaphasiques⁴¹ (**Figure 11**).

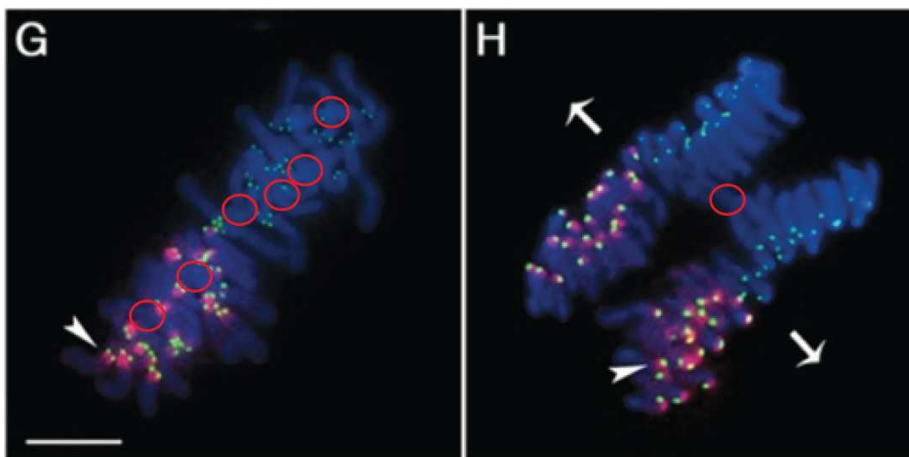


Figure 11 Image issue d'un microscope confocale montrant l'ADN au stade (G) de métaphase et (H) anaphase. L'ADN est coloré en bleu et les marqueurs vert et rouge représentent des protéines mitotiques (ATRX et CREST). Les cercles rouges entourent des formes d'ADN caténés. Image adaptée de De La Fuente, R. et al.⁴²

2.3. Impact de la topologie de l'ADN sur l'apparition de pathologies

Il est maintenant évident que la topologie de l'ADN est dynamique pendant toute la durée du cycle cellulaire. Des altérations topologiques pourraient causer des dommages sur le génome pouvant conduire à l'apparition de pathologies.

Des perturbations structurales de l'ADN dans les domaines TADs, à hauteur de 34 % ont été identifiées dans le génome de lymphocyte B leucémiques^{43,44}. Ces modifications des domaines

TADs ont pour conséquences l'expression de gènes de fusion aberrants ainsi que la formation de plusieurs structures d'ADN différentes de la « B-form » (Z-DNA, cruciform/hairpin, triplexes, quadruplexes), qui sont associées aux translocations et aux délétions génétiques^{45,46}.

Enfin, des études ont montré notamment que durant les infections bactériologiques, la topologie de l'ADN des cellules hôtes est remaniée pour permettre aux pathogènes *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* ou encore *Yersinia enterocolitica*, d'infecter les cellules hôtes⁴⁷⁻⁵⁰. Ces espèces remanient l'architecture 3D de l'ADN de la cellule hôte via une cascade de réactions engendrée par les agents pathogènes⁵¹.

La topologie de l'ADN est un facteur important dans les processus impliquant l'accès à l'information génétique. Une régulation fine de ce paramètre géométrique est indispensable au bon fonctionnement des cellules eucaryotes et procaryotes.

Il est donc nécessaire de comprendre comment cette régulation s'opère à l'échelle moléculaire

Les ADN topoisomérasés sont les principales régulatrices de la topologie de l'ADN, qualifiée de « véritable magicienne moléculaire » par James Wang, le chercheur qui a caractérisé pour la première fois ces enzymes dans les années 1970^{52,53}.

3. Les ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des nucléoprotéines capables de couper l'ADN et de le relier en un cycle catalytique. Il existe plusieurs topoisomérases dans les cellules eucaryotes et procaryotes⁵⁴. Elles partagent une caractéristique commune : la capacité à réaliser des coupures de l'ADN par une réaction de transestérification (**Figure 12**). La tyrosine catalytique présente chez toutes les topoisomérases permet une attaque nucléophile sur le squelette phosphate de l'ADN, ce qui conduit à la formation d'un complexe stable de clivage entre l'ADN et la protéine.

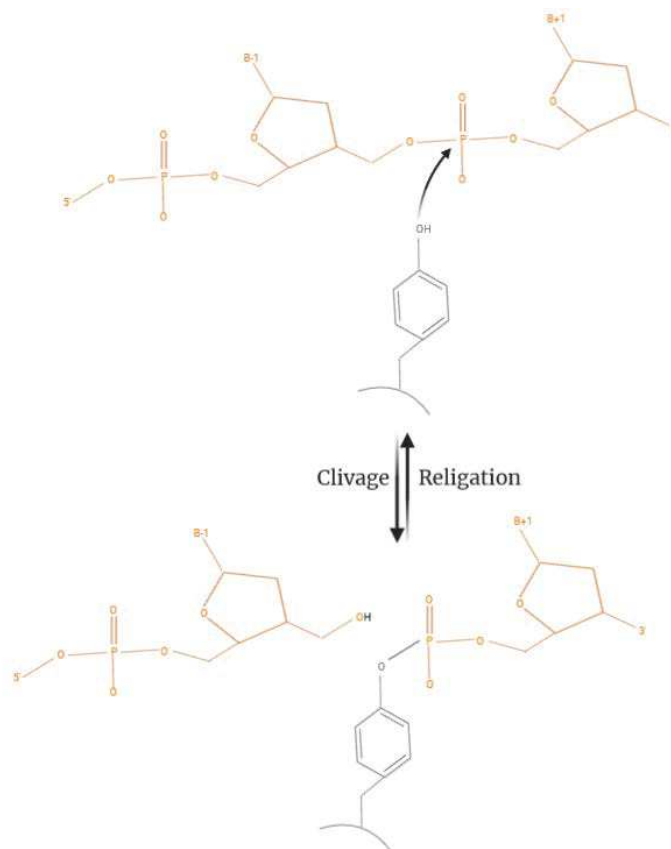
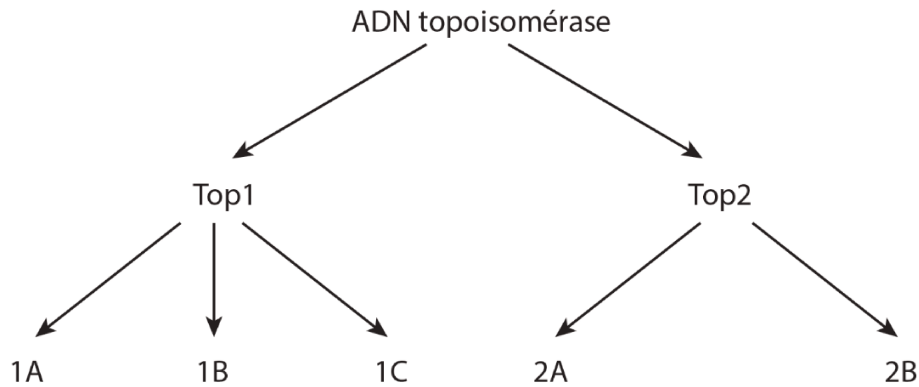


Figure 12 Réaction de transestérification des ADN topoisomérases avec l'ADN.

Ce mécanisme permet de réguler la topologie de l'ADN en modifiant l'indice d'entrelacement Lk sur cette portion. Il existe des ADN topoisomérases de type 1 (Top1), qui réalisent une coupure sur un ADN simple brin, et des ADN topoisomérases de type 2 (Top2) qui clivent un ADN double brin. Les topoisomérases sont généralement désignées par un chiffre romain indiquant si elles appartiennent aux sous-familles des Top1 ou des Top2. Les Top1s sont les TopI, TopIII et TopV. Les Top2s connues à ce jour sont les TopII, TopIV, TopVI et TopVIII. Il existe deux enzymes qui

ne respectent pas cette nomenclature : l'ADN Gyrase, une topoisomérase bactérienne appartenant à la classe des Top2s, et la Reverse Gyrase, qui est également une topoisomérase bactérienne mais de type 1. Au sein des types 1 et des types 2, les protéines sont réparties dans les classes A, B et C en fonction de leurs structures tridimensionnelles et/ou de leurs séquences protéiques (**Figure 13**).



Topoisomerase	Type	Structure	Coupure simple/double brin	dépendance à l'ATP	dépendance aux ions Mg ²⁺
TopI bactérienne	1A	Monomère	simple	Non	Oui
TopI eucaryote	1B	Monomère	simple	Non	Non
TopII	2A	Homo-dimère	double	Oui	Oui
TopIII	1A	Monomère	simple	Non	Oui
TopIV	2A	Hétéro-tétramère	double	Oui	Oui
TopV	1B/1C	Monomère	simple	Non	Non
TopVI	2B	Hétéro-tétramère	double	Oui	Oui
TopVIII	2B	Homo-dimérique	double	Oui	?
DNA gyrase	2A	Hétéro-tétramère	double	Oui	Oui
Reverse gyrase	1A	Monomère	simple	Oui	Oui

Figure 13 Classification des ADN topoisomérases. La classification montre la répartition des topoisomérases. Le tableau montre les caractéristiques structurales et mécanistiques de toutes les topoisomérases.

Bien que toutes les ADN topoisomérases soient capables de réguler la topologie de l'ADN, chacune d'elles remplissent une fonction spécifique. Ces caractéristiques peuvent être le relâchement d'un ADN surenroulé positivement ou négativement, dénouer des caténanes d'ADN ou encore de surenrouler un ADN relâché (**Figure 14**).

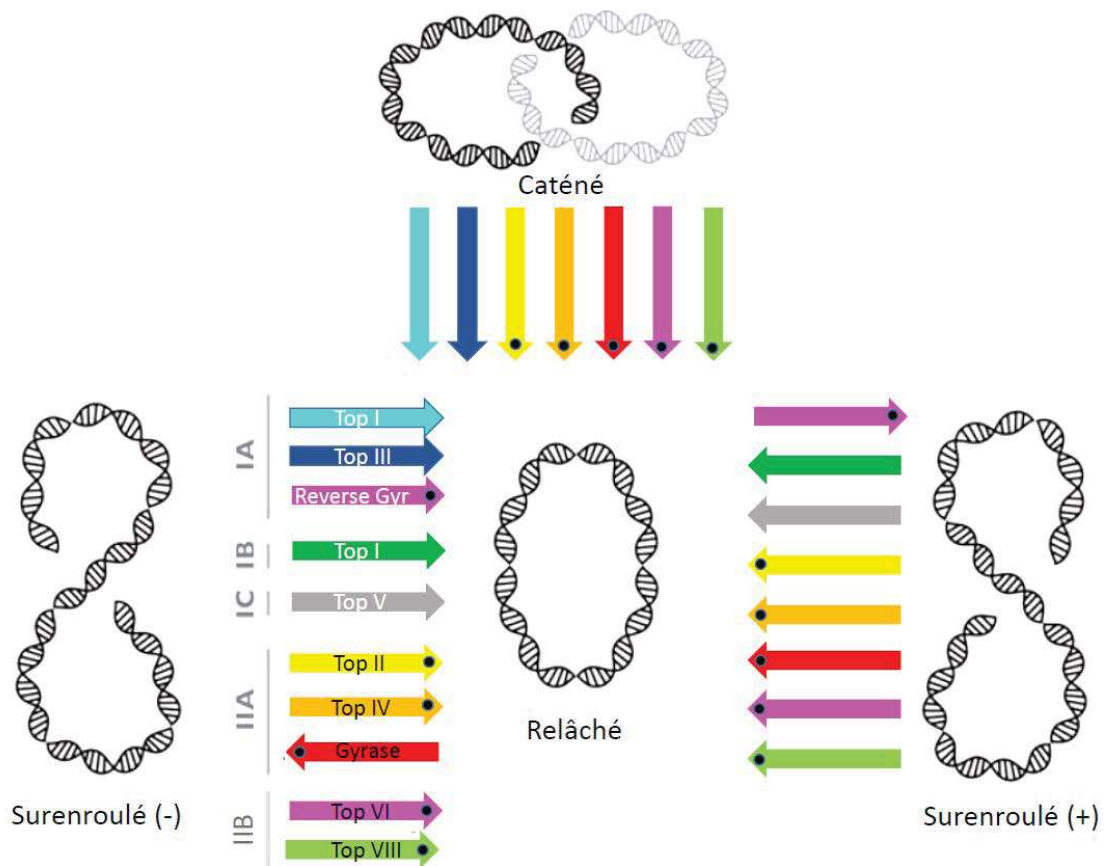


Figure 14 Activités des ADN topoisomérases. La base de la flèche désigne le substrat d'ADN et la pointe désigne le produit de la réaction. Le pont noir au centre de la pointe de certaines flèches indique que la réaction en question requiert l'hydrolyse de la molécule d'ATP (Adénosine triphosphate). Image adaptée de Shoefler, A.J., Berger, J. M.⁵⁵

Durant cette thèse je me suis consacré à l'étude de la structure et de la fonction des ADN topoisomérases de type 2A. En conséquence je ne discuterai que de cette classe d'enzyme dans la suite de cette thèse.

3.1. Les Topoisomérases de type 2A

Les Top2As réalisent des coupures double brin sur l'ADN⁵⁶. Contrairement aux Top1 qui réalisent des coupures de type simple brin. Ces enzymes conduisent un double brin d'ADN au travers d'un autre ADN double brin préalablement coupé. Ce mécanisme permet de modifier l'indice d'entrelacement Lk de 2. Les Top2As sont constituées d'un domaine de liaison de l'ADN, similaire à celui des Top1A, composé des sous-domaines WHD (Winged Helix Domain) et TOPRIM

(TOPoisomerase-PRImase). Cependant les topoisomérases de type 2 sont ATP-dépendantes et requièrent l'hydrolyse de deux molécules d'ATP pour compléter un cycle catalytique. Seules trois types de topoisomérases de type 2A ont été isolées : L'ADN topoisomérase de type 2 présente chez les eucaryotes (TopII) et présente sous deux isoformes α et β chez les mammifères, l'ADN gyrase (Gyrase) présente chez les procaryotes et les archées et la TopIV bactérienne (**Figure 15**).

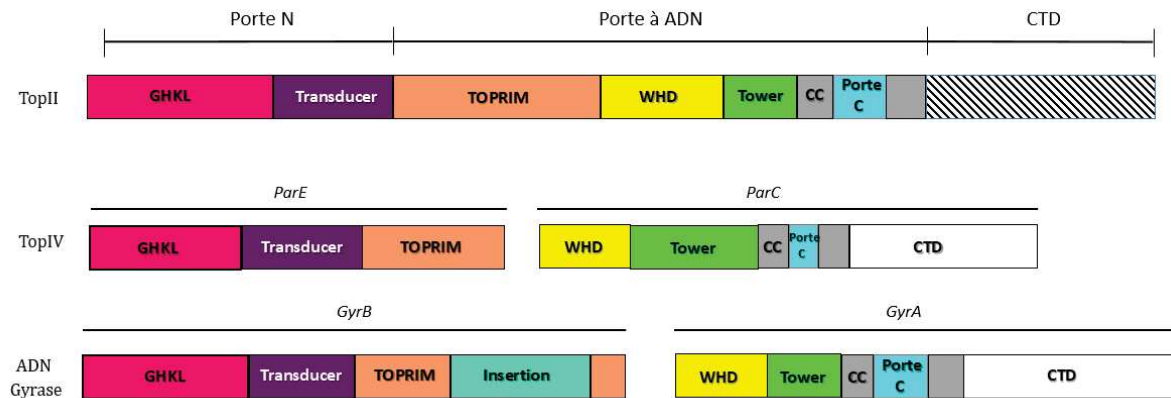


Figure 15 Illustration des domaines structuraux des topoisomérases appartenant au groupe Top2A.

3.2. Mécanisme réactionnel des Top2A

Les TopIIs eucaryotes sont des protéines homodimériques, composées de plusieurs domaines formant trois portes. Elles régulent la topologie de l'ADN par un mécanisme qui peut être divisé en plusieurs étapes. Tout d'abord la TopII se place sur un segment d'ADN double brin (segment G) puis elle s'associe à un second segment double brin (segment T)⁵⁷ et clive de façon transitoire par une réaction de transestérification le segment G. Cette réaction implique une tyrosine catalytique conservée chez les topoisomérases et localisée au sein du domaine de liaison de l'ADN. La porte N se referme par dimérisation des domaines après liaison de deux molécules d'ATP à l'enzyme⁵⁸. L'hydrolyse d'une des molécules d'ATP entraîne un réarrangement allostérique de la protéine, ce qui permet le passage du segment T à travers le brin coupé et sa sortie de l'enzyme⁵⁹ par la porte C. Le segment G est reliqué puis l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP permet une « réinitialisation » de la structure de l'enzyme pour débiter un nouveau cycle catalytique. En revanche il n'existe pas de résultats clairs concernant le passage du segment T au travers de l'enzyme. Kampranis et al. ont réalisé des études biochimiques sur l'ADN gyrase et proposent que le segment T passe au travers des 3 portes⁶⁰. Cependant une étude bio-informatique plus récente

suggère que le segment T ne passe pas par l'ouverture de la porte N mais traverse uniquement la porte à ADN et la porte C suggérant un mécanisme à 2 portes plutôt que 3 portes⁶¹ (**Figure 16**).

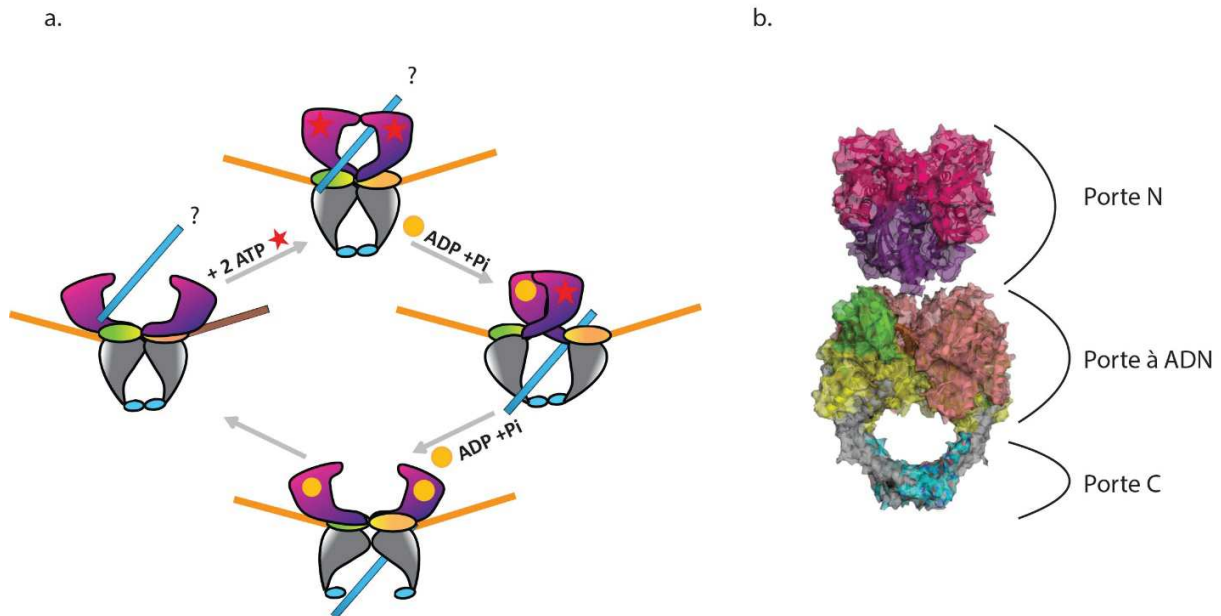


Figure 16 Mécanisme d'action générale des Top2As. (a) Schématisation du mécanisme d'action proposé par Kampranis et al⁶⁰, le segment G est représenté par la barre en orange, le segment T est représenté par la barre bleue, la porte N est colorée en violet, la porte à ADN est colorée en vert et jaune et la porte C est colorée en bleu. Les molécules d'ATP et d'ADP (Adénosine diphosphate) sont représentées respectivement par une étoile rouge et un cercle jaune. (b) Indication des différentes portes sur la structure de la TopII de levure *S.cerevisiae* (PDB ID : 4GFH).

3.3. Organisation structurale des TopII eucaryotes

3.3.1. Le corps catalytique

Les Topoisomérases de type 2A sont organisées en 3 interfaces appelées « portes » contenant les domaines GHKL (Gyrase ; Hsp90 ; histidine Kinase ; Mut L), Transducer, TOPRIM, WHD, Tower, Coiled-coil (**Figure 17**).

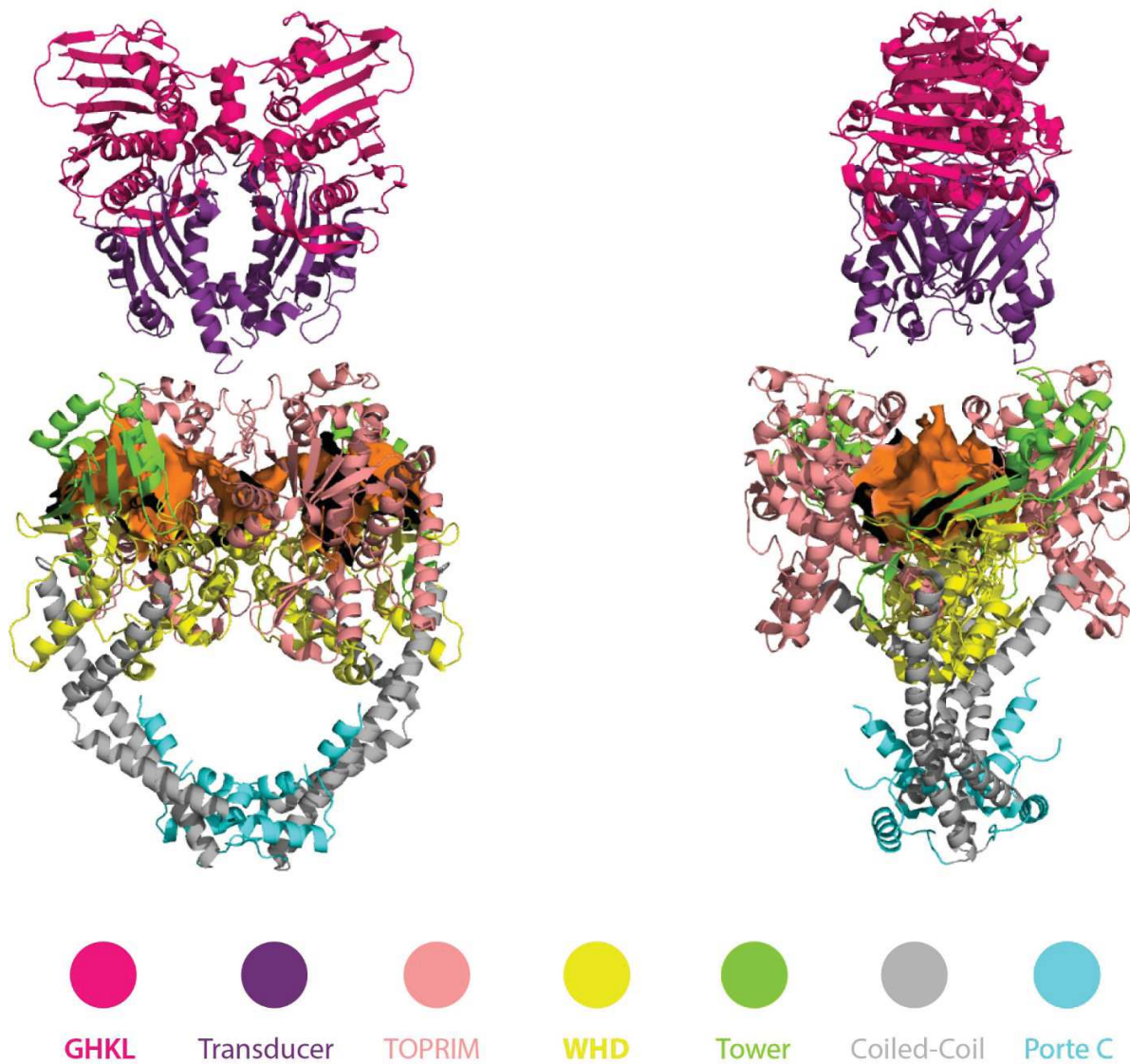


Figure 17 Arrangement tridimensionnel des domaines composant le corps catalytique des TopII (PDB IDs : 1ZXM et 5GWK). L'ADN (segment G) est représenté en surface orange.

La porte N

La porte N correspond au domaine ATPase dans lequel la réaction d'hydrolyse de l'ATP a lieu. Les sous-domaines qui le composent sont les sous-domaines GHKL et Transducer.

Le domaine GHKL contient une poche permettant la fixation de l'ATP et d'un ion Mg^{2+} . La molécule d'ATP est stabilisée par un réseau de résidus conservés et l'ion Mg^{2+} . Le phosphate labile

de la molécule d'ATP interagit avec un groupement carbonyle entre les résidus 162 et 163, et avec le groupement NH_3^+ de la lysine 378 (chez la TopII α) (**Figure 18a,b**). La conformation de la porte N en complexe avec l'ADP montre un mouvement du domaine GHKL qui se referme sur lui-même, favorisant l'ouverture du domaine Transducer⁶² (**Figure 18c**).

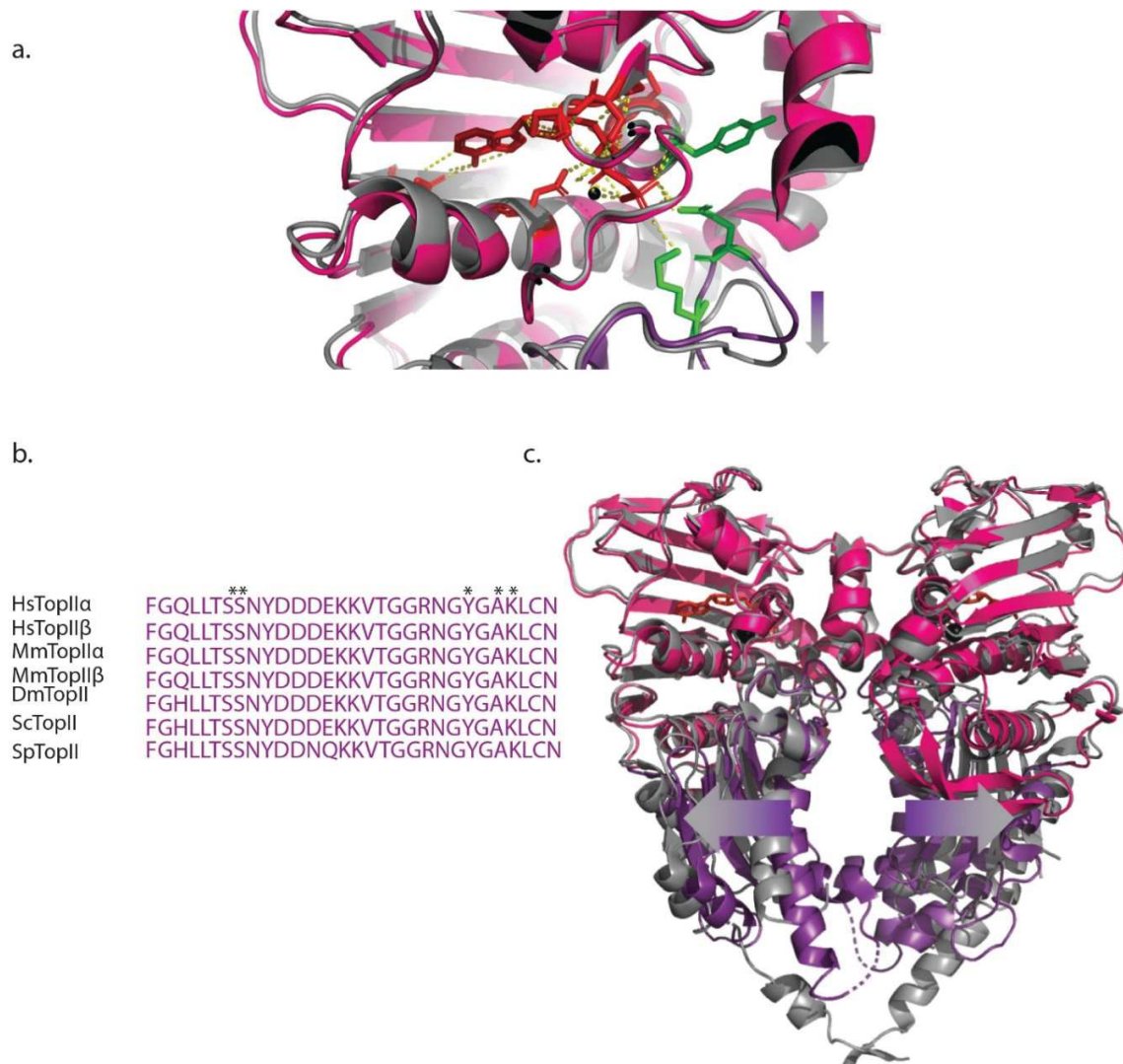


Figure 18 Superposition des structures de la porte N de la TopII α sous la conformation d'avant hydrolyse en rose et violet (PDBID : 1ZXN) et après hydrolyse de l'ATP en gris (PDB ID : 1ZXN). (a) La molécule d'APM-PNP en rouge et les résidus avec lesquelles elle interagit sont sous forme de sticks. Ces résidus sont de couleur verte s'ils stabilisent le phosphate labile de la molécule d'ATP et rouge s'ils stabilisent le reste de la molécule. La flèche représente le mouvement de la boucle flexible contenant le résidu 378 entre les deux structures (b) Alignement de séquence à proximité de la molécule d'ATP, les astérisques montrent les résidus en interaction avec l'ATP.(c.) Illustration des mouvements du domaine Transducer en dégradé violet à gris représenté par les flèches.

Le Transducer est le domaine qui fait le lien entre la porte N et les domaines participant à la coupure et au maintien de l'ADN double brin, qui constituent la porte à ADN. Au sein du Transducer se trouve le motif K-loop constitué de six lysines successives. La mutation de ce motif conservé au sein des TopII en alanine ou en acide glutamique impacte l'activité de la TopII de *S. cerevisiae* en diminuant la vitesse du cycle catalytique⁶³. Le Transducer semble important pour le transport du segment T⁶⁴. Il induit des mouvements allostériques de l'enzyme entière car sa délétion et/ou la mutation de certains résidus ont un impact important sur l'activité de coupure de l'ADN et d'hydrolyse de l'ATP^{65,66}. Malgré son importance il n'existe à l'heure actuelle aucune structure complète du Transducer permettant de comprendre comment ces domaines sont agencés les uns par rapport aux autres.

La porte à ADN

La porte à ADN est composée de 4 sous-domaines : TOPRIM, WHD, Tower, et Coiled-coil.

Le TOPRIM est un domaine conservé chez les protéines interagissant avec l'ADN comme les nucléases et les primases. Il contient un repliement « de Rossmann » ainsi qu'un site de fixation de l'ion Mg^{2+} important pour la réaction de transestérification. Cet ion est maintenu au sein de la protéine grâce au motif DXD⁶⁷.

Le domaine WHD contient le site de coupure de l'ADN incluant la tyrosine catalytique (Y805 chez la TopII α , Y821 chez la TopII β) ainsi qu'un domaine de stabilisation et d'ancrage de l'ADN, HTH⁶⁸.

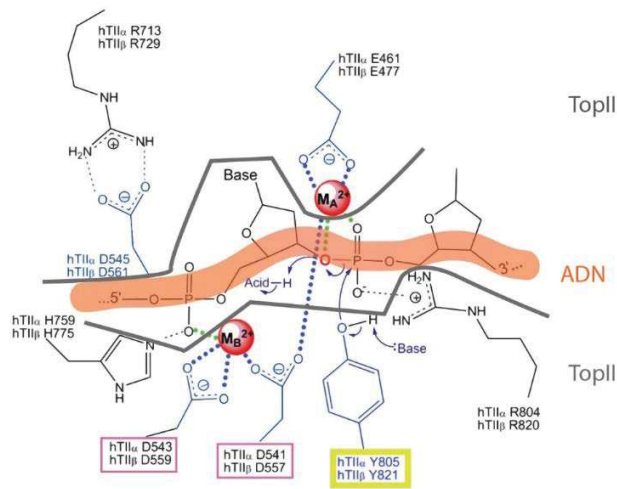


Figure 19 Illustration de la réaction de transestérification avec les résidus impliqués et les ions cofacteurs. La position que prend la molécule d'ADN est symbolisée par la ligne orange. La tyrosine catalytique des TopII humains est encadrée en jaune, les acides aspartiques du motif DXD sont encadrés en violet. Image adaptée de Deweese, J.E. ; Osheroff, N.⁶⁹

D'après les structures cristallographiques du domaine Tower en conformation ouverte et fermée, ce dernier semble contribuer à la stabilisation du segment G⁷⁰. Il favorise le repliement de cet ADN qui adopte une courbure de 150° par l'action d'une isoleucine conservée⁷¹ (I856 chez la TopII α , I872 chez la TopII β) (**Figure 19**).

Le domaine Coiled-coil est composé de trois longues hélices α qui font le lien entre la porte C, la porte à ADN et le domaine C-terminal. Le segment T passe le long de ces hélices pour sortir par la porte C. Après ouverture de cette porte, les hélices du domaine Coiled-Coil induisent un réarrangement de l'enzyme⁷².

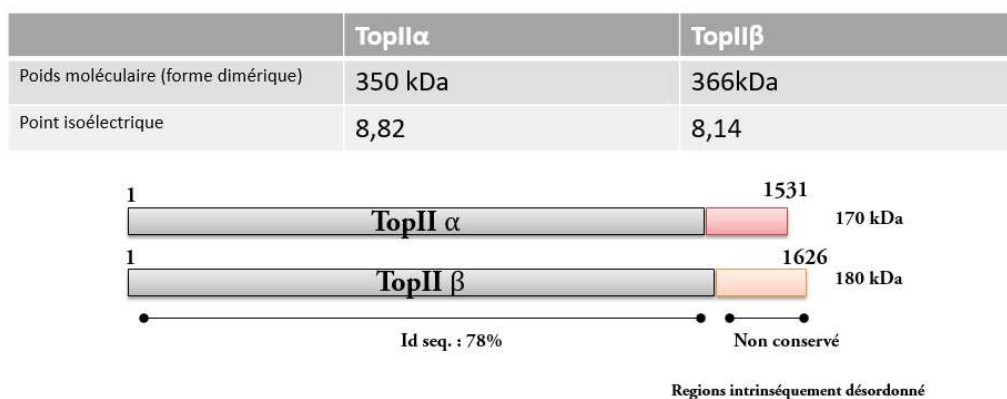
La porte C

Constituée d'un seul domaine, c'est par cette ouverture que le segment T peut sortir de l'enzyme. Laponogov et al. ont obtenu la structure cristallographique de la TopIV bactérienne en conformation ouverte. À l'aide de simulations informatiques et à partir d'autres structures cristallographiques, ils ont pu montrer que lorsque le segment T est au contact d'hélices du domaine Coiled-coil, cela enclenche l'ouverture de la porte C⁷³ (**Figure 16**). Cependant les résidus

impliqués ne sont pas connus et il n'existe aucune information permettant d'affirmer que ce mécanisme est conservé chez les TopII humaines.

3.3.2. Le domaine C-terminal des TopIIs humaines

Les deux isoformes de la TopII humaine sont identiques sur l'ensemble de leurs séquences, excepté pour le domaine C-terminal (CTD). Ces domaines font respectivement 37,6 kDa et 49 kDa pour l'isoforme α et β , leur point isoélectrique est de 9,5 et 6,0. À titre de comparaison les points isoélectriques des isoformes entières sont de 8,8 pour l'isoforme α et 8,1 pour son homologue (**Figure 20**). Dans les structures des domaines isolés des TopIIs humaines, disponibles dans la banque de données PDB, les domaines CTD sont absents. Ces derniers sont considérés comme intrinsèquement désordonnés selon les prédictions de structure secondaire, ce qui limite les approches structurales par cristallographie ou par Cryo-EM.



	CTDI α	CTDI β
Poids moléculaire (forme dimérique)	37,6 kDa	49 kDa
Point isoélectrique	9,54	6,00

Figure 20 Paramètres physico-chimiques des Topoisomérases humaines et de leurs domaines C-terminaux respectifs. Le rôle de ces domaines est encore mal connu. Pourtant plusieurs études ont montré leurs influences sur l'interaction entre les TopIIs et l'ADN⁷⁴ ainsi que sur les activités catalytiques des enzymes^{75,76}.

L'activité catalytique de la TopII α est stimulée par l'absence du domaine C-terminal. De plus ces domaines semblent contribuer à la spécificité de l'enzyme pour les surenroulements positifs et négatifs⁷⁷. En effet la TopII α préfère relâcher un ADN surenroulé positivement tandis que la TopII β n'a pas de préférence entre les surenroulements positifs ou négatifs⁷⁸. Ces domaines expliquent la différence d'activité entre les TopIIs humaines. Le CTD de l'isoforme β agit comme un régulateur négatif de l'activité en présence d'ADN, contrairement à son homologue⁷⁹. Une autre étude a montré qu'une protéine chimérique TopII α + CTD β se comporte comme l'isoforme β *in vivo* et *in vitro*^{77,80}. Enfin ces domaines sont aussi des plateformes de recrutement de partenaires protéiques et elles sont modulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTMs)⁵.

De nombreuses questions sur la régulation et le rôle précis de ces domaines restent en suspens. Il n'existe pas à ce jour de données structurales montrant l'organisation spatiale de ces domaines par rapport au corps catalytique de l'enzyme durant les étapes du cycle catalytique.

3.4. Diversité des domaines C-terminaux des Top2As

D'un point de vue structural, la différence majeure entre les Top2As réside dans leur domaine CTDs. En effet bien que le CTD des TopIIs eucaryotes est prédit comme intrinsèquement désordonnée et qu'aucune structure n'est disponible à ce jour, ce n'est pas le cas pour la TopIV et la Gyrase (**Figure 21**). Le CTD de l'ADN gyrase a une structure en spirale qualifiée de « β -pinwheel », constitué de 6 unités appelées « lames » composées essentiellement de feuillet β anti-parallèle. Bien que cette constitution ne soit pas strictement identique entre les espèces⁸¹ le CTD est important dans les activités effectuées par la Gyrase. La présence du CTD est importante pour la régulation de la topologie de l'ADN car sa délétion diminue drastiquement l'action de la Gyrase^{82,83}. La structure de l'ADN gyrase de *Thermus thermophilus* obtenue dans l'équipe en complexe avec de l'ADN a révélé que le segment G se lie aux domaines CTDs, permettant ainsi de le stabiliser et de réaliser la réaction de surenroulement propre à la Gyrase⁸. La structure du CTD de la TopIV est une variante de celle de l'ADN gyrase. En effet elle est constituée de 5 lames et ne possède pas comme son homologue de motif GyrA-box⁸⁴ qui est crucial pour l'activité de la Gyrase⁸⁵. La TopIV a tout comme la TopII α une préférence pour résoudre les surenroulements positifs. Le CTD de l'isoforme α , tronqué de son CTD à une activité différente ne pouvant plus

distinguer les surenroulements positifs et négatifs⁷⁸. Cette observation est similaire pour la TopIV. La délétion des CTDs sur la TopIV réduit sa capacité d'interaction avec l'ADN, inhibant ainsi les réaction de relâchement et de décaténation⁸⁴. Ces différents domaines C-terminaux conduisent à des activités différentes entre les topoisomérases de type 2A (**Figure 22**).

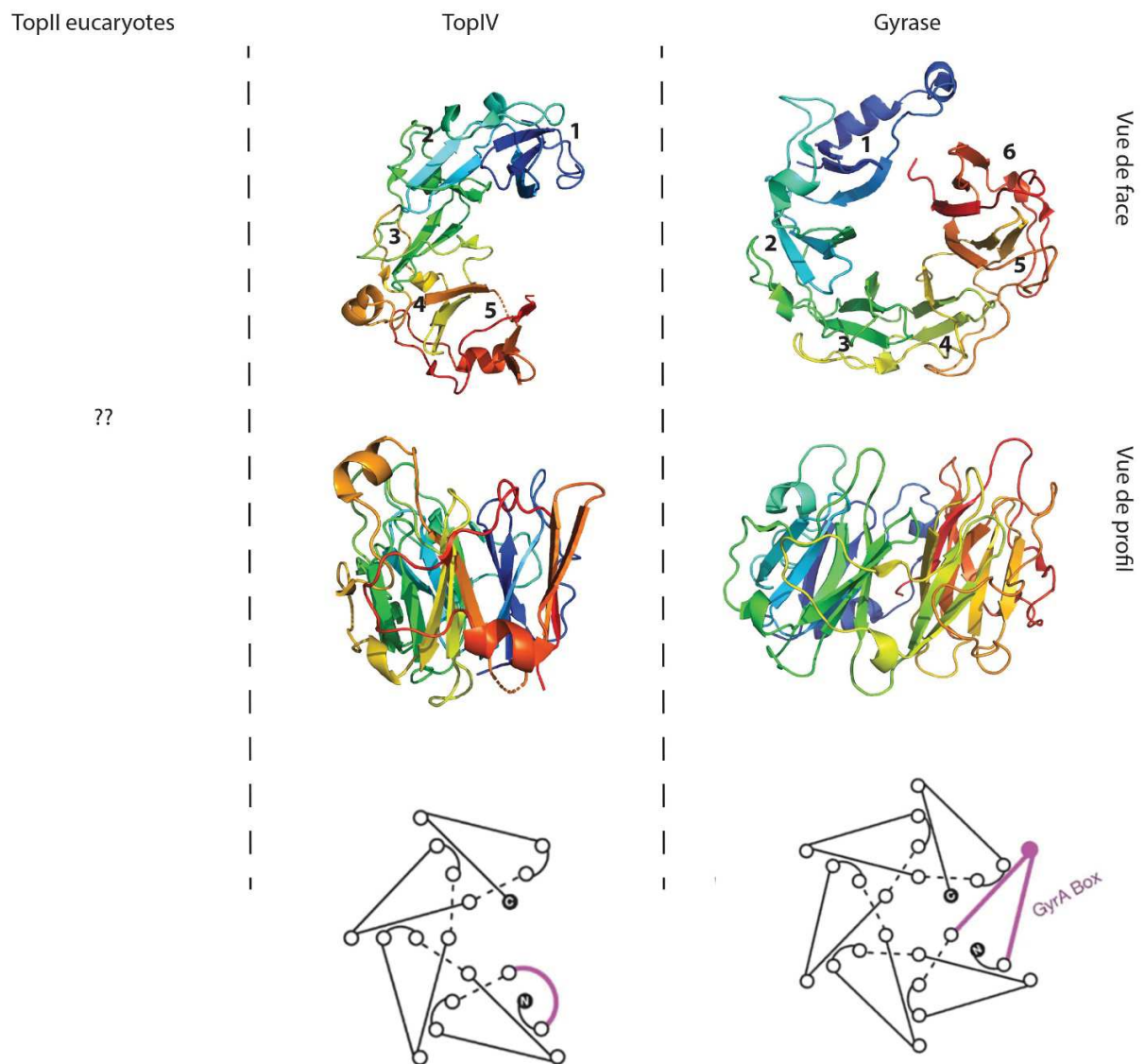


Figure 21 Structures des domaines C-terminaux des TopII eucaryotes, de la TopIV (PDBID : 1ZVT) et de la Gyrase (PDB ID : 1ZIO). Les représentations structurales du haut et du milieu sont les structures cristallographiques de ces domaines en vue de face et de profil respectivement. Les illustrations du bas schématisent la disposition des « lames » pour la TopIV et la gyrase. Aucune information structurale n'est pour le moment disponible concernant le CTD des TopII eucaryotes.

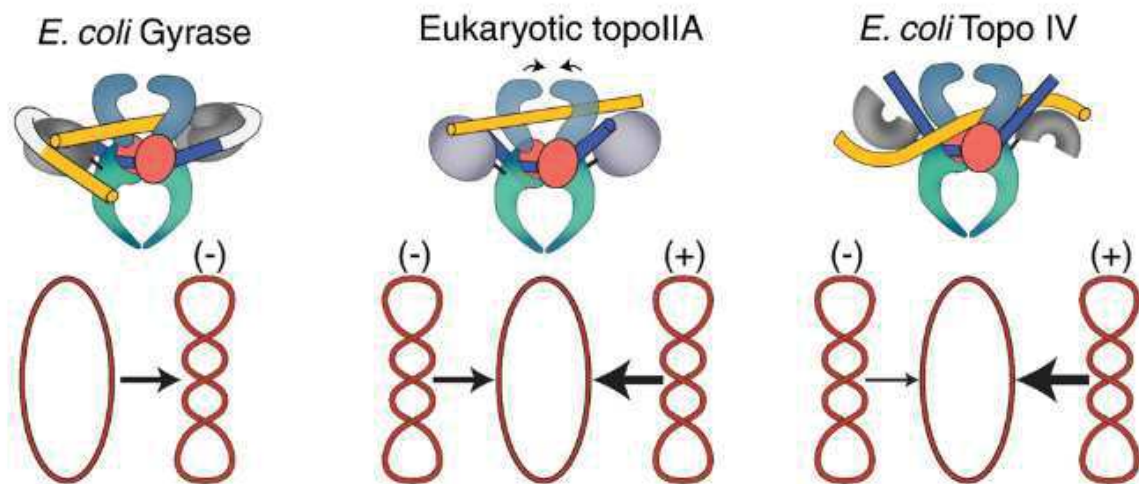


Figure 22 Activité des Top2As. Les illustrations du haut montrent le repliement de l'ADN au contact de chaque Top2A. Les illustrations du bas récapitulent les activités des Top2As. **Figure** issue de Neuman, K.C. ⁸⁶

3.5. Topoisomérase IV

La TopIV bactérienne est la décaténase de la bactérie^{87,88}. C'est un hétérotétramère constitué des deux sous-unités ParE (70,2 kDa) et ParC (83,2 kDa) (**Figure 23**). Une délétion des gènes codant pour la TopIV dans des bactéries conduit à une activité de décaténation 100 fois inférieure à la normale⁸⁹. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la TopIV, la Gyrase et la TopI bactérienne interviennent conjointement afin de défaire les nœuds qui apparaissent lors de l'avancé de la fourche de réplication⁹⁰ et assurent le maintien du taux de surenroulement⁹¹. Afin de s'adapter à la surexpression ou l'inhibition d'expression des sous-unités de la TopIV, le taux d'expression des sous-unités de la Gyrase est inversement régulé⁸⁷.

La TopIV est capable bien que ce ne soit pas son rôle premier, de relâcher l'ADN. La TopIV montre une préférence pour le relâchement de surenroulements positifs avec une constante de dissociation (K_D) de 0,15 nM et un K_D de 0,23 nM pour le surenroulement négatif^{87,92,93}. Cette préférence peut être expliquée par l'angle avec lequel la TopIV se positionne sur le brin d'ADN, qui est de 85°, soit 5° de différence par rapport à l'angle de 90° de la TopII eucaryote avec l'ADN⁹³. Enfin la TopIV se distingue de la TopIII, qui est aussi capable de décaténer l'ADN, par le niveau d'énergie requis pour ce mécanisme⁹⁴.

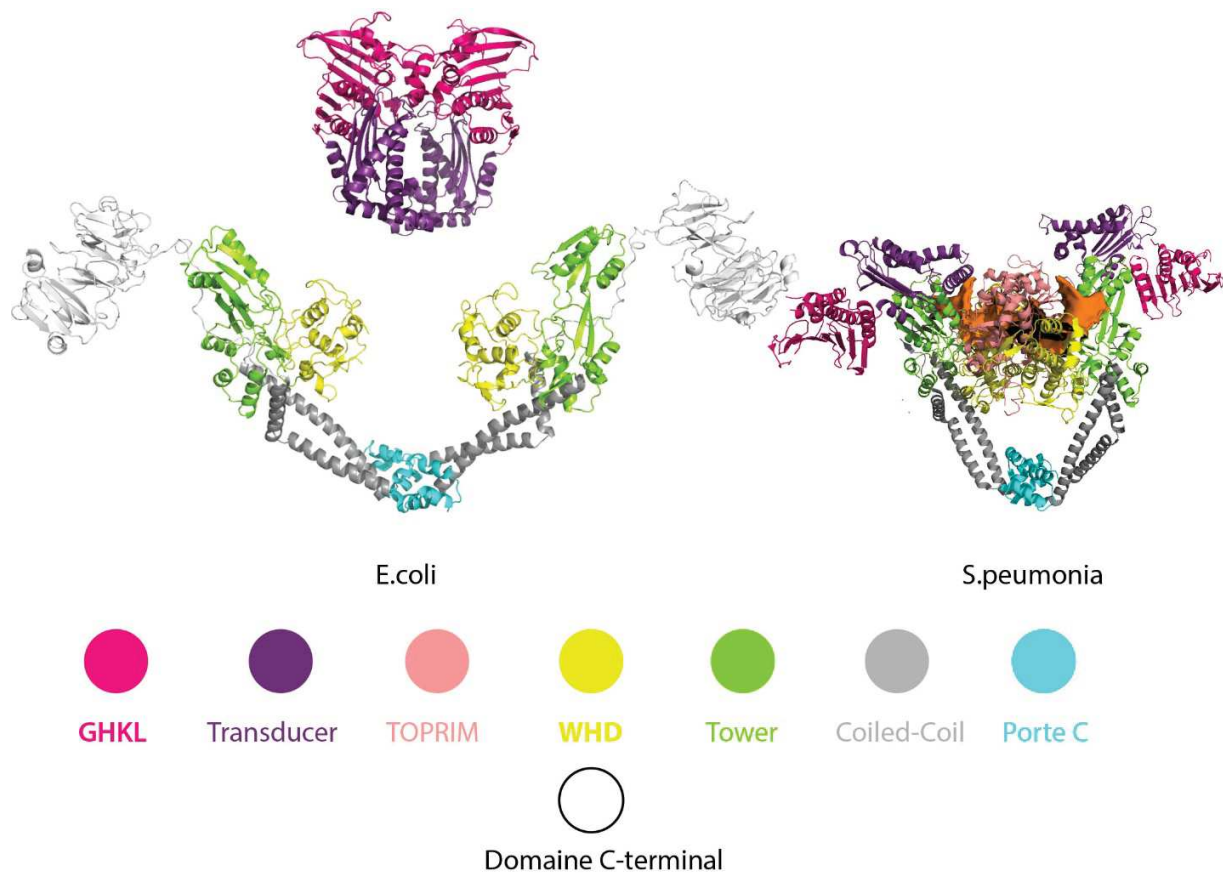


Figure 23 Structure cristallographique de la TopIV de *E.coli* (PDB ID : 1S16 et 1ZVU) et de *S. pneumoniae* (PDB ID : 4I3H).

3.6. ADN gyrase

L'ADN gyrase est la seule topoisomérase connue à ce jour pouvant introduire des supertours négatifs dans un ADN relâché⁹⁵. C'est une topoisomérase bactérienne de type 2A qui forme un hétérotétramère constitué des sous-unités GyrA (96,6 kDa) et GyrB (90 kDa) qui sont homologues aux sous-unités ParE et ParC de la TopIV⁸⁷ (**Figure 15**). La GyrB est constitué d'un domaine ATPase et d'un domaine TOPRIM qui interagit avec l'ADN et GyrA. Au sein de ce domaine TOPRIM se trouve un domaine d'insertion propre à l'ADN Gyrase d'*E. coli*, qui est important pour la coupure du segment G et qui favorise l'ouverture du domaine GyrA en se liant au domaine Coiled-Coil⁹⁶ (**Figure 25**). La sous-unité GyrA contient le domaine de coupure de l'ADN WHD et les domaines Coiled-coil et Tower. Son domaine C-terminal de 35 kDa adopte une structure en

forme de rosace. La première structure de la gyrase entière déterminée en 2013 par cryo microscopie électronique⁸ a révélé le trajet suivi l'ADN autour de l'enzyme (**Figure 24**).

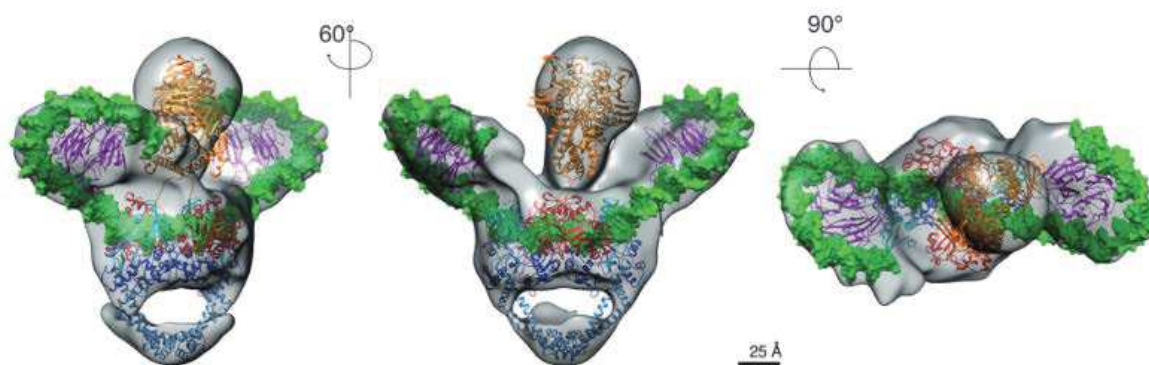


Figure 24 Modèle obtenu par Cryo microscopie électronique du complexe Gyrase-ADN de *T. thermophilus*. La molécule d'ADN colorée en vert est enroulée autour des CTDs en violet et la coupure est réalisée dans le domaine de liaison de l'ADN en rouge. **Figure** issue de Papillon, J. et al.⁸

Chez *E. coli* cette roue est constituée de six lames β -pinwheel, autour desquelles le double brin d'ADN coupé s'enroule, cette structure est indispensable au mécanisme de surenroulement. C'est dans cette structure que réside la principale différence entre la Gyrase et la Top IV dont le CTD ne contient que cinq lames dégénérées⁸¹. Une Gyrase tronquée, sans son CTD, présente une activité similaire à celle d'une TopII eucaryote et ne peut plus surenrouler l'ADN⁸³.

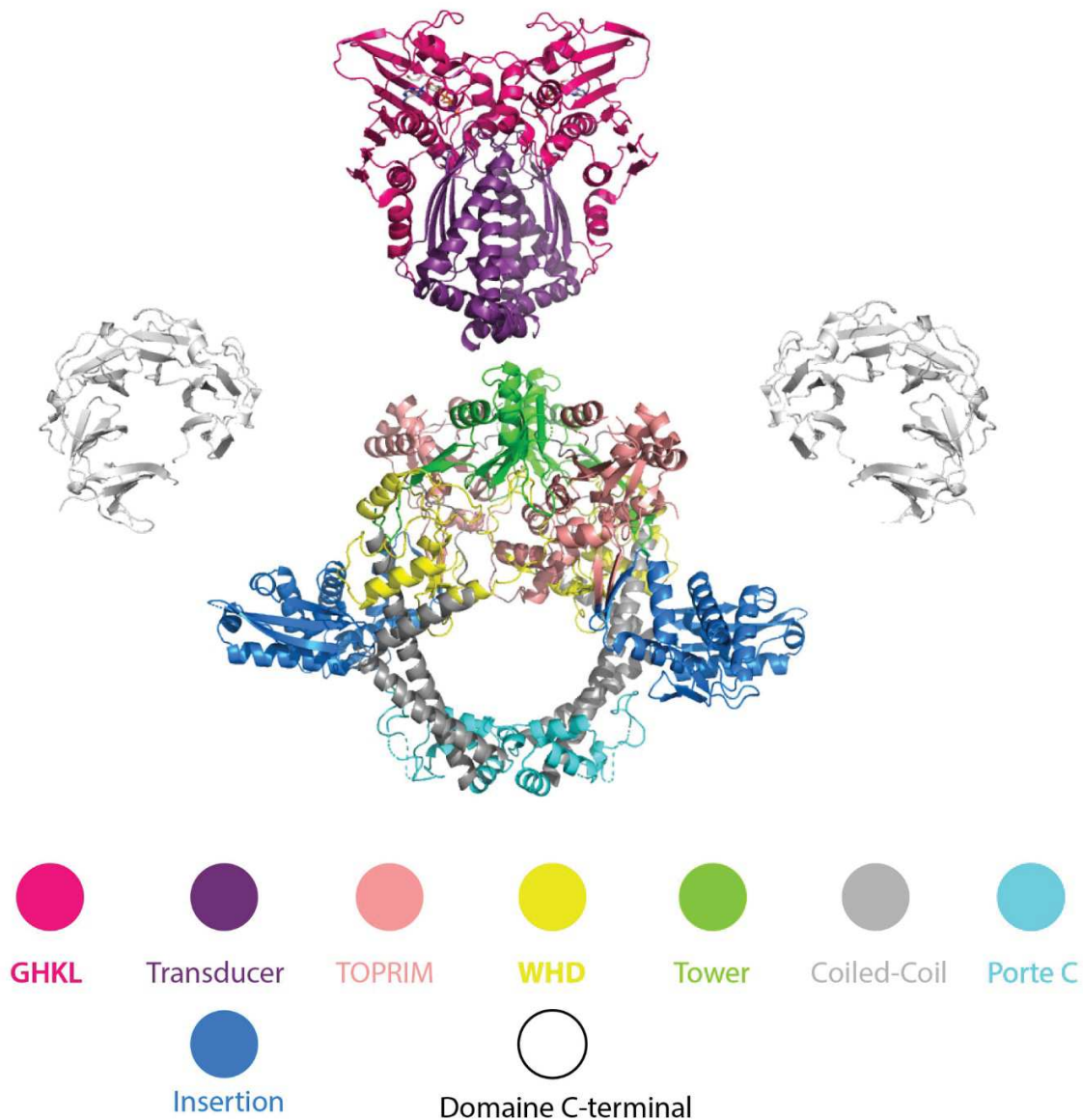


Figure 25 Structure cristallographique de la Gyrase de *E.coli* (PDB ID : 1ZIO, 1EI1, 3NUH).

3.7. Action de la topoisomérase de type II α durant le cycle cellulaire

Pendant le cycle cellulaire la molécule d'ADN subit de nombreux changements (**Figure 26**). Les topoisomérases, en tant qu'agents régulateurs de la topologie de l'ADN, occupent donc une place déterminante durant ce cycle. La régulation de l'expression de la TopII α au cours du cycle cellulaire en fait un biomarqueur de prolifération, puisqu'une hausse de l'expression protéique est observée

lors de la transition G2/M⁹⁷⁻⁹⁹. La TopII α intervient lors de la phase finale du processus de réplication de l'ADN au stade G1/S. Elle agit plus particulièrement sur les régions télomériques où les anomalies dues aux répétitions de séquence sont les plus fréquentes¹⁰⁰. Durant de la transition G2/M, l'ADN commence à se condenser pour prendre l'apparence de chromosomes lors de la métaphase. Lors de cette étape clé, l'expression de la TopII α augmente et est notamment assurée par la régulation de son ARN messenger via la séquence 3'UTR¹⁰¹ et par l'expression de la deubiquitinase USP15 qui empêche une dégradation précoce de l'enzyme, dont l'expression protéique coïncide avec celle de la TopII α ^{102,103}. À ce stade du cycle, la TopII α résout les précatenanes engendrés par l'avancement de la fourche de réplication. Cependant la topologie des régions correspondant aux futurs télomères et aux centromères chromosomiques ainsi que les zones d'ADN ribosomique, reste sous forme de caténane jusqu'à l'anaphase¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Les principales protéines qui orchestrent la condensation de l'ADN en chromosome sont les complexes condensine pendant la prophase puis cohésine pendant la métaphase. La TopII α seule permet une compaction limitée de l'ADN lors de la métaphase, la condensine seule ne permet pas non plus d'atteindre la compaction obtenue lorsque la TopII α et la condensine travaillent de concert^{108,109}. La compaction de l'ADN par la condensine génère des supertours positifs, substrats préférentiels de la TopII α , contrairement à la TopII β qui n'a pas de préférence en ce qui concerne la topologie de l'ADN^{110,111}. Lorsque les chromatides sœurs sont formées, la cohésine rassemble les deux brins chromosomiques pour former un chromosome pendant la métaphase. Le complexe cohésine protège les chromosomes contre des coupures excessives de l'ADN engendrées par la TopII α ¹¹². Lors de l'entrée en métaphase les chromosomes sont prêts à être séparés et à entrer en anaphase, la cohésine est dégradée par l'enzyme séparase¹¹³.

Les PTMs de la TopII α , notamment sa phosphorylation et sa SUMOylation permettent à la TopII α de se concentrer au niveau des centromères¹¹⁴⁻¹¹⁶. Quand a lieu la ségrégation des chromosomes, la TopII α réalise des réactions de décaténation en chaîne. Elle joue un rôle de garde-fous et permet une bonne séparation des brins chromosomiques durant l'anaphase¹¹⁷. L'inactivation de la TopII α n'empêche pas le cycle cellulaire d'entamer l'étape de l'anaphase, néanmoins des ponts anaphasiques font leur apparition ce qui entraîne une aneuploïdie cellulaire, une anomalie favorisant l'apparition de cancers¹¹⁸. À la fin du cycle cellulaire la TopII α est ubiquitinée ce qui conduit à sa dégradation progressive¹¹⁹. Cependant avec la quantité restante il a été montré que

chez *Xenopus* que la TopII α induit la dissociation des complexes de reconnaissance de l'origine de réplication afin de prévenir une entrée en phase S précoce¹²⁰.

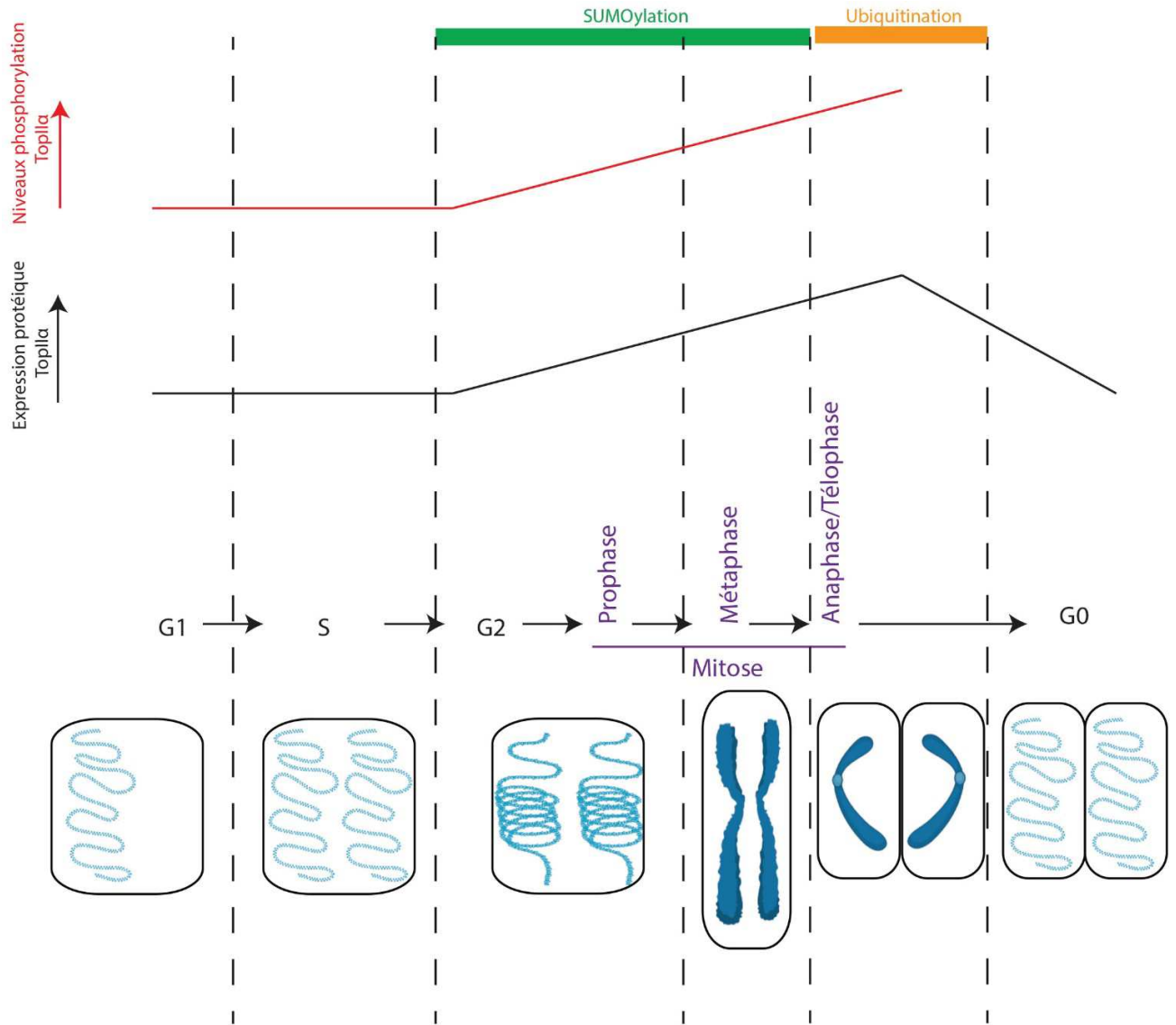


Figure 26 Évolution des PTMs et du niveau protéique de la TopII α durant le cycle cellulaire. L'évolution du niveau de phosphorylation est représentée avec le graphique rouge. La présence de modification du type SUMOylation et ubiquitinylation est représenté par les barres vertes et orange. Les illustrations en dessous du cycle cellulaire représentent la quantité et la condensation de l'ADN à chaque étape du cycle. Figure inspirée de Lee, J. H. ; Berger, J. M.¹¹⁹

3.8. Implication des topoisomérases de type II humaines dans la différenciation cellulaire et dans l'organisation de la chromatine

La TopII β , contrairement à son homologue α , n'est pas indispensable au bon déroulement de la division cellulaire¹¹⁹. Néanmoins, elle est importante pour la régulation de la transcription. Alors que l'isoforme α est majoritairement exprimée dans les cellules souches, la TopII β est exprimée dans les cellules différenciées et son expression n'est pas dépendante du cycle cellulaire¹²¹. Le rôle le plus connu de cette isoforme réside dans son implication dans le développement neuronal. Les souris dont la transcription du gène TOP2B est inactivée meurent peu après la naissance suite à une insuffisance respiratoire⁴. Des tests d'immunocoloration ont montré un défaut de croissance des axones moteurs et une malformation des synapses au niveau des muscles. Par ailleurs, les axones sensoriels ne sont pas en contact avec la moelle épinière¹²². Une coloration du mRNA de la TopII β sur des coupes de cerveau d'embryon montre que les neurones dans lesquelles la TopII β est le plus exprimée sont les neurones du cortex cérébral, contrairement à la TopII α qui est exprimée dans les neurones ventriculaires et les cellules souches neurales¹²³⁻¹²⁵ (**Figure 27a**). L'expression génique spatiale et temporelle des deux isoformes durant la genèse du cortex confirme cette observation (**Figure 27b**). En comparant le profil de transcription de neurones issus du cortex d'une souris sauvage à celui de neurones d'une souris n'exprimant pas la TopII β , on constate que seuls 1 à 4 % des gènes sont affectés par la présence ou l'absence de la TopII β . Parmi eux, 30 % des gènes sont impliqués dans l'expansion des neurofilaments, ou la formation des liaisons synaptiques¹²⁶. Ces gènes sont particulièrement longs, plus de 100 kb, ils sont classés dans la catégorie des « longs gènes »^{3,127,128}.

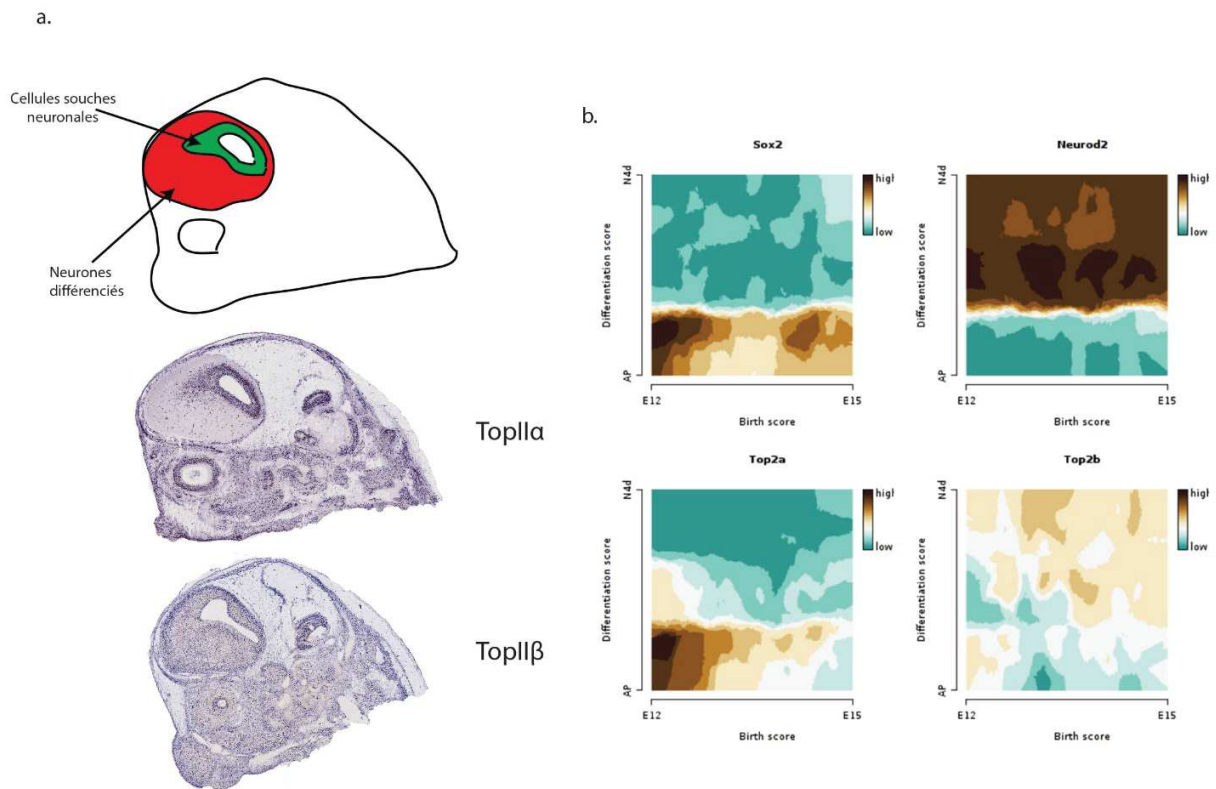


Figure 27 Différences d'expression entre la TopII α et la TopII β durant le développement neuronal. (a) Coloration du mRNA de la TopII α et de la TopII β sur des coupes de souris au stade embryonnaire E14.5. L'expression de la TopII α est importante dans les cellules souches neuronales, représentée par la zone verte sur le schéma, tandis que la TopII β est exprimée dans les neurones différenciés, zone colorée en rouge sur le schéma. Photographies obtenues à partir de la base de données GenePaint¹²⁹. (b) Expression génique spatial et temporel des TopII α et β au cours de la genèse du cortex chez les souris. Les contrôles Sox2 et Neurod2 sont des marqueurs de forte expression dans respectivement les cellules neuronales non différenciées et différenciées en début et fin de développement du cortex. Graphiques issus de la base de données Gene browser telagirton¹³⁰.

Des analyses de Chip-Seq réalisées à partir de cellules de foie de souris montrent une co-localisation de la TopII β et de la protéine CTCF à la base des boucles flexibles de la chromatine¹²⁷ (**Figure 28**). La protéine CTCF est indispensable au recrutement du complexe cohésine qui permet la transcription des gènes durant l'interphase, en se regroupant autour des domaines TADs¹³¹. Un modèle obtenu par simulation informatique montre que la TopII β intervient à l'extrémité des domaines TADs, à cette localisation des stress topologiques engendrés par le mouvement du complexe cohésine qui réarrange l'architecture des domaines TADs apparaissent¹³². D'autre part, la TopII β réalise des coupures doubles brin à la base des domaines TADs induisant une conformation d'ADN favorable à l'initiation de la transcription ou de la réplication de l'ADN¹³³⁻¹³⁵. Ainsi la TopII β joue un rôle important dans la transcription, plus précisément dans le remaniement de la topologie de portions d'ADN de plus de 100 kb.

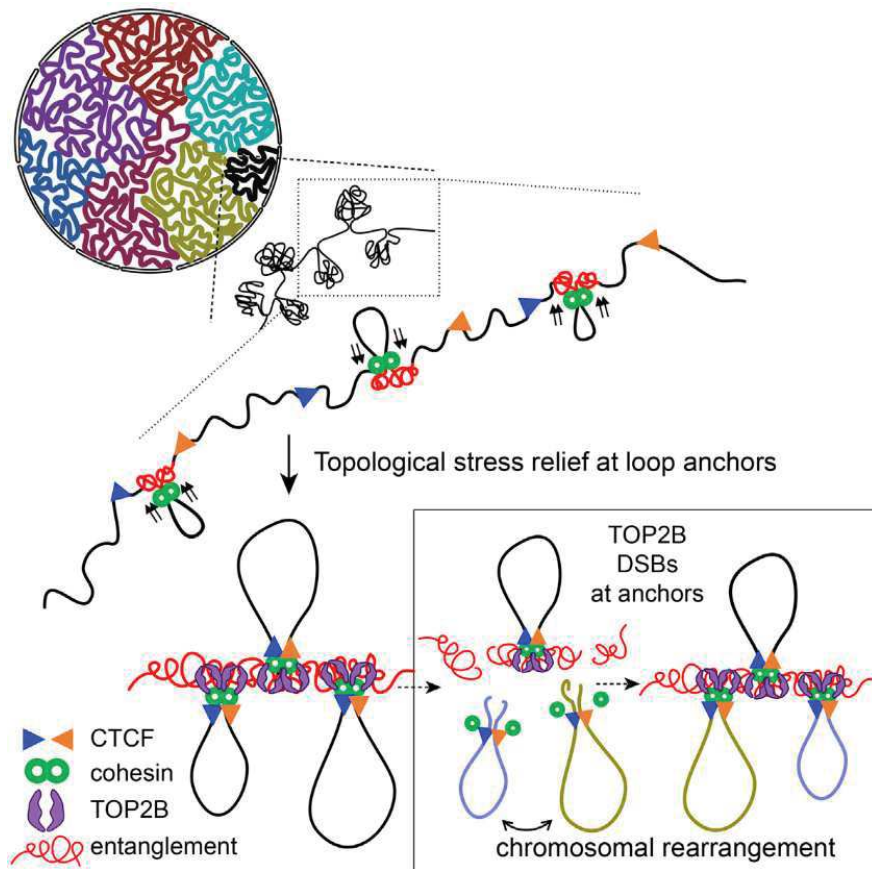


Figure 28 Schéma représentant la localisation de la TopIIβ et la protéine de reconnaissance CTCF au sein des domaines TADs. **Figure** issue de Canela, A. et al.¹³⁶

Les ADN topoisomérases sont donc impliquées dans de nombreux mécanismes régulant la vie cellulaire et la dérégulation de l'activité de ces protéines affecte profondément le bon fonctionnement de la cellule. De par leur proximité avec la molécule d'ADN, ces enzymes ont été identifiées comme cibles de molécules thérapeutiques¹³⁷. La première d'entre elles fut l'ADN gyrase en 1976⁵². L'inhibition de la Gyrase par des composés antibiotiques a rendu les traitements dans lesquelles ces molécules sont administrées très efficaces. Rapidement les topoisomérases humaines ont été identifiées comme cibles de molécules anticancéreuses qui déstabilisent la molécule d'ADN¹³⁸. Nous présentons ces différentes molécules et leurs modes d'actions dans les paragraphes suivants.

4. Les Molécules thérapeutiques anti-topoisomérase de type 2A

L'inhibition des ADN topoisomérases de type 2 par des adjuvants chimiques peut être catégorisée en deux classes (**Figure 29**):

- Les Topoisomérases « poisons » : Le mécanisme d'action de ces molécules se base sur la proximité des topoisomérases avec l'ADN en stabilisant le complexe ADN-topoisomérase au moment du clivage de l'ADN (Top2cc). L'accumulation de ces coupures dans le génome engendre une déstabilisation cellulaire qui conduit à la mort de la cellule.
- Les inhibiteurs catalytiques : Cette classe de molécule inhibe l'activité catalytique des Top2 en empêchant l'hydrolyse de l'ATP ou sa fixation dans l'enzyme.

Nous ne parlerons dans cette partie que des molécules les plus utilisés contre les Top2s dans les traitements actuels.

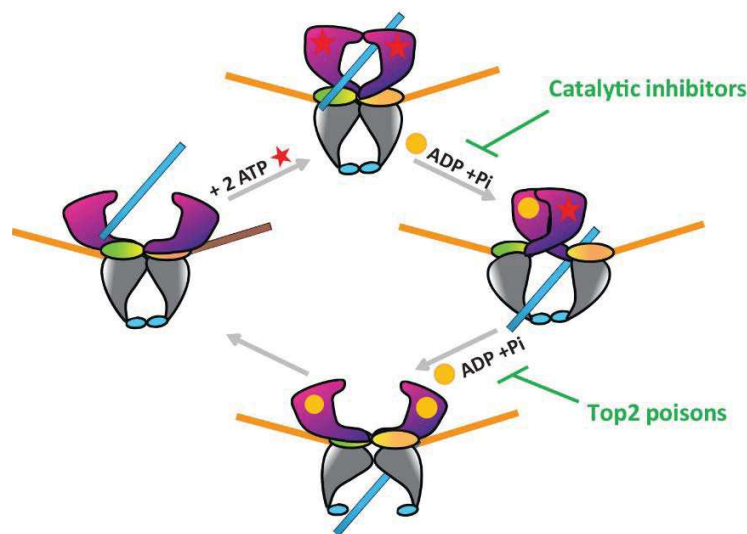


Figure 29 Les molécules anti-Top2 interviennent à différentes étapes du cycle catalytique suivant leur classe.

4.1. Les molécules « poisons »

Les premières molécules entraînant une inhibition de l'activité des TopII humains à avoir été identifiées sont les agents intercalants de l'ADN, plus particulièrement les composés de la famille des anthracyclines (**Figure 30**) produit de façon naturelle chez les Streptomyces. Parmi les molécules appartenant à cette famille, la doxorubicine (adriamycine) issue de la daunorubicine est

une molécule très utilisée dans les thérapies anti-cancéreuses¹³⁹. Cette molécule s'intercale de préférence dans les régions de l'ADN riches en base A/T. Cette molécule conduit à l'arrêt de la prolifération cellulaire, notamment au stade G2/M¹⁴⁰. Cependant, son administration doit être limitée à cause de son principal effet secondaire, sa cardiotoxicité¹⁴¹.

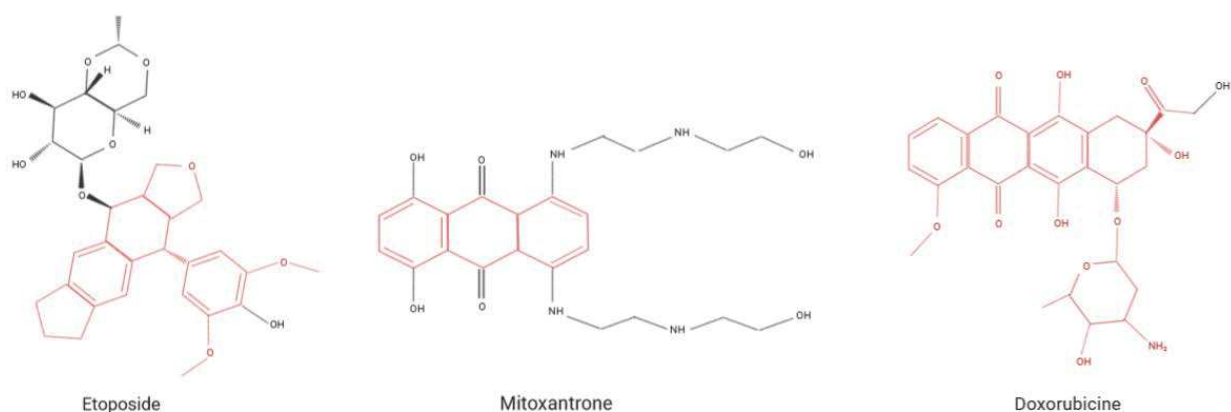


Figure 30 Structure chimique de l'étoposide, de la mitoxantrone et de la doxorubicine : des molécules "poisons". Les structures colorées en rouge, représente les atomes importants pour l'intercalation dans l'ADN.

La mitoxantrone appartient au groupe des anthracènes et est produit de façon exclusivement synthétique (**Figure 30 et 31**). Elle fait partie des traitements de première ligne chez les patients atteints de leucémies pédiatriques et adultes, ainsi qu'en deuxième ligne dans les cancers du poumon et de la prostate¹⁴². La structure de ce composé est similaire à celles des composés anthracycliques, cependant la mitoxantrone ne possède pas de groupement chimique appartenant à la famille des sucres, sa toxicité est moindre comparée aux autres composés de la famille des anthracènes^{143,144}. Néanmoins, une étude récente réalisée sur une cohorte de 49 patients souffrant de sclérose multiple, a mis en lumière que ce composé comporte des risques cardiaques¹⁴⁵. De plus des études menées sur des rats montrent que la mitoxantrone peut présenter des risques pour le foie¹⁴⁶.

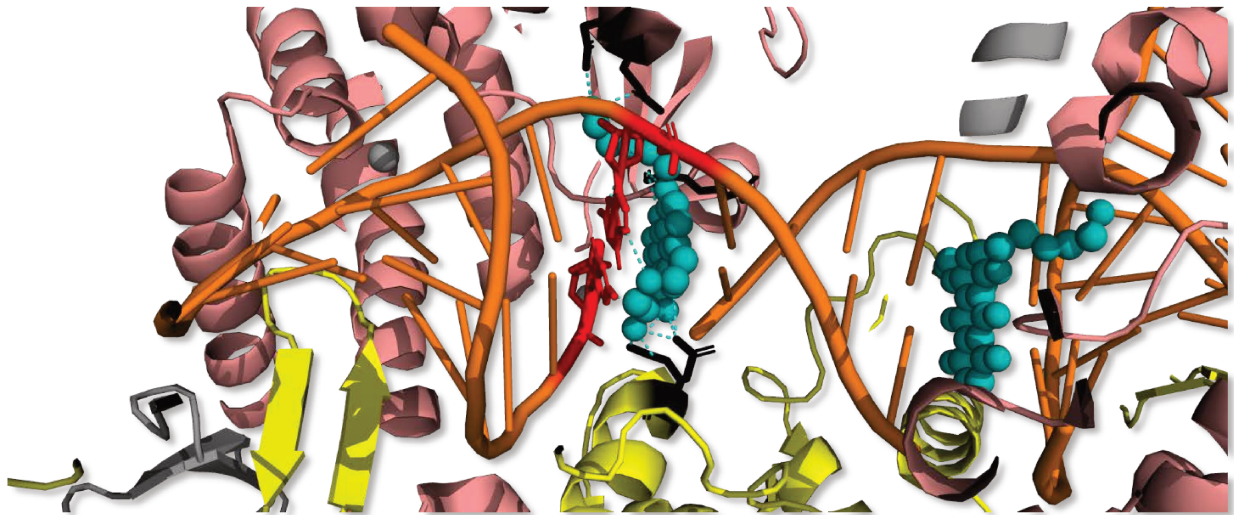


Figure 31 Intercalation de deux molécules de mitoxantrone, représentées par des sphères au sein de l'ADN stabilisant le complexe de clivage Top2cc (PDB ID : 4G0V). L'ADN est coloré en orange et les bases azotées en interaction avec la mitoxantrone sont colorées en rouge.

Dérivé de la podophyllotoxine, l'étoposide (VP-16, Vepesid) est un « poison » le plus connu pour les topoisomérases de classe 2A (**Figure 29**). Cette molécule est utilisée afin de traiter de nombreuses formes de cancer. L'étoposide génère de nombreuses coupures double brins, bien plus que les autres intercalant de la famille des Topoisomérases « poisons » anti-Top2^{147,148}.

Les structures cristallographiques des domaines de liaison à l'ADN des TopII α et β en complexe avec l'étoposide ont permis de comprendre le mécanisme de stabilisation des complexes Top2cc qui est similaire avec la mitoxantrone. Le noyau aglycone tétracyclique de deux molécules d'étoposide s'intercale entre les paires de bases du double brin clivé. Cette intercalation est rendue possible par l'ouverture générée dans la double hélice d'ADN par les TopII^{149,150}. D'un point de vue stœchiométrique, deux molécules d'étoposide interagissent avec une TopII, elles sont positionnées au niveau des paires de base +1/-4 et +1/-5 (**Figure 32**). L'interaction directe avec la TopII rend ce composé plus spécifique que les autres intercalants.

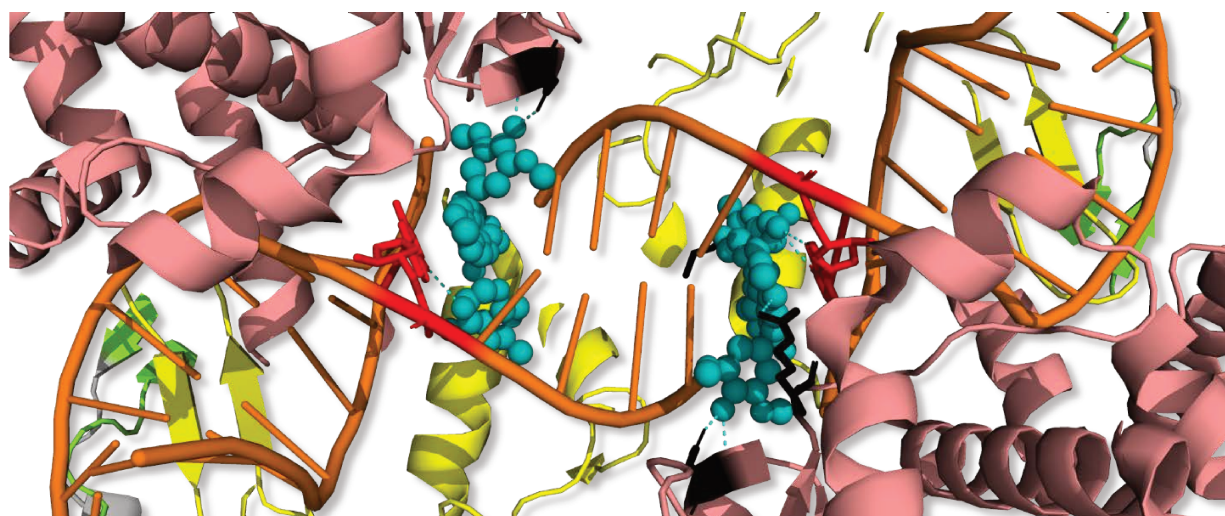


Figure 32 Intercalation de deux molécules d'étoposide, représentées par des sphères au sein de l'ADN stabilisant le complexe de clivage Top2cc (PDB ID : 5GWK). L'ADN est coloré en orange et les bases azotées en interaction avec la mitoxantrone sont colorées en rouge.

Cette catégorie de molécule est en constant développement. Récemment la synthèse chimique d'un composé organoplatinium a été réalisée combinant la molécule d'étoposide et un composé cis-dichlorodiammineplatinum(II) (**Figure 33**). Ce composé a montré une meilleure stabilité *in vitro* des complexes de clivage comparé à l'étoposide seul pour les deux isoformes. Ceci est dû à l'interaction du platine avec une méthionine conservée chez les deux isoformes et à proximité de la molécule d'ADN d'après les structures cristallographiques obtenues¹⁴⁹.

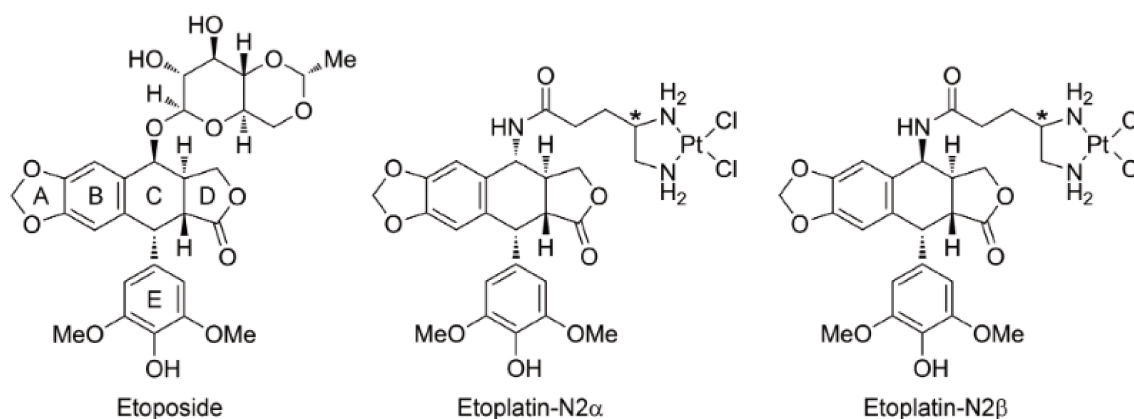


Figure 33 Structures chimiques de l'étoposide et de ses dérivées en complexe avec du platine. Figure issue de Wang, Y. R. et al.¹⁴⁹

Les molécules « poisons » sont utilisés dans le traitement de maladies bactériennes. Ces molécules appartiennent à la famille des fluoroquinolones (**Figure 34**). La moxifloxacine, et la lévofloxacine ciblent spécifiquement la Gyrase et non la TopIV bactérienne. Ces antibiotiques stabilisent les Top2cc en agissant de façon similaire à l'étoposide, en stabilisant les complexes clivés d'après les structures cristallographique obtenues.

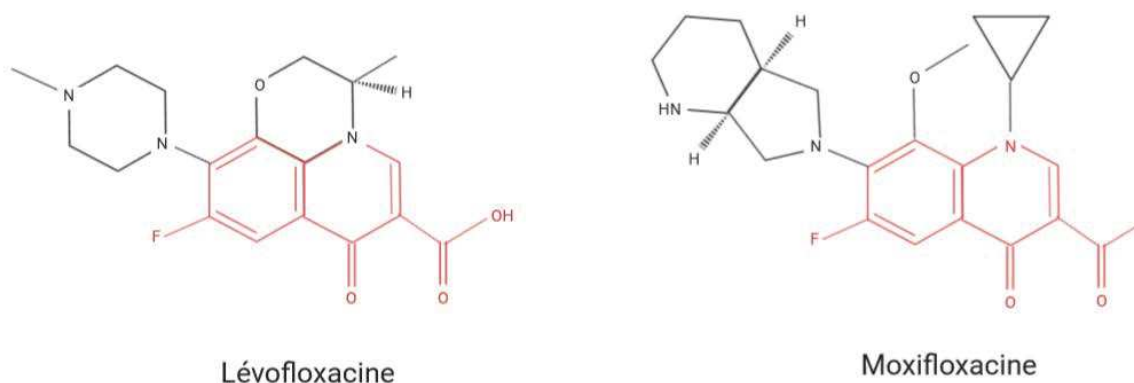


Figure 34 Structures chimiques de la lévofloxacine et de la moxifloxacine : des antibiotiques anti-Top2. Les structures sont colorées en rouge représentant le groupement fluoroquinolone.

4.2. Les inhibiteurs catalytiques

Les inhibiteurs catalytiques qui ciblent les TopII_s eucaryotes appartiennent à la famille des bisdioxopiperazines (**Figure 35**). En 1969 Hellmann et al. ont montré que la molécule ICRF 159 (Imperial Cancer Research Fund) a des effets anti-tumoraux sur six patients atteints de leucémies aiguës et trois patients atteints de sarcome lymphatique¹⁵¹

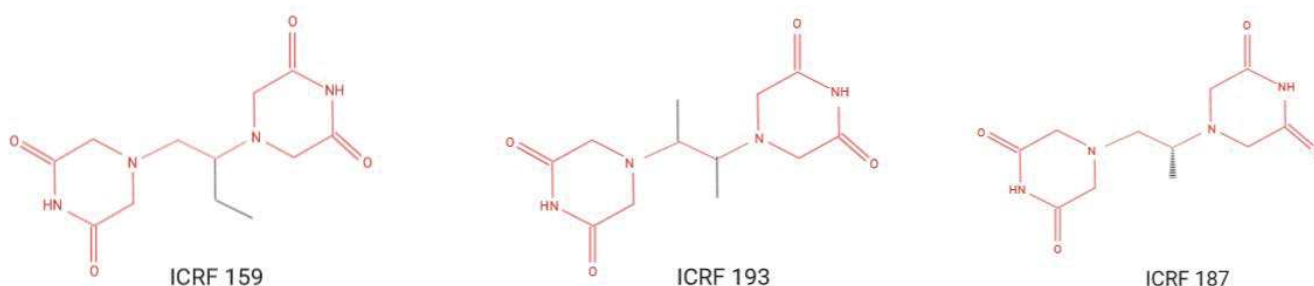


Figure 35 Structures chimique des composés ICRF 159, 193 et 187 : les inhibiteurs catalytiques. Les structures colorées en rouge représentent le groupement bisdioxopiperazines.

Cependant l'utilisation d'ICRF 159 entraîne de lourds effets secondaires qui se manifestent par des troubles digestifs aigus ainsi qu'une importante carence en fer¹⁵¹. Suite à ce constat, de nombreuses molécules dérivées d'ICRF 159 ont été produites. Ainsi, ICRF 187 est couramment utilisée en tandem avec la doxorubicine afin de limiter les effets cardiotoxiques de cette dernière. ICRF 193 est un dérivé diméthylé de ICRF 159, c'est la molécule ICRF la plus efficace. La TopII α est dix fois plus sensible à ICRF 193 qu'à ICRF 159¹⁵². La structure cristallographique du domaine ATPase de la TopII de levure en complexe avec ICRF 187 a montré que ce composé favorise la stabilisation d'une conformation fermée de ce domaine empêchant ainsi l'hydrolyse de la molécule d'ATP¹⁵³ (**Figure 36**). Les conclusions de cette étude ont été appuyées par des caractérisations biochimiques réalisées en 1994 montrant qu'en présence d'ICRF la TopII de levure est moins efficace pour hydrolyser l'ATP et qu'elle provoque l'arrêt du cycle catalytique à l'étape de clivage¹⁵⁴. L'un des intérêts de l'utilisation de ICRF 187 en tandem avec la doxorubicine en plus de son effet cardioprotecteur, est également d'empêcher la mise en place du mécanisme de résistance à la doxorubicine¹⁵⁵. Le mécanisme de protection que procurent les molécules d'ICRF 193 et 187 est encore peu compris, cependant ce mécanisme semble lié à une inhibition secondaire de la TopII β et à une réduction de son niveau protéique dans les myocytes cardiaques^{156,157}.

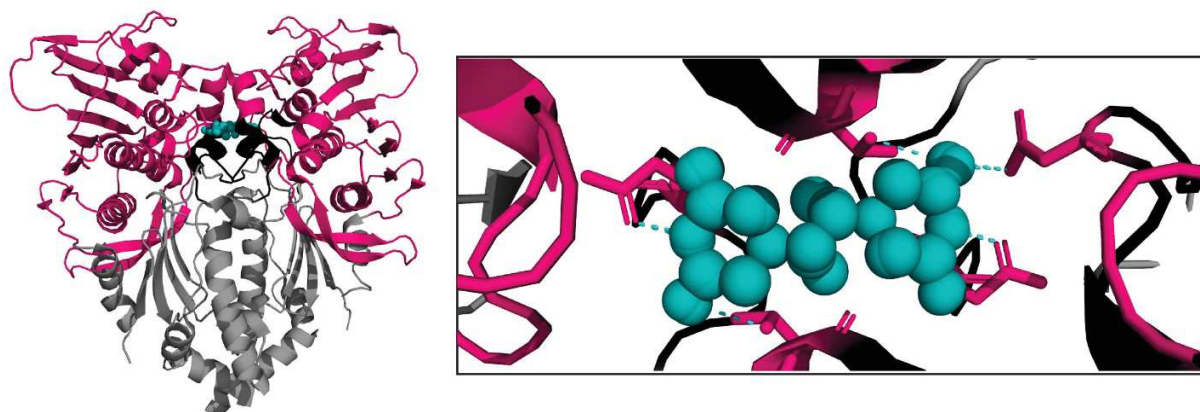
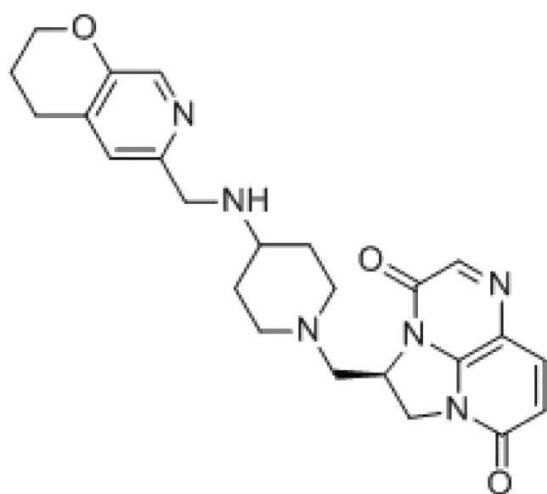


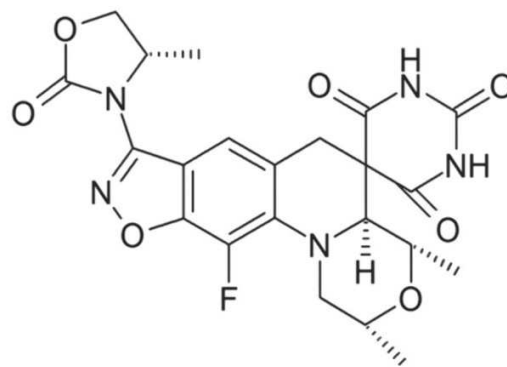
Figure 36 Stabilisation de la porte N par la molécule ICRF représentée en sphère. Elle se situe à l'interface dimérique du domaine GHKL interagissant avec des résidus appartenant aux deux monomères illustrés sous forme de stick, ce qui bloque ainsi tout mouvement de ce domaine (PDB ID : 1Q1D).

4.3. Les NBTIs : une nouvelle classe d'inhibiteur pour l'ADN gyrase

La classe des NBTIs (**N**ovel **B**acterial **T**opoisomerase **I**nhibitor) regroupe de petites molécules présentant une puissante activité anti-bactérienne. Ces molécules font l'objet d'essais cliniques au moment de l'écriture de ce manuscrit. L'intérêt premier de leur utilisation est l'absence de mécanisme de résistance des bactéries face à ces molécules. Dans cette classe se trouve la gépotidacine ou GSK 2140944, un dérivé du composé GSK 299423 et AZD0914 un analogue de QPT-1 (**Figure 37**). Les structures cristallographiques de la Gyrase avec ces composés sont disponibles¹⁵⁸. QPT-1 s'intercale dans le domaine TOPRIM empêchant la fixation des quinolones qui se fixent alors au sein du domaine WHD sur des résidus conservés^{159,160}. La gépotidacine s'intercale dans le domaine WHD sur le site de coupure de l'ADN avec une caractéristique intéressante : il n'y a qu'une molécule pour une enzyme. GSK 2140944 se positionne au centre de l'ADN, à la paire de base +2/+3 de l'ADN clivé.



GSK2140944 (gépotidacine)



AZD0914

Figure 37 Structures chimiques de GDK2140994 et AZD0914.

4.4. Les toxines et protéines régulatrices

Les Topoisomérases interagissent avec plusieurs partenaires protéiques pour le bon fonctionnement général des processus cellulaires énumérés précédemment. Or certaines protéines

sont sécrétées pour engendrer une résistance aux traitements antibactériens et anticancéreux. Dans le monde des bactéries, la protéine de résistance à la quinolone MfpA et la protéine YacG inhibent l'activité de l'ADN gyrase en empêchant que cette dernière fixe le segment G au sein du domaine de liaison à l'ADN.

MfpA présente une structure et une distribution de charge en surface qui mime un ADN de forme B^{161,162}. Des études biochimiques et de biologie cellulaire ont montré que MfpA peut inhiber l'activité de l'ADN gyrase et qu'elle contribue aux mécanismes de résistance¹⁶³. Cependant aucune structure n'est disponible pour le moment du complexe complet Gyrase-MfpA (**Figure 38**). Ces informations structurales pourraient aider à mettre en évidence les possibles différences de fixation entre l'ADN et MfpA dans l'interaction avec l'ADN gyrase.

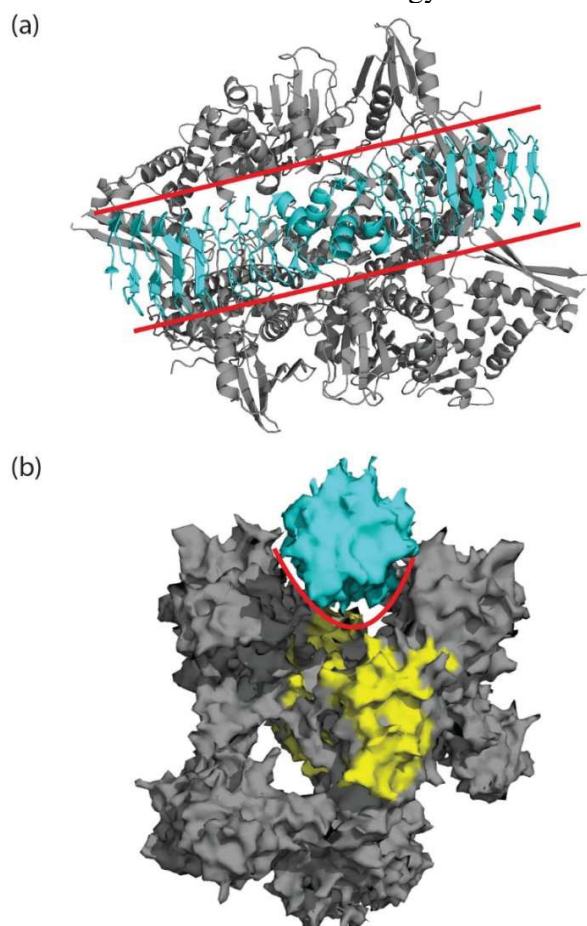


Figure 38 Positionnement possible de la protéine MfpA (PDB ID : 2BM4), colorée en cyan dans le domaine de liaison de la Gyrase coloré en jaune (PDB ID : 3NUH). (a) Vue de dessus la protéine MfpA à l'espace nécessaire pour se positionner entre les hélices du domaine Tower et TOPRIM. (b) Vue de profil, la protéine MfpA à l'espace nécessaire pour s'insérer et interagir avec le domaine WHD coloré en jaune.

La protéine YacG inhibe l'activité de l'ADN gyrase en interférant dans la liaison du segment G d'ADN^{164,165}. La structure cristallographique de ce complexe montre que les doigts de zinc de cette protéine interagissent avec des résidus du domaine TOPRIM. Enfin l'extrémité C-terminale flexible de YacG se loge au sein du domaine WHD (**Figure 39**). Pour le moment aucune protéine équivalente chez les eucaryote inhibant les TopII α de levure et humaines par compétition avec l'ADN n'a été identifié.

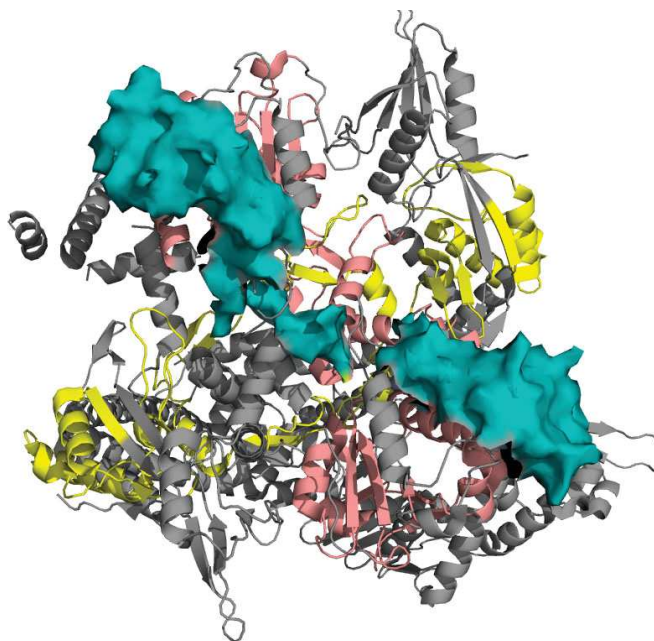


Figure 39 Structure cristallographique du complexe entre le domaine de liaison de l'ADN gyrase et YacG(PDB ID : 4TMA). La protéine YacG est colorée en cyan et représentée en mode surface. Les domaines WHD et TOPRIM de la Gyrase sont colorés respectivement en jaune et en rouge saumon.

4.5. Spécificité des molécules anti-TopII α humaines

Les molécules anti-topo utilisées en chimiothérapie des cancers ciblent à la fois la TopII α et la TopII β ^{166,167}. En effet les molécules visant les TopII α humaines agissent sur des régions qui sont extrêmement similaires entre les deux isoformes : les domaines GHKL et WHD ont un pourcentage d'identité de séquence de respectivement 83% et 86%¹⁶⁸. Hors la protéine cible lors des traitements anticancéreux est la TopII α , qui intervient dans la prolifération cellulaire et donc dans le

développement des tumeurs. S'il était possible de cibler spécifiquement la TopII α cela éviterait d'endommager des cellules pleinement différenciées, puisque la TopII α est moins abondante dans ces cellules⁴. Ces traitements manquent donc de spécificité et induisent des leucémies secondaires et une certaine cardiotoxicité qui est liée à l'inhibition de la TopII β ¹⁶⁹.

Dans les années 90 des équipes de recherches ont observé des différences de niveau dans les modifications post traductionnelles (PTMs) de la TopII α ¹⁷⁰⁻¹⁷³ après traitement avec des molécules anti-Top2. Les PTMs modulent les mécanismes des processus qui opèrent durant le cycle et la différenciation cellulaire^{174,175}, processus dans lesquels les topoisomérases sont impliqués. Des études menées par des équipes dans les années 90 mentionné précédemment sur la modulation des PTMs après administration des traitements anti-Top2, ainsi que la récente mise en évidence de la modulation des PTMs des TopIIs dans les cellules cancéreuses⁵, nous ont poussé à caractériser ces modifications et leurs potentiels impacts.

5. Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sont des modifications chimiques des protéines. Ces modifications correspondent à la fixation d'un groupement chimique de quelques atomes ou de plusieurs peptides, sur un acide aminé ou une extrémité de la protéine. Certaines PTMs ont pour conséquences d'entraîner une modification de l'activité, de la localisation et de la conformation des protéines cibles¹⁷⁶. Ces réactions sont catalysées par des protéines spécialisées, des enzymes, dans la fixation de ces groupements. Ainsi, l'altération de la structure chimique des résidus modifiés affecte les interactions des protéines cibles avec leurs partenaires et en conséquence influe sur les voies de signalisation cellulaires.

Dans ce projet de thèse, les PTMs étudiées en rapport avec les modifications apportées sur les Top2 sont : la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation et l'ubiquitylation.

5.1. Phosphorylation

La phosphorylation est une modification fréquente chez les eucaryotes, elle existe également chez les procaryotes, à plus petite échelle cependant¹⁷⁷. Son implication dans la plupart des processus cellulaires, de la division cellulaire à la synthèse de protéines, en passant par la croissance cellulaire et l'apoptose, en font la PTM la plus étudiée¹⁷⁸. La phosphorylation consiste en la fixation d'un groupement phosphate PO_4^{3-} à l'extrémité de la chaîne latérale d'un résidu hydroxylé sérine, thréonine ou tyrosine¹⁷⁹. La réaction de phosphorylation est catalysée par un groupe de protéines appelées kinases et nécessite une molécule d'ATP (**Figure 40**). Il existe différents groupes de kinases qui forme le kinome¹⁸⁰ contenant plus de 500 protéines (**Figure 41**). La phosphorylation étant une réaction chimique réversible, les phosphatases agissent de manière opposée aux kinases, leur fonction au sein de la cellule est de retirer le groupement phosphate des résidus cibles par hydrolyse.

Les études menées jusqu'à présent sur les phosphorylations des TopII α humaines ont permis d'identifier des kinases qui catalysent ces réactions sur la TopII α , actuellement aucune information n'est disponible pour l'isoforme β .

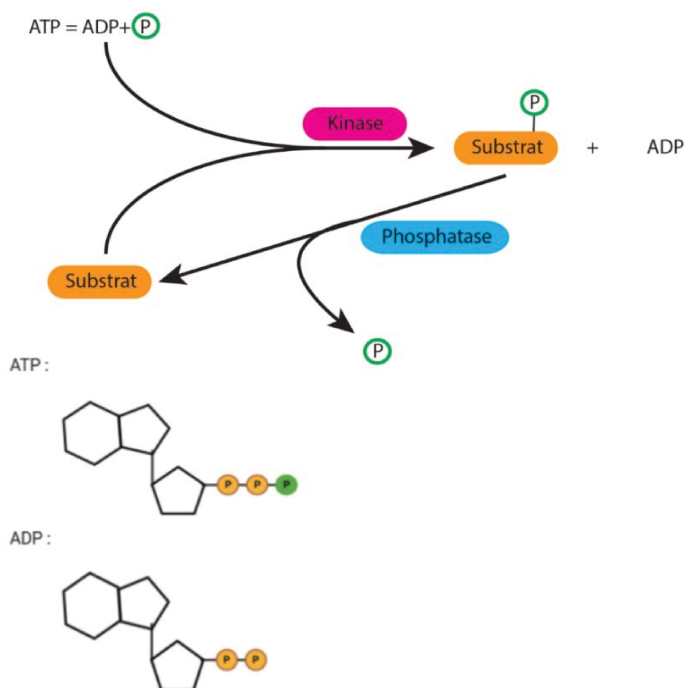


Figure 40 Réaction de phosphorylation et de déphosphorylation.

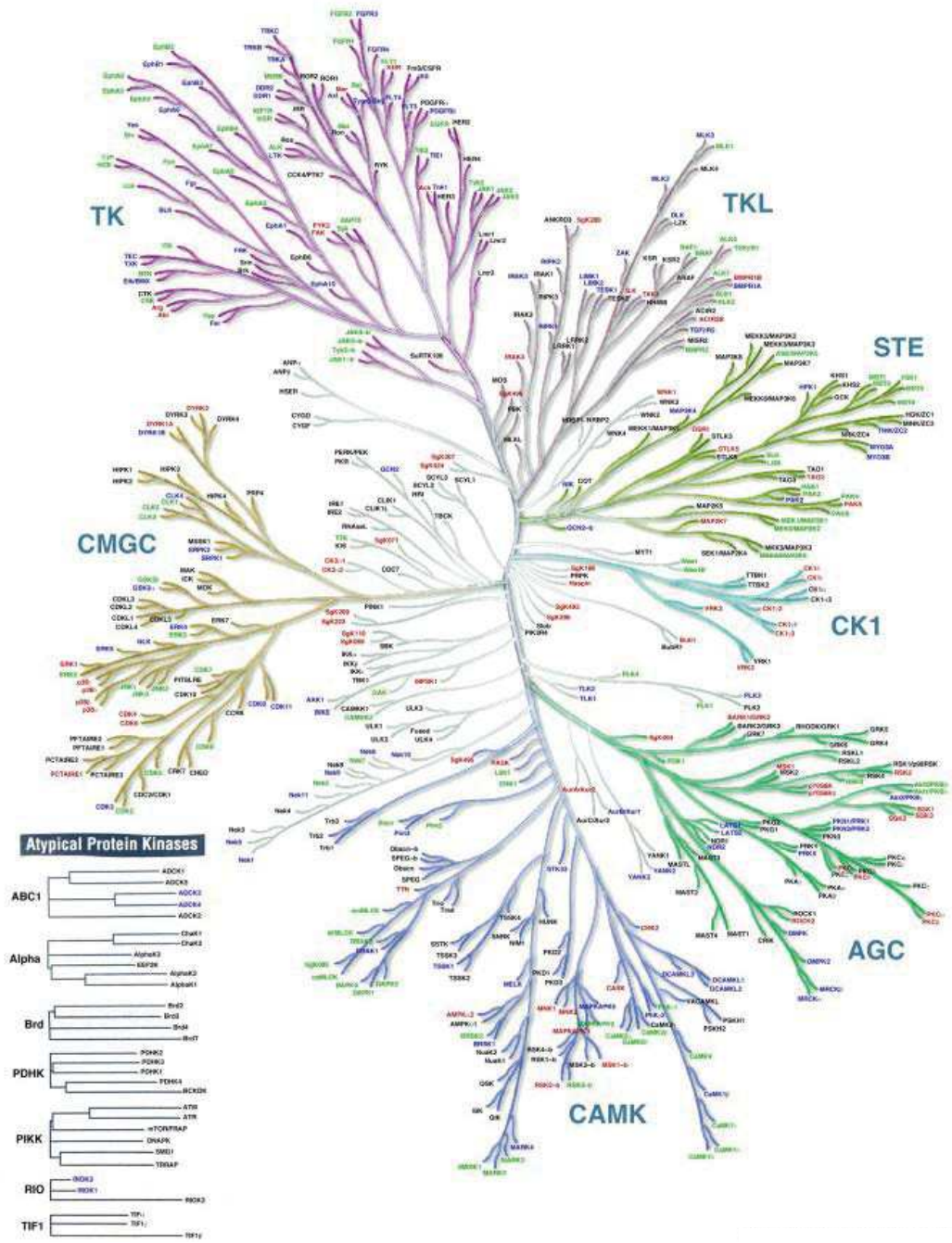


Figure 41 Le kinome humain. Figure issue de Manning, G. et al. 180

5.1.1. La famille CMGC

La famille CMGC est un large groupe de kinases divisé en plusieurs sous-familles

→ La sous-famille MAPK

Les kinases appartenant à la famille MAPK (**Mitogen-Activated Protein Kinase**) jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Des dysfonctionnements de ces enzymes ont été observés dans le cancer et certaines d'entre elles sont des oncoprotéines avérées¹⁸¹. Ainsi, la kinase Erk2 est surexprimée dans les cancers des ovaires, de la vessie, des poumons et du sein à hauteur de 21%, 13%, 12% et 5% respectivement d'après l'institut national de cancérologie américain NIH¹⁸². D'après cette base de données, la kinase p38δ est surexprimée à hauteur de 5% dans les cancers de la peau. Cependant, une baisse de l'expression de cette protéine est observée dans la plupart des autres cancers. Néanmoins, la kinase p38δ a été récemment proposée comme un possible marqueur tumoral dans les cancers du rein car sa surexpression dans les cellules tumorales rénales augmente la vitesse de croissance des tumeurs¹⁸³.

→ La sous-famille CDK

La famille CDK (**Cyclin-Dependent Kinase**) est impliquée dans les différents points de contrôle de la division cellulaire¹⁷⁹. Les kinases de ce groupe sont activées par le biais d'une interaction avec une autre classe de protéines appelées cycline. Une des kinases appartenant à ce groupe, cdk1, intervient en tant que point de contrôle avant l'entrée en mitose de la cellule¹⁸⁴ participant activement à la constitution des microtubules, essentiels au bon déroulement de la division cellulaire.

→ La sous-famille GSK3

GSK3 (**Glycogen Synthase Kinase 3**) est une sous-famille constituée des deux isoformes GSK3α et β identique à 90% à l'exception des extrémités N et C-terminales¹⁸⁵. Mises en évidence pour la première fois dans le métabolisme de synthèse du glycogène¹⁸⁶, elles interviennent également dans la transcription et dans la stabilisation des microtubules ainsi que dans des voies de signalisation

telles que Wnt, Notch et Hedghog¹⁸⁷. Leur sensibilité à l'insuline en fait des cibles thérapeutiques de choix dans le traitement du diabète^{188,189}. La délétion de GSK3 β est létale pour l'embryon contrairement à l'isoforme α ¹⁸⁵. De plus il a été montré que l'activité de l'isoforme β est elle-même régulé par un des isoformes de p38¹⁹⁰. La famille GSK3 peut être un oncogène, cependant il peut également agir en tant que suppresseur de tumeur. Son rôle exact reste encore à définir¹⁹¹⁻¹⁹³.

5.1.2. La famille Caséine kinase 1 (CK1)

Cette famille de kinases regroupe les isoformes α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ et ϵ d'enzymes CKI monomériques¹⁹⁴. Ces isoformes partagent une homologie de séquence protéique de 50% à travers leur domaine catalytique ainsi qu'une homologie de domaine avec les kinésines, des protéines moteurs qui se lient aux microtubules¹⁹⁵. Comme beaucoup de kinases, les CKI sont impliquées dans de nombreux processus intra-cellulaires et des altérations de l'activité de cette famille sont impliquées dans de nombreuses pathologies. Cette famille est connue pour intervenir dans le système circadien chez *Drosophila melanogaster* en régulant la phosphorylation de la protéine Period¹⁹⁶. Elles régulent la stabilité de la β -caténine, influant par conséquent sur la transcription des gènes régulés par la voie de signalisation Wnt¹⁹⁷. Enfin des études ont montré une implication des CKI dans la maladie d'Alzheimer, qui participeraient à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau¹⁹⁸.

5.1.3. La famille Caséine kinase 2

Les kinases de la famille caséine kinase 2 sont différentes des enzymes appartenant à la famille CK1. Les deux catégories de caséines kinases sont des agents phosphorylants identifiés pour la première fois comme agent de phosphorylation sur la protéine caséine présente dans le lait de bovin¹⁹⁹. Cependant leurs structures et leurs fonctionnements sont différents. Ces dernières forment un hétéro-tétramère et sont composées d'une sous-unité α et α' ainsi que de deux sous-unités β ^{200,201}. Trois isoformes ont été mis en évidence *in vivo* $\alpha_2\beta_2$, $\alpha'\beta_2$ et $\alpha\alpha'\beta_2$ ²⁰². Les conformations de ces kinases permettent de catalyser la réaction de phosphorylation en utilisant le phosphate d'une molécule d'ATP et de GTP (Guanosine Triphosphate). La forme la plus étudiée de cette famille est la caséine kinase 2 $\alpha_2\beta_2$ (CK2). La CK2 est principalement localisée dans le noyau cellulaire, grâce aux séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) présentes au sein de ses sous-unités²⁰³.

Cependant, des études ont montré que la CK2 pouvait présenter une localisation cytoplasmique et interagir avec des partenaires présents au niveau de la membrane cellulaire²⁰⁴.

De nombreuses études ont montré une surexpression de la CK2 dans de nombreux cancers²⁰⁵, si bien qu'elle est utilisée en tant que biomarqueur général. Il est intéressant de noter que des expérimentations en levure ont montré que la CK2 est indispensable lors du stade G1 et de la transition G2/M²⁰⁶, au moment où la TopII α atteint un pic d'expression protéique. Elle est également impliquée dans la formation des corps d'inclusions dans la maladie de Parkinson²⁰⁷ et est un des agents régulateurs du système circadien²⁰⁸.

5.1.4. La famille AGC

Cette famille regroupe des kinases possédant un domaine catalytique similaire à savoir les « cAMP-dependent kinase 1 » telles que la protéine kinase A (PKA), les « cGMP-dependent protein kinase » et la famille des protéines kinases C¹⁷⁹. Le corps catalytique des kinases appartenant à cette famille, est composé d'un petit lobe en N-terminal et d'un gros lobe en C-terminal avec en son centre un site de fixation de l'ATP^{209,210}. Grâce à cette structure, le substrat est stabilisé sur le gros lobe et par des mouvements allostériques les deux lobes se referment l'un sur l'autre permettant la réaction de phosphorylation entre la molécule d'ATP et le substrat. La différence majeure entre les kinases de cette famille et celles du reste du kinome est la régulation de leurs activités.

Des mutations génétiques dans la séquence codante de ces kinases ont été reportées dans de nombreuses maladies telles que le cancer ou le diabète²¹¹. La protéine kinase C ζ fait partie de la sous-famille des PKC et joue un rôle important dans la tumorigenèse en activant le facteur de transcription NF- κ B déclenchant la transcription de gènes anti-apoptotiques ou encore la cascade de signalisation ERK/MAPK qui est une des voies de signalisation de la réponse au stress cellulaire²¹².

5.1.5. La famille PLK

Très proche de la famille AGC, les kinases de la famille PLK se différencient par le fait qu'elles sont impliquées dans la régulation de la mitose²¹³. Cette famille est composée de 5 kinases notées Plk-1 à 5. Elles sont composées d'un domaine Polo-Box caractéristique, qui est indispensable à l'activité et la localisation. La délétion de ce domaine entraîne l'inactivité de la kinase²¹⁴. Les PLK agissent en collaboration avec les kinases CDK notamment Cdk1-cyclin B, un complexe régulateur principal de l'entrée en mitose²¹⁵, qui est activée par une réaction de phosphorylation médiée par Plk-1. Cette dernière intervient dans la transition G2-M du cycle cellulaire avec la TopII α et son implication dans la formation des microtubules, qui est altérée dans les cellules MCF-7 en présence d'inhibiteur de Plk-1²¹⁶. Le rôle de Plk-3 est moins connu que celui de son homologue. Cependant il est impliqué dans la réponse à l'hypoxie des cellules, ayant une fonction de suppresseur de tumeur, prévenant l'activation du gène central de l'hypoxie HIF-1²¹⁷.

5.2. Acétylation

Après la phosphorylation, l'acétylation est la 2^e PTM la plus répertoriée dans la littérature²¹⁸. Une acétylation fait référence à l'addition d'un groupement acétyle sur l'extrémité N-terminale d'une chaîne polypeptidique, mais aussi à la fixation d'un groupement acétyle sur la chaîne latérale des résidus lysine. Lors de ces deux réactions l'acetyl coenzyme-A est le donneur de groupement acétyle. Dans le premier cas la réaction est médiée par un groupe d'enzyme appelé Nt-acétyltransférases (NAT) et dans le second cas par des enzymes du groupe des lysine-acétyltransférases (KAT). Seul le deuxième cas sera abordé. Les acétylations médiées par les KATs sont réversibles, en effet une déacétylation par des lysine-déacétylases (KDACs) peut avoir lieu **(Figure 42)**.

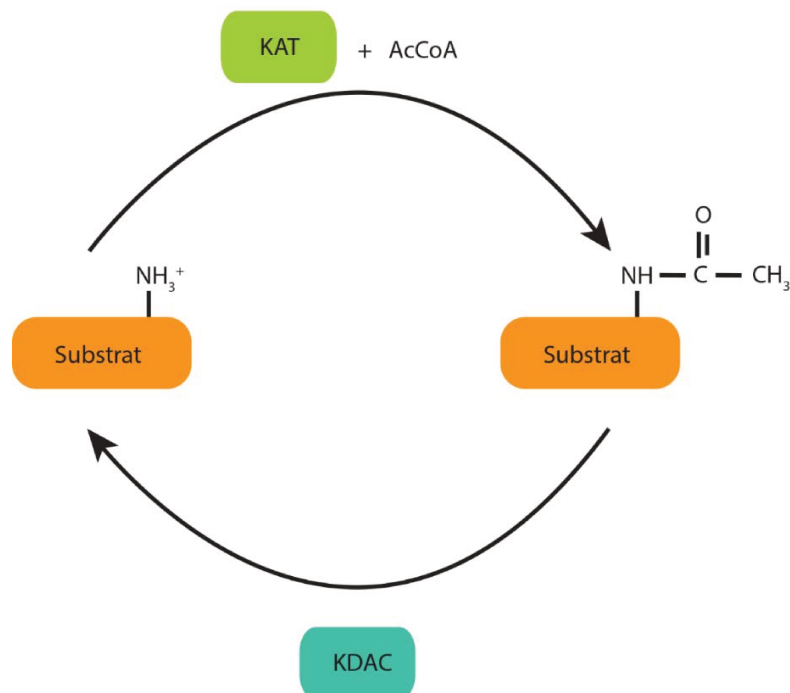


Figure 42 Réaction d'acétylation et de déacétylation.

Ces enzymes reconnaissent les lysines acétylées grâce à un domaine de lecture de ces lysines modifiées appelé « bromodomain »²¹⁹. Un des groupes les plus connus appartenant à la famille KDACs sont les histone-déacétylases (HDACs) qui régulent les acétylations présentes sur les queues d'histones. Le niveau d'acétylation sur ces queues influe sur la compaction de l'ADN, une hyperacétylation permet la décompaction localisée de l'ADN autour de l'octamère d'histone qui conduit à la transition du stade d'hétérochromatine à euchromatine indispensable à la transcription²²⁰ (**Figure 43**).

Par conséquent, cette modification est impliquée dans toutes les pathologies touchant à la régulation de facteurs de transcription, comme le cancer. Ainsi, en dehors des histones de plus en plus de protéines sont de possibles cibles d'acétyltransférases chez les procaryotes et les eucaryotes²²¹⁻²²³. Au moment de l'écriture de ce manuscrit de thèse aucun élément n'était disponible quant au taux d'acétylation des TopII.

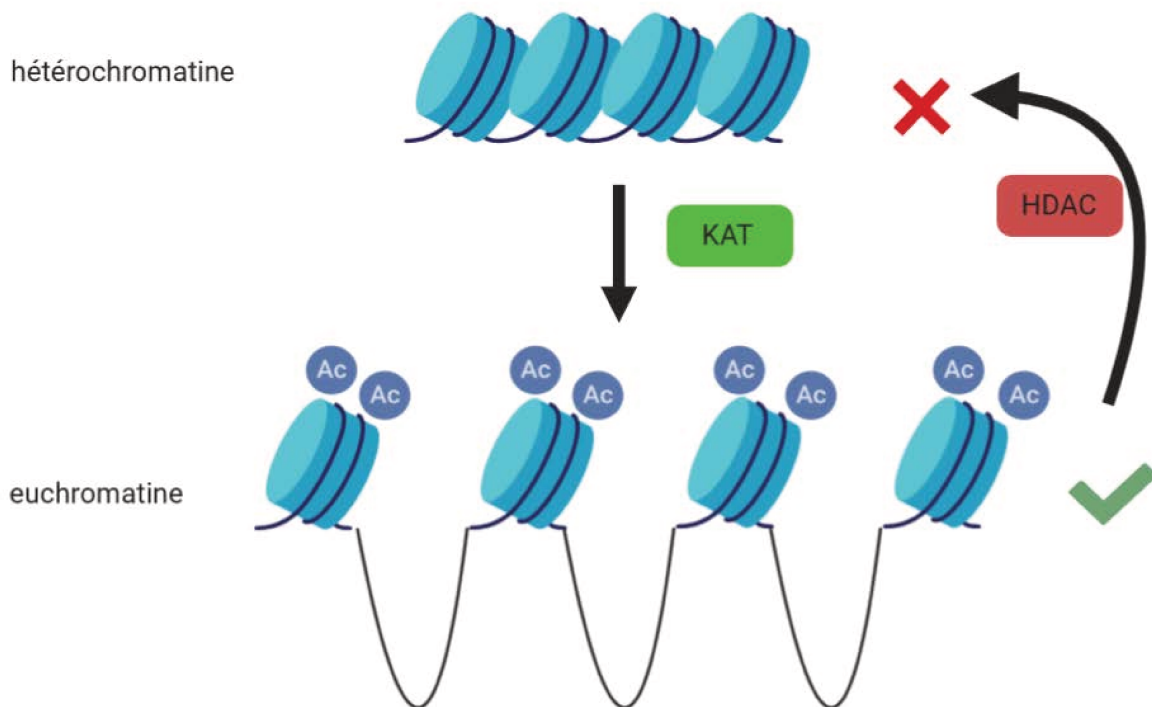


Figure 43 Transition hétérochromatine/euchromatine médiée par les acétylations.

5.3. SUMOylation et Ubiquitylation

Les PTMs abordées dans ce paragraphe, contrairement aux deux précédentes modifications, consistent en la fixation de peptide.

L'ubiquitylation est une modification correspondant à la fixation d'une molécule d'ubiquitine sur la chaîne latérale d'une lysine. La molécule d'ubiquitine est un peptide de 8,5 kDa comportant une hélice α et 4 feuillets β . L'ubiquitine possède 5 lysines K6, K11, K27, K29, K33 K48 et K63 qui peuvent être elles-mêmes modifiées par des PTMs²²⁴. Ces lysines peuvent donc être ubiquitinées, on parle alors de chaîne de poly-ubiquitylation (ou Poly-Ub). Suivant la taille de la chaîne de Poly-Ub, il peut y avoir plusieurs combinaisons qui influent sur le comportement de la protéine cible²²⁵ (**Figure 44**). La combinaison la plus connue est la Poly-Ub qui active la dégradation de la protéine cible via la voie protéasomale²²⁶. Concernant les Topoisomérases, l'ubiquitylation peut jouer un rôle dans l'activation de l'enzyme. Lou et al. ont montré que la TopII α est ubiquitynylée par BRCA1 ce qui a pour effet de stimuler la réaction de décaténation²²⁷.

Malheureusement beaucoup de questions restent en suspens comme les sites de la TopII α modifiés par BRCA1 et dans quelles circonstances.

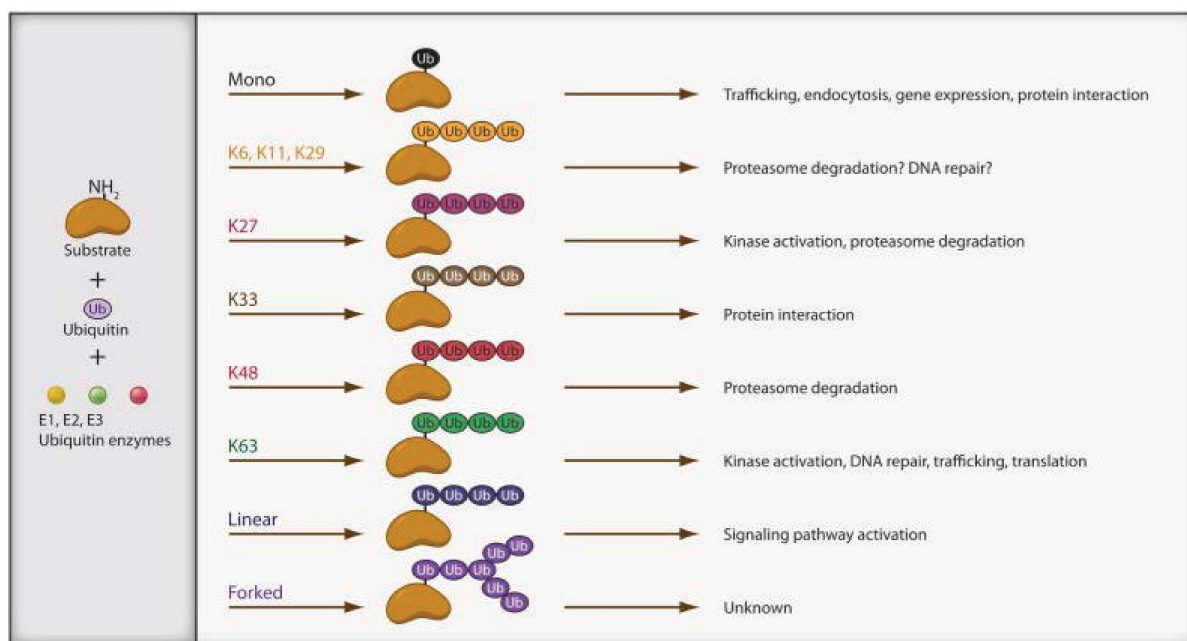


Figure 44 Tableau montrant la diversité des effets que procure la fixation de groupement ubiquitine. **Figure** issue de Malynn, B. A. et al. ²²⁵

Ce peptide est structurellement proche des peptides impliqués dans la réaction de SUMOylation. Une réaction de SUMOylation peut correspondre à l'ajout de 3 différents peptides SUMO1, SUMO2 et SUMO3 (Small Ubiquitin **MO**difier). Ces peptides ont des structures similaires entre eux à savoir une hélice α et 4 feuillets β bordés par une boucle flexible aux extrémités N et C terminales (**Figure 45**). SUMO2 et 3 partagent une identité de séquence de 97%. En revanche SUMO2/3 partagent une identité de séquence avec SUMO1 de 52% ce qui distingue ce dernier des 2 autres peptides (**Figure 46**). Enfin pour l'ubiquitylation, il est possible d'observer des chaînes de poly-SUMOylation *in vivo* et *in vitro*, en particulier les peptides SUMO2 et 3 qui contrairement à SUMO1 contiennent le site de modification SUMO $\psi KxE/D$ sur l'extrémité N-terminale, où ψ est un acide aminé hydrophobe et x n'importe quel acide aminé²²⁸.



Figure 45 Superposition des structures cristallographiques des peptides : Ubiquine, coloré en jaune (PDB ID : 1UBQ), SUMO1 (PDB ID : 1A5R) et SUMO2 (PDB ID : 2N1W) colorées en gris.

```

Ubiquitine 1 MQ-----IFVKTLTKTKITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRFLSDYNIQKESTLH
SUMO1 1 MSDQEARPSTEDLGDKKE-GEYIKLKVIGQDSSEIHFVKMTTHLKKIKESYQROGVPMNSLRFLFEGQRIADNEAPKELGMEBEDVIE
SUMO2 1 MADEKPKEG-----VKTE--NDHINLKVAGQDGSVVFQKPKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRPDGQPIN--TDTPAQLEMEDEDITD
SUMO3 1 MSEKPKEG-----VKTE--NDHINLKVAGQDGSVVFQKPKRHTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRPDGQPIN--TDTPAQLEMEDEDITD

Ubiquitine 69 LVLRLRGG-----
SUMO1 90 VMQQTGCEHSTV-----
SUMO2 86 VFQQTGCV-----Y
SUMO3 85 VFQQTGCVPESSLAGH-

```

Figure 46 Alignement de séquences des peptides Ubiquitine, SUMO1, SUMO2, SUMO3.

Les réactions d'ubiquitylation et de SUMOylation impliquent plusieurs protéines dans leurs mécanismes d'action.

Les peptides ubiquitines générés possèdent à leur extrémité C-terminale le motif di-glycine suivi ou non d'une dizaine d'acides aminés non conservés entre les peptides. Ces peptides sont aussi recyclés à partir d'un substrat contenant déjà la modification Ubiquitine. Cette étape est appelée la maturation du peptide. L'extrémité C-terminale du peptide doit dans un premier temps être clivée

afin de ne conserver que le motif di-glycine, cette coupure est orchestrée par une enzyme DUB (Deubiquitinating enzyme) dont plusieurs isoformes existent chez *Homo sapiens*²²⁹. Le peptide clivé est ensuite activé par la formation d'une liaison Thioester entre le peptide et une cystéine catalytique de la protéine E1 dans un processus dépendant de la présence d'ATP. Le peptide ubiquitine lié à E1 est conjugué sous l'action d'une enzyme E2 UBC (Ubiquitin conjugating). Enfin, la protéine se lie à une E3 ligase elle-même interagissant avec la protéine cible et cette proximité permet le transfert du peptide ubiquitine sur la cible²³⁰ (**Figure 47**).

Pour la réaction de SUMOylation le schéma mécanistique est similaire. Ces deux modifications vont de pair l'une avec l'autre et sont mutuellement régulées²³¹. Cela a été observé pour la dégradation des Top2cc²³². Néanmoins, les peptides étant différents, il existe des particularités dans leur mécanisme de fixation respectif. Ainsi, l'étape de clivage de l'extrémité C-terminale du peptide SUMO est médiée par une enzyme SENP (Sentrin Protease) et l'enzyme E3 ligase de SUMO ne forme pas d'intermédiaire²³³. Sur ce dernier critère entre 500 et 1000 E3 ligases ont été répertoriées, réparties en plusieurs familles, permettant de distinguer une large gamme de complexe de conjugaison E2-SUMO ou E2-ubiquitin²³⁴. De par leur fonction de reconnaissance de substrat, les E3 ligases sont des cibles thérapeutiques dans les traitements inhibant ces PTMs²³⁵.

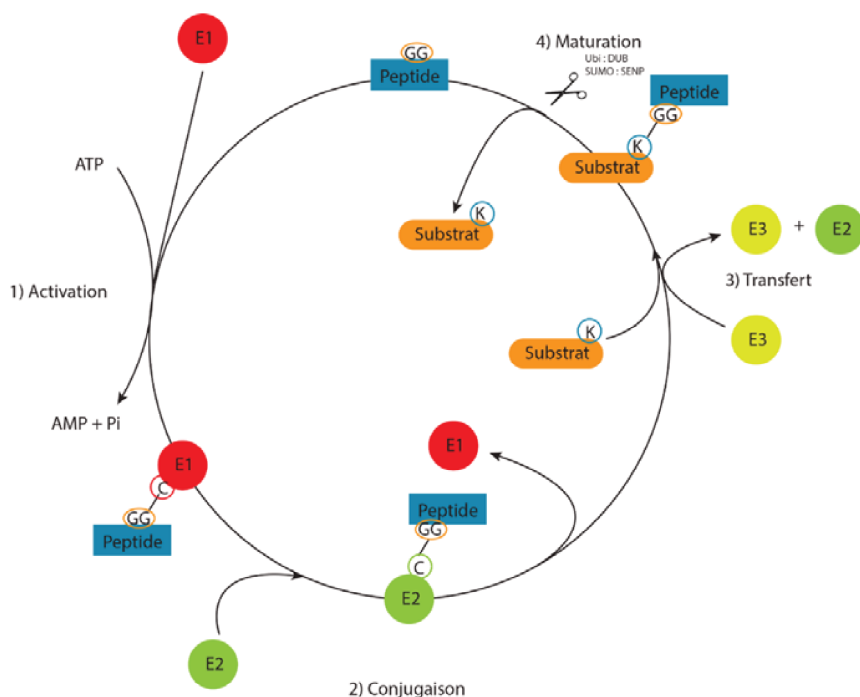


Figure 47 Mécanisme réactionnel de SUMOylation/désSUMOylation et Ubiquitylation/déubiquitylation.

6. Influence des inhibiteurs de PTM sur les ADN-Topoisomérases

. Ces PTMs font partie intégrante de la régulation des mécanismes cellulaires. La modulation des PTMs s'est donc rapidement imposée comme un axe de recherche clinique contre le cancer ou les maladies neurodégénératives^{236,237}. Le principal avantage que procure l'utilisation de molécules visant les agents régulateurs des PTMs est la spécificité du traitement. En effet le niveau des PTMs peut varier selon si les cellules sont saines ou cancéreuses étant donné que ce sont des phénomènes régulés par les PTMs^{238,239}.

Plusieurs expériences ont montré un lien de cause à effet entre l'inhibition des kinases et la modulation de l'activité catalytique des TopII α . Les inhibiteurs de tyrosine kinases comme la génistéine, la biochanine A et l'apigénine inhibent l'activité des TopII α en stabilisant le complexe de clivage Top2cc²⁴⁰⁻²⁴². L'effet des molécules anti-Top2 est amplifié lorsque ces dernières sont administrées avec des inhibiteurs de kinases²⁴³.

En ce qui concerne les inhibiteurs de lysine acétyl-transférases (KAT) et leur lien avec les ADN topoisomérases, très peu d'informations sont disponibles dans la littérature. Les seuls traitements qui relient les ADN topoisomérases et les KATs sont les inhibiteurs HDAC, lesquels modifient le degré de phosphorylation de la TopII α ²⁴⁴. Enfin les inhibiteurs des HDACs altèrent la relocalisation de la TopII β , la redistribuant de l'hétérochromatine au nucléole, modifiant ainsi la transcription de gènes contribuant à la croissance tumorale²⁴⁵. Ces derniers peuvent également être utilisés en synergie avec les Top2-poisons dans le traitement du cancer²⁴⁶.

L'un des effets les plus remarquables de l'ubiquitylation est l'activation de la voie de dégradation des protéines par le protéasome 26S. L'inhibition de la voie de dégradation protéasomale par la molécule MG132, induit une hypersensibilité des cellules contre les agents anti-Top2²⁴⁷, assurant le maintien des complexes de clivage ADN-Topoisomerase. Le même effet est observé après ajout d'un cocktail d'inhibiteur d'agent de deubiquitylation, avec toutefois un impact sur la distribution des TopII α ²⁴⁸. Les résultats disponibles semblent montrer que l'ubiquitylation est importante pour la dégradation des TopII α .

Les molécules inhibitrices de PTMs ont un impact sur l'activité et la concentration des topoisomérases et plus particulièrement des TopII α . Les PTMs jouent un rôle dans la réponse aux traitements anticancéreux actuels.

Il a été montré que les PTMs des TopII α sont modulées par les molécules anti-Top2. Nous avons rassemblé les informations concernant la corrélation entre les PTMs et la résistance aux molécules anti-Top2 dans un article de revue parue dans le journal *Cancer Drug Resistance* en 2020. Cette revue récapitule toutes les phosphorylations, acétylations, ubiquitylations et SUMOylations identifiées et analysées à ce jour chez la TopII α . Une partie des résultats présentés dans le chapitre I portant sur l'identification des phosphorylations et des acétylations sont repris dans cette revue permettant une comparaison des PTMs identifiés dans notre étude avec celles répertoriées pour les cellules cancéreuses. Enfin nous discutons de l'impact de la résistance aux molécules anti-Top2 sur la régulation et l'activité de la TopII α . Les informations de la littérature et les données structurales existantes permettent de discuter l'implication de la régulation de la TopII α par les PTMs dans le traitement du cancer. Nous avons ajouté ci-dessous le manuscrit de cette revue publiée.

7. [Revue Lotz, C. Lamour, V Cancer drug resistance 2020 “The interplay between DNA topoisomerase 2 \$\alpha\$ post-translational modifications and drug resistance”](#)

Review

Open Access



The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational modifications and drug resistance

Christophe Lotz¹, Valérie Lamour^{1,2}

¹Integrative Structural Biology Department, IGBMC, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7104, INSERM U1258, Illkirch 67404, France.

²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg 67000 France.

Correspondence to: Dr. Valérie Lamour, Integrative Structural Biology Department, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, Illkirch Cedex 67404, France. E-mail: lamourv@igbmc.fr

How to cite this article: Lotz C, Lamour V. The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational modifications and drug resistance. *Cancer Drug Resist* 2020;3:149-60. <http://dx.doi.org/10.20517/cdr.2019.114>

Received: 17 Dec 2019 **First Decision:** 13 Jan 2020 **Revised:** 19 Jan 2020 **Accepted:** 5 Feb 2020 **Available online:** 27 Feb 2020

Science Editor: Robert C.A.M. van Waardenburg **Copy Editor:** Jing-Wen Zhang **Production Editor:** Jing Yu

Abstract

The type 2 DNA topoisomerases (Top2) are conserved enzymes and biomarkers for cell proliferation. The catalytic activities of the human isoform Top2 α are essential for the regulation of DNA topology during DNA replication, transcription, and chromosome segregation. Top2 α is a prominent target for anti-cancer drugs and is highly regulated by post-translational modifications (PTM). Despite an increasing number of proteomic studies, the extent of PTM in cancer cells and its importance in drug response remains largely uncharacterized. In this review, we highlight the different modifications affecting the human Top2 α in healthy and cancer cells, taking advantage of the structure-function information accumulated in the past decades. We also overview the regulation of Top2 α by PTM, the level of PTM in cancer cells, and the resistance to therapeutic compounds targeting the Top2 enzyme. Altogether, this review underlines the importance of future studies addressing more systematically the interplay between PTM and Top2 drug resistance.

Keywords: DNA topoisomerase, drug resistance, post-translational modifications, etoposide

INTRODUCTION

The type 2 DNA topoisomerases (Top2) are evolutionary conserved enzymes and biomarkers for cell proliferation^[1]. They are involved in essential cellular processes such as DNA replication, DNA transcription, and chromosome segregation^[2]. The human Top2 α isoform is highly expressed during



© The Author(s) 2020. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, for any purpose, even commercially, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.



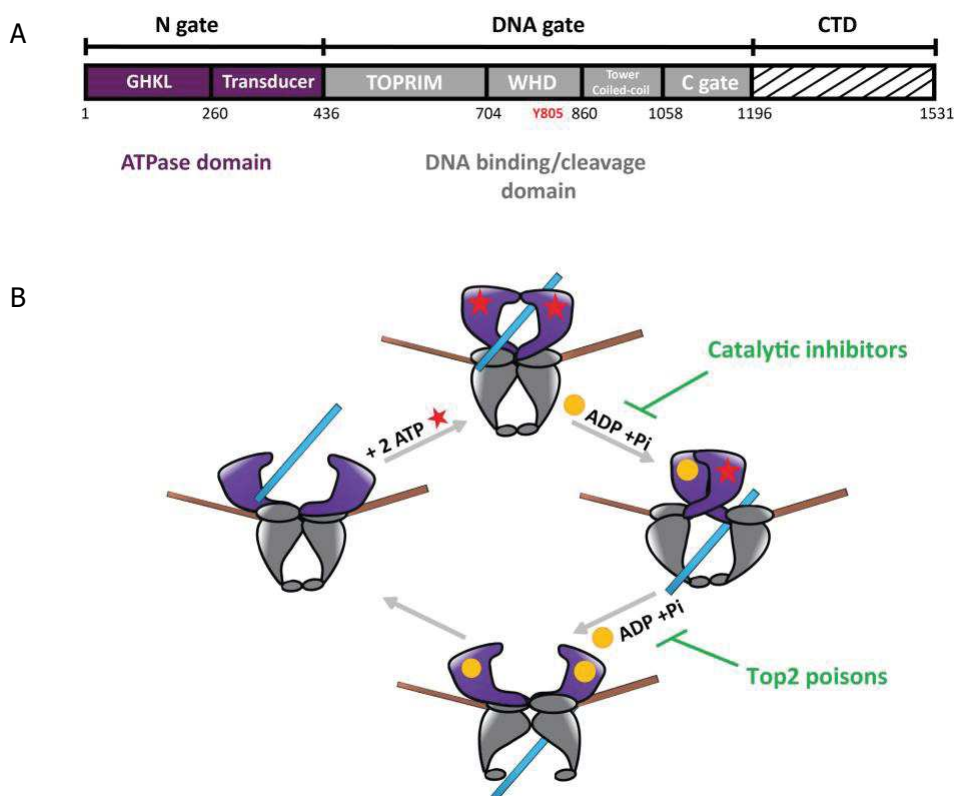


Figure 1. Domain organization of Type 2 DNA topoisomerase and catalytic cycle. A: domain organization of the human Top2 enzymes. The Top2 enzymes are composed of three dimeric interfaces. The N-gate (in purple) is composed of a GHKL domain binding ATP and a transducer domain. The DNA-gate (in grey) comprises the WHD with the conserved catalytic tyrosine (Y805 in red) and the Toprim domain, that contains three acidic residues binding magnesium ions. The C-gate forms a dimeric interface where the DNA exits the enzyme at the end of the reaction. The CTD (dashed lines) differs between species and between the human isoforms Top2 α and Top2 β . Residue numbering is that of the Top2 α isoform. B: catalytic cycle of Top2 relaxation activity. (1) The Top2 enzyme binds a DNA G-segment (in brown) at the dimeric interface at the DNA-gate. (2) Upon ATP binding (red stars), a second DNA fragment called T-segment (in blue) is trapped in the ATPase domain. (3) Introduction of a reversible DNA double strand break in the G-segment is coupled to the hydrolysis of an ATP molecule, leading to the release of ADP (yellow sphere) and an inorganic phosphate, and results in the transport of the T-segment through the break. Catalytic inhibitors such as bispiperazine (ICRF derivatives) trap a closed clamp intermediate, affecting ATP-driven conformational changes of the allosteric assembly. (4) Hydrolysis of a second ATP molecule triggers the release of the T-segment through the C-gate and resets the enzyme. Top2 poisons such as etoposide and doxorubicin prevent G-segment religation. Top2: type 2 DNA topoisomerase; CTD: C-terminal domain; WHD: winged helix domain; G: gated; T: transported; GHKL: Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL domain; TOPRIM: topoisomerase-primase domain

mitosis and is essential for cell division^[3]. Its main function is to regulate topological entanglements in DNA that can compromise cell division or gene transcription^[4].

Top2 are large multidomain enzymes that fold into a homodimer forming three-protein interfaces called “gates”^[5] [Figure 1A]. The C-terminal domain (CTD) whose 3D structure is unknown is less conserved and seems to play a role in protein-DNA and protein-protein interactions^[6]. To remove topological stress, Top2 introduce a reversible double strand break in a DNA molecule and transport another DNA duplex through the break^[5] [Figure 1B]. This elaborate mechanism can be targeted by chemicals that affect the catalytic sites. In particular, the Top2 α isoform is a major target for antineoplastic agents that are widely used in cancer chemotherapy^[7]. While catalytic inhibitors affect ATP hydrolysis, topoisomerase “poisons” stabilize the cleavage complex (Top2cc), leading to accumulation of lethal DNA double-strand breaks^[8,9] [Figure 1B]. However, cancer cells may develop resistance that can be attributed to Top2 single point mutations, alteration of gene expression, or regulation of post-translational modifications (PTM)^[10].

Aberrant PTM are often found in cancer cells and are one of their distinguishing features^[11,12]. The earliest studies of PTM in Top2 proteins date back to the 1990s with the first report of a phosphorylation of purified Top2 α from mouse cells^[13]. Since then, the identification and characterization of PTM have been accelerated by the development of proteomic techniques^[14]. Because of their relevance in cancer therapy, Top2 α PTM have been characterized mostly in cancer cell lines, while the extent of PTM in the homeostasis of normal cells has been somewhat neglected^[15]. Recently, we identified the phosphorylation and acetylation sites in human Top2 α overproduced in the yeast *S. cerevisiae* and in a hamster mammalian cell line (BHK21), thus providing a basal landscape of the modifications for Top2 α isoform^[16].

In this review, we analyze the different types of modifications affecting the human Top2 α in normal and cancer cells with a structure-function perspective. We also overview the relationships among the regulation of Top2 α by PTM, the level of PTM in cancer cells, and the resistance to anti-Top2 therapeutic compounds.

PHOSPHORYLATIONS

Phosphorylation is the most studied modification of Top2 due to its importance in the regulation of the enzyme during the cell cycle and was shown to influence several aspects of Top2 α function. The level of phosphorylation reaches a maximum peak at G2/M phase along with the level of Top2 α expression^[17]. Several studies have reported that Top2 α catalytic activity is modulated by phosphorylations^[18,19].

The majority of phosphorylations were identified in the Top2 α CTD in normal and cancer cells [Figure 2]. The CTD is important for the proper subcellular localization of the enzyme as its deletion leads to Top2 mislocalization^[20]. In particular, the phosphorylation of Top2 α Ser1213 is important for its relocation from the chromosome arms to the centromere^[21]. Phosphorylation by Casein Kinase II (CKII), Protein Kinase C (PKC), or Extracellular signal Regulated Kinase II enhanced the decatenation and the relaxation activities, of both human and *Drosophila* Top2 α ^[17,19,22]. Inversely, incubation of Top2 α with the kinase PKC ζ inhibits the decatenation activity *in vivo* and *in vitro*^[23]. Phosphorylation of Ser1106 by Casein Kinase I was shown to regulate decatenation since its mutation to alanine slows down the decatenation and cleavage reactions^[18,24]. However, the presence of a phosphorylated residue cannot always be directly correlated with the modulation of the enzyme activity^[25]. Substitution of Ser1525 with an alanine does not affect decatenation activity, despite being a major substrate for phosphorylation by CKII, Polo-like kinase I, and p38g^[26-29].

In addition to the regulation of Top2 α catalytic activity, phosphorylations appear to be important for the recruitment of protein partners in a chromatin context. In *HeLa* cells, the methylated tail of Histone 3 was shown to interact with the Top2 α chromatin tether, a 30-amino-acid sequence at the end of the CTD^[30]. In this region, three phosphorylations could be identified in cancer cells and only one thus far in normal cells, including phosphorylation on Ser1525, which could modulate binding of Top2 α to the nucleosome [Figure 2].

In the conserved catalytic domains of Top2 α , three phosphorylation sites in the ATPase, topoisomerase-primase domain (TOPRIM), and the coiled-coil domains were detected in normal cells [Figure 3]. Ten additional phosphorylations were identified in cancer cells in the GHKL and transducer domains and in the N-terminal arm closing the dimer [Figure 3]. Phosphorylation of Ser29 by PKC in the N-terminal arm of the ATPase domain stimulates the DNA relaxation activity *in vitro*^[17]. Phosphorylations at this position could impact the allosteric movements of the ATPase domain and the dimeric interface.

The overall level of phosphorylation was shown to modulate the ATPase activity of Top2 α as well as the cleavage/religation reaction *in vitro*^[22,31,32]. More phosphorylations can be found in cancer cells in the TOPRIM and winged helix domain (WHD) domains, and lining the coiled-coil region [Figures 2 and 3B]. Although less abundant, six phosphotyrosines in the Top2 α protein were identified in cancer cells [Figure 3B].

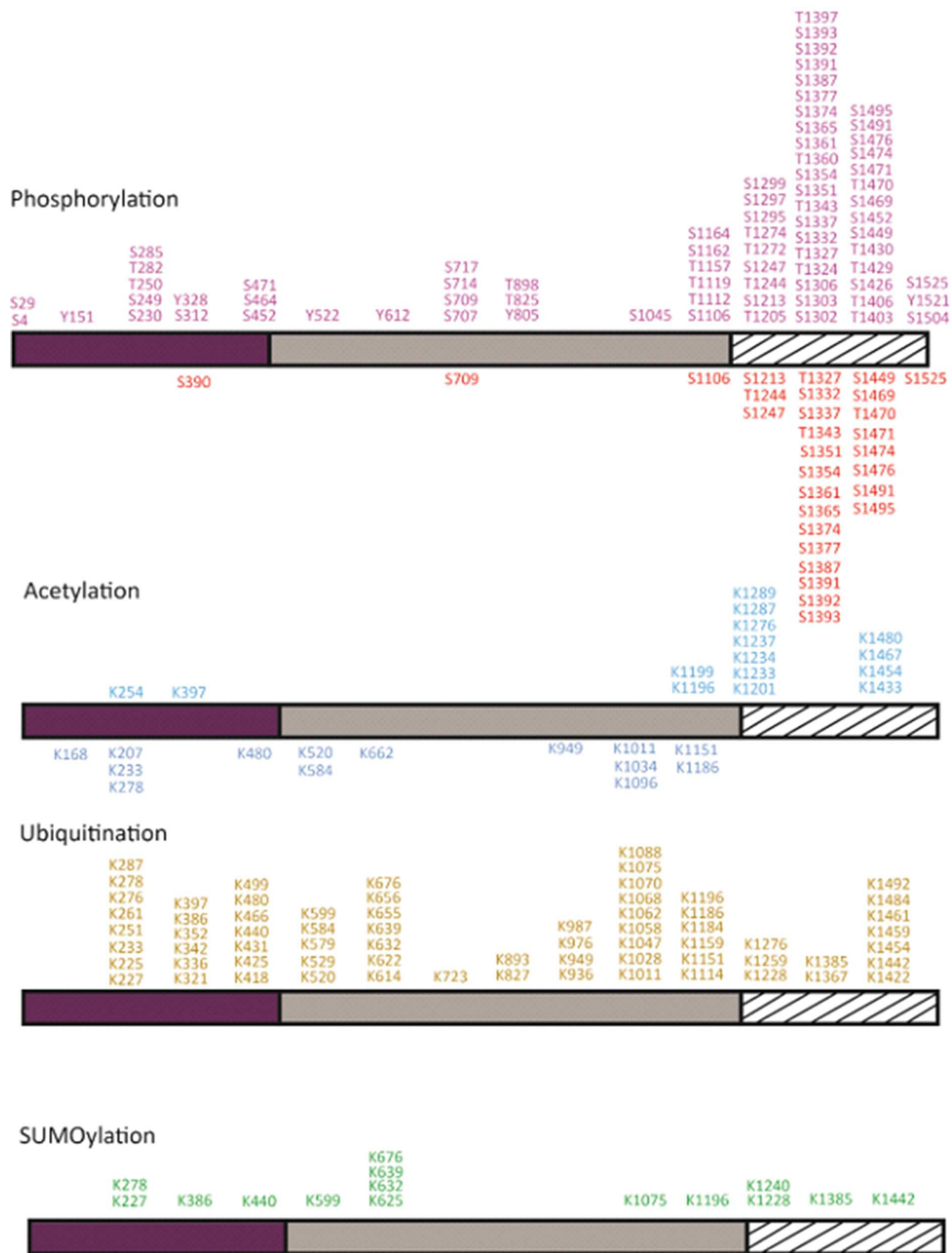


Figure 2. Post-translational modifications of the human Top2 α . Phosphorylations and acetylations identified in the recombinant Top2 α protein produced in yeast or mammalian cells are reported below the domain diagram (Bedez *et al.*^[16], 2018). Modifications identified in cancer cells as reported in the PhosphoSiteplus database are indicated above the domain diagrams (Horneck *et al.*^[40], 2014). Phosphorylation sites are colored in red, acetylation in blue, ubiquitination in yellow, and SUMOylation in green. To date, about 104 phosphorylation, 28 acetylation, 67 ubiquitination, and 15 SUMOylation sites have been identified. Twenty-six out of 29 phosphorylations in normal cells and 46 out of 75 phosphorylations in cancer cells were found in the CTD. Fifteen SUMOylation sites were identified in cancer cells, half on the DNA gate and C-gate, four in the N-gate, and five in the CTD. Thirteen acetylations on the CTD and two in the ATPase domain were reported in cancer cells. Two phosphotyrosines were identified in the N-gate, three in the DNA-gate, and one on the CTD in cancer cells. Positions are numbered as indicated in the NCBI gene ID:7153, which results in a +1 shift in the residue numbering for some positions compared with their numbering in articles (for example, Thr1342 appears in the present figure as Thr1343, and Ser1524 as Ser1525). Top2: type 2 DNA topoisomerase; CTD: C-terminal domain

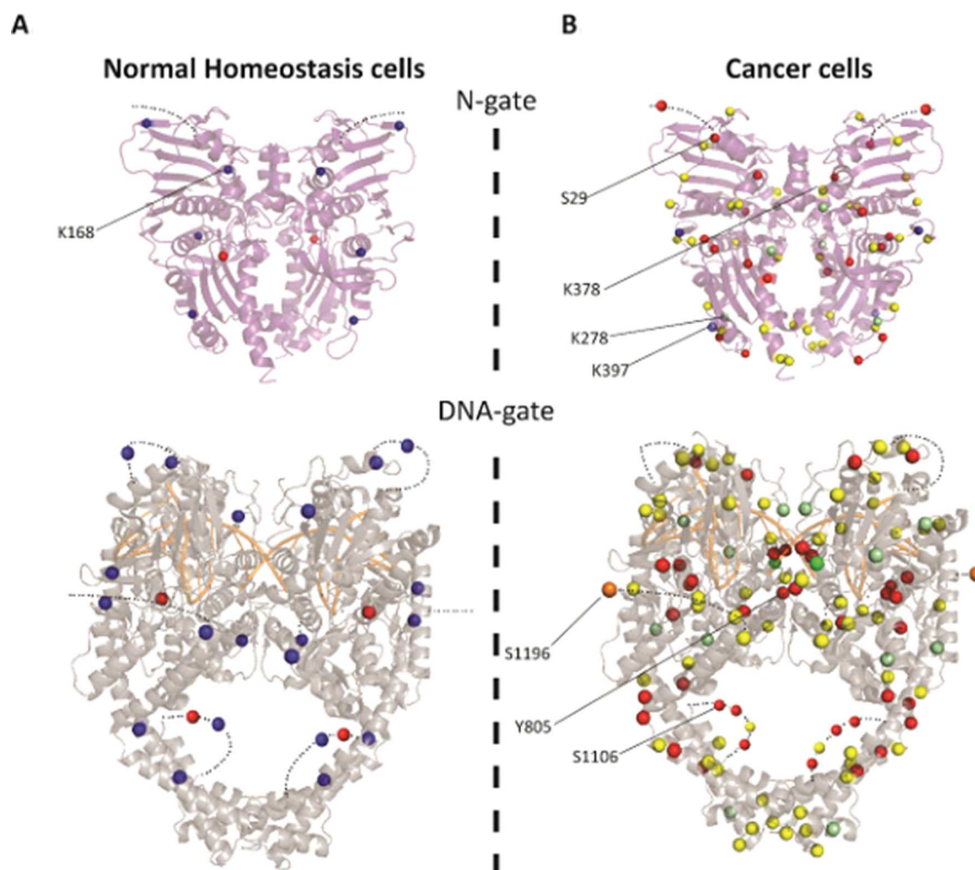


Figure 3. Distribution of the post-translational modifications on the structures of Top2 α catalytic domains. A: modifications found in normal homeostasis cells (Bedez *et al.*^[16], 2018) reported on the ATPase domain structure (PDBID: 1ZXM) (top) and DNA binding/cleavage domain (PDBID: 5GWK) (bottom). B: modifications found in cancer cells reported in the PhosphoSitePlus database reported on the catalytic domains. The C-terminal domains for which no structure is available are not represented. Modifications appear as a blue sphere for acetylation, red for phosphorylation and yellow for ubiquitination. Positions that were found either ubiquitinated or SUMOylated appear as pale green spheres. Positions that were found either ubiquitinated or acetylated appear as pale blue spheres. Half of the SUMOylations were identified in the TOPRIM domain and C-gate. Only one position at residue 625 was found solely SUMOylated (dark green) and residue 1196 was found to be the site of acetylation, SUMOylation, and ubiquitination (orange). Positions specifically mentioned in the main text are indicated by a black line. Figures were generated using PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. TOPRIM: topoisomerase-primase domain

Interestingly, the conserved catalytic tyrosine (Y805) was found to be phosphorylated in acute T-cell leukemia (Jurkat cells) and myelogenous leukemia K562 cells, and not in normal cells, suggesting direct modulation of the enzyme cleavage activity.

The phosphorylation status of Top2 in drug resistant cells has been the subject of contradictory observations. Takano *et al.*^[33] observed that hyperphosphorylation of Top2 in etoposide-resistant KB cells correlated with a decrease in cleavage complex formation. CKII is hyperactivated in cancer while in fission yeast CKII phosphorylation of Top2 suppresses its sensitivity to the catalytic inhibitor ICRF-193, which inhibits Top2 by impairing its ATP hydrolysis activity^[34]. In this context, phosphorylation of serine residues was identified in the CTD outside the ATPase domain. This indicates not only that distant positions can have a role in the response to ICRF, but also that the phosphorylation status of Top2 can affect its drug response. Hyperphosphorylation linked to CKII was also observed in drug resistant breast cancer cells^[35]. In contrast, hypophosphorylated Top2 α was observed in etoposide-resistant K562 and HL-60 leukemia cells, being in the latter case linked to a reduced level of Ser1106 phosphorylation^[36,37].

ACETYLATIONS

We identified acetylation sites almost exclusively in the structured catalytic core of Top2 α and only one in the CTD after overexpression in yeast and BHK21 cells^[16]. This is consistent with the observation that acetylations are often found in structured regions of proteins^[38]. In cancer cells, acetylations were mostly identified in the CTD^[39-41] [Figure 2]. Acetylations have not been studied as extensively as phosphorylations, which limits the conclusions that can be drawn from a comparison between normal homeostasis and cancer cells.

In healthy cells, the acetylations found in the DNA gate are located in the TOPRIM, coiled-coil, and C-gate domains. Those located close to the extremities of the DNA groove could affect DNA binding [Figure 3A]. Interestingly, 8 acetylated positions in healthy cells located in the DNA gate have also been found ubiquitinated in cancer cell lines, suggesting a switch of modification in cancer cells^[42-46]. Lys1196 was found to be a site for acetylation in Jurkat cells, ubiquitination in Jurkat and HEP-2 cells, and SUMOylation in *HeLa* cells^[43,46,47]. This residue is located in a hinge region between the C-gate domain and the CTD and could be involved in the regulation of Top2 activities [Figure 3B]. Lys278 in a loop region of the transducer is acetylated in normal cells but found to be SUMOylated and ubiquitinated in cancer cells [Figure 2]. Lys397, which lies in the transducer helix, is acetylated in cancer cells but can also be ubiquitinated. These positions are mostly located on the surface of the N-gate domain and therefore compatible with the addition of bulky modifications [Figure 3A]. Although buried at the dimeric interface, we also found an acetylation on Lys168 in Top2 α produced in the yeast expression system. Mutation of this residue showed that this position is important for the coupling of ATPase activity and dimerization^[16].

While few studies are available on the acetylation of Top2 α in response to drugs, indirect inferences can be made. The association of Top2 with histone deacetylases (HDAC) was shown to modulate its activity and in particular etoposide-stimulated cleavage both *in vivo* and *in vitro*^[48,49]. In addition, treatment of hepatocellular carcinoma cells with an HDAC inhibitor triggers the proteasomal degradation of Top2^[50].

Interestingly, acetylations that were identified in BHK21 were also found as targets for ubiquitination in cancer cells. Inversely, most acetylations identified thus far in cancer cells do not correspond to reported ubiquitination or SUMOylation sites, which indicates that regulation of some PTM depends on the cell state. Although further analysis is needed, these studies suggest a regulation of Top2 α activity by acetylations and a potential interplay between other modifications such as ubiquitinations and SUMOylations.

UBIQUITINATIONS AND SUMOYLATIONS

Ubiquitin is a small regulatory protein that when attached to proteins alter their cellular localization, protein activity, or molecular interactions, and may target them for proteasome degradation^[51]. Ubiquitinations were identified throughout the Top2 α sequence in cancer cells [Figure 2]. In non-cancer cells (mouse embryonic fibroblasts), only one ubiquitination in the ATPase transducer domain has been reported thus far. Lys378 is ubiquitinated by the E3 ligase activity of the APC/C complex, promoting 26S proteasome degradation at G1 phase, thus modulating Top2 α levels for chromosome maintenance^[52]. This residue interacts directly with the ATP molecule and could be accessible to modifications when the N-gate is open during the catalytic cycle.

Introduction or removal of ubiquitin is also a mechanism of drug resistance, as it modulates the Top2 α activities and protein levels through proteasome degradation^[53-55]. Deficiency in the RNF168 E3 ubiquitin ligase in breast cancer cells, or elevated levels of ubiquitin ligase Mdm2 in osteosarcoma cells, confers resistance to the Top2 poison etoposide, by regulating Top2 activities^[53,56]. Ubiquitin-mediated degradation

of Top2 also contributes to the level of drug resistance in solid tumors since proteasome inhibition leads to etoposide resistance^[57]. In addition, the E3 ubiquitin ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2cc in *HeLa* cells upon teniposide treatment^[58].

Evidence for a functional and physical interplay between ubiquitination and SUMOylation have been reported at a larger scale, suggesting a coordination for proteasome degradation and the regulation of ubiquitin modifiers^[59]. The Small Ubiquitin-like Modifier or SUMO proteins are considered as members of the ubiquitin-like protein family, although they are not directly related to protein degradation^[60]. It was shown that the resolution of TOP2cc by tyrosyl-DNA phosphoesterase 2 is controlled by the SUMO ligase ZATT^[61]. SUMOylation play a critical role in DNA condensation and chromosome segregation. Top2 α is directed to the inner centromere via the E3 ligase RanBP2-mediated SUMOylation for the resolution of sister centromeres^[62]. The E3 ligase PIAS γ was also shown to regulate the catalytic activity of Top2 α at the centromere for the proper segregation of chromosome^[63]. Evidence of a crosstalk between phosphorylation and SUMOylation was shown in cancer cells, which targets the CTD^[64,65].

Strikingly, most of the SUMO sites in the catalytic domains were identified along the dimeric interface of the Top2 α structure [Figure 3]. Structure determination of Top2 has shown that the subunits form an intertwined dimer structure and that the buried surface could be accessible during the catalytic cycle [Figure 1B]^[66-69].

SUMOylation, similar to other post-translational modifications, is impacted by chemical adjuvants but little information is available thus far. Conjugation to the SUMO2/3 by the SUMO ligase PIASg in response to Top2 inhibitors alters the Top2 decatenation activity, essential for chromatid arm separation at mitosis^[70]. Interestingly, SUMOylation in Top2 α is increased upon ICRF-193 or teniposide exposure, as well as following oxidative stress or heat shock^[71].

Altogether, ubiquitination and SUMOylation are important modifications that can have a direct impact on Top2 α levels, interplay with other PTM, and consequently affect drug response.

TOP2 α MUTATIONS IN RESISTANT CELLS

Point mutations in the Top2 α gene that lead to podophyllotoxin resistance mostly affect the drug binding site or are located on the TOPRIM domain [Figure 4A]. A recent study in yeast identified mutations of Top2 conferring resistance against vosaroxin, a quinolone derivative in a phase II clinical trial^[72]. Some mutations also appeared in the unstructured C-terminal region of human Top2 α , indicating that residues that are external to the binding pockets of the drugs can contribute to resistance mechanisms, due to the allosteric properties of the protein.

Point mutations conferring resistance to the bispiperazine compounds were found in the ATPase domain of Top2 α in small cell lung cancer and Chinese hamster ovary cells^[73]. These mutations impact the dimeric interface and the formation of the ICRF binding pocket^[74] [Figure 4]. Another study in yeast showed that drug resistance mutations are not restricted to the N-terminal domain but can also be found in the DNA-gate^[75] [Figure 4B]. Single point mutations located in the N-terminal domain display a more resistant phenotype compared with those in the DNA-gate, with the exception of Gly551, a conserved residue in eukaryotic Top2. Interestingly, a Gly551Ser mutation confers resistance to both Top2 poison etoposide and the catalytic inhibitor ICRF^[72,75]. The dual resistance could be explained by the proximity of the etoposide-binding site in the DNA groove and the allosteric properties of the enzyme, since movements of the DNA-gate are coupled to ATP hydrolysis [Figure 1B].

Although no drug resistant mutations targeting known PTM sites could be found in the literature except for vosaroxin resistant yeast cells^[72], it cannot be excluded that such events occur in the Top2 α gene of resistant

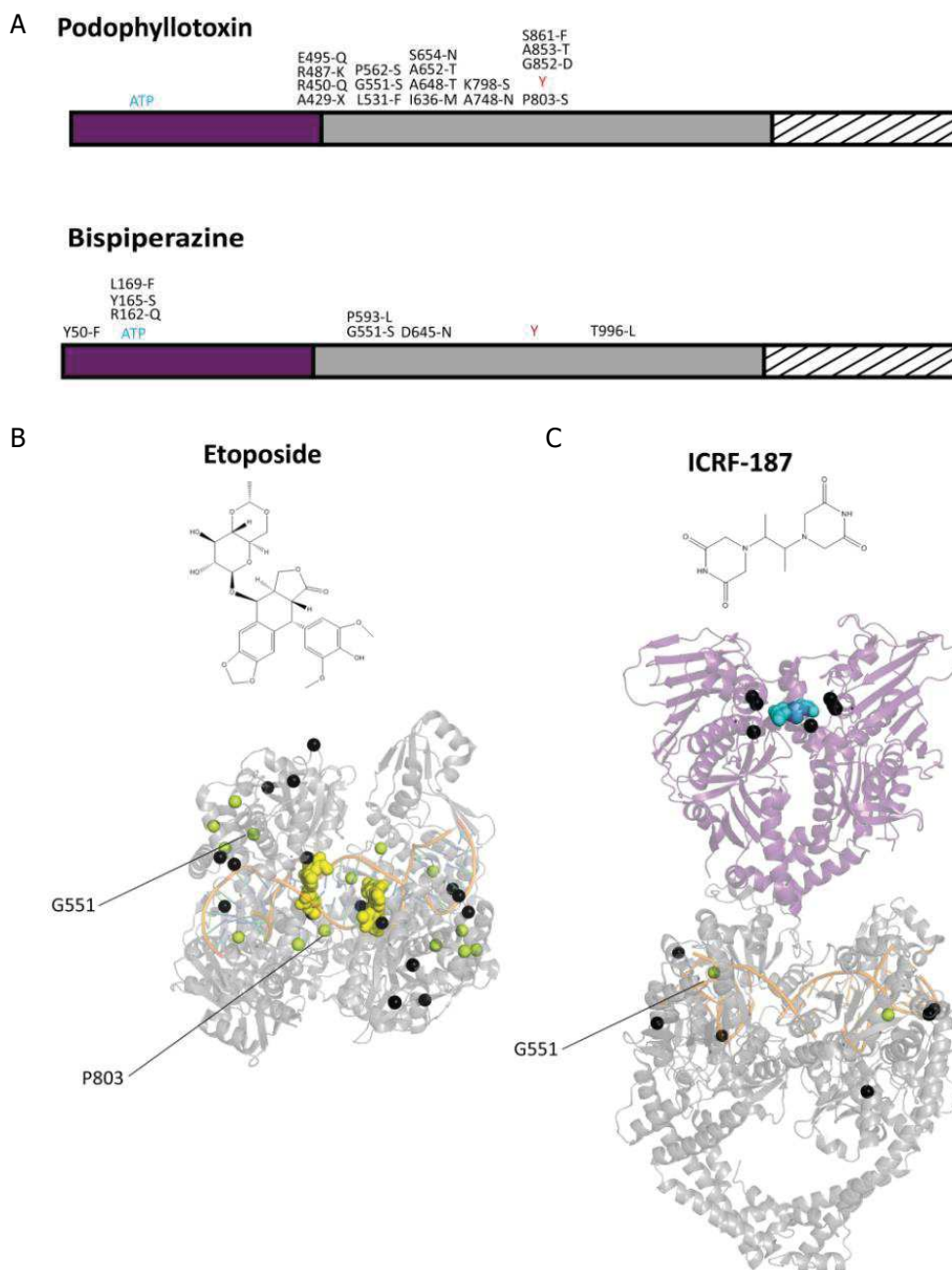


Figure 4. Distribution of point mutations providing drug resistance on the structures of the Top2 α catalytic domains. A: distribution of the positions presenting single point mutations that confer resistance to podophyllotoxin compounds (etoposide) (top) and bispiperazine (ICRF-187) (bottom), indicated on the domain diagram of Top2 α . B: single point mutations conferring resistance to anti-Top2 drugs are represented as black spheres reported on the structures of the catalytic domains. The DNA binding/cleavage domain (PDBID: 5GWK) of human Top2 α homolog bound to two etoposide molecules represented as yellow spheres (B). The ATPase domain of the yeast homolog (PDBID: 1QZR) bound to the ICRF-187 compound represented as blue spheres, with mutations also appearing in the DNA binding/cleavage domain (PDBID: 5GWK) (C). Residues mutated to serine in resistant cell lines appear in pale green. Positions specifically mentioned in the main text are indicated by a black line

cancer cells. Mutations have been reported that introduce a serine or threonine in etoposide-resistant cells in the TOPRIM or WHD domains^[73,75] [Figure 4]. *In silico* prediction of phosphorylation sites indicates that mutation of Ala652, located between TOPRIM and WHD, would generate a phosphorylation site for PKC^[76]. Mutation of Pro803 nearby the catalytic tyrosine shows a consensus sequence for Cdc2. Further

investigations would be required to find if these positions are targeted by kinases *in vivo* and contribute to the mechanism of resistance.

CONCLUSION

Most phosphorylations were found in the CTD of the Top2 α isoform, related to its role in the cell cycle. However, the conserved catalytic domains are also directly targeted by kinases and other modifying enzymes introducing acetylations, SUMOylations, and ubiquitinations, interfering with the structure-function properties of the Top2 α isoform. Top2 PTM in cancer cells were mostly identified in targeted studies analyzing their regulation and interactions with modifying enzymes during the cell cycle. Further systematic analysis of Top2 PTM in cancer cells would be required to analyze the interplay between PTM and compare their modulation in response to different compounds, in order to identify potential biomarkers of cancer prognosis and drug resistance, as well as new therapeutic avenues targeting the Top2 α or modifying enzymes.

DECLARATIONS

Acknowledgments

We thank Robert Drillien for useful suggestions and proofreading the manuscript.

Authors' contributions

Generated the figures: Lotz C

Wrote the manuscript: Lotz C, Lamour V

Availability of data and materials

Not applicable.

Financial support and sponsorship

This work was supported by the Fondation ARC and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT (managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02). The authors acknowledge the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05 and of Instruct-ERIC.

Conflicts of interest

All authors declared that there are no conflicts of interest.

Ethical approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Copyright

© The Author(s) 2020.

REFERENCES

1. Ali Y, Abd Hamid S. Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumor Biol* 2016;37:47-55.
2. Mondal N, Parvin JD. DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 2001;413:435-8.
3. Akimitsu N, Adachi N, Hirai H, Hossain MS, Hamamoto H, et al. Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic

- cells depleting the activity of DNA topoisomerase II alpha. *Genes Cells* 2003;8:393-402.
4. Collins I, Weber A, Levens D. Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol Cell Biol* 2001;21:8437-51.
 5. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001;70:369-413.
 6. Clarke DJ, Azuma Y. Non-catalytic roles of the topoisomerase II C-terminal domain. *Int J Mol Sci* 2017;18.
 7. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2009;9:338-50.
 8. Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase-II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1781-5.
 9. Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, et al. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* 2011;333:459-62.
 10. Vassetzky YS, Alghisi GC, Gasser SM. DNA topoisomerase II mutations and resistance to anti-tumor drugs. *Bioessays* 1995;17:767-74.
 11. Cicens J, Zalyte E, Bairoch A, Gaudet P. Kinases and cancer. *Cancers (Basel)* 2018;10.
 12. Han ZJ, Feng YH, Gu BH, Li YM, Chen H. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (review). *Int J Oncol* 2018;52:1081-94.
 13. Saijo M, Enomoto T, Hanaoka F, Ui M. Purification and characterization of type II DNA topoisomerase from mouse Fm3a cells: phosphorylation of topoisomerase-II and modification of its activity. *Biochemistry* 1990;29:583-90.
 14. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003;21:255-61.
 15. Chen T, Sun Y, Ji P, Kopetz S, Zhang W. Topoisomerase IIalpha in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene* 2015;34:4019-31.
 16. Bedez C, Lotz C, Batisse C, Broeck AV, Stote RH, et al. Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain. *Sci Rep* 2018;8:9272.
 17. Wells NJ, Fry AM, Guano F, Norbury C, Hickson ID. Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. *J Biol Chem* 1995;270:28357-63.
 18. Grozav AG, Chikamori K, Grabowski DR, Xu Y, Kinter M, et al. Casein kinase I delta/epsilon isoforms phosphorylate serine 1106 in the catalytic domain of human topoisomerase II alpha. *Cancer Res* 2006;47.
 19. Shapiro PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, et al. Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase II alpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999;19:3551-60.
 20. Adachi N, Miyaike M, Kato S, Kanamaru R, Koyama H, et al. Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3135-42.
 21. Ishida R, Takashima R, Koujin T, Shibata M, Nozaki N, et al. Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase II alpha. *Cell Struct Funct* 2001;26:215-26.
 22. Devore RF, Corbett AH, Osheroff N. Phosphorylation of topoisomerase II by casein kinase II and protein kinase c: effects on enzyme-mediated DNA cleavage/religation and sensitivity to the antineoplastic drugs etoposide and 4'-(9-Acridinylamino) methane-sulfon-m-anisidide. *Cancer Res* 1992;52:2156-61.
 23. Plo I, Hernandez H, Kohlhagen G, Lautier D, Pommier Y, et al. Overexpression of the atypical protein kinase C reduces topoisomerase II catalytic activity, cleavable complexes formation, and drug-induced cytotoxicity in monocytic U937 leukemia cells. *J Biol Chem* 2002;277:31407-15.
 24. Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, et al. Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem* 2003;278:12696-702.
 25. Shiozaki K, Yanagida M. Functional dissection of the phosphorylated termini of fission yeast DNA topoisomerase-II. *J Cell Biol* 1992;119:1023-36.
 26. Luo KT, Yuan J, Chen JJ, Lou ZK. Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* 2009;11:204-10.
 27. Wells NJ, Addison CM, Fry AM, Ganapathi R, Hickson ID. Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alpha protein in vivo and is a substrate for casein kinase II in vitro. *J Biol Chem* 1994;269:29746-51.
 28. Li H, Wang Y, Liu X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II alpha in cell cycle progression. *J Biol Chem* 2008;283:6209-21.
 29. Qi XM, Hou SW, Lepp A, Li RS, Basir Z, et al. Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II alpha protein by p38 gamma mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *J Biol Chem* 2011;286:35883-90.
 30. Lane AB, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ. A novel chromatin tether domain controls topoisomerase II alpha dynamics and mitotic chromosome formation. *J Cell Biol* 2013;203:471-86.
 31. Corbett AH, Fernald AW, Osheroff N. Protein kinase C modulates the catalytic activity of topoisomerase II by enhancing the rate of atp hydrolysis: evidence for a common mechanism of regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 1993;32:2090-7.
 32. Corbett AH, Devore RF, Osheroff N. Effect of casein kinase-II-mediated phosphorylation on the catalytic cycle of topoisomerase II. Regulation of enzyme activity by enhancement of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 1992;267:20513-8.
 33. Takano H, Kohno K, Ono M, Uchida Y, Kuwano M. Increased phosphorylation of DNA topoisomerase-II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res* 1991;51:3951-7.
 34. Nakazawa N, Arakawa O, Ebe M, Yanagida M. Casein kinase II-dependent phosphorylation of DNA topoisomerase II suppresses the effect of a catalytic topo II inhibitor, ICRF-193, in fission yeast. *J Biol Chem* 2019;294:3772-82.
 35. Matsumoto Y, Takano H, Fojo T. Cellular adaptation to drug exposure: Evolution of the drug-resistant phenotype. *Cancer Res* 1997;57:5086-92.
 36. Ritke MK, Allan WP, Fattman C, Gunduz NN, Yalowich JC. Reduced phosphorylation of topoisomerase II in etoposide-resistant human

- leukemia K562 cells. *Mol Pharmacol* 1994;46:58-66.
37. Ganapathi R, Constantinou A, Kamath N, Dubyak G, Grabowski D, et al. Resistance to etoposide in human leukemia HL-60 cells: reduction in drug-induced DNA cleavage associated with hypophosphorylation of topoisomerase II phosphopeptides. *Mol Pharmacol* 1996;50:243-48.
 38. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:536-50.
 39. Mertins P, Qiao JW, Patel J, Udeshi ND, Clauser KR, et al. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods* 2013;10:634-7.
 40. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* 2015;43:D512-20.
 41. Wu Q, Cheng ZY, Zhu J, Xu WQ, Peng XJ, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid treatment reveals crosstalks among proteome, ubiquitylome and acetylome in non-small cell lung cancer A549 cell line. *Sci Rep* 2015;5:9520.
 42. Udeshi ND, Svinkina T, Mertins P, Kuhn E, Mani DR, et al. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-epsilon-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:825-31.
 43. Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, et al. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell* 2011;44:325-40.
 44. Povlsen LK, Beli P, Wagner SA, Poulsen SL, Sylvestersen KB, et al. Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat Cell Biol* 2012;14:1089-98.
 45. Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, et al. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol Cell Proteomics* 2011;10:M111.013284.
 46. Akimov V, Barrio-Hernandez I, Hansen SVF, Hallenborg P, Pedersen AK, et al. UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol* 2018;25:631-40.
 47. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, et al. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21:927-36.
 48. Tsai SC, Valkov N, Yang WM, Gump J, Sullivan D, et al. Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet* 2000;26:349-53.
 49. Johnson CA, Padget K, Austin CA, Turner BM. Deacetylase activity associates with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:4539-42.
 50. Chen MC, Chen CH, Chuang HC, Kulp SK, Teng CM, et al. Novel mechanism by which histone deacetylase inhibitors facilitate topoisomerase II alpha degradation in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011;53:148-59.
 51. Gilberto S, Peter M. Dynamic ubiquitin signaling in cell cycle regulation. *J Cell Biol* 2017;216:2259-71.
 52. Eguren M, Alvarez-Fernandez M, Garcia F, Lopez-Contreras AJ, Fujimitsu K, et al. A synthetic lethal interaction between APC/C and topoisomerase poisons uncovered by proteomic screens. *Cell Rep* 2014;6:670-83.
 53. Guturi KKN, Bohgaki M, Bohgaki T, Srikumar T, Ng D, et al. RNF168 and USP10 regulate topoisomerase II alpha function via opposing effects on its ubiquitylation. *Nat Commun* 2016;7:12638.
 54. Kang X, Song C, Du X, Zhang C, Liu Y, et al. PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation. *Sci Rep* 2015;5:17873.
 55. Fielding AB, Concannon M, Darling S, Rusilowicz-Jones EV, Sacco JJ, et al. The deubiquitylase USP15 regulates topoisomerase II alpha to maintain genome integrity. *Oncogene* 2018;37:2326-42.
 56. Senturk JC, Bohlman S, Manfredi JJ. Mdm2 selectively suppresses DNA damage arising from inhibition of topoisomerase II independent of p53. *Oncogene* 2017;36:6085-96.
 57. Ogiso Y, Tomida A, Lei SH, Omura S, Tsuruo T. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res* 2000;60:2429-34.
 58. Alchanati I, Teicher C, Cohen G, Shemesh V, Barr HM, et al. The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2 alpha cleavage complex - a potentially new drug target. *PLoS One* 2009;4:e8104.
 59. Sun Y, Miller Jenkins LM, Su YP, Nitiss KC, Nitiss JL, et al. A conserved SUMO-Ubiquitin pathway directed by RNF4/SLX5-SLX8 and PIAS4/SIZ1 drives proteasomal degradation of topoisomerase DNA-protein crosslinks. *BioRxiv* 2019. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/707661v1> [Last accessed on 20 Feb 2020]
 60. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 2005;18:1-12.
 61. Schellenberg MJ, Lieberman JA, Herrero-Ruiz A, Butler LR, Williams JG, et al. ZATT (ZNF451)-mediated resolution of topoisomerase 2 DNA-protein cross-links. *Science* 2017;357:1412-6.
 62. Dawlaty MM, Malureanu L, Jeganathan KB, Kao E, Sustmann C, et al. Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase II alpha. *Cell* 2008;133:103-15.
 63. Ryu H, Furuta M, Kirkpatrick D, Gygi SP, Azuma Y. PIASy-dependent SUMOylation regulates DNA topoisomerase II alpha activity. *J Cell Biol* 2010;191:783-94.
 64. Antoniou-Kourounioti M, Mimmack ML, Porter ACG, Farr CJ. The impact of the C-terminal region on the interaction of topoisomerase II alpha with mitotic chromatin. *Int J Mol Sci* 2019;20.
 65. Edgerton H, Johansson M, Keifenheim D, Mukherjee S, Chacon JM, et al. A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 2016;213:651-64.
 66. Chen SF, Huang NL, Lin JH, Wu CC, Wang YR, et al. Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II DNA-

- gate. *Nat Commun* 2018;9:3085.
67. Vanden Broeck A, Lotz C, Ortiz J, Lamour V. Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nat Commun* 2019;10:4935.
 68. Petrella S, Capton E, Raynal B, Giffard C, Thureau A, et al. Overall structures of mycobacterium tuberculosis DNA gyrase reveal the role of a corynebacteriales GyrB-specific insert in ATPase activity. *Structure* 2019;27:579-89.e5.
 69. Wendorff TJ, Schmidt BH, Heslop P, Austin CA, Berger JM. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J Mol Biol* 2012;424:109-24.
 70. Agostinho M, Santos V, Ferreira F, Costa R, Cardoso J, et al. Conjugation of human topoisomerase 2 alpha with small ubiquitin-like modifiers 2/3 in response to topoisomerase inhibitors: cell cycle stage and chromosome domain specificity. *Cancer Res* 2008;68:2409-18.
 71. Mao Y, Desai SD, Liu LF. SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 2000;275:26066-73.
 72. Blower TR, Bandak A, Lee ASY, Austin CA, Nitiss JL, et al. A complex suite of loci and elements in eukaryotic type II topoisomerases determine selective sensitivity to distinct poisoning agents. *Nucleic Acids Res* 2019;47:8163-79.
 73. Wessel I, Jensen LH, Renodon-Corniere A, Sorensen TK, Nitiss JL, et al. Human small cell lung cancer NYH cells resistant to the bisdioxopiperazine ICRF-187 exhibit a functional dominant Tyr165Ser mutation in the walker A ATP binding site of topoisomerase II alpha. *FEBS Lett* 2002;520:161-6.
 74. Renodon-Corniere A, Jensen LH, Nitiss JL, Jensen PB, Sehested M. Analysis of bisdioxopiperazine dexrazoxane binding to human DNA topoisomerase II alpha: decreased binding as a mechanism of drug resistance. *Biochemistry* 2003;42:9749-54.
 75. Jensen LH, Wessel I, Moller M, Nitiss JL, Sehested M, et al. N-terminal and core-domain random mutations in human topoisomerase II alpha conferring bisdioxopiperazine resistance. *FEBS Lett* 2000;480:201-7.
 76. Miller ML, Ponten TS, Petersen TN, Blom N. NetPhosK - Prediction of kinase-specific phosphorylation from sequence and sequence-derived features. *Febs J* 2005;272:111.

8. Objectifs de thèse

Les éléments reportés dans l'introduction de ce manuscrit font apparaître que les ADN topoisomérases sont des protéines essentielles pour le bon fonctionnement cellulaire. L'inhibition de leur expression ou la dérégulation de leurs activités ont des conséquences néfastes sur ce fonctionnement pouvant enclencher le mécanisme d'apoptose cellulaire, mais aussi perturber les processus comme la division cellulaire, ou engendrer ainsi l'apparition de pathologies comme le cancer. Leur interaction avec l'ADN et leur importance dans la régulation de la vie cellulaire en font des cibles majeures pour les thérapies cancéreuses et les maladies infectieuses.

Les agents anticancéreux visant les TopII α développés depuis des décennies déjà sont efficaces pour limiter, voire stopper la croissance tumorale. Cependant leurs nombreux effets secondaires, dus à un manque de spécificité pour les cellules cancéreuses et à une non distinction entre les isoformes TopII α et TopII β , affectent les patients atteints de ces maladies. Dans l'objectif de distinguer les différences entre les isoformes, nous avons analysé la distribution de leurs PTMs respectifs à partir d'une lignée cellulaire commune ne présentant pas de dérégulation du cycle cellulaire et comparé cette distribution avec celles trouvées dans la littérature. Enfin nous souhaitons comprendre comment ces modifications impactent *in vitro* l'activité et la structure de ces enzymes. Ces connaissances permettront une comparaison avec la distribution des PTMs issues de cellules cancéreuses et de comprendre plus en détail le rôle de ces modifications sur l'activité propre aux TopII.

Les connaissances actuelles sur les ADN topoisomérases de type 2A ont permis de comprendre comment ces protéines régulent la topologie de l'ADN par un mécanisme de coupure réversible de la molécule d'ADN. Néanmoins des détails mécanistiques, voire la structure tridimensionnelle de domaines manquent encore pour comprendre les conformations que ces protéines adoptent pour accomplir ces activités. Dans le but d'apporter des informations supplémentaires, l'équipe a entrepris de déterminer les structures des topoisomérases de type II α et β humaines et l'ADN gyrase de *E.coli* en complexe avec de l'ADN et des molécules thérapeutiques anti-Top2. L'intérêt de ce projet est de comprendre plus en détail les mouvements allostériques qui s'opèrent entre les domaines du corps catalytiques, d'obtenir une première visualisation structurale du domaine C-

terminal des TopII humaines et de caractériser finement les différences structurales entre les topoisomérases eucaryotes et procaryotes.

Ce manuscrit sera composé de trois chapitres. Le premier traitera des résultats et conclusions des projets portant sur l'étude des modifications post traductionnelles des TopII. Les chapitres deux et trois sur l'étude structure-fonction de respectivement les TopII humaines et de l'ADN gyrase.

Chapitre I : Analyse des phosphorylations et des acétylations des TopII α et β et de leurs impacts sur le couplage structure/fonction

1. Introduction et objectifs

Les topoisomérases sont des protéines clés intervenant dans la condensation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et dans la formation des complexes protéiques de régulation de la transcription au niveau de la chromatine²⁴⁹⁻²⁵¹. Ces processus étant régulés par des modifications post-traductionnelles (PTMs), des études ont été menées sur le rôle de ces modifications chez les TopII α , en particulier la phosphorylation. Des premières études ont montré que le taux de phosphorylation de la TopII α augmente avec le niveau protéique cours du cycle cellulaire. Le taux de phosphorylation est maximal lors du stade G2/M du cycle^{252,253}. Le rôle des phosphorylations dans la régulation de l'activité catalytique est toujours sujet à débat. Meyer et al. ont montré que l'augmentation du taux de phosphorylation est associée à une baisse d'activité de la TopII α dans les cellules A431 de carcinome épidermoïde²⁵³. Cependant des études plus récentes ont démontré que les phosphorylations catalysées par certaines kinases telles que la caséine kinase II α , la protéine kinase C ou encore ERK2 inhibent l'activité catalytique de la TopII α ^{252,254,255}.

D'autres études suggèrent que certaines phosphorylations de la TopII α n'ont pas d'influence sur son activité catalytique, telle que la phosphorylation de la sérine 1525 qui est impliquée dans la voie de signalisation du « décaténation checkpoint », mais dont la mutation en alanine ne semble pas affecter l'activité de décaténation¹¹⁷. De plus les phosphorylations de la TopII α semblent jouer un rôle dans le recrutement de partenaires protéiques ainsi que sur la localisation de la protéine tout au long du cycle cellulaire²⁵⁶. Les phosphorylations influencent la réponse aux traitements anticancéreux. En effet Takano et al. ont observé une hyperphosphorylation de la TopII α dans des cellules cancéreuses KB résistantes à l'étoposide qui conduit à une inhibition de l'activité de coupure de l'ADN¹⁷³. Cependant Ritke et al ainsi que Ganapathi et al. ont mis en évidence une hypophosphorylation de la TopII dans des lignées de cellules cancéreuses K562 et HL-60 également résistantes à l'étoposide^{171,172}. Le rôle de la phosphorylation chez la TopII α est donc encore mal compris.

À ce jour nous ne disposons que de très peu d'informations sur le rôle des acétylations. Les seules conclusions publiées ne concernent pas directement les sites mais montrent une modulation de l'activité de la TopII α en présence d'histone déacétylase^{257,258}.

Nous avons donc décidé d'identifier les phosphorylations et les acétylations sur les TopII α et β produites en cellules de mammifère et en levure par spectrométrie de masse. Ces caractérisations apporteront des informations sur les sites de PTMs présents dans des cellules en condition homéostatique ce qui permettra de compléter les données obtenues avec les modèles cellulaires utilisés pour l'investigation des PTMs chez les TopIIs. L'identification de ces sites permettra de comparer ces derniers dans les différents modèles cellulaires ; cellules en équilibre homéostatique ou cellules cancéreuses. Enfin ce sera la première étude qui comparera les modifications identifiées et leur influence sur les activités des deux isoformes humaines α et β dans les mêmes conditions de production et d'analyse. La comparaison des PTMs identifiées dans ces deux systèmes nous permettra de savoir si les échantillons sont hétérogènes d'un point de vue des PTMs suivant le moyen de production utilisé.

2. Production de la TopII α et de la TopII β

2.1. Clonage des nouvelles constructions des TopII α et β

Les plasmides codant pour les TopIIs humaines ont été élaborés dans le laboratoire avant le début de ma thèse. Les gènes étaient flanqués d'une séquence codant pour un tag de purification 10-histidine (10His) en C-terminal. De plus les constructions du laboratoire contenaient les séquences codant pour les 5 premiers résidus de la TopII de levure au lieu des 28 premiers résidus naturels en N-terminal (N-ter) pour l'isoforme α et des 40 premiers pour l'isoforme β . Enfin des recherches menées au sein du laboratoire ont montré que la présence de séquences de recombinaison attb1 et attb2, nécessaires pour un clonage de type Gateway, entraîne une diminution de la quantité de protéine recombinante produite²⁵⁹.

Afin de reconstituer les gènes entiers des deux isoformes et d'optimiser la quantité et la pureté de la protéine purifiée, nous avons entrepris de cloner ces gènes dans le plasmide pVOTE avec un double tag Streptavidine (2Strep) en N-terminal des séquences génomiques et un tag 10 Histidine (10His) en C-terminal et en enlevant la séquence attb1 (**Figure 48**). Le protocole de clonage pour les deux isoformes se trouve dans la section « Matériel et Méthode »

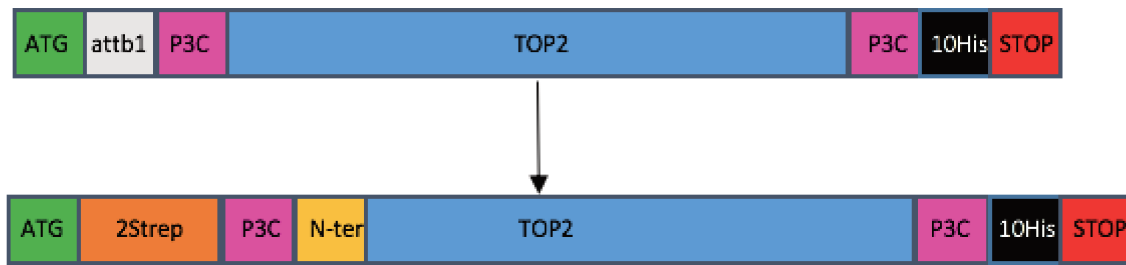


Figure 48 Schéma récapitulatif du clone final désiré. La séquence correspondant aux premiers acides nucléiques manquants en N-terminal pour les gènes codant les TopII humains est colorée en jaune et écrite « N-ter ». Les séquences d'acides nucléiques correspondant aux sites de coupure à la protéase 3C sont colorées en rose et notées « P3C ».

2.2. Analyse de la production en cellule de mammifère par Western-Blot

Une fois les nouvelles constructions obtenues, nous avons pu faire des tests d'expressions des 2 isoformes dans des cellules de mammifère en suspension BHK21 (Baby Hamster Kidney cells 21) à l'aide d'un virus modifié de la vaccine non pathogène pour l'Humain (voir Matériel et Méthodes).

Nous avons décidé d'utiliser des cellules BHK21 comme système d'expression afin de produire des protéines recombinantes proches des formes natives, notamment grâce à la présence de PTMs. Par ailleurs ces cellules peuvent être cultivées dans un milieu de culture ne nécessitant que peu de constituants pour la croissance de ces cellules, ce qui permet de réaliser des cultures à grande échelle²⁶⁰.

Des premiers tests d'expression à petite échelle ont été réalisés pour comparer l'ancienne et la nouvelle construction de chaque isoforme. Des échantillons avant et après induction ont été déposés sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 49**).

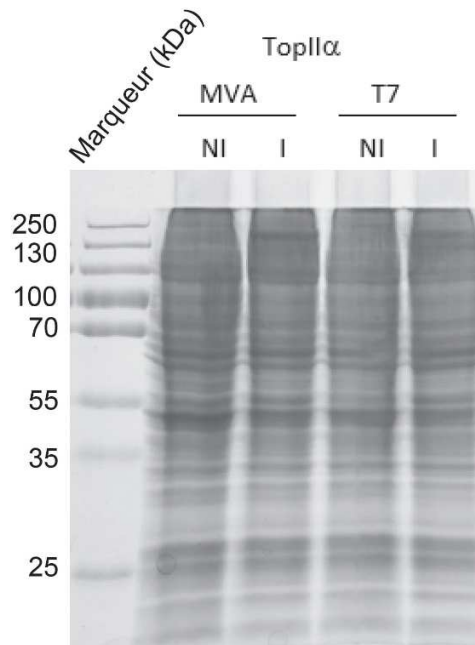


Figure 49 Gel d'expression en cellule de mammifère BHK21 coloré au bleu de Coomassie. Les annotations "NI" et "I" signifient respectivement les fractions non-induit et induit. Les annotations "MVA" et "T7" correspondent respectivement à l'ancienne et la nouvelle construction génétique.

Le gel de contrôle ne permet pas de conclure quant à la surproduction des topoisomérases dans ce système d'expression. Nous avons donc décidé de procéder à une détection de protéine par Western-Blot. Pour mettre en évidence la TopII α , nous avons utilisé des anticorps qui révèlent spécifiquement la séquence peptidique 1435-1531 de la TopII α . Un anticorps anti- β Actine ainsi qu'un anticorps anti-A27 ont été utilisés pour contrôler respectivement la quantité de protéines cellulaires déposées sur le gel et le taux de d'infection de la culture²⁶¹.

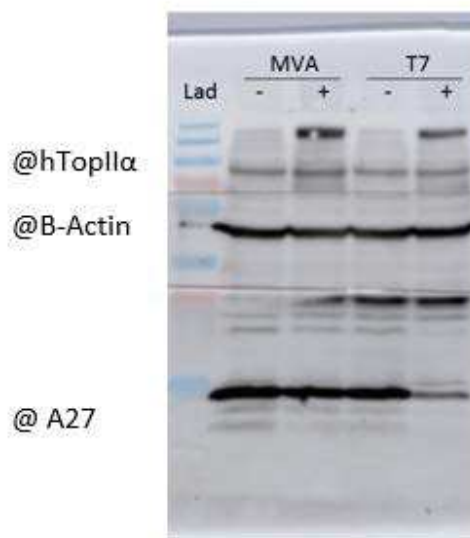


Figure 50 Comparaison de l'efficacité de l'induction et du taux d'expression de TopII α entre les deux constructions par Western-Blot. Les anticorps utilisés ciblent respectivement le CTD de la TopII α (@hTopII α), la protéine β -actin (@B-Actin) et une protéine du virus de la vaccine A27 (@A27). L'anticorps utilisé contre la TopII α provient de chez Sigma-aldrich référence WH0007153-100UG. Les anticorps utilisés contre la β -actin et A27 sont produit dans le service d'anticorps de l'IGBMC.

Le traitement des images et l'analyse de l'intensité des bandes de protéine par ImageJ ont montré que la nouvelle construction plasmidique permet de produire jusqu'à 2,5 fois plus de TopII α recombinante par rapport à l'ancienne construction plasmidique (**Figure 50**).

La même analyse a été envisagée pour étudier l'expression de la nouvelle construction de la TopII β en utilisant l'anticorps qui révèle spécifiquement la séquence peptidique 1435-1531 de la TopII β . Cependant la mise en évidence des protéines ciblées par l'anticorps anti-A27 et anti-Actine B n'a pas été concluante, ne permettant pas de contrôler la quantité de protéines déposées sur le gel, ni le taux d'infection de la culture. Nous n'avons donc pas pu conclure sur le taux de TopII β recombinante produite. Ce que l'on peut conclure c'est que le protocole d'induction fonctionne pour les nouvelles constructions (**Figures 50 et 51**) (Voir Matériel et Méthodes).

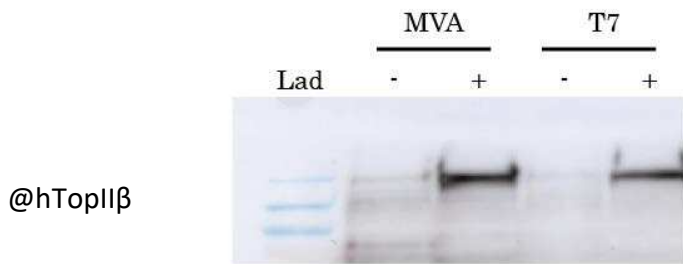


Figure 51 Test de l'efficacité de l'induction de l'expression de la TopIIβ en cellule BHK21 par WesternBlot. L'anticorps utilisé cible le CTD de la TopIIβ. L'anticorps utilisé contre la TopIIβ provient de chez Abcam référence 72334.

2.3. Purification de la TopIIα et β

Une fois les conditions de production définies, nous avons purifié les TopIIα et β à partir de culots cellulaires issus de 6L de culture.

Le protocole de purification mis au point avec les anciennes constructions débutait par une étape de lyse par sonication. Après centrifugation et récupération de la fraction soluble, une première étape de purification sur colonne d'affinité au nickel Ni²⁺ était effectuée. Les éluats étaient ensuite dialysés pour éliminer l'imidazole et diminuer la concentration en sel, puis une seconde étape de purification sur une colonne échangeuse d'ions/affinité Héparine était réalisée. Les rendements obtenus avec ce protocole de purification étaient de 1 mg/ litre de culture et de 0,5 mg/litre de culture respectivement pour la TopIIα et la TopIIβ.

Afin de mettre au point un protocole adapté aux nouvelles constructions, nous avons choisi de lyser par haute pression à l'aide d'un Emulsiflex C3, un homogénéisateur à haute pression, ce procédé permet une lyse plus efficace et permet donc de récupérer une plus grande quantité de protéine dans la fraction soluble tout en limitant la dégradation²⁶². Nous avons choisi d'ajouter du Chlorure de Potassium (KCl) en plus du Chlorure de Sodium (NaCl) aux tampons utilisés lors de la purification afin de mieux stabiliser les nucléoprotéines^{263,264}. Pour la première étape, nous avons choisi de conserver la purification sur colonne d'affinité au nickel Ni²⁺ qui est désormais effectuée en tandem avec une colonne d'affinité qui retient le tag Streptavidine des nouvelles constructions (**Figure 52a**). L'étape de dialyse n'est plus nécessaire puisque l'imidazole a été éliminé et la concentration en sel réduite grâce au passage sur la colonne d'affinité Streptavidine. Après coupure à la protéase P3C (Protéase 3C du Rhinovirus Humain type 14) (**Figure52b**) pour cliver les tags

de purification, la seconde étape est une purification sur colonne Héparine, avec non plus une élution avec gradient de NaCl mais une élution par un pallier de 350 mM NaCl et 350 mM KCl (**Figure 52c**).

Avec ces optimisations nous avons pu obtenir un rendement de 0,7mg/L de culture pour la TopII β et multiplier par 3,5 le rendement de la TopII α passant de 1 à 3,5mg/L de culture. En revanche pour les deux isoformes dans les 4 constructions nous observons toujours une bande de dégradation correspondant à 15% de l'échantillon total. (**Figure 52d**).

En conclusion nous avons optimisé la production et la purification des deux TopIIs humaines avec les nouvelles constructions.

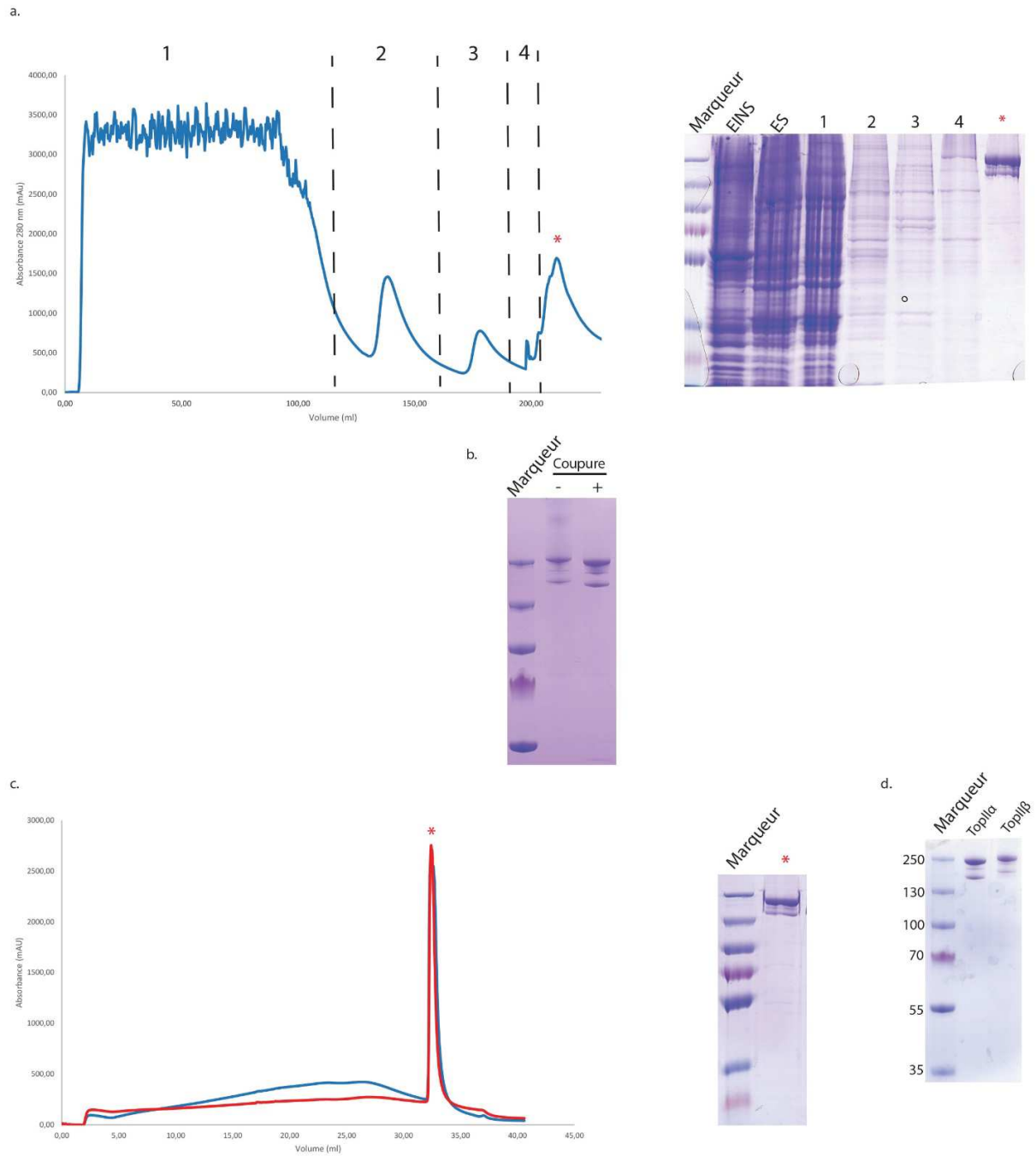


Figure 52 Purification des TopII_h. (a) Après lyse les échantillons sont soumis à une première étape de purification sur deux colonnes d'affinités Nickel et Streptavidine. Les fractions 1,2,3 et 4 correspondent dans l'ordre à 1 : l'injection de la fraction soluble, 2 : lavage avec 20 mM d'imidazole, 3 : lavage avec 60 mM d'imidazole, 4 : lavage avec 250 mM d'imidazole. L'astérisque correspond au pic d'éluion avec 3 mM de desthiobiotine. (b) Gel SDS-PAGE montrant l'efficacité de la coupure avec la protéase P3C. (c) Deuxième étape de purification sur une colonne échangeuse d'ion Héparine. L'astérisque correspond au pic d'éluion avec 750 mM de sel. (d) Gel gradient SDS-PAGE montrant la pureté obtenue à la fin du protocole de purification pour les deux isoformes avec une dégradation correspondant à environ 15% de l'échantillon total.

2.4. Tests fonctionnels

Après purification des topoisomérases, il est important de caractériser les échantillons obtenus. Leur activité de régulation de la topologie de l'ADN doit être testée, notamment leur capacité à relâcher de l'ADN surenroulé négativement. La TopII β ayant été produite en quantité suffisante pour la première fois dans le laboratoire, nous souhaitons comparer l'activité *in vitro* des TopII α et β (**Figure 53**). Ces deux protéines ont été purifiées et produites en utilisant le même protocole et présentent le même profil de pureté. Nous souhaitons également comparer l'activité des protéines produites à partir des anciennes et des nouvelles constructions pour comprendre si l'extrémité N-terminale joue un rôle dans l'activité catalytique des TopIIs, d'autant plus que les séquences de ce domaine diffèrent chez les deux isoformes (**Figure 54**) (*Annexe 1*).

Les résultats des tests de relâchement montrent que la TopII α est plus active que son homologue. En effet, les premiers topoisomères d'ADN relâchés sont visibles en présence de 2.5 nM de TopII α , contre 5.0 nM de TopII β avec des bandes de plus faible intensité. Il n'y a eu que très peu d'études menées sur la comparaison de l'activité *in vitro* de la TopII α et de la TopII β , seule une étude a montré que la constante de Michaelis Menten (K_m) est légèrement plus faible pour la TopII β que pour la TopII α ²⁶⁵.

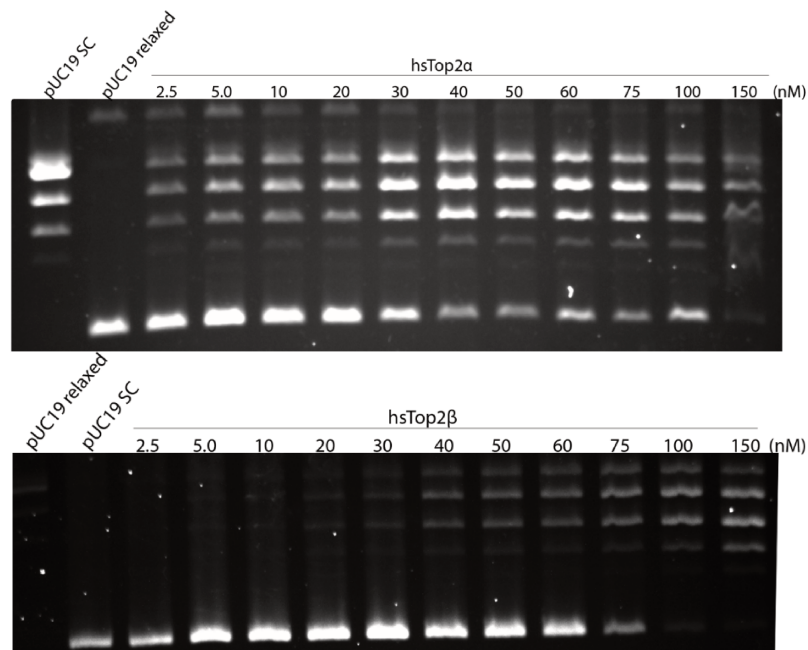


Figure 53 Test de relâchement de la TopII α et de la TopII β sur un ADN surenroulé négativement PUC 19.

Quant à l'impact de l'extrémité N-terminale des deux formes sur l'activité catalytique, il semble négligeable pour la TopII β . Pour la TopII α , on observe une diminution de l'intensité de la bande correspondant à l'ADN surenroulé à 15.0 nM, témoignant d'une augmentation de l'activité en l'absence des 28 premiers résidus de la protéine. Dans les anciennes constructions, les premiers résidus des TopIIs étaient remplacés par les 5 premiers résidus de la TopII de la levure *S. cerevisiae*. Les tests de relâchement de l'ADN pour la TopII β ont montré que ces résidus n'ont pas d'influence sur l'activité de relâchement *in vitro* (**Figure 54**). Les structures cristallographiques du domaine N-terminal de la TopII α ne contiennent pas les 28 premiers résidus⁶². Compte tenu du manque d'information sur la structure adoptée par ces 28 résidus, il est difficile de faire une hypothèse sur le rôle de cette extrémité dans le mécanisme d'action de la TopII α .

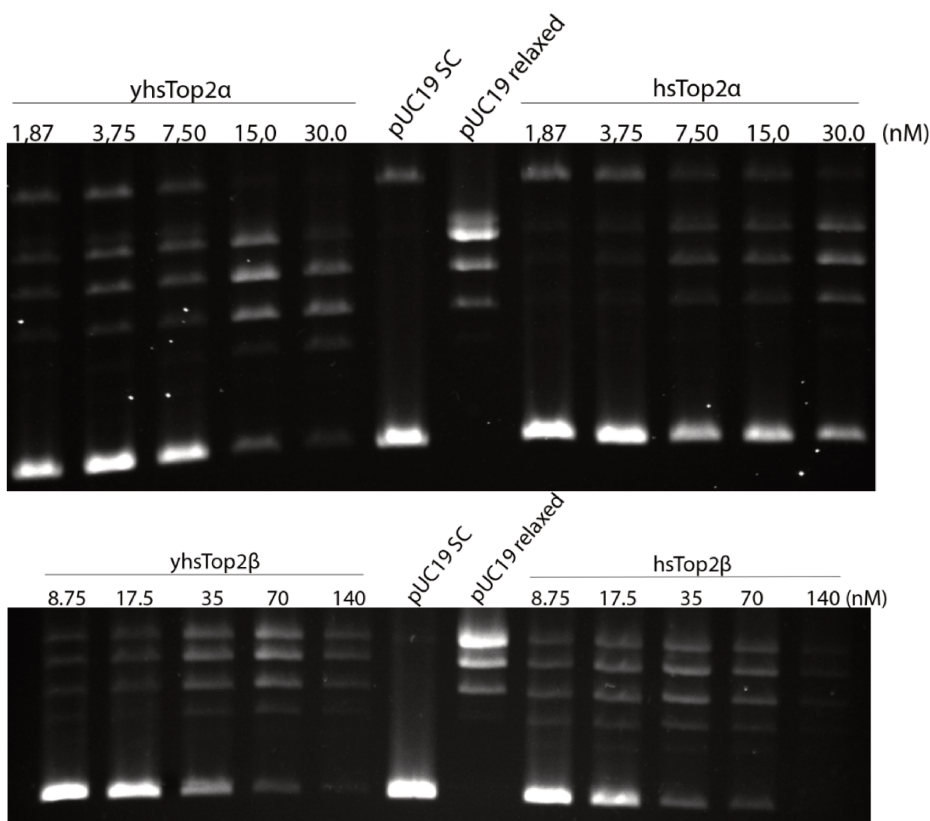


Figure 54 Comparaison de l'activité de relâchement des quatres constructions .

3. Identification des sites de phosphorylation et d'acétylation chez la TopIIα

L'identification des sites de phosphorylations et d'acétylations a été réalisée par spectrométrie de masse. Depuis quelques années, la spectrométrie de masse est une méthode de choix pour l'identification des PTMs. En effet, une faible quantité de protéine suffit pour mettre en évidence les modifications présentes, en un temps record et avec une grande sensibilité²⁶⁶.

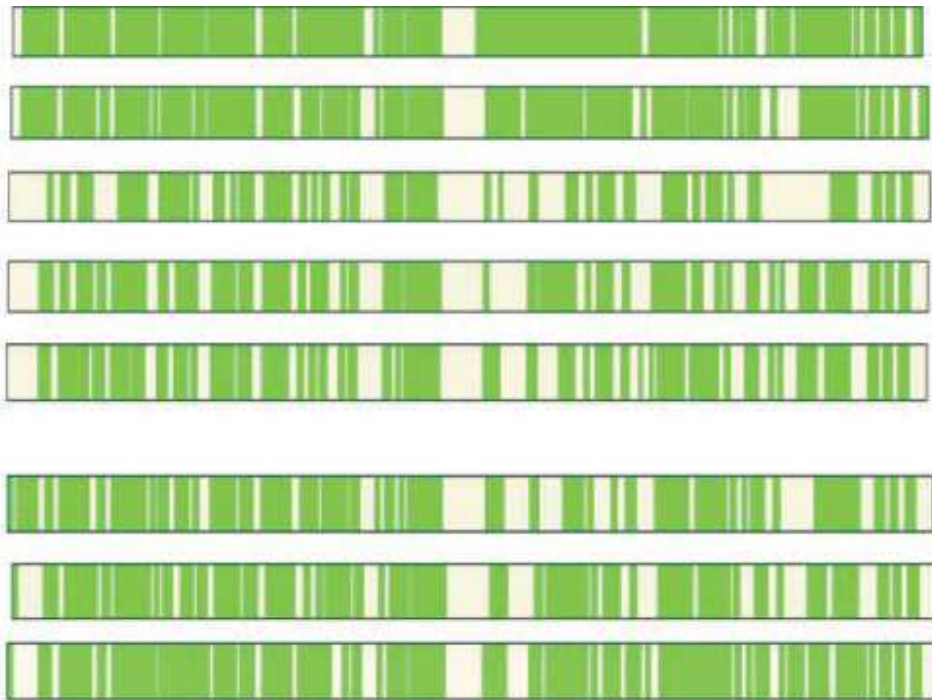


Figure 55 Couverture peptidique pour chaque analyse de spectrométrie de masse, concernant l'identification des sites de phosphorylation et d'acétylation sur la TopII α .

Les peptides identifiés en spectrométrie de masse couvrent en moyenne 70% de la séquence protéique de l'isoforme α . Seule la région entre les résidus 700 et 800 n'a jamais été couverte durant nos analyses, ce qui est dû à l'absence de site de coupure pour la trypsine et la chemotrypsine enzymes utilisées pour générer les peptides de la TopII α (**Figure 55**).

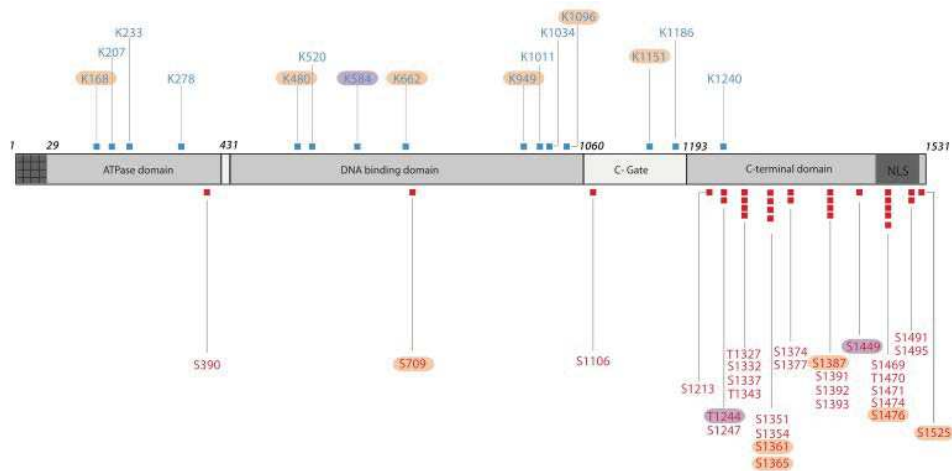


Figure 56 Identification des sites phosphorylation en rouge et des sites d'acétylation en bleu sur la TopII α surexprimée en levure ou en cellules de mammifère. Les positions encadrées en orange ont été identifiées uniquement dans la levure, les positions encadrées en violet ont été identifiées uniquement dans les cellules de mammifère. Figure issue de Bedez, Lotz et al.²⁶⁷

Nous avons ainsi identifié 29 sites de phosphorylations et 15 sites d'acétylations (**Figure 56**) (**Tableau 1**). Parmi les sites identifiés, 6 sites de phosphorylation ont été mis en évidence spécifiquement pour la TopII α recombinante produite dans la levure et 2 uniquement pour la TopII α produite dans les cellules BHK21. En ce qui concerne les acétylations, 6 sites ont été identifiés uniquement chez la protéine produite en levure et un site (K584) est acétylé uniquement quand la protéine est produite via le système BHK21.

À l'issue de nos 8 analyses, nous pouvons conclure que l'acétylation du résidu K1011 est celle qui a été identifiée le plus souvent. L'acétylation des résidus K168, K584, K949 et K1096 n'ont pu être identifiés que lors d'une seule analyse. Nous avons pu identifier que 11% des phosphorylations sont sur le corps catalytique. L'extrémité C-terminale est également très phosphorylée à partir du résidu S1374, 14 des 18 sérines sont phosphorylées.

À partir de ces résultats, nous avons pu conclure que 89% des résidus phosphorylés sont situés dans le domaine C-terminal alors que la majorité des sites d'acétylation a été identifiée sur le corps catalytique, à l'exception du résidu K1240, unique acétylation du domaine C-terminal. De plus, nous n'avons pas mis en évidence de modifications entre les résidus 800 et 948 qui couvrent la majeure partie du domaine WHD et le début du domaine Tower.

	Résidus	S.Cerevisiae	BHK21	Détections
	K168	1	0	1
	K207	2	1	3
	K233	3	2	5
	K278	3	1	4
	K480	3	0	3
	K520	3	2	5
	K584	0	1	1
	K662	2	1	3
	K949	1	0	1
	K1011	5	3	8
	K1034	3	1	4
	K1096	1	0	1
	K1151	2	0	2
	K1186	3	0	3
Acétylations	K1240	4	2	6

	Résidus	S.Cerevisiae	BHK21	Détections
	S390	1	2	3
	S452	1	0	1
	T453	1	0	1
	S497	1	0	1
	S709	3	0	3
	S1106	4	3	7
	S1213	5	3	8
	T1244	0	2	2
	S1247	5	3	8
	T1327	2	1	3
	S1332	4	2	6
	S1337	3	1	4
	T1343	3	1	4
	S1351	2	1	3
	S1354	1	1	2
	S1361	1	1	2
	S1365	1	1	2
	S1374	5	3	8
	S1377	5	3	8
	S1387	2	0	2
	S1391	4	2	6
	S1392	4	2	6
	S1393	4	3	7
	S1449	0	1	1
	S1469	5	3	8
	T1470	3	2	5
	S1471	4	3	7
	S1474	4	3	7
	S1476	1	0	1
	S1491	1	3	4
	S1495	5	3	8
Phosphorylations	S1525	2	0	2

Tableau 1 Nombre d'identification pour chaque site de phosphorylation et d'acétylation de la TopII α . La colonne « Détections » représente le nombre de fois que le site est identifié dans les deux systèmes d'expression et la barre est une visualisation comparative de ce chiffre avec les autres sites. Les cellules colorées en bleu désignent les sites identifiés dans les deux systèmes d'expression.

Lorsque l'on reporte les PTMs identifiés sur les structures du domaine ATPase⁶² et du domaine de liaison de l'ADN ou porte à ADN¹⁴⁹, on observe que les résidus K207 et K168 font partie du domaine GHKL (**Figure 57**). K168 interagit avec la molécule d'ATP, K233 et K278 sont localisées dans le domaine Transducer. Sur la porte à ADN, K662 et K1011 interagissent avec l'ADN. Tandis que les autres lysines se situent à la surface de la porte à ADN, S709 est localisée près de l'ion Mg²⁺. S390 est localisée à la jonction du domaine GHKL et Transducer. Quant au résidu S1106, il est situé dans le domaine C-Gate au sein d'une boucle flexible.

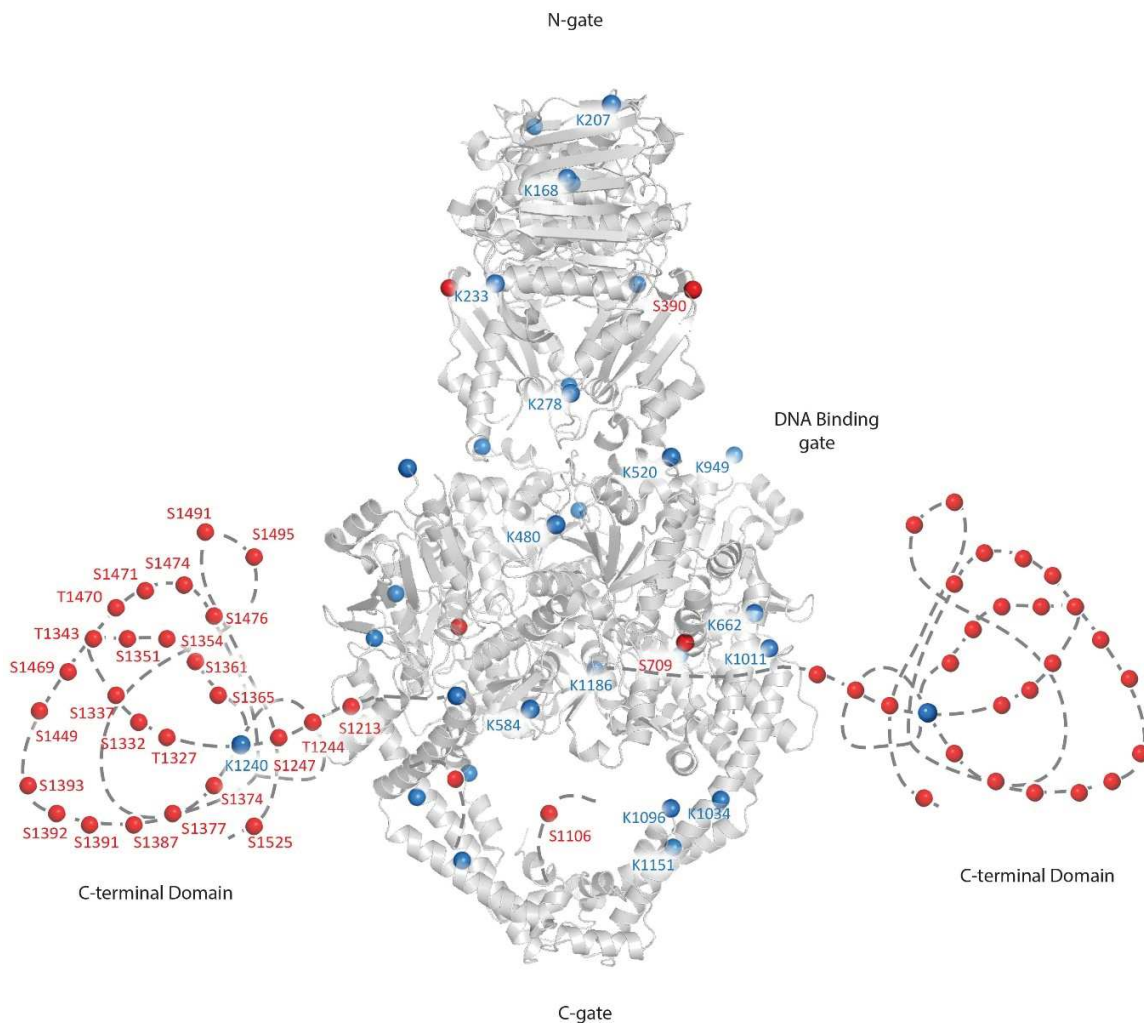


Figure 57 Localisation des sites de phosphorylation en rouge et d’acétylation en bleu sur la structure tridimensionnelle des domaines de la TopII α (PDB ID : 1ZXM et 5GWK). **Figure** issue de Bedez, Lotz et al.²⁶⁷

4. Publication Bedez.C, Lotz.C etal. Scientific Reports 2018 “Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain”

Suite à l’identification des sites de phosphorylation et d’acétylation de la TopII α , nous avons décidé d’étudier le rôle du résidu K168. Nous avons mis en évidence que la lysine 168 pouvait être acétylée chez les TopII α produites en levure. Au terme de nos analyses nous n’avons pu observer qu’une fois cette acétylation. Cette position n’a jamais été répertoriée dans les bases de données.

Cette lysine se trouve au sein d'un réseau d'interaction qui maintient la molécule d'ATP au sein du domaine GHKL. Plus précisément, ce résidu est situé à la base d'une boucle flexible qui se referme sur la molécule d'ATP, permettant ainsi le bon déroulement de la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Cette lysine est strictement conservée chez les eucaryotes et devient une sérine chez les procaryotes. Cette distinction entre les deux branches phylogéniques suggère une différente stabilisation de l'ATP et témoigne donc d'un possible impact de ce résidu sur l'activité catalytique des TopII α . Pour comprendre le rôle du résidu K168 dans l'activité catalytique et dans la structure de la TopII α , nous avons décidé de muter cette lysine en alanine.

Les résultats de notre étude sur le rôle du résidu K168 ainsi que l'identification des phosphorylations et des acétylations sur la TopII α ont été publiés dans le journal Scientific Reports en 2018. Les premiers travaux de cette étude ont débuté avant mon arrivée dans le laboratoire. Ma contribution à ce travail a été la mise en place du clonage et de la production de la TopII α avec la construction comprenant l'extrémité N-terminale complète en cellules de mammifères ainsi que la caractérisation biochimique et biophysique de l'impact de la mutation K168A.

Cette étude a permis de mettre en évidence une possible régulation de l'activité de la TopII α par l'acétylation à travers le couplage activité/dimérisation du domaine ATPase.

Les informations supplémentaires sont accessibles en cliquant sur le lien suivant :

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-018-27606-8/MediaObjects/41598_2018_27606_MOESM1_ESM.pdf

SCIENTIFIC REPORTS



Correction: Publisher Correction

OPEN

Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain

Claire Bedez¹, Christophe Lotz¹, Claire Batisse¹, Arnaud Vanden Broeck¹, Roland H. Stote¹, Eduardo Howard³, Karine Pradeau-Aubretton¹, Marc Ruff¹ & Valérie Lamour^{1,2}

Type 2 DNA topoisomerases (Top2) are critical components of key protein complexes involved in DNA replication, chromosome condensation and segregation, as well as gene transcription. The Top2 were found to be the main targets of anticancer agents, leading to intensive efforts to understand their functional and physiological role as well as their molecular structure. Post-translational modifications have been reported to influence Top2 enzyme activities in particular those of the mammalian Top2 α isoform. In this study, we identified phosphorylation, and for the first time, acetylation sites in the human Top2 α isoform produced in eukaryotic expression systems. Structural analysis revealed that acetylation sites are clustered on the catalytic domains of the homodimer while phosphorylation sites are located in the C-terminal domain responsible for nuclear localization. Biochemical analysis of the eukaryotic-specific K168 residue in the ATPase domain shows that acetylation affects a key position regulating ATP hydrolysis through the modulation of dimerization. Our findings suggest that acetylation of specific sites involved in the allosteric regulation of human Top2 may provide a mechanism for modulation of its catalytic activity.

Type 2 DNA topoisomerases (Top2) are part of essential protein complexes involved in DNA replication, chromosome condensation and segregation, as well as gene transcription^{1–3}. The Top2 are highly conserved enzymes and catalyze the transport of a DNA duplex through a transient double strand break to release catenates, relax supercoils and remove entanglements⁴.

Top2 are among the main targets of anticancer agents, prompting intensive efforts to understand the functional and physiological role of this enzyme family as well as their molecular structure⁵. Vertebrate organisms possess two isoforms, Top2 α and Top2 β , encoded by distinct genes^{6–8}. The human Top2 isoforms share considerable sequence identity and form functional homodimers with three protein interfaces or gates comprising the ATPase domain, the DNA binding-cleavage domain and the C-terminal domain (Fig. 1a). Tridimensional structures of the ATPase and the DNA binding domains have been solved by X-ray crystallography^{9–11}. The α and β isoforms diverge mainly in their C-terminal domain, whose structure remains unknown and may account for the functional differences of the isoforms. Expression of the Top2 α isoform is regulated in a cell cycle dependent manner in proliferative cells¹². The β isoform plays a more specialized physiological role as this isoform has been shown to be essential for the final stage of neural differentiation^{13,14}.

Post-translational modifications of Top2 isoforms have been found to influence enzyme activity, stability and subcellular localization¹⁵. Among them, phosphorylation sites are the best characterized with a number of studies showing their impact on the regulation of Top2 enzyme function, nuclear localization and control of cell cycle checkpoint^{16–22}. Both isoforms of human Top2 are phosphorylated throughout the cell cycle and some positions are hyperphosphorylated during G2/M^{21,23–25}. In addition, ubiquitination, SUMOylation and several acetylation events were identified but the correlation with the cell cycle, protein recruitment or regulation of Top2 function is not yet fully understood^{26,27,15}. Furthermore, inhibition of Top2 α by anti-cancer drugs is known to be modulated

¹Université de Strasbourg, CNRS UMR7104, INSERM U1258, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. ²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. ³Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos, Conicet, La Plata, Argentina. Claire Bedez and Christophe Lotz contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.L. (email: lamourv@igbmc.fr)

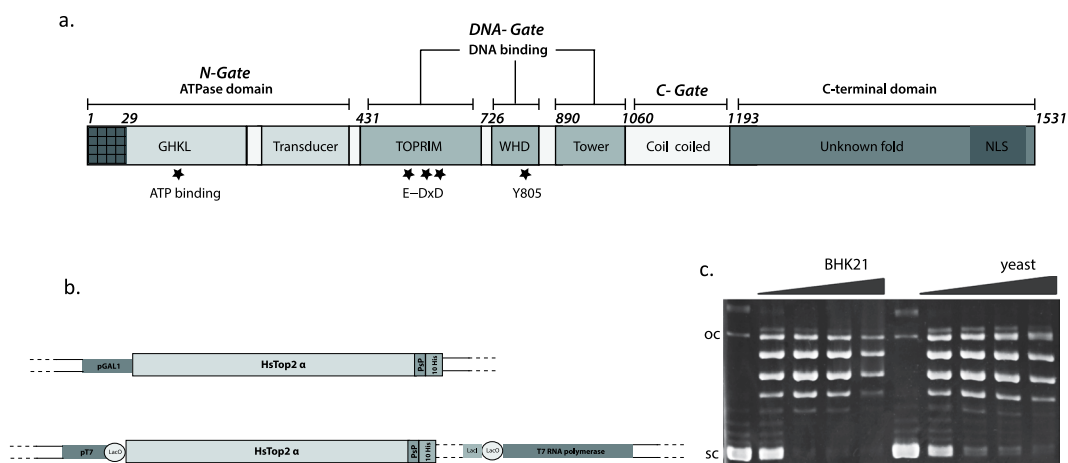


Figure 1. Production of the Top2 α enzyme in yeast and mammalian cells. (a) Domain organization of the human Top2 α . The ATPase domain contains 2 subdomains, the “GHKL” ATP binding domain and the transducer domain forming the N-Gate. The DNA binding site comprises 3 subdomains and form the DNA-gate: the Toprim domain containing the acidic triad E-DxD involved in metal binding, the Winged Helix Domain (WHD) with the conserved catalytic tyrosine, and the tower domain. The C-gate is formed by the coiled coil domain followed by the C-terminal domain containing Nuclear Localization Signal (NLS). (b) Overexpression constructs in yeast and mammalian cells. The Top2 α gene was cloned after the pGal1 promoter for expression in yeast. For expression in BHK21 mammalian cells, the Top2 α gene is integrated in the modified virus Ankara (MVA) genome. The LacO operator is upstream of T7 RNA pol and the Top2 α genes, allowing a double control of both Top2 α and T7 RNA polymerase expression by LacI. PsP: PreScission protease cleavage site, 10 His: 10 histidines tag. (c). DNA relaxation assay of the recombinant produced in yeast and mammalian cells. Negatively supercoiled DNA was incubated with increasing concentration of Top2 α (0, 8, 17, 36, 72 nM) and migrated in a 1% agarose gel incubated with ethidium bromide. oc: open circular DNA, sc: supercoiled DNA.

by phosphorylation^{28–30}. Hyperphosphorylation of the α isoform has been reported in etoposide resistant cells, while other studies associated a hypophosphorylation of the enzyme after doxorubicin treatment^{29,31,32}.

Overexpression protocols in the yeast system were set up for the yeast enzyme in the late 80 s, and for the human isoforms in the early 90 s^{33–35}. Despite improvements of protocols to obtain pure protein, eukaryotic systems used to generate recombinant Top2 are expected to produce a complex set of posttranslational modifications that remains largely uncharacterized and could impact *in vitro* functional and inhibition assays. Further studies are important to characterize such modifications.

In this work, we have mapped and compared phosphorylation and acetylation sites of the human Top2 α isoform overexpressed in *S. cerevisiae* and BHK21 mammalian cells. We report the acetylation sites of the Human Top2 α isoform (HsTop2 α), clustered on the catalytic domains. Using point mutation, biochemical assays, biophysics approaches and molecular dynamic simulations, we have analyzed the role of a eukaryotic-specific position located in the ATP binding pocket of the enzyme, highlighting the catalytic mechanism that is targeted by acetylation.

Overall, our study shows that post-translational modifications may impact conserved residues of Top2 α and not only variable regions. It also suggests that the post-translational modifications of the recombinant enzymes should be taken into account when analyzing their functional properties and sensitivity to inhibitors.

Results

Optimization of the HsTop2 expression in yeast and mammalian cells. cDNA for the Top2 isoforms were inserted in a pYEP24 derived yeast expression plasmid using restriction enzymes more than two decades ago^{34,35}. To facilitate the purification of these large enzymes, we added a 10-histidine tag and a protease cleavage site at the 3' end of the genes (Fig. 1b). The plasmids were transformed in the yeast JEL1 Gal⁺ strains auxotrophic for uracil as previously described³⁵. To improve expression, we switched from a lactate/glycerol medium to a raffinose medium that is not repressive, allowing a faster induction of expression³⁶. Overall, we could shorten and simplify the expression protocol to 3 days from plasmid transformation to cell harvesting compared with former published procedures. The 170 kDa protein was purified using a nickel affinity and then a heparin chromatographic step with a final yield of 1 mg per liter of culture (Figure S1).

The overexpression of the enzyme in BHK21 mammalian cells was achieved using the Modified vaccinia virus Ankara (MVA) encoding the full length genes as a vector under the control of a T7 promoter (Fig. 1b). This strategy was previously used to successfully express eukaryotic proteins³⁷. The protein purification was performed with the protocol optimized for the HsTop2 α overexpressed in *S. cerevisiae*. The final yield obtained from MVA infected BHK21 cells was 1.5 mg per liter of culture (Figure S1).

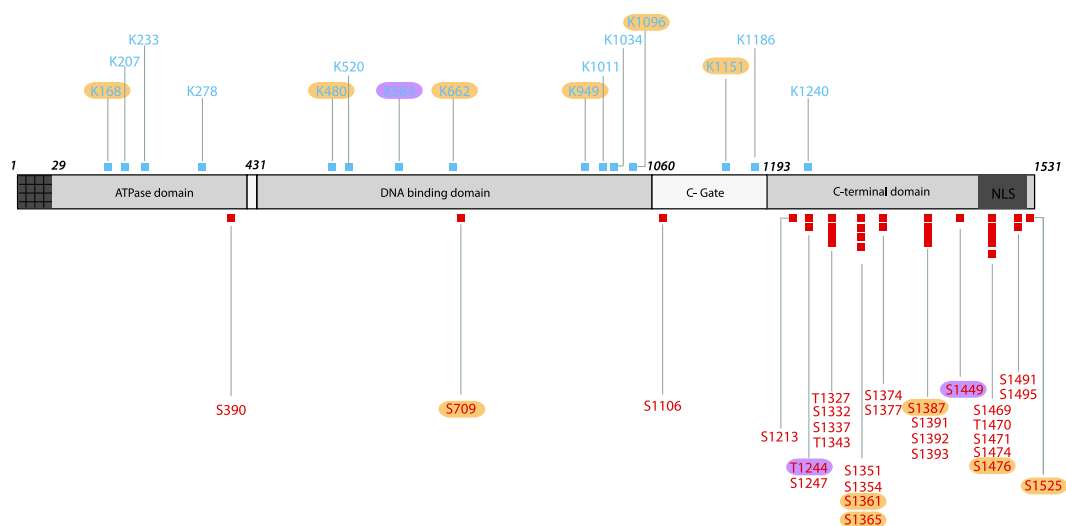


Figure 2. Post-translational modifications of the human Top2 α identified by mass spectrometry. Phosphorylation (red squares) and acetylation (blue squares) sites are reported on the HsTop2 α primary sequence. Modifications that were mostly detected in Sc-HsTop2a or in BHK21-HsTop2a in the experimental replicates are highlighted in orange and in magenta respectively.

Characterization of the *in vitro* activities of the recombinant Top2 α isoform. We compared the catalytic activities of the recombinant protein produced from *S. cerevisiae* (Sc-HsTop2a) and BHK21 cells (BHK21-HsTop2a). DNA relaxation assays using the recombinant Sc-HsTop2a and BHK21-HsTop2a show that the enzyme starts relaxing negatively supercoiled DNA with a protein concentration of 8 nM and that the DNA is fully relaxed at 17 nM for both enzymes (Fig. 1c). These data are in agreement with published data indicating that the recombinant enzymes are similar and fully functional for DNA relaxation activities when produced from either of the two expression systems³⁴.

We also determined the ATP hydrolysis rate of Sc-HsTop2a and BHK21-HsTop2a with a steady state coupled PK/LDH ATPase assay³⁸. Both enzymes produced in yeast or mammalian cells have an equivalent rate of ATP hydrolysis with a k_{cat} of $2.05 \pm 0.035 \text{ s}^{-1}$ for Sc-HsTop2a and $2.7 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$ for BHK21-HsTop2a. These values are similar to the values found for the endogenous and overexpressed enzymes previously reported in the literature^{39,40}.

Identification of the HsTop2a phosphorylation and acetylation sites. The purified recombinant enzymes were trypsin-digested and the peptides analyzed by LC-MS/MS using an Orbitrap mass spectrometer. Phosphorylated peptides were enriched through affinity columns prior to analysis. Overall, 86% of the peptide sequence was covered following the in-gel trypsin digestion. To compensate for the relative abundance of particular modified positions, we performed at least 3 separate experiments to complete the analysis (supplemental material 5). We detected 27 phosphorylation sites and 14 acetylation sites for the Sc-HsTop2a protein, and 23 phosphorylation sites and 9 acetylation sites for the BHK21-HsTop2a protein (Fig. 2). In the technical replicates, 21 phosphorylation and 8 acetylation sites were consistently found at the same positions in the recombinant protein monomer expressed in yeast or mammalian cells, suggesting an equivalent level of modification in both eukaryotic expression systems. Using a malachite green assay⁴¹, we were able to calculate that the Top2 α samples produced in yeast or BHK21 cells contain an average of 7 ± 1 phosphates per Top2 α subunit, meaning that at most one third of all sites are phosphorylated. There is no available standard deacetylation assay that we could use to assess the acetylation status of our sample. Similar to the heterogeneity in phosphorylation, we expect that the Top2 α sample produced in yeast and mammalian cells is only partially acetylated.

Phosphorylated residues were mostly clustered in the C-terminal domain, with only 1 phosphorylation in each of the ATPase, DNA binding and C-gate domains. On the contrary, acetylation sites were found homogeneously on residues located in the ATPase and DNA binding domain, with only one acetylated residue was at the entrance of the C-terminal domain in a region that is not visible in the available crystal structures (Fig. 3). The acetylation sites are spread out over the catalytic domains with 10 positions on the DNA gate and C-gate, and 4 in the ATPase domain.

Functional analysis of position K168. Among the ATPase domain positions, Lysine 168 was found acetylated only once out of several determinations in the recombinant Top2 α sample produced in yeast, indicative of a low occurrence of this modification. Lysine 168 lies in a conserved sequence motif within the GHKL domain of eukaryotic Top2 and is replaced by a Serine in prokaryotic organisms (Fig. 4a). This residue is positioned at the base of the ATP lid, a flexible loop wrapping around the ATP molecule (Fig. 4b). As revealed by the sequence alignment, the primary sequence of the ATP lid is largely divergent between eukaryotes and prokaryotes. The interactions maintaining the base of the loop in presence of ATP are as a consequence driven by different interaction networks

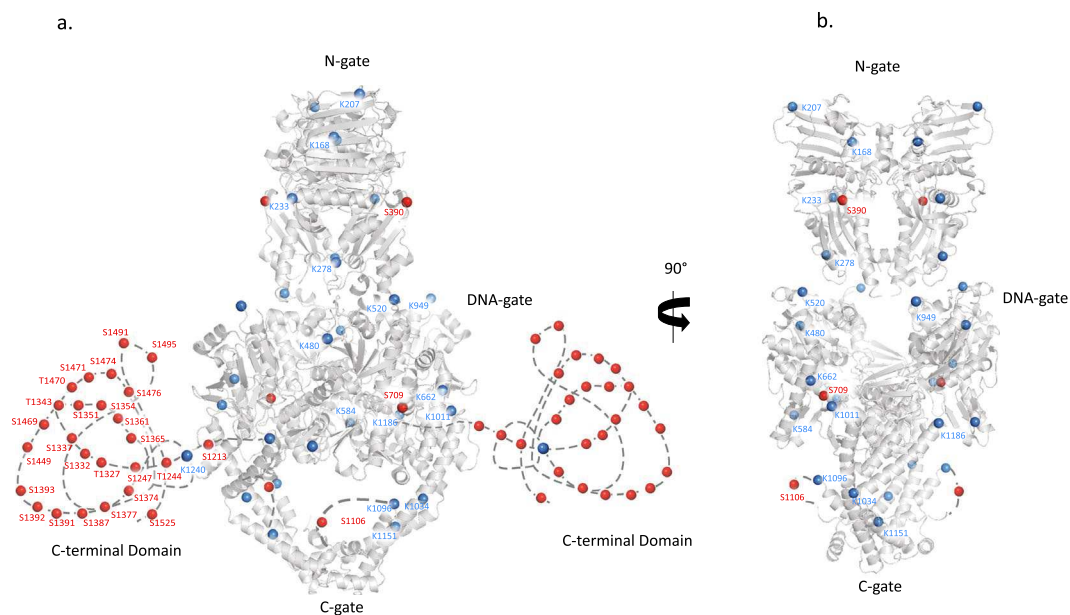


Figure 3. Distribution of acetylation and phosphorylation sites on the Top2 α structural domains. Identified phosphorylation (red) and acetylation (blue) sites were reported on the human Top2 α domain structures. The ATPase domain (PDBID: 1ZXM) and the DNA binding domain without DNA (PDBID: 5GWK) of the Top2 α isoform appear in grey cartoon. Position numbers have been inserted only on one of the monomer chain of the dimeric structure for clarity. (a) Front view of the structure with the C-terminal domains (CTD) of the eukaryotic Top2 depicted as a dashed line on each side of the catalytic core. (b) Side view of the structure showing the position of modifications on the catalytic domains in a different orientation (structures rotated 90° relative to a.) The CTD domains have been omitted for clarity. A movie is provided in the supplemental material. Figures were generated using PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

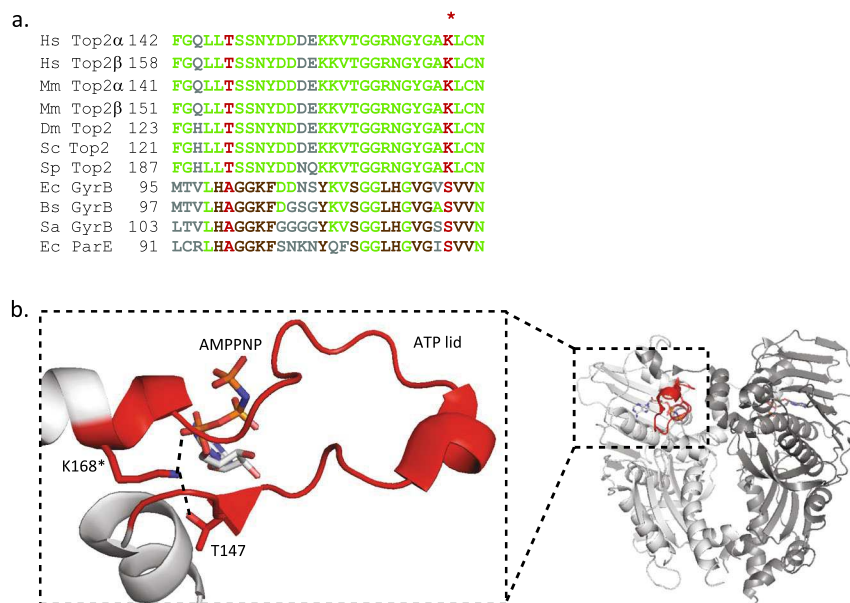


Figure 4. Interactions mediated by residue K168 in the ATPase domain. (a) Sequence alignment of the ATP lid. Conserved positions are colored in green, conserved positions in the prokaryotic sequences in brown. Positions delimiting the beginning and end of the loop are indicated in red. The acetylated position K168 in the HsTop2 α is indicated by a star. *Hs*: homo sapiens, *Mm*: mus musculus, *Dm*: drosophila megalonaster, *Sc*: saccharomyces cerevisiae, *Sp*: saccharomyces pombe, *Ec*: escherichia coli, *Bs*: bacillus subtilis, *Sa*: staphylococcus aureus. b. Structure representation of the ATP lid. The ATPase domain of the human Top2 α isoform (PDB:1ZXM) appears as a light gray ribbon with the ATPase domain loop (ATP lid) in red circling the γ -phosphate of the AMP-PNP molecule. K168 is located at the basis of the ATP lid and forms 2.8 Å hydrogen bonds with the AMP-PNP α -phosphate and Thr147 (dashed lines). Figures were generated using PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

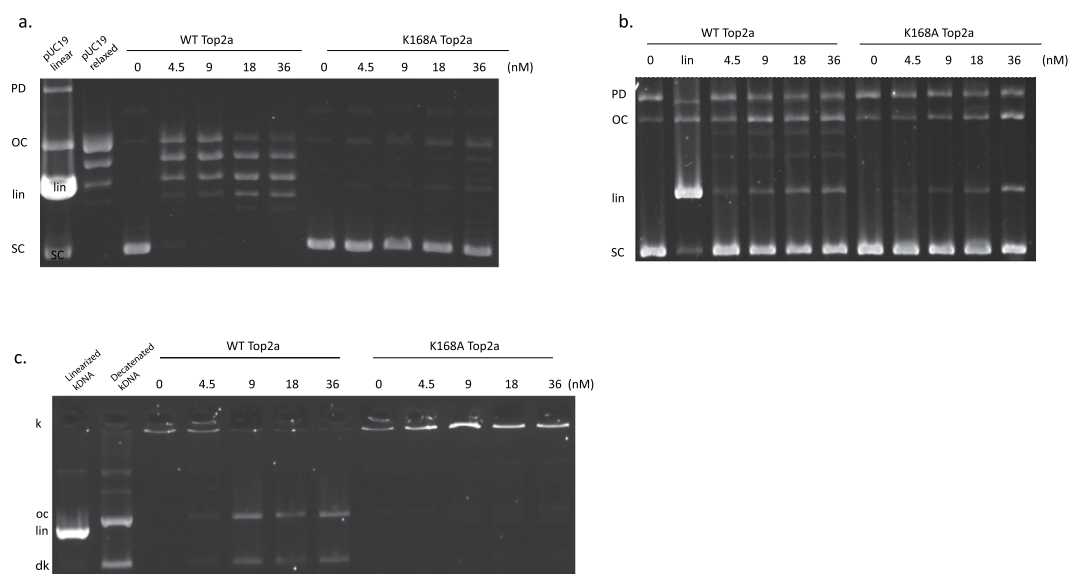


Figure 5. Activities of the Top2 α -K168A mutant. **(a)** DNA relaxation assays showing a decrease in activity for the mutant enzyme. **(b)** DNA cleavage assays with etoposide show an impaired cleavage of the K168A mutant when compared with the same concentrations of WT enzyme. **(c)** Decatenation assays show that the mutant is inactive when compared with the WT enzyme. Reactions were run on a 1% agarose gel incubated with ethidium bromide. OC = open circular DNA, SC = supercoiled DNA, lin = linear DNA, PD = pUC19 dimers, k = catenated DNA, dk = decatenated DNA.

(Figs 4b and S5). Lysine 168 is forming a direct hydrogen bond with the ATP molecule. This led us to analyze more precisely the role of this position in the catalytic function of the human Top2 α .

To probe the role of lysine 168, we mutated Lysine 168 to Alanine in the full length enzyme (HsTop2 α ^{K168A}). The mutant was overexpressed in yeast and purified with our optimized protocol resulting in a similar yield as the WT enzyme. DNA relaxation and cleavage activities are impaired for the K168A mutant when compared with the same concentration range of the WT enzyme (Fig. 5a,b). The ATPase domain mutation has a strong impact on the decatenation activity, which is completely abolished (Fig. 5c). ATP hydrolysis enzymatic assays showed that catalytic activity of the mutant is decreased as much as 7-fold ($K_{cat} = 0,3 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$) compared with the WT ($K_{cat} = 2,05 \pm 0,035 \text{ s}^{-1}$) although not completely abolished.

To probe the role of K168 in the stabilization of the ATPase domain, we purified the ATPase domain (residue 29 to 428) bearing the K168A mutation (ATPase^{K168A}), as well as the WT domain, using a modified version of a previously published protocol⁹. To analyze the stability of the ATPase^{K168A} domain compared with the wild type ATPase domain, we performed thermal shift assays using differential scanning fluorimetry (NanoDSF)⁴². The wild type ATPase domain displays a melting temperature (T_m) of 49.2 °C with a thermal shift to 74 °C in presence of AMP-PNP, a non hydrolysable analog of ATP (Fig. 6a). The thermal shift of over 20 °C is consistent with a stabilization of the ATPase domain in the presence of AMP-PNP, in agreement with the well documented transition from the monomeric to the dimeric state of ATPase domains, upon AMP-PNP binding. Ionic strength variations in the buffer conditions did not affect the transition of the melting temperature, indicating a very strong stabilization of the WT domain in the presence of AMP-PNP (data not shown). For the mutant domain ATPase^{K168A}, we recorded a T_m of 50.7 °C without AMP-PNP, and 51.1 °C when AMP-PNP was added (Fig. 6b). The temperature shift of 0.4 °C within the error margin suggests no stabilization of the ATPase^{K168A} domain in the presence of AMP-PNP.

To investigate the dimerization state of the mutant and wild type domains, we performed an analytical size exclusion chromatography with and without AMP-PNP. The ATPase domain was eluted at 15.1 ml with a shift to 14.1 ml in the presence of AMP-PNP (Fig. 6c). This 1 ml elution shift corresponds to the formation of a 94 kDa dimeric form in agreement with the calibration curve of the gel filtration column. The ATPase^{K168A} domain was eluted at 15.1 ml, both in absence and in presence of AMP-PNP (Fig. 6d), corresponding to the 47 kDa monomeric form of the ATPase domain, showing that no dimerization occurs for the mutant domain in the presence of AMP-PNP (Figure S6).

Molecular modeling and dynamic simulation. Normal mode analysis is a computational method to study molecular deformational motions that are widely involved in biological functions of macromolecules. It was shown in previous studies that the lowest-frequency modes contribute significantly to large-scale displacements and can provide important information on domain motions⁴³. Focusing only on these modes, we quantified the intrinsic dynamics (flexibility) of the homodimer and the effects of both the K168A mutation, as well as K168 acetylation on the ATP binding domain monomer. The results for the atomic fluctuations of the wild-type dimer were compared with the fluctuations calculated from the crystallographic B-factors of the corresponding crystal structure (Figure S2). A good correspondence is found between the computed and experimental values. We find that loop

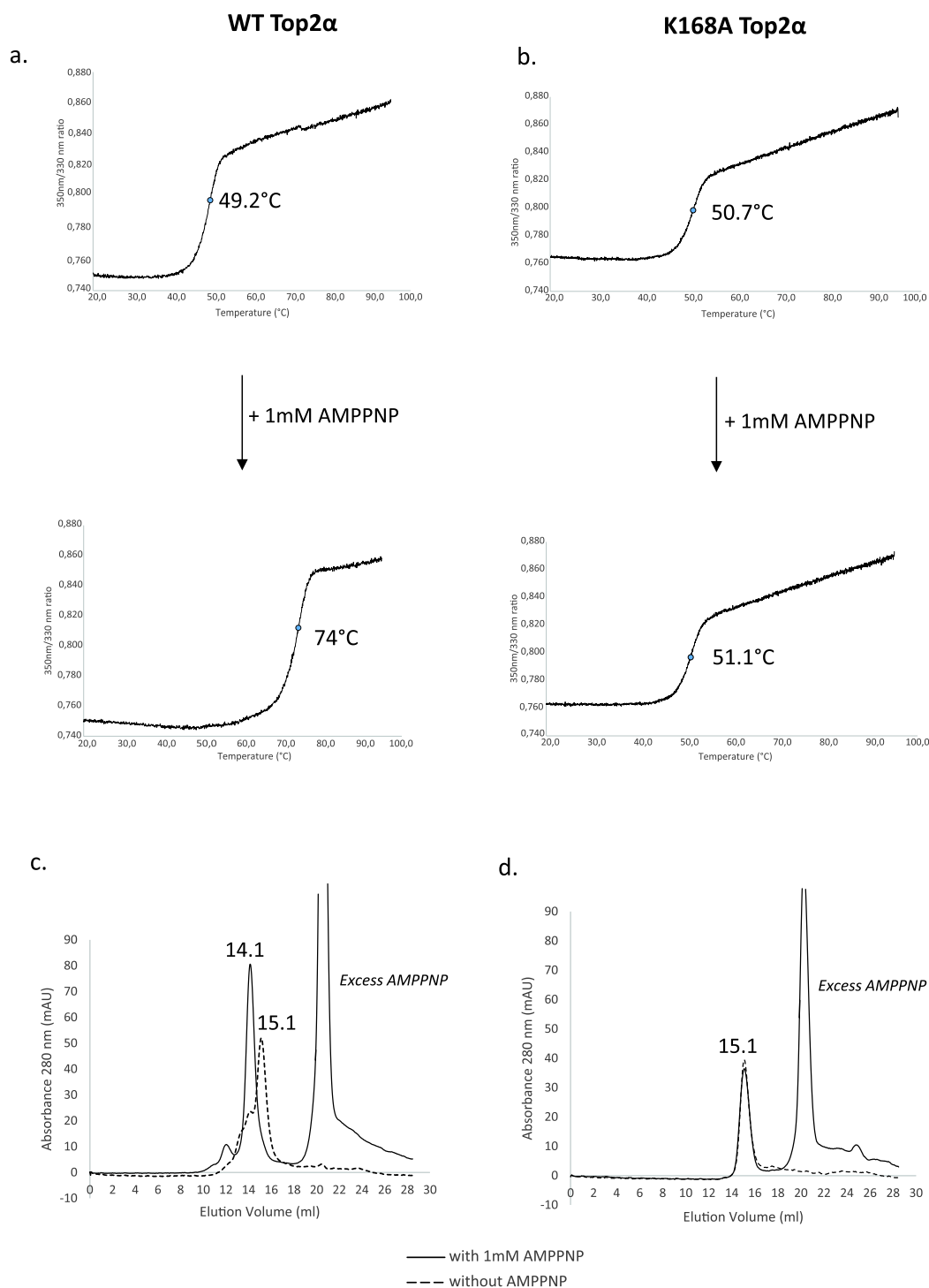


Figure 6. Thermal stability and dimerization analysis of the Top2 α WT and K168A mutant. **(a)** The thermal shift of the domains was measured by differential scanning fluorimetry thermal shift assay. The fusion temperature of the wild type ATPase domain shifts from 49.2°C to 74°C in presence of AMPPNP **(b)** The mutant domain K168A presents about the same melting temperature of 51°C in presence or absence of AMPPNP. **(c,d)** The wild type and mutant ATPase domain were analyzed by analytical gel filtration on a Superdex200 (10/300). The wild type domain **(c)** elutes at 15.1 ml alone and at 14.1 ml with 1 mM AMPPNP with a significant shift corresponding to the dimer formation. The K168A mutant **(d)** elutes at 15.1 ml with and without AMP-PNP consistent with no dimer formation. Elution volumes are reported to the first decimal for clarity, detailed analysis of the elution peaks is provided in Figure S5.

regions, and to some degree, the N- and C-terminals of the protein display the highest flexibility. While this general dynamical behavior is also evident from the temperature factors, this overall favorable comparison establishes that our calculations provide a good representation of the molecular-level dynamics. To assess the impact

of the point mutation K168A and the potential effect of K168 acetylation *in silico*, we investigated the changes in low-frequency vibrational modes on the monomer. The calculations show that the point mutation K168A or acetylation of K168 in the ATPase domain results in a change in the collective motions of the monomeric chain with respect to the wild-type, particularly affecting the N-terminal arm of the monomer (Figure S3). We expect similar consequences for the higher frequency vibrational modes. These results are suggestive of the effect of point mutations and post-translational modification on the underlying dynamics of the monomeric chain, which may subsequently have consequences for the formation of the active dimer.

Discussion

In the present study, we were able to improve the production pipeline in *S.cerevisiae* for the human Top2 isoforms and establish a robust overexpression protocol in BHK21 mammalian cells yielding active recombinant enzymes. In order to characterize the post-translational modification state of our samples, we identified the phosphorylation and acetylation sites of the HsTop2 α overexpressed in the two eukaryotic expression systems. Our data show that the position and number of phosphorylation and acetylation sites were similar upon overexpression in either of the two systems. The yeast expression system being the most convenient choice to produce eukaryotic Top2, this study suggests that *S. cerevisiae* may be as efficient as higher eukaryotes to produce a properly modified HsTop2, at least for the most predominant post-translational modifications. At this stage, it is not straightforward to quantify the preponderant modifications in the samples. However, the resulting samples display a basal catalytic activity with catalytic constants similar to those reported in the literature for endogenous and recombinant enzymes and constitute what can be considered as the wild type reference used in the field.

As expected from the literature, our analysis identified a large number of phosphorylated sites located on the C-terminal domain of HsTop2 α (Figs 2 and 3). This domain does not directly participate in the catalysis of ATP hydrolysis or DNA cleavage activity but it was shown to modulate DNA cleavage and the recognition of supercoil handedness^{44,45}. It is also involved in determining subcellular localization and protein-protein interactions^{46–48}. Top2 α has been found to be a major component of chromatin associated complexes whose composition varies during mitotic progression^{49–51}. The phosphorylated clusters confer a negative charge to this region, which could potentially trigger interactions with basic patches of other proteins and modulate binding to DNA. In this context, *in vitro* validation of Top2 partners should take into account the phosphorylation state of the enzyme.

Our data corroborate a number of the phosphorylation sites in databases reporting phosphoproteome analysis of cancer cell lines or targeted biochemical studies (Phosphosite plus, UniprotKB). We identified 29 phosphorylation sites over the 74 reported modifications in the Phosphosite Plus database²⁷ (Table S1), with the exception of one modification at position S709, that was not described in previous reports. This shows that the modifications introduced by the heterologous overexpression systems are consistent with the ones reported for the endogenous Top2. The recombinant enzyme is a complex sample of protein modified at different steps of the cell cycle and only a subset of sites was found to be systematically modified upon each analysis. This is consistent with studies showing that specific positions are cell cycle dependent, while others are phosphorylated during the entire cell cycle¹⁵.

On the other hand, not all reported phosphorylation sites were present in the recombinant protein. Studies have shown that the level of phosphorylation can be modified when cells are treated with anti-topoisomerase drugs, revealing a correlation between the regulation of the phosphorylation state of Top2 and the cytotoxic response in a living cell. One study has shown that the decrease of Top2 α cleavage-complexes is correlated with hypophosphorylation²⁸. As a consequence, the additional sites reported in the database could indicate that some sites are modified only in cancer cell lines or when exposed to drugs. Further studies are warranted to determine if phosphorylation events can be attributed to specific cancer cell lines or to cellular responses to anti-topoisomerase molecules. In this context, the phosphorylation state of the recombinant Top2 α enzyme should also be taken into account when used for drug screening.

In contrast to what is known about phosphorylation sites, only a few acetylated positions in the Top2 proteins were previously identified through proteomic analysis of post-translational modifications in cell lines^{26,27}. Despite several large scale proteome analyses of eukaryotic cells there is no reliable prediction and consensus motif for acetylation sites, pointing to the necessity for experimental detection⁵². Our mass spectrometry analysis of the recombinant Top2 α shows that the acetylation sites are distributed on the conserved ATPase and DNA binding domains forming the catalytic core of the enzyme (Fig. 3). This result is consistent with previous observations that acetylations are often found in structured regions while phosphorylations are observed in divergent disordered domains⁵². These modifications are mostly located on the surface of the enzyme in accessible regions, including DNA binding regions that can be exposed through conformational remodeling during the catalytic cycle of the enzyme.

Introduction of modifications on these mostly conserved positions is likely to affect the catalytic activity of the enzyme. In particular, we identified an acetylation on the conserved Lysine 168 located in the ATP binding pocket and at the center of an interaction network at the basis of the ATP lid (Fig. 4a,b). The release of the γ phosphate of ATP after hydrolysis breaks this interaction and induces a reorganization of the dimeric interface at the base of the ATP lid. Mutation of this residue to Alanine inhibited the relaxation and the decatenation activity of the enzyme, as well as the dimerization of the ATPase domain, highlighting its pivotal role in the dimerization-ATPase coupling reaction. The mutant enzyme is deficient in DNA relaxation but still retains DNA cleavage activity showing it can bind a DNA segment but cannot transport another DNA segment. Normal mode analysis confirms that mutation to Alanine could affect dimerization by perturbations of the native collective motions. The same *in silico* analysis conducted on the ATPase domain with an acetylated Lysine 168 suggests that this modification would also affect the collective motions that could subsequently affect dimerization. It is interesting to note that this residue is replaced by a Serine in bacterial type 2 topoisomerases that makes a hydrogen bond network through a water molecule contacting the α -phosphate of the AMP-PNP molecule (Figs 4 and S4). A lysine at this position in

the human enzyme forms a much tighter interaction network and its acetylation would be a very efficient way to directly regulate the topoisomerase activities, in particular DNA capture that is correlated to dimerization events. Acetylation sites were also found in the DNA-binding cleavage domain along the DNA groove and in the C-gate region (Fig. 3 and supplemental movie). These modifications are most likely to affect DNA binding and transport and the resulting allosteric control of the protein gates.

No specific study has been conducted to understand the role of these modifications *in vivo* or *in vitro* although it is known that histone deacetylase 1 and 2 associate with the Top2 and enhance its activities⁵³. The recognition of acetylated lysine is principally mediated by bromodomains within multidomain proteins which are well characterized for binding histone modifications in chromatin⁵⁴. The Top2 α proteins are part of large multiprotein complexes associated with chromatin remodeling. In particular, interaction with the SWI/SNF complexes containing bromodomains were reported to increase the Top2 α decatenation and ATP hydrolysis activities⁵⁵. Despite these recent findings, the molecular mechanisms regulating the acetylation/deacetylation level of Top2 has yet to be addressed.

It is noteworthy that acetylation of Lysine 168 was detected only once over seven analysis. As this residue is critical for enzyme activity, any modification could potentially represent an event of protein inactivation. Interestingly this residue was found to be ubiquitinated in proteomic analysis of leukemia cells²⁶. 15 acetylation sites were found during our analysis and 7 of them were reported in the literature as ubiquitinated and 2 as sumoylated sites in the PhosphositePlus databank. Although we did not detect the presence of SUMO or ubiquitin peptides in our analysis, it is interesting to note that a crosstalk between acetylations and sumoylation/ubiquitination has been reported on chromatin proteins⁵⁶. Sumoylation of Top2 has been reported to prepare the enzyme for degradation by the 26S proteasome and regulate cell response to drug-induced DNA damage^{57,58}. In addition the SUMO2/3 proteins and SUMO ligases RanBP2 and PIAS γ and have been shown to affect the localization of the Top2 at the centromere¹⁵. The tumor suppressor BRCA1 was shown to reduce Top2 α activity through its E3 ubiquitin ligase activity¹⁵. Acetylation at key catalytic positions could potentially be part of regulating a signaling cascade shutting down activity before degradation of the Top2. The molecular interaction orchestrating the fine regulation of the multiple modifications of Top2 still need to be investigated. Our results open perspectives for the systematic analysis of the impact of acetylation on the catalytic and cellular activities of human Top2 α . This will require detailed *in vitro* studies and determination of the Top2 functions in the cellular context.

Methods

S. cerevisiae expression plasmid. The Top2 α gene was amplified by PCR from the *Saccharomyces cerevisiae* expression plasmid pWOB6-HsTop2 using a C-terminal primer containing a PreScission Protease (PsP) cleavage sequence followed by a 10-histidine tag. In this construct, the first five residues of *S. cerevisiae* Top2 α are fused to the 29th residue of HsTop2a. PCR inserts were ligated in the yeast expression plasmid pYES2.1, a high-copy episomal vector for galactose-inducible expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae* (pYES2.1 TOPO TA Expression Kit, Invitrogen). Sequencing of the plasmid confirmed the insertion of the Top2 gene without any mutation.

S. cerevisiae overexpression. For expression, we used the *Saccharomyces cerevisiae* strain, Jel1 Δ Top1 (Mat α leu2 trp1 ura3-52 prb1-122 pep4-3 Δ his3::PGAL10-GAL4 Top1::ura3 Δ). Yeast transformation was performed using the LiAc procedure⁵⁹. Several colonies of freshly transformed Jel1 Δ Top1 were used to inoculate 4 \times 0.5 L of minimum media lacking uracil (Csm-ura), and supplemented with 2% (w/v) glucose to repress the GAL1 promoter. These pre-cultures were grown for 2 days at 30 °C. At the late log phase, cultures were pelleted at 3500 g for 20 minutes and the media containing glucose was thrown away. Pellets were then resuspended in 5 ml of Csm-ura media. 6 liters of Csm-ura, supplemented with 2% (w/v) raffinose and 2% (w/v) galactose medium were inoculated at a final OD of 0.8 per liter, and incubated for 16 hours at 30 °C. Due to the presence of galactose in the media, induction starts right away after inoculation. Finally, cells were pelleted at 3500 g for 20 minutes and flash-frozen in liquid nitrogen before storage at -80 °C until use. The overexpression of the Top2 α isoform was confirmed by western blot with antibodies raised against the C-terminal domain of the enzyme.

Construction of the BHK21-MVA expression plasmid. The full length HsTop2 α gene, with the PsP cleavage site followed by a 10-histidine tag sequence, was amplified with primers containing attL1 and attL2 sites for Gateway cloning. These amplified sequences were introduced into the pENTR backbone (pE607 Invitrogen). The HsTop2 α gene was then transferred by Gateway recombination in a pVote0GW vector containing a selective marker and a portion of the viral hemagglutinin gene sequence (HA)⁶⁰. Generation of the recombinant viruses was performed as described previously³⁷. Briefly, the plasmid resulting from the recombination between pE-E607-HsTop2 α and pVote0GW was transfected into MVA-T7 infected BHK21 cells. During the virus replication, the HsTop2 coding sequence flanked by HA sites is recombined in the virus genome thanks to the HA sites. The resulting recombinant viruses are selected and amplified by an iterative selection process.

BHK21 overexpression. For protein production, a suspension of BHK21 C13-2P cells (10^6 cells/ml) was infected with approximately 0.1 PFU/cell of recombinant virus in 5 liter cylindrical flasks containing 1.2 liters cell culture medium (GMEM, 10% FCS, 1.5 g/L BTP, 50 μ M Gentamycin). Two days later, infected cells were mixed with uninfected cells at a 1:10 ratio in six 5-liters cylindrical flasks containing 2 liters of uninfected cells at 10^6 cells/ml. 1 mM IPTG was added at the time of cell mixture. Incubation at 37 °C was continued for another 24 hours. Cells were then pelleted at 2000 g for 5 minutes, washed in PBS and pelleted again at 2000 g for 5 minutes. The cell pellets were stored at -80 °C until use.

Full length HsTop2 WT and K168A purification. The point mutation at position K168 was introduced in the pYES2.1-hsTop2 α plasmid using the Quick Change kit (Invitrogen) for expression in yeast. All steps were carried out at 4 °C. The purification procedure was the same for *S. cerevisiae* and BHK21 cells. Cell pellets were resuspended with a 1:3 (w/v) ratio in a lysis buffer containing 50 mM HEPES pH8.0, 1 M NaCl, 10% glycerol, 0.1 mM MgCl₂, 2 mM β -mercaptoethanol (BME), 1 mM PMSF and Complete protease inhibitor EDTA-free (PIC, Roche). Cell lysis was performed with high pressure Homogenizer Emulsiflex C3 by 4 to 5 passes at >1500 bars. Cell debris were removed by centrifugation at 50 000 g for 60 minutes. Briefly, the proteins were purified using two chromatographic steps using Nickel affinity and Heparin columns (see supplemental procedures for detailed procedures).

HsTop2 WT and K168A ATPase domain production. The WT or K168A mutant ATPase domain sequence was amplified by PCR from the corresponding pYES2.1 vectors and inserted using a Ligation Independent cloning protocol in a pET28b-derived vector with an N-terminal 6-histidine tag, a Maltose Binding Protein fusion (MBP) and a TEV protease site. The vectors were transformed in a BL21 (DE3) strain and grown in 6 liters of LB medium in presence of 100 μ g/l of Kanamycin at 37 °C. Expression was induced with IPTG at OD_{600nm} = 0.8 at 30 °C for 10 h. Cells were harvested and lysed 3 times with an Emulsiflex C3 homogenizer at 1500 bars in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail. Briefly, the proteins were purified using three chromatographic steps using Nickel affinity, MBP affinity and Heparin columns (see supplemental procedures for detailed procedures).

DNA relaxation and cleavage assays. An increasing concentration of Top2 α was incubated with 11 nmoles of negatively supercoiled pUC19 plasmid at 30 °C in a reaction mixture (20 μ l) containing 20 mM Tris-acetate pH7.9, 50 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μ g/ml BSA. After 20 minutes, reactions were stopped by addition of DNA loading buffer (ThermoFisher) and SDS 0.2%. For cleavage assays, 50 μ M of etoposide were added to the reaction and incubated 30 min at 37 °C. The reactions were stopped with 0.2% SDS and treated with 0.5 mg/ml proteinase K for 40 min at 37 °C. Samples were run on a 1% agarose, 1 \times Tris Borate EDTA buffer (TBE) gel, at 9 V/cm for 180 min at room temperature. Agarose gels were stained with 0.5 mg/ml ethidium bromide (EtBr) in 1 \times TBE for 15 min, followed by 5 min destaining in water. DNA topoisomers were revealed using a Typhoon 8600 or Syngene U:Genius3 scanner.

Decatenation assays. Decatenation assays were performed using 0.2 μ g of kDNA per reaction (Topoisomerase II Assay kit from Topogen) with purified Top2 α and incubated 30 min at 37 °C and run on a 1% agarose, 1 \times Tris Borate EDTA buffer (TBE) gel, at 5.5 V/cm for 1 h at room temperature. The reactions were stopped with 1% SDS and treated with 0.5 mg/ml proteinase K for 15 min at 37 °C and analyzed in the same conditions as the relaxation assays.

Analytical gel filtration. The oligomerization state of the K168A mutant was analyzed by gel filtration chromatography with a Superdex200 10/300 GL column (GE Healthcare). Protein samples concentrated at 1.0 mg/ml with and without an excess of AM-PNP were injected on the column equilibrated against 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 200 mM NaCl and 0.1 mM BME, at a flow rate of 0.3 ml/min.

Thermal shift assays. The thermal shift assay was performed on a Prometheus NT.48 apparatus (NanoTemper Technologies). This technique records the absorption of tryptophan and tyrosine at respectively 330 and 350 nm by Differential Scanning Fluorimetry (DSF) as the protein unfolds in a temperature gradient from 20 to 95 °C. The buffer solution and protein concentration were the same as the ones used for gel filtration.

ATPase enzymatic assays. ATPase assays were performed as described by Lindsley *et al.*⁶¹. ATP hydrolysis is coupled with the oxidation of NADH through a cascade of pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) reactions. The absorbance is monitored at 340 nm over 200 seconds at 37 °C with a Shimadzu 1700 spectrophotometer. Reactions were recorded in triplicates with 75 nM protein and 21 nM plasmid DNA (PUC19) in 500 μ l of a buffer containing 50 mM Tris HCl pH7.5, 150 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 7 mM BME, 100 μ g/mg of BSA, 4U/5U of PK/LDH mixture, 2 mM PEP, and 0.2 mM NADH.

Mass spectrometry analysis. Purified protein samples (5–10 μ g) were loaded on a SDS polyacrylamide gel and bands were excised from one-dimension gel lane and subjected to manual in-gel reduction, alkylation and digestion. The gel bands were reduced with 10 mM DTT for 1 h at 57 °C and alkylated for 45 min in the dark with 55 mM iodoacetamide. Each band was duplicated and digested with 600 ng of trypsin (Promega) overnight at 37 °C. The extracted peptide solutions were then dried using a SpeedVac centrifuge (5301 Concentrator Eppendorf). Detailed procedures for the NanoLC-nanoESI/MS-MS analysis of the resulting peptides with an Orbitrap ELITE mass spectrometer are provided in supplemental materials.

Malachite green assay. Phosphate concentration was assessed using the Malachite Green Assay kit from Cayman chemical. 10 μ g of HsTop2 α was incubated for 30 minutes at 37 °C with increasing ratio of purified lambda phosphatase to release all phosphates from the recombinant protein. The reaction was performed in a buffer containing 50 mM Hepes pH 8.0, 2 mM DTT and 0.01% Brij 35. The reaction mix was then incubated with the malachite kit reagent and absorbances at 620 nm were measured in a 96 well plate on a Synergy HTX spectrophotometer. Experiments were run in triplicates. Phosphate concentration was assessed using the calibration curve and standard solutions provided in the assay kit.

Molecular modeling. The structure of the ATPase domain of human DNA topoisomerase 2 α dimer was obtained from the Protein Data Bank (PDBID: 1ZXM)⁹. For the modelling, the AMP-PNP was replaced by ATP in the binding pocket. The missing loops were constructed by homology modelling using the Modeller program⁶² and this structure was used for all subsequent calculations. All calculations were done using the CHARMM program⁶³ and the all-atom force field for proteins⁶⁴. Hydrogen atoms were placed using the HBUILD facility⁶⁵ in the CHARMM program. The detailed procedures for normal mode analysis following a previously developed protocol⁶⁶ are provided in supplemental materials.

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Mondal, N. & Parvin, J. D. DNA topoisomerase II α is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* **413**, 435–438 (2001).
- Nitiss, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* **9**, 327–337 (2009).
- Ju, B. G. *et al.* A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**, 1798–1802 (2006).
- Bush, N. G., Evans-Roberts, K. & Maxwell, A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* **6** (2015).
- Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**, 338–350 (2009).
- Austin, C. A. & Fisher, L. M. Isolation and characterization of a human cDNA clone encoding a novel DNA topoisomerase II homologue from HeLa cells. *FEBS Lett* **266**, 115–117 (1990).
- Tsutsui, K. *et al.* Molecular cloning of partial cDNAs for rat DNA topoisomerase II isoforms and their differential expression in brain development. *J Biol Chem* **268**, 19076–19083 (1993).
- Jenkins, J. R. *et al.* Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res* **20**, 5587–5592 (1992).
- Wei, H., Ruthenburg, A. J., Bechis, S. K. & Verdine, G. L. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **280**, 37041–37047 (2005).
- Wu, C. C. *et al.* Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science* **333**, 459–462 (2011).
- Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A. & Berger, J. M. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J Mol Biol* **424**, 109–124 (2012).
- Woessner, R. D., Mattern, M. R., Mirabelli, C. K., Johnson, R. K. & Drake, F. H. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* **2**, 209–214 (1991).
- Lyu, Y. L. *et al.* Role of topoisomerase II β in the expression of developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol* **26**, 7929–7941 (2006).
- Tsutsui, K., Sano, K., Kikuchi, A. & Tokunaga, A. Involvement of DNA topoisomerase II β in neuronal differentiation. *J Biol Chem* **276**, 5769–5778 (2001).
- Chen, T., Sun, Y., Ji, P., Kopetz, S. & Zhang, W. Topoisomerase II α in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene* **34**, 4019–4031 (2015).
- Escargueil, A. E., Plisov, S. Y., Filhol, O., Cochet, C. & Larsen, A. K. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem* **275**, 34710–34718 (2000).
- Ishida, R. *et al.* Threonine 1342 in human topoisomerase II α is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem* **271**, 30077–30082 (1996).
- Li, H., Wang, Y. & Liu, X. Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase II α in cell cycle progression. *J Biol Chem* **283**, 6209–6221 (2008).
- Luo, K., Yuan, J., Chen, J. & Lou, Z. Topoisomerase II α controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 204–210 (2009).
- Redwood, C., Davies, S. L., Wells, N. J., Fry, A. M. & Hickson, I. D. Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II α in a phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* **273**, 3635–3642 (1998).
- Wells, N. J., Fry, A. M., Guano, F., Norbury, C. & Hickson, I. D. Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. *J Biol Chem* **270**, 28357–28363 (1995).
- Wells, N. J., Addison, C. M., Fry, A. M., Ganapathi, R. & Hickson, I. D. Serine 1524 is a major site of phosphorylation on human topoisomerase II alpha protein *in vivo* and is a substrate for casein kinase II *in vitro*. *J Biol Chem* **269**, 29746–29751 (1994).
- Burden, D. A. & Sullivan, D. M. Phosphorylation of the alpha- and beta-isoforms of DNA topoisomerase II is qualitatively different in interphase and mitosis in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* **33**, 14651–14655 (1994).
- Kimura, K. *et al.* Identification of the nature of modification that causes the shift of DNA topoisomerase II beta to apparent higher molecular weight forms in the M phase. *J Biol Chem* **269**, 24523–24526 (1994).
- Wells, N. J. & Hickson, I. D. Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem* **231**, 491–497 (1995).
- Mertins, P. *et al.* Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nat Methods* **10**, 634–637 (2013).
- Hornbeck, P. V., Chabra, I., Kornhauser, J. M., Skrzypek, E. & Zhang, B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* **4**, 1551–1561 (2004).
- Aoyama, M. *et al.* Attenuation of drug-stimulated topoisomerase II-DNA cleavable complex formation in wild-type HL-60 cells treated with an intracellular calcium buffer is correlated with decreased cytotoxicity and site-specific hypophosphorylation of topoisomerase II α . *Biochem J* **336**(Pt 3), 727–733 (1998).
- Ganapathi, R. *et al.* Resistance to etoposide in human leukemia HL-60 cells: reduction in drug-induced DNA cleavage associated with hypophosphorylation of topoisomerase II phosphopeptides. *Mol Pharmacol* **50**, 243–248 (1996).
- Qi, X. *et al.* Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II α protein by p38 γ mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *J Biol Chem* **286**, 35883–35890.
- Ritke, M. K., Murray, N. R., Allan, W. P., Fields, A. P. & Yalowich, J. C. Hypophosphorylation of topoisomerase II in etoposide (VP-16)-resistant human leukemia K562 cells associated with reduced levels of beta II protein kinase C. *Mol Pharmacol* **48**, 798–805 (1995).
- Takano, H., Kohno, K., Ono, M., Uchida, Y. & Kuwano, M. Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res* **51**, 3951–3957 (1991).
- Worland, S. T. & Wang, J. C. Inducible overexpression, purification, and active site mapping of DNA topoisomerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **264**, 4412–4416 (1989).
- Wasserman, R. A., Austin, C. A., Fisher, L. M. & Wang, J. C. Use of yeast in the study of anticancer drugs targeting DNA topoisomerases: expression of a functional recombinant human DNA topoisomerase II alpha in yeast. *Cancer Res* **53**, 3591–3596 (1993).
- Austin, C. A. *et al.* Expression, domain structure, and enzymatic properties of an active recombinant human DNA topoisomerase II beta. *J Biol Chem* **270**, 15739–15746 (1995).

36. Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3–41 (2002).
37. Hebben, M. *et al.* High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expr Purif* **56**, 269–278 (2007).
38. Huang, T. G. & Hackney, D. D. Drosophila kinesin minimal motor domain expressed in Escherichia coli. Purification and kinetic characterization. *J Biol Chem* **269**, 16493–16501 (1994).
39. Hammonds, T. R. & Maxwell, A. The DNA dependence of the ATPase activity of human DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* **272**, 32696–32703 (1997).
40. West, K. L., Turnbull, R. M., Willmore, E., Lakey, J. H. & Austin, C. A. Characterisation of the DNA-dependent ATPase activity of human DNA topoisomerase IIbeta: mutation of Ser165 in the ATPase domain reduces the ATPase activity and abolishes the *in vivo* complementation ability. *Nucleic Acids Res* **30**, 5416–5424 (2002).
41. D'Angelo, E., Crutchfield, J. & Vandiviere, M. Rapid, sensitive, microscale determination of phosphate in water and soil. *J Environ Qual* **30**, 2206–2209 (2001).
42. Alexander, C. G. *et al.* Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 2241–2250 (2014).
43. Hayward, S. In *Computational biochemistry and biophysics* (eds O.M. Becker, B. Roux, & M. Watanabe) 153–168 (Marcel-Dekker, 2001).
44. McClendon, A. K., Dickey, J. S. & Osheroff, N. Ability of viral topoisomerase II to discern the handedness of supercoiled DNA: bimodal recognition of DNA geometry by type II enzymes. *Biochemistry* **45**, 11674–11680 (2006).
45. Dickey, J. S. & Osheroff, N. Impact of the C-terminal domain of topoisomerase IIalpha on the DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry* **44**, 11546–11554 (2005).
46. Christensen, M. O. *et al.* Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* **157**, 31–44 (2002).
47. McClendon, A. K. *et al.* Bimodal recognition of DNA geometry by human topoisomerase II alpha: preferential relaxation of positively supercoiled DNA requires elements in the C-terminal domain. *Biochemistry* **47**, 13169–13178 (2008).
48. Meczes, E. L., Marsh, K. L., Fisher, L. M., Rogers, M. P. & Austin, C. A. Complementation of temperature-sensitive topoisomerase II mutations in *Saccharomyces cerevisiae* by a human TOP2 beta construct allows the study of topoisomerase II beta inhibitors in yeast. *Cancer Chemother Pharmacol* **39**, 367–375 (1997).
49. Rattner, J. B., Hendzel, M. J., Furbee, C. S., Muller, M. T. & Bazett-Jones, D. P. Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol* **134**, 1097–1107 (1996).
50. Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R. & Earnshaw, W. C. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* **127**, 303–318 (1994).
51. Meyer, K. N. *et al.* Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and modulation of catalytic enzyme activities. *J Cell Biol* **136**, 775–788 (1997).
52. Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 536–550 (2014).
53. Tsai, S. C. *et al.* Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet* **26**, 349–353 (2000).
54. Fujisawa, T. & Filippakopoulos, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 246–262 (2017).
55. Dykhuizen, E. C. *et al.* BAF complexes facilitate decatenation of DNA by topoisomerase IIalpha. *Nature* **497**, 624–627 (2013).
56. Hendriks, I. A. *et al.* Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 927–936 (2014).
57. Mao, Y., Desai, S. D. & Liu, L. F. SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* **275**, 26066–26073 (2000).
58. Mao, Y., Desai, S. D., Ting, C. Y., Hwang, J. & Liu, L. F. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* **276**, 40652–40658 (2001).
59. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. & Woods, R. A. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360 (1995).
60. Pradeau-Aubret, K., Ruff, M., Garnier, J. M., Schultz, P. & Drillien, R. Vectors for recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia virus Ankara. *Anal Biochem* **404**, 103–105 (2010).
61. Lindsley, J. E. In *Methods Mol Biol* Vol. 95, 57–64 (2001).
62. Fiser, A. & Sali, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol* **374**, 461–491 (2003).
63. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem* **30**, 1545–1614 (2009).
64. MacKerell, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* **102**, 3586–3616 (1998).
65. Brunger, A. T. & Karplus, M. Polar hydrogen positions in proteins: empirical energy placement and neutron diffraction comparison. *Proteins* **4**, 148–156 (1988).
66. Fidelak, J. *et al.* Dynamic correlation networks in human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma nuclear receptor protein. *Eur Biophys J* **39**, 1503–1512 (2010).

Acknowledgements

The *S. cerevisiae* expression plasmid pWOB6 encoding the Top2 α isoform was a gift from Pr. C.A. Austin. We thank G. Verdine for sharing details of the purification of the HsTop2 α ATPase domain and M. Nadal for careful reading of the manuscript and suggestions. We thank Robert Drillien for sharing his expertise on the mammalian expression system and the IGBMC common services, in particular Mathilde Joint and Luc Negroni of the Mass Spectrometry service. This work was supported by the Fondation ARC, Alsace contre le Cancer and by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT (a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02). Computational resources were provided by the Institut du Développement et des Ressources en Informatique Scientifique (IDRIS/GENCI) and the Mésocentre de Calcul of Strasbourg University. The authors acknowledge the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05 and of Instruct-ERIC.

Author Contributions

K.P. and M.R. designed and prepared the mammalian expression plasmids. C. Be., C. Ba., A.V., C.L., V.L. and E.H. performed cloning, protein production and activity assays. C.L. performed biophysics experiments and R.H.S. the molecular dynamics calculations. C. Be., C.L. and V.L. analyzed the data and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27606-8>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

5. Identification des sites de phosphorylation et des acétylation chez la TopII β

L'identification des phosphorylations et des acétylations de la TopII α par spectrométrie de masse ayant donné des résultats interprétables, nous avons réalisé la même analyse pour la TopII β . La digestion tryptique et la sensibilité du spectromètre de masse a ainsi permis d'identifier environ 54% de la séquence protéique de l'isoforme β réparti de façon homogène sur la séquence (**Figure 58**).

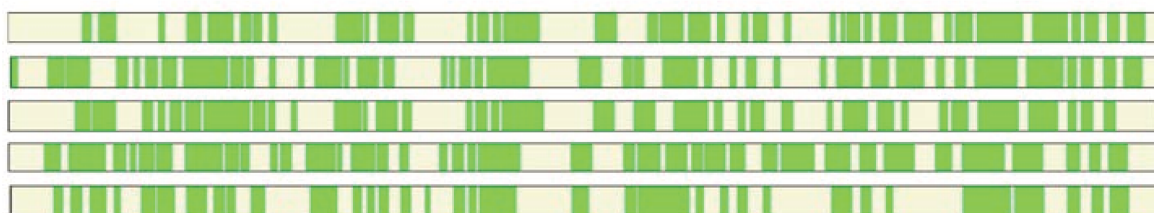


Figure 58 Couverture peptidique pour chaque analyse de spectrométrie de masse concernant l'identification des sites de phosphorylation et d'acétylation sur la TopII β .

Dans nos 9 analyses, 5 sites d'acétylation et 42 sites de phosphorylation ont pu être identifiés. Nous avons donc mis en évidence plus de sites de phosphorylations mais moins de sites d'acétylations que pour la TopII α (**Figure 59**) (**Tableau 2**). A l'instar de l'isoforme α , la majorité des sites de phosphorylations et d'acétylations sont localisées respectivement sur le domaine C-terminal et sur le corps catalytique de la TopII β . Nous n'avons pas pu mettre en évidence des sites d'acétylations que dans deux de nos analyses, et tous ces sites ont été identifiés uniquement sur la protéine produite en levure excepté la lysine 294, qui elle a été mise en évidence sur la protéine produite dans les deux systèmes. L'analyse des structures cristallographiques des domaines catalytiques de la TopII α ne permet pas de déterminer à ce stade l'importance de cette position au sein du Transducer.

L'analyse par spectrométrie de masse des peptides des deux isoformes, n'a pas révélé de sites d'ubiquitinylation ou de SUMOylation. Ce type de modification joue un rôle clé dans la dégradation des TopIIs humaines^{232,268}.

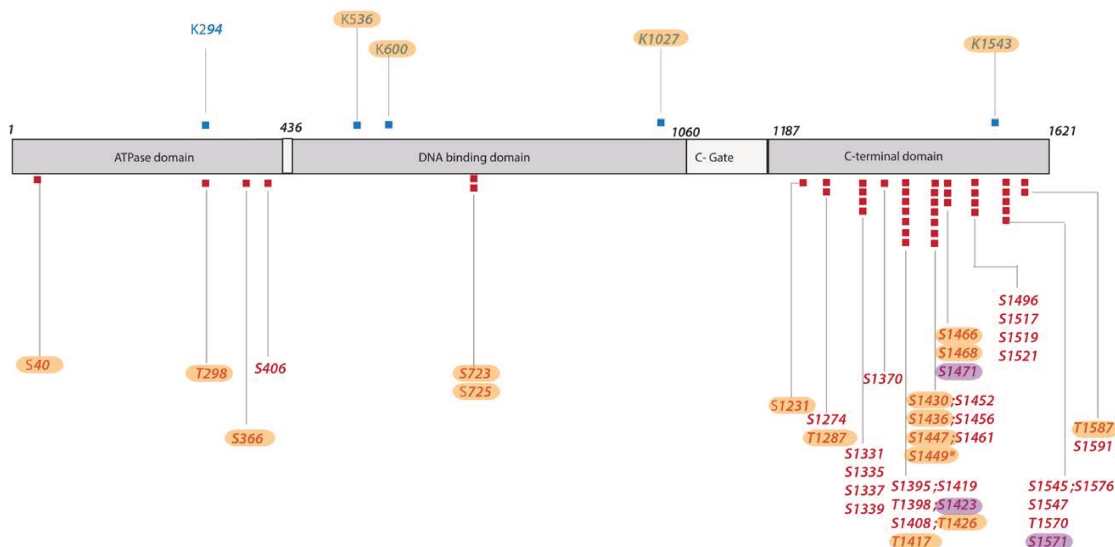


Figure 59 Identification des phosphorylations en rouge et des acétylations en bleu sur la TopII β surexprimé en levure ou en cellules de mammifère. Les positions encadrées en jaune ont été identifiées uniquement dans la levure, les positions encadrées en violet ont été identifiées uniquement dans les cellules de mammifère.

Parmi les sites de phosphorylations identifiés, 16 sont présents uniquement sur la protéine produite en levure et 3 spécifiquement sur celle produite dans le système d'expression BHK21. Parmi les phosphorylations du corps catalytique, seul le résidu S406 est phosphorylé quel que soit le système d'expression utilisé, les autres ne sont identifiés que lorsque la protéine est produite en levure. Les sites de phosphorylation varient donc fortement en fonction du système d'expression utilisé dans le cas de l'isoforme β . Cette observation est similaire à celle de Hirano et al. sur le protéasome 26S, qui montre des différences de PTMs suivant l'espèce d'origine étudiée ; souris, humain ou levure²⁶⁹.

Au niveau de la porte N, à l'exception de la serine 40 qui fait partie de l'extrémité N-terminale, l'unique acétylation et les phosphorylations se trouvent à la base du Transducer sur des régions flexibles. Si nous analysons la localisation de ces sites sur la structure de la porte N après hydrolyse de l'ATP⁶², ces domaines ne sont plus visibles, ce qui montre que ces phosphorylations et cette acétylation sont sur des régions flexibles et sont accessibles à un moment donné du cycle catalytique. Sur la porte à ADN, le résidu K600 se trouve dans le domaine désordonné de la clé grecque pour laquelle nous ne disposons pas à l'heure actuelle de données structurales pour la TopII β ^{270,271}. Les deux autres acétylations des résidus K536 et K1027 sont situées respectivement à la surface du domaine TOPRIM et du domaine Tower (**Figure 60**).

Les sites de phosphorylation S723 et S725 sont situés sous le domaine de liaison à l'ADN face à un ion magnésium et au cœur d'un réseau d'interaction qui stabilise des hélices des domaines WHD et TOPRIM.

	Résidus	S.Cerevisiae	BHK21	Détections
Acétylations	K294	1	1	2
	K536	1	0	1
	K600	1	0	1
	K1027	1	0	1
	K1543	1	0	1

	Résidus	S.Cerevisiae	BHK21	Détections
	S40	3	0	3
	T298	1	0	1
	S366	1	0	1
	S406	2	3	5
	S723	1	0	1
	S725	1	0	1
	S1231	2	0	2
	S1274	2	0	2
	T1287	2	0	2
	S1331	2	2	4
	S1335	1	1	2
	S1337	2	1	3
	S1339	1	1	2
	S1370	3	3	6
	S1395	3	3	6
	T1398	2	1	3
	S1408	5	3	8
	T1417	1	0	1
	S1419	1	3	4
	S1423	0	1	1
	T1426	1	1	2
	S1430	2	0	2
	S1436	3	2	5
	S1447	2	0	2
	S1449	1	0	1
	S1452	1	1	2
	S1456	3	1	4
	S1461	6	3	9
	S1466	1	0	1
	S1468	1	0	1
	S1471	0	1	1
	S1496	2	0	2
	S1517	4	5	9
	S1519	5	3	8
	S1521	3	1	4
	S1545	1	2	3
	S1547	3	6	9
	T1570	1	1	2
	S1571	0	1	1
	S1576	2	2	4
	T1587	1	0	1
Phosphorylations	S1591	1	1	2

Tableau 2 Nombre d'identification pour chaque site de phosphorylation et d'acétylation pour la TopII β . La colonne « Détections » représente le nombre de fois que le site est identifié dans les deux systèmes d'expression et la barre est une visualisation comparative de ce chiffre avec les autres sites. Les cellules colorées en bleu désignent les sites identifiés dans les deux systèmes d'expression.

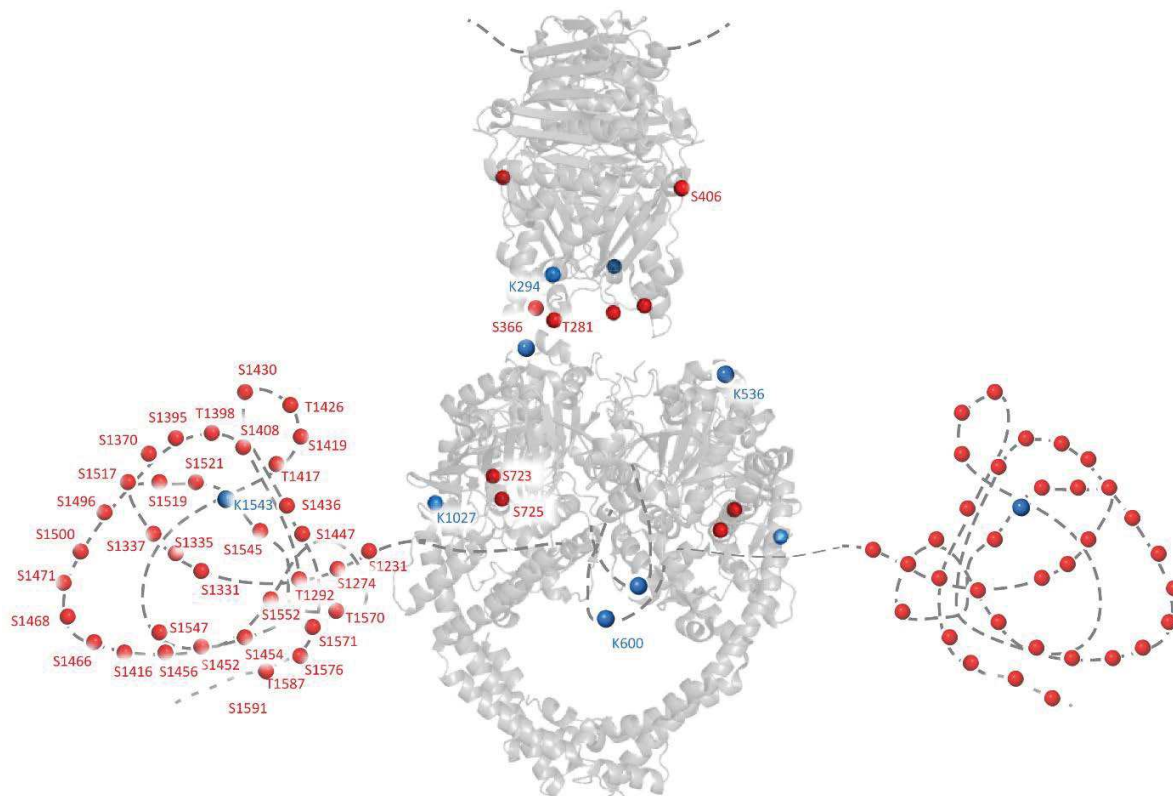


Figure 60 Localisation des sites de phosphorylation en rouge et d'acétylation en bleu sur la structure tridimensionnelle des domaines catalytiques de la TopII β (PDB ID : 1ZXM et 3QX3).

6. Analyses comparatives des PTM trouvés en cellules cancéreuses et dans les cellules BHK21/*S.cerevisiae* pour chaque isoformes

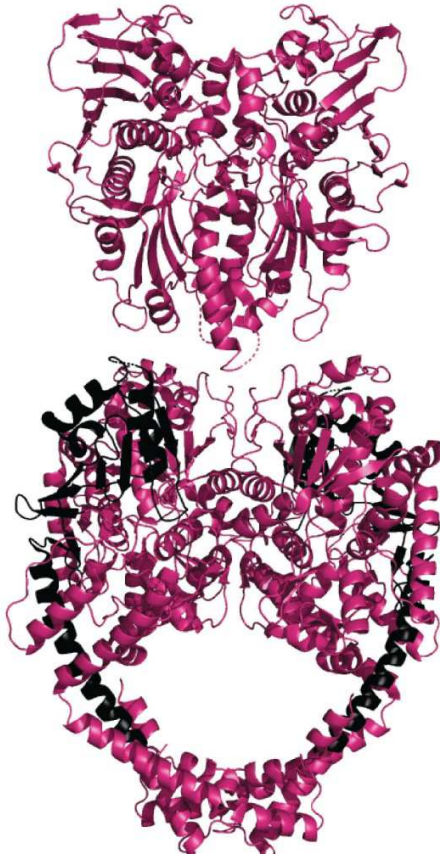
Dans cette section, nous allons analyser et interpréter les résultats sur les identifications de PTM sur les TopII α et la TopII β . Pour ce faire, nous allons tout d'abord comparer les PTMs mises en évidence dans nos études (cellules BHK21 et *S. cerevisiae*) et celles présentées dans la base de données Phosphosite⁺ où les modifications des TopIIs sont majoritairement issues de cellules cancéreuses. Grâce à un alignement de séquences protéiques des enzymes humaines, nous allons comparer les positions des sites de phosphorylation et des acétylations des deux isoformes. Enfin, nous nous attacherons plus particulièrement à décrire des positions qui présentent un intérêt pour l'étude du cycle catalytique des TopII.

La base de données Phosphosite⁺ a été lancée en 2003 et répertorie les modifications chimiques de chaque protéine qui ont été publiées dans la littérature à partir de résultats *in vitro* et *in vivo* ²⁷². Nous avons choisi de travailler avec cette base de données car elle est complète et claire. N'ayant pas mené l'identification des SUMOylations et les ubiquitinations, nous nous concentrerons principalement sur les phosphorylations et les acétylations.

Analyse des PTMs de la TopII α identifiées dans des cellules en équilibre homéostatique et dans des cellules cancéreuses

La base de donnée Phosphosite⁺ répertorie les résidus qui sont les cibles des modifications post-traductionnelle et précise dans quelles lignées cellulaires elles ont été identifiées²⁷². En ce qui concerne les TopIIs humaines, les sites répertoriés sont exclusivement identifiés dans des cellules cancéreuses. Cette particularité permet une comparaison des résidus modifiés par phosphorylation ou acétylation entre les cellules « saine » ou en équilibre homéostatique avec les résidus modifiés dans les cellules cancéreuses¹⁷⁰ (**Figure 62 et 63**). Dans ces dernières, 40% des sites de phosphorylations sont identifiés sur le corps catalytique contre 10% pour les cellules en équilibre homéostatique. La phosphorylation de résidus tyrosines est détectée sur la TopII α uniquement dans les cellules cancéreuses. La tyrosine catalytique conservée à la position 805, est phosphorylée dans des cellules lymphocytaires de Jurkat et dans des lymphoblastes K-562. Cette tyrosine est impliquée dans la coupure réversible de l'ADN, et sa modification pourrait grandement altérer les activités catalytiques de la TopII α . Enfin, il existe sur la TopII α une zone sur le Coiled-Coil domain et sur le domaine Tower ne présentant aucune phosphorylation (**Figure 61a**). En ce qui concerne les acétylations, aucune n'est répertoriée dans la région où l'ADN est stabilisé (**Figure 61b**).

a.



b.

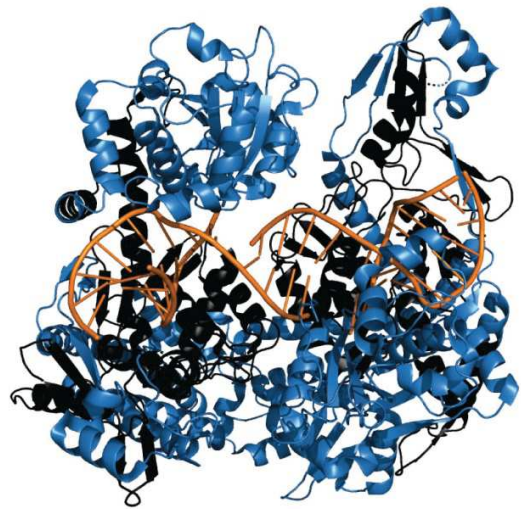


Figure 61 Les régions colorées en noir sur la structure de la TopII α représente celles où aucune (a) phosphorylation et (b) acétylation n'ont été identifiées dans la base de donnée Phosphosite⁺ ou dans notre étude.

En ce qui concerne les acétylations, 15 ont été identifiées dans des cellules cancéreuses, soit le même nombre de sites identifiés que dans notre étude. Néanmoins, la localisation est différente : nous avons mis en évidence des acétylations exclusivement sur le corps catalytique tandis que sur Phosphosite⁺ 13 des 15 acétylations en cellules cancéreuses sont localisées sur le domaine C-terminal. Une étude suggère que les sites d'acétylations se trouvent sur des domaines structurés²⁷³. Si cela est effectivement le cas, cela suggère que le CTD peut être structuré et non flexible sous certaines circonstances dictées par les PTMs . Aucune acétylation n'a été observée sur le domaine de liaison de l'ADN. Enfin au sein des cellules cancéreuses, les positions des résidus acétylés ne sont pas identifiées comme ubiquitynlées ou SUMOylées à l'exception des lysines K397, K1276 et K1454 qui sont identifiées comme site d'ubiquitylation et K1196 qui peut être

ubiquitinylée et SUMOylée. Il est intéressant de mettre en exergue que la majorité des sites d'acétylations de la protéine produite en cellule BHK21 ou en levure, sont ubiquitinylés dans les cellules cancéreuses à l'exception des lysines K207, K662, K1034 et K1096. Cela témoigne d'un changement de fonctionnalité de ces sites de modification. Il a été reporté que l'acétylation peut protéger les protéines contre la dégradation par la voie du protéasome 26S²⁷⁴, ce qui est une hypothèse intéressante car si cela est vérifié, la TopII α serait plus dégradée dans les cellules cancéreuses ce qui pourrait altérer la division cellulaire. Cependant, le double rôle d'une lysine acétylée ou ubiquitinylée est complexe car il intervient majoritairement dans la stabilité de la protéine mais aussi dans le recrutement de partenaires protéiques^{274,275}.

Les ubiquitylations concernent 67 résidus répartis sur la totalité de la protéine, à l'exception des 300 premiers résidus de l'extrémité N-terminale et des 30 derniers résidus de l'extrémité C-terminale. Les 30 derniers résidus ne présentent que des phosphorylations et aucune autre PTMs. Ces résidus font partie d'une zone d'interaction avec la chromatine récemment identifiée²⁵⁶. Cette région, appelée « chromatin tether », intervient dans l'interaction entre la TopII α et l'ADN et est importante pour le bon déroulement de la mitose. Dans la base de données, la majeure partie des lysines SUMOylées sont aussi ubiquitinylées à l'exception des lysines K625 et K1240.

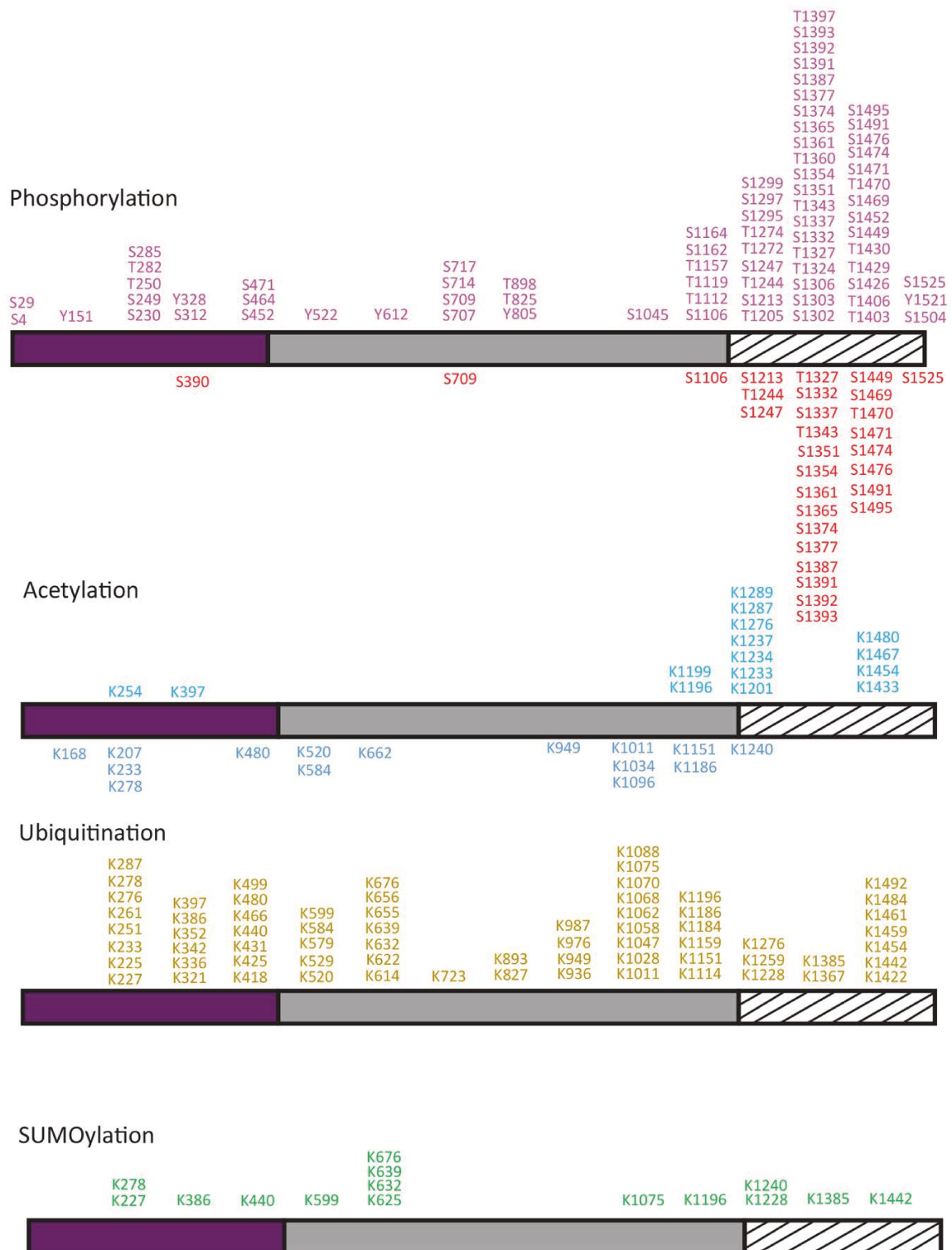


Figure 62 Modifications post traductionnelles de la TopII α positionnées sur une représentation de la séquence peptidique où la porte N est représenté en violet, la porte à ADN en gris et le domaine C-terminal en hachuré. Les sites identifiés dans notre étude ²⁶⁷ se situent sur le dessous de la barre. Les sites au-dessus de la barre sont répertoriés dans la base de données Phosphosite⁺. Les phosphorylations sont colorées en rouge/violet, les acétylations sont colorées en bleu clair/foncé, les ubiquitinylation sont colorées en jaune et les SUMOylation sont colorées en vert. Figure issue de Lotz, C. et Lamour. V. ¹⁷⁰

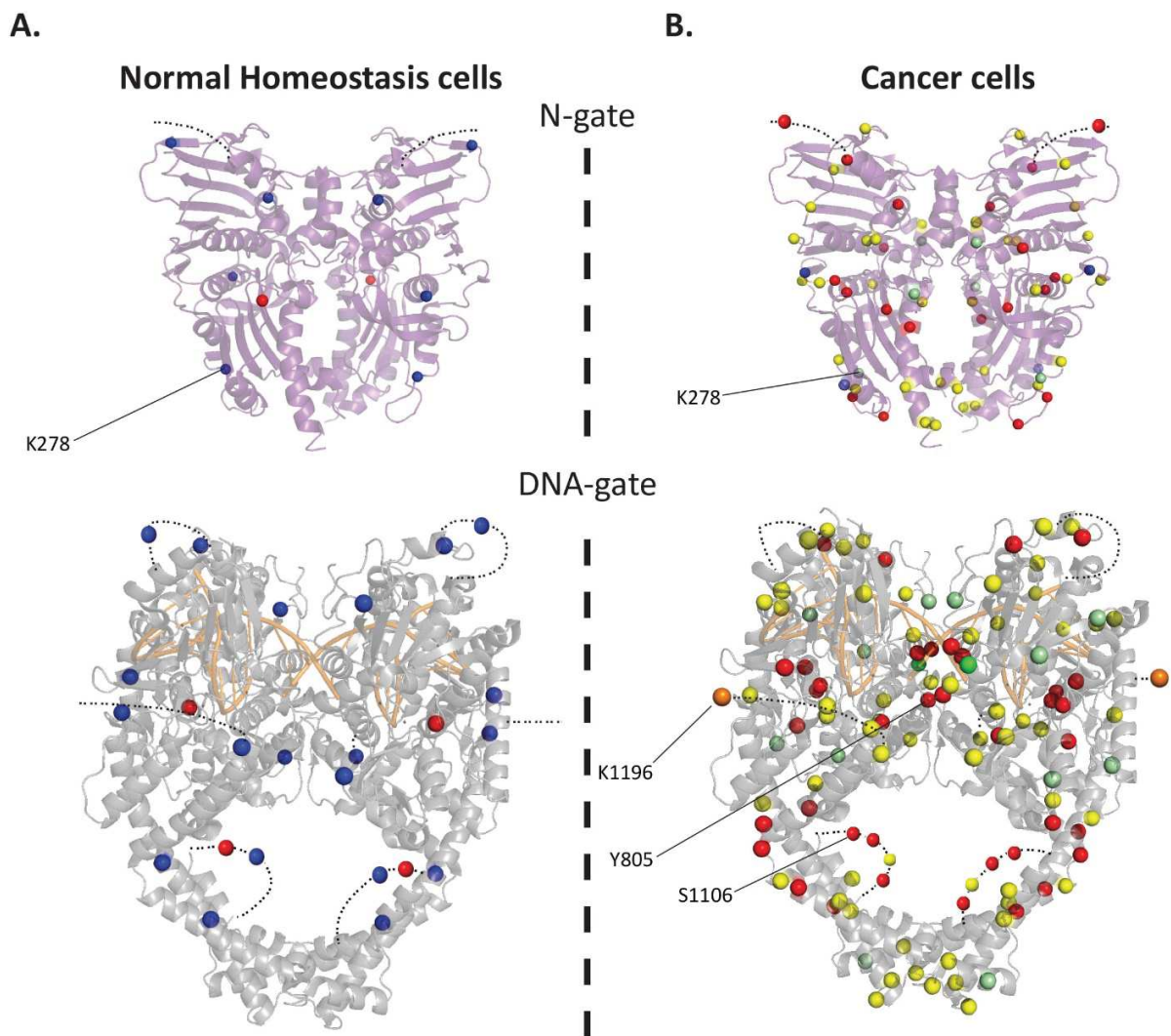


Figure 63 Positions des modifications post-traductionnelles présentes sur le corps catalytique de la TopII α . Le code couleur est identique à la figure 62. K1196 pouvant être acétylé, SUMOylé et ubiquitinylé est coloré en orange. Les résidus SUMOylés pouvant être ubiquitinylés sont colorés en vert pâle. Figure issue de Lotz. C, et Lamour. V. ¹⁷⁰

Analyse des PTMs de la TopII β identifiées dans des cellules en équilibre homéostatique et dans des cellules cancéreuses

De manière générale, comme pour la TopII α , nous observons plus de phosphorylations et d'acétylations sur la TopII β dans les cellules cancéreuses que dans les cellules en équilibre homéostatique (**Figure 64 et 65**). Il y a 79 phosphorylations identifiées en cellules cancéreuses contre 42 dans notre étude. Dans les deux cas, les phosphorylations se trouvent en majorité sur le

domaine C-terminal, comme pour l'isoforme α . 42% des sites de phosphorylation de la TopII β se trouvent sur le corps catalytique pour les enzymes issus de cellules cancéreuses contre 12% pour les cellules en équilibre homéostatique. Cependant, sur la TopII β il existe aussi une zone sans phosphorylation mais qui est différente de son homologue car cette zone ne concerne que le domaine TOPRIM. De même que la TopII α , les tyrosines sont identifiées comme phosphorylées uniquement dans les cellules cancéreuses. Cependant la tyrosine catalytique Y821 de la TopII β n'est pas retrouvée comme site de phosphorylation d'après la base de données Phosphosite⁺.

Au total, 17 acétylations de la TopII β ont été identifiées dans les cellules cancéreuses et 5 dans notre étude. À l'exception de la lysine K1543, tous les sites d'acétylation que nous avons mis en évidence dans notre étude sont aussi ubiquitinylés. Quant aux lysines acétylées identifiées dans les cellules cancéreuses, celles présentes sur le domaine C-terminal sont sujettes exclusivement à cette modification. Par opposition, les lysines présentes sur le corps catalytique sont aussi ubiquitinylés et la lysine K1027 peut aussi bien être ubiquitinylée que SUMOylée. Les fonctions de ces lysines sont par conséquent multiples étant donné que la majorité des lysines sont sujettes à de multiples PTMs. Enfin, la zone dans laquelle aucune acétylation n'est répertoriée est la même que pour la TopII α soit au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Ceci nous permet de conclure que pour les deux isoformes de TopIIs humaines, l'acétylation ne régule pas directement la fixation de l'ADN.

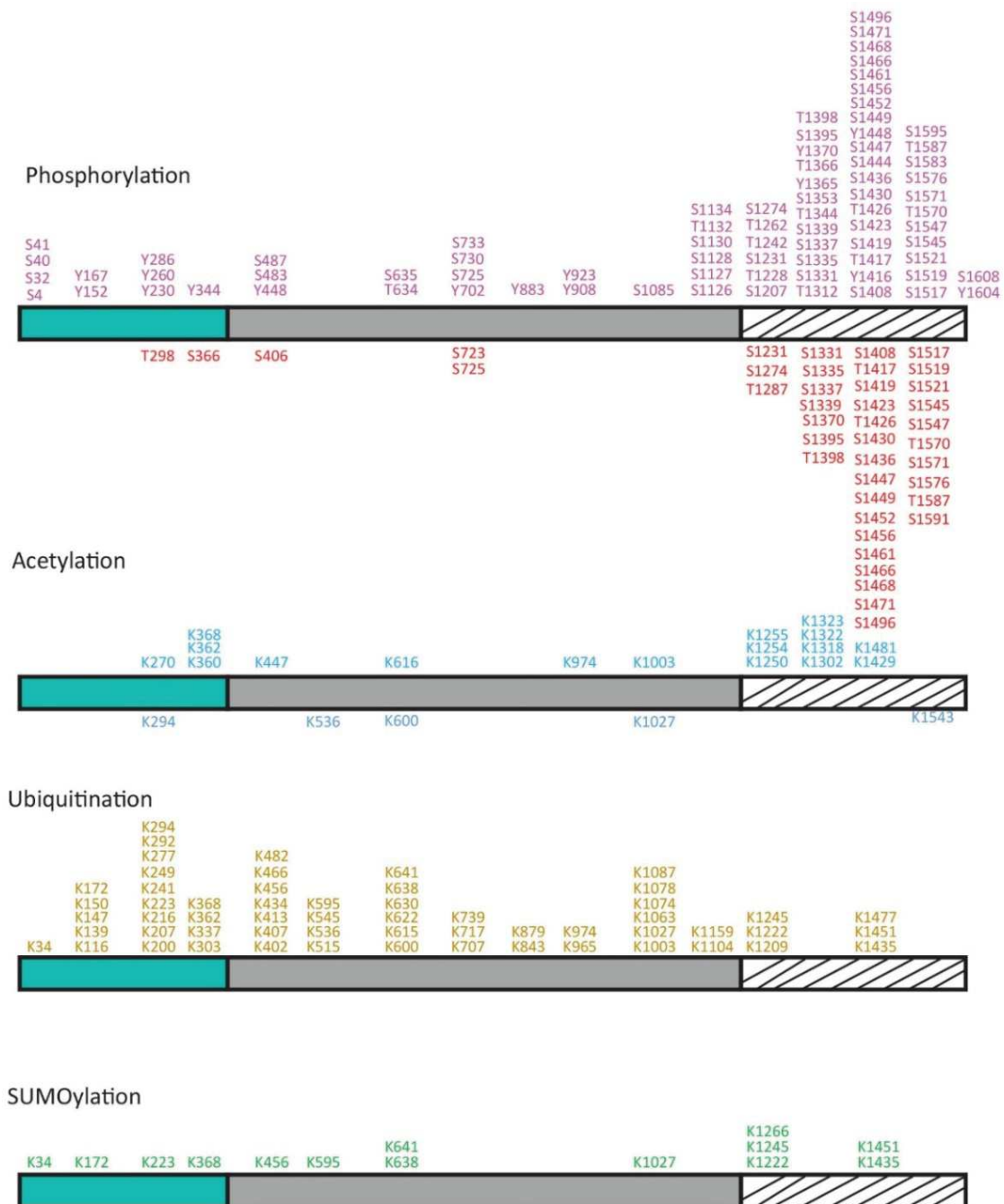


Figure 64 Modifications post-traductionnelles de la TopII β reportées sur une représentation de la séquence peptidique où la porte N est représentée en cyan, la porte à ADN en gris et le domaine C-terminal en hachuré. Les sites identifiés dans notre étude se situent en dessous de la barre. Les sites au-dessus de la barre sont répertoriés dans la base de données Phosphosite⁺. Les phosphorylations sont colorées en rouge/violet, les acétylations sont colorées en bleu clair/foncé, les ubiquitylations sont colorées en jaune et les SUMOylation sont colorées en vert.

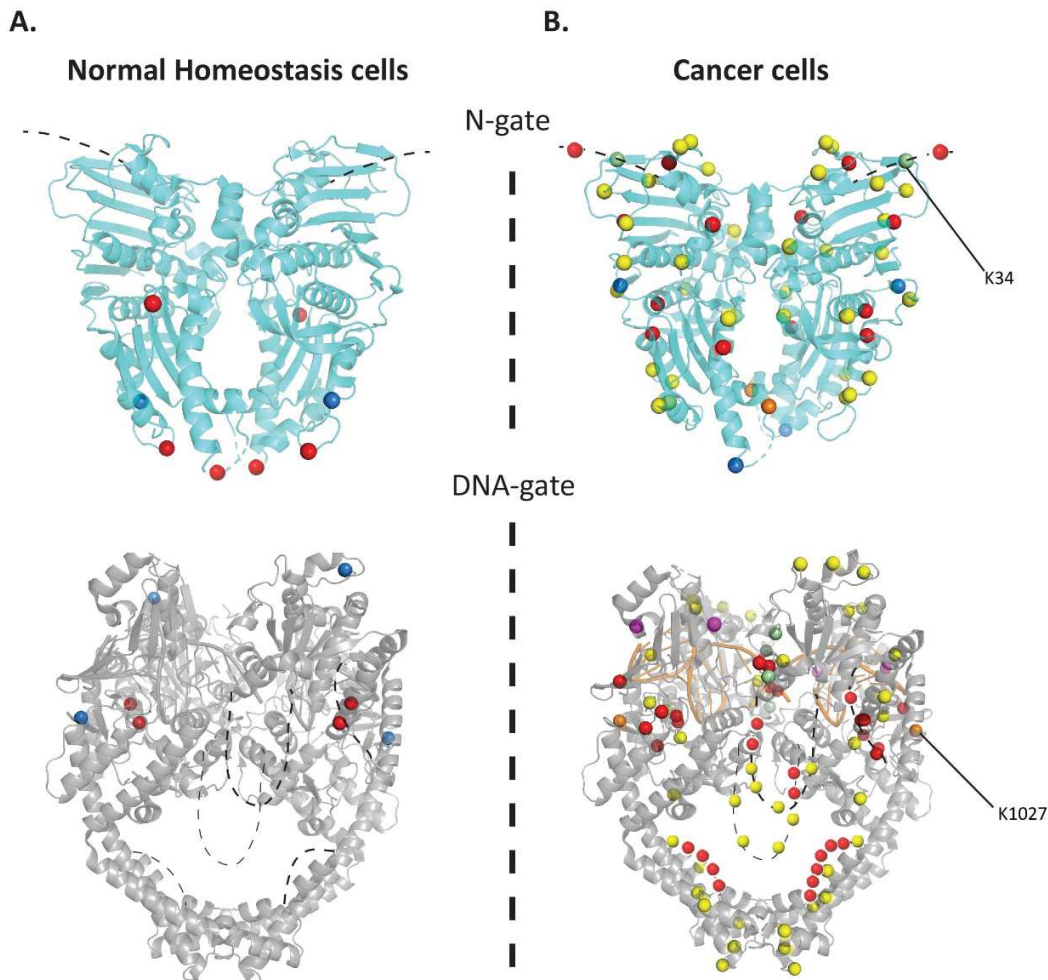


Figure 65 Positions des modifications post-traductionnelles présentes sur le corps catalytique de la TopII β . Le code couleur est identique à la figure 64. K368 pouvant être acétylé, SUMOylé et ubiquitylé au sein d'un même stade homéostatique cellulaire est coloré en orange. Les résidus SUMOylés pouvant être ubiquitylés sont colorés en vert pâle. K974 pouvant être acétylé et ubiquitylé au sein d'un même stade homéostatique cellulaire est coloré en violet.

Concernant l'ubiquitylation, la TopII β présente des sites de modifications sur l'ensemble de sa séquence protéique. La TopII β porte dans sa partie N-terminale une lysine en position 34 pouvant être ubiquitylée. La lysine K34 peut également être sujette à une SUMOylation montrant que l'extrémité N-terminale chez la TopII β est régulée par des PTMs contrairement à celle de la TopII α . 14 sites SUMOylation ont été identifiés, le résidu K1266 ne peut être que SUMOylé, tandis que les autres résidus sont aussi sujets à une réaction d'ubiquitylation.

Comparaison de la position des sites de phosphorylation et d'acétylation des deux isoformes de TopIIs humaines

L'alignement des séquences protéiques TopII α et β se trouve en *Annexe 1* de ce manuscrit. Après avoir comparé la distribution des PTMs sur les TopII exprimées en cellules cancéreuses et non cancéreuses, nous avons comparé cette distribution entre les deux homologues. Grâce à cet alignement, nous avons pu mettre en évidence des sites de phosphorylations conservés entre les deux isoformes, sites qui sont modifiés dans les cellules en équilibre homéostatique et cancéreuses. Ces phosphorylations pour les deux isoformes sont principalement localisées sur les domaines C-terminaux non conservés, à l'exception des résidus S709 (TopII α)/S725 (TopII β). Le résidu S390 de la TopII α et son équivalent la S406 de la TopII β ne sont phosphorylés que dans des cellules en équilibre homéostatique BHK21. Les seuls résidus dont le rôle est documenté dans la littérature sont en position 1213, 1354, 1361, 1365, 1393 et 1469 chez la TopII α ^{114,244,276,277}. Selon l'alignement de séquence, seuls certains sites de phosphorylation communs aux deux isoformes sont modifiés dans les deux types cellulaires (**Figure 66**), ce qui n'est pas le cas concernant les acétylations. Les acétylations conservées entre les deux isoformes des TopIIs humaines sont les résidus suivants K520 (TopII α) / K536 (TopII β), K584 (TopII α) / K600 (TopII β) et K1011 (TopII α) / K1027 (TopII β). Les acétylations 520/536 et 584/600 sont localisées en surface et à l'intérieur du domaine TOPRIM, tandis que les acétylations 1011/1027 se situent dans le domaine Tower, à proximité et pointant vers l'ADN. Les positions de ces sites ne sont pas modifiées dans les cellules cancéreuses et aucune étude spécifique sur ces résidus n'a été reportée. Certains sites de phosphorylation de la TopII β ont été identifiés sur des régions non conservées chez la TopII α et sont donc spécifiques à cette isoforme. Cela concerne les sites T1262, T1287, S1395, T1398, S1447, S1517, S1519 et S1576. Ces derniers sont donc peut-être importants pour le fonctionnement spécifique de la TopII β .

TopII α		S709		S1295 S1213	S1393 S1391 S1365 S1361 S1354 S1351	S1495 S1471 S1469 S1449
	Porte N	Porte à ADN	Porte C	CTD		
TopII β		S730		S1231 S1331	S1408 S1419 T1426 S1430 S1466 S1468	S1517 S1545 S1547 S1571

Figure 66 Sites de phosphorylation communs aux TopII α et β identifiés dans des cellules saines et cancéreuses.

L'alignement de séquences en *Annexe 1* permet de visualiser une région dans le domaine C-terminal qui est particulièrement phosphorylée dans les deux isoformes. Cette région s'étend des résidus 1354 à 1397 chez la TopII α et de 1420 à 1475 chez la TopII β . C'est une zone de la TopII α connue pour être phosphorylée par les caséine kinase II, p34^{cdc2} et GSK3 β , et pour intervenir notamment dans la stabilité des TopIIs, un exemple illustrant cela est la dégradation de TopII α par la voie protéasomal initiée par la phosphorylation des sérines 1361 et 1365^{244,276}.

Il serait intéressant de mieux caractériser cette zone qui peut potentiellement être une plateforme de recrutement de partenaires protéiques.

Analyse de sites modifiés pertinents pour l'activité catalytique de l'enzyme

Nous nous sommes intéressés particulièrement au rôle de la lysine 168 chez la TopII α . Nous avons montré que l'acétylation de ce résidu conservé peut jouer un rôle dans le couplage entre l'hydrolyse de l'ATP et la dimérisation du domaine ATPase²⁶⁷.

Cette étude en combinaison avec la littérature nous indique qu'il faut prendre en compte l'impact des PTMs dans l'étude du cycle catalytique des TopII. En tenant compte de ces modifications, il sera à l'avenir peut être possible de d'inhiber de façon plus spécifiquement ces enzymes tout au long du cycle cellulaire ou à une étape bien précise du cycle catalytique. À la vue du grand nombre de modifications présentes chez les deux isoformes, nous souhaiterions dans la suite de ce travail caractériser les positions suivantes qui selon nous, permettraient de mieux comprendre l'impact des PTM.

Y 805 (TopII α)

La tyrosine catalytique Y805 a été identifiée comme phosphorylée dans deux lignées cellulaires leucémiques lymphocytaires, la lignée de lymphoblaste K-562 et la lignée de lymphocyte T de Jurkat traitée à la calyculin A un inhibiteur de phosphatase serine/thréonine PP1 et PP2A, et avec le pervanadate, un inhibiteur de phosphatase tyrosine.

Les cellules K-562 possèdent le gène de fusion BCR-ABL conduisant à une anomalie dite du chromosome de Philadelphie²⁷⁸. Cette aberration génétique produit une protéine ayant une activité de tyrosine kinase dérégulée²⁷⁹. Les lymphocytes de Jurkat sont utilisés pour leur grande production d'interleukine 2, cytokine participant à la croissance des lymphocytes T. Il a été montré que cette lignée est déficiente en phosphatase PTEN et SHIP. L'effet du pervanadate sur cette lignée est la hausse de l'activité de tyrosine kinase src like, lck et fyn entre autres^{280,281}. Quant à la calyculin A elle dégrade I κ B β ²⁸² impactant le bon fonctionnement de NF- κ B²⁸³. On peut en conclure que la phosphorylation de la tyrosine 805 est un évènement anormal et dont le rôle reste à déterminer dans le contexte de la régulation de ces cellules cancéreuses.

Une phosphorylation à cette position impactera nécessairement le mécanisme catalytique des TopIIs, mais pourrait ne pas inhiber complètement la réaction de transestérification. En effet, la valeur calculée du pKa est de 6 pour une phosphotyrosine contre 10 pour une tyrosine normale²⁸⁴, soit plus acide est plus réactive encore à échanger des électrons avec une base. Néanmoins la présence d'un groupement phosphate à l'extrémité de la chaîne latérale de la tyrosine catalytique peut aussi impacter d'un point de vue stérique l'insertion de l'ADN au niveau du domaine de liaison (**Figure 67**). Cependant le calcul du pKa ne prend pas en compte l'environnement physico-chimique de cette tyrosine qui est dynamique durant le cycle catalytique et en interaction avec les acides nucléiques. Des études de dynamique moléculaire seraient intéressantes pour voir si cette modification peut influencer sur la capacité de coupure de l'ADN par la TopII α . Les phosphotyrosines sont différentes des phosphoserines/phosphothréonines, leur groupement fonctionnel étant plus grand et morphologiquement différent, elles sont capables d'interagir avec des partenaires qui possèdent un domaine de liaison des phosphotyrosines²⁸⁵. Une caractéristique qui diffère des domaines de reconnaissance des phosphosérines et phosphothréonine²⁸⁶. Il est donc possible que

les TopII α portant cette modification puissent avoir une activité catalytique différente des TopII α ne portant pas cette modification.

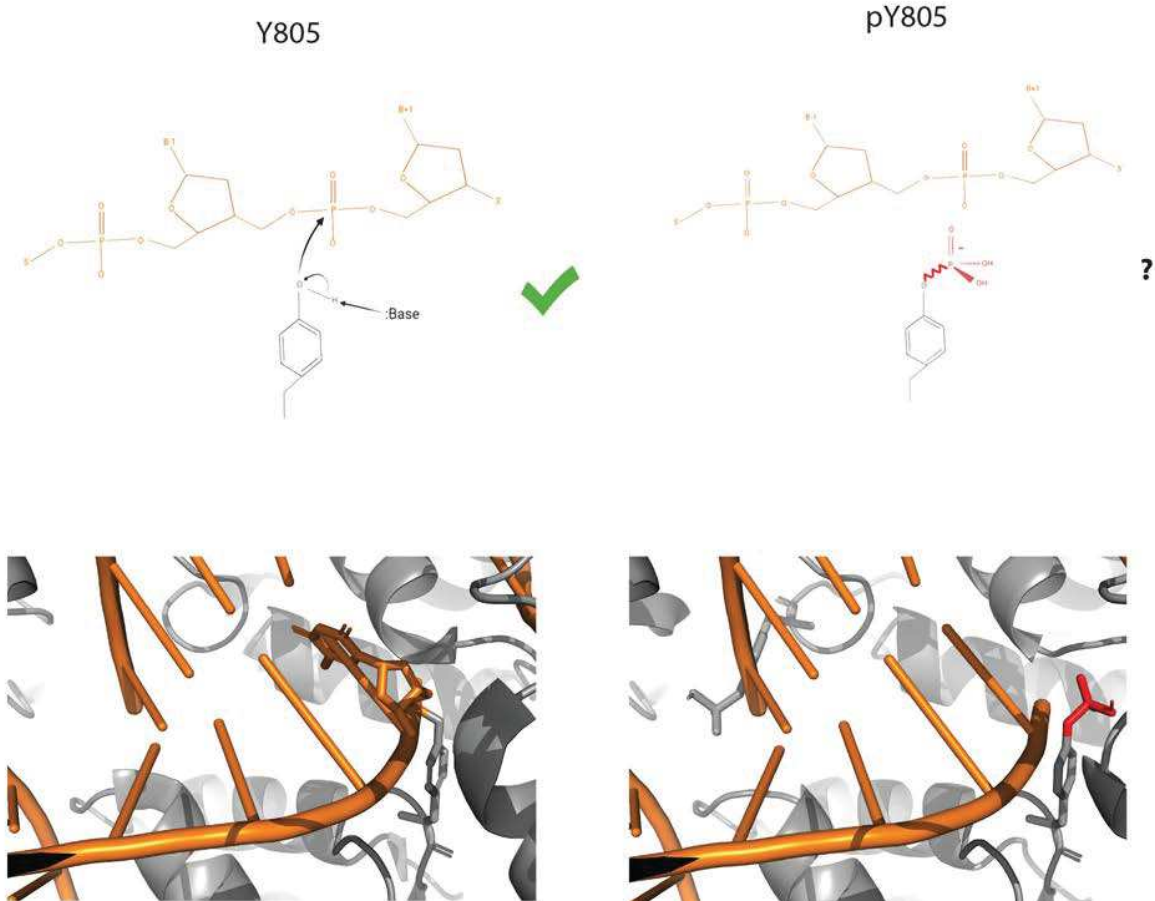


Figure 67 Possibles impacts de la phosphorylation de la tyrosine catalytique de la TopII α . Visualisation schématique (en haut) et sur la structure (en bas) de la tyrosine catalytique non phosphorylé (à gauche) (PDB ID : 5GWK) et phosphorylé (à droite). La structure portant la mutation ponctuelle est générée avec le logiciel Vienna-PTM 2.0²⁸⁷⁻²⁸⁹.

K1196 (TopII α)

La lysine 1196 est identifiée comme acétylée dans les cellules de Jurkat traitées au pervanadate et à la calyculin A. Cependant cette lysine est ubiquitinylée dans ces mêmes cellules traitées au bortezomib, un inhibiteur du protéasome 26S ainsi que dans des cellules Hep-2 une lignée dérivée des cellules *HeLa* avec ce même traitement. Enfin K1196 a été identifiée comme SUMOylée dans des cellules *HeLa*²⁹⁰⁻²⁹².

La position 1196 se trouve à la limite du corps catalytique structuré et du CTD intrinséquement désordonnée. Nous savons que le CTD peut participer à l'activité catalytique⁷⁶, bien que l'on ne connaisse pas pour l'heure son rôle exact dans l'activité de la TopII α . Nous pouvons supposer que le comportement de l'enzyme serait altéré suivant la présence ou non de modification sur cette position. Il est possible qu'une acétylation qui est un petit groupement chimique influera différemment d'un groupement SUMO ou Ubiquitine sur la localisation du CTD par rapport au corps catalytique. Il est cependant difficile à ce stade de faire plus d'hypothèses sur cette position sans données structurales et fonctionnelles sur cette partie de l'enzyme.

S709 (TopII α)/ S725 (TopII β)

Ces phosphorylations se trouvent sur une zone où la séquence peptidique est strictement conservée entre les deux isoformes. Les phosphorylations S709 et S725 ont été identifiées dans nos études sur les 2 isoformes produits dans la levure. Sur Phosphosite⁺ on retrouve ces modifications au sein des cellules *HeLa*, dans les cellules pulmonaires cancéreuses PC-9 et à partir d'analyse sur le foie de souris saine²⁹³⁻²⁹⁵.

Ces phosphorylations se trouvent à proximité de l'ion Mg²⁺ impliqué dans la catalyse de la réaction de coupure de l'ADN. Pour les deux isoformes, ces serines participent à la stabilisation de cet ion en stabilisant l'hélice A' α 1 du domaine de liaison à l'ADN via une interaction avec la glutamine 544 pour la TopII α et 560 pour la TopII β (**Figure 68**).

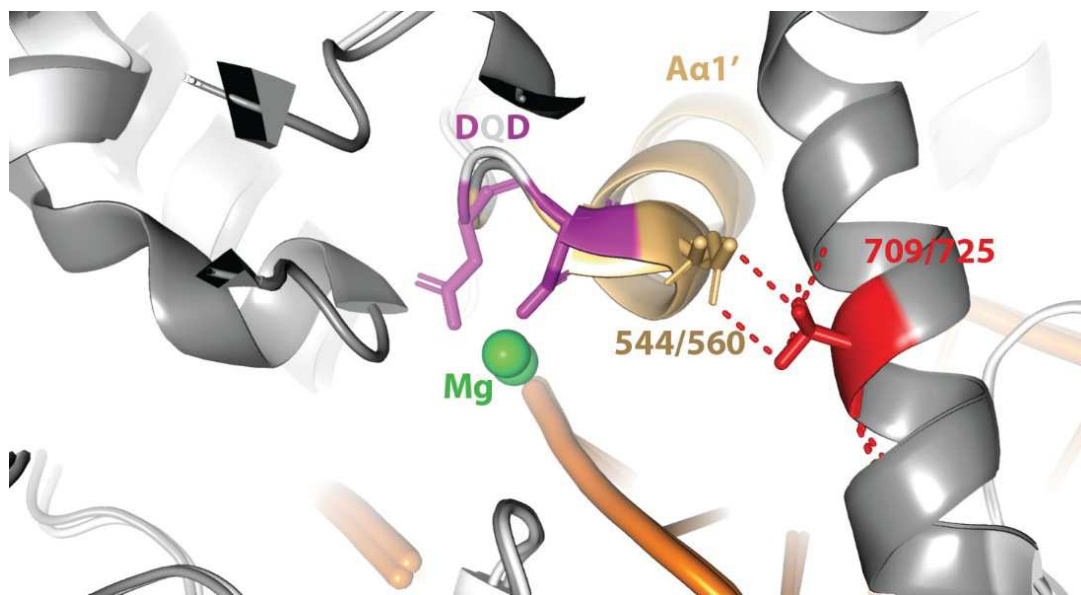


Figure 68 Les sérines 709 (TopII α)/725(TopII β) participent de façon indirecte au maintien de l'ion cofacteur magnésium coloré en vert en stabilisant l'hélice A α 1' par l'interaction avec la glutamine 544 (TopII α)/560(TopII β) coloré en orange claire, ce qui a pour conséquence de stabiliser la position du motif DQD coloré en violet qui interagit directement avec l'ion cofacteur.

Enfin cette serine est conservée chez les isoformes humains mais pas chez la levure *S.cerevisiae* ou chez la drosophile où elle est remplacé dans les deux cas par une alanine²⁷⁰.

Ces éléments nous amènent à penser que cette position est importante car elle est spécifique aux eucaryotes supérieurs et se situe dans une zone avec de larges mouvements allostériques. Enfin elles participent à la stabilisation de l'ion magnésium nécessaire au bon déroulement de la réaction de transestérification. Ces positions étant phosphorylé chez la TopII α et β indépendamment du statut homéostatique de la cellule, il est possible de penser que cette modification est importante pour les mouvements allostérique du domaine de liaison à l'ADN, ainsi qu'à la réaction de coupure du segment G.

7. Étude de l'influence des phosphorylations sur les TopII α et β

L'identification des phosphorylations et des acétylations sur les isoformes entiers de TopIIs humaines a mis en lumière une multitude de résidus qui sont régulés par les PTMs. Ces sites de modifications affectent des résidus à des positions clés au sein de la structure tridimensionnelle. Néanmoins la question qui est posée est de savoir quel effet les PTMs comme les phosphorylations identifiées en abondance, ont sur l'activité globale et l'architecture tridimensionnelle des TopIIs

humaines. Pour répondre à cette question nous avons divisé le travail en deux projets : l'étude de l'influence des phosphorylations sur les activités des TopII α humaines entières et l'étude de l'influence des phosphorylations sur la structure des domaines C-terminaux α et β , particulièrement impactés par ces modifications.

7.1. Étude de l'influence des phosphorylations sur les TopII α entières

7.1.1. Mise au point de la production des TopII α et β déphosphorylées

Afin de produire un échantillon entièrement déphosphorylé, nous avons choisi d'utiliser la λ phosphatase (LPP)²⁹⁶ issue du bactériophage λ ²⁹⁷ que nous avons exprimée dans les bactéries et purifiée d'après le protocole décrit dans la section « Matériel et méthode » de ce manuscrit.

Les TopII α ont été incubées avec une quantité croissante de LPP dans un tampon contenant des ions manganèse nécessaires à l'activité de la LPP et du détergent BriJ 35²⁹⁶. Nous avons réalisé l'incubation avec la LPP sur la nuit à 4°C afin de déphosphoryler en parallèle de l'étape de coupure des étiquettes de purification en N et C-terminale par la protéase P3C (**Figure 69**). La déphosphorylation des échantillons est analysée sur gels SDS-PAGE après incubation dans le colorant commercial Pro-Q Diamond qui colore de façon spécifique les phosphoprotéines. Il contient un composé fluorescent qui a un profil d'excitation et d'émission 550nm/580 nm est spécifique des phosphoprotéines²⁹⁸.

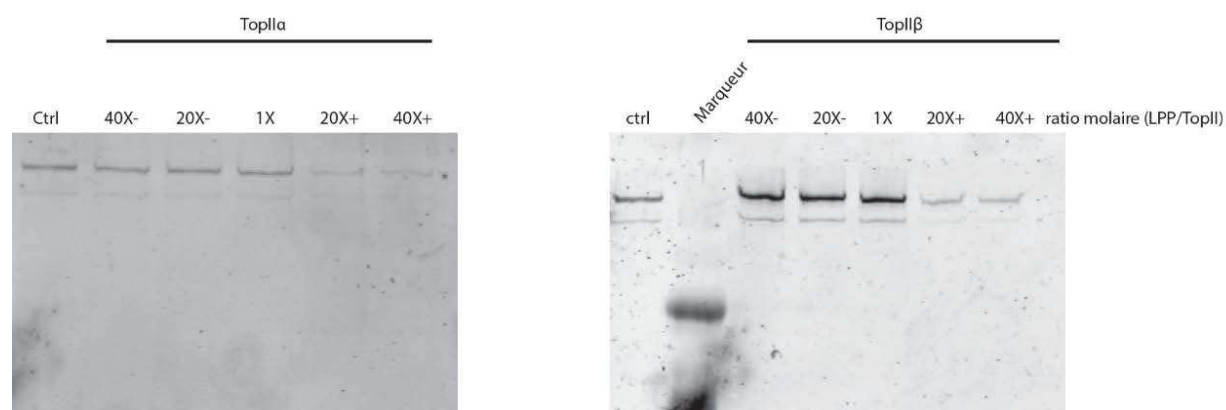


Figure 69 Analyse de l'efficacité de la réaction de déphosphorylation effectuée à 4°C sur la nuit par la LPP sur gel SDS-PAGE coloré avec le colorant spécifique aux phosphoprotéines Pro-Q Diamond. Le contrôle annoté « ctrl » est la TopII α sous sa forme phosphorylée en fin de purification.

Durant l'incubation sur la nuit, un ratio mole à mole de 1/40 (TopII/LPP) a été nécessaire pour déphosphoryler les deux isoformes *in vitro*.

Compte tenu de la quantité nécessaire pour une réaction optimale à 4°C, nous avons décidé d'incuber le mélange réactionnel à 30°C pendant 30 minutes (**Figure 70**).

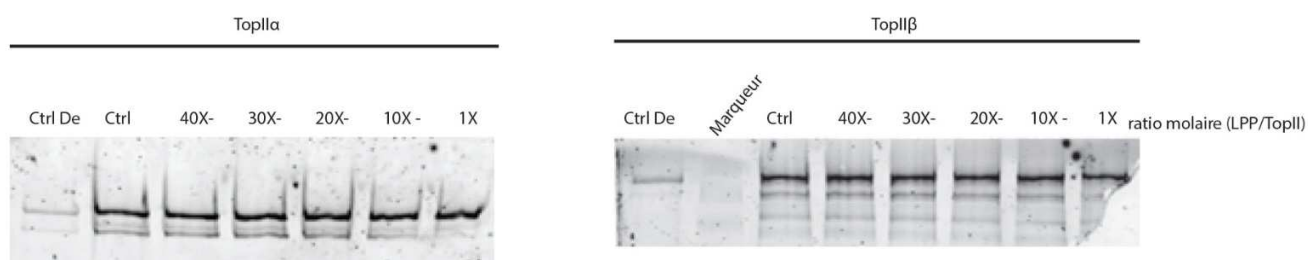


Figure 70 Analyse de l'efficacité de la réaction de déphosphorylation effectuée à 30°C pendant 30 minutes par la LPP sur gel SDS-PAGE coloré avec le colorant spécifique aux phosphoprotéines Pro-Q Diamond. Le contrôle annoté « ctrl » est la TopII α et β déphosphorylées par la réaction précédente à 4°C (fraction 40X+).

Dans ces conditions, les échantillons sont faiblement déphosphorylés, même en incubant une quantité équimolaire de LPP et de TopIIs. Afin de tester l'activité de notre phosphatase purifiée, nous avons utilisé par comparaison une LPP commerciale de NEB (LPPc) dans les mêmes conditions.

Dans un premier temps, étant donné que la concentration de la LPPc est exprimée en unité, nous souhaitons savoir combien une unité représente en quantité de LPP (**Figure 71**). Pour cela nous avons titré 1 μ l de cette enzyme sur un gel SDS-PAGE avec des quantités connues de LPP purifiée. De plus l'analyse sur gel SDS-PAGE permettra d'apprécier la pureté de la phosphatase commerciale et de la comparer avec celle que nous avons produite.

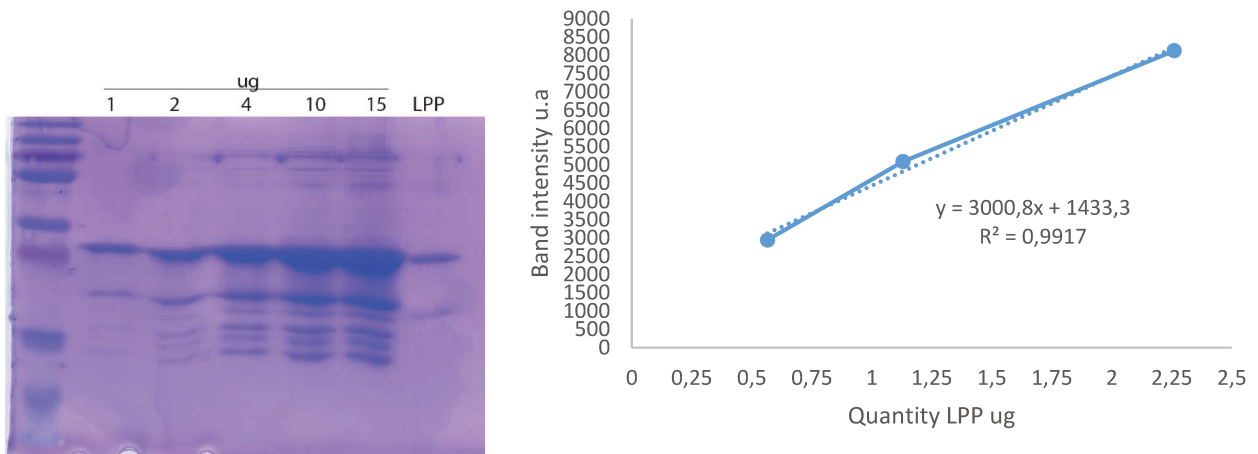


Figure 71 Détermination de la concentration de LPPc correspondant à 400 unités, par mesure de l'intensité de bande sur un gel SDS-PAGE. La mesure d'intensité de bande a nécessité l'utilisation du logiciel de traitement d'image ImageJ.

D'après notre courbe de titration, 1 µl (c'est-à-dire 400 unités) de LPPc correspond à 0,32 µg. De plus, nous pouvons dire que la pureté de la LPP purifiée dans le laboratoire est proche de celle de la LPPc. Connaissant ces paramètres, nous avons incubé à 4°C sur la nuit 1 µl de LPPc avec des quantités croissantes de TopIIβ en utilisant le tampon employé précédemment. Étant donné que la TopIIβ comporte un plus grand nombre de site phosphorylation identifié, nous avons décidé de tester l'efficacité de la LPPc sur cette protéine. Afin de comparer l'activité entre la LPPc et celle produite dans notre laboratoire LPP, nous avons utilisé un mélange réactionnel avec une quantité équimolaire de TopIIβ et de LPP dans ces mêmes conditions. Nous avons également ajouté deux autres contrôles : l'utilisation du tampon commercial de la LPPc et une incubation de la TopIIβ avec de la LPPc à 30°C, 30 minutes comme recommandé par le fabricant (**Figure 72**).



Figure 72 Analyse de l'efficacité de la réaction de déphosphorylation effectuée par la LPPc sur gel SDS-PAGE coloré avec le colorant spécifique aux phosphoprotéines Pro-Q Diamond. Le contrôle annoté « Ctrl » est la TopIIβ sous sa forme phosphorylée en fin de purification. L'échantillon « a » représente le résultat d'une réaction équimolaire entre LPPc:TopIIβ sur la nuit à 4°C. L'échantillon « b » représente le résultat d'une réaction équimolaire entre LPPc:TopIIβ pendant 30 minutes à 30°C. L'échantillon « c » représente le résultat d'une réaction équimolaire entre LPPc:TopIIβ pendant 30 minutes à 37°C. Les autres réactions se sont déroulées à 4°C sur la nuit.

La conclusion de cette expérience est que l'activité de la LPPc est identique à celle de la LPP. En utilisant les mêmes ratios, le taux de phosphorylation est similaire entre les traitements avec les deux LPP. L'utilisation du tampon commercial ou l'incubation à 30°C avec LPPc ne semble pas changer l'efficacité de la réaction.

Nous avons donc choisi de continuer d'utiliser la λ phosphatase produite dans notre laboratoire, la réaction a été réalisée avec un ratio 40 moles de LPP pour 1 mole de TopII .

7.1.2. Production à grande échelle des TopIIα et β sous leurs formes phosphorylée et déphosphorylée

Une fois la réaction de déphosphorylation mise au point, nous avons entrepris de produire de la TopII α et β sous leur forme phosphorylée et déphosphorylée à grande échelle. L'objectif de produire à partir de grandes quantités est d'avoir assez de protéine pour faire des tests d'activités et évaluer l'influence des phosphorylations sur leurs activités catalytiques.

Les protocoles de purification pour les deux isoformes sont identiques à ceux décrits pour les protéines natives. Cependant après élution de l'étape d'affinité sur colonne Streptavidine, la

quantité de protéine obtenue est divisée en deux échantillons. La réaction de déphosphorylation se fait en parallèle de la coupure à la P3C. La 1^{ère} échantillon sera déphosphorylé, le second sera incubée dans les mêmes conditions mais sans LPP, le troisième échantillon sera uniquement digéré à la P3C dans les conditions normales de purification (**Figure 73 et 74**).

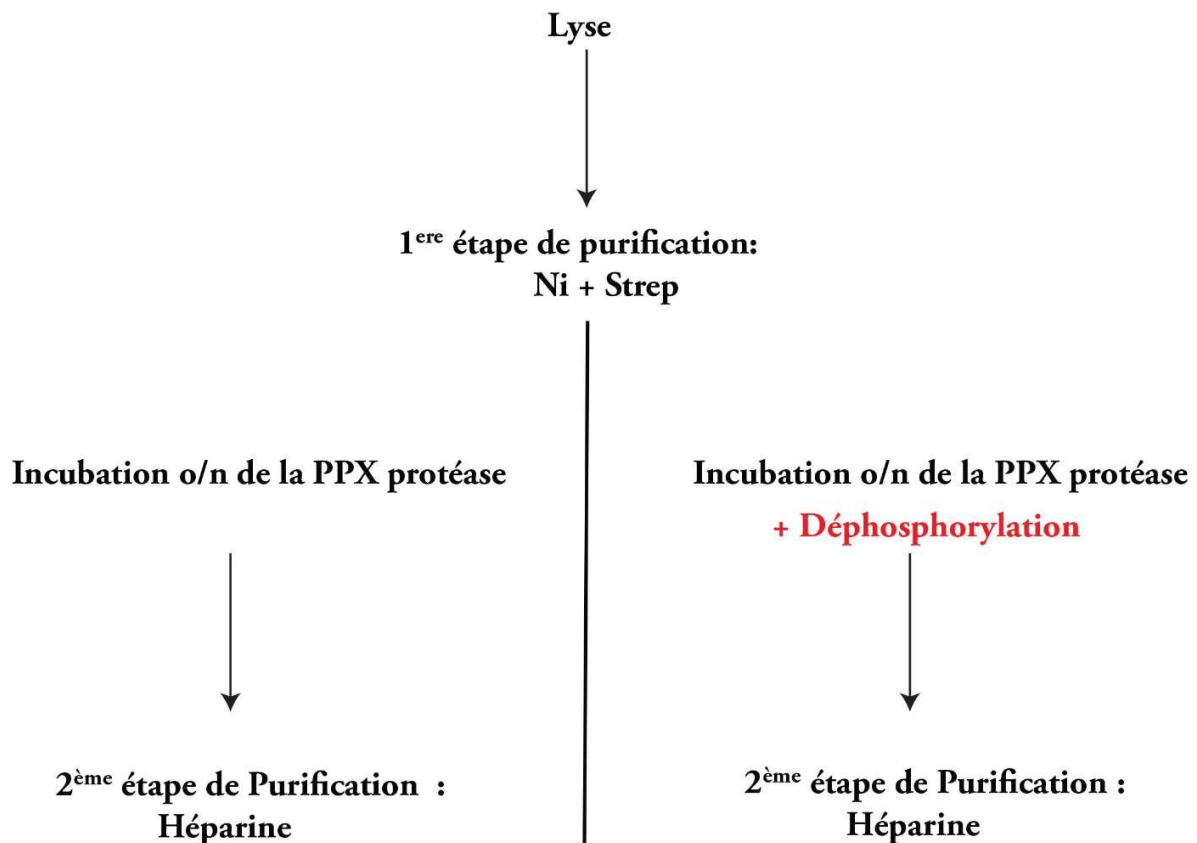


Figure 73 Schéma récapitulatif des étapes de purification en vue de la production de la TopII α sous forme phosphorylé et déphosphorylée. Le tampon de déphosphorylation finale est le suivant : 25 mM HEPES pH 8.0 ; 190 mM NaCl ; 190 mM KCl ; 14 % Glycérol ; 1 mM MnCl₂ ; 0.01% Brij 35 ; 2 mM DTT.

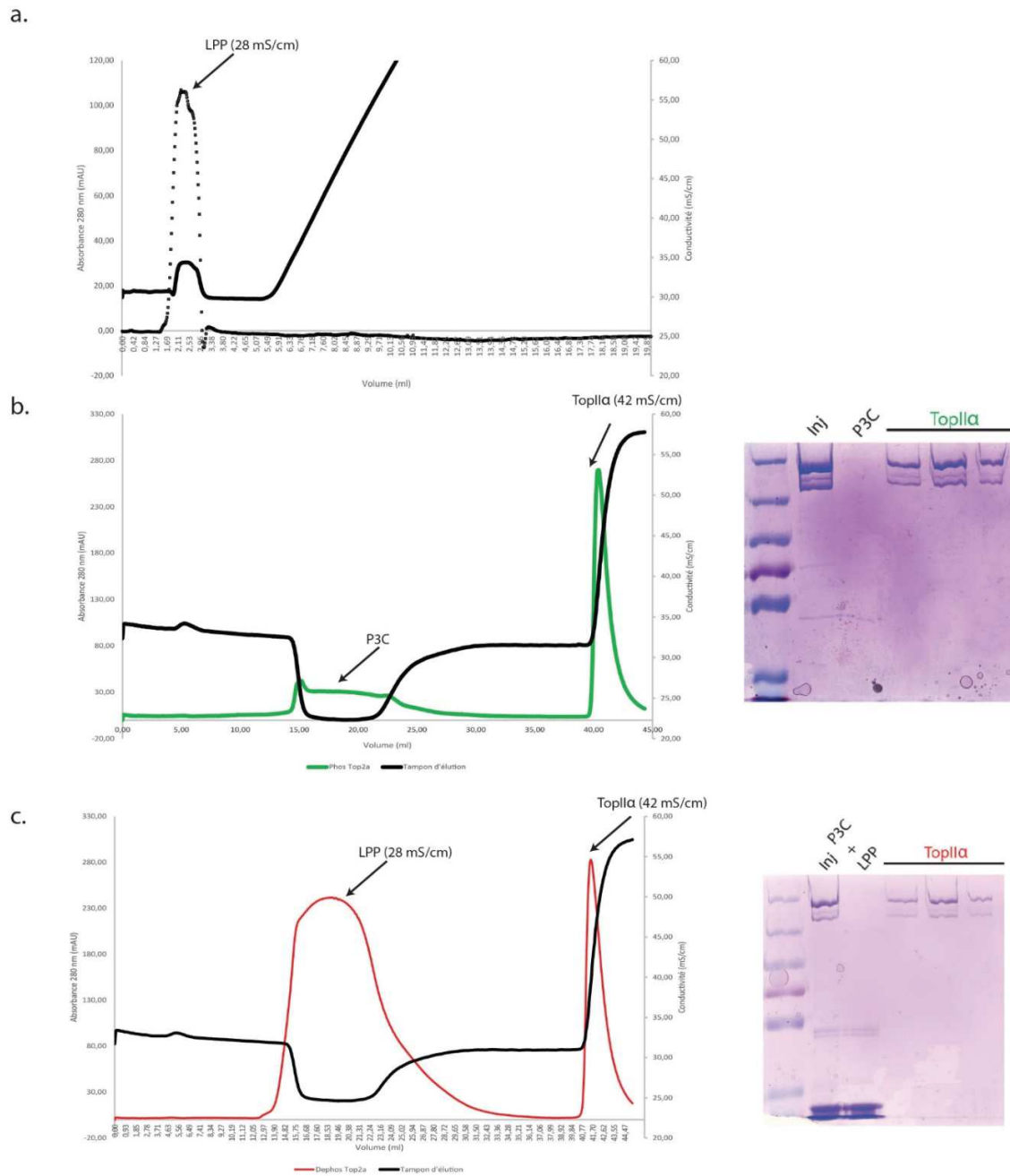


Figure 74 Purification de la TopII α sous forme phosphorylée et déphosphorylée. Les chromatogrammes et gels SDS-PAGE représentent le passage des échantillons sur une colonne échangeuse d'ion Héparine. (a) Le premier chromatogramme représente l'élué d'un échantillon de LPP seul, ce dernier n'est pas retenu par la colonne et est évacué de la colonne dans les conditions de purifications établies. (b) Le chromatogramme du milieu représente la purification d'un échantillon TopII α phosphorylé + P3C. La P3C n'est pas retenue par la colonne et la forme phosphorylée de la TopII α est éluée de la colonne à une conductivité de 42mS/cm.(c) Le chromatogramme du bas représente la purification d'un échantillon TopII α déphosphorylé + P3C + LPP. La P3C et la LPP ne sont pas retenus par la colonne et la forme déphosphorylée de la TopII α est éluée de la colonne à une conductivité de 42mS/cm. Les gels SDS PAGE montrent le profil d'élué des formes phosphorylée et déphosphorylée en fin de purification.

Lors de l'étape de purification de l'échantillon déphosphorylé sur la colonne Héparine, nous observons une augmentation de l'absorption à 280 nm dans la fraction non retenue. Ce pic d'absorption correspond à la LPP, d'après des tests réalisés sur le passage de LPP seule sur colonne Héparine dans les mêmes conditions. Le rendement est de 2 mg de chaque forme à partir de 6 L de culture de mammifère, soit un rendement de 1mg/L de culture. La disparition de la bande caractéristique correspondant à la LPP sur le gel SDS-PAGE lors de l'éluion de la TopII α montre que l'utilisation de la colonne échangeuse d'ions Héparine permet une bonne séparation de la LPP et de la TopII α .

Afin de vérifier si la réaction de déphosphorylation a fonctionné, les échantillons sont analysés sur un gel SDS-PAGE suivi d'une coloration au colorant Pro-Q Diamond (**Figure 75**).

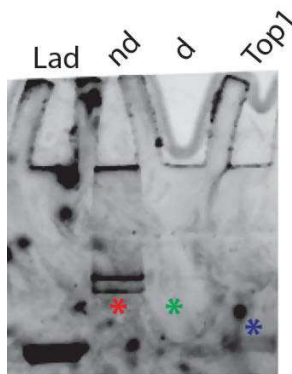


Figure 75 Vérification de l'efficacité de la réaction de déphosphorylation sur un gel SDS-PAGE coloré avec le colorant spécifique aux phosphoprotéines Pro-Q Diamond. Les astérisques rouge, vert et bleu représentent respectivement la forme phosphorylée, déphosphorylée et le contrôle la Top1 d'*E.coli*.

En comparant l'intensité de bandes révélées par la coloration des phosphoprotéines, nous pouvons en conclure que la réaction de déphosphorylation a fonctionné. Ces échantillons ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse pour identifier les sites de phosphorylation potentiellement présents. Les résultats de l'analyse sont reportés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**) :

	TopII α phosphorylé	TopII α déphosphorylé
Nombre de sites de phosphorylation identifiés	28	2
Nombre de peptides phosphorylés	809	12
Nombre de peptides total	14296	15561
Taux de phosphorylation	5.66%	0.07%

Tableau 3 Résultat de l'analyse par spectrométrie de masse pour l'identification des peptides modifiés et non modifiés en fin de purification.

L'analyse en spectrométrie de masse indique que la fraction supposée entièrement déphosphorylée ne l'est pas entièrement car deux sites sont encore identifiables, la sérine 1106 et la thréonine 1343. Cependant nous caractériserons ce lot de protéine, car le taux de phosphorylation de l'échantillon TopII α déphosphorylée est inférieur à celui du contrôle phosphorylé. De plus le nombre de sites phosphorylés identifiés dans l'échantillon TopII α phosphorylée est en adéquation avec le nombre que l'on identifie usuellement ²⁶⁷.

Les échantillons produits avec un rendement et une pureté suffisante, nous avons voulu tester si la présence ou non de phosphorylation impacte la stabilité thermique de l'enzyme (**Figure 76**). Pour cela nous avons utilisé la méthode de la fluorimétrie différentielle à balayage (NanoDSF). La mesure de fluorescence est basée sur l'absorption et l'émission des résidus aromatiques tryptophane et tyrosine, qui émettent de la fluorescence aux longueurs d'ondes 330 nm et 350 nm. Lors de la dénaturation de la structure protéique, les tryptophanes enfouis et impliqués dans les cœurs hydrophobes se retrouvent en surface et le ratio 330nm/350nm va augmenter, témoignant ainsi d'une dénaturation de la protéine. Les échantillons suivants ont été analysés avec cette technique : la TopII α phosphorylée, déphosphorylée et le contrôle, c'est-à-dire la TopII α phosphorylée qui n'a pas été incubée dans le tampon de déphosphorylation.

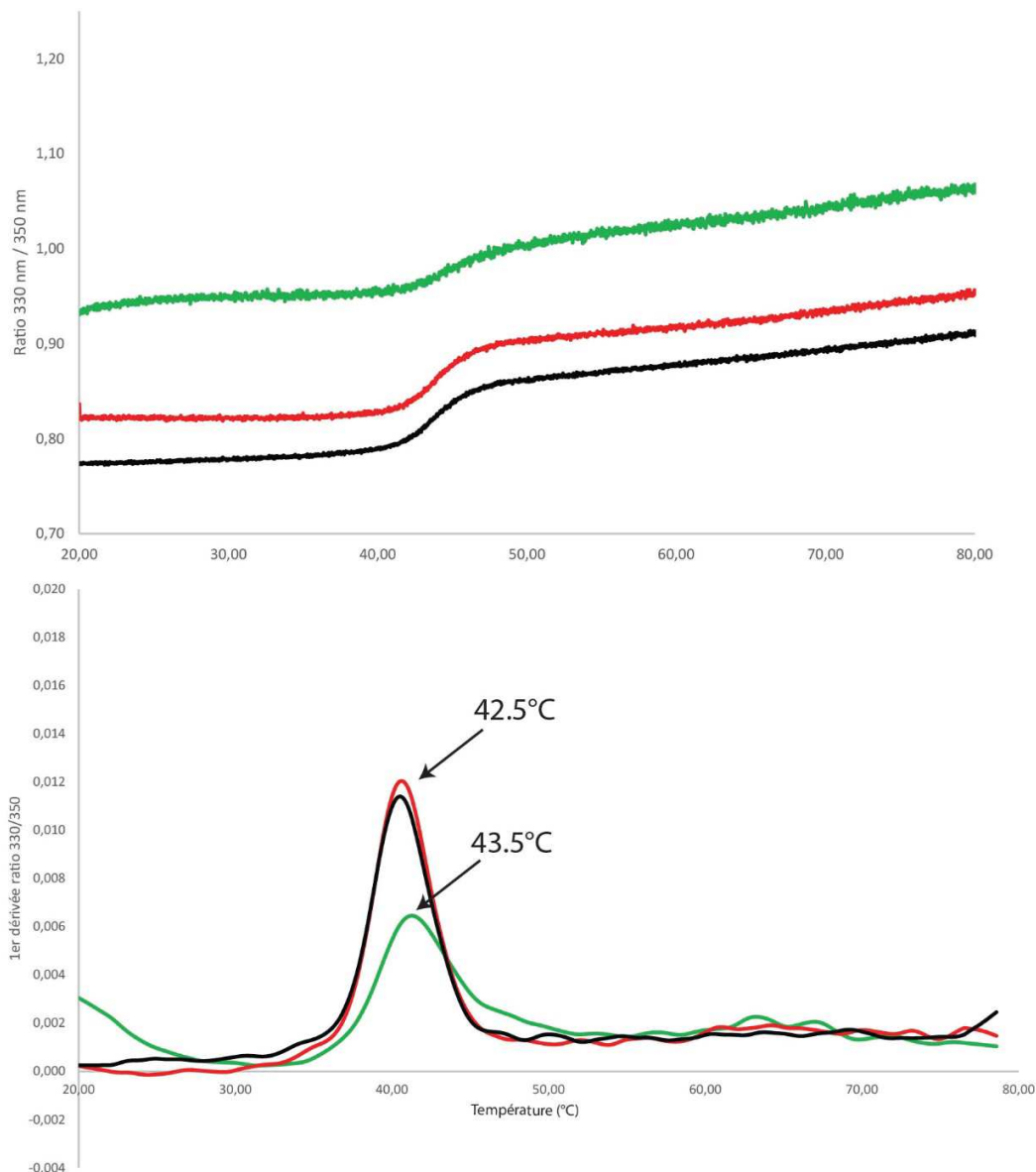


Figure 76 Analyse NanoDSF montrant la stabilité thermique des échantillons TopII α phosphorylée en vert, déphosphorylée en rouge et le contrôle TopII α phosphorylé n'ayant pas incubé dans le tampon de déphosphorylation finale. La mesure de stabilité est faite par calcul du ratio d'intensité de fluorescence à 330 et 350 nm pendant la montée en température. Le panel du haut mesure la valeur du ratio de l'émission de fluorescence 330/350 nm. Le panel du bas représente la 1^{er} dérivée de la valeur du ratio 330/350 nm et aide à la visualisation des résultats.

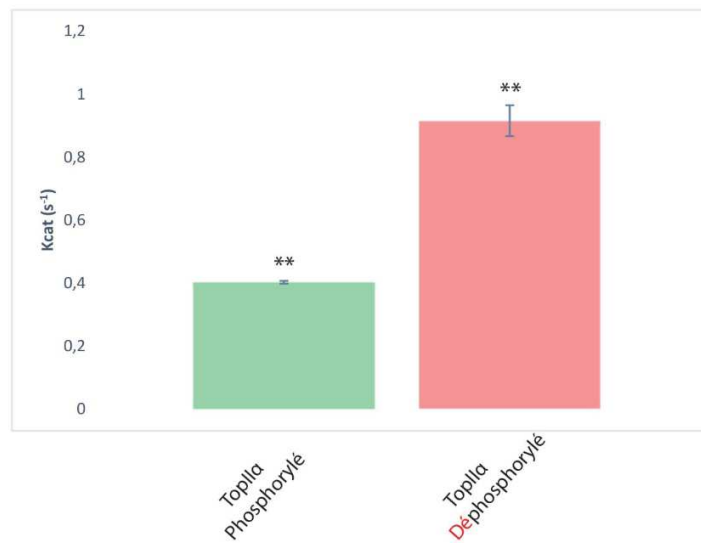
Dans les conditions d'analyse de la NanoDSF, la déphosphorylation de la TopII α ne modifie pas la stabilité thermique de l'enzyme. En effet si l'on compare avec l'étude portant sur l'étude du mutant K168A²⁶⁷ ou le projet portant sur l'étude fonctionnelle et structurale de la Gyrase en complexe avec l'ADN et la gépotidacine (voir Chapitre III)²⁹⁹ la stabilité thermique de ces protéines étaient impactée avec une différence de température de minimum 8°C. Sur ces résultats

nous en déduisons donc que la différence de température observée n'est pas significative. En conclusion l'absence de phosphorylation sur la protéine ne semble pas modifier la stabilité de la structure de la TopII α .

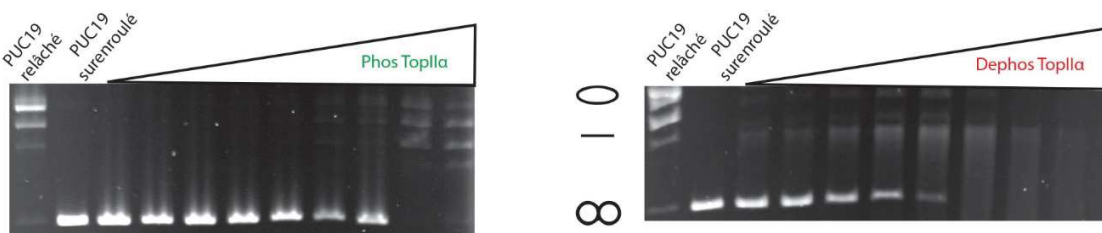
7.1.3. Influence des phosphorylations sur l'activité catalytique des TopIIs

La TopII α produite sous sa forme phosphorylée et déphosphorylée est en quantité suffisante pour des analyses fonctionnelles. À partir de ces échantillons, il est donc possible d'évaluer le possible impact des phosphorylations sur les activités catalytiques de la TopII α . Nous avons réalisé pour les deux formes en parallèle un test de relâchement de l'ADN, un test de décaténation et un test d'hydrolyse de l'ATP.

a.



b.



c.

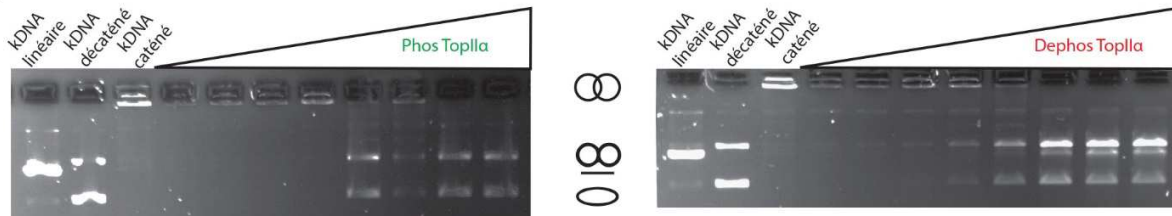


Figure 77 Étude de l'impact des phosphorylations sur l'activité *in vitro* de la TopIIα. (a) test d'hydrolyse de l'ATP, résultat moyenné sur deux triplicats. (b) test de relâchement sur un ADN PUC19 surenroulé négativement. (c) test de décaténation sur un réseau d'ADN circulaire kDNA (kinetoplast DNA).

L'interprétation commune à tous ces tests est que la forme déphosphorylée de la TopIIα a un effet sur sa fonction de régulation de la topologie de l'ADN. La constante catalytique de l'enzyme déphosphorylée est deux fois plus importante que son homologue phosphorylé, signifiant que l'enzyme déphosphorylé hydrolyse plus rapidement l'ATP (**Figure 77a**). Dans la réaction de relâchement, la TopIIα déphosphorylée est plus active sur un ADN surenroulé négativement que la TopIIα phosphorylé (**Figure 77b**). Cette observation peut expliquer les valeurs trouvées pour la

constante catalytique. Cependant nous observons uniquement la forme clivée du PUC19 et aucune bande correspondant à de l'ADN relâché, ce qui indique une religation incomplète. Enfin la TopII α peut décaténer l'ADN de façon un peu plus efficace que l'homologue phosphorylé, néanmoins comme pour le relâchement, il semblerait qu'une fraction d'ADN clivé persiste durant cette réaction (**Figure 77c**).

Ces résultats diffèrent de précédentes études publiées. À notre connaissance, seul trois études ont réalisées des réactions de déphosphorylation *in vitro* et tester l'activité des TopII. En 1985 Ackermann et al.³⁰⁰ ont déphosphorylé la TopII de *D.melanogaster*, l'enzyme était capable de relâcher l'ADN mais moins efficacement que l'enzyme sauvage ou l'enzyme traité par la kinase CK2. En 1990 Saijo et al.³⁰¹ ont déphosphorylé une TopII sans préciser quels isoformes, à partir de cellules de souris cancéreuses FM3A. Le traitement à la phosphatase a annihilé l'activité de relâchement. Enfin Shiozaki et al.³⁰² en 1992 ont déphosphorylé la TopII de *S.pombe* et ont conclu que le traitement à la phosphatase impacte l'activité de relâchement qui inhibe l'activité de l'enzyme, comparé à l'enzyme sans traitement. Le point commun sur ces trois travaux est l'absence d'analyse montrant l'efficacité de la réaction de déphosphorylation dû notamment à l'absence de tests fiable à l'époque. Néanmoins ces études vont dans la même direction à savoir une baisse de l'activité catalytique de relâchement de l'ADN si la TopII est déphosphorylée. Nos résultats montrent une activité de relâchement différente de ce qui a déjà été publié avec une proportion d'ADN qui n'est plus surenroulé, donc l'enzyme est bien encore active mais le fait qu'une fraction d'ADN clivé soit présente n'avait jamais été observé auparavant.

La question sur le rôle de la phosphorylation dans l'activité catalytique est donc complexe. Les résultats obtenus en l'état n'apportent pas de conclusion définitive, et des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette observation et interpréter correctement ce résultat. Enfin la même expérience devra être réalisée sur la TopII β .

7.2. Étude de l'influence des phosphorylations sur les domaines C-terminaux α et β

7.2.1. Purification du CTD de la TopII α et β

Les clonages du domaine C-terminal de la TopII α (CTDII α) et les protocoles de purification à partir de culture de bactéries ont été élaborés dans l'équipe à mon arrivée en thèse. Les étiquettes servant à la purification des CTDs sont les mêmes que pour les isoformes entiers : une étiquette 2Strep en N-terminal et une étiquette 10His en C-terminal. La production est réalisée dans la souche bactérienne LOBSTER³⁰³ avec 1 mM d'IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) pour l'induction. L'incubation après induction des cultures est réalisée pendant 4h à 37°C (**Figure 78**).

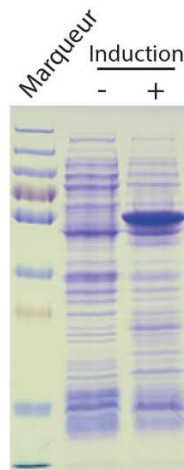
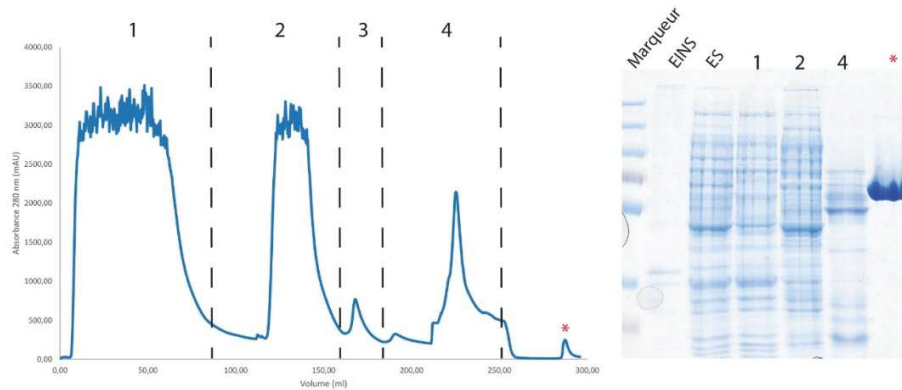


Figure 78 Test d'induction à l'IPTG sur des bactéries LOBSTR de CTDII α .

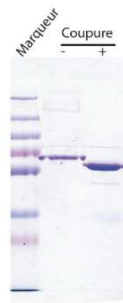
Les protocoles de lyse et de centrifugation sont identiques à ceux de la purification des isoformes entiers produits en cellules mammifères. La première étape de purification est réalisée sur deux colonnes d'affinité Ni²⁺ en tandem avec une double colonne d'affinité Streptavidine. Après des lavages successifs, l'élution est faite directement dans une colonne d'affinité Streptavidine (**Figure 79a**). Après élution et coupure à la protéase P3C pour retirer les étiquettes de purification (**Figure 79b**), la seconde étape de purification se fait sur colonne échangeuse d'ion Héparine, avec élution par un pallier de 350 mM NaCl et 350 mM KCl (**Figure 79c**).

Nous avons pu obtenir un rendement de 1,5mg/L de culture pour le CTD de la TopII α et de 1.0mg/L de culture pour le CTD de laTopII β . La pureté obtenue pour le CTD des deux isoformes est satisfaisante pour des études de biochimie et de biologie structurale (**Figure 79d**).

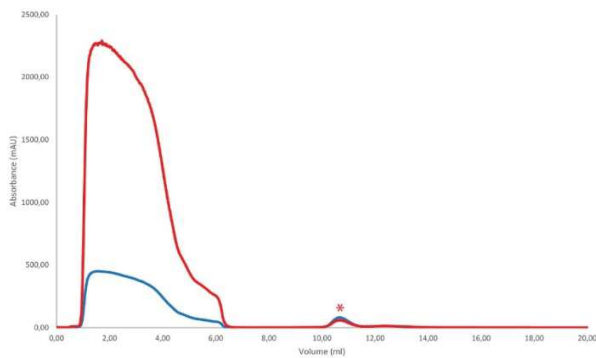
a.



b.



c.



d.

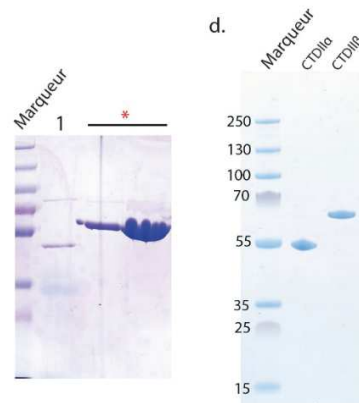


Figure 79 Purification des CTDs. (a) Après lyse des cellules, les échantillons sont soumis à une première étape de purification sur deux colonnes d'affinités Nickel et Streptavidine. Les fractions 1,2,3 et 4 correspondent dans l'ordre à 1 : l'injection de la fraction soluble, 2 : lavage avec 20 mM d'imidazole, 3 : lavage avec 60 mM d'imidazole, 4 : lavage avec 250 mM d'imidazole. L'astérisque correspond au pic d'élué avec 3 mM de desthioiotine. (b) Gel SDS-PAGE montrant l'efficacité de la coupure avec la protéase P3C. (c) Deuxième étape de purification sur une colonne échangeuse d'ion Héparine. L'astérisque correspond au pic d'élué avec 750 mM de sel. (d) Gel gradient SDS-PAGE montrant la pureté obtenue à la fin du protocole de purification pour les deux isoformes.

Nous avons choisi de phosphoryler les CTDs avec la caséine kinase II α (CKII) car c'est la kinase la plus documentée dans la littérature pour son rôle de dérégulation de l'activité globale de la TopII α ^{117,304}.

Nous avons incubé les CTDs avec des quantités croissantes de CKII produite de façon recombinante au préalable (voir la section « Matériel et Méthodes » de ce manuscrit). L'incubation se fait en présence d'ATP à 37°C pendant 2h (**Figure 80**).

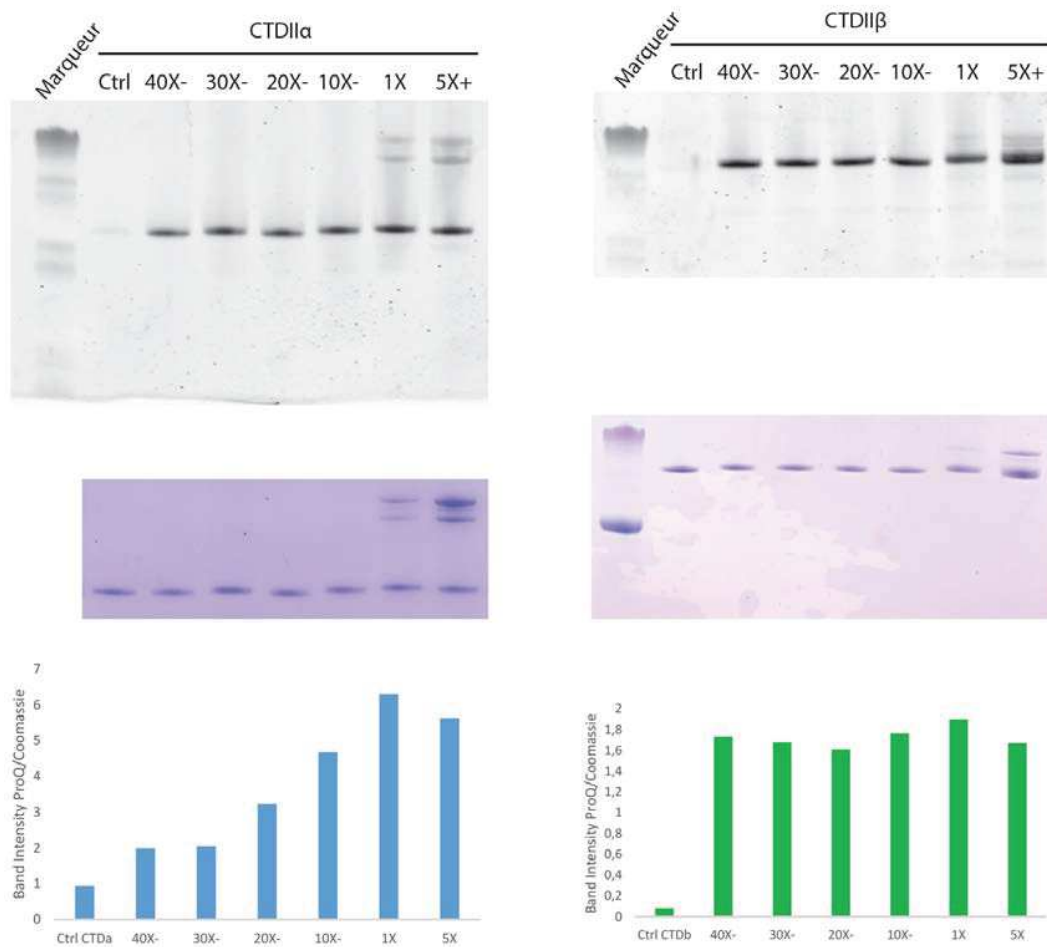


Figure 80 Analyse de l'efficacité de la réaction de phosphorylation effectuée à 37°C incubé pendant 2h par la CK2 sur gel SDS-PAGE coloré avec le colorant spécifique aux phosphoprotéines Pro-Q Diamond et au bleu de Coomassie pour les protéines totales. Le contrôle annoté « ctrl » est les CTDII α et CTDII β en fin de purification. Les graphiques représentent la valeur du ratio : d'intensité de bande des gels ProQ/intensité de bande des gels Coomassie.

L'analyse de l'intensité des bandes montre que pour les deux isoformes un ratio équimolaire (CKII/CTD) est suffisant pour phosphoryler tous les sites consensus de phosphorylation de la caséine kinase II α .

7.2.2. Production à grande échelle des domaines C-terminaux α et β sous leurs formes phosphorylée et déphosphorylée

Une fois la réaction de déphosphorylation mise au point, nous avons entrepris de produire les CTDs de la TopII α et β sous leurs formes phosphorylée et déphosphorylée à partir de 6L de culture bactérienne.

Les protocoles de purification sont identiques à ceux décrits précédemment. Cependant après élution de l'étape d'affinité sur colonne Streptavidine, la quantité de protéine obtenue est divisée en 3 lots. Une partie est phosphorylée, une deuxième est incubée dans les mêmes conditions mais sans CK2 et la troisième partie est uniquement digérée à la P3C. La réaction de phosphorylation par CK2 se fait à 37°C dans un tampon de phosphorylation pendant deux heures puis la coupure à la P3C se fait sur la nuit à 4°C (**Figure 81, 82 et 83**).

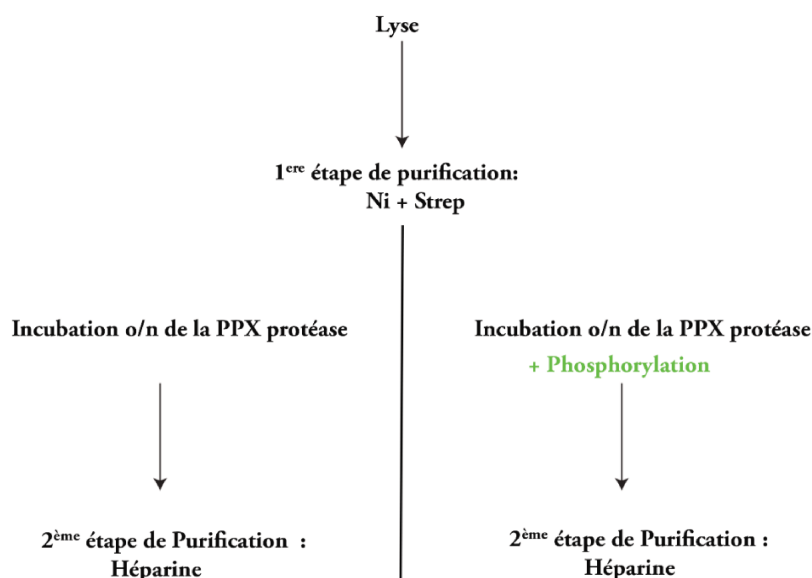


Figure 81 Schéma récapitulatif des étapes de purification en vue de la production des CTDII α et β sous forme phosphorylée et déphosphorylée. Le tampon de phosphorylation finale est le suivant : 50 mM Tris pH 8.0 ; 90 mM NaCl ; 35 mM KCl ; 5 % Glycérol ; 10 mM MgCl₂ ; 0.6 mM ATP ; 1 mM DTT.

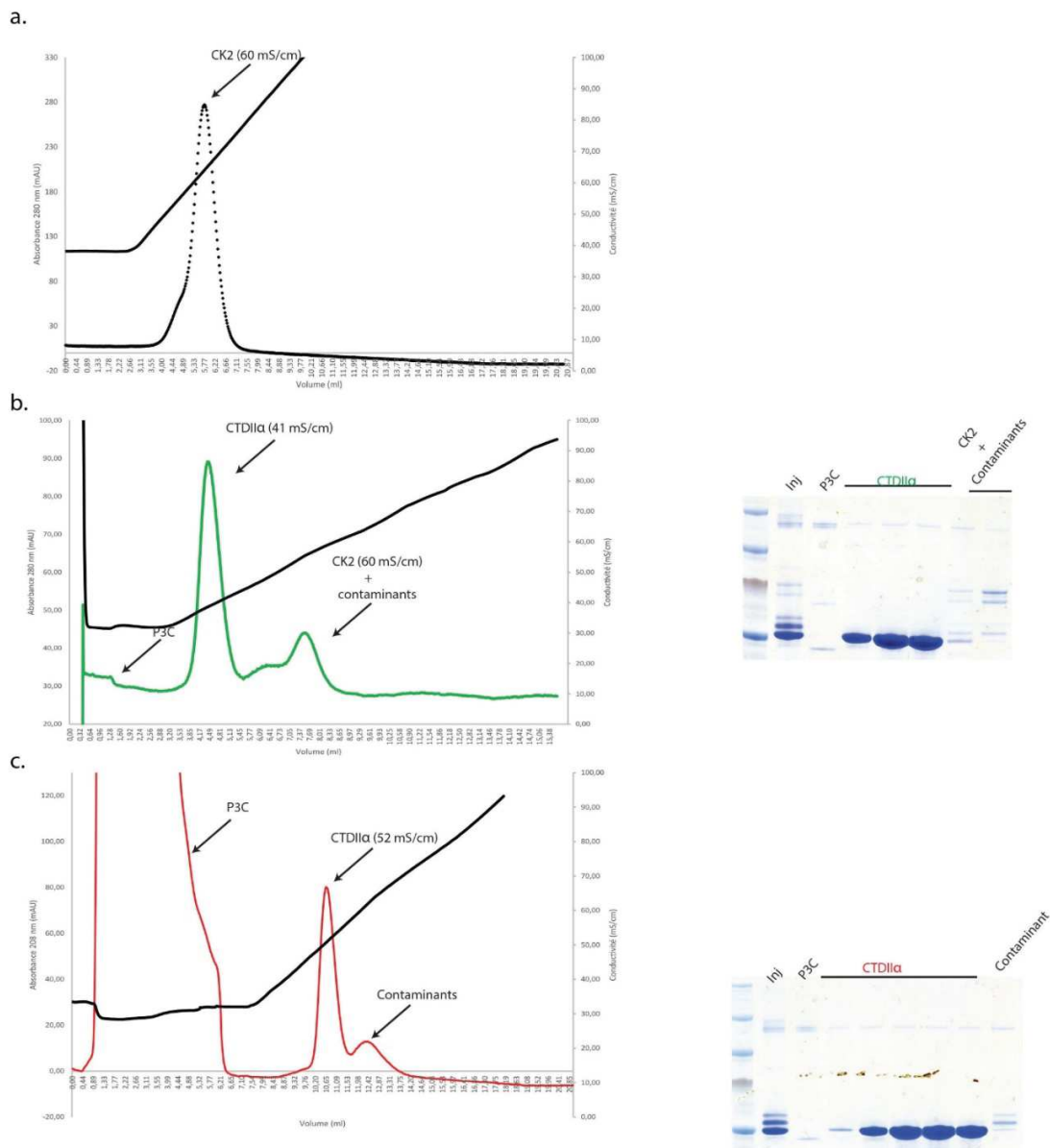


Figure 82 Purification de CTDII α sous forme phosphorylée et déphosphorylée. Les chromatogrammes et gels SDS-PAGE représentent le passage des échantillons sur une colonne échangeuse d'ion Héparine. (a) Le premier chromatogramme représente le passage d'un échantillon de CK2 seul, ce dernier est élué à une conductivité de 60 mS/cm dans les conditions de purifications établies. (b) Le chromatogramme du milieu représente la purification d'un échantillon CTDII α phosphorylé + P3C + CK2. La P3C n'est pas retenue par la colonne et la forme phosphorylée de CTDII α est éluée de la colonne à une conductivité de 41mS/cm. (c) Le chromatogramme du bas représente la purification d'un échantillon CTDII α déphosphorylé + P3C. La P3C n'est pas retenue par la colonne et la forme déphosphorylée de la CTDII α est éluée de la colonne à une conductivité de 52mS/cm. Pour les deux derniers échantillons les contaminants dus à la mauvaise coupure de la P3C sont élués de la colonne à plus forte concentration de sel. Les gels SDS PAGE montrent le profil d'éluition des formes phosphorylée et déphosphorylée en fin de purification.

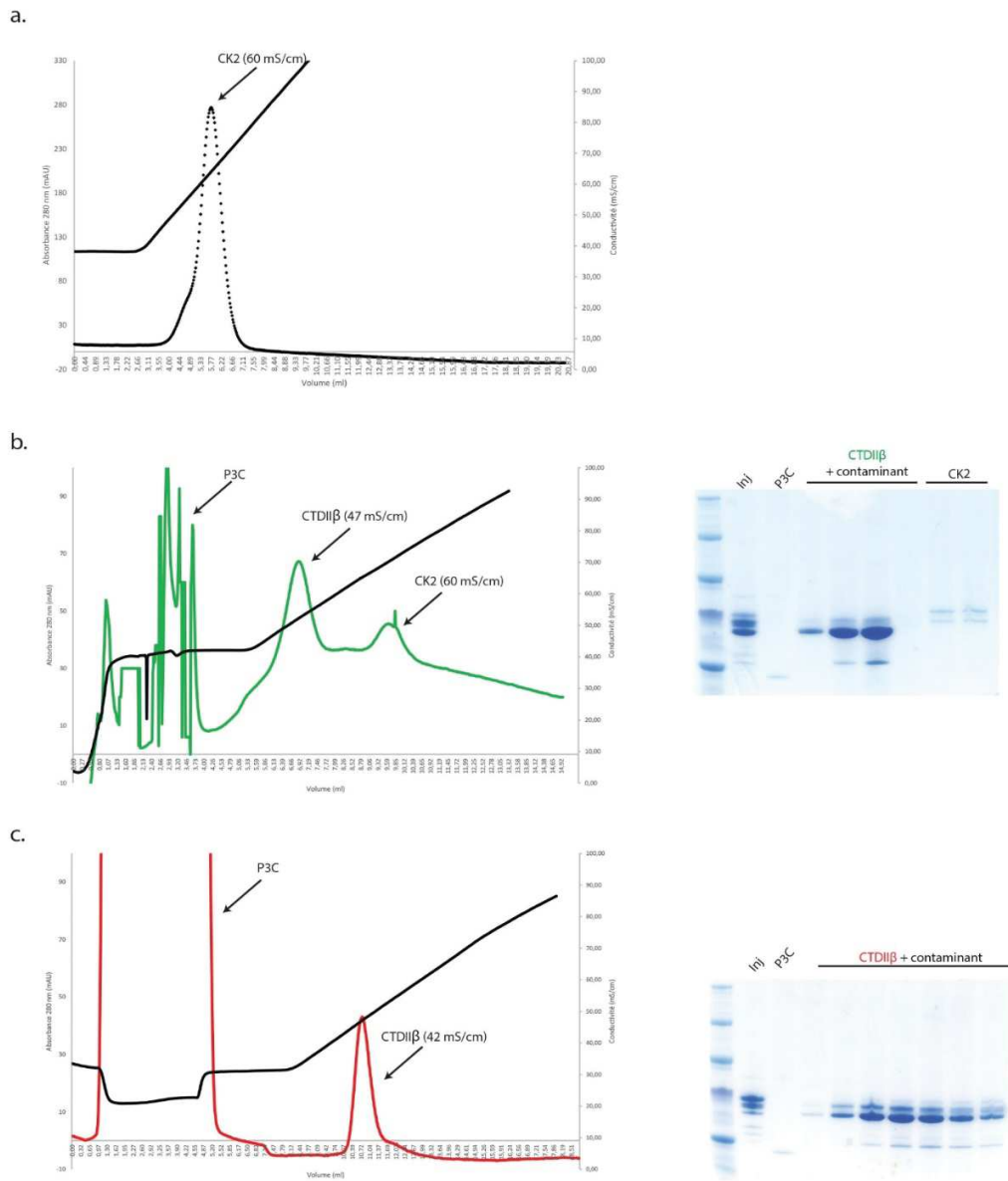


Figure 83 Purification de CTDII β sous forme phosphorylée et déphosphorylée. Les chromatogrammes et gels SDS-PAGE représentent le passage des échantillons sur une colonne échangeuse d'ion Héparine. (a) Le premier chromatogramme représente le passage d'un échantillon de CK2 seul, ce dernier est élué à une conductivité de 60 mS/cm dans les conditions de purifications établies. (b) Le chromatogramme du milieu représente la purification d'un échantillon CTDII β phosphorylé + P3C + CK2. La P3C n'est pas retenue par la colonne et la forme phosphorylée de CTDII β est éluée de la colonne à une conductivité de 47mS/cm. (c) Le chromatogramme du bas représente la purification d'un échantillon CTDII α déphosphorylé + P3C. La P3C n'est pas retenue par la colonne et la forme déphosphorylée de CTDII β est éluée de la colonne à une conductivité de 42mS/cm. Pour les deux derniers échantillons, les contaminants dus à la mauvaise coupure de la P3C sont à la même concentration de sel que l'échantillon intacte. Les gels SDS PAGE montre le profil d'éluition des formes phosphorylée et déphosphorylée en fin de purification.

Durant la production des CTDs phosphorylés, la digestion à la P3C n'a pas été complète pour une raison que nous n'avons pas pu clairement identifier. Nous avons pu séparer les formes coupées des formes encore avec étiquette pour le CTD de l'isoforme α mais pas pour le CTD de l'isoforme β . Cependant dans les deux cas la séparation entre le CTD et la CK2 fut possible. Les rendements obtenus sont de 0.7 mg/L de culture d'échantillon phosphorylé pour le CTD de la TopII α et de 0.2 mg/L de culture d'échantillon phosphorylé pour le CTD de la TopII β .

Afin de vérifier si la réaction de phosphorylation a fonctionné, les échantillons ont été analysés sur un gel SDS-PAGE après coloration au Pro-Q Diamond, (**Figure 84**).

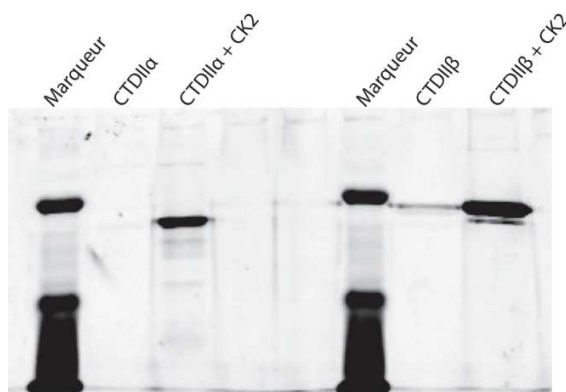


Figure 84 Vérification de la réaction de déphosphorylation sur un gel SDS-PAGE coloré au colorant spécifique au phosphoprotéine Pro-Q Diamond.

La lecture du gel après coloration montre que la réaction de phosphorylation des CTDs *in vitro* par la kinase CK2 a été efficace.

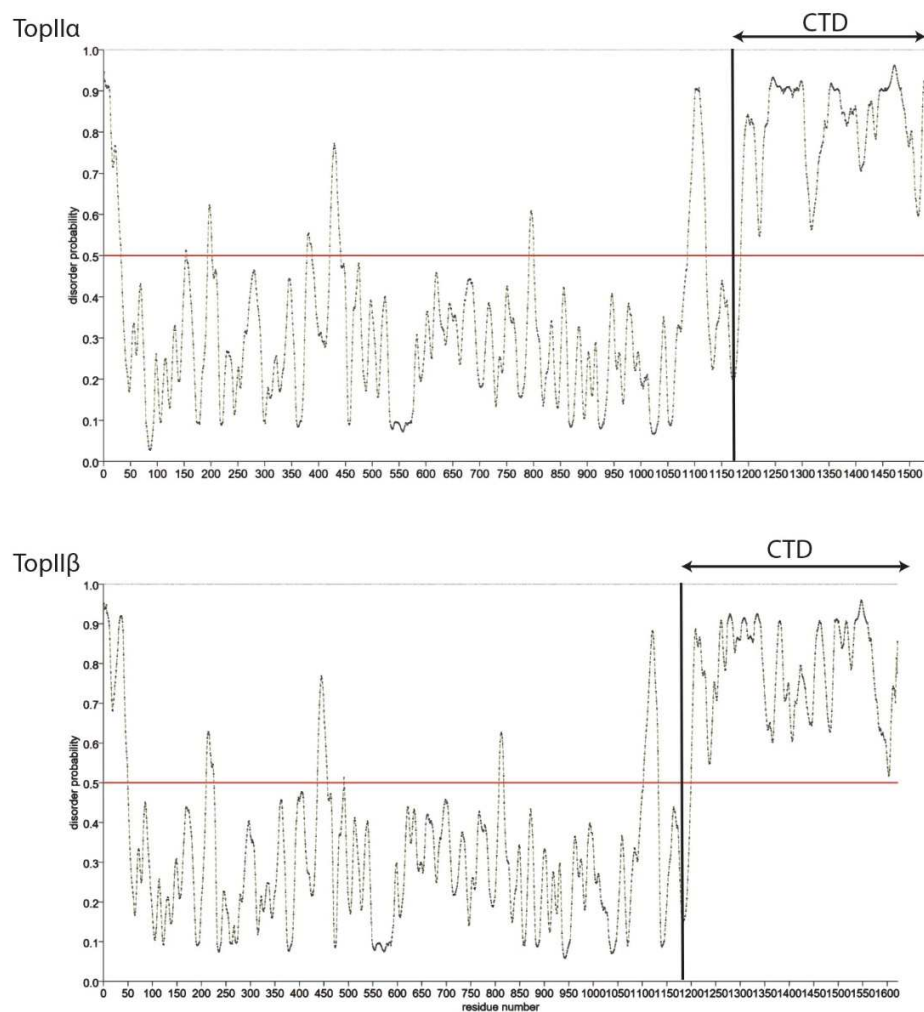


Figure 85 Résultat du logiciel de prédiction de régions désordonnée prDOS³⁰⁵, basée sur la séquence peptidique des protéines. La probabilité de trouver le plus de régions désordonnées se trouve sur le CTD pour les deux isoformes.

Les structures des CTD α et β sont prédites comme désordonnées^{271,305} (**Figure 85**). La technique de la fluorimétrie à balayage différentiel (Nano DSF) peut apporter des informations sur le repliement de ce domaine si elle révèle une transition liée à la dénaturation. En effet si lors de l'analyse une bande d'absorption est observée cela signifie que l'échantillon possède potentiellement des éléments de structure.

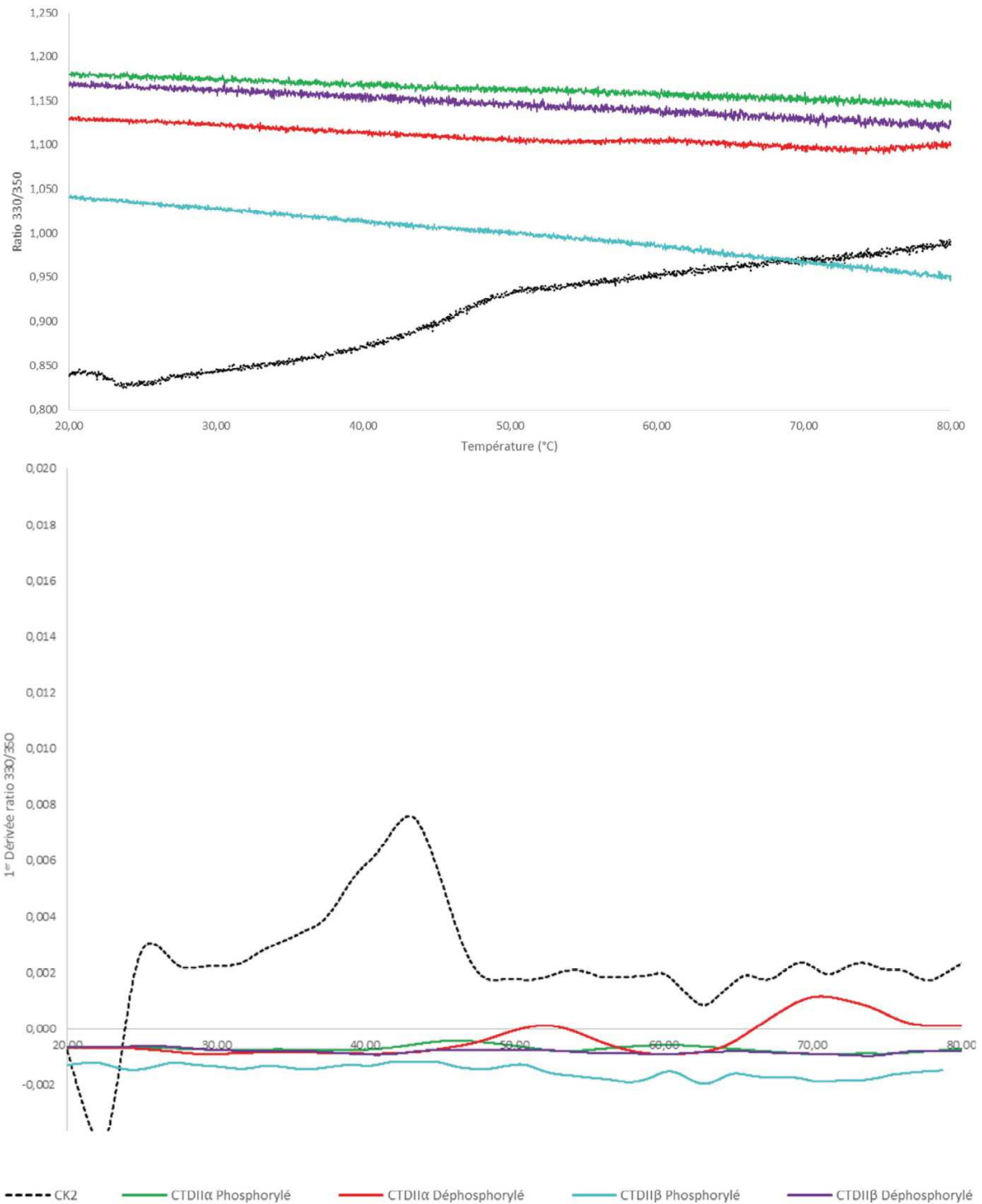


Figure 86 Analyse NanoDSF montrant la stabilité thermique des échantillons CTDIIα phosphorylé et déphosphorylé en vert et rouge, ainsi que le CTDIIβ sous la forme phosphorylée et déphosphorylée en bleu et violet. Le signal émis par CK2 dans les concentrations similaires aux autres échantillons est représenté en noir pointillé. Le panel du haut représente la mesure du ratio de fluorescence 330/350 nm. Le panel représente la valeur de la 1^{er} dérivée du panel du haut et aide à la visualisation des résultats.

L'analyse NanoDSF sur les CTD phosphorylés ou non phosphorylés, n'a pas été concluante (**Figure 86**). En effet si l'on compare la valeur du ratio 330nm/350nm de CK2 dans des concentrations similaires, le signal des échantillons CTDs est faible et l'on n'observe aucune transition mesurable qui serait liée à la dénaturation de structures. Néanmoins il est toujours possible que les phosphorylations puissent induire des éléments de structure. En effet les CTDs des deux isoformes ne possèdent qu'un tryptophane dans leur séquence peptidique ainsi que une tyrosine pour le CTDII α et six pour CTDII β . La Nano DSF n'est par conséquent pas une technique très sensible dans ce cas pour identifier la présence d'éléments structuraux sur ces domaines.

Nous envisageons donc dans la suite de cette étude de vérifier la présence ou non d'éléments de structure secondaire par dichroïsme circulaire. Si les résultats sont encourageants nous souhaitons ensuite analyser les échantillons par la technique de diffusion aux rayons X aux petits angles (SAXS). Une expériences réalisée dans l'équipe par Arnaud Vanden Broeck a permis notamment de confirmer *in vitro* que le CTD de la TopII α produit en bactérie, est désordonné d'après la courbe de Kratky obtenue à fortes concentration de CTDII α ²⁹⁹ (**Figure 87**).

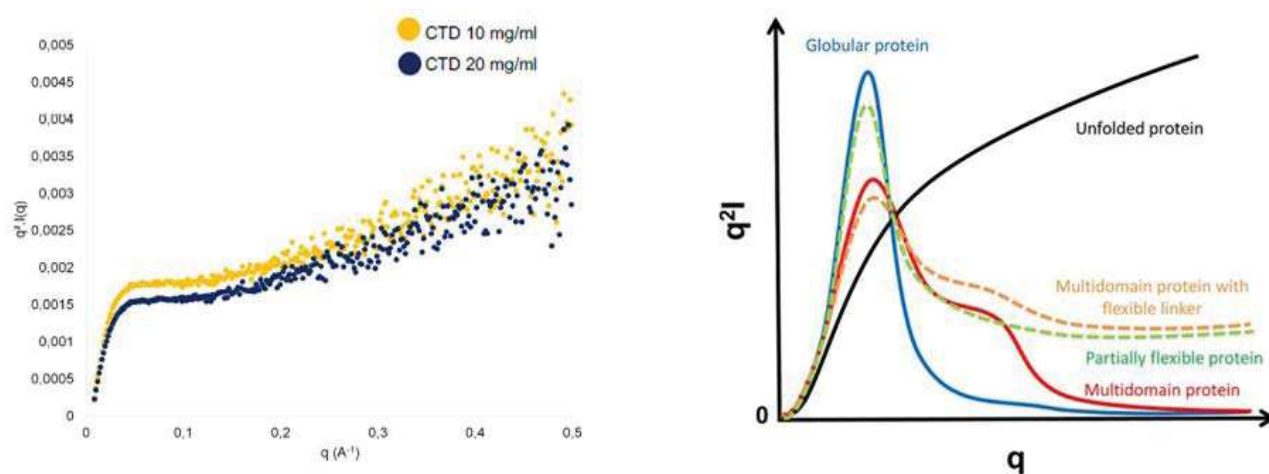


Figure 87 À gauche les résultats de l'analyse SAXS du CTDII α déphosphorylé à 10 et 20 mg/ml sous forme du Kratky plot. À droite une illustration issue du site internet du [Stanford Synchrotron Radiation Lightsource](#) avec la signification de l'allure des courbes possibles. Les courbes qu'adoptent le CTDII α sont similaires à celles correspondant à une protéine déstructurée.

7.2.3. Analyse des sites de phosphorylation de la caséine kinase II α

Après phosphorylation des CTDs par la caséine kinase II α , nous avons cherché à identifier les sites de phosphorylation de cette kinase sur les CTDs. Cette première analyse sera une première caractérisation des sites phosphorylés spécifiquement par CK2 et sera importante à l'avenir pour les analyses structurales envisagées. Si pour le CTD de la TopII α certains sites sont connus^{114,117,244,277,304,306}, en ce qui concerne la TopII β , à notre connaissance cela n'a pas été recherché. Afin d'avoir un premier aperçu des sites pouvant être phosphorylés *in vitro* par CK2, nous avons comme précédemment analysé par spectrométrie de masse les échantillons déphosphorylés et phosphorylés.

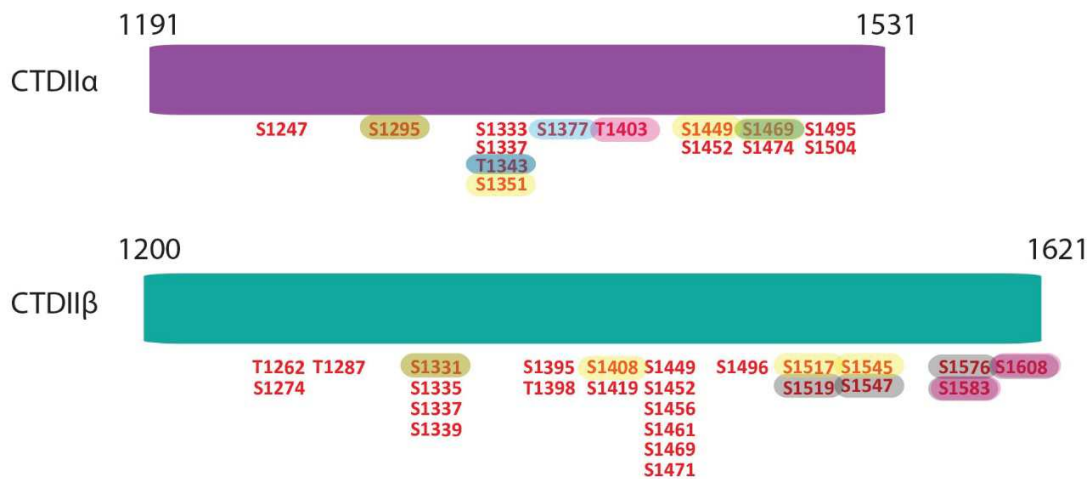


Figure 88 Sites de phosphorylation identifiés sur les CTDII α et β après réaction de phosphorylation avec la caséine kinase II identifiés par spectrométrie de masse. Les sites entourés en rose sont les sites identifiés uniquement sur la base de données Phosphosite⁺. Les sites entourés en jaune sont les sites communs aux isoformes α et β d'après l'alignement de séquence (*Annexe 1*). Les sites entourés en bleu ont été étudié dans la littérature et validés par des techniques de reconnaissance par anticorps comme site de phosphorylation pour la CK2^{304,306,307}. Les sites entourés en gris ont été identifiés sur des échantillons de CTD n'ayant pas subi de réaction de phosphorylation par CK2.

L'analyse en spectrométrie de masse a permis l'identification de 14 sites de phosphorylation pour le CTDII α et 25 sites pour le CTDII β (**Figure 88**) (**Tableau 4**). De façon surprenante les sérines 1213, 1365 et 1525 n'ont pu être identifiés, alors que la phosphorylation sur ces sites est bien documentée et que nous les avons identifiés dans de précédentes analyses sur les protéines entières produites en cellules de mammifères^{114,244,267,306}.

Parmi ces sites, 4 sont communs aux deux isoformes d'après l'alignement de séquence : S1295 α /S1331 β , S1351 α /S1408 β , S1449 α /S1517 β et S1469 α /S1545 β (**Figure 66**). Les sites

identifiés pour les deux CTDs ont déjà été répertoriés soit par notre étude sur protéines entières soit dans la base de données Phosphosite⁺. Seules les phosphorylations T1403 α , S1583 β et S1608 β n'ont été reportées que dans la base de données Phosphosite⁺ qui ne répertorie pour les TopII s humaines que des sites sur des lignées cellulaires cancéreuses.

D'autre part, nous avons mis en évidence des sites de phosphorylation dans les échantillons produits dans les bactéries et n'ayant pas eu de traitement à la CK2 (**Figure 88 et Tableau 4**). Il a été montré qu'au sein des bactéries, les protéines qui sont en interaction avec l'ADN et impliquées dans la maintenance du génome peuvent être phosphorylées. Par ailleurs une phosphorylation a été identifiée sur la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase, une des TopII s bactériennes³⁰⁸, montrant ainsi que les topoisomérases procaryotes sont modifiées. Il est donc possible que les CTDs surexprimés en bactérie soient ponctuellement phosphorylées. Néanmoins le niveau de phosphorylation entre les formes phosphorylées et non phosphorylées est différent.

Les sites de phosphorylation identifiés dans les échantillons CTDs n'ayant pas subi de traitement à la kinase ont été identifiés dans notre précédente étude pour les deux isoformes. D'après le logiciel de prédiction de site de phosphorylation NetPhos3.1³⁰⁹ ces sites sont des substrats pour CK2 uniquement. Nous avons souhaité identifier un possible homologue de CK2 dans le règne bactérien mais à notre connaissance aucun homologue n'a été identifié. De plus, nous n'avons pas identifié de logiciel prédisant les sites de phosphorylation de protéines surexprimées dans les bactéries.

	CTDII α Phosphorylé	CTDII α Déphosphorylé	CTDII β Phosphorylé	CTDII β Déphosphorylé
Nombre de sites de phosphorylation	14	3	25	4
Nombre total de peptides	4041	6299	6201	5414
Nombre de peptides modifiés	812	33	3027	264
Taux de phosphorylation	20.10%	0.52%	48.80%	4.88%

Tableau 4 Résultat de l'analyse de spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides modifiés et non modifiés en fin de purification.

Le traitement à la caséine kinase II α augmente le taux de phosphorylation de ces domaines de plus de 10 fois. L'analyse en spectrométrie de masse confirme les résultats obtenus par le gel coloré au colorant spécifique des phosphoprotéines.

Comme pour l'étude sur l'identification des phosphorylations et des acétylations sur les isoformes entiers, il faut réitérer cette expérience plusieurs fois pour analyser de façon plus fiable quels résidus sont systématiquement phosphorylés par la caséine kinase II α . Ces connaissances permettront à l'avenir de comprendre plus précisément la structure et la fonction des domaines C-terminaux.

8. Discussion et Conclusion

Les TopII α humaines sont régulées par des modifications post-traductionnelles. L'identification des sites de phosphorylation et d'acétylation sur les TopII α surexprimés dans *S.cerevisiae* et dans les cellules de mammifère BHK21 montre que les sites identifiés pour les deux systèmes sont similaires. Les deux systèmes d'expression produisent des enzymes homogènes d'un point de vue des phosphorylations et des acétylations. La distribution des sites de phosphorylation et d'acétylation est identique pour les deux isoformes : les sites de phosphorylation sont localisés majoritairement dans les domaines CTD et les sites d'acétylation sont regroupés sur le corps catalytique des enzymes. Avec ce travail d'identification, il est possible de comparer les PTMs identifiées dans notre étude avec les sites identifiés et répertoriés dans la base de données Phosphosite⁺. La particularité de cette base de données est que pour les topoisomérases de type II humaines, l'ensemble des sites identifiés sont issus de cellules cancéreuses. Il est donc possible de comparer les sites trouvés dans des cellules en condition homéostatique (notre travail) aux sites modifiés dans les cellules cancéreuses d'après la base de données Phosphosite⁺.

Dans les cellules cancéreuses, les sites de phosphorylation sont identifiés sur tous les domaines de la structure des enzymes contrairement à notre analyse, qui les retrouve principalement sur les domaines C-terminaux. L'analyse des sites de phosphorylation retrouvés dans les TopII α issus de cellules cancéreuses montre aussi que les tyrosines sont phosphorylées, ce qui n'a pas été observé dans nos analyses. En particulier, la tyrosine catalytique de la TopII α qui est identifiée comme

phosphorylée au sein des cellules cancéreuses K562 et de Jurkat, ce qui n'est pas le cas pour la TopII β à ce jour dans aucun type cellulaire.

D'autre part, l'étude ciblée de la lysine 168 portant une acétylation chez la TopII α suggère que les PTMs affectent des résidus clés pour l'activité catalytique des TopIIs. Les simulations de dynamique moléculaire et les caractérisations biochimiques et biophysiques ont démontré que l'acétylation de cette lysine ou son inactivation par mutagénèse dirigée empêche la dimérisation de la porte N, ce qui affecte l'activité catalytique de la TopII α .

L'expression de la TopII α varie avec le cycle cellulaire pour atteindre un maximum d'expression au stade G2/M³¹⁰. Cette hausse de l'expression est corrélée avec une hausse du niveau de phosphorylation³⁰². Ce résultat indique que les phosphorylations jouent un rôle dans le fonctionnement de la TopII α . Durant ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à caractériser l'impact des phosphorylations sur l'activité catalytique des TopIIs. L'approche choisie était de comparer les activités *in vitro* des enzymes phosphorylés et déphosphorylés par la λ phosphatase. La production de la TopII α sous forme déphosphorylée a pu être optimisée et les quantités obtenues sont désormais suffisantes pour des études fonctionnelles. Contrairement à d'autres études traitant ce sujet^{300 301,302}, nous avons pu contrôler l'efficacité de la réaction de déphosphorylation par spectrométrie de masse et par une coloration sur gel spécifique aux phosphoprotéines.

Les résultats préliminaires montrent que l'absence de phosphorylation sur la TopII α a des conséquences sur la régulation de la topologie de l'ADN. La réaction d'hydrolyse de la molécule d'ATP est plus efficace et elle est capable de décaténer l'ADN comme le contrôle enzyme sauvage, bien qu'elle relâche beaucoup moins efficacement. Cependant la proportion d'ADN clivé est importante d'après les tests de régulation de la topologie de l'ADN effectués, ce qui indique une défaillance de l'étape de religation. Ces résultats doivent être confirmés par des essais supplémentaires pour apporter des éléments permettant de clore le débat sur la question de l'influence des phosphorylations sur les activités catalytiques.

Les domaines CTD regroupent la majorité des sites de phosphorylation identifiés. D'un point de vue structural, les logiciels de prédiction de structure secondaire montrent que les CTDs sont des régions structurales désordonnées. Cependant ces analyses ne prennent pas en considération les PTMs présentes. Un des projets de cette thèse était d'analyser l'impact de ces phosphorylations massives sur la structure de ces domaines. L'influence des phosphorylations sur la structure, la

fonction et les interactions avec les partenaires protéiques a déjà été montrée sur de grands objets moléculaires comme la protéine Tau où la forme des agrégats de la protéine dépendent de la combinaison de phosphorylation³¹¹, ainsi que l'ARN polymérase II eucaryote où la phosphorylation du CTD joue un rôle dans l'interaction avec les facteurs de transcription ETS³¹².

Afin de vérifier cette hypothèse, les domaines isolés des deux isoformes ont été produits et purifiés à partir du système d'expression bactérien dont l'abondance de PTMs est très basse comparée aux systèmes eucaryotes³¹³. La phosphorylation de ces domaines purifiés par la caséine kinase II α a été effectuée *in vitro*. L'analyse des sites de phosphorylation confirme que les CTDII α et β sont des substrats pour CK2. Cependant il est difficile de formuler plus de conclusions à partir de ces résultats préliminaires. Il sera important de refaire cette expérience. Néanmoins les protocoles de purification mis au point, ces échantillons pourront être analysés par dichroïsme circulaire afin de déterminer ou non la présence d'éléments de structure secondaire. Si les résultats sont concluants, des analyses complémentaires par SAXS seront envisagées.

D'autre part, à la lecture de différentes recherches menées sur le rôle des phosphorylations au sein des bactéries, ces dernières modifient l'expression³¹⁴ et l'interaction qu'on les protéines avec l'ADN³¹⁵. Étant donné que GyrB, une sous unité de l'ADN gyrase codant pour la porte N, est identifié comme phosphorylé dans des analyses en spectrométrie de masse, on peut se poser la question si les phosphorylations influencent les Top2s procaryotes.

En conclusion les résultats de ce chapitre ouvrent de nombreuses perspectives. La parution de l'article dans *Scientific Reports* et de la revue publiée dans le journal *Cancer Drug Resistance* mettent à disposition de la communauté scientifique des ADN topoisomérases un état des lieux des modifications post-traductionnelles dont les régulations seront abordées sur une base rationnelle en prenant en compte les relations structures/fonction.

9. Perspectives

En perspective de ce projet, il serait intéressant de connaître les sites de phosphorylation et d'acétylation présents dans des cellules mammifères résistantes à des molécules anti-TopII. En effet comme présenté dans l'introduction de ce manuscrit, les taux de PTMs présents sur les

topoisomérases de type II humaines varient si la cellule a développé ou non une résistance après traitement par ces molécules thérapeutiques¹⁷¹⁻¹⁷³. Cependant les résultats des différents groupes de recherche sur ce sujet divergent, du fait que les lignées cellulaires utilisées diffèrent d'une étude à l'autre^{301,302}.

Connaissant les modifications des TopII α dans les cellules BHK21 sauvages, la question posée est de savoir si celles-ci varient avec l'acquisition de résistances aux topoisomérase « poison » comme l'étoposide ou la mitoxantrone et si ces modifications diffèrent de celles observées dans des cellules résistantes aux inhibiteurs catalytiques comme ICRF-193. Ces informations permettront aussi une comparaison des modifications de la TopII α et β dans ces conditions, permettant ainsi de déceler peut-être des spécificités de régulation entre ces deux isoformes durant l'acquisition des mécanismes de résistance.

De nombreuses lignées cellulaires résistantes ont été développées au cours de ces dernières années et les protocoles de production de lignées cellulaires résistantes contre les molécules anti-TopII sont bien établis³¹⁶. Deux stratégies d'étude seraient envisageables. La première serait d'utiliser le système du virus modifié de la vaccine mis en place durant cette thèse pour induire une surexpression de la protéine après traitement par des molécules anti-cancéreuses, et analyser les modifications.

L'autre possibilité serait d'utiliser la technologie CRISPR-Cas9 pour modifier le génome de ces cellules en rajoutant des étiquettes de purification en N ou C-terminal des gènes codant pour les TopII α . Des études sur les TopII α utilisant cette technologies pour réaliser des lignées KO de la TopII α ont déjà été réalisées³¹⁷. L'avantage d'utiliser le système CRISPR-Cas9 serait d'être dans des conditions plus physiologiques, comparé à l'étude par surexpression. Il est possible maintenant d'utiliser cette technologie sur des cellules BHK21 avec l'apparition de solutions commerciales facilitant la production de lignées³¹⁸. Cependant l'inconvénient est que le taux d'expression des TopII α endogènes est bien inférieur, comparé à l'utilisation du système de surexpression du virus de la vaccine modifié. Il est possible que les quantités obtenues après purification ne soient pas suffisantes pour caractériser ces échantillons, bien que d'après le protocole établi par Nitiss *et al.* les quantités de TopII α endogènes sont suffisantes pour des tests d'activité *in vitro*³¹⁹.

De nombreuses questions sur le rôle des PTMs restent encore en suspens. Néanmoins les travaux terminés, en cours et envisagés serviront de base pour répondre à des questions biologiques encore

en suspens comme celle concernant les spécificités des régulations des deux topoisomérases humaines.

Chapitre II : Détermination de l'architecture moléculaire des TopIIs humaines en complexe avec de l'ADN

1. Introduction et objectifs

Les ADN topoisomérases ont fait l'objet de nombreuses études en biologie structurale. Du fait de leur interaction directe avec l'ADN, les TopII humaines sont des cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer⁵. Dans la base de données PDB, 17 structures des TopII α et β en complexe avec différents composés thérapeutiques comme l'étoposide, l'amsacrine et la mitoxantrone ont été déposées^{7,62,70,149,150}. Ces structures obtenues par cristallographie aux rayons X correspondent à des domaines isolés. Néanmoins ces études ont révélé différentes conformations de ces domaines. Ainsi, la porte N en complexe avec un analogue de l'ATP adopte une conformation fermée, tandis que le complexe avec de l'ADP correspond à une conformation ouverte du sous-domaine Transducer. La structure du domaine de liaison à l'ADN a mis en évidence une conformation fermée liée à de l'ADN clivé par la tyrosine catalytique et maintenu par différents composés thérapeutiques mentionnés ci-dessus, stabilisant le complexe clivé ou Top2cc. En 2018, le domaine de liaison de l'ADN des TopII a pu être cristallisé en conformation pré-ouverte⁷⁰. Malgré les informations obtenues, les connexions entre les deux domaines du corps catalytique et la structure des domaines CTDs restent inconnues.

Il est aujourd'hui indispensable d'obtenir des informations structurales sur les protéines entières TopII α et β pour comprendre les mécanismes allostériques qui coordonnent les mouvements structuraux des domaines catalytiques et comprendre comment les domaines CTDs se positionnent par rapport à ces domaines. Ces informations pourraient permettre d'identifier des différences structurales entre les deux isoformes des topoisomérases de type II humaines et mieux cerner le rôle des domaines CTDs.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre était d'obtenir la structure tridimensionnelle des TopII α et β entières en complexe avec l'étoposide et de l'ADN afin d'étudier les relations structure-fonction concernant les déterminants moléculaires de leurs mécanismes allostériques.

La méthode de détermination structurale utilisée est la Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM). Cette technique présente l'avantage de faciliter la détermination de la structure tridimensionnelle des grands complexes flexibles. Elle permet d'obtenir une structure plus proche des conditions physiologiques que par cristallographie aux rayons X, qui peut potentiellement contraindre la structure par le biais de l'empilement cristallin. De plus, de nombreuses tentatives de cristallisation

ont été infructueuses, cela est sans doute dû à l'hétérogénéité de l'échantillon, liée aux multiples conformations que les TopII α adoptent durant leur cycle catalytique ce qui est une contrainte très limitante en cristallographie. Enfin, les premiers résultats obtenus sur l'ADN gyrase de *Thermus thermophilus* dans l'équipe en 2013 ont montré la faisabilité des études structurales de ces macromolécules par CryoEM⁸.

Dans ce travail, j'ai contribué à la production des isoformes entières en cellules de mammifère, ainsi qu'à la caractérisation structure-fonction de mutants de ces protéines par des tests fonctionnels qui ont complété l'analyse de la structure de la TopII α par CryoEM obtenue précédemment dans l'équipe par Arnaud Vanden Broeck. Ce travail a conduit à la rédaction d'un article concernant la TopII α qui a été soumis en Août 2020, actuellement en révision et disponible sur la plateforme BioRxiv et qui est inclus dans ce chapitre. Enfin, j'ai réalisé des premières déterminations structurales du complexe de la TopII β par Cryo-EM.

2. Etude structural de l'ADN topoisomérasés de type II α en complexe avec de l'ADN et de l'étoposide

- 2.1. Publication Vanden Broeck. A, Lotz. C, Drillien. R, Bedez. C, Lamour. V en revision disponible sur BioRxiv 2020 "Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α ".

Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α

Authors: Arnaud Vanden Broeck^{1,2}, Christophe Lotz^{1,2}, Robert Drillien^{1,2}, Claire Bedez^{1,2}, Valérie Lamour^{1,2,3*}

¹Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104, U1258, Illkirch, France

²Department of Integrated Structural Biology, IGBMC, 1 Rue Laurent Fries, 67404, Illkirch Cedex, France

³Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67091, Strasbourg Cedex, France

* Correspondence to Valérie Lamour, lamourv@igbmc.fr

Abstract

The human type IIA topoisomerases (Top2) are essential enzymes that regulate DNA topology and chromosome organization. The Top2 α isoform is a prime target for antineoplastic compounds used in cancer therapy that form ternary cleavage complexes with the DNA. Despite extensive studies, structural information on this large dimeric assembly is limited to the catalytic domains, hindering the exploration of allosteric mechanism governing the enzyme activities and the contribution of its non-conserved C-terminal domain (CTD). Herein we present cryo-EM structures of the entire human Top2 α nucleoprotein complex in different conformations solved at subnanometer resolutions. Our data unveils the molecular determinants that fine tune the allosteric connections between the ATPase domain and the DNA binding/cleavage domain. Strikingly, the reconstruction of the DNA-binding/cleavage domain at 4.2 Å uncovers a linker leading to the CTD, which plays a critical role in modulating the enzyme's activities and opens perspective for the analysis of post-translational modifications.

Introduction

25 Type II DNA topoisomerases (Top2) are evolutionary conserved enzymes whose primordial activity is
26 to regulate the homeostasis of DNA topology in eukaryotes and bacteria ¹. The Top2 are involved in
27 essential cellular processes such as DNA replication, DNA transcription, and chromosome segregation
28 ². The human Top2 α isoform is highly expressed during mitosis, essential for cell division ³ and a
29 biomarker for cell proliferation ⁴. As such, Top2 α is a major target for antineoplastic drugs that hamper
30 its catalytic activities ⁵.

31 This large homodimeric enzyme introduces a double strand break in a first DNA duplex, called G-
32 segment, and directs the transport of a second DNA duplex, called T-segment, through the transient
33 break in order to change the topology of a DNA crossover. The passage of the T-segment requires
34 ATP hydrolysis and is thought to occur along with the opening and closing of several dimeric
35 interfaces constituting molecular gates ^{6,7}. The crystal structures of the ATPase and DNA
36 binding/cleavage domains of eukaryotic Top2 have been determined and present cavities compatible
37 with the binding of a DNA double helix ⁸⁻¹³. Biochemical and structural studies have provided
38 evidence that the ATPase domain or N-gate, and the DNA binding/cleavage domain forming the
39 DNA- and C-gates, are allosterically connected, a key feature of its activity ^{14,15}. However, hinge
40 regions connecting the catalytic sites of the human enzyme remain largely unexplored, hindering
41 efforts to apprehend the quaternary organization of this enzyme and the landscape of conformations it
42 adopts during the catalytic cycle.

43 In addition, the Top2 catalytic domains are flanked by C-terminal extensions that vary from one
44 species to another ^{16,17}. These domains contain nuclear localization signals and are submitted to
45 extensive post-translational modifications that condition the cellular localization of Top2, its
46 interactions with cellular partners and progression of the cell cycle ^{18,19}. Several studies have suggested
47 that different regions of the Top2 α CTD contribute to the enzyme's catalytic activities through DNA
48 binding ²⁰⁻²³. In contrast with prokaryotic enzymes that harbor a pinwheel-structured CTD ²⁴⁻²⁶, the
49 same region in eukaryotic enzymes presents no homology to any known fold, hence limiting structure-
50 function analysis. It has become clear that the analysis of the molecular determinants of the enzyme's

51 allostery and the modulation of its activity by the CTD now requires the availability of a complete
52 molecular structure of the Top2 α .

53 In this work, we determined the cryo-EM structure of the full length human Top2 α isoform bound to
54 DNA in different conformations trapped by the anti-cancer drug etoposide. The structures reveal the
55 connections between the ATPase and DNA binding/cleavage domains, allowing the identification of
56 conserved sequence patterns in humans that control the allosteric signaling between the catalytic sites.
57 In addition, we were able to localize the linker between the DNA binding/cleavage domain and the
58 CTD inserting below the G-segment. We show that this region directly stimulates the Top2 α catalytic
59 activity suggesting that the bulk of the CTD domain may counterbalance this effect, potentially
60 through post-translational modifications.

61 **Results**

62 **Cryo-EM reconstructions of the hTop2 α nucleoprotein complex**

63 The full-length hTop2 α was overexpressed in mammalian cells and purified using tandem affinity
64 chromatography followed by a heparin step (see Methods and Supplementary Fig. 1). Samples were
65 tested for enzymatic activity and mixed with asymmetric DNA oligonucleotides mimicking a doubly-
66 nicked 30bp DNA¹¹ (Supplementary Fig. 1b and Table 2). The antineoplastic drug etoposide and
67 AMP-PNP, the non-hydrolysable homolog of ATP, were added to the nucleoprotein complex in order
68 to minimize the conformational heterogeneity of the sample.

69 The DNA-bound hTop2 α complex was analyzed by single-particle cryo-EM. Six different datasets
70 were recorded on a Titan Krios microscope yielding a total of 13,484 micrographs. Using automated
71 picking procedure in RELION2²⁷, a total of 1,908,092 particles were extracted from the micrographs.
72 The dataset was curated using a combination of 2D and 3D ab-initio classifications in RELION2 and
73 cryoSPARC²⁸, respectively, yielding a final stack of 162,332 particles (Supplementary Fig. 2). Using
74 a low-pass filtered 3D ab-initio model generated in cryoSPARC, a first 3D reconstruction of the DNA-
75 bound hTop2 α was obtained at 6.6 Å resolution (Supplementary Fig. 3). The flexibility of the complex

76 is visible from the 2D class averages showing the dimerized ATPase domain adopting different
77 positions relative to the DNA-binding/cleavage domain (Supplementary Fig. 2b,d).

78 To isolate the different conformations and improve the overall resolution, we used a combination of
79 global and local approaches to deconvolute the structures of the hTop2 α complex. Using 3D focused
80 refinements, reconstructions of the DNA-binding/cleavage domain were generated for two different
81 states. State 1 was solved at 4.2 Å using 57,976 particles and State 2 was solved at 5.0 Å using 34,922
82 particles (Supplementary Fig. 3). Each particle stack was submitted to 3D-refinement without mask to
83 yield two reconstructions of the entire complex in State 1 at 5.6 Å resolution, and in State 2 at 7.2 Å
84 resolution (Supplementary Fig. 3). Due to the flexibility of the ATPase domain, the densities of the
85 linkers with the DNA binding/cleavage domain were not well resolved in the cryo-EM maps. To get
86 information on this region, a 3D-focused classification was performed on the ATPase domain yielding
87 one class comprising 36,610 particles with a well-resolved connection between the two functional
88 domains which was refined at 7.6 Å resolution (Supplementary Fig. 3).

89 **Model building of the hTop2 α complex in different states**

90 Near-atomic resolution features of the 4.2 Å map in State 1 allowed us to fit, build and refine the
91 atomic model of the hTop2 α DNA-binding/cleavage domain in complex with DNA and etoposide²⁹
92 (Figure 1a-c, Supplementary Fig. 5). Strikingly, we were also able to identify EM density for the
93 etoposide molecule, intercalating in the DNA duplex between positions -1 and +1 (Figure 1d), with
94 similar protein and DNA contacts as previously reported in crystallographic structures (Supplementary
95 Fig. 7)^{10,29}.

96 The resulting DNA-binding/cleavage domain model together with the crystal structure of the ATPase
97 domain bound to AMP-PNP⁸ were then combined to refine the complete atomic structure of the full-
98 length hTop2 α in State 1 (Figure 2). The 27-aa linkers between the two domains, missing from the
99 crystal structure of the isolated ATPase domain, were built as alpha helices based on secondary
100 structure predictions and using well-defined linker densities of the cryo-EM map obtained by focused
101 classification on the ATPase domain (Supplementary Fig. 3 and 6). Finally, the atomic model of the

102 DNA-binding/cleavage domain in State 2 and the corresponding full-length hTop2 α in State 2 were
103 refined using State 1 model as a reference.

104 **Analysis of the hTop2 α conformations**

105 The complete architecture of the hTop2 α reveals the intertwined arrangement of the two subunits, a
106 feature that was deduced from the yeast enzyme crystal structure and recently observed in the cryo-EM
107 models of the prokaryotic Topo II^{12,30} (Figure 2d and Figure 3d-f). The dimeric ATPase domain sits in
108 a $\sim 95^\circ$ orthogonal orientation above the DNA-gate, similar to what was previously observed with the
109 yeast Top2 ($\sim 90^\circ$ orientation)¹² (Figure 3d-f). The structure is asymmetric with the ATPase domain
110 slightly bent ($\sim 5^\circ$) in both orthogonal plans (Figure 3d-e). Compared to the yeast Top2 structure, the
111 ATPase domain is positioned 15 Å above the DNA-gate. Interestingly this creates a cavity large
112 enough to accommodate a T-segment on top of a G-segment (Figure 3d-e).

113 In State 1, the TOPRIM and Tower domains are positioned upward and tightly bound to the G-
114 segment which is highly bent. This state corresponds to a closed cleavage complex as observed in the
115 structure of the DNA-bound hTop2 α DNA-binding/cleavage domain crystallized without etoposide,
116 with the exception of the C-gate being closed in our structure¹¹. In State 2, the TOPRIM domain is
117 moved upward by 7 Å while the Tower domain is moved away from the TOPRIM domain by 8 Å
118 (Figure 3a). The physical separation of the TOPRIM and tower domains induces the stretching and
119 unwinding of the G-segment by 8 Å in both directions (Figure 3c), positioning the DNA-
120 binding/cleavage domain in a pre-opening conformation as observed in the crystal structure of
121 DNA/etoposide-bound hTop2 α DNA-binding/cleavage domain²⁹. In this conformation, the TOPRIM
122 and tower domains are separated by ~ 20 Å, which could contribute to the formation of the cavity
123 compatible with the presence of a T-segment before transport through the G-segment.

124 Since the 2 structures solved in different states are bound to AMP-PNP and etoposide, the complexes
125 are trapped in a form precluding the opening of the G-segment. However, the hTop2 α DNA
126 binding/cleavage domain is still able to oscillate between the closed and pre-opening states in presence
127 of etoposide, despite the fact that the G-segment base pairs remain annealed (see supplemental

128 analysis). This conformational oscillation has also been observed in different bacterial DNA gyrase
129 complexes bound to antibiotics^{30,31} (Figure 3, Supplementary Fig. 3 and 8).

130 We also found that the ATPase domain adopts different inclinations depending on the conformation of
131 the DNA-binding/cleavage domain. When the DNA-binding/cleavage domain is a closed state, the
132 ATPase domain is bending over by 5° relative to the dimeric symmetry axis. In the pre-opening state,
133 the ATPase domain bends over by about 15° (Supplementary Fig. 2d and 3). These tilting movements
134 are inherent to the flexibility of the ATPase domain which sits on top of a cavity only partially
135 occupied by the DNA G-segment. It is most likely that the presence of a fully formed DNA crossover
136 would constrain the tilting range of the N-gate.

137 The conformational changes observed in the DNA-gate are however directly correlated to rotations
138 and translational movements of the ATPase domain (Figure 3a,b). Conformational changes of the
139 TOPRIM domains in the DNA-gate modify the distance between residues N433 of each monomer,
140 which are connected to the alpha helices of the ATPase transducers. In the closed state, the distance
141 between the two residues N433 is 49.3 Å while the distance is shortened to 46.4 Å in the pre-opening
142 state. Consequently, this translational movement of 3 Å in the orthogonal plane of the DNA gate
143 induces the rotation of the ATPase domain by 3° counterclockwise, opposite to the intertwining
144 (Figure 3b). It also forces the ATPase domain to come closer to the DNA-gate prefiguring a
145 conformation that would position the T-segment in the newly formed groove between the TOPRIM
146 and tower domains (Figure 3e). Altogether the rotation of the N-gate that correlates with the oscillation
147 of the DNA-gate can be associated with a corkscrew mechanism that we can extrapolate from the two
148 overall conformations of the full-length catalytic core (Supplementary Movie 1).

149 **Structure-based analysis of molecular determinants of allosteric transitions**

150 Although the N-gate is not required for G-segment cleavage, the DNA gate *per se* is not able to open
151 unless ATP binds to the N-gate³². These findings support a model that implies a direct coupling
152 between the ATP binding/hydrolysis and the DNA-gate opening through the 27-aa alpha helices
153 linkers.

154 To analyze the molecular determinants of this allosteric mechanism, we performed a sequence analysis
155 of the TOP2 protein from 37 species, including Top2 α and Top2 β from 5 eukaryotic organisms, from
156 unicellular organisms to Human (Figure 4a). A conservation profile of the 27-aa linker, predicted to
157 fold as an alpha helix, was calculated from 32 sequences out of the 37 species, including only
158 multicellular animals, revealing two highly conserved consensus motifs; W₄₁₄xxF₄₁₇K₄₁₈ and
159 K₄₂₅K₄₂₆C₄₂₇ (Figure 4b). The two aromatic residues W414 and F417 form a hydrophobic patch
160 between the linkers, which could contribute to the stability of their interaction (Figure 4d). Lysine 418
161 is strictly conserved and is close to the K-loop (342-344), that was shown to be involved in DNA
162 sensing in the yeast enzyme¹². Residues K425, K426 and C427 are also highly conserved and are
163 located towards the end of the linker helices, at the entrance of the TOPRIM domain (Figure 4d).

164 To assess the contribution of these residues in the allosteric regulation of the human enzyme, we
165 designed three hTop2 α mutants: K418A to remove the positively charged side chain, W414A-F417S
166 to remove the hydrophobic patch and K425G-K426G-C427P to disrupt the alpha helix fold. We tested
167 their ability to perform DNA relaxation and DNA cleavage and their ATPase activity in comparison
168 with the wild-type enzyme.

169 The K418A mutant displays DNA relaxation, cleavage and ATPase activities in the same range as the
170 WT enzyme (Figure 4c,e and Supplementary Fig. 10). The W414A-F417S mutant shows a slight
171 increase in relaxation activity but with cleavage and ATPase activities similar to the WT (Figure 4c,e,
172 Supplementary Fig. 10). This increased DNA relaxation activity may be attributed to the
173 disappearance of the hydrophobic patch maintaining the two linkers locked together. If this interaction
174 is weakened, this could potentially facilitate the opening of the transducer helices during DNA-gate
175 opening and transport of the DNA T-segment, thus slightly increasing the overall DNA relaxation
176 activity.

177 On the contrary, introduction of the triple mutations K425G-K426G-C427P results in an impaired
178 relaxation activity compared to the WT enzyme (Figure 4e). Similarly, the ATPase activity is reduced
179 2-fold (Figure 4c). However, the triple mutant enzyme is still able to cleave DNA, but to a lesser
180 extent (Supplementary Fig. 10). The disruption of the helical structure may loosen the linkers, weaken

181 their rigidity and attenuate the transmission of the signal through the linker. Overall, the different
182 mutations show that conduction of the allosteric signal between the N-gate and the DNA-gate is finely
183 tuned by sequence specific motifs in the linkers.

184 **Regulation of the catalytic activity by the C-terminal domain.**

185 Although we used the complete hTop2 sequence for our structural analysis by cryo-EM, we were not
186 able to observe any density belonging to the bulk of the CTD in the 2D classes, nor in the 3D
187 reconstructions. Secondary structure prediction on the CTD sequence (residues 1191-1531) suggests
188 that this domain is disordered (Figure 5a). We confirmed this prediction by analyzing the CTD
189 structure in solution using Small Angle X-ray Scattering (SAXS). The Kratky plot derived from the
190 scattering curve showed a plateau for high scattering vector q -values, typical of unfolded proteins, in
191 contrast with the Gaussian curve observed in globular domains³³ (Supplementary Fig. 9). However,
192 analysis of the 4.2 Å EM map of the DNA binding/cleavage domain revealed an additional EM density
193 that could be attributed to the beginning of the CTD domain (residues 1192-1215) (Figure 5c and
194 Supplementary Fig. 5g). This region of the CTD begins at the end of the terminal coiled-coil alpha
195 helix of the DNA binding/cleavage domain on residue 1192, stretches along the Tower domain and
196 extends under the G-segment major groove pointing in an orthogonal direction from the DNA gate
197 (Figure 5c).

198 To our knowledge, the linker leading to the CTD has not been previously observed in a eukaryotic
199 Top2 structure. The CTD has been shown to confer specific functions and DNA topology preferences
200 to the human isoforms that differ in this region^{34,35}. It also undergoes multiple post-translational
201 modifications that regulate its cellular distribution and activity throughout the cell cycle². Several
202 studies have explored how the CTD could modulate the catalytic activities and DNA binding
203 properties of the Top2^{21,36}. However, most studies used a construct of Top2 ending before, or at
204 position 1192, therefore not accounting for the contribution of this linker region that is in close
205 proximity with the G-segment³⁷. To assess the contribution of this region in the catalytic activities, we
206 designed hTop2 α constructs with a complete deletion of the CTD (Δ 1193) or a partial CTD truncation
207 (Δ 1217) (Figure 5). The hTop2 α lacking the complete CTD (Δ 1193) showed similar relaxation and

208 ATPase activities than those of the WT enzyme (Figure 5d,e, and Supplementary Fig. 10), as also
209 observed in previous studies³⁶. The mutant ($\Delta 1193$) is however slightly impaired in its cleavage
210 activity compared to the WT in presence of etoposide (Supplementary Fig. 10). A similar effect of a
211 larger $\Delta 1175$ CTD deletion was already observed with high concentrations of drug, showing that loss
212 of the CTD decreases etoposide cleavage³⁶. On the contrary, the relaxation activity of the hTop2 α
213 with the partial CTD truncation ($\Delta 1217$) was increased ~10-fold compared to the wild-type or $\Delta 1193$
214 enzymes. Remarkably, its ATPase activity was also increased by ~2-fold (Figure 5d,e) and the
215 cleavage activity of the $\Delta 1217$ was also strongly increased (Supplementary Fig. 10).

216 In the partial CTD truncation, the portion of the CTD ranging from residue 1192 to residue 1217 is in
217 close vicinity of the G-segment and seems to act as a positive regulator of the strand passage process,
218 which appears to stimulate the relaxation activity.

219 **Discussion**

220 The cryo-EM structures of the entire hTop2 α , reveal how the ATPase domain is spatially connected to
221 the DNA-binding/cleavage domain conformations. The alpha helices that were missing in crystal
222 structures of the human ATPase domain, are reminiscent of the transducer helices found in procaryotic
223 Top2 enzymes but differ in sequence and in the relative orientation of their crossing, which narrows
224 down the cavity of the N-gate (Figure 4 and supplementary Fig. 6). Previous crystal structures of type
225 2 topoisomerases isolated domains or cryo-EM reconstructions of the bacterial homolog DNA gyrase
226 reported distinct DNA/binding domain conformation but so far without connection with the position of
227 the ATPase domain^{15,30,38}. Our structures highlight how subtle movements in the DNA-gate propagate
228 to the N-gate through networks of interactions mediated by conserved motifs, in particular in the
229 transducer helices. Although AMP-PNP, a non-hydrolysable analogue of ATP, was used to dimerize
230 the ATPase domains, this shows that conformational transitions can occur within the same sample.
231 Indeed, it was shown that AMP-PNP can support a single, complete round of DNA passage, but that
232 the ATPase domains remain dimerized, preventing further rounds of activity^{39,40}. Structures with other
233 nucleotides would provide further insights in the conformational range that link rotation of the N-gate

234 to opening of the DNA gate. Although the isolated N-gate of prokaryotic enzymes have been shown to
235 bind a DNA duplex within its cavity ⁴¹, it is unlikely that the human enzyme could accommodate a
236 DNA double helix without subsequent conformational rearrangement and partial opening of the
237 transducer helices.

238 In addition, the near-atomic resolution structure of the DNA-binding/cleavage domain reveals a part of
239 the CTD domain which was not previously observed and is positioned nearby the G-segment inflection
240 points on each side of the enzyme. The curvature of the DNA was shown to be important for the
241 selection of cleavage sites ⁴². The particular localization of the CTD linker may structurally favor the
242 curvature of the G-segment, stimulating DNA cleavage as shown in the cleavage assays, and favoring
243 strand passage. We also show that this linker preceding the CTD domain enhances the catalytic
244 activities of the hTop2 α . As the Δ 1192 mutant devoid of CTD shows a similar relaxation activity as
245 the full length hTop2 α , this suggests that the bulk of the CTD domain counterbalances the stimulating
246 effect of the linker.

247 Interestingly the orientation of the linkers suggests the CTD domain could be positioned in an
248 orthogonal direction relative to the plane of the Top2 catalytic domains. On the contrary, in
249 prokaryotic enzymes, the linkers of the CTD domains are positioned in the same plane ^{24,30}. The CTD
250 linker sequence of the Top2 α displays a high content in positively charged residues, as well as several
251 conserved residues at positions 1209 and 1212-1214 also found in the Top2 β isoform and other
252 eukaryotic species (Figure 5b). This suggest that the CTD linker constitutes a common structural
253 feature of the multicellular eukaryotic Top2, independently of the conservation of the rest of their
254 CTD.

255 Interestingly, Serine 1213, located at the end of the linker, has been found to be subjected to mitotic
256 phosphorylation and contributes to localization of the Top2 α to the centromere ⁴³⁻⁴⁵. Such post-
257 translational modification could regulate the binding of this CTD portion to the G-segment in order to
258 modulate the relaxation activity of the hTop2 α activities during the cell cycle. The Top2 activities are
259 indeed associated with cellular complexes regulating the genome organization ⁴⁶. The chromatin tether,
260 a specific sequence within the hTop2 α CTD, was shown to interact with histone tails in chromatin

261 structures¹⁸. The path of the CTD linker along the catalytic core of the enzyme indicates that the CTD
262 may be positioned in a different orientation compared with the prokaryotic homologs, and may favor
263 its binding to nucleosome structures in the eukaryotic genome.

264

265 **Acknowledgements**

266 We thank Julio Ortiz and Gabor Papai for their help with data collection. This work was supported by
267 the Fondation ARC, the Association Alsace contre le Cancer and the grant ANR-10-LABX-0030-
268 INRT (managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme
269 Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02). The authors acknowledge the support and the use
270 of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05
271 and of Instruct-ERIC. Computational resources were provided by the Méso-centre de Calcul
272 (University of Strasbourg).

273

274 **Contributions**

275 A.V.B. and V.L. conceived the study and designed the experiments; A.V.B., C.L., R.D. and C.B.
276 performed the experiments; A.V.B. performed the cryo-EM data collection, processed the cryo-EM
277 data and built the atomic models; A.V.B., C.L. and V.L. analyzed and interpreted the data; A.V.B.,
278 C.L. and V.L. wrote the manuscript.

279

280 **Corresponding author**

281 Correspondence to Valérie Lamour.

282

283 **Competing interests**

284 The authors declare no competing interests.

285

286

287

Methods

289 **Protein expression and purification.** The sequence coding for the full length human Top2 α (1-1531)
290 was inserted into a modified pVote0GW vector depleted of *attB1* sequence and containing an N-
291 terminal Twin-strep tag and a C-terminal 10 His-tag. A selective marker and a portion of the viral
292 hemagglutinin gene sequence (HA) present in the plasmid allowed selecting recombinant MVA-T7
293 viruses holding the *hTop2 α* construct under the dependence of a T7 promoter. Generation and
294 selection of the recombinant viruses was performed as described previously⁴⁷. Prior to overexpression,
295 600mL of BHK21 C13-2P cells in suspension (10^6 cells/ml) were infected with approximately 0.1
296 PFU/cell of recombinant virus in cell culture medium (GMEM, 10% FCS, 1.5 g/L BTP, 50 μ M
297 Gentamycin) and incubated at 37°C. After 48h, the infected cells were mixed with 6L of uninfected
298 cells at 10^6 cells/ml and a 1:10 ratio (v/v), respectively. Overexpression was directly induced by the
299 addition of 1mM IPTG followed by an incubation of 24h at 37°C. Cells were harvested and
300 resuspended in Lysis buffer (25 mM Hepes, 500 mM NaCl, 500 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM
301 imidazole, 10% v/v glycerol, 2.5 mM beta-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM Pefabloc,
302 protease inhibitor cocktail (Roche), pH 8.0) and lysed with 3 cycles of high pressure disruption using
303 an EmulsiFlex-C3 apparatus (Avestin) at 1500 bars. The full length hTop2 α was first purified by a
304 tandem affinity chromatography on a manually packed XK 26/20 column (Pharmacia) with Chelating
305 Sepharose 6 Fast Flow resin (GE healthcare) bound to Ni²⁺ ions followed by a StrepTrap HP column
306 (GE healthcare). Elution from the chelating resin was performed using 250mM imidazole pH 8.0
307 added to the Lysis buffer and allowed the protein to bind to the StrepTactin Sepharose resin. The
308 protein was washed with 25 mM Hepes, 200 mM NaCl, 200 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% v/v
309 glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0 and eluted with the same buffer supplemented with 3mM Desthiobiotin
310 (Sigma). Twin-strep and His tags were removed by the addition of P3C (Precision protease) at 1:50
311 ratio (w/w) and incubated overnight at 4°C. The cleaved protein was then loaded on a HiTrap Heparin
312 HP column (GE Healthcare). Elution was performed by a single step using 25 mM Hepes, 400 mM
313 NaCl, 400 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% v/v glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0. After the purification
314 process (Supplementary Fig. 1a), 20 mg of the full length hTop2 α were obtained from 6L of BHK21
315 C13-2P cell cultures. About 10 to 15% of the protein sample shows some degradation depending on

316 the protein batch, as previously observed⁴³. Western blot analysis using TOP2A antibody PA5-46814
317 (Thermo Fischer Scientific) shows that the C-terminal domain tends to be cleaved off during protein
318 purification despite the use of protease inhibitors (Supplementary Fig. 1a). However, the majority of
319 the sample is constituted by full-length protein forming an intact homodimer that can be stabilized to
320 form complexes with DNA prior to cryo-EM sample freezing (Supplementary Fig. 1c).

321 **Nucleic acid preparation.** A doubly nicked 30 bp DNA duplex was reconstituted using 2 asymmetric
322 synthetic oligonucleotides obtained from Sigma-Aldrich. Sequences for the single strand 17bp (5'-
323 CGCGCATCGTCATCCTC-3') and the single strand 13bp (5'-GAGGATGACGATG-3') were chosen
324 as described in¹¹. Briefly, the nucleic acids were dissolved in DNase-free water at 1 mM
325 concentration. To assemble the double stranded DNA, each oligo was mixed at 1:1 molar ratio,
326 annealed by incubating at 95°C for 2 min and then decreasing the temperature by 1°C every 1 min
327 until reaching 20°C. The annealed doubly nicked DNA duplex was then buffer-exchanged in Hepes 20
328 mM pH 7.5 with a BioSpin 6 column (BioRad).

329 **Complex formation for cryo-EM.** Purified hTop2 α was mixed with the 30 bp dsDNA at 1:1 molar
330 ratio to obtain a 20 μ M final concentration of protein and DNA. The mixture was incubated for 10 min
331 at 37°C. Then, etoposide (Sigma) was added to reach a final concentration of 0.5 mM. The subsequent
332 mixture was incubated for 10 min at 37°C. Finally, ADPNP was added to the complex at a final
333 concentration of 0.5 mM. The fully reconstituted complex was further incubated 30 min at 30°C.

334 **BS3 Cross-linked hTop2 α -DNA-Etoposide-ADPNP complex.** The purified hTop2 α is unstable in
335 buffer conditions under low salt conditions. Therefore, a chemical stabilization by BS3 was necessary
336 for further cryo-electron microscopy analysis. To determine the optimal concentration of BS3 allowing
337 a complete stabilization of the complex without inducing aggregates, the newly formed complex was
338 incubated with different concentration of BS3 and analyzed by SDS-PAGE. Briefly, BS3 (Thermo
339 Fischer Scientific) was freshly resuspended in filtered DNase-free water at 25 mM stock
340 concentration. Rapidly after BS3 preparation, the complex was incubated for 30 min at 30°C with 0.25
341 mM up to 5 mM BS3 and the crosslinking was quenched by adding Tris-HCl, pH 7.5, to 50 mM. The

342 optimal concentration was determined at 1 mM (Supplementary Fig. 1c). The cross-linked complex
343 was centrifuged at 20,000g for 30 min at 4°C to remove remaining aggregates.

344 **Buffer exchange of the complex in optimal Cryo-EM buffer.** The complex was first dialyzed
345 against 200 mL of intermediate buffer (20 mM Hepes, 200 mM KAc, 200 mM Na-Glu, 5 mM MgAc,
346 0.5 mM TCEP, pH 7.5) for 2h at 4°C using Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units (7000MWCO)
347 (Thermo Fischer Scientific). Then, a second dialysis was performed in 200 mL of the final cryo-EM
348 buffer (20 mM Hepes, 100 mM KAc, 50 mM Na-Glutamate, 5 mM MgAc, 0.5 mM TCEP, pH 7.5) for
349 4 h at 4°C. Finally, 8 mM CHAPSO (Sigma-Aldrich) was added to the dialyzed complex to prevent
350 adsorption of the particles to the air/water interface⁴⁸. The sample was centrifuged 2h at 16,000 g to
351 remove potential aggregates.

352 **Cryo-EM grid preparation.** Quantifoil R-1.2/1.3 300 mesh copper grids were glow-charged for 20s
353 prior to the application of 4 µl of the complex. After 30 s of incubation, the grids were plunge-frozen
354 in liquid ethane using a Vitrobot mark IV (FEI) with 95 % chamber humidity at 10°C.

355 **Electron microscopy.** Cryo-EM imaging was performed on a Titan Krios microscope operated at
356 300 kV (FEI) equipped with a Gatan K2 Summit direct electron camera (Gatan), a Gatan Quantum
357 energy filter, and a CS corrector (FEI). Images were recorded in EFTEM nanoprobe mode with Serial
358 EM⁴⁹ in super-resolution counting mode with a super resolution pixel size of 0.55 Å and a defocus
359 range of -1 to -3.2 µm. Six datasets were collected with a dose rate of 6 to 8 e⁻/pixel/s (1.1 Å pixel size
360 at the specimen) on the detector. Images were recorded with a total dose of 50 electrons/Å², exposure
361 time between 7 to 10 s and 0.2 to 0.25 s subframes (35 to 50 total frames).

362 **Data processing.** Processing of each data set was done separately following the same procedure until
363 the 3D refinements where particles were merged. The super-resolution dose-fractionated subframes
364 were gain-corrected with IMOD⁵⁰ and binned twice by Fourier-cropping, drift-corrected and dose-
365 weighted using MotionCor2⁵¹ yielding summed images with 1.1 Å pixel size. The contrast transfer
366 function of the corrected micrographs was estimated using GCTF v1.06⁵². Thon rings were manually
367 inspected for astigmatism and micrographs with measured resolutions worse than 5 Å were excluded.
368 Particles were automatically picked by template matching in RELION2^{27,53}. To generate the

369 templates, around 6000 particles were manually picked on micrographs from the first data set using
370 EMAN2⁵⁴. Then, the manually picked particles were subjected to 2D classification in RELION2 and
371 the best class averages were used as templates for subsequent automatic picking procedure. Taking
372 together the 6 data sets, a total of 1,908,092 particles were selected from 13,484 micrographs. Particles
373 from each data set were separately subjected to 2 rounds of 2D classification in RELION2 to remove
374 junk particles and contaminations resulting in a total of 505,681 particles for further processing
375 (Supplementary Fig. 2b). Particles from the 6 data sets were merged into 2 independent data sets that
376 were each subjected to 2 rounds of 3D *ab-initio* classification in cryoSPARC²⁸ with a class probability
377 threshold of 0.9. After discarding the poor-quality models, the remaining particles were merged,
378 resulting in a final data set of 162,332 particles. This final data set was used to generate a high-quality
379 *ab-initio* model with cryoSPARC (Supplementary Fig. 2c). The *ab-initio* model was low-pass filtered
380 to 30Å and was used as a reference for 3D auto-refinement in RELION2 producing a map of 7 Å
381 global resolution. The refined particle coordinates were then used for local CTF estimation using
382 GCTF v1.06 followed by a re-extraction with centering. This new particle stack was subjected to a 3D
383 auto-refinement in RELION2 using the *ab-initio* model low-pass filtered at 30 Å resulting in a 6.8 Å
384 map, further post-processed to a 6.6 Å global resolution (Supplementary Fig. 3). Local resolution
385 calculated with Blocres⁵⁵ showed a range of resolution from 4Å in the DNA-binding/cleavage domain
386 and 14Å in the ATPase domain indicating a high flexibility of the head. Moreover, 2D classifications
387 showed large movements of the ATPase domain relative to the DNA-binding/cleavage domain
388 (Supplementary Fig. 1d).

389 A combination of local approaches was used to identify different conformations and to improve local
390 resolution of each domain. Since the ATPase head domain was too small for a 3D focused refinement,
391 we first performed a focused 3D classification of the ATPase domain with a soft mask and no
392 alignment in RELION2. One class of 36,610 particles with well-defined densities of the ATPase
393 domain was selected. To facilitate an accurate alignment of the particles, a new *ab-initio* model of the
394 class was calculated in cryoSPARC together with the DNA-binding/cleavage domain. Homogeneous
395 refinement in cryoSPARC of the selected class yielded a reconstruction with overall resolution of 7.6Å
396 in which density of the linkers appeared (Supplementary Fig. 3).

397 Secondly, a focused 3D auto-refinement was performed in RELION2 using a soft mask around the
398 DNA-binding/cleavage domain. Post-processing of the map produced a 4.5Å resolution reconstruction
399 of the DNA-binding/cleavage domain. Then, a focused 3D classification of the DNA-binding/cleavage
400 domain starting with a fine angular sampling of 3.7°, local angular search range of 5° and tau fudge of
401 16 was performed. Two of the classes showed better angular accuracies and distinct conformations of
402 the DNA-binding/cleavage domain, referred to as State 1 (57,976 particles) and State 2 (34,922
403 particles). These 2 classes were further refined in cryoSPARC by homogeneous refinement with a C2
404 symmetry and gave a reconstruction with global resolution of 4.2 Å and 5.0 Å, respectively.
405 Reconstructions with relative positions of the ATPase domain regarding both State 1 and State 2
406 conformations of the DNA-binding/cleavage domain were obtained by a homogeneous refinement in
407 cryoSPARC with a C1 symmetry. Auto-masking was disabled to avoid appearance of artifacts during
408 refinement. The reconstruction of the overall complex with the DNA-binding/cleavage domain in State
409 1 conformation yielded a map of 5.6 Å overall resolution. For the DNA-binding/cleavage domain in
410 State 2 conformation, the reconstruction yielded a map of the entire complex at 7.2Å overall
411 resolution. Further heterogeneous refinements were performed to assess the flexibility of the ATPase
412 domain with respect to the DNA-binding/cleavage domain (Supplementary Fig. 3).

413 All reported resolutions are based on the gold standard FSC-0.143 criterion⁵⁶ and FSC-curves were
414 corrected for the convolution effects of a soft mask using high-resolution noise-substitution in
415 RELION2 as well as in cryoSPARC⁵⁷. All reconstructions were sharpened by applying a negative B-
416 factor that was estimated using automated procedures⁵⁸. Local resolution of maps reconstructed in
417 cryoSPARC were calculated using Blocres (Supplementary Fig. 4). The cryo-EM maps of the DNA-
418 binding/cleavage domain in State 1 and State 2 state as well as the entire complex in the 2 same
419 conformations have been deposited in the EMDataBank under accession numbers EMD-11550, EMD-
420 11551, EMD-11553, EMD-11554, respectively. The EM map with well-resolved N-gate/DNA-gate
421 linkers have also been deposited in the EMDataBank under accession numbers EMD-11552.

422 **Model building and refinement of the DNA-binding/cleavage domain.** The 2 reconstructions of the
423 DNA-binding/cleavage domain in State 1 and State 2 at 4.2Å and 5.0Å, respectively, were used to

424 refine a crystal structure of the hTop2 α DNA-binding/cleavage domain in complex with DNA and
425 etoposide ²⁹. PDB 5GWK was stripped of all ions and water molecules, with all occupancies set to 1
426 and B-factors set to 50. First, the atomic model was rigid-body fitted in the filtered and sharpened
427 maps with Chimera ⁵⁹. A first round of real-space refinement in PHENIX ⁶⁰ was performed using local
428 real-space fitting and global gradient-driven minimization refinement. Then, nucleic acids were
429 modified according to the DNA sequence used in our structure. The visible part of the CTD linker
430 (1187-1215) was built as a poly-A coil. Several rounds of real-space refinement in PHENIX using
431 restraints for secondary structure, rotamers, Ramachandran, and non-crystallographic symmetry were
432 performed, always followed by manual inspection in COOT ⁶¹, until a converging model was obtained.
433 A half-map cross-validation was performed to define 0.5 as the best refinement weight in PHENIX
434 allowing atom clashes reduction and prevention of model overfitting (Supplementary Fig. 4). All
435 refinement steps were done using the resolution limit of the reconstructions according to the gold
436 standard FSC-0.143 criterion ⁵⁶. Refinement parameters, model statistics and validation scores are
437 summarized in Supplementary Table 1. The atomic models of the DNA-binding/cleavage domain in
438 State 1 and State 2 conformations have been deposited in the Protein Data Bank under accession
439 numbers 6ZY5, 6ZY6, respectively.

440 **Model building and refinement of the overall complex.** For both conformations of the DNA-
441 binding/cleavage domain, the 3D reconstructions of the overall complex were used for further atomic
442 model refinement. The atomic models previously refined for each conformation of the DNA-
443 binding/cleavage domain were rigid-body fitted in the overall maps using Chimera. Then, crystal
444 structure of the ATPase domain in complex with ADPNP was rigid-body fitted in the filtered and
445 unsharpened maps using Chimera. PDB 1ZXM ⁸ was stripped of all ions and water molecules, with all
446 occupancies set to 1 and B-factors set to 50. A first round of real-space refinement in PHENIX was
447 performed using rigid-body and global gradient-driven minimization refinement. Then, the linker
448 between ATPase domain and the DNA-binding/cleavage domain was built in COOT as an alpha helix,
449 following the density and according to the secondary structure prediction (Supplementary Fig. 6).
450 Refinement followed the same procedure as for the masked DNA-binding/cleavage domain except that
451 the local real-space fitting was replaced by a rigid-body refinement. Resolution limit for refinements

452 was set according to the gold standard FSC-0.143 criterion. Refinement parameters, model statistics
453 and validation scores are summarized in Supplementary Table 1. The atomic models of the full-length
454 hTop2 α in State 1 and State 2 conformations have been deposited in the Protein Data Bank under
455 accession numbers 6ZY7, 6ZY8, respectively.

456 **Expression and purification of hTop2 α mutants.** The modified pVote0GW vector used for wild-
457 type hTop2 α overexpression was mutated by site directed mutagenesis using the QuikChange XL Site-
458 Directed Mutagenesis kit (Agilent) in order to generate the plasmids harboring K418A, W414A-
459 F417S, K425G-K426G-C427P mutations and Δ 1193 or Δ 1217 truncations (Supplementary Table 3).
460 The overexpression procedure for the five mutants is identical to the wild type hTop2 α described
461 above in the Methods section. Purification of each mutant was performed in batch. Cells were
462 harvested and resuspended in Lysis buffer (25 mM Hepes, 500 mM NaCl, 500 mM KCl, 1 mM MgCl₂,
463 20 mM imidazole, 10% v/v glycerol, 2.5 mM beta-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM Pefabloc,
464 protease inhibitor cocktail (Roche), pH 8.0) and lysed with 3 cycles of high pressure disruption using
465 EmulsiFlex-C3 (Avestin) at 1500 bars. After centrifugation 1h at 40000g, the lysate of the 3 mutants
466 (K418A, W414A-F417S, K425G-K426G-C427P) were incubated with 2 ml of TALON resin for 2h
467 under agitation at 4°C. The proteins were washed 3 times with the lysis buffer containing increasing
468 concentration of imidazole up to 50mM. Then proteins were eluted from the resin with 250mM
469 imidazol pH 8.0 added to the Lysis buffer. The three aforementioned eluted proteins and the 2
470 additional mutants lysates (Δ 1193 and Δ 1217) were incubated with 2 ml of StrepTactin resin and
471 incubated 2h under agitation at 4°C. The proteins were washed 3 times with 25 mM Hepes, 200 mM
472 NaCl, 200 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% v/v glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0 and eluted with the same
473 buffer supplemented with 3 mM Desthiobiotin (Sigma).

474 **Relaxation assay.** An increasing concentration of hTop2 α was incubated at 37°C with 6 nmoles of
475 supercoiled pUC19 plasmid in a reaction mixture containing 20 mM Tris-acetate pH7.9, 100 mM
476 potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1mM DTT, 1 mM ATP, 100 μ g/ml BSA. After 30
477 minutes, reactions were stopped by addition of SDS 1%. Agarose gel electrophoresis was used to
478 monitor the conversion of supercoiled pUC19 to the relaxed form. Samples were run on a 0.8%

479 agarose, 1X Tris Borate EDTA buffer (TBE) gel, at 6V/cm for 180 min at room temperature. Agarose
480 gels were stained with 0.5mg/ml ethidium bromide in 1X TBE for 15 min, followed by 5 min
481 destaining in water. DNA topoisomers were revealed using a Synergy U:Genius 3 scanner.

482 **Cleavage assay.** An increasing concentration of hTop2 α was incubated at 37°C with 6 nmoles of
483 supercoiled pUC19 plasmid in a reaction mixture containing 20 mM Tris-acetate pH7.9, 50 mM
484 potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 100 μ g/ml BSA and 275 μ M
485 of etoposide. After 30 minutes, reactions were stopped by addition of SDS 1% and 650 μ M of
486 proteinase K. After incubation at 37°C 40 minutes, a phenol-chloroform DNA extraction at pH 8 was
487 performed. Agarose gel electrophoresis was used to monitor the conversion of supercoiled pUC19 to
488 the relaxed form. Samples were run on a 0.8% agarose, 1X Tris Borate EDTA buffer (TBE) gel, at
489 6V/cm for 180 min at room temperature. Agarose gels were stained with 0.5 mg/ml ethidium bromide
490 in 1X TBE for 15 min, followed by 5 min destaining in water. DNA topoisomers were revealed using
491 a Synergy U:Genius 3 scanner.

492 **ATPase enzymatic assays.** ATP hydrolysis was measured by following the oxidation of NADH
493 mediated by pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH). The absorbance is monitored at
494 340 nm over 200 seconds at 37 °C with a Shimadzu 1700 spectrophotometer. Reactions were recorded
495 in triplicates with 75 nM protein and 21 nM plasmid DNA (PUC19) in 500 μ l of a buffer containing 50
496 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 7 mM BME, 100 μ g/mg
497 of BSA, 4U/5U of PK/LDH mixture, 2 mM PEP, and 0.2 mM NADH and 4 mM ATP.

498 **Phylogenetic and structure prediction analysis of the TOP2.** 41 TOP2 genes, from unicellular
499 eukaryotes to Human (Supplementary Table 4), were aligned with ClustalW ⁶² using the BLOSUM
500 weight matrix. The subsequent alignment was injected into the ConSurf server ⁶³ to analyze the
501 conservation of the primary sequence. Secondary structure prediction of the hTop2 α was performed
502 using the PSIPRED server ⁶⁴. Protein domain graphs (Figures 4 and 5) were generated using
503 domainsGraph.py (archived at <https://github.com/elifesciences-publications/domainsGraph>) ⁶⁵.

504 **hTop2 α CTD production and purification.** The sequence coding for the human Top2 α CTD (1191-
505 1531) was inserted into a modified pAX vector containing an N-terminal 10 His-tag and a C-terminal
506 twin-strep tag. Overexpression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 in LB medium
507 containing 50 μ g/mL kanamycin and 35 μ g/mL chloramphenicol. Cells were induced with 1 mM IPTG
508 after reaching an OD₆₀₀ 0.95 and protein was expressed at 37 °C for 4 h. The CTD was purified
509 similarly as described for the full length human Top2 α supplemented by an additional size-exclusion
510 chromatography step. After the ion exchange chromatography, fractions containing the intact CTD
511 were pooled and loaded on a Superdex S200 16/60 size-exclusion chromatography column (GE
512 Healthcare) using 25 mM Hepes, 200 mM NaCl, 200 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% v/v glycerol, 2 mM
513 DTT, pH 8.0. After the purification process, 4 mg of the hTop2 α CTD were obtained per liter of cell
514 culture (Supplementary Fig. 9a).

515 **SAXS experiments.** Small Angle X-ray Scattering (SAXS) data of the hTop2 α CTD (1191-1531) at
516 10 or 20 mg/ml was collected on an in-house Rigaku BioSAXS-1000 (Rigaku) apparatus, equipped
517 with a Rigaku MicroMaxTM-007HF generator and a Pilatus 100k detector. The sample was
518 maintained at 10°C and exposed to the X-ray beam for 2h. A total of 8 images were recorded every 15
519 min. All the data processing steps were performed using the program package PRIMUS⁶⁶.

520

521

References

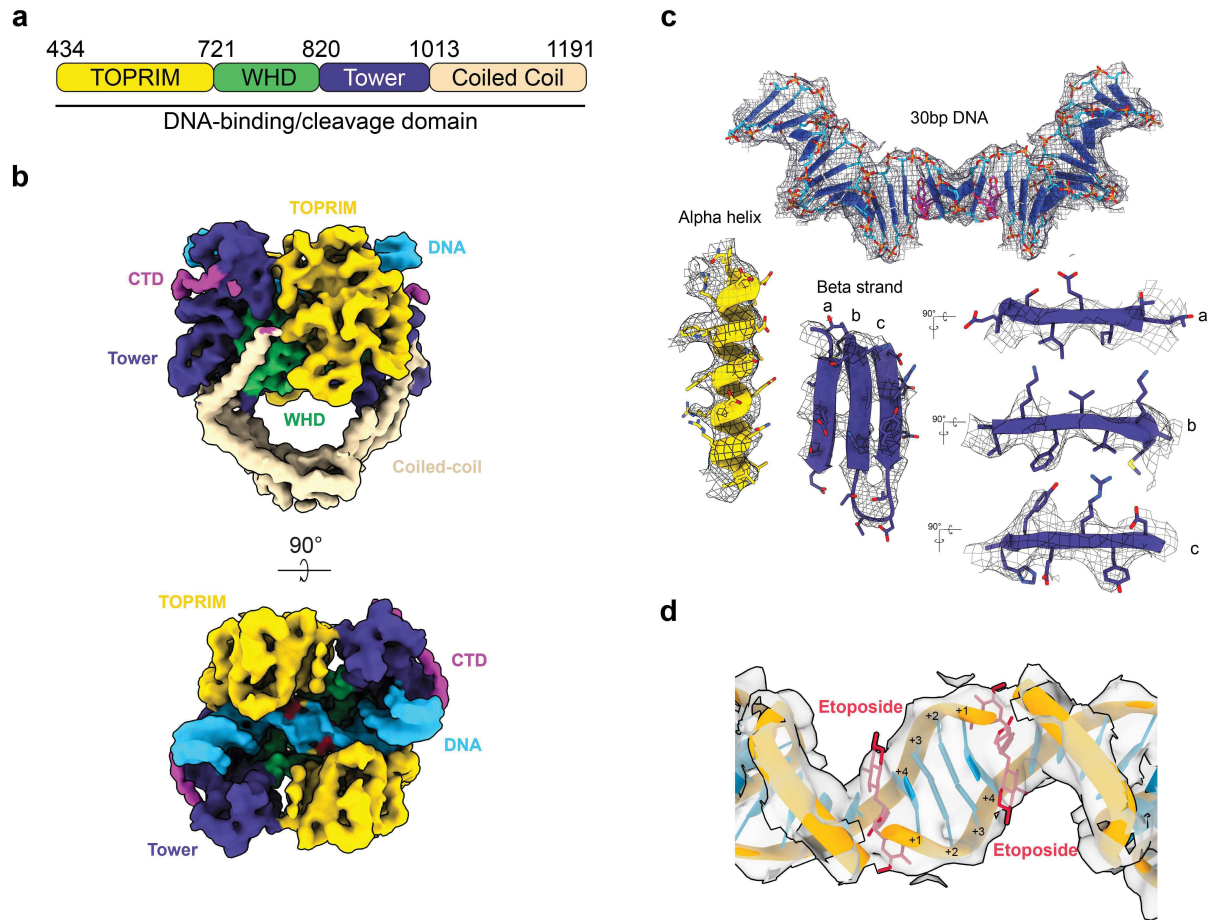
- 523 1. Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H. & Berger, J. M. All tangled up: how cells direct,
524 manage and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 827–841 (2011).
- 525 2. Chen, T., Sun, Y., Ji, P., Kopetz, S. & Zhang, W. Topoisomerase II α in chromosome instability
526 and personalized cancer therapy. *Oncogene* **34**, 4019–4031 (2015).
- 527 3. Akimitsu, N. *et al.* Enforced cytokinesis without complete nuclear division in embryonic cells
528 depleting the activity of DNA topoisomerase II α . *Genes to Cells* (2003) doi:10.1046/j.1365-
529 2443.2003.00643.x.
- 530 4. Ali, Y. & Abd Hamid, S. Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer
531 chemotherapy. *Tumor Biology* (2016) doi:10.1007/s13277-015-4270-9.
- 532 5. Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**,
533 338–350 (2009).
- 534 6. Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. C. & Wang, J. C. DNA transport by a type II
535 topoisomerase: Direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
536 (1996) doi:10.1073/pnas.93.9.4057.
- 537 7. Schoeffler, A. J. & Berger, J. M. DNA topoisomerases: Harnessing and constraining energy to
538 govern chromosome topology. *Quarterly Reviews of Biophysics* (2008)
539 doi:10.1017/S003358350800468X.
- 540 8. Wei, H., Ruthenburg, A. J., Bechis, S. K. & Verdine, G. L. Nucleotide-dependent domain
541 movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.*
542 (2005) doi:10.1074/jbc.M506520200.
- 543 9. Dong, K. C. & Berger, J. M. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type
544 IIA topoisomerases. *Nature* (2007) doi:10.1038/nature06396.
- 545 10. Wu, C. C. *et al.* Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug
546 etoposide. *Science (80-.)*. (2011) doi:10.1126/science.1204117.
- 547 11. Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A. & Berger, J. M. The structure of
548 DNA-bound human topoisomerase II alpha: Conformational mechanisms for coordinating
549 inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* (2012)
550 doi:10.1016/j.jmb.2012.07.014.
- 551 12. Schmidt, B. H., Osheroff, N. & Berger, J. M. Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide
552 complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2012)
553 doi:10.1038/nsmb.2388.
- 554 13. Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C. & Wang, J. C. Structure and mechanism of DNA
555 topoisomerase II. *Nature* (1996) doi:10.1038/379225a0.
- 556 14. Bjergbaek, L. *et al.* Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of
557 human topoisomerase IIalpha. *J. Biol. Chem.* **275**, 13041–13048 (2000).
- 558 15. Chen, S. F. *et al.* Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II

- 559 DNA-gate. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-05406-y.
- 560 16. Clarke, D. J. & Azuma, Y. Non-catalytic roles of the topoisomerase II α C-terminal domain.
561 *International Journal of Molecular Sciences* (2017) doi:10.3390/ijms18112438.
- 562 17. Sengupta, T., Mukherjee, M., Mandal, C., Das, A. & Majumder, H. K. Functional dissection of
563 the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate
564 *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5305–5316 (2003).
- 565 18. Lane, A. B., Giménez-Abián, J. F. & Clarke, D. J. A novel chromatin tether domain controls
566 topoisomerase II α dynamics and mitotic chromosome formation. *J. Cell Biol.* (2013)
567 doi:10.1083/jcb.201303045.
- 568 19. Lotz, C. & Lamour, V. The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational
569 modifications and drug resistance. *Cancer Drug Resist.* (2020) doi:10.20517/cdr.2019.114.
- 570 20. Meczes, E. L., Gilroy, K. L., West, K. L. & Austin, C. A. The impact of the human DNA
571 topoisomerase II C-terminal domain on activity. *PLoS One* (2008)
572 doi:10.1371/journal.pone.0001754.
- 573 21. McClendon, A. K., Dickey, J. S. & Osheroff, N. Ability of viral topoisomerase II to discern the
574 handedness of supercoiled DNA: Bimodal recognition of DNA geometry by type II enzymes.
575 *Biochemistry* (2006) doi:10.1021/bi0520838.
- 576 22. Kozuki, T. *et al.* Roles of the C-terminal domains of topoisomerase II α' and topoisomerase II β
577 in regulation of the decatenation checkpoint. *Nucleic Acids Res.* (2017)
578 doi:10.1093/nar/gkx325.
- 579 23. Gilroy, K. L. & Austin, C. A. The impact of the C-Terminal domain on the interaction of
580 human DNA topoisomerase II α and β with DNA. *PLoS One* (2011)
581 doi:10.1371/journal.pone.0014693.
- 582 24. Laponogov, I. *et al.* Structure of an ‘open’ clamp type II topoisomerase-DNA complex
583 provides a mechanism for DNA capture and transport. *Nucleic Acids Res.* (2013)
584 doi:10.1093/nar/gkt749.
- 585 25. Bouige, A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase possesses two functional GyrA-
586 boxes. *Biochem. J.* (2013) doi:10.1042/BJ20130430.
- 587 26. Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K. & Berger, J. M. The C-terminal domain of DNA gyrase A
588 adopts a DNA-bending β -pinwheel fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004)
589 doi:10.1073/pnas.0401595101.
- 590 27. Kimanius, D., Forsberg, B. O., Scheres, S. H. W. & Lindahl, E. Accelerated cryo-EM structure
591 determination with parallelisation using GPUS in RELION-2. *Elife* (2016)
592 doi:10.7554/eLife.18722.
- 593 28. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. CryoSPARC: Algorithms for
594 rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* (2017)
595 doi:10.1038/nmeth.4169.
- 596 29. Wang, Y. R. *et al.* Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-

- 597 specific Pt(II)-methionine coordination chemistry. *Nucleic Acids Res.* (2017)
598 doi:10.1093/nar/gkx742.
- 599 30. Vanden Broeck, A., Lotz, C., Ortiz, J. & Lamour, V. Cryo-EM structure of the complete E. coli
600 DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nat. Commun.* (2019) doi:10.1038/s41467-019-12914-y.
- 601 31. Gibson, E. G., Bax, B., Chan, P. F. & Osheroff, N. Mechanistic and structural basis for the
602 actions of the antibacterial gepotidacin against staphylococcus aureus gyrase. *ACS Infect. Dis.*
603 (2019) doi:10.1021/acsinfecdis.8b00315.
- 604 32. Roca, J. The path of the DNA along the dimer interface of topoisomerase II. *J. Biol. Chem.*
605 (2004) doi:10.1074/jbc.M402555200.
- 606 33. Glatter, O. & Kratky, O. General theory X- Ray scattering. *Small-Angle X-ray Scatt.* (1982)
607 doi:10.1002/actp.1985.010360520.
- 608 34. McClendon, A. K. *et al.* Bimodal recognition of DNA geometry by human topoisomerase II α :
609 Preferential relaxation of positively supercoiled DNA requires elements in the C-terminal
610 domain. *Biochemistry* (2008) doi:10.1021/bi800453h.
- 611 35. McClendon, A. K., Rodriguez, A. C. & Osheroff, N. Human topoisomerase II α rapidly relaxes
612 positively supercoiled DNA: Implications for enzyme action ahead of replication forks. *J. Biol.*
613 *Chem.* (2005) doi:10.1074/jbc.M503320200.
- 614 36. Dickey, J. S. & Osheroff, N. Impact of the C-terminal domain of topoisomerase II α on the
615 DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry* (2005) doi:10.1021/bi050811l.
- 616 37. Kawano, S. *et al.* DNA-binding activity of rat DNA topoisomerase II α C-terminal domain
617 contributes to efficient DNA catenation in vitro. *J. Biochem.* (2015) doi:10.1093/jb/mvv110.
- 618 38. Soczek, K. M., Grant, T., Rosenthal, P. B. & Mondragón, A. CryoEM structures of open
619 dimers of gyrase A in complex with DNA illuminate mechanism of strand passage. *Elife* **7**,
620 e41215 (2018).
- 621 39. Roca, J. & Wang, J. C. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: Evidence in favor of a
622 two-gate mechanism. *Cell* (1994) doi:10.1016/0092-8674(94)90222-4.
- 623 40. Osheroff, N. Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. *J. Biol. Chem.*
624 (1986).
- 625 41. Laponogov, I. *et al.* Trapping of the transport-segment DNA by the ATPase domains of a type
626 II topoisomerase. *Nat. Commun.* **9**, 2579 (2018).
- 627 42. Jang, Y. *et al.* Selection of DNA Cleavage Sites by Topoisomerase II Results from Enzyme-
628 Induced Flexibility of DNA. *Cell Chem. Biol.* (2019) doi:10.1016/j.chembiol.2018.12.003.
- 629 43. Bedez, C. *et al.* Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 α highlight the role of
630 a eukaryote-specific residue in the ATPase domain. *Sci. Rep.* (2018) doi:10.1038/s41598-018-
631 27606-8.
- 632 44. Ishida, R. *et al.* Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase
633 II α . *Cell Struct. Funct.* (2001) doi:10.1247/csf.26.215.
- 634 45. Antoniou-Kourouniotti, M., Mimmack, M. L., Porter, A. C. G. & Farr, C. J. The impact of the

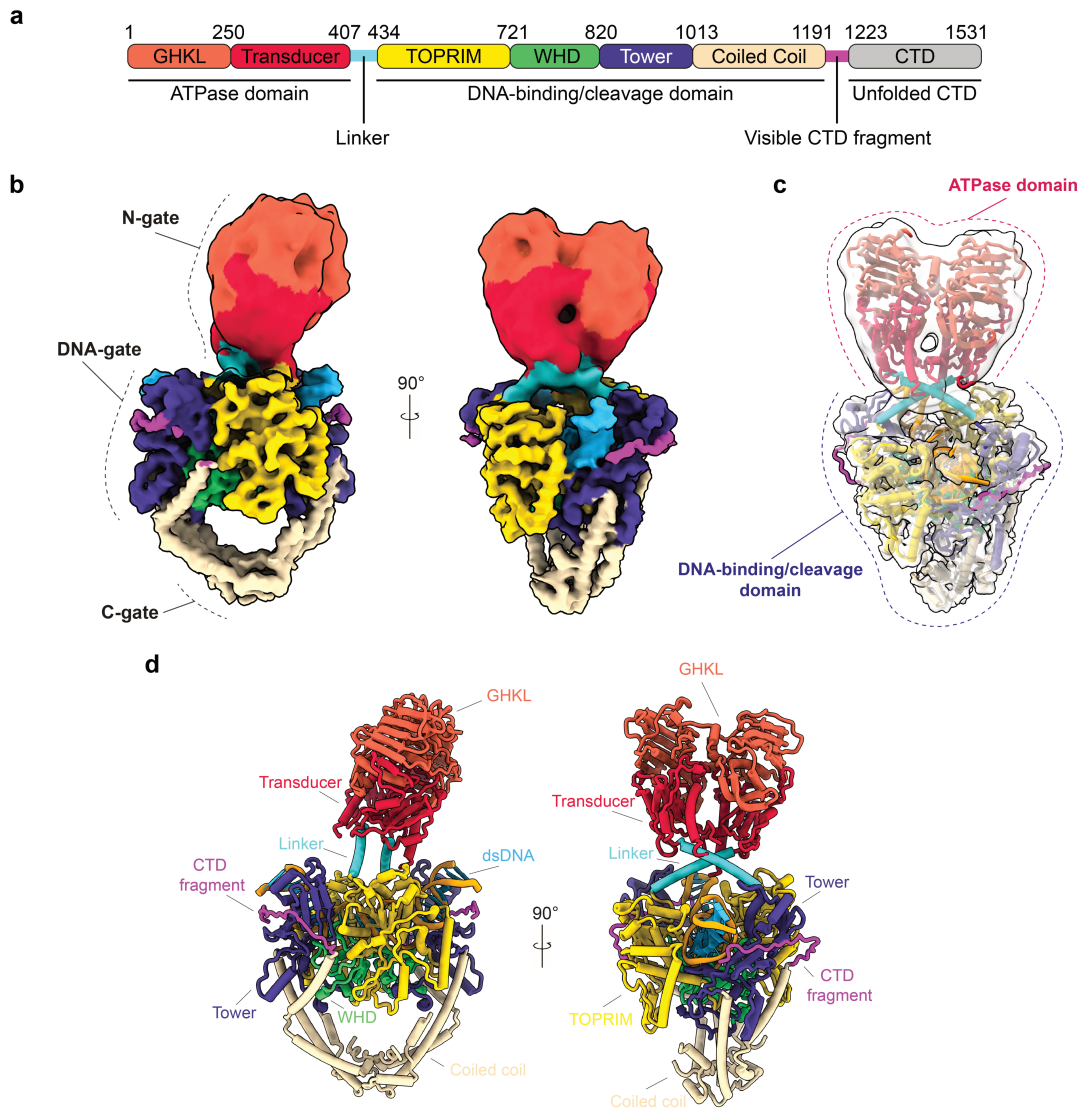
- 635 C-terminal region on the interaction of topoisomerase ii alpha with mitotic chromatin. *Int. J.*
636 *Mol. Sci.* (2019) doi:10.3390/ijms20051238.
- 637 46. Lee, S. K. & Wang, W. Roles of Topoisomerases in Heterochromatin, Aging, and Diseases.
638 *Genes* vol. 10 (2019).
- 639 47. Pradeau-Aubreton, K., Ruff, M., Garnier, J.-M., Schultz, P. & Drillien, R. Vectors for
640 recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia
641 virus Ankara. *Anal. Biochem.* **404**, 103–105 (2010).
- 642 48. Chen, J., Noble, A. J., Kang, J. Y. & Darst, S. A. Eliminating effects of particle adsorption to
643 the air/water interface in single-particle cryo-electron microscopy: Bacterial RNA polymerase
644 and CHAPSO. *J. Struct. Biol. X* **1**, 100005 (2019).
- 645 49. Mastronarde, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of
646 specimen movements. *J. Struct. Biol.* (2005) doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007.
- 647 50. Mastronarde, D. N. & Held, S. R. Automated tilt series alignment and tomographic
648 reconstruction in IMOD. *J. Struct. Biol.* (2017) doi:10.1016/j.jsb.2016.07.011.
- 649 51. Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2: Anisotropic correction of beam-induced motion for improved
650 cryo-electron microscopy. *Nature Methods* (2017) doi:10.1038/nmeth.4193.
- 651 52. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* (2016)
652 doi:10.1016/j.jsb.2015.11.003.
- 653 53. Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure
654 determination. *J. Struct. Biol.* (2012) doi:10.1016/j.jsb.2012.09.006.
- 655 54. Bell, J. M., Chen, M., Baldwin, P. R. & Ludtke, S. J. High resolution single particle refinement
656 in EMAN2.1. *Methods* (2016) doi:10.1016/j.ymeth.2016.02.018.
- 657 55. Heymann, J. B. & Belnap, D. M. Bsoft: Image processing and molecular modeling for electron
658 microscopy. *J. Struct. Biol.* (2007) doi:10.1016/j.jsb.2006.06.006.
- 659 56. Scheres, S. H. W. & Chen, S. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination.
660 *Nature Methods* (2012) doi:10.1038/nmeth.2115.
- 661 57. Chen, S. *et al.* High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution
662 in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy*
663 (2013) doi:10.1016/j.ultramic.2013.06.004.
- 664 58. Rosenthal, P. B. & Henderson, R. Optimal determination of particle orientation, absolute hand,
665 and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* (2003)
666 doi:10.1016/j.jmb.2003.07.013.
- 667 59. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and
668 analysis. *J. Comput. Chem.* (2004) doi:10.1002/jcc.20084.
- 669 60. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular
670 structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2010)
671 doi:10.1107/S0907444909052925.
- 672 61. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta*

- 673 *Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* (2010) doi:10.1107/S0907444910007493.
- 674 62. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (2007)
- 675 doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
- 676 63. Ashkenazy, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize
- 677 evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res.* (2016)
- 678 doi:10.1093/nar/gkw408.
- 679 64. Buchan, D. W. A. & Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on.
- 680 *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.1093/nar/gkz297.
- 681 65. Patel, A. B. *et al.* Architecture of the chromatin remodeler RSC and insights into its
- 682 nucleosome engagement. *Elife* (2019) doi:10.7554/eLife.54449.
- 683 66. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. PRIMUS: A
- 684 Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.*
- 685 (2003) doi:10.1107/S0021889803012779.
- 686
- 687



688

689 **Figure 1. Cryo-EM structure of the etoposide-poisoned DNA-binding/cleavage domain.** **a.** Schematic
 690 representation of the hTop2 α DNA-binding/cleavage domain. **b.** Cryo-EM structure of the DNA-
 691 binding/cleavage domain in State 1 solved at 4.2Å resolution. The structure is colored as in **a**, the DNA is
 692 colored in blue and a visible fragment of the CTD is colored in magenta. **c.** Near-atomic resolution features of
 693 the 4.2Å cryo-EM map. The 30bp DNA and the corresponding EM density are shown in the upper part. An alpha
 694 helix with well-resolved side chain densities of aromatic and basic residues is shown on the left. Beta-strands
 695 with well-resolved side chain densities of aromatic and basic residues are shown on the right. **d.** EM density
 696 around etoposide and the intercalated DNA bases is shown. The +1 position is not phosphorylated to trap the
 697 DNA-bound hsTop2 α in a cleavage complex-like state.



698

699

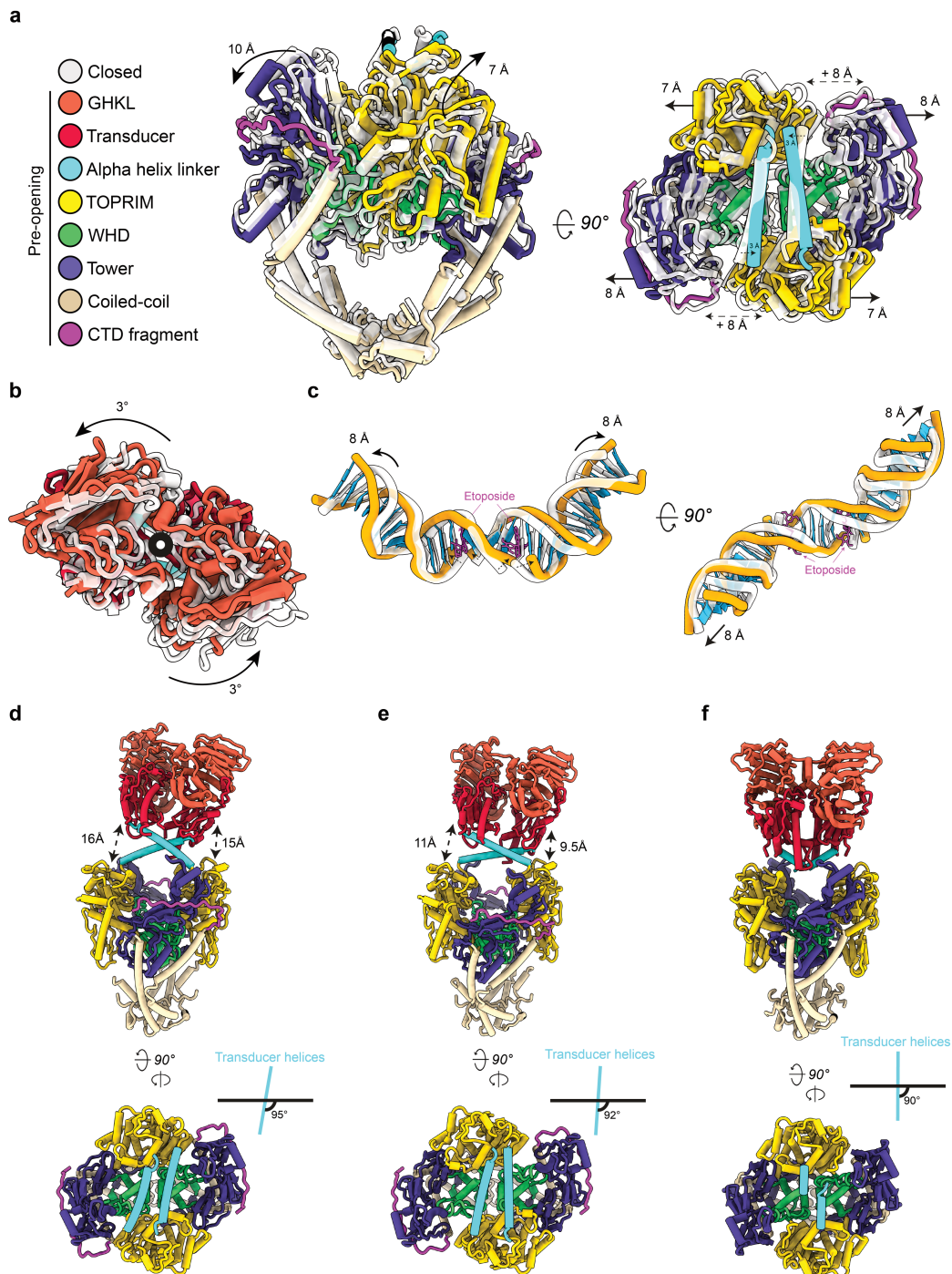
700

701

702

703

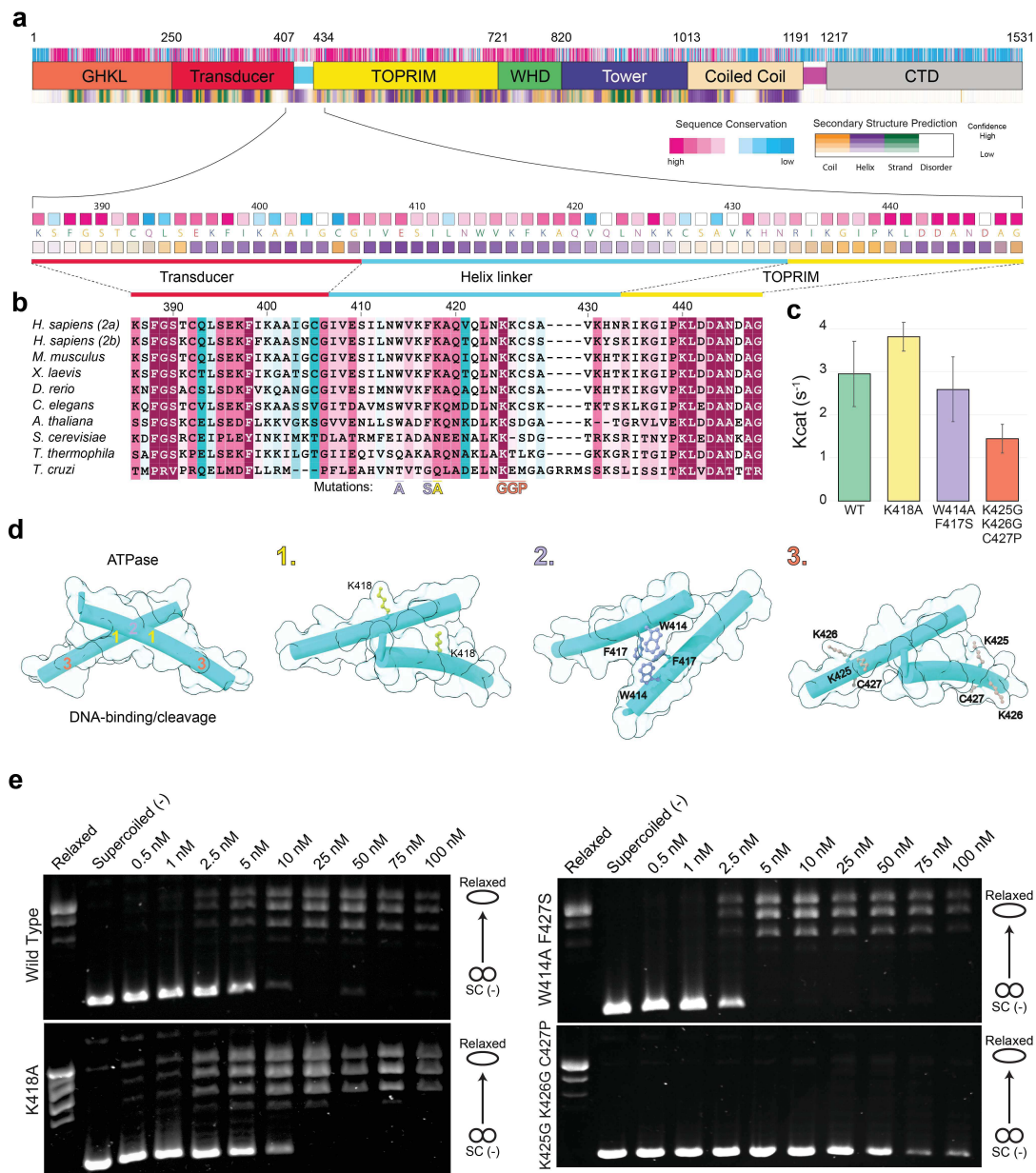
Figure 2. Molecular model of the DNA-bound Human Top2 α . **a.** Schematic representation of the hTop2 α domains. Human Top2 α is composed of two identical subunits assembling in an active homodimeric form. **b.** Composite cryo-EM map of the full Human Top2 α with DNA-gate in State 1. **c.** Atomic model fitted inside the cryo-EM map. Each domain is coloured as in **a.** **d.** Atomic model of the full human Top2 α with the same colour coding .



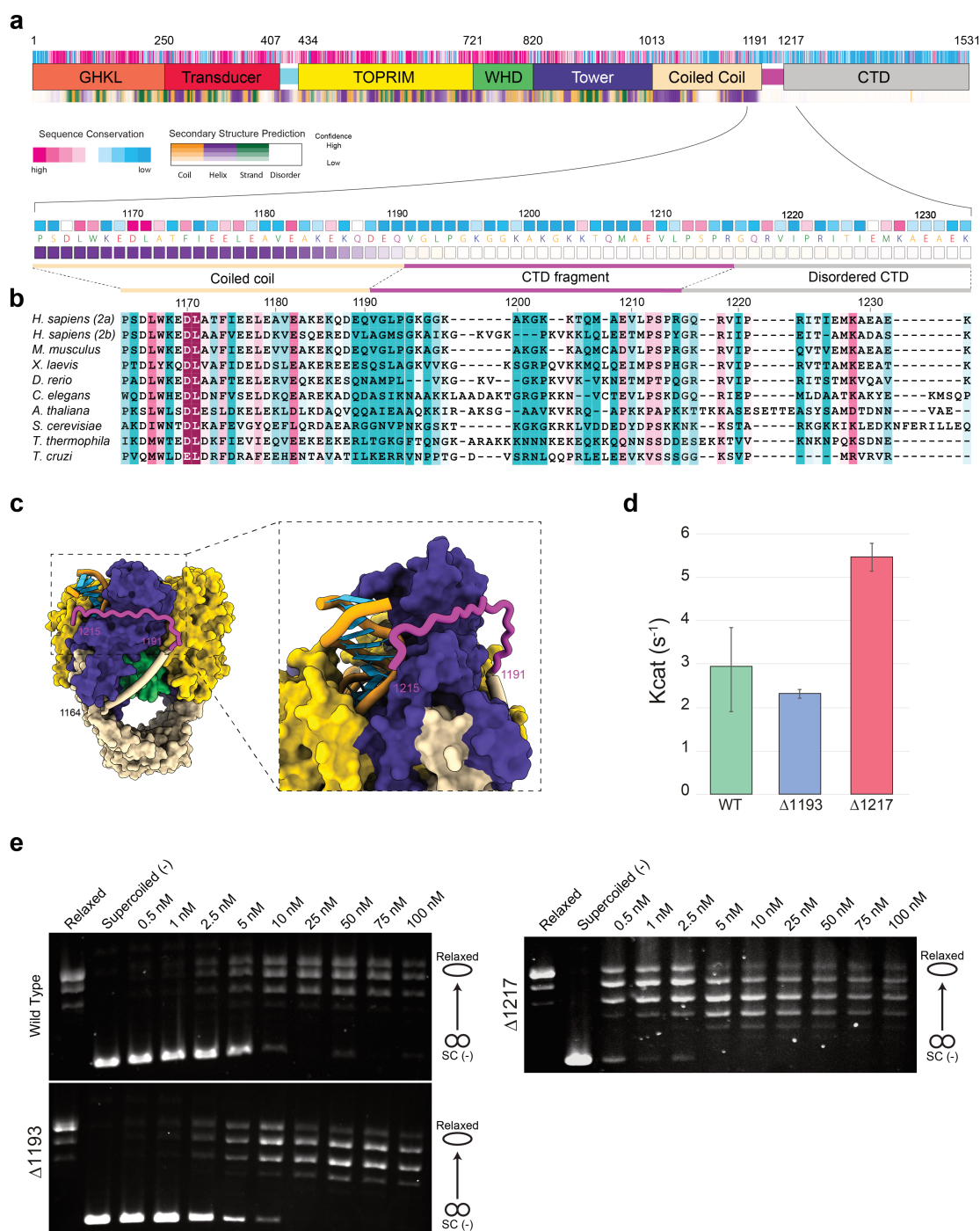
704

705 **Figure 3. Structural changes associated with G-segment opening and allosteric connections between the N-**
 706 **and DNA-gates. a.** Superimposition of DNA-binding/cleavage domain structures in State 1 (closed) (grey) and
 707 State 2 (pre-opening) (colored based on the legend). TOPRIM domain and Tower domain are moving away from
 708 8 Å in the pre-opening state. **b.** A 3° rotating movement of the ATPase domain (opposite to the intertwinning) is
 709 observed during the transition from closed to pre-opening conformation of the DNA-gate. **c.** During the
 710 transition, the DNA is unwound and stretched by 8 Å. **d.** hTop2α with DNA-gate in closed state: the ATPase

711 domain is bent by $\sim 5^\circ$ with respect to the vertical axis and also by $\sim 5^\circ$ in the orthogonal plane, positioning the
712 ATPase domain at a distance of $\sim 15\text{\AA}$ of the DNA-gate (top). The ATPase domain transducer alpha-helices in
713 cyan form a $\sim 95^\circ$ angle with the DNA-gate (bottom). e. hTop2 α with DNA-gate in pre-opening state: the
714 ATPase domain is bent by $\sim 8^\circ$ with respect to the vertical axis and also by $\sim 5^\circ$ in the orthogonal plan,
715 positioning the ATPase domain at a distance of $\sim 10\text{\AA}$ of the DNA-gate (top). The ATPase domain transducer
716 alpha-helices in red form a $\sim 92^\circ$ with the DNA-gate (right). f. Yeast Top2 with DNA-gate in closed state: the
717 ATPase domain is straight in both orthogonal plans, positioning the ATPase domain in close contact with the
718 DNA-gate (top). The ATPase domain transducer alpha-helices in red form a $\sim 90^\circ$ with the DNA-gate (bottom).



719 **Figure 4. Analysis of the hTop2a allosteric regulation mediated by the linker connecting the N-gate to the**
 720 **DNA-gate. a.** Domain organization, sequence conservation and secondary structure prediction for hTop2a.
 721 Below is a zoom view of the linker joining N-gate to DNA-gate showing the sequence at a residue level. **b.**
 722 Multiple sequence alignment focused on the linker region. Only 10 model organisms species of out of the 41
 723 species used to calculate the sequence conservation are displayed. **c.** ATP hydrolysis activity of the wild-type,
 724 K418A, W414A-F417S and K425G-K426G-C427P hTop2a. Kcat was measured in triplicates at 37°C with 1mM
 725 ATP in presence of 6nM linear DNA (pUC19). **d.** Spatial localization of the mutated residues on the linker
 726 joining N-gate to DNA-gate. **e.** Relaxation activity of the wild-type, K418A, W414A-F417S and K425G-
 727 K426G-C427P hTop2a. Protein concentrations are listed in nM of holoenzyme.



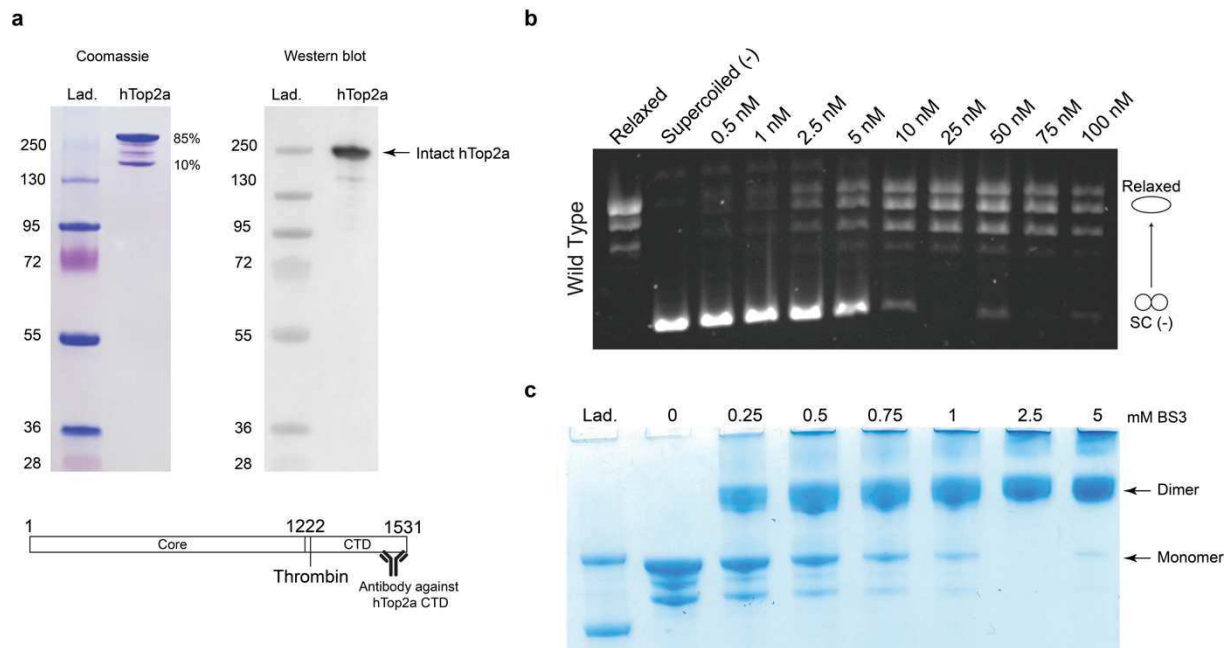
728 **Figure 5. Analysis of the connection between the DNA gate and the CTD domain.** **a.** Domain organization,
 729 sequence conservation and secondary structure prediction for hTop2 α . Below is a zoom view of the CTD
 730 fragment visible in the EM reconstruction showing the sequence at a residue level. **b.** Multiple sequence
 731 alignment focused on the CTD fragment region. Only 10 model organisms species of out of the 41 species used
 732 to calculate the sequence conservation are displayed. **c.** Orthogonal views of the DNA-binding/cleavage domain
 733 in closed state. The CTD domain is highlighted in magenta. The inset shows a zoom on the region of the CTD
 734 which comes in close vicinity of the DNA G-segment. **d.** ATP hydrolysis activity by wild-type, $\Delta 1193$ and

735 $\Delta 1217$ hTop2 α . Kcat was measured in triplicates at 37°C with 1mM ATP in presence of 6nM linear DNA
736 (pUC19) e. Comparison of relaxation activity by wild-type, $\Delta 1193$ and $\Delta 1217$ hTop2 α . Protein concentrations
737 are listed in nM of holoenzyme.

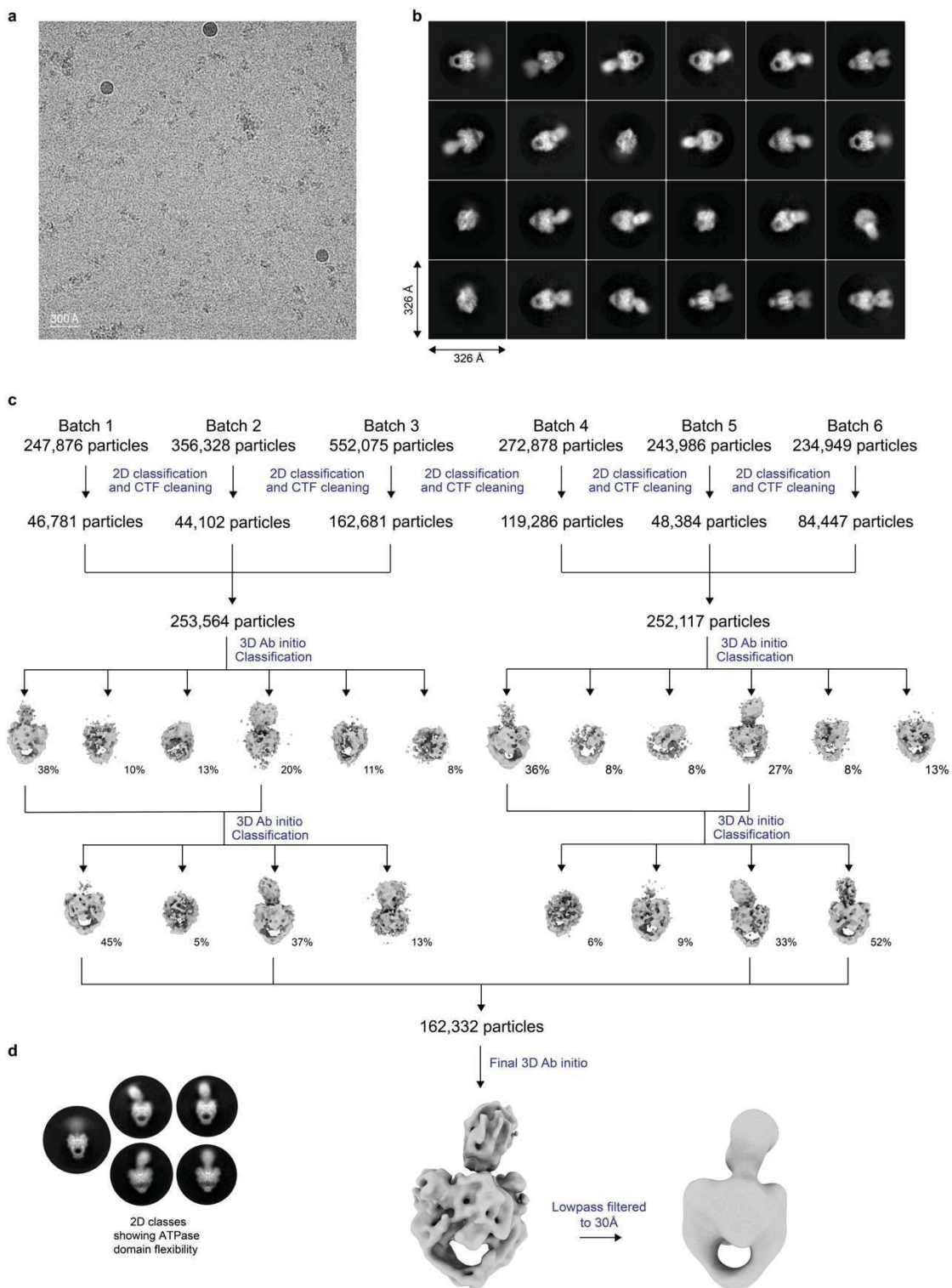
Supplementary Information

Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α

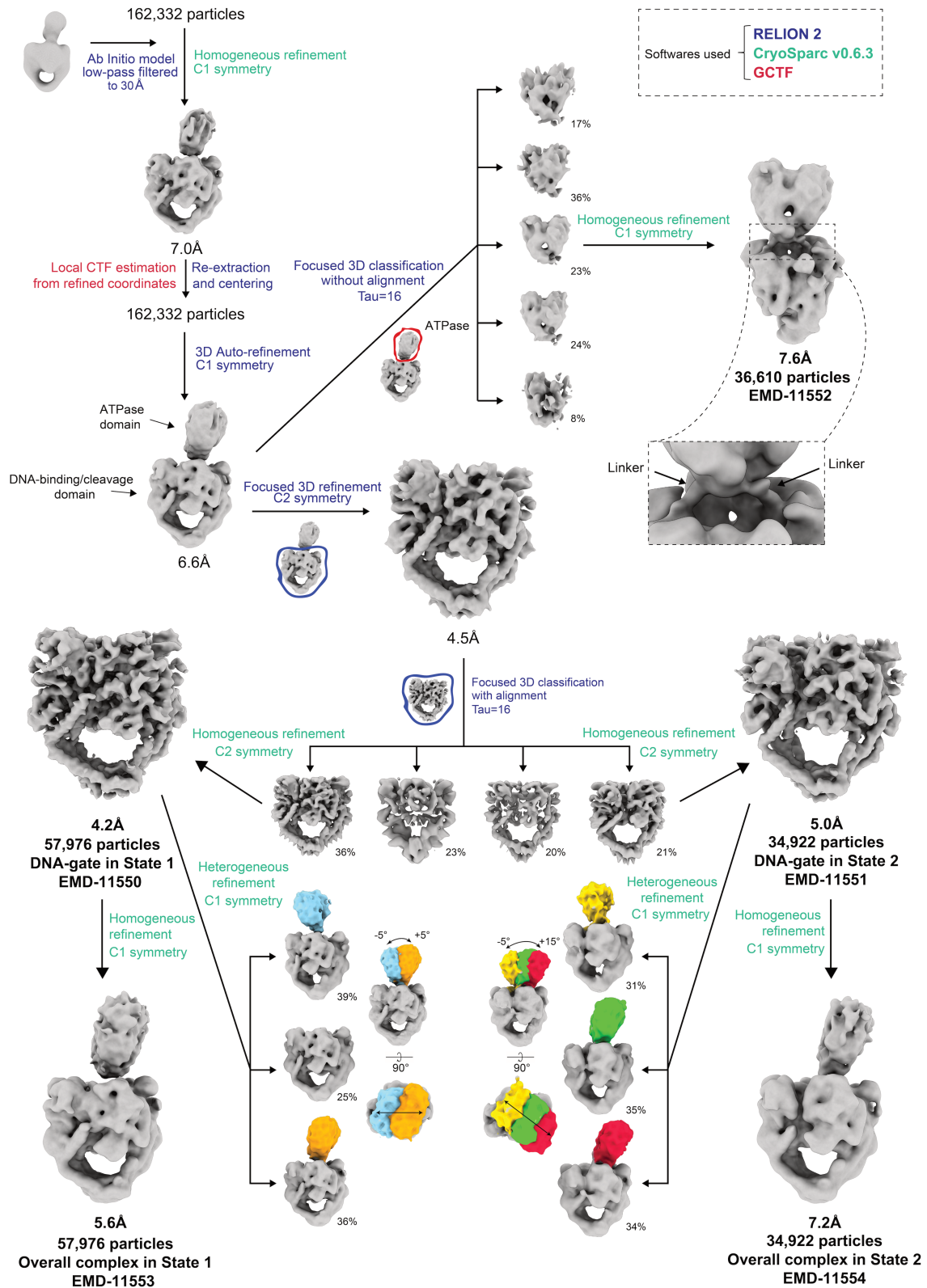
Arnaud Vanden Broeck, Christophe Lotz, Robert Drillien, Claire Bedez and Valérie Lamour



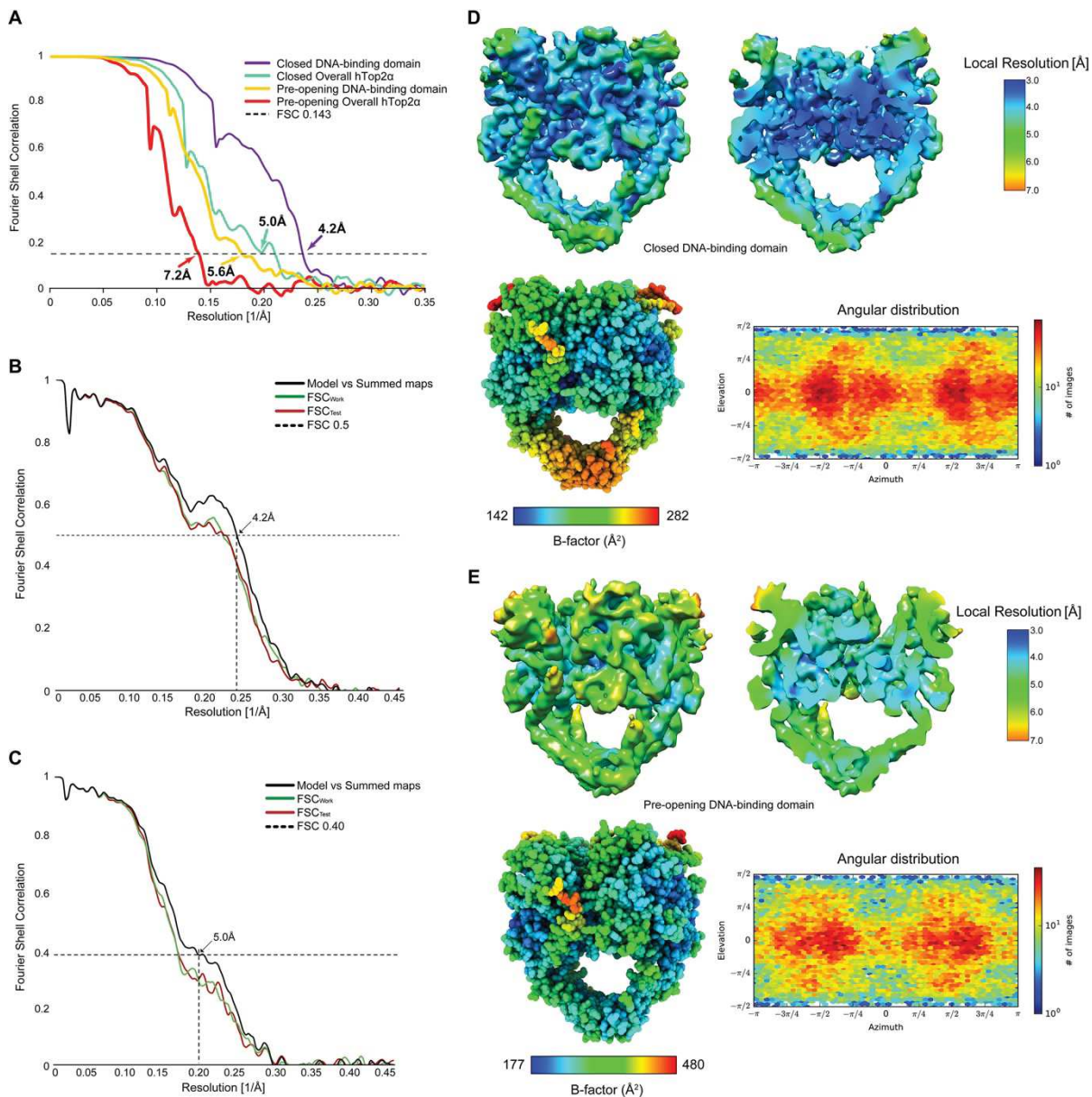
Supplementary Fig. 1. Purification and stabilization of the hTop2α. **a.** SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified hTop2α. Coomassie staining is shown on the left. Western blot analysis using a monoclonal antibody directed against the hTop2α CTD is shown on the right. During the protein preparation, the CTD is cleaved off in 10 to 15% of the sample. **b.** Relaxation activity by wildtype hTop2α. Protein concentrations are listed in nM of holoenzyme. **c.** Titration of BS3 for stabilization of the DNA-bound hTop2α homodimer. Formation of the full-length complex can still be obtained from the predominant species in presence of DNA and after crosslinking with BS3.



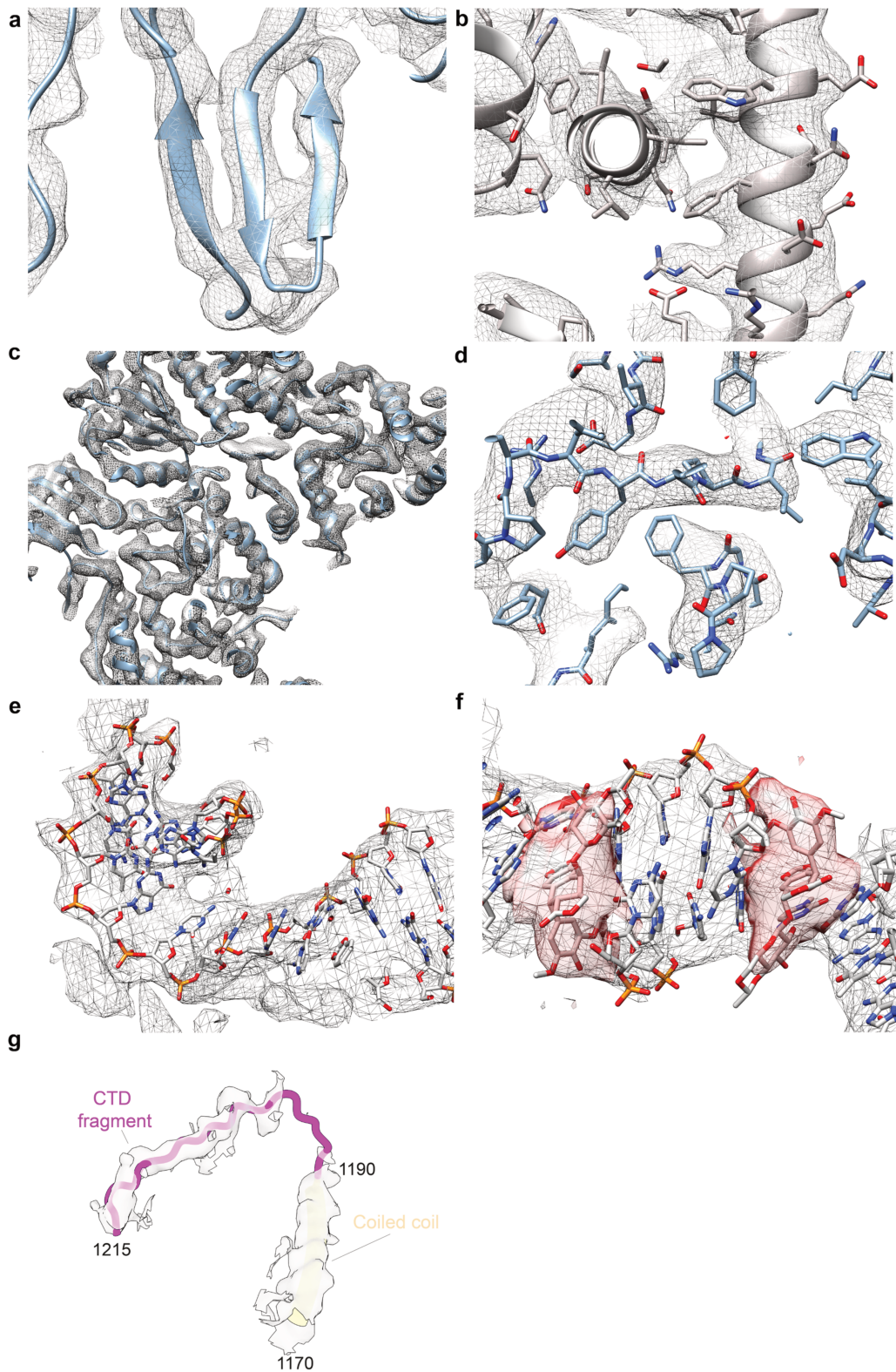
Supplementary Fig. 2. Cryo-EM data acquisition and *ab-initio* model generation. **a.** A typical Cryo-EM micrograph collected on a FEI Titan Krios microscope operated at 300 kV and detected with a Gatan K2 Summit camera. **b.** Reference-free 2D classification. **c.** Flow chart of data processing from 2D classification to *ab-initio* model generation. The number of particles is indicated at each step. **d.** Subset selection of 2D classes showing the flexibility of the ATPase domain with respect to the DNA-binding/cleavage domain.



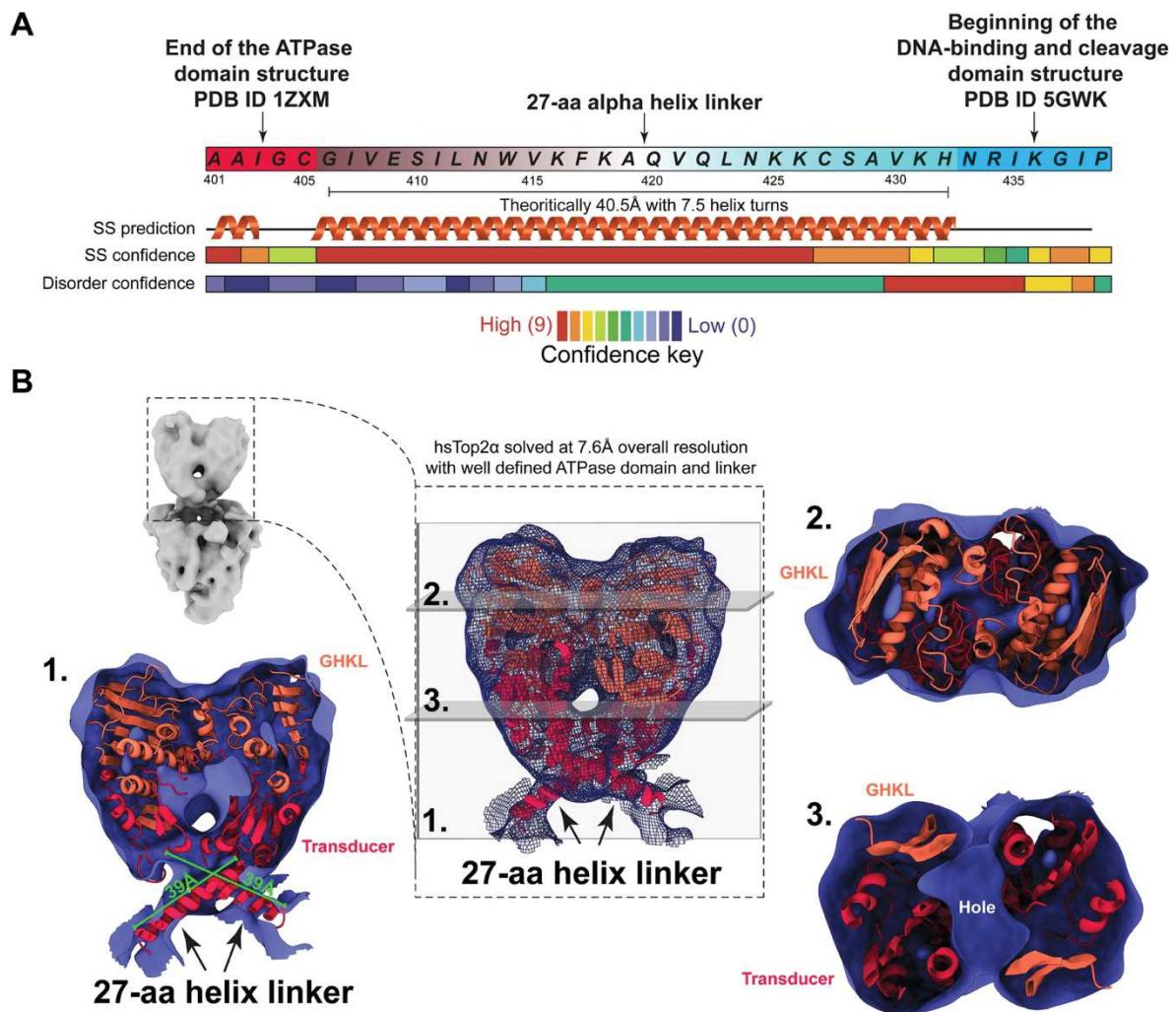
Supplementary Fig. 3. Flow chart of cryo-EM data processing. The *ab-initio* model was refined in cryoSPARC yielding a map of 6.6Å overall resolution using 162,332 particles. Focused 3D classification with and without alignment followed by Homogeneous refinement allowed us to solve 4 new structures: the DNA-binding/cleavage core in a closed state at 4.2Å resolution and in a pre-opening state at 5.0Å resolution, the overall complex in a closed state at 5.6Å resolution and the overall complex in pre-opening state at 7.2Å resolution. The number of particles used for the final refinement is indicated.



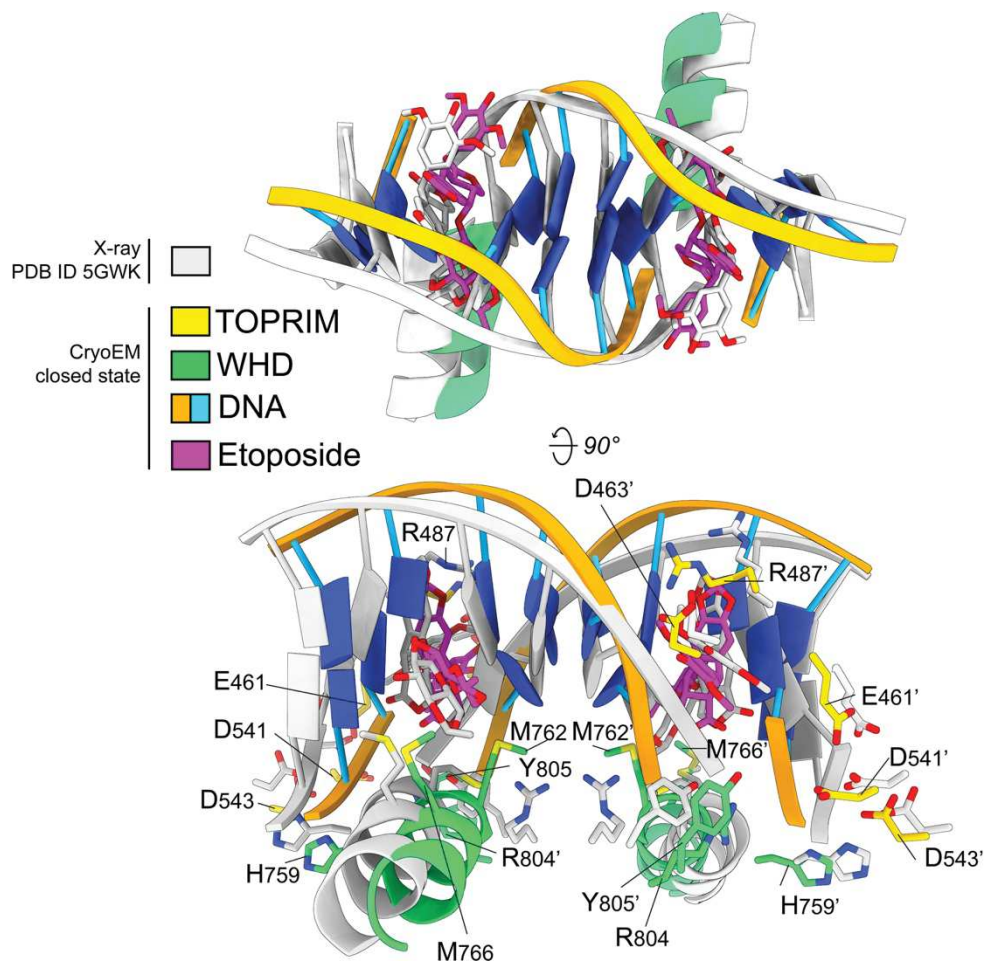
Supplementary Fig. 4. Cryo-EM statistics of the overall DNA-bound hTop2 α and DNA-binding/cleavage domain in closed and pre-opening states. **a.** FSC plots and resolution estimation using the gold-standard 0.143 criterion generated from RELION2. Cross-validation FSC curves for the closed (**b**) and pre-opening (**c**) DNA-binding/cleavage domain models versus unfiltered half maps (the one used in the refinement, FSC_{work} , and the other half, FSC_{free}) and the unfiltered summed maps. Final refined map of the closed (**d**) and pre-opening (**e**) DNA-binding/cleavage domain. The maps (upper left) and sliced maps (upper right) are coloured according to local resolution calculated with Blocres. The atomic models refined in the corresponding cryo-EM maps (lower left) are colored according to the B-factors. The angular distribution plots (lower right) were generated from cryoSPARC.



Supplementary Fig. 5. Near-atomic resolution features of the DNA-binding/cleavage domain in closed conformation. **a.** Beta strands individualization. **b.** Alpha helices with well-defined EM density of the side chains. **c.** Overview of an atomic model region fitted in the EM density. **d.** Aromatic residues with well-defined EM density. **e.** G-segment fitted in the EM density. **f.** EM density of etoposide in red. **g.** EM density of the CTD linker (magenta line, residues 1191-1215).

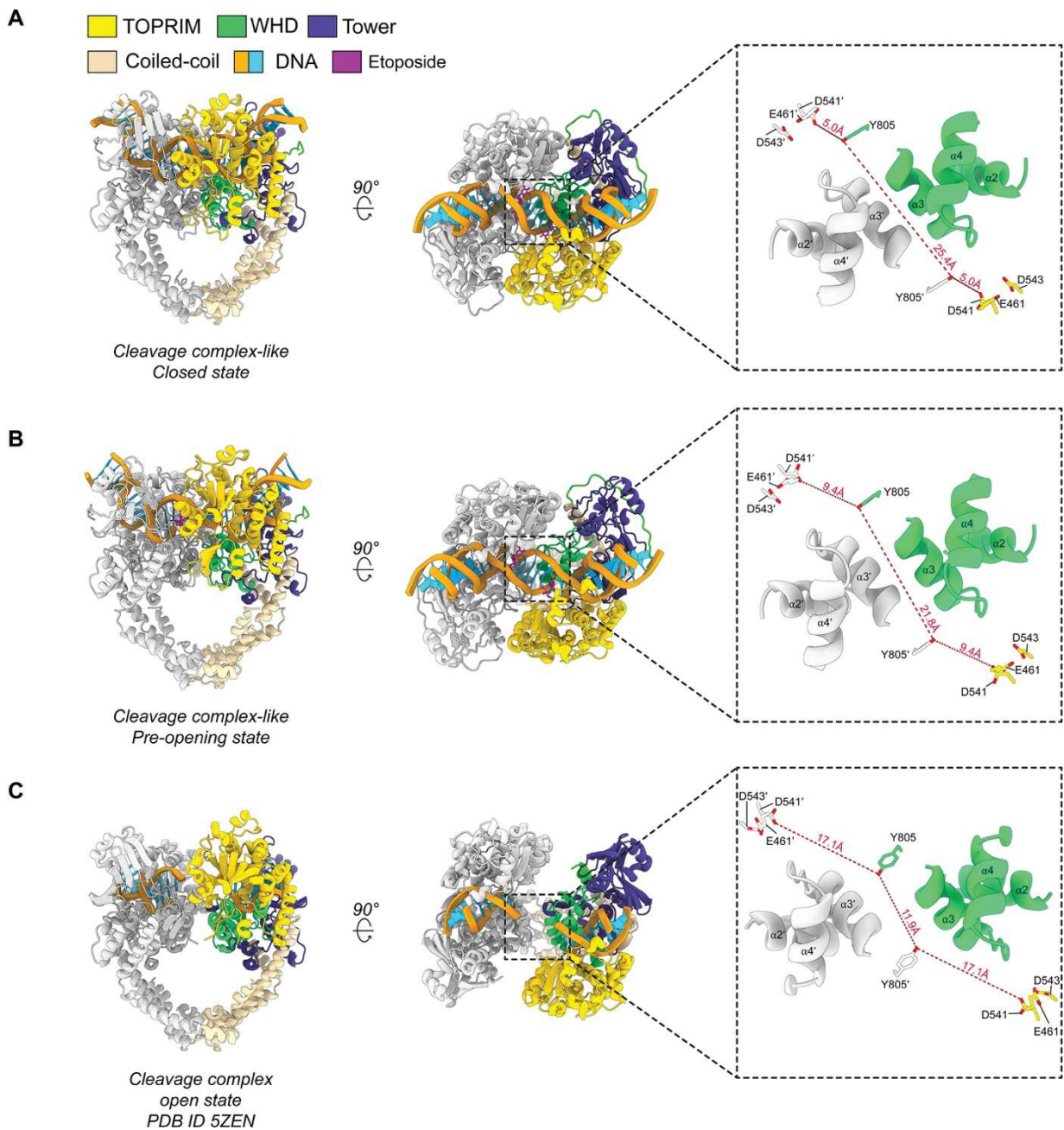


Supplementary Fig. 6. Building of the 27-aa linkers between the N-gate and the DNA gate. **a.** The 27-aa linkers are predicted to fold as an alpha helix based on secondary structure prediction performed with Phyre2¹. The theoretical length of a 27-aa alpha helix is 40.5Å with 7.5 turns, considering that an alpha helix has 3.6 residues per turn and a pitch length of 5.4Å. **b.** After fitting of the functional domains in the EM density, the distance between the last residue of the ATPase domain, C405, (PDB ID 1ZXM) and the first residue of the DNA-binding/cleavage domain, N433, is 39Å. To accommodate such distance with the missing 27-aa, the linkers were built as alpha helices accordingly to the secondary structure prediction and the EM density map. The 3 views of the ATPase domain through different slices of EM density (7.6 Å resolution) show an overall good fit of the atomic model in the map.



Supplementary Fig. 7. Comparison of etoposide binding sites of cryo-EM and X-ray hTop2 α structures.

Slight rearrangement of the protein structure and DNA bases in the EM structure, compared to the X-ray structure, yielded to a minor shift of the etoposide in the binding site during refinement to avoid steric clashes. Structures are colored as indicated in the legend.



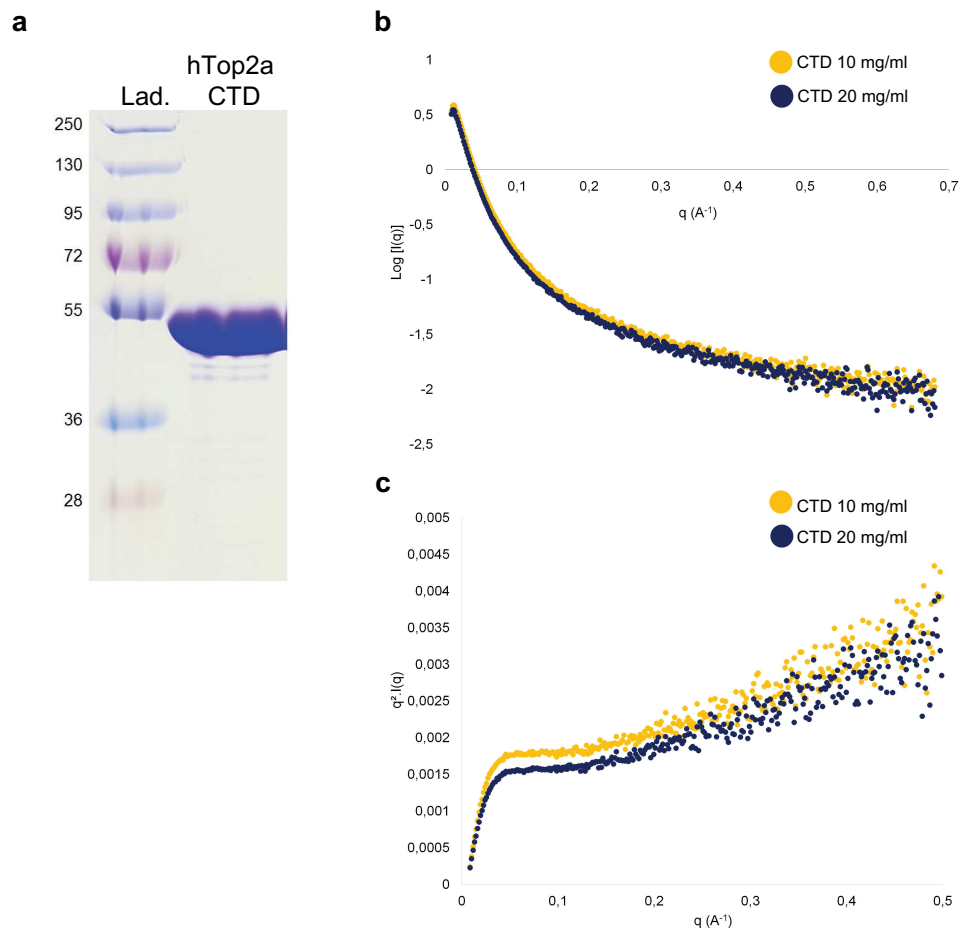
Supplementary Fig. 8. Quaternary and tertiary changes associated with G-segment opening after cleavage.

Orthogonal views of the hTop2 α DNA-binding/cleavage core in different states. The inset show selected structural elements (alpha helices α_2 , α_3 and α_4) lining the bottom side of the G-segment groove and key catalytic amino acids in the closed cleavage complex-like (CC-like) (a), pre-opening CC-like (b) and open CC (c) ². For each conformation, the catalytic tyrosine residues, the cation-binding residues and the distances between the two catalytic residues and the closer aspartic acid residue of the Dx/D dyad are shown to illustrate structural changes in the DNA-gate during closed-to-open transitions. See legend on the top for the color code.

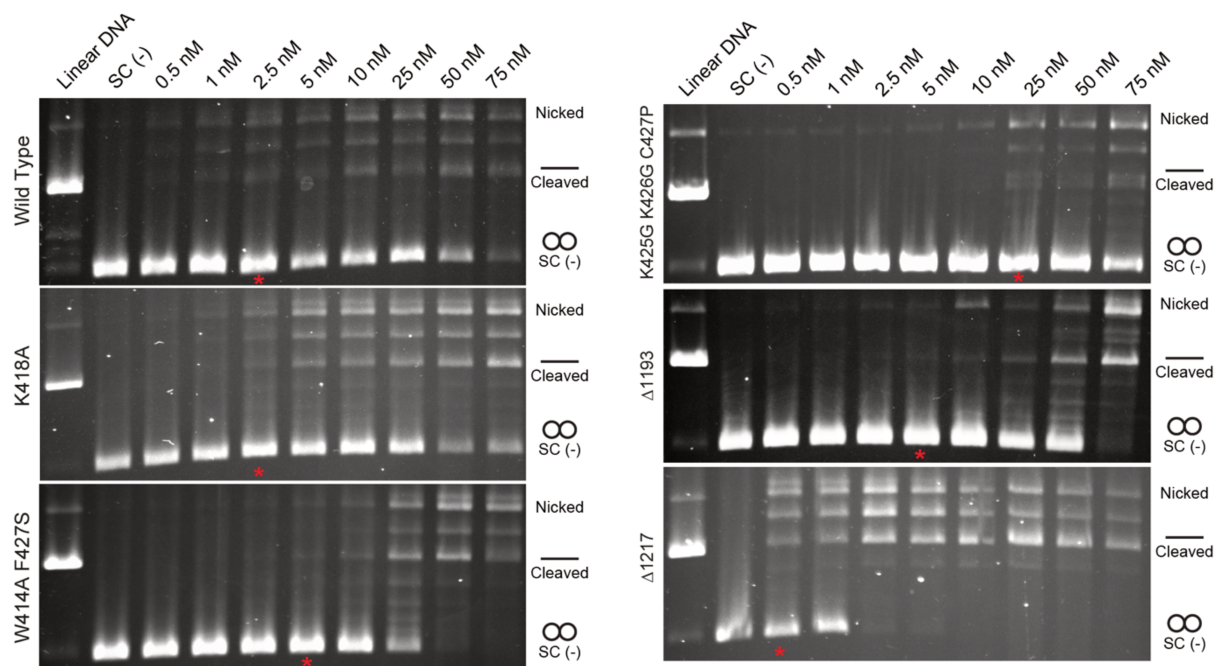
Residues from different homodimer are colored differently, with labels belonging to the second homodimer marked by a prime.

Supplemental analysis related to Supplementary Fig. 8

The main conformational changes are observed in the DNA-gate, while the ATPase domain is more prone to rotations and translational movements to accompany the DNA-gate motions (Figure 3). During this conformational transition, the two alpha helices α_3 and α_3' of each homodimer slide against each other by half helix turn yielding the catalytic tyrosine residues rapprochement by 3.6 Å. As the TOPRIM domain performs a swinging outward movement, the DxD di-acidic metal ion-binding motif recede by 4.4 Å from the catalytic tyrosine residues, decoupling the key catalytic residues which disfavor the religation of cleaved DNA ends (Supplementary Fig. 8a-b). Concomitantly to the motion of the DNA-Gate, the dimerized ATPase domain is rotating by 3° counterclockwise (opposite to the intertwining) and is coming closer to the DNA-gate in order to push the T-segment in the newly formed groove between the TOPRIM and tower domains (Figure 3). These two states of the DNA-gate precede the open conformation². In particular, the two alpha helices α_3 and α_3' of each homodimer have slid against each other by one helix turn, bringing closer the catalytic tyrosine residues. The DxD dyads are now far from the tyrosine residues and follow the sliding and swiveling motion of the DNA-gate (Supplementary Fig. 8c).



Supplementary Fig. 9. SAXS analysis of the hTop2 α CTD. **a.** SDS-PAGE analysis of the purified hTop2 α CTD (1191-1531) **b.** Experimental SAXS curves of the CTD at 10 mg/ml (yellow) and 20 mg/ml (blue). **c.** Kratky plot demonstrating the absence of fold of the CTD.



Supplementary Fig. 10. DNA Cleavage assays. Comparison of cleavage activity in presence of 250 μ M etoposide of wild-type, K418A, W414A-F417S and K425G-K426G-C427P, Δ 1193 and Δ 1217 hTop2 α . Protein concentrations are listed in nM of holoenzyme. The asterisks indicate the lowest concentration at which a cleavage band is observed.

Data Collection						
Microscope	Titan Krios					
Voltage (keV)	300					
Magnification	105,000					
Electron dose (e ⁻ Å ⁻²)	50					
Detector	Gatan K2 Summit (super-resolution mode)					
Pixel Size (Å)	1.1 (0.55)					
Defocus range (µm)	-1 to -3					
Individual data sets						
Batches	1	2	3	4	5	6
Micrographs (no.)	2299	2230	3128	2348	1553	1926
Extracted particles (no.)	247,876	356,328	552,075	272,878	243,986	234,949
Particles after cleaning (2 rounds of 2D classification, MaxRes<5Å)	46,781	44,102	162,681	119,286	48,384	84,447
Merged data sets for refinement						
Total merged particles	505,681					
Particles after cleaning (2 rounds of 3D ab initio classification)	162,332					
Reconstructions						
	DNA-binding/cleavage domain in state 1	DNA-binding/cleavage domain in state 2	Overall complex in state 1	Overall complex in state 2		
	EMD-11550	EMD-11551	EMD-11553	EMD-11554		
	PDB 6ZY5	PDB 6ZY6	PDB 6ZY7	PDB 6ZY8		
Software	cryoSPARC v0.6.3					
Final particles (no.)	57976	34922	57976	34922		
Box size (pixels)	296x296x296					
Symmetry imposed	C2	C2	C1	C1		
Map resolution FSC 0.143 (global) (Å)	4.22	5.04	5.56	7.18		
Applied B-factor for sharpening (Å ²)	-165	-295	-107	-161		
Model refinement						
Software	Phenix 1.12					
Resolution cut-off (Å)	4.2	5.0	5.6	7.2		
Non-hydrogen atoms	13510	13510	19985	19980		
Protein residues	1520	1520	2319	2318		
DNA bases (atoms)	1218	1218	1218	1218		
Ligands (atoms)	84	84	146	146		
Average B-factor	190	264	635	762		
R.m.s. deviations						
Bond lengths (Å)	0.004	0.004	0.004	0.004		
Bond angles (°)	0.832	0.834	0.890	0.901		
Validation						
Real space correlation coefficient	0.83	0.84	0.79	0.73		
MolProbity score	1.61	1.54	1.37	1.54		
Clashscore (all atoms)	6.47	6.77	6.70	7.41		
Poor rotamers (%)	0.15	0	0	0		
Ramachandran plot						
Favored (%)	96.23	97.09	98.05	97.27		
Allowed (%)	3.77	2.91	1.95	2.73		
Outliers (%)	0	0	0	0		

Supplementary Table 1. Data collection, processing and refinement statistics.

13bp	GAGGATGACGATG
17bp	CGCGCATCGTCATCCTC

Supplementary Table 2. Asymmetric oligonucleotides sequences.

Primer name	Sequence
hTop2a-K418A-fw	AAGCATACTAAACTGGGTGAAGTTTGCGGCCCAAGTCCAG
hTop2a-K418A-rev	CTGGACTTGGGCCGCAAACCTTCACCCAGTTTAGTATGCTT
htop2A-W414A-F417S-fw	GTGGTATTGTAGAAAGCATACTAAACGCGGTGAAGAGTAAGGCCCAA GTCCAG
htop2A-W414A-F417S-rev	CTGGACTTGGGCCTTACTCTTCACCGGTTTAGTATGCTTTCTACAATA CCAC
hTop2a-KKC425GGP-fw	GGTGAAGTTTAAGGCCCAAGTCCAGTTAAACGGGGGGCCTTCAGCTGT AAAACATAATAGAATCAAGGGA
hTop2a-KKC425GGP-rev	TCCCTTGATTCTATTATGTTTTACAGCTGAAGGCCCGTTTAACTGG ACTTGGGCCTTAAACTTCACC
hTop2a-Delta1193-fw	GATGAACAAGTCGGACTTGAAGTTCTGTTCCAGGGG
hTop2a-Delta1193-rev	CCCCTGGAACAGAACTTCAAGTCCGACTTGTTTCATC
hTop2a-Delta1217-fw	GCCTTCTCCGCGTGGTCTGGAAGTTCTGTTCC
hTop2a-Delta1217-rev	GGAACAGAACTTCCAGACCACGCGGAGAAGGC

Supplementary Table 3. Primer sequences used for the plasmids mutagenesis.

Protein name	Organism	Uniprot ID
TOP2	<i>Aedes albopictus</i>	A0A023EXD7
TOP2A	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	G1LN78
TOP2A	<i>Anas platyrhynchos</i>	U31FZ2
TOP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P30182
TOP2	<i>Ascaris suum</i>	F1KQV5
TOP2	<i>Biomphalaria glabrata</i>	A0A2C9K2L3
TOP2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q23670
TOP2	<i>Callorhinchus milii</i>	A0A4W3J3D7
TOP2A	<i>Cavia porcellus</i>	H0V8L7
TOP2	<i>Ciona intestinalis</i>	F7AKG2
TOP2	<i>Crassostrea gigas</i>	K1Q404
TOP2A	<i>Danio rerio</i>	Q6DRC7
TOP2	<i>Daphnia magna</i>	A0A165ADD4
TOP2	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Q55BP5
TOP2	<i>Drosophila melanogaster</i>	P15348
TOP2	<i>Echinococcus granulosus</i>	W6UGB7
TOP2A	<i>Gallus gallus</i>	O42130
TOP2B	<i>Gallus gallus</i>	O42131
TOP2A	<i>Homo sapiens</i>	P11388
TOP2B	<i>Homo sapiens</i>	Q02880
TOP2A	<i>Latimeria chalumnae</i>	H3ALH9
TOP2	<i>Loa loa</i>	A0A117VLJ5
TOP2A	<i>Loxodonta africana</i>	G3UIA0
TOP2A	<i>Monodelphis domestica</i>	F7ABY1
TOP2A	<i>Mus musculus</i>	Q01320
TOP2B	<i>Mus musculus</i>	Q64511
TOP2	<i>Octopus bimaculoides</i>	A0A0L8FFS9
TOP2A	<i>Ophiophagus hannah</i>	V8P300
TOP2A	<i>Pelodiscus sinensis</i>	K7F361
TOP2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P06786
TOP2A	<i>Sarcophilus harrisii</i>	G3WFK3
TOP2	<i>Sarcoptes scabiei</i>	A0A132ALV4
TOP2	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	W4XMF6
TOP2	<i>Stylophora pistillata</i>	A0A2B4S1C7
TOP2	<i>Tetrahymena thermophila</i>	Q6PUA4
TOP2	<i>Trypanosoma cruzi</i>	P30190
TOP2A	<i>Tursiops truncatus</i>	A0A2U4BNZ1
TOP2B	<i>Tursiops truncatus</i>	A0A2U4CFF8
TOP2A	<i>Xenopus laevis</i>	Q6INT0

Supplementary Table 4. Uniprot sequence ID of the homologs used for the multiple sequence alignments.

Supplementary References

1. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).
2. Chen, S. F. *et al.* Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II DNA-gate. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-05406-y.

2.2. Discussion

Au terme de ce projet, la première structure de la topoisomérase de type II α entière en complexe avec de l'ADN et la molécule «poison» étoposide a été obtenue. La structure permet de visualiser le domaine de liaison à l'ADN en conformation fermée et pré-ouverte avec une résolution globale respective de 5,6 Å et 7,2 Å. La résolution structurale du corps catalytique est de respectivement 4,2 Å pour la conformation fermée et 5,0 Å pour la conformation semi-ouverte. L'obtention de la structure du corps catalytique entier, a permis de mettre en lumière les arrangements moléculaires entre les deux domaines dont il est composé. Les éléments structuraux qui font la connexion entre les deux domaines appartiennent au domaine Transducer. D'après les prédictions de structure secondaire, ces éléments devraient adopter une structure en hélice α . La structure Cryo-EM obtenue a permis de confirmer cette prédiction et de construire ces éléments jusqu'alors pas visible dans les structures cristallographiques de domaines ATPase isolés. Ces hélices se croisent lorsque la protéine passe d'une conformation ouverte à une conformation fermée. Le rapprochement de ces deux hélices forme un patch hydrophobe constitué de résidus conservés chez les TopII α eucaryotes qui pourrait stabiliser la conformation fermée. Les analyses fonctionnelles que j'ai réalisées dans le cadre de ce projet ont montré que des mutations ponctuelles dans ce patch hydrophobe composé des résidus tryptophane et phénylalanine stimulent l'activité de relâchement, elles n'exercent cependant pas d'influence sur l'efficacité de la réaction d'hydrolyse de l'ATP ou de clivage de l'ADN. En revanche, la destruction des structures hélicoïdales rend impossible la réaction de relâchement de l'ADN et ralentit significativement la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Néanmoins, ce mutant empêchant le repliement en hélice est toujours capable de cliver l'ADN mais beaucoup moins efficacement que l'enzyme sauvage. Ces analyses montrent que ces hélices sont importantes pour la communication des mouvements allostériques entre les domaines du corps catalytique.

D'après les résultats obtenus, une densité électronique correspondant au début du CTD : la zone 1193 à 1217 a pu être mise en évidence. Le repliement structural de cette densité correspond à une boucle. Cette boucle commence au bout de la dernière hélice α connue à partir des structures cristallographiques du domaine catalytique, passe au travers d'une cavité en surface du domaine Tower et se place sous le segment G d'ADN. D'après notre structure, le CTD ne semble pas être orienté dans le même plan que le corps catalytique de l'enzyme mais orthogonal à celui-ci, ce qui diffère des topoisomérases de type II procaryotes comme l'ADN Gyrase ou la TopIV (**Figure 89**).

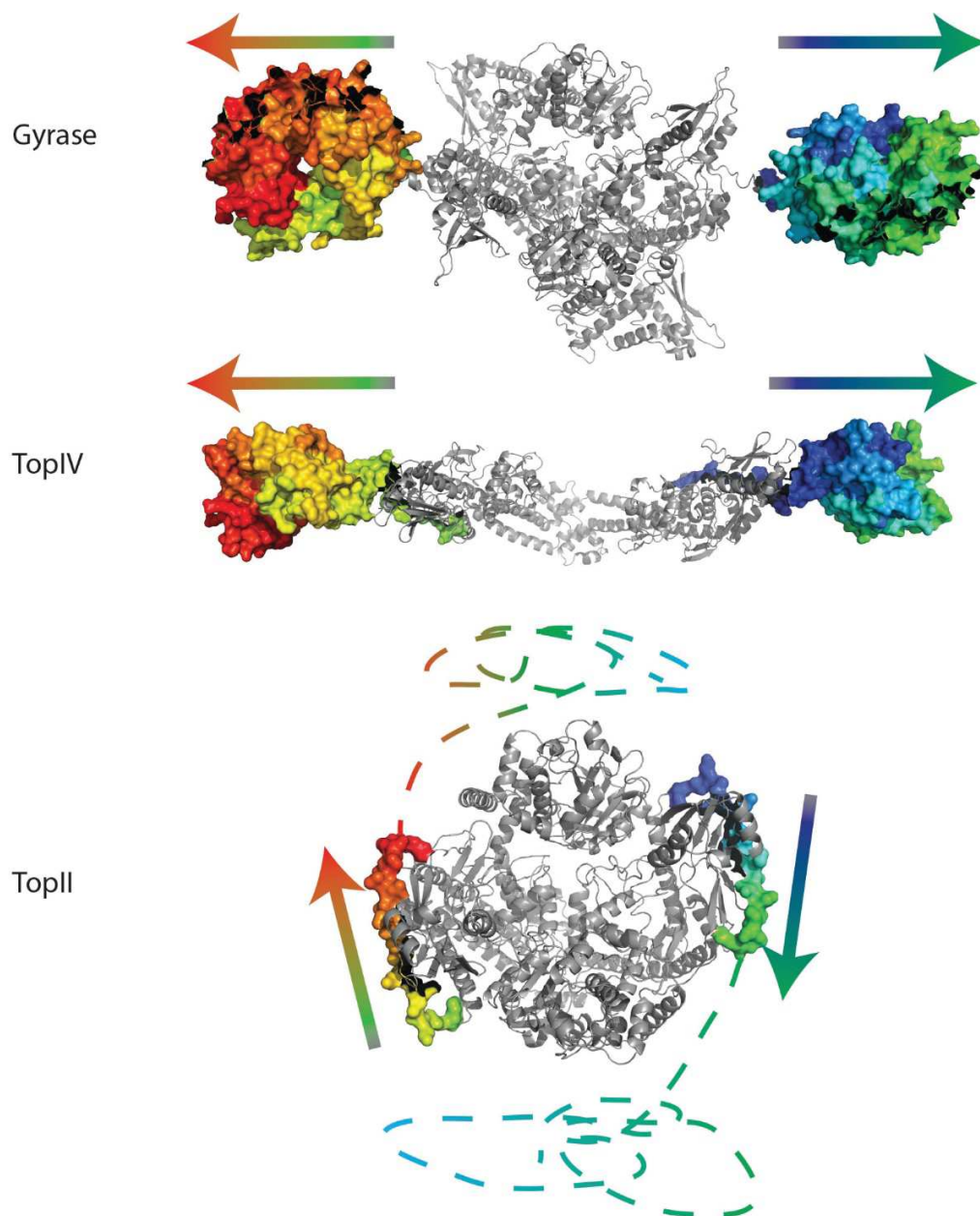


Figure 89 L'orientation et la structure des CTDs (en multicolore) est différent entre les Top2As procaryotes comme la TopIV ou la Gyrase et la Top2A eucaryote TopII α .

D'après les trois types de tests *in vitro* réalisés, la protéine tronquée de son domaine C-terminal à partir du résidu 1217 est significativement plus active que la protéine sauvage ou que la protéine tronquée à partir du résidu 1193. Ces résultats témoignent d'une fonction importante de cette connexion au domaine CTD qui n'a jamais été mise en évidence auparavant. L'autre résultat issu des tests d'activité est que l'on peut affirmer que le reste du CTD dans sa globalité contrebalance cet effet.

2.3. Perspectives

Les perspectives à ce projet sont multiples. En perspective, une des études complémentaires de ces travaux serait de **tester l'activité de décaténation**. Cette activité est importante lors de la ségrégation des chromosomes³²⁰. Une étude menée dans le laboratoire de Neil Osheroff montre que le mutant tronqué de son domaine CTD à partir du résidu 1175 présente une activité de relâchement de l'ADN similaire à celle de la protéine sauvage mais que l'activité de décaténation est inhibée⁷⁶. Il serait intéressant de déterminer si la portion du CTD visible sur les structures obtenues impacte ou non l'activité de décaténation. Cette information permettrait de savoir si ces résidus sont indispensables à la réaction et ainsi mieux comprendre les différences entre les mécanismes de relâchement et de décaténation.

Lors de l'analyse des PTMs, nous avons identifiées **la lysine 1196 comme site intéressant, étant donné qu'elle a été identifiée comme l'une des rares positions à être acétylée, SUMOylée et ubiquitinylée**. Avec les données structurales maintenant disponibles, nous avons situé ce résidu dans l'architecture complète de la TopII α . K1196 se situe au début de la connexion avec le CTD, juste après la dernière hélice α observable dans les structures cristallographiques. Il est probable au vue de la position de cette lysine que la présence d'un groupement SUMO, Ubiquitine ou Poly-ubiquitine impacterait les interactions stabilisant cette portion du CTD et par extension le CTD lui-même (**Figure 90**). Il semble difficile avec les outils actuels de « mimer » à des résidus spécifiques l'effet de grosses modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation ou la SUMOylation et de regarder leurs impacts structuraux et fonctionnels. Cependant, il serait intéressant de vérifier si ces peptides impactent la structure et la fonction de cette partie du CTD par leur simple présence.

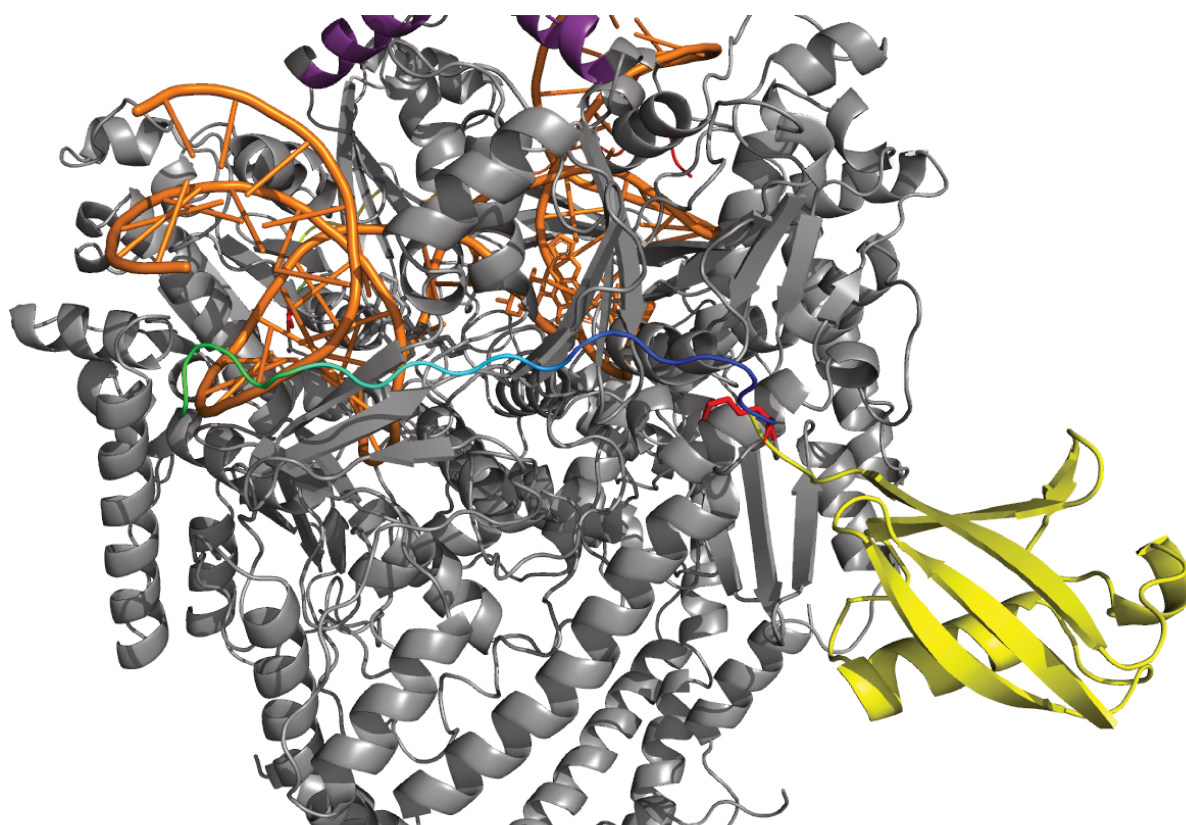


Figure 90 Position de la lysine 1196, colorée en rouge, sur la nouvelle région obtenue dans cette étude en multicolore. Le modèle obtenu montre que cette lysine d'un point de vue de l'encombrement peut être greffée d'un groupement SUMO ou Ubiquitine, coloré en jaune.

Dans cette zone correspondant au début du CTD se trouve la sérine 1213 (**Figure 92**). Cette sérine est un site de phosphorylation identifié lors de nos analyses en spectrométrie de masse^{170,267}. L'alignement de séquence entre les isoformes α et β montre que la phosphorylation est conservée chez les deux isoformes (**Figure 91**).

	1170	1180	1190		1200		1210		1220
<i>H. sapiens</i> (2a)	PSDLWKED	DLATFIEELEAVEAKEKQDEQVGLPGKGGK	-----	AKGK	--KTQM-	AEVLESPRGQ	--	RVIP	·
<i>H. sapiens</i> (2b)	PSDLWKED	DLAAFVEELDKVESQEREDVLAGMSGKAIKG	--KVVGK	---	PKVKKLQLEETMPS	PYGR	--	RIIP	·

Figure 91 Alignement de séquence TopII α [H.sapiens (2a)] et TopII β [H.sapiens (2b)] comprenant la fin du domaine catalytique (1163-1193 TopII α), le début du CTD observé dans la structure (1196-1217 TopII α) et la suite du domaine (1217-1224). La sérine 1213 de la TopII α sujette à une phosphorylation pour les deux isoformes est conservée (encadré en rouge).

De plus, elle a été identifiée dans de nombreuses études de protéomique d'après la base de données Phosphosite⁺ avec plus de 60 références. Par ailleurs, d'après l'alignement de séquence, l'équivalent du résidu 1213 de la TopII α chez la TopII β (S1231) a également été identifié comme site de phosphorylation. La phosphorylation de ce résidu a un impact sur la localisation

intracellulaire de la TopII α ^{114,321}. Cependant, aucune information sur le rôle catalytique de ce résidu n'est disponible à ce jour. Au vu de sa position dans les deux conformations et se trouvant à proximité avec l'ADN, **la détermination du rôle fonctionnel de la phosphorylation du résidu 1213 pourrait être une information cruciale pour la compréhension du fonctionnement de la TopII α .**

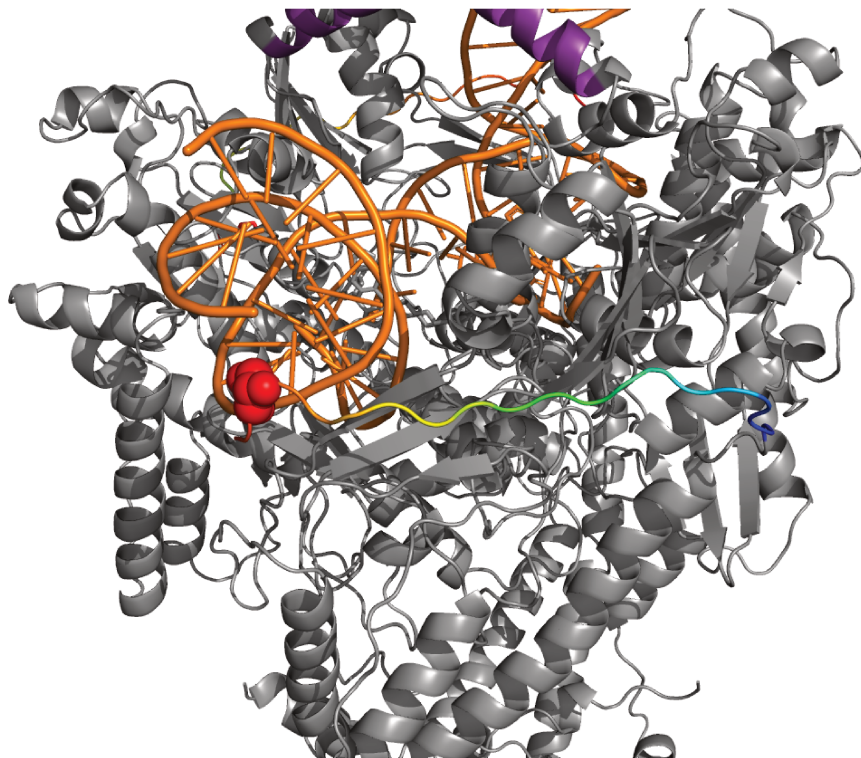


Figure 92 Position de la serine 1213 en sphère, colorée en rouge, sur la nouvelle région obtenue dans cette étude en multicolore.

Bien que cette structure apporte des résultats fondamentaux importants, d'autres informations structurales sont nécessaires pour comprendre comment la structure de cette protéine régule sa fonction. **En effet la position de la connexion menant au CTD a pu être révélée mais l'arrangement tridimensionnel de la majorité de ce domaine est encore inconnu.** Des études ont montré une implication du CTD dans la reconnaissance des supertours d'ADN^{74,77,80}. Les informations disponibles sur le rôle de ce domaine révèlent son importance dans les interactions de la TopII α avec la chromatine³²². Le CTD interagit avec les queues d'histones, notamment avec le variant d'histone H₂ApT^{120 115} et le variant H₃R²⁶me₂sK²⁷me₁²⁵⁶. Pour ce dernier variant, la région du CTD qui interagit avec l'histone H3 est connue sous le nom de «chromatin tether» composée des 30 derniers résidus de l'extrémité C-terminale.

Néanmoins ces interactions ont été déterminées par copurification (*pull-down*) avec des temps d'incubation qui sont importants. Il est donc important dans un premier temps de confirmer ces interactions *in vitro*. Des expériences de TCI (Titration Calorimétrique Isotherme) ont été réalisées par Arnaud lors de sa thèse pour quantifier l'interaction entre le CTDII α et le peptide d'histone H3 de l'étude de Lane et al.²⁵⁶. Malgré plusieurs adaptations de tampon il n'était pas possible d'observer l'interaction (voir page 275 de manuscrit de thèse d'Arnaud Vanden Broeck). Une possibilité qu'il faut encore tester serait de faire ces mêmes expériences avec un CTD phosphorylée pour déterminer si ces modifications régissent cette interaction. Un autre projet serait de créer un complexe TopII α -nucleosome. Les TopII α interagissent avec un ADN à proximité d'un nucléosome³²³. De plus, au sein du nucléosome sous sa forme métastable, le reversome, la topologie induite est le surenroulement positif³²⁴⁻³²⁶, substrat de choix pour la TopII α dont le CTD permettrait de distinguer le sens des surenroulements⁷⁸ (**Figure 93**).

Enfin disposant d'échantillons de CTD modifié et non modifié, il serait envisageable avec la spectrométrie de masse couplée à la réticulation (HDx-MS)³²⁷ de répondre à la question suivante : **les modifications post-traductionnelles présentes sur ce domaine influencent-elles l'interaction avec les queues d'histone ?**

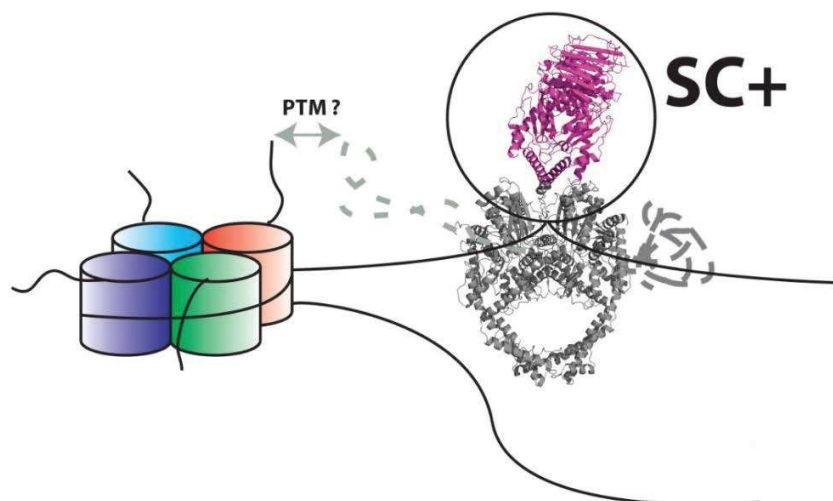


Figure 93 Modèle basé sur de nombreuses d'évidences que le CTD de la TopII α interagisse avec les queues d'histone et plus particulièrement avec les queues de H2 et H3 et que cette interaction dépend des PTMs présentes sur les deux partenaires^{115,256}.

La reconnaissance des supertours d'ADN par le CTD des TopII α humaines, indique que les derniers interagissent avec l'ADN. L'orientation de ces domaines diffère de celle des domaines de

Top2s procaryotes. Cette structure du complexe entier amène la question suivante : **Comment les CTD interagissent-ils avec le segment T d'ADN ?** La présence ou l'absence de ces domaines impacte l'activité globale de l'enzyme^{74,79,80}. D'un point de vue structural, ces domaines ne sont pas visibles dans les structures Cryo-EM ou cristallographiques et il est important de noter que ces structures ont été résolues en l'absence d'un segment T. Lane et al. ont montré que le CTD peut être associé physiquement à un ADN plasmidique par des expériences de retard sur gel²⁵⁶. Ayant cette information plusieurs perspectives sont possibles. Une des expériences qui peut être effectuée est de savoir si cette association est invariante avec un CTD phosphorylé par CK2 car dans l'expérience des auteurs précédents, ces derniers ont produit le CTD en bactérie. Enfin il serait intéressant de visualiser si ce domaine peut interagir avec un ADN linéaire ou décaténé.

Enfin, une dernière perspective possible est d'obtenir la structure du complexe de la TopII β en complexe avec le même ADN de 30 bp utilisés pour la résolution de la structure de la TopII α et de l'étoposide. L'obtention de la structure de ce nouveau complexe rendrait possible la comparaison structurale des deux isoformes entières dans les mêmes conditions. Cette comparaison permettrait notamment de comparer l'orientation du CTD de la TopII α à celle de la TopII β , dont la séquence diffère entre les deux isoformes avec des insertions dans le CTD de la TopII β .

La question de l'orientation de ce domaine et de son rôle dans l'activité de la TopII β peut se poser, car il a été montré que ces domaines sont importants dans la distinction des activités de régulation topologique entre les isoformes humains^{76,78-80}. Si cette orientation est différente, ces résultats pourraient expliquer en partie les résultats *in vitro* de l'équipe de Neil Osheroff qui a travaillé sur l'activité de relâchement de la TopII α dont le CTD a été remplacé par celui de la TopII β , ce qui a eu pour conséquence que cette enzyme chimérique relâche avec la même efficacité l'ADN surenroulé positivement ou négativement, alors que l'enzyme sauvage a une préférence pour les surenroulements positifs⁷⁸.

C'est sur cette dernière perspective que j'ai également travaillé durant ma thèse et dont je vais présenter les résultats obtenus dans le paragraphe suivant.

3. Le complexe TopII β -ADN-Etoposide

3.1. Formation du complexe

Nous avons transposé les étapes de formation du complexe TopII α - ADN 30 bp- étoposide au complexe TopII β – ADN 30 bp – étoposide (**Figure 94 et 96**) (stœchiométrie 1 :1 :2).

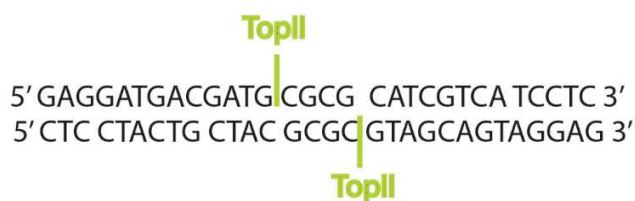


Figure 94 Séquence d'ADN de 30 paires de base utilisée pour former le complexe TopII β – ADN 30 bp – étoposide. Cette même séquence d'ADN a été utilisée par Wendorff et al.²⁷⁰ pour obtenir la structure cristallographique du domaine de liaison de l'ADN de la TopII α .

La formation de ce complexe s'est avérée plus délicate que pour l'isoforme β que pour l'isoforme α . Une fois le complexe formé, un traitement au subérate de bis(sulfosuccinimidyle) (BS3) (**Figure 95**), un agent de *pontage* (*crosslinker*), est réalisé. Ce traitement a pour but de lier de façon covalente entre elles les amines primaires des chaînes latérales des lysines. Le BS3 ou de tout autre *crosslinker* est communément utilisé dans la préparation de complexes pour l'analyse de particules isolées en Cryo-EM. Ce traitement permet de figer les principales conformations de l'échantillon, de stabiliser le complexe dans les conditions de tampon de la cryoEM et lui permet de mieux résister à l'étape de la congélation rapide^{328,329}. Cependant, la concentration de BS3 doit être optimisée car un excès de *crosslinker* pourrait favoriser l'apparition d'agrégats et de complexes multimériques non spécifiques³³⁰ (voir paragraphe suivant). D'autre part, la présence de glycérol et une forte concentration de sel dans l'échantillon entraînent une diminution du contraste des images acquises au microscope, impactant par conséquent le traitement de ces dernières. Il est donc important de limiter, voire d'éliminer ces composants délétères. On applique pour cela une dialyse qui permet également de remplacer le chlorure de potassium et de sodium par du glutamate de potassium et de sodium, car les ions chlorures sont capables d'induire des vues préférentielles sur un complexe nucléoprotéique comme l'ARN polymérase³³¹. De plus, des expériences menées sur une TopII de *Bos Taurus* montrent que cette dernière est plus active en présence d'ion glutamate qu'en présence d'ions chlorures³³². Enfin, le détergent 3-([3-Cholamidopropyl]diméthylammonio)-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO) (**Figure 95**) est

ajouté à la solution avant congélation. À sa concentration micellaire le détergent protège le complexe de l'interface air-liquide qui pourrait le dénaturer en diminuant sa concentration locale par un effet de charge en surface du complexe³³¹. Enfin, l'échantillon est déposé sur une grille de microscopie en cuivre R1.2/1.3 puis plongé dans l'éthane liquide refroidi par l'azote liquide à l'aide du Vitrobot selon les conditions suivantes : Blot time 3s, Blot force 8.

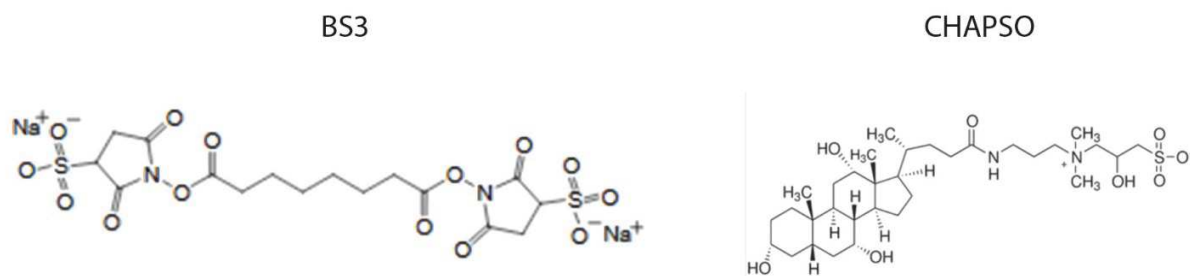


Figure 95 Structures chimiques des molécules BS3 et CHAPSO.

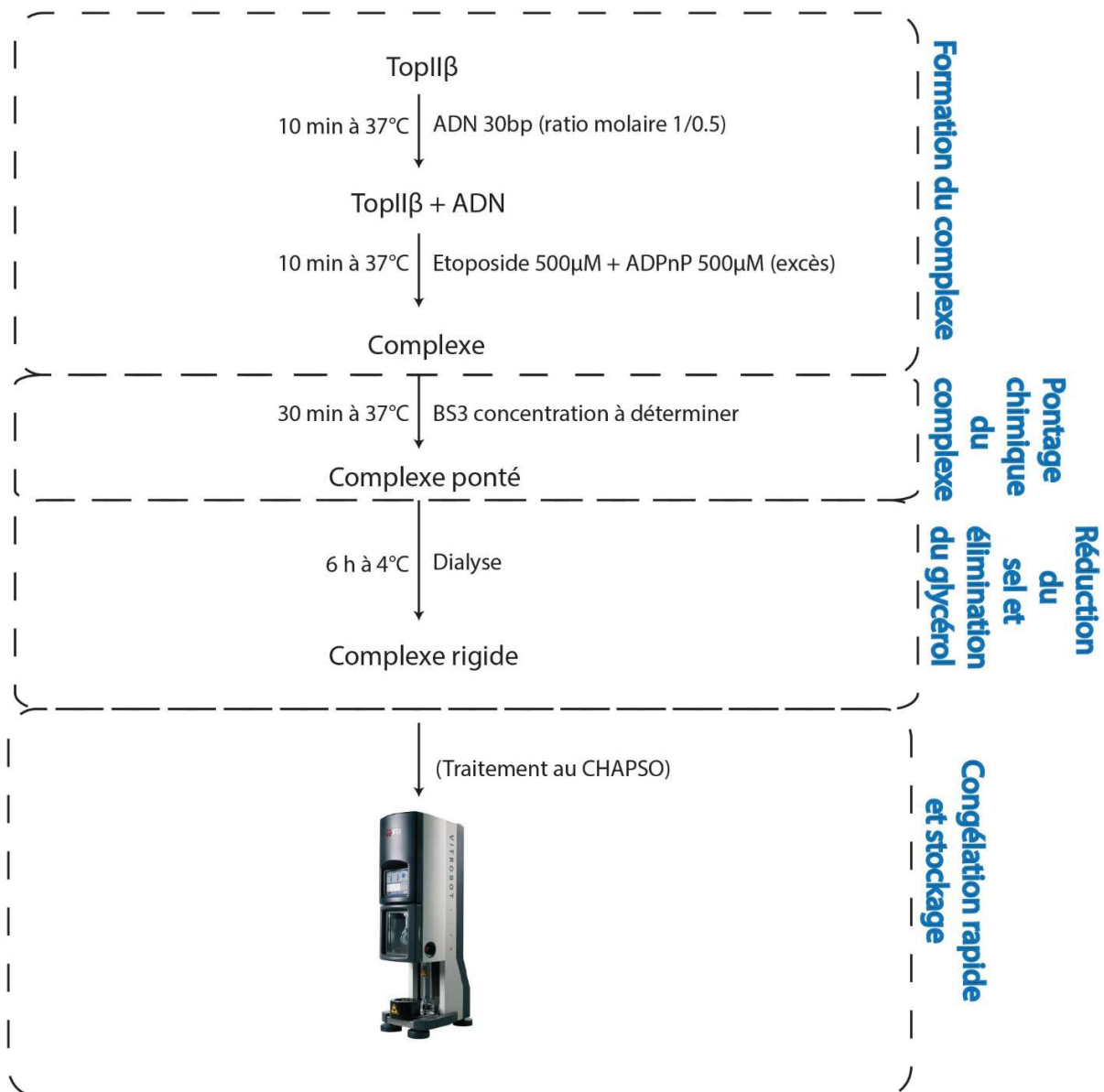


Figure 96 Étapes de préparation du complexe TopIIβ – ADN 30bp – Etoposide en vue d’une acquisition au cryo microscope électronique.

3.2. Optimisation de la quantité de BS3 et préparation de l’échantillon

Afin de déterminer la concentration de BS3 nécessaire pour stabiliser le complexe, une gamme de concentration de 0,25 à 5 mM de BS3 est réalisée (**Figure 97**). Une fois le complexe formé, pour chaque point de concentration de BS3 la réaction de *pontage* est réalisée avec une incubation de 30 minutes à 37°C puis stoppée par ajout de 50 mM final de tampon Tris pH 7.5. L’efficacité de la

réaction est évaluée par gel SDS-PAGE gradient de 4 - 16 % de polyacrylamide, coloré au bleu de Coomassie.

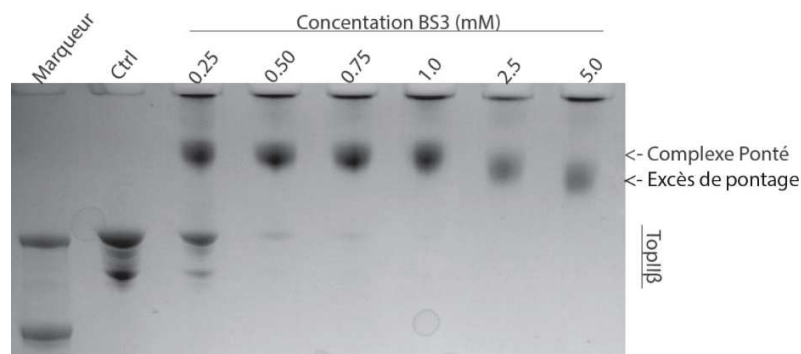


Figure 97 Optimisation de la quantité de BS3 a ajouté pour ponter le complexe. La concentration optimale de BS3 dans les conditions de préparation actuelles est de 1.0 mM.

À une concentration finale de 1 mM de BS3, le complexe TopII β -ADN-étoposide semble être entièrement ponté. Aux concentrations supérieures, le profil de migration est différent témoignant d'un autre état du complexe, potentiellement altéré.

Une fois cette optimisation effectuée, le complexe a pu être formé en partant des conditions utilisées pour la formation du complexe de la TopII α . Le complexe a été formé à partir d'une concentration initiale de TopII β de 5,3 mg/ml. Afin de confirmer que le complexe est formé lors du dépôt sur la grille, les échantillons avant, après réaction de *pontage* et après dialyse sont analysés sur gel SDS-PAGE gradient de 4 – 16 % (**Figure 98**).

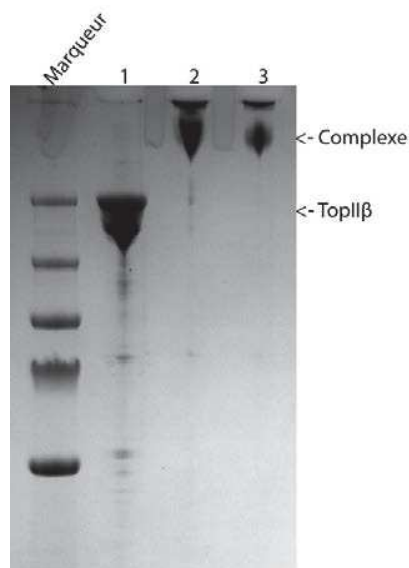


Figure 98 Analyse de l'efficacité de la réaction de pontage et de la quantité d'échantillon disponible. Le stade 1 correspond à l'échantillon avec tous les composants formant le complexe avant réaction de pontage. Le stade 2 représente la migration de l'échantillon après la réaction de pontage et avant l'étape de dialyse. Le stade 3 représente la migration de l'échantillon après dialyse.

D'après la migration sur le gel, le complexe est bien présent dans l'échantillon après dialyse et donc avant dépôt et congélation de la grille de microscopie. Cependant, la quantité de complexe a diminué lors de la dialyse. Les bandes correspondant à un poids moléculaire inférieur à celui de la TopII β avant traitement au BS3, apparaissent car une quantité importante de protéine a été chargée sur gel, environ 10 μ g. À partir de cet échantillon, 8 grilles ont pu être congelées et une d'entre elles a été analysée au cryo-microscope électronique Polara afin de s'assurer de la qualité des grilles. L'image ci-dessous montre une image (micrographie) acquise sur ce microscope (**Figure 99**).

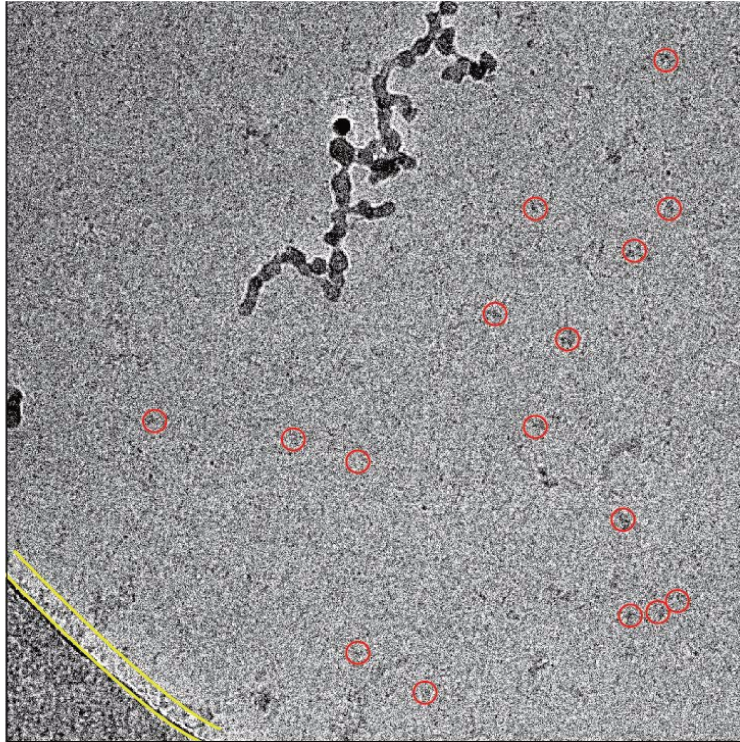


Figure 99 Micrographe d'une zone de la grille. Les particules entourées en rouge correspondent au complexe. Les particules entre les lignes jaunes correspondent à des agrégats de TopII β .

L'analyse de cette grille nous a permis de conclure que la préparation à partir de cet échantillon et que les grilles issues de cette préparation peuvent être utilisées afin de résoudre la structure tridimensionnelle du complexe avec le cryo-microscope électronique à haute résolution Titan Krios. L'épaisseur de glace est satisfaisante car elle permet de distinguer les particules. Enfin, peu d'agrégats sont visibles.

3.3. Acquisition d'images au Titan Krios

Les paramètres techniques du microscope sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) :

Microscope	Titan Krios
Voltage (keV)	300
Magnification	105 000
Dose d'électron ($e^{-}\text{\AA}^{-2}$)	51
Détecteur	Gatan K2 Summit
Taille de pixel (\AA)	0,55
Defocus (μm)	-0,4 à -0,5

Tableau 5 Paramètres d'acquisition du Titan Krios au moment de l'acquisition du jeu de données.

Après acquisition d'un jeu de donnée, 2460 micrographes ont été enregistrés. Le traitement des images a été réalisé sous la supervision d'Arnaud Vanden Broeck dans l'équipe (**Figure 100a**). La première étape consiste en la sélection manuelle des particules de taille et forme correspondant au complexe. Après traitement des premiers 600 micrographes à l'aide du logiciel EMAN2, 4548 particules ont été sélectionnées. L'étape de sélection des particules sur l'ensemble des micrographes a été effectuée de façon automatique en se basant sur le profil des particules sélectionnées manuellement. À partir de cette sélection, 251 196 particules ont été extraites. Ces particules ont été réparties en 100 classes par le logiciel RELION. De ces 100 classes, seules 14 classes correspondent à la forme probable du complexe. Ces 14 classes ont servi de base pour une nouvelle sélection de particules qui ont été redistribuées en 50 classes afin de visualiser un maximum d'orientations du complexe pour la reconstruction d'un modèle 3D (**Figure 100b**). De ces classes, un modèle *ab initio* a pu être reconstruit avec une résolution globale de 13 \AA avec le logiciel CRYOSPARC.

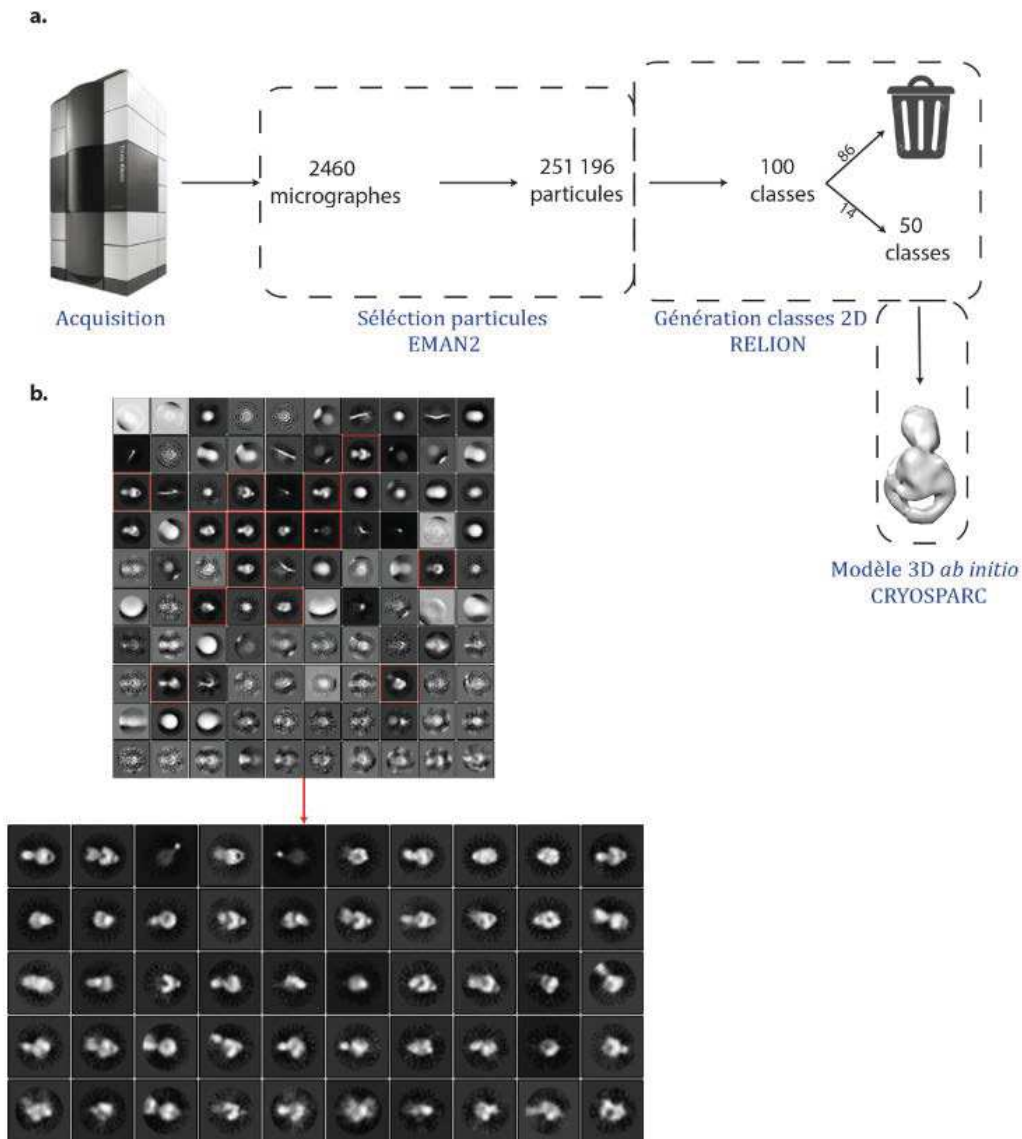


Figure 100 Traitement de données des micrographes obtenus lors de l'acquisition du Titan Krios. (a) Récapitulatif des étapes effectuées pour le traitement de données. (b) L'image du haut correspond aux 100 classes obtenues sur RELION après sélection des particules, les classes entourés en rouge correspondent aux 14 classes sélectionnées à partir desquelles nous avons générés les 50 classes finales (image du bas).

Le modèle obtenu présente une forme tridimensionnelle similaire à celle du complexe de la TopII α , ce qui était attendu vue l'homologie globale de séquence et structure sur les domaines catalytiques. Le domaine de liaison à l'ADN est reconnaissable à la présence d'une cavité entre les domaines Coiled-Coil, telle qu'on la visualise dans les structures cristallographiques. Le domaine ATPase du modèle est difficilement superposable à la structure cristallographique car moins bien défini⁶². La superposition des domaines de liaison à l'ADN du modèle et de la structure cristallographique¹⁵⁰ suggère que la densité électronique correspondant à l'ADN de 30pb ou segment G, est absente dans

le complexe (**Figure 101**). Par conséquent, nous n'avons pas poursuivi la détermination de la structure à partir de cet échantillon.

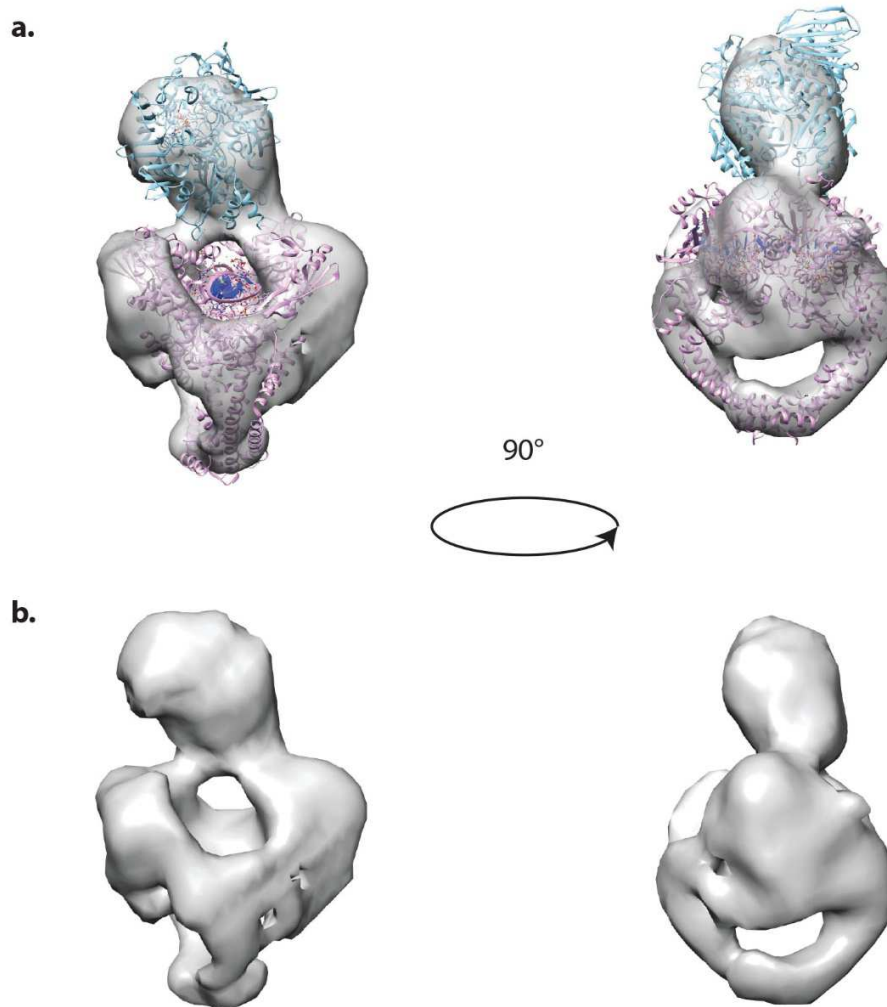


Figure 101 Modèle structurel obtenu après traitement des données du Titan Krios. (a) superposition du modèle expérimental en gris avec les structures cristallographiques de la porte N et de la porte à ADN. (b) nous pouvons observer sur le modèle expérimentale, l'absence de densité correspondant à l'ADN.

3.4. Influence du sel dans la stabilisation du complexe

Afin de comprendre pourquoi le complexe TopII β -ADN n'a pas pu se former, nous avons analysé chaque étape du protocole de formation du complexe. Un échantillon a été prélevé lors de chaque étape du protocole, notamment avant et après l'étape de dialyse. Ces échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose Tris-Borate-EDTA (TBE) 1%, coloré au bromure d'éthidium (BET) pour

détecter les acides nucléiques puis au bleu de Coomassie afin d'identifier les protéines (**Figure 102**).

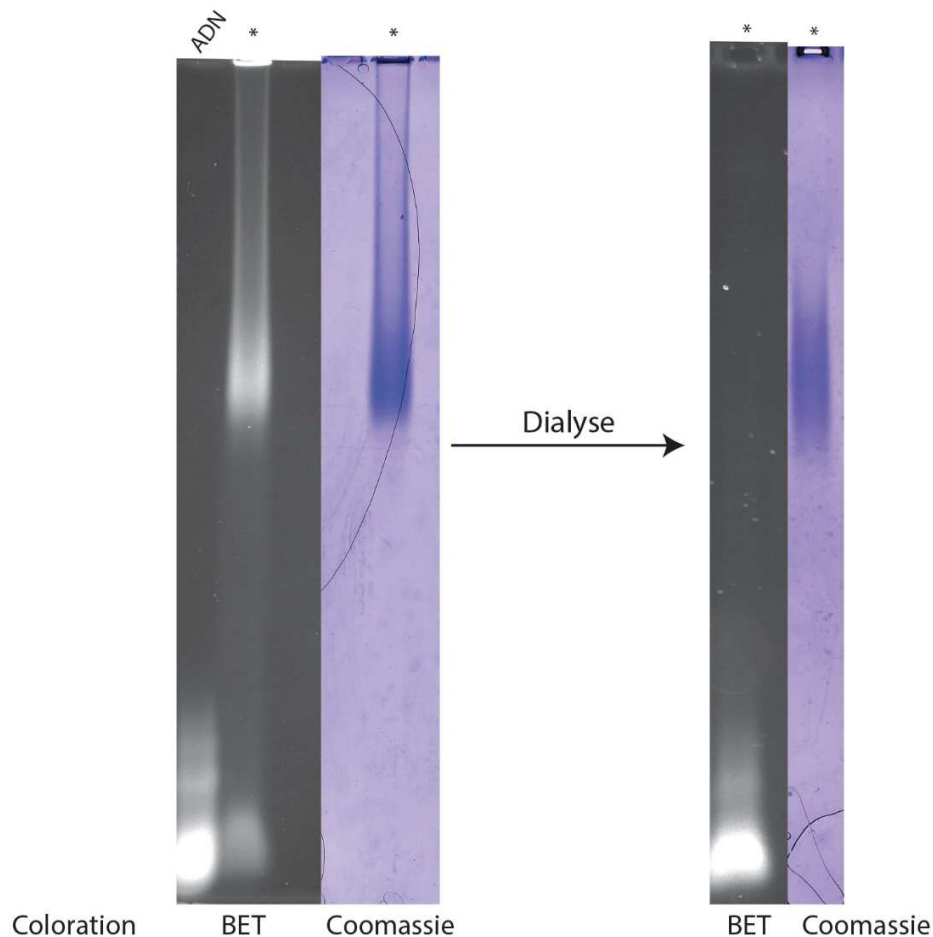


Figure 102 Visualisation de la migration des échantillons sur un gel d'agarose TBE 1% avant (image de gauche) et après (image de droite) dialyse. Les astérisques correspondent à la migration du complexe. Les gels sont colorés successivement au bromure d'éthidium (BET) puis au bleu de Coomassie pour observer la migration de l'ADN puis celui de la TopII β .

Nous avons ainsi constaté qu'après l'étape de dialyse, nous perdons le signal de l'ADN au sein du complexe alors que la partie protéique est bien présente, ce qui semble indiquer que le complexe se dissocie. Malgré le traitement au *crosslinker* BS3, nous supposons que, la stabilité du complexe avec l'ADN est moindre que pour le complexe TopII α -ADN dans les conditions utilisées pour la cryo-microscopie.

Afin de comprendre les raisons de cette dissociation du complexe nous avons entrepris de comparer les lysines localisées en surface de la structure pour les deux isoformes.

3.5. Analyse de la distribution des lysines en surface

Lors de la formation du complexe TopII β -ADN-Etoposide, celui-ci s'est dissocié lors de la dialyse. Cela signifie que le complexe TopII β -ADN est moins stable que le complexe TopII α -ADN, malgré l'utilisation du BS3 qui permet de lier les amines primaires des lysines entre elles. Afin de déterminer si la cavité où se fixe le segment G de l'ADN est affecté de façon similaire par le BS3. Nous avons analysé la distribution des lysines sur le domaine de liaison de l'ADN au niveau de la zone de clivage/reliation de l'ADN et disposant de la structure du complexe entier de la TopII α , nous pouvons analyser les lysines situées au niveau des hélices du Transducer du domaine ATPase.

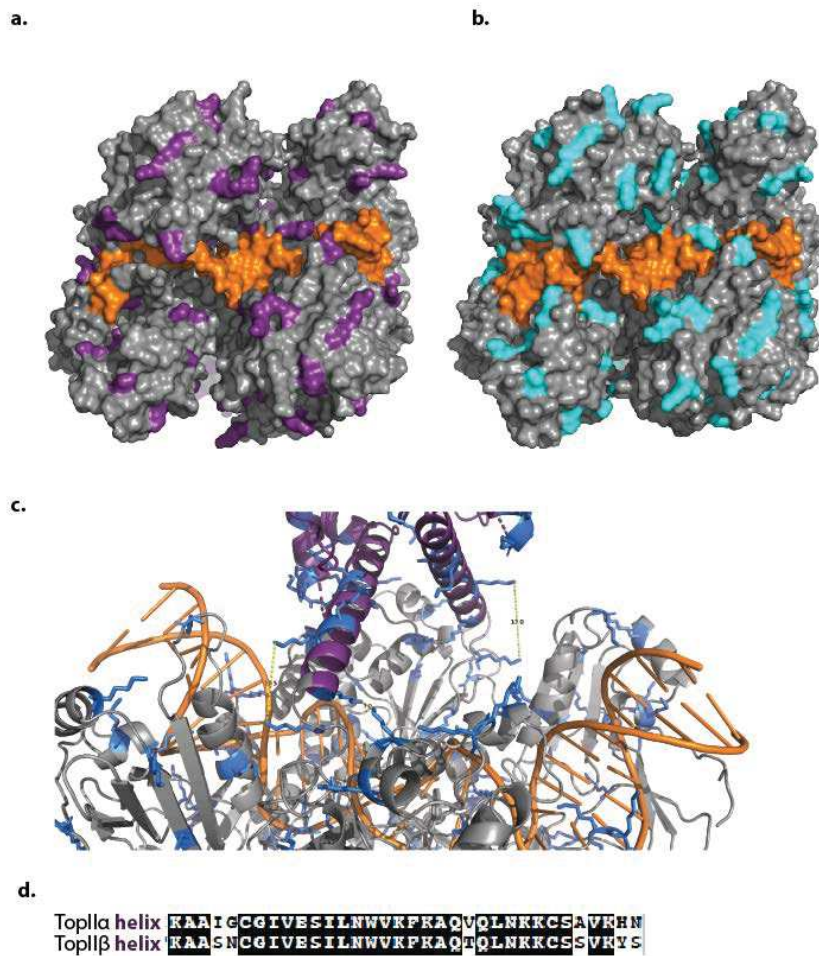


Figure 103 Analyse de la distribution des lysines pour la TopII α et β à proximité de la molécule d'ADN. Identification des lysines en surface de la TopII α en violet (a) et de la TopII β (b) en cyan sur les domaines TOPRIM et Tower, l'ADN est coloré en orange. (c) Identification de quelques pontages possibles par le BS3 entre les hélices du Transducer et le domaine de liaison de l'ADN de la TopII α . (d) Alignement de séquence de la TopII α et β sur la zone correspondant aux hélices du transducer pour la TopII α .

D'après la répartition des lysines sur le domaine de liaison de l'ADN, la distribution semble équivalente pour les deux isoformes (**Figure 103a et b**). De plus entre les hélices du domaine Transducer et le domaine de liaison de l'ADN, des réactions de pontage semblent possibles d'après les distances mesurées (**Figure 103c**). Enfin la séquence peptidique des hélices de la TopII α est identique à la séquence de la TopII β (**Figure 103d**).

D'après ces similitudes, il est difficile de comprendre la différence de comportement entre la TopII α et la TopII β . La différence majeure entre ces protéines est le domaine C-terminal (*Annexe 1*)

sur lequel nous n'avons pas d'information structurale qui pourrait éclairer une potentielle différence de comportement quant à la fixation de l'ADN.

L'obtention et la caractérisation de protéines chimériques TopII α -CTD β et TopII β -CTD α montrent que les CTDs sont spécifiquement impliqués dans la reconnaissance du surenroulement de l'ADN⁷⁸. De plus en ce qui concerne le CTDII β , ce dernier est très important pour l'activité de décatenation, la production de la TopII β délété de son CTD est inhibé d'un facteur 10²⁷¹. Lors de la purification de la TopII β , bien qu'elle soit active, d'après nos tests *in vitro* une bande de dégradation est observée en fin de purification (voir Chapitre I) et cette dégradation est caractéristique du domaine C-terminal des TopIIs humaines³³³. Cependant, la présence de cette dégradation pourrait être limitante quant à la stabilisation du complexe TopII β alors qu'elle est également présente dans les échantillons de TopII α et sans influence sur la reconstitution de son complexe avec l'ADN.

Cette expérience doit être reproduite en reconstituant en parallèle le complexe de la TopII α en contrôle puisque le protocole avait permis l'obtention de la structure de son complexe nucléoprotéique.

3.6. Conclusion

Des premiers essais de formation du complexe TopII β -ADN-Etoposide ont été réalisés. En utilisant le même protocole que pour le complexe de la TopII α , nous avons obtenu un modèle avec une résolution globale de 13 Å. Néanmoins, la molécule d'ADN est absente. Bien que formé au préalable, les résultats préliminaires montrent que le complexe se dissocie durant l'étape de dialyse. L'analyse en détail des structures cristallographiques n'a pas donnée d'argument justifiant cette dissociation. Le profil de pureté de la TopII β en fin de purification présente une dégradation de son extrémité C-terminale pour 15% de l'échantillon. Il est possible que ce CTD intervienne de façon plus importante dans la formation du complexe nucléoprotéique que pour la TopII α , ces 2 isoformes présentant des domaines différents par leur séquence primaire.

Chapitre III : Architecture moléculaire de l'ADN Gyrase en complexe avec de l'ADN et la gépotidacine

1. Introduction et objectifs

Tout comme leurs homologues humains, les Top2 procaryotes et plus particulièrement l'ADN gyrase sont les cibles dans le traitement de pathologies, et dans ce cas pour les traitements antibiotiques. Les molécules ciblant l'ADN gyrase n'échappent pas à l'émergence de nouvelles réponses adaptatives des bactéries. Ainsi, il est indispensable de produire de nouveaux inhibiteurs de l'ADN gyrase, face auxquelles les bactéries ne pas développent de résistance. Pour ce faire, l'obtention de nouvelles données structurales détaillées permettrait de comprendre la relation structure-fonction de cette protéine. Parmi les données de la PDB, 13 structures des domaines isolées GyrA et GyrB de l'ADN gyrase de *E. coli* ont été publiées^{334,335}. Bien que ces structures cristallographiques apportent des informations sur les changements conformationnels de ces domaines au cours du cycle catalytique, prises isolément, elles ne permettent pas de répondre aux questions portant sur les mécanismes allostériques permettant la coordination des activités catalytiques.

En 2013, le laboratoire a publié la première structure de l'ADN gyrase de *Thermus thermophilus* entière obtenue par Cryo-EM⁸. L'obtention de cette structure a permis de visualiser le trajet de l'ADN dans le domaine de liaison de l'ADN mais aussi autour des domaines CTD. Bien qu'apportant une information globale sur l'architecture de l'enzyme, sur cette structure résolue à 18 Å, elle ne permet pas d'analyser précisément les connexions entre les domaines. L'objectif de ce projet est d'obtenir une structure à haute résolution de la protéine bactérienne entière. Cet objectif est rendu réalisable grâce à l'utilisation du microscope électronique Titan Krios et à l'amélioration des détecteurs et des logiciels de traitement d'image.

L'équipe a ainsi entrepris de résoudre la structure de l'ADN gyrase de *E. coli* en complexe avec un ADN de 180 bp et un inhibiteur issu de la nouvelle classe de molécules inhibitrice NBTI : la gépotidacine, pour laquelle les bactéries n'ont pas encore développé de mécanisme de résistance.

La détermination de la structure par microscopie électronique a été réalisée par Arnaud Vanden Broeck pendant la période de ma thèse. Les données de microscopie électronique ont permis d'obtenir la structure du complexe Gyrase-ADN-gépotidacine sous deux conformations 1) le domaine de liaison fermé et 2) pré-ouvert. J'ai participé à ce projet dans le cadre de la caractérisation d'un réseau d'interaction de résidus au sein du Transducer qui est différent entre

T.thermophilus et *E.coli*, témoignant ainsi d'une différence dans la régulation allostérique de l'enzyme. Pour cela, j'ai préparé des échantillons de protéine sauvage et de mutant et réalisé les tests enzymatiques et topologiques.

2. Publication Vanden Broeck, A. ; Lotz, C. ; Ortiz, J. ; Lamour, V. Nature Communication 2019 "Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex"

Les informations supplémentaires sont accessibles en cliquant sur le lien suivant :

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41467-019-12914-y/MediaObjects/41467_2019_12914_MOESM1_ESM.pdf

ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12914-y>

OPEN

Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex

Arnaud Vanden Broeck ^{1,2,3,4}, Christophe Lotz ^{1,2,3,4}, Julio Ortiz ^{1,2,3,4} & Valérie Lamour ^{1,2,3,4,5*}

DNA gyrase is an essential enzyme involved in the homeostatic control of DNA supercoiling and the target of successful antibacterial compounds. Despite extensive studies, a detailed architecture of the full-length DNA gyrase from the model organism *E. coli* is still missing. Herein, we report the complete structure of the *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex trapped by the antibiotic gepotidacin, using phase-plate single-particle cryo-electron microscopy. Our data unveil the structural and spatial organization of the functional domains, their connections and the position of the conserved GyrA-box motif. The deconvolution of two states of the DNA-binding/cleavage domain provides a better understanding of the allosteric movements of the enzyme complex. The local atomic resolution in the DNA-bound area reaching up to 3.0 Å enables the identification of the antibiotic density. Altogether, this study paves the way for the cryo-EM determination of gyrase complexes with antibiotics and opens perspectives for targeting conformational intermediates.

¹Department of Integrated Structural Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France. ²Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104, Illkirch, France. ³Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM) U1258, Illkirch, France. ⁴Université de Strasbourg, Illkirch, France. ⁵Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France. *email: lamourv@igbmc.fr

The type IIA DNA topoisomerases (Top2) are nano-machines that control DNA topology during multiple cellular processes such as replication, transcription and cell division^{1–4}. These enzymes catalyze the transport of a DNA duplex through a double strand break to perform DNA relaxation, decatenation, and unknotting. DNA gyrase plays a vital role in the compaction of the bacterial genome and is the sole type II topoisomerase able to introduce negative supercoils into DNA, a reaction coupled to ATP hydrolysis⁵.

DNA gyrase A and B subunits assemble into a A₂B₂ heterotetramer of approximately 370 kDa forming three molecular interfaces called N-gate, DNA-gate and C-gate allowing DNA binding and strand passage^{6,7}. The flexibility of this large enzyme constitutes a challenge for the structural study of the multiple conformations it adopts during the catalytic cycle. Until recently, only the structures of isolated domains with drugs were known, providing partial information on this modular enzyme and not accounting for the allosteric connections between the catalytic domains^{8–11}. The architecture of a full-length DNA gyrase from *T. thermophilus* in complex with a 155 bp dsDNA and ciprofloxacin was first solved using cryo-electron microscopy (cryo-EM) at a resolution of 18 Å¹². This first model provided a rationale for probing mechanistic questions based on biochemical, single molecule, and FRET techniques^{13–16}, but the low resolution model did not allow deconvolution of discrete conformations of the full-length enzyme, leaving many mechanistic questions unresolved. Furthermore, the atomic details of the structure and of the drug binding site in the context of the overall conformation of DNA gyrase were not available at this resolution. In addition, the information derived from the thermophilic homolog does not account for all the mechanistic and structural specificities of the *E. coli* DNA gyrase, the genetic model for which functional data have been accumulated over the past decades. In particular, the *E. coli* DNA gyrase GyrB subunit possesses a domain insertion of 170 amino acids, not found in the *T. thermophilus* enzyme, that has been shown to help coordinate communication between the different functional domains¹⁷. Deletion of this domain greatly reduces the ability of *E. coli* DNA gyrase to bind DNA and decreases its ATP hydrolysis and DNA negative supercoiling activity¹⁷.

DNA gyrase is a prime target for catalytic inhibitors such as aminocoumarins, or ‘poison’ inhibitors of the cleavage complex,

such as quinolones^{18–21}. More recently, novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBTIs), have been developed that also target the DNA cleavage activity of gyrase, but with a mechanism and target site different from the quinolones²². These molecules and in particular gepotidacin, represent a promising alternative and are currently in clinical trial for the treatment of bacterial infections^{23–25}. However, the use of any antibiotics may lead to the appearance of mutations and the development of resistant strains²⁶. Our capacity to understand the molecular determinants of drug resistance depends in part on the availability of complete 3D architecture of DNA gyrase nucleoprotein complexes with drugs.

In this study, we reveal the complete molecular structure of the *E. coli* DNA gyrase bound to dsDNA and to the NBTI molecule gepotidacin using cryo-EM. The structure of the entire complex was solved at 6.6 Å resolution and two conformations of the DNA-binding/cleavage domain in closed and pre-opening states were solved at 4.0 and 4.6 Å resolution, respectively. These sub-nanometer resolution structures reveal in detail the structural and spatial organization of the different functional domains of *E. coli* gyrase and of their connections. In particular, they elucidate the position of the conserved GyrA-box motif responsible for DNA wrapping and allow the unambiguous identification of the gepotidacin molecule in the cryo-EM map. The deconvolution of distinct conformations of the DNA-binding/cleavage domain provides a better understanding of the allosteric movements that the enzyme conducts at the early steps of G-segment opening, stabilized by the gepotidacin molecule. Altogether this work paves the way for the structure determination of gyrase complexes with additional antibiotics using cryo-EM and the in-depth analysis of its allosteric regulation.

Results

Cryo-EM structure of the DNA gyrase nucleoprotein complex.

The *E. coli* GyrB and GyrA subunits were overexpressed and purified separately before assembly in stoichiometric amounts and incubation with a double-nicked 180 bp DNA (Supplementary Table 1). The holoenzyme was further purified by size-exclusion chromatography resulting in a single and homogenous complex (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a). DNA supercoiling and ATP hydrolysis assays showed that the A₂B₂ complex is fully

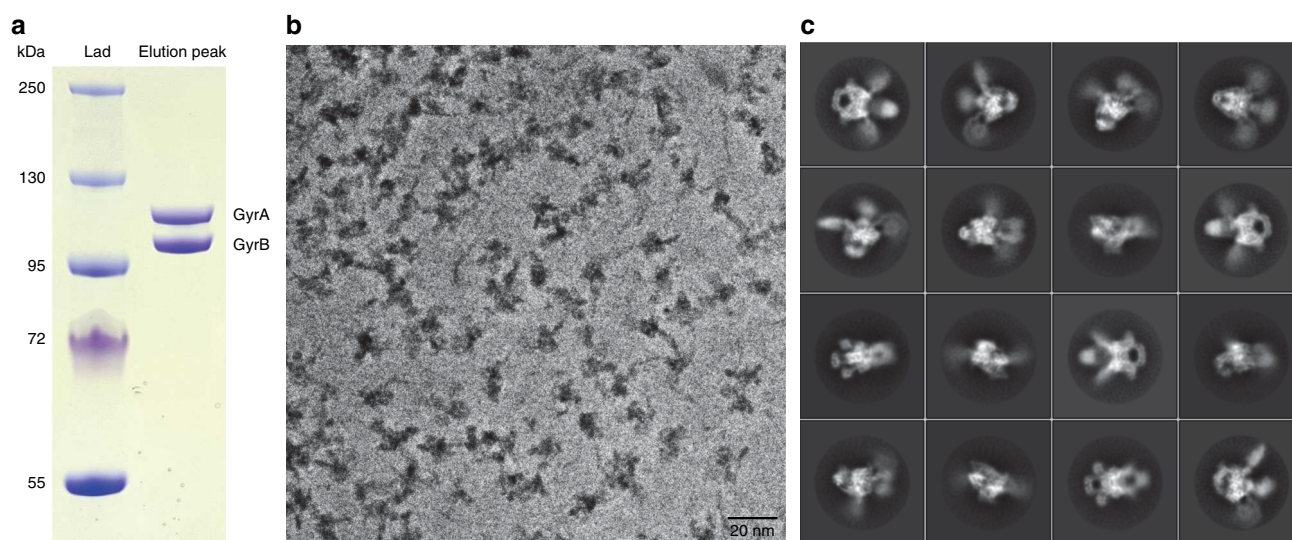


Fig. 1 Sample preparation and image acquisition. **a** SDS-PAGE analysis of the reconstituted GyrA₂B₂ after size-exclusion chromatography. The source data are provided as a Source Data file. **b** A typical cryo-EM micrograph collected with a Gatan K2 Summit camera on a FEI Titan Krios microscope operated at 300 kV with Volta Phase Plate. The length of the scale bar is 20 nm. **c** Selection of 2D classes from reference-free 2D classification

active (Supplementary Figs. 1b and 9b). Finally, the gepotidacin molecule was added to the complex, which was further stabilized using ADPNP, a non-hydrolysable analog of ATP.

Images of the DNA gyrase complex were recorded using a Titan Krios with a Volta Phase Plate at a -500 nm defocus target, allowing a significant increase in contrast of the images and optimization of the image acquisition rate^{27,28} (Fig. 1b). After gain correction, frame alignment and manual inspection, 8,701 micrographs were selected out of 11,833 initial movie frames coming from four datasets (Supplementary Table 2). Several rounds of 2D classification in RELION2^{29,30} yielded class averages displaying high-resolution features such as the DNA wrapped around the β -pinwheels and defined alpha helices (Fig. 1c). An *ab-initio* 3D model was calculated with a final stack of 191,456 particles using cryoSPARC³¹ (Supplementary Fig. 2). Multiple classification and refinement steps were then performed in RELION2 using global and local approaches to deconvolute different structures of the DNA-bound DNA gyrase (Supplementary Figs. 3–5). The overall DNA-bound DNA gyrase complex was solved at 6.6 Å using 94,633 particles. The estimation of the local resolution showed a broad spectrum from 5.0 Å on the DNA-binding/cleavage domain to 8.0 Å on the ATPase domains and β -pinwheels (Supplementary Fig. 4c).

Structures of the DNA-binding/cleavage domain were solved in two different states with different positioning of the GyrB TOPRIM insertion relative to the rest of the DNA-binding/cleavage domain. State 1 was solved at 4.0 Å using 60,548 particles and State 2 was solved at 4.6 Å using 53,655 particles (Supplementary Fig. 3). Local resolution estimation shows more stable regions reaching up to 3.0 and 4.0 Å for State 1 and State 2 structures, respectively, while the GyrB *E. coli* insertion seems more disordered (Supplementary Fig. 4c). To allow better positioning and refinement of the atomic models in the EM density of the overall structure, we also solved three additional structures with better defined densities for the ATPase domain and DNA-binding/cleavage domain (5.9 Å), the DNA-binding/cleavage domain without the TOPRIM insertion (4.0 Å) and the DNA-binding/cleavage domain with the C-terminal β -pinwheels wrapped by DNA (6.3 Å) (Supplementary Figs. 3–5 and Supplementary Table 2). The cryo-EM maps of individual regions at different resolutions were used to generate a composite EM map that reflects the flexibility of the complex, in particular in the ATPase domain and DNA-bound β -pinwheels (Fig. 2b, Supplementary Fig. 5 and Supplementary Movie 1).

Analysis of the complete *E. coli* DNA gyrase architecture. The atomic models of *E. coli* GyrA and GyrB domains, solved by X-ray crystallography^{10,17,32}, were combined to build and refine the complete atomic structure of the full-length *E. coli* DNA gyrase holoenzyme in complex with the DNA duplex in the cryo-EM maps (Fig. 2c). The continuous density of the ATPase and DNA-binding/cleavage domains EM map at 5.9 Å allowed us to build unambiguously the protein linkers between the C-terminal end of the transducer helices of the ATPase domain and the N-terminal end of the TOPRIM domain (Fig. 2d and Supplementary Fig. 5). The resulting model now shows clearly the details of the intertwined structure of the DNA gyrase hetero-tetramer (Fig. 2b, c). The dimeric ATPase domain is sitting in an orthogonal orientation above the DNA-binding/cleavage domain ($\sim 95^\circ$) as previously observed with the *T. thermophilus* DNA gyrase¹² (Supplementary Fig. 6a). The density of the flexible loops connecting the ATPase domain to the TOPRIM domain are well defined allowing to position these elements crossing on top of the G-segment in the DNA-bound gyrase conformation (Fig. 2d). In the DNA-free open structure of the *M. tuberculosis* DNA gyrase,

these linkers are laying apart on the surface of the TOPRIM domain³³.

We could also build the linker between the C-terminal end of the GyrA coiled-coil domains and the β -pinwheels on each side (Fig. 2e and Supplementary Fig. 5). The quality of the density allows to distinguish the upper from the lower face of the pinwheel disk where the N- and C-terminal ends are located. The tracing of the linker connecting to the N-terminal end of the pinwheel on blade 1 enabled the precise orientation of the crystal structure of the *E. coli* β -pinwheel¹⁰ in the EM map (Figs. 2e and 3a). Consequently, the first contact between the G-segment and the β -pinwheel occurs at blade 3, then wraps around the β -pinwheel by contacting blade 4, 5, 6 and exits the β -pinwheel through contact with blade 1 containing the GyrA-box motif (Fig. 3a).

Other structural elements missing in crystal structures such as surface loops, α -helices of the DNA binding/cleavage and C-gate domains could be completed or corrected in the GyrB and GyrA subunits representing more than 5% of the total sequence (Supplementary Fig. 7 and Supplementary Table 3).

The overall structure is asymmetric, with the ATPase domain slightly bent ($\sim 10^\circ$) towards one of the β -pinwheels bringing it closer to a distance of 27 Å. The ATPase domain is sitting 11 Å away from the DNA-binding/cleavage domain (Supplementary Fig. 6). Each β -pinwheel resides on the same side as its respective GyrB subunit, with an approximate $\sim 45^\circ$ angle from the center of the DNA-binding/cleavage domain. This spatial arrangement of the β -pinwheel induces an overall $\sim 150^\circ$ bending of the DNA, as seen in previously reported crystal structures^{22,34,35}. 130 bp of the double-stranded DNA out of 180 bp could be fitted and the corresponding base pairs were submitted in refinement in the cryo-EM map. The DNA duplex is chirally wrapped around the β -pinwheels orienting the T-segment towards the DNA-gate second groove formed by the TOPRIM-WHD and tower domains with a 60° angle (Supplementary Fig. 6b).

Conserved structural elements in the transducer domain. The transducer helices in the GyrB subunit are thought to be a pivotal structure for the allosteric changes following ATP hydrolysis^{32,36}. These helices are sticking out of the transducer domain that forms a central cavity in the ATPase domain. Based on the first crystal structure of the ATPase domain⁸, it was initially suggested that residue R286 in *E. coli* (*Ec*) points towards the cavity of the transducer domain and contributes to DNA capture and therefore is a key element of the enzyme's allostery³⁷. However, further analysis of this area from the crystal structure of Brino et al. shows that *Ec* R286 seems engaged in a salt bridge with E264, which is also involved in a hydrogen bond network with R316³² (Fig. 4b). R286 is replaced by a lysine in the *Thermus thermophilus* (*Tth*) enzyme and most organisms possess either an arginine or a lysine at this position (Supplementary Fig. 8). *Tth* K284 at the same position points toward the N-gate central cavity and is not engaged in an hydrogen bond network since E264 is replaced by A262 and R316 by a L314³⁸ (Fig. 4a). This organism therefore presents an alternative sequence to *E. coli* in this region with a conserved folding and accomplishing the same set of catalytic activities.

To probe the role of this position in the allosteric regulation of the holoenzyme, we compared the catalytic activities of point mutations of *Ec* R286 and *Tth* K284 (Fig. 4c, d). *Ec* R286 was mutated into a lysine to mimic the *Thermus* position and a glutamine to remove the charge as performed in the previous study of Tingley et al.³⁷. The residue *Ec* E264 was also mutated into alanine to mimic the *Thermus* position. Inversely, *Tth* K284 was mutated into arginine or glutamine. The mutant proteins were

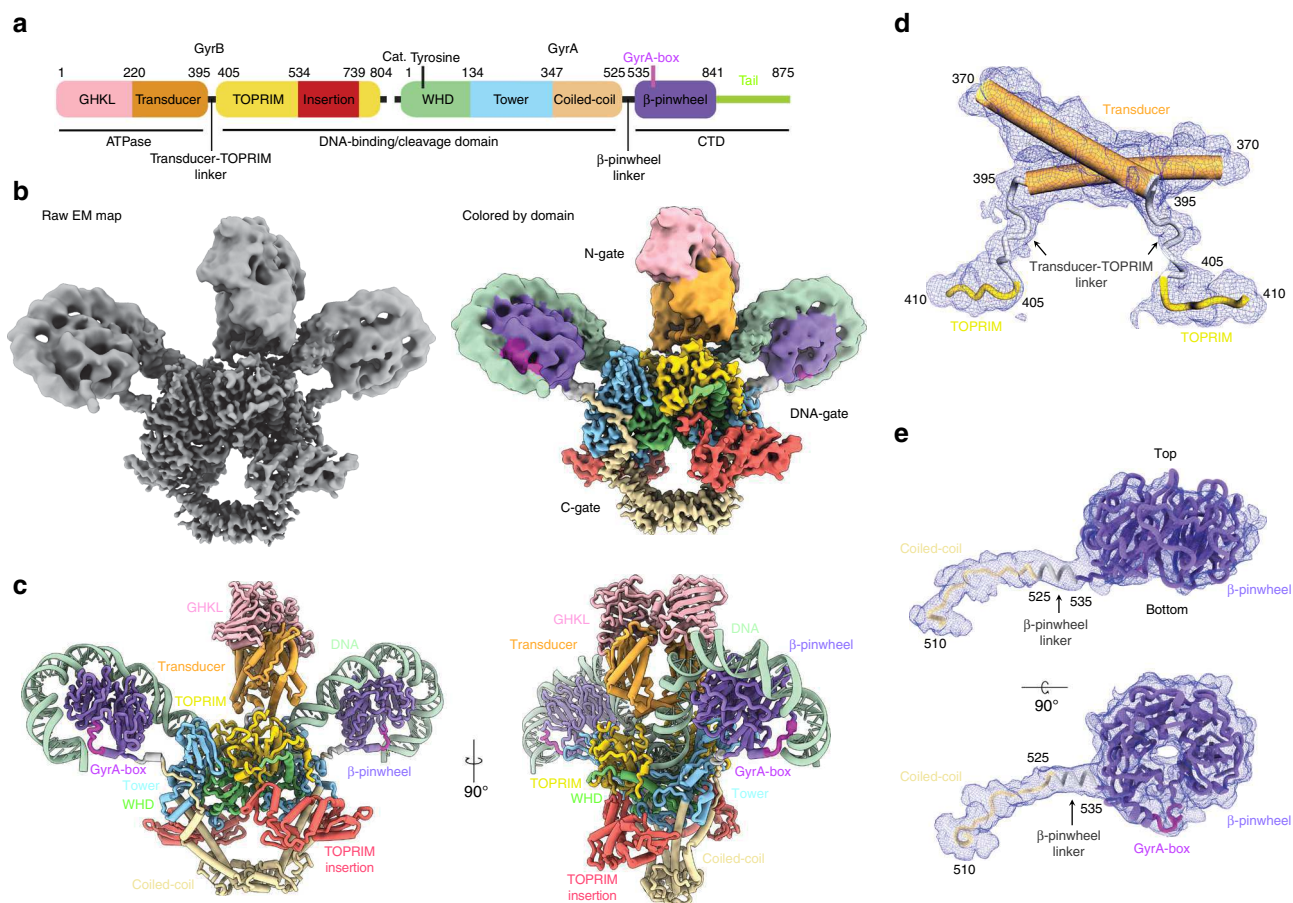


Fig. 2 Cryo-EM 3D reconstruction and molecular model of the DNA gyrase complex. **a** Schematic representation of the GyrA and GyrB domains, the position of the conserved catalytic tyrosine in the DNA-binding/cleavage domain and of the GyrA-box are indicated. **b** Raw composite cryo-EM map of the full complex of DNA gyrase (left) and the same cryo-EM map colored by protein domains using the color code as in **a** (right). **c** Molecular structure of the hetero-tetrameric complex including the GyrA/GyrB subunits (same color code as in **a**) and 130 bp DNA (in pale green) that were built and refined in the cryo-EM maps. **d** Zoom on the transducer helices and the transducer-TOPRIM linkers built in the density (blue mesh) and connecting the N-gate to the DNA-gate. **e** Perpendicular views of the linker that connects the DNA-binding/cleavage domain to the bottom of the β -pinwheel. The identification of a clear density for the 10-AA linker ending with a short helix allowed to orient the β -pinwheel structure unambiguously in the map. This leads to the positioning of the GyrA-box (in magenta) at the exit of the DNA path around the β -pinwheel, in close contact with DNA

recombinantly produced with no detectable denaturation. Thermal denaturation experiments on the *E. coli* mutant proteins using differential scanning fluorimetry showed the same behavior as the WT protein except for the E264A that shows a decreased thermal stability (Supplementary Fig. 9a). The ATPase and DNA supercoiling activities of the *Tth* K284R and K284Q mutants remain in the same range as the WT at 37 °C (Fig. 4c and Supplementary Fig. 9b). The *Ec* R286K mutant exhibits slightly higher ATPase and DNA supercoiling activities compared to the WT suggesting either side chain is compatible with the catalytic activities in *E. coli* (Fig. 4d and Supplementary Fig. 9b). In contrast, the *Ec* R286Q and E264A mutants have a 6- and 8-fold reduced ATPase activity and present a 5- and 10-fold reduced negative supercoiling activity, respectively. The E264A mutation is particularly detrimental to the DNA gyrase activities. This could be explained by the fact that this residue forms hydrogen bonds with residues R286 and R316, which are both involved in the interaction network maintaining the structure of the transducer domain (Fig. 4b). The alanine mutation is likely to break these interactions and affect the rigidity of this structure element, as shown by the thermal denaturation assays (Supplementary Fig. 9a).

All together this suggests that the presence of the transducer interaction network in *E. coli* is important for ensuring allosteric coupling between ATP hydrolysis and DNA supercoiling activities.

Deconvolution of the DNA-gate conformations. The deconvolution of different particles population in the dataset has led to distinct 3D reconstructions of the DNA-binding/cleavage domain. The 4.0 Å (State 1) and 4.6 Å (State 2) structures of the DNA-binding/cleavage domain bound to the double-nicked G-segment reside in a configuration similar, but not identical, to the cleavage complex in presence of DNA and ciprofloxacin with a RMSD of 1.78 and 2.01 Å, respectively¹². The overall RMSD between State 1 and State 2 conformations is of 2.2 Å. In state 2, very subtle changes occur in structural elements lining the G-segment groove compared to State 1. The 2 conformations mostly differ in the GyrB subunit, more particularly the TOPRIM insertion that rotates around the GyrA N-terminal arm with a 5.0 Å upward displacement (Fig. 5). This motion increases the distance between GyrA Tower and GyrB TOPRIM from 8 to 11 Å, inducing a slight shortening of the distance between the catalytic tyrosines from 26.4 to 25.6 Å and inducing the stretching of the G-segment by 2.5 Å in both directions (Fig. 5b, d and Supplementary Fig. 10).

State 1 can be described as a cleavage complex in a closed conformation of the DNA-gate, hereafter designated as closed. State 2 corresponds to an intermediate opening of the DNA-gate therefore referred as a pre-opening conformation, when compared with the larger opening that can be observed in the

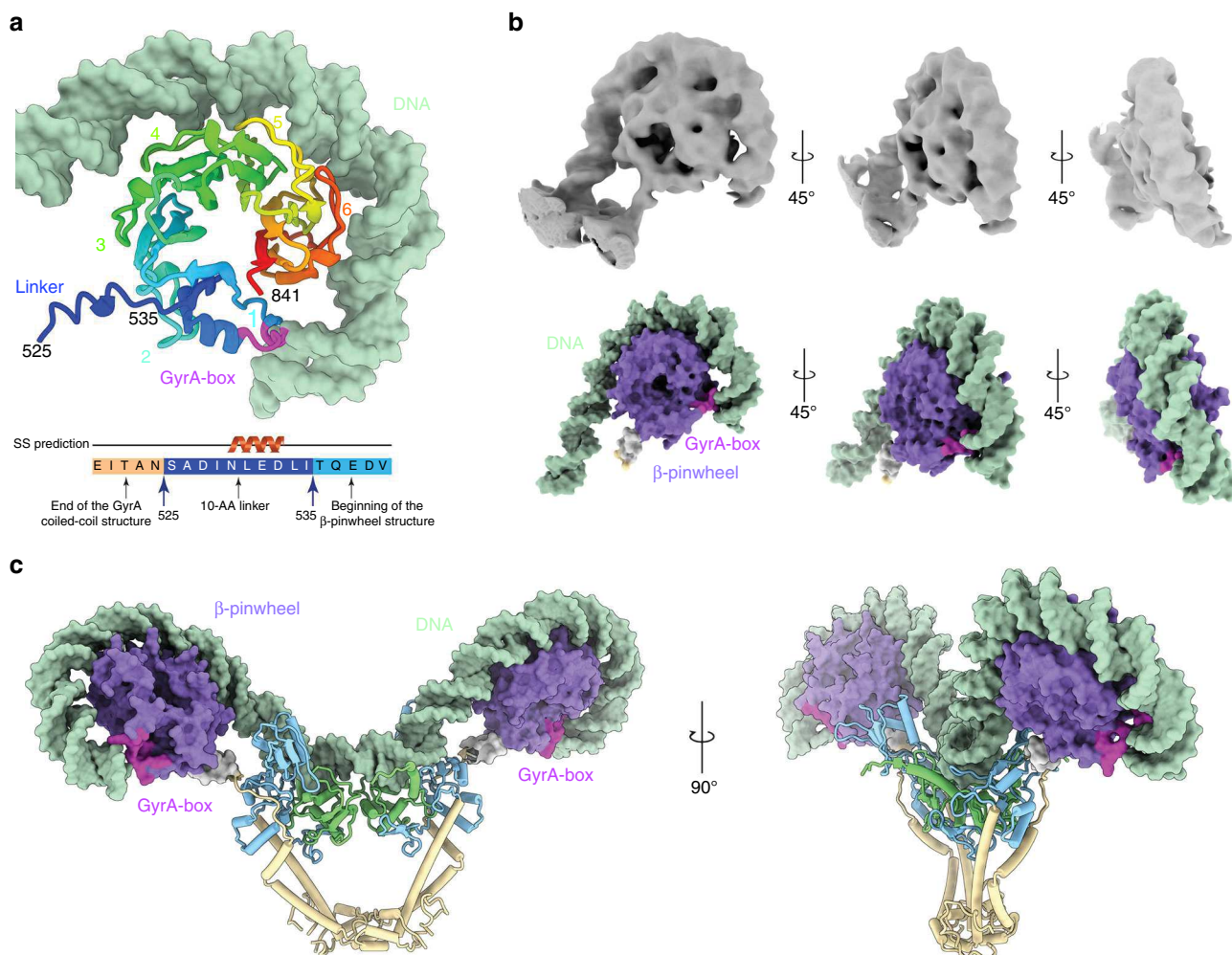


Fig. 3 DNA Wrapping around the GyrA CTD β -pinwheel and GyrA-box structure. **a** Cartoon representation of the molecular structure of the GyrA β -pinwheel, rainbow colored from the N-terminal end in blue, to the C-terminal end in red. The GyrA-box (QRRGGKG) is colored in magenta and DNA in pale green. The β -pinwheel blades are numbered from 1 to 6. The first contact between DNA and the β -pinwheel occurs at blade 3, wraps around the disk by contacting blade 4, 5, 6 and exits the β -pinwheel through contact with blade 1. **b** Different views of the 6.3 Å cryo-EM map (in grey) zoomed on the β -pinwheel wrapped with DNA and the corresponding molecular models in surface representation (same color code as in Fig. 2). The slight superhelical structure of the pinwheel is clearly visible on the side view. **c** Overall view of the 130 bp DNA duplex wrapping around the two β -pinwheels of DNA gyrase. For clarity, only the GyrA subunits are displayed. The GyrA-box motifs of each β -pinwheel are located at the exit of the DNA path around the β -pinwheel and act as clamps stabilizing the DNA curvature

conformation adopted by the hsTop2 β ³⁹ (Supplementary Fig. 10d). State 1 and 2 correspond to a conformational oscillation before the opening of the DNA-gate (Supplementary Movie 2). This pre-opening transition is mainly undertaken by the insertion domain acting like an anvil which positions the TOPRIM domain in a configuration ready to perform the opening of the DNA-gate.

Identification of the gepotidacin and ions in the EM map.

Despite the high flexibility of the complex, we were able to solve a structure of the gyrase DNA-binding/cleavage domain in the closed complex with DNA and gepotidacin at 4.0 Å resolution using a focused refinement strategy (Supplementary Fig. 3). Side chains of secondary structure elements and the DNA double helix are very well defined in this highly ordered region (Fig. 6a). The local resolution near the NBTI binding site was estimated at 3 Å, which allowed the identification of the gepotidacin density (Fig. 6a, b and Supplementary Fig. 4). The molecule intercalates in the DNA duplex between positions +2 and +3 forming hydrophobic interactions and pi-stacks with the protein and the

DNA, at the same location as previously observed for the NBTIs and crystallized with *S. aureus* DNA gyrase^{22,25,40,41} (Supplementary Fig. 11a). The main difference in the binding pocket of *S. aureus* and *E. coli* gyrase lies in the subunit methionine residue (M75) that is replaced by an isoleucine residue in (I74) (Supplementary Fig. 11a). This position is part of a GyrA hydrophobic pocket that accommodates the pyranopyridine ring of the gepotidacin. Although the overall resolution of the pre-opening state is lower, a density for the gepotidacin molecule could be identified at a lower rmsd level, suggesting that the gepotidacin binding site is compatible with conformational fluctuations at the DNA-gate. Such flexibility of the DNA-binding/cleavage domain in presence of gepotidacin has also been observed in the *S. aureus* DNA crystal structures of DNA-binding/cleavage domains with an intact or doubly nicked DNA²⁵.

Further away along the DNA in the TOPRIM domain, a density could be observed in the 4 Å EM map at 6 Å rmsd at the cleavage reaction B-site that could correspond to the position of a magnesium ion (Supplementary Fig. 12). The density of the conserved aspartic and glutamic residues defining the B-site are

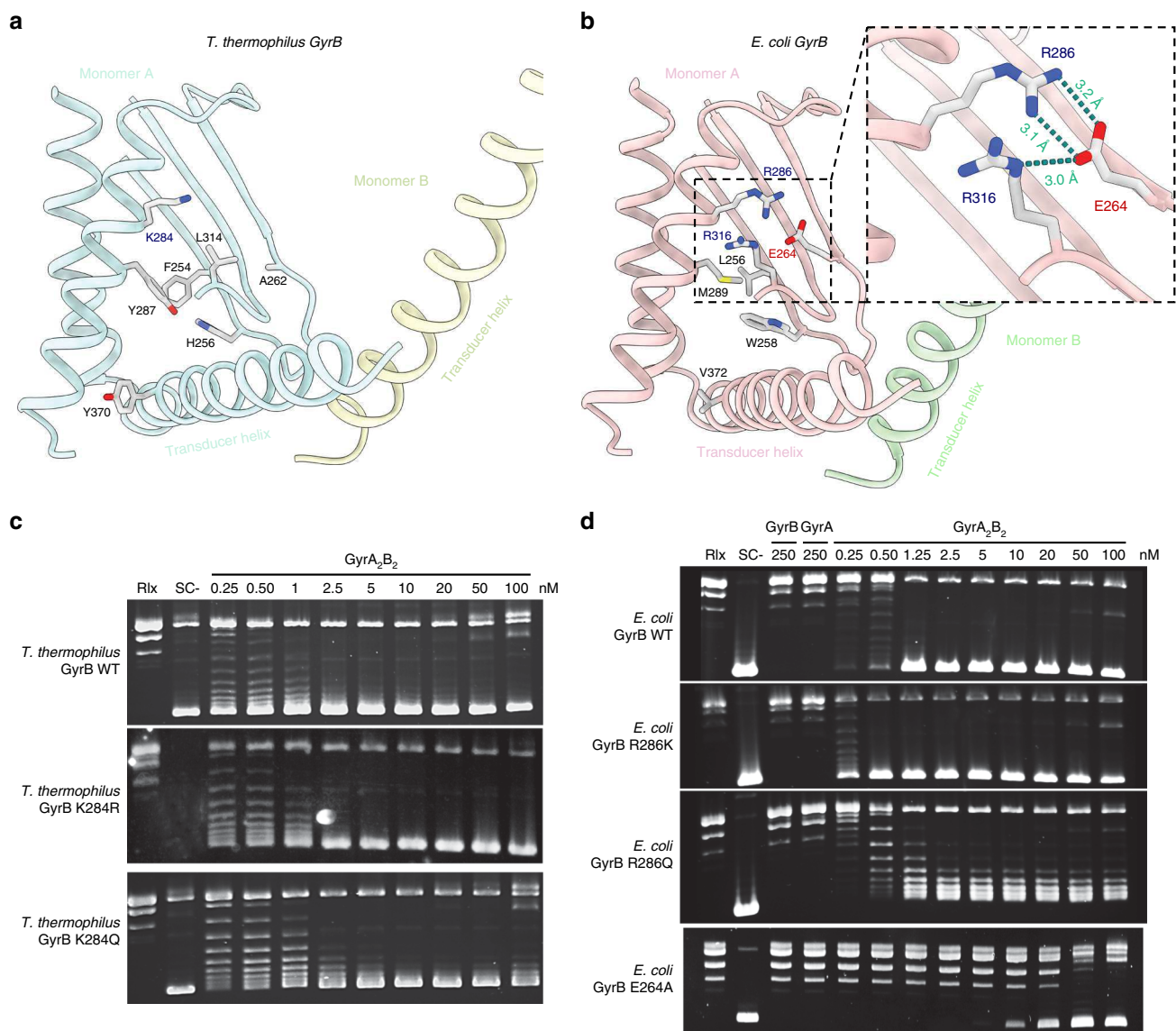


Fig. 4 Transducer structural elements involved in allosteric regulation. **a** Cartoon representation of the *T. thermophilus* GyrB transducer domain. The K284 residue is not engaged in an interaction network. The transducer is mainly stabilized by a hydrophobic core (only side chains different in the two species are displayed) and a hydrogen bond involving H256 and Y287. **b** Cartoon representation of the *E. coli* GyrB transducer domain. The transducer domain is stabilized by a salt bridge involving R286 and E264 in interaction with R316, anchoring the beta-sheets to the alpha helix. **c** DNA negative supercoiling activities of wild-type, K284R and K284Q *T. thermophilus* DNA gyrase showing no effect of the mutations. Protein concentrations are indicated in nM holoenzyme. Negative and positive controls are shown as relaxed (Rlx) or negatively supercoiled DNA species (SC-), respectively. **d** DNA negative supercoiling activity of wild-type, R286K, R286Q, and E264A *E. coli* DNA gyrase showing no effect of R286K but an impaired activity of the R286Q and E264A mutants. The source data are provided as a Source Data file

however much weaker but it has now been observed in high-resolution cryo-EM maps that negatively charged groups yield weaker densities than positively charged groups⁴². Taken together, it is likely that the cryo-EM structure could contain the requisite metal ions needed by DNA gyrase to perform DNA cleavage.

Discussion

Although the complex was formed with a 180 bp linear DNA template, only 130 bp could be built in the cryo-EM map, showing that the remaining 25 or 50 bp distributed on both sides of the G-segment are highly flexible. This was also observed in the *T. thermophilus* gyrase complex with DNA, where 130 bp out of 155 bp could be docked in the cryo-EM map albeit of a lower

resolution¹². The spatial arrangement of the β -pinwheels induces an overall $\sim 150^\circ$ bending of the G-segment in the *E. coli* gyrase. The 130 bp DNA duplex is chirally wrapped around the β -pinwheel orienting the T-segment in the DNA-gate groove formed by the TOPRIM and tower domains to form a 60° angle positive crossover when T-segment path is extrapolated. The combination of the high bending angle of the G-segment ($\sim 150^\circ$) with the peculiar orientation of the β -pinwheels positions the T-segment to access the DNA-gate with an almost null or negative angle of $\sim -10^\circ$ (Supplementary Fig. 6b). As a consequence, this configuration seems unfavorable to T-segment strand passage and would require a structural rearrangement of the β -pinwheel to proceed further. The *E. coli* structure is reminiscent of a state immediately following G-segment binding and wrapping, a conformational intermediate that could have been trapped by

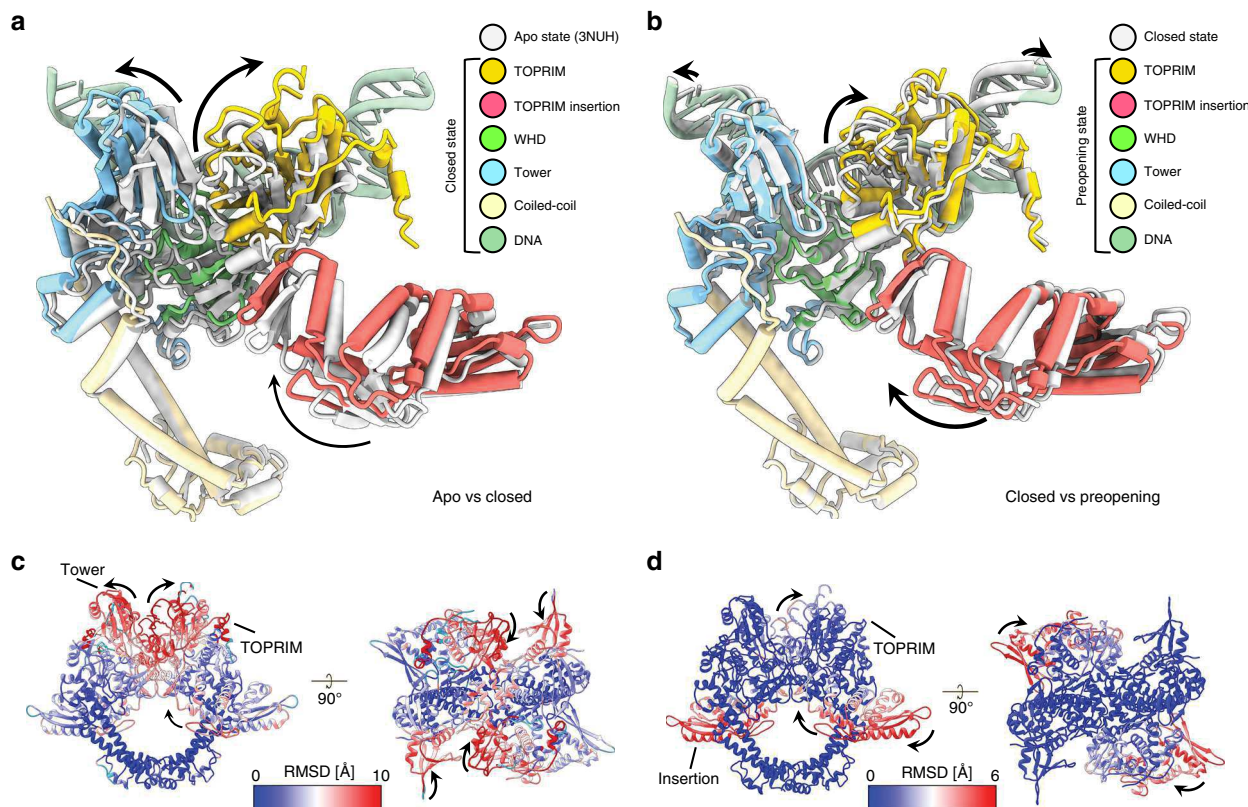


Fig. 5 Conformational changes associated with G-segment binding, cleavage and opening. **a** Superimposition of the cleavage complex in a closed state (this study) to the DNA-free DNA-binding/cleavage domain (*apo* state, PDB ID 3NUH). Only one monomer of GyrB and GyrA is displayed for clarity. The superimposition shows that the majority of the movements are performed by the TOPPRIM and Tower domains upon DNA binding and cleavage. **b** Superimposition of the cleavage complex in the pre-opening state to the closed state. The superimposition shows the upward movement of the TOPPRIM domain while the tower domain remains fixed. The TOPPRIM insertion domain pivots around the N-terminal GyrA arm preceding opening of the G-segment after cleavage. **c** RMSD analysis of the DNA-binding/cleavage domain in *apo* state and cleavage complex in closed conformation. **d** RMSD analysis of the cleavage complex in closed conformation to the pre-opening conformation

gepotidacin. Interestingly, a recent single-molecule study identified a Ω conformational state after G-segment binding, possibly similar to the *E. coli* complex and preceding the α state in the catalytic cycle, a conformation favorable to the T-segment strand passage¹³. This transition would require a different orientation of the pinwheels which motion might be controlled and regulated by the acidic CTD tail in contact with the DNA-gate as previously suggested⁴³.

During T-segment strand passage, the DNA-binding/cleavage domain needs to undergo several conformational changes. Crystal structures of DNA-binding/cleavage domains in different states have led to propose that the DNA-gate opening is achieved by a sliding and swiveling motion of the two halves against each other, breaking the G-segment axis^{2,3,39,44}. A recent structure of the hsTop2 β DNA-binding/cleavage domain was solved in an open conformation, revealing a funnel-shaped channel ready for the entry of T-segment⁴⁰. Besides, MD simulation of the T-segment crossing through the open DNA-gate suggested the presence of a conformation where the central cavity is widened and flattened, a state previously observed in a crystal structure of the *B. subtilis* DNA gyrase⁴⁵. Consequently, the high degree of structural conservation of the bacterial and the human Top2 β suggests that this mechanism of sliding and swiveling can be extended to the bacterial Topo IIA, and thus to DNA gyrase. In this context, the pre-opening conformation of the cleavage complex represents one of the discreet steps that DNA gyrase undergoes to open the DNA-gate (Supplementary Movie 2). In *E. coli*, this step might be further controlled by the presence of the GyrB insertion domain.

Deletion of the insertion was shown to greatly reduce the DNA binding, supercoiling and DNA-stimulated ATPase activities of *E. coli* DNA gyrase¹⁷. The subtle swiveling movement of the GyrB insertion domain around the N-terminal arm of GyrA leads to a controlled stretching of the G-segment by 5 Å and spatial separation of the TOPPRIM and Tower domains, a necessary step for the formation of the groove that will accommodate the T-segment. In the light of our structural study, the insertion in the TOPPRIM domain may presumably act as a steric counterweight amplifying the movements of the DNA-gate.

The DNA-gate opening is coupled to ATP hydrolysis through the transducer region whose cavity is thought to accommodate a DNA T-segment, as evidenced by recent structural data on a bacterial Topo IV ATPase domain with an oligonucleotide⁴⁶. Basic residues lining the transducer cavity and in particular residue R286 in the *E. coli* ATPase domain are thought to contribute to DNA capture and enzyme allostery³⁷. The GHKL region of the ATPase domain shows a strong sequence identity across species due to the universal conservation of the catalytic motifs, with more variability across the transducer sequence (Supplementary Fig. 8). In *T. thermophilus*, the equivalent position K284 is pointing in the cavity and could potentially mediate an interaction with DNA; however, our experiments show that point mutations have no effect on the catalytic activities. In contrast, the analysis of the *E. coli* structure shows that R286 is engaged in an interaction network with E264 and R316 anchoring together secondary structures of the transducer and providing rigidity to the transducer terminal helix (Fig. 4b). In

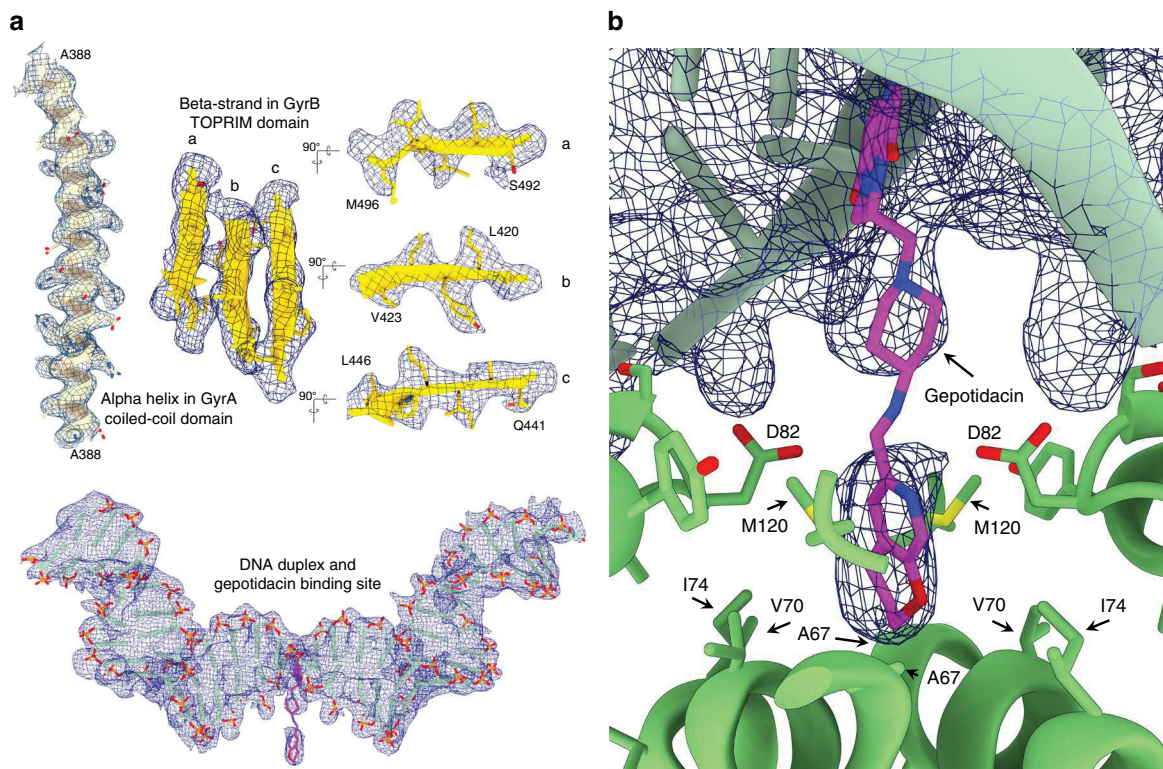


Fig. 6 High-resolution features of the DNA-binding/cleavage domain bound to gepotidacin. **a** High-resolution features of the 4 Å cryo-EM map. An alpha helix and beta-sheet with well resolved side chains are shown on the upper panel. The 36 bp DNA duplex and gepotidacin are shown in the bottom panel. **b** Gepotidacin binding site. Electron density of the DNA and gepotidacin are shown in blue mesh. Residues in the direct vicinity of the compound are highlighted

T. thermophilus, the transducer is instead stabilized by a hydrophobic core where aliphatic side chains are replaced by aromatic residues and a different hydrogen bond network, notably involving H256 and Y287 (Fig. 4a). Rather than a direct effect involving DNA contact, we conclude that efficient allosteric transmission of ATP hydrolysis relies on the transducer rigidity that is maintained by species-specific interaction networks. It is not clear at this stage if DNA capture and transport is directly linked to the basic residues in the transducer and at which catalytic step molecular interaction with the T-segment intervenes. The full architecture of the complex in presence of a T-segment still needs to be determined to better understand the molecular determinants of DNA capture.

The complete DNA binding around the β -pinwheel surface generates a twisting of $\sim 200^\circ$ consistent with the reported wrapping around DNA gyrase pinwheel blades⁴⁷. The structure of the β -pinwheel adopts a slight superhelical twist as previously observed in the crystal structure of the isolated domain¹⁰ (Fig. 3b and Supplementary Fig. 6c). The highly conserved GyrA-box motif, QRRGGK⁴⁸, located on the first blade of the β -pinwheels is essential for DNA wrapping (Fig. 3a, b). Complete deletion or alanine substitution of this motif completely abolishes the negative supercoiling activity⁴⁹. By elucidating the spatial localization of the GyrA-box motif when DNA gyrase is bound to DNA, we show here why the GyrA-box motif is crucial in wrapping DNA. The position of the GyrA-box suggests that it acts as a clamp maintaining the DNA wrapped around the β -pinwheel with strong interaction that can compensate for the energetically unfavorable configuration of the twisted DNA (Fig. 3c). This explains the role of the GyrA-box behaving as a ‘at the end of the wrap’ mechanism, consistent with previous studies^{50,51}. In addition, the analysis of the complex overall conformation shows that

the β -pinwheels are oriented in a way that the CTD tail could face the GyrB TOPRIM domain. The CTD sequence of *E. coli* DNA gyrase is composed of an unfolded and poorly conserved acidic tail starting at the end of the β -pinwheel structure (Supplementary Fig. 13a). Several biochemical studies have shown that the CTD tail stimulates DNA wrapping coupled with ATP hydrolysis^{43,52}. Modeling of the 34 residues of the *E. coli* CTD tail shows that it could easily reach and contact the TOPRIM insertion domain (Supplementary Fig. 13b). Conformational changes of the DNA-gate from closed to pre-opening state may conduct a signal to the β -pinwheel through the tethered acidic tail promoting a β -pinwheel vertical movement. This interaction might also drive the relative orientation of the β -pinwheels wrapped with DNA, positioning the T-segment in the proper direction for transport to the DNA-gate.

The high-resolution features of the DNA-binding/cleavage domain structure now makes it possible to detect the density of small molecules and possibly catalytic ions in the cryo-EM map. We were able to observe the gepotidacin molecule inserted in the DNA on the two-fold axis at the GyrA dimer interface, as previously observed in crystal structures of the *S. aureus* DNA gyrase in complex with the NBTI^{22,25,40,41}. Gepotidacin is currently in clinical trials for the treatment of *N. gonorrhoeae* infections^{23,24}, a species that is phylogenetically closer to *E. coli* and also harbors an isoleucine at this position in the gyrase sequence (Supplementary Fig. 11b, c). The comparison of the cryo-EM map with the electron density map of crystal structures²⁵ shows that the cryo-EM map information is of comparable quality in this region for the identification of small compounds (Supplementary Fig. 14).

Based on this study, we foresee that it is now possible to consider cryo-EM as a viable tool to perform structure-guided

drug design to target flexible complexes and identify new conformations of DNA gyrase that could so far not be obtained by conventional structural methods.

Methods

GyrB and GyrA expression and purification. The sequence coding for the full-length *E. coli* GyrA (2-875) was inserted into a modified pET28b containing an N-terminal 10-His tag and a C-terminal Twin-strep tag. Overexpression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 in LB medium containing 50 µg/mL kanamycin and 35 µg/mL chloramphenicol. Cells were induced with 0.35 mM IPTG after reaching an OD₆₀₀ 0.85 and protein was expressed at 37 °C for 4 h. Cells were harvested and resuspended in lysis buffer (20 mM Hepes, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% v/v glycerol, pH 8.0) and lysed with three cycles of high-pressure disruption using EmulsiFlex-C3 at 1500 bars. The GyrA protein was purified by nickel-affinity chromatography on a manually packed XK 26/20 column (Pharmacia) with Chelating Sepharose 6 Fast Flow resin (GE Healthcare) bound to Ni²⁺ ions. Elution was performed with the lysis buffer containing 250 mM imidazole pH 8.0 and eluted proteins were directly attached on a 10 ml Streptavidin Sepharose (GE Healthcare). Proteins were extensively washed with Strep buffer (20 mM Hepes, 60 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% v/v glycerol, pH 8.0) and eluted with Strep buffer containing 3 mM Dethiobiotin (Sigma–Aldrich). Both 10-His tag and Twin-strep tag were subsequently cleaved by PreScission protease (P3C) and Tobacco Etch Virus (TEV) cleavage (mass ratio 1:1:50 P3C-TEV-GyrA) overnight at 4 °C. GyrA was then further purified by an anion exchange chromatography step using a HiTrap Q HP column (GE Healthcare). The protein was eluted with a linear gradient of 20 column volumes with buffer B (20 mM Hepes, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% v/v glycerol, pH 8.0). Fractions containing GyrA were pooled and loaded on a Superdex S200 16/60 size-exclusion chromatography column (GE Healthcare) using 20 mM Hepes, 50 mM NaGlu, 50 mM KAc, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% v/v glycerol, pH 8.0. 37 mg of GyrA were obtained from 3 L of cultures. The GyrB (2-804) coding sequence was inserted into the same modified pET28b. Overexpression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) pRARE2 in LB medium containing 50 µg/mL kanamycin and 35 µg/mL chloramphenicol. Cells were induced with 0.35 mM IPTG after reaching an OD₆₀₀ 0.85 and protein was expressed at 18 °C for 18 h. The GyrB purification procedure is as described above for GyrA. 10 mg of GyrB were obtained from 3 L of cultures.

Full DNA gyrase reconstitution. *E. coli* GyrA and GyrB were mixed at equimolar ratio to allow full DNA gyrase reconstitution. The complex was further purified on a Superdex S200 16/60 size-exclusion chromatography column (GE Healthcare) using cryo-EM buffer (20 mM Hepes, 30 mM NaGlu, 30 mM KAc, 2 mM MgAc, 0.5 mM TCEP, pH 8.0) (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1).

Nucleic acid preparation. A double-nicked 180 bp DNA duplex was reconstituted using 2 phosphorylated asymmetric synthetic oligonucleotides¹² obtained from Sigma–Aldrich (Supplemental Table 1). Briefly, the nucleic acids were dissolved in DNase-free water at 1 mM concentration. To assemble the double-stranded DNA, each oligo was mixed at 1:1 molar ratio, annealed by incubating at 95 °C for 2 min and then decreasing the temperature by 1 °C every 1 min until reaching 20 °C. The annealed doubly nicked DNA duplex was then buffer-exchanged in Hepes 20 mM pH 8.0 with a BioSpin 6 column (BioRad).

Complex formation for cryo-EM. The purified DNA gyrase was mixed with the 180 bp dsDNA at 1:1 molar ratio with a final protein and DNA concentration of 32 µM. The mixture was incubated for 10 min at 37 °C. Gepotidacin (GSK2140944, purchased at MedChemExpress) resuspended at 10 mM in 100% DMSO was added to reach a final concentration of 170 µM (1.7% DMSO). The mixture was incubated for 10 min at 37 °C. AMP-PNP (Sigma) was added to the complex at a final concentration of 340 µM. The fully reconstituted complex was further incubated 30 min at 30 °C. Finally, 8 mM CHAPSO (Sigma–Aldrich) was added to the complex. The sample was centrifuged 2 h at 16,000 × g to remove potential aggregates.

Cryo-EM grid preparation. Quantifoil R-1.2/1.3 300 mesh copper grids were glow-charged for 20 s prior to the application of 4 µl of the complex. After 30 s of incubation, the grids were plunge-frozen in liquid ethane using a Vitrobot mark IV (FEI) with 95% chamber humidity at 10 °C.

Electron microscopy. Cryo-EM imaging was performed on a Titan Krios microscope operated at 300 kV (FEI) equipped with a K2 Summit direct electron camera (Gatan), a GIF Quantum energy filter (Gatan) operated in zero-energy-loss mode with a slit width of 20 e⁻ V, a Volta Phase Plate (FEI) and a CS corrector (FEI). Images were recorded in EFTEM nanoprobe mode with Serial EM⁵³ in super-resolution counting mode at nominal magnification of 130,000x with a super-resolution pixel size of 0.44 Å and a constant defocus target of ~500 nm (Supplementary Fig. 2c). The VPP was advanced to a new position every 100 min (Supplementary Fig. 2b). Four

datasets were collected with a dose rate of 6 to 8 e⁻/pixel/s (0.88 Å pixel size at the specimen) on the detector. Images were recorded with a total dose of 50 e⁻/Å², exposure time between 7 to 10 s and 0.2 to 0.25 s subframes (35 to 50 total frames). A total of 11,833 movies were recorded after data collection of the 4 datasets.

Data processing. Data processing of each dataset was done separately following the same procedure until the 3D refinements when particles were merged. The super-resolution dose-fractionated subframes were gain-corrected with IMOD⁵⁴ and binned twice by Fourier-cropping, drift-corrected and dose-weighted using MotionCor2⁵⁵ yielding summed images with 0.88 Å pixel size. The contrast transfer function of the corrected micrographs was estimated using GCTF v1.06⁵⁶. Thon rings were manually inspected for astigmatism and micrographs with measured resolutions worse than 4 Å were discarded yielding 8,701 remaining micrographs. Particles were automatically picked by reference-free Gaussian blob picking protocol in RELION^{29,30}. Taking together the 4 datasets, a total of 1,572,962 particles were selected. Four times binned particles from each dataset were separately subjected to two rounds of 2D classification in RELION2 to remove junk particles and contaminations resulting in a total of 479,667 particles for further processing. Particles from the four datasets were merged into one unique dataset followed by a re-extraction with centering in 3 × 3 binned format. A last round of 2D classification was then performed yielding a final particle stack of 338,616 particles. The subsequent particle stack was subjected to one round of 3D *ab-initio* classification in cryoSPARC³¹. After discarding the poor-quality models, the remaining *ab-initio* model resulted in a final dataset of 191,456 particles, with a class probability threshold of 0.9 (Supplementary Fig. 2a). The *ab-initio* model was low-pass filtered to 30 Å and was used as a reference for homogeneous refinement in cryoSPARC resulting in a 5.4 Å map. The refined particle coordinates were then used for local CTF estimation using GCTF v1.06 followed by re-extraction of 2 × 2 binned particles with centering. This new particle stack was subjected to a 3D auto-refinement in RELION2 using the *ab-initio* model low-pass filtered at 30 Å yielding a map with a global resolution of 5.0 Å (Supplementary Fig. 3). Local resolution showed a range of resolution from 4.0 Å in the DNA-binding/cleavage core to 9.0 Å in the ATPase domain and the GyrA β-pinwheel wrapping the DNA, indicative of high flexibility of these two modules. To obtain a final reconstruction of the full complex with well-defined densities for each domain, we performed 3D classification without alignment yielding several different classes. Particles from three classes were merged (94,633 particles). The subsequent 1 × 1-binned particles stack was refined in RELION2 without mask until late refinement iterations where a soft mask was applied to improve resolution. Post-processing of the map yielded a 6.6 Å resolution reconstruction of the overall complex (Supplementary Fig. 3).

A combination of different local approaches was used to identify different conformations and to improve local resolution of each domain. Since the ATPase domain was too small for a 3D focused refinement, we first performed a focused 3D classification of the ATPase domain with a soft mask and no alignment in RELION2. One class of 58,329 particles with a well-defined density of the ATPase domain was selected, followed by re-extraction of 1 × 1-binned particles yielding particles with pixel size of 0.88 Å/pixel. To facilitate an accurate alignment of the particles, this class was further refined in RELION2 using a soft mask around the ATPase domain and the DNA-binding/cleavage domain yielding a 5.9 Å global resolution map (ATPase-Core) (Supplementary Fig. 3).

Secondly, we performed a focused 3D classification of the GyrA β-pinwheel with a soft mask and no alignment in RELION2. One class of 45,040 particles with a well-defined density of the GyrA β-pinwheel was selected, followed by re-extraction of 1 × 1-binned particles yielding particles with pixel size of 0.88 Å/pixel. This class was further refined in RELION2 using a soft mask around the β-pinwheel and the DNA-binding/cleavage domain yielding a 6.3 Å resolution map (CTD-Core) (Supplementary Fig. 3).

Finally, a focused 3D auto-refinement was performed in RELION2 using a soft mask around the DNA-binding/cleavage domain. Post-processing of the map produced a 4.3 Å resolution reconstruction of the DNA-binding/cleavage domain. Then, a focused 3D classification of the DNA-binding/cleavage domain was performed. Two of the classes showed better angular accuracies and distinct closed (60,548 particles) and pre-opening conformations (53,655 particles) of the DNA-binding/cleavage domain. These two classes were further refined in RELION2 by focused 3D refinement with a C2 symmetry using 1 × 1 binned particles and gave reconstructions with global resolution of 4.0 and 4.6 Å after post-processing, respectively (Supplementary Fig. 3). The closed DNA-binding/cleavage domain was further refined by focused 3D refinement using a soft mask, which excludes the disordered TOPRIM insertion yielding a 4.0 Å map of high quality (Supplementary Fig. 3).

All reported resolutions are based on the gold standard FSC-0.143 criterion⁵⁷ and FSC-curves were corrected for the convolution effects of a soft mask using high-resolution noise-substitution⁵⁸ in RELION2 as well as in cryoSPARC (Supplementary Fig. 4a). All reconstructions were sharpened by applying a negative B-factor that was estimated using automated procedures⁵⁹. Local resolution of maps was calculated using Blocres⁶⁰ (Supplementary Fig. 4c). The cryo-EM maps of the overall complex, ATPase-core, CTD-core and the DNA-binding/cleavage domain in closed (with and without TOPRIM insertion) and in pre-opening state have been deposited in the EM Data Bank under accession numbers EMD-4913, EMD-4914, EMD-4915, EMD-4910, EMD-4909, EMD-4912, respectively.

Model building and refinement. The EM reconstruction of the DNA-binding/cleavage domain lacking the TOPRIM insertion solved at 4.0 Å was of the best quality. Almost all side chains could be seen and Gepotidacin density was clearly visible. This map was used to refine a crystal structure of the DNA-binding/cleavage domain of the *E. coli* DNA gyrase¹⁷. A dimeric atomic model of the DNA-binding/cleavage domain was generated using PDB 3NUH in PyMol (Schrodinger L.L.C.). The subsequent atomic model was stripped of amino acids belonging to the TOPRIM insertion, all ions and water molecules, with all occupancies set to 1 and B-factors set to 50. First, the atomic model was rigid-body fitted in the filtered and sharpened map with Chimera⁶¹. A first round of real-space refinement in PHENIX⁶² was performed using local real-space fitting and global gradient-driven minimization refinement. Then, 20 nucleic acids from the structure of *S. aureus* DNA gyrase⁴¹ (PDB 5IWM) were copied and fitted into our atomic model. DNA sequence was modified according to the DNA used in our structure. Missing protein residues and nucleic acids were manually built in COOT⁶³. Atomic model and constraint dictionary of gepotidacin (GSK-2140944) were generated with the Grade server (<http://grade.globalphasing.org>). Gepotidacin was then manually fitted in the empty electron density in COOT and then duplicated. Both duplications were set to 0.5 occupancy. Several rounds of real-space refinement in PHENIX using restraints for secondary structure, rotamers, Ramachandran, and non-crystallographic symmetry were performed, always followed by manual inspection in COOT, until a converging model was obtained. Finally, B-factors were refined by a final round of real-space refinement in PHENIX using the same settings as before. After the refinement has converged, atomic coordinates of the TOPRIM insertion were added to the atomic model. It was further refined in the EM reconstructions containing the insertion density in closed and pre-open states using the same procedure. A half-map cross-validation was performed to define 1.5 as the best refinement weight in PHENIX allowing atom clash reduction and prevention of model overfitting (Supplementary Fig. 4e). All refinement steps were done using the resolution limit of the reconstructions according to the gold standard FSC-0.143 criterion⁵⁷. Refinement parameters, model statistics and validation scores are summarized in Supplementary Table 2. The atomic models of the *E. coli* DNA-binding/cleavage domain in closed (with and without insertion) and pre-opening conformations have been deposited in the Protein Data Bank under accession numbers 6RKU, 6RKS, 6RKV, respectively.

For the overall complex, we used a combination of different EM reconstructions to build the DNA gyrase overall complex atomic model. The ATPase-Core structure solved at 5.9 Å was used to rigid-body fit in Chimera the ATPase domain crystal structure in complex with ADPNP³² (PDB 1E1I) and the DNA-binding/cleavage domain refined in closed conformation. The quality of the electron density allowed to build in COOT the missing residues of the linker between the ATPase domain and the DNA-binding/cleavage domain. The CTD-Core structure solved at 6.3 Å was used to accurately rigid-body fit the β -pinwheel crystal structure¹⁰ in Chimera. The 10 missing amino acids (564–574) following the GyrA-box were added using the modelling server Phyre2⁶⁴. The quality of the electronic density allowed to build in COOT the missing nucleic acids around the β -pinwheel as well as the 10 amino acids linking the last GyrA residues to the β -pinwheel. Based on a secondary structure prediction, a part of the linker was built as an alpha helix (Fig. 3). The subsequent atomic model containing the ATPase domain, the DNA-binding/cleavage domain and one β -pinwheel was rigid-body fitted into the overall complex structure solved at 6.6 Å using Chimera. Then, a copy of the first β -pinwheel was fitted into the density of the second β -pinwheel in COOT. The missing nucleic acids around the second β -pinwheel as well as the missing 10 residues of the linker were manually built in COOT. The resulting atomic model was stripped of all ions and water molecules, with all occupancies set to 1 and B-factors set to 50. Finally, real-space refinement of the atomic model against the overall complex structure was performed in PHENIX using rigid-body and global gradient-driven minimization refinement. Resolution limit for refinement was set according to the gold standard FSC-0.143 criterion⁵⁷. Half-map cross-validations were also performed (Supplementary Fig. 4e). Refinement parameters, model statistics and validation scores are summarized in Supplementary Table 2. The atomic model of the overall structure has been deposited in the Protein Data Bank under accession numbers 6RKW. All the Figures were created with Chimera⁶¹, ChimeraX⁶⁵ and PyMol (Schrodinger L.L.C.).

***E. coli* GyrB R286K, R286Q, and E264A purification.** The modified pET28b used for wild-type *E. coli* GyrB overexpression was mutated by site-directed mutagenesis using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent) in order to generate three plasmids harboring R286K, R286Q, or E264A mutations (Supplementary Table 4). Overexpression and purification procedures for the three mutants are identical to the wild-type GyrB described above in the Methods section.

***T. thermophilus* GyrB K284R, K284Q purification.** The modified pET28b used for wild-type *T. thermophilus* GyrB overexpression¹² was mutated by site-directed mutagenesis using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent) in order to generate two plasmids harboring K284R or K284Q mutations (Supplementary Table 4). Overexpression and purification procedures for the two mutants are identical to the *E. coli* wild-type GyrB described above in the Methods section.

DNA supercoiling assay. An increasing concentration of DNA gyrase (GyrA₂B₂) was incubated at 37 °C with 6 nM of relaxed pUC19 plasmid in a reaction mixture

containing 20 mM Tris-acetate pH 7.9, 100 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 100 µg/ml BSA. After 30 min, reactions were stopped by addition of SDS 1%. Agarose gel electrophoresis was used to monitor the conversion of relaxed pUC19 to the supercoiled form. Samples were run on a 0.8% agarose, 1X Tris Borate EDTA buffer (TBE) gel, at 6 V/cm for 180 min at room temperature. Agarose gels were stained with 0.5 mg/ml ethidium bromide in 1X TBE for 15 min, followed by 5 min destaining in water. DNA topoisomers were revealed using a Typhoon (GE Healthcare).

ATPase activity assay. ATP hydrolysis is measured by following the oxidation of NADH mediated by pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH). The absorbance was monitored at 340 nm over 600 s at 37 °C with a Shimadzu 1700 spectrophotometer. Reactions were recorded in triplicates with 50–100 nM of GyrA₂B₂ and 16 nM linear DNA (pCR-blunt) in 500 µl of a buffer containing 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 7 mM BME, 100 µg/mg of BSA, 4U/5U of PK/LDH mixture, 2 mM PEP, and 0.2 mM NADH.

Multiple alignment and evolutionary conservation of residues. GyrB ATPase/Transducer protein sequences from 30 species (Uniprot codes: GYRB_STRCO, *Streptomyces coelicolor*; A0A3A2T2C3_LISMN, *Listeria monocytogenes*; W8F4Q2_AGR4, *Agrobacterium tumefaciens*; Q83FD5_COXBU, *Coxiella burnetii*; GYRB_ECOLI, *Escherichia coli*; GYRB_NEIGO, *Neisseria gonorrhoeae*; GYRB_SALTY, *Salmonella typhimurium*; Q7V9N3_PROMA, *Prochlorococcus marinus*; GYRB_STRR6, *Streptococcus pneumoniae*; GYRB_MYCPN, *Mycoplasma pneumoniae*; GYRB_SHIFL, *Shigella flexneri*; GYRB_PSEAE, *Pseudomonas aeruginosa*, Q18C89_PEPD6, *Clostridium difficile*; GYRB_RICFE, *Rickettsia felis*; Q8CZG1_YERPE, *Yersinia pestis*; GYRB_BORBU, *Borrelia burgdorferi*; GYRB_ENTFA, *Enterococcus faecalis*; Q8YEQ5_BRUME, *Brucella melitensis*; GYRB-STAAU, *Staphylococcus aureus*; Q7VQU8_BLOFL, *Blochmannia floridanus*; GYRB_HAEIN, *Haemophilus influenzae*; GYRB_MYCTU, *Mycobacterium tuberculosis*; GYRB_THEMEA, *Thermotoga maritima*; GYRB_THET8, *Thermus thermophilus*; GYRB_BACSU, *Bacillus subtilis*; GYRB_HELPHY, *Helicobacter pylori*; GYRB_CHLTR, *Chlamydia trachomatis*; GYRB_VIBCH, *Vibrio cholerae*; GYRB_THEAQ, *Thermus aquaticus*; GYRB_AQUAE, *Aquifex aeolicus*) were aligned using the Clustal Omega server (EMBL-EBI). The subsequent alignment was used to plot the amino acids evolutionary conservation on the ATPase/transducer structure (PDB ID 1E1I) using the ConSurf server (<http://consurf.tau.ac.il>). The phylogenetic tree was generated by neighbour-joining method using the multiple alignment in Clustal Omega.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

Model coordinates and density maps are available in the Protein Data Bank (PDB ID 6RKS [<https://www.rcsb.org/structure/6RKS>], 6RKU [<https://www.rcsb.org/structure/6RKU>], 6RKV [<https://www.rcsb.org/structure/6RKV>], 6RKW [<https://www.rcsb.org/structure/6RKW>]) and the EM Data Bank (EMD-4909 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4909>], EMD-4910 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4910>], EMD-4912 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4912>], EMD-4913 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4913>], EMD-4914 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4914>], EMD-4915 [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/emdb/EMD-4915>]). The source data underlying Figs. 1a, 4c, d and Supplementary Fig. 9b are provided as a Source Data file. Other data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 10 May 2019; Accepted: 7 October 2019;

Published online: 30 October 2019

References

- Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 430–440 (2002).
- Vos, S. M., Tretter, E. M., Schmidt, B. H. & Berger, J. M. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 827–841 (2011).
- Schoeffler, A. J. & Berger, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q. Rev. Biophys.* **41**, 41–101 (2008).
- Bush, N. G., Evans-Roberts, K. & Maxwell, A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* **6** <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2014> (2015).
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**, 3872–3876 (1976).

6. Roca, J. & Wang, J. C. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* **77**, 609–616 (1994).
7. Roca, J., Berger, J. M., Harrison, S. C. & Wang, J. C. DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 4057–4062 (1996).
8. Wigley, D. B., Davies, G. J., Dodson, E. J., Maxwell, A. & Dodson, G. Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**, 624–629 (1991).
9. Morais Cabral, J. H. et al. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**, 903–906 (1997).
10. Ruthenburg, A. J., Graybosch, D. M., Huetsch, J. C. & Verdine, G. L. A superhelical spiral in the Escherichia coli DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J. Biol. Chem.* **280**, 26177–26184 (2005).
11. Soczek, K. M., Grant, T., Rosenthal, P. B. & Mondragon, A. CryoEM structures of open dimers of gyrase A in complex with DNA illuminate mechanism of strand passage. *elife* **7**, e41215 (2018).
12. Papillon, J. et al. Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7815–7827 (2013).
13. Basu, A. et al. Dynamic coupling between conformations and nucleotide states in DNA gyrase. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 565–574 (2018).
14. Basu, A., Parente, A. C. & Bryant, Z. Structural dynamics and mechanochemical coupling in DNA Gyrase. *J. Mol. Biol.* **428**, 1833–1845 (2016).
15. Gubaev, A. & Klostermeier, D. The mechanism of negative DNA supercoiling: a cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA Repair (Amst.)* **16**, 23–34 (2014).
16. Stelljes, J. T., Weidlich, D., Gubaev, A. & Klostermeier, D. Gyrase containing a single C-terminal domain catalyzes negative supercoiling of DNA by decreasing the linking number in steps of two. *Nucleic Acids Res.* **46**, 6773–6784 (2018).
17. Schoeffler, A. J., May, A. P. & Berger, J. M. A domain insertion in Escherichia coli GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7830–7844 (2010).
18. Collin, F., Karkare, S. & Maxwell, A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 479–497 (2011).
19. Heide, L. New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 31–36 (2014).
20. Delgado, J. L., Hsieh, C. M., Chan, N. L. & Hiasa, H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem. J.* **475**, 373–398 (2018).
21. Vanden Broeck, A., McEwen, A. G., Chebaro, Y., Potier, N. & Lamour, V. Structural basis for DNA Gyrase interaction with coumermycin A1. *J. Med. Chem.* **62**, 4225–4231 (2019).
22. Bax, B. D. et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* **466**, 935–940 (2010).
23. Biedenbach, D. J. et al. In vitro activity of gepotidacin, a novel triazaacenaphthylene bacterial topoisomerase inhibitor, against a broad spectrum of bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1918–1923 (2016).
24. Scangarella-Oman, N. E. et al. Microbiological analysis from a phase 2 randomized study in adults evaluating single oral doses of gepotidacin in the treatment of uncomplicated urogenital gonorrhoea caused by Neisseria gonorrhoeae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01221–18 (2018).
25. Gibson, E. G., Bax, B., Chan, P. F. & Osheroff, N. Mechanistic and structural basis for the actions of the antibacterial gepotidacin against Staphylococcus aureus Gyrase. *ACS Infect. Dis.* **5**, 570–581 (2019).
26. Pommier, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.* **8**, 82–95 (2013).
27. Danev, R. & Baumeister, W. Cryo-EM single particle analysis with the Volta phase plate. *Elife* **5**, e13046 (2016).
28. Khoshouei, M., Radjainia, M., Baumeister, W. & Danev, R. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nat. Commun.* **8**, 16099 (2017).
29. Kimanius, D., Forsberg, B. O., Scheres, S. H. & Lindahl, E. Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. *elife* **5**, e18722 (2016).
30. Scheres, S. H. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* **180**, 519–530 (2012).
31. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **14**, 290–296 (2017).
32. Brino, L. et al. Dimerization of Escherichia coli DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J. Biol. Chem.* **275**, 9468–9475 (2000).
33. Petrella, S. et al. Overall structures of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase reveal the role of a corynebacteriales GyrB-specific insert in ATPase activity. *Structure* **27**, 579–589 e5 (2019).
34. Dong, K. C. & Berger, J. M. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature* **450**, 1201–1205 (2007).
35. Schmidt, B. H., Osheroff, N. & Berger, J. M. Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1147–1154 (2012).
36. Stanger, F. V., Dehio, C. & Schirmer, T. Structure of the N-terminal Gyrase B fragment in complex with ADPPi reveals rigid-body motion induced by ATP hydrolysis. *PLoS ONE* **9**, e107289 (2014).
37. Tingey, A. P. & Maxwell, A. Probing the role of the ATP-operated clamp in the strand-passage reaction of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4868–4873 (1996).
38. Lamour, V., Hoermann, L., Jeltsch, J. M., Oudet, P. & Moras, D. An open conformation of the Thermus thermophilus gyrase B ATP-binding domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 18947–18953 (2002).
39. Chen, S. F. et al. Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II DNA-gate. *Nat. Commun.* **9**, 3085 (2018).
40. Chan, P. F. et al. Thiophene antibacterials that allosterically stabilize DNA-cleavage complexes with DNA gyrase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, E4492–E4500 (2017).
41. Miles, T. J. et al. Novel tricyclics (e.g., GSK945237) as potent inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 2464–2469 (2016).
42. Wang, J. & Moore, P. B. On the interpretation of electron microscopic maps of biological macromolecules. *Protein Sci.* **26**, 122–129 (2017).
43. Tretter, E. M. & Berger, J. M. Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: I. A nonconserved acidic C-terminal tail modulates Escherichia coli gyrase activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 18636–18644 (2012).
44. Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A. & Berger, J. M. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* **424**, 109–124 (2012).
45. Rudolph, M. G. & Klostermeier, D. Mapping the spectrum of conformational states of the DNA- and C-gates in Bacillus subtilis gyrase. *J. Mol. Biol.* **425**, 2632–2640 (2013).
46. Laponogov, I. et al. Trapping of the transport-segment DNA by the ATPase domains of a type II topoisomerase. *Nat. Commun.* **9**, 2579 (2018).
47. Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K. & Berger, J. M. The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 7293–7298 (2004).
48. Ward, D. & Newton, A. Requirement of topoisomerase IV parC and parE genes for cell cycle progression and developmental regulation in Caulobacter crescentus. *Mol. Microbiol.* **26**, 897–910 (1997).
49. Kramlinger, V. M. & Hiasa, H. The “GyrA-box” is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J. Biol. Chem.* **281**, 3738–3742 (2006).
50. Costenaro, L., Grossmann, J. G., Ebel, C. & Maxwell, A. Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of the full-length DNA gyrase a subunit. *Structure* **13**, 287–296 (2005).
51. Lanz, M. A. & Klostermeier, D. The GyrA-box determines the geometry of DNA bound to gyrase and couples DNA binding to the nucleotide cycle. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10893–10903 (2012).
52. Lanz, M. A., Farhat, M. & Klostermeier, D. The acidic C-terminal tail of the GyrA subunit moderates the DNA supercoiling activity of Bacillus subtilis gyrase. *J. Biol. Chem.* **289**, 12275–12285 (2014).
53. Mastronarde, D. N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* **152**, 36–51 (2005).
54. Mastronarde, D. N. & Held, S. R. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD. *J. Struct. Biol.* **197**, 102–113 (2017).
55. Zheng, S. Q. et al. MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* **14**, 331–332 (2017).
56. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* **193**, 1–12 (2016).
57. Scheres, S. H. & Chen, S. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **9**, 853–854 (2012).
58. Chen, S. et al. High-resolution noise substitution to measure overfitting and validate resolution in 3D structure determination by single particle electron cryomicroscopy. *Ultramicroscopy* **135**, 24–35 (2013).
59. Rosenthal, P. B. & Henderson, R. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* **333**, 721–745 (2003).
60. Heymann, J. B. & Belnap, D. M. Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 3–18 (2007).
61. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).

62. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
63. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
64. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).
65. Goddard, T. D. et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **27**, 14–25 (2018).

Acknowledgements

We thank the teams of B. Klaholz and P. Schultz, as well as A. Weixlbaumer and X. Guo for useful technical suggestions and help with computational resources. This work was supported by the Fondation ARC and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT (managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02). The authors acknowledge the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05 and of Instruct-ERIC. Computational resources were provided by the Mésocentre de Calcul (University of Strasbourg).

Author contributions

A.V.B. and V.L. conceived the study and designed the experiments; A.V.B. and C.L. performed the experiments; A.V.B. and J.O. performed the cryo-EM data collection; A.V.B. processed the cryo-EM data and built the atomic models; A.V.B. and V.L. analyzed and interpreted the data; A.V.B. and V.L. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12914-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to V.L.

Peer review information *Nature Communications* thanks Claudine Mayer, Yuan He and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

3. Discussion

Ce travail portant sur l'étude de l'ADN gyrase en complexe avec un ADN et la gépotidacine a conduit à la détermination structurale de deux conformations du complexe entier. Ces conformations correspondent au domaine de liaison à l'ADN sous forme (1) fermée et (2) pré-ouverte avec des résolutions respectives de 4,0 et 4,6 Å. La résolution obtenue a permis de tracer les hélices du domaine Transducer à la jonction entre les domaines N-terminal et le domaine de liaison à l'ADN. L'utilisation de la Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) a permis la déconvolution de deux états conformationnels, apportant ainsi des informations sur les mouvements générés par le domaine de liaison à l'ADN lors de l'ouverture de la porte à ADN et la séparation du segment G après coupure double brin. La molécule de gépotidacine a pu être identifiée dans la reconstruction du domaine de liaison de l'ADN à une résolution de 3 Å, au même emplacement que dans la structure cristallographique du domaine de liaison à l'ADN de la gyrase de *S. aureus*¹⁵⁸. Ces résultats démontrent ainsi que la Cryo-EM est une méthode adaptée pour le criblage de composés thérapeutiques sur l'ADN gyrase entière.

D'autre part, cette étude a permis de compléter le modèle moléculaire de l'ADN gyrase entière d'*E. coli*, modèle de référence pour les études biochimiques et fonctionnelles de cette classe d'enzyme bactérienne. En effet, seuls les domaines isolés étaient disponibles et de nombreuses connexions entre les domaines ou bien des zones non visibles dans les structures cristallographiques ont pu être corrigées ou reconstruites représentant près de 95% de la séquence totale.

Enfin, l'obtention de ces informations structurales a permis de clarifier le rôle d'un acide aminé dans la communication allostérique entre le domaine ATPase et de liaison à l'ADN. En effet dans la structure de l'étude de Tingey et al.³³⁶ l'arginine 286 située dans le domaine Transducer du domaine ATPase est orientée vers la cavité centrale du domaine N-terminal et sa mutation en glutamine annihile l'activité de surenroulement et inhibe l'hydrolyse de l'ATP. Les auteurs en ont déduit que ce résidu participe au transport du segment T à travers le domaine N-terminal. Cependant, dans la structure résolue en 1991 par Brino et al., l'orientation de R286 suggère que ce résidu est plutôt impliqué dans un réseau d'interaction qui est différent entre *E. coli* et *T. thermophilus*³³⁷. Ce réseau de résidus maintient des éléments de structure secondaire du domaine

Transducer. La mutagenèse dirigée de ces résidus, en modifiant la charge ou la longueur du groupement fonctionnel, perturbe l'activité catalytique et la structure de l'ADN gyrase chez *E. coli* montrant que des motifs peptidiques différents et spécifiques à chaque espèce dans le domaine Transducer contribuent aux propriétés allostériques de l'enzyme.

4. Conclusion

L'obtention des structures des TopII_s procaryotes et eucaryote entières en complexe avec un ADN double brin permet de les comparer entre elles. Il existe de nombreuses similitudes entre les structures mais des différences sont notables, notamment au niveau des hélices du Transducer qui font la connexion entre le domaine N-terminal et le domaine de liaison de l'ADN. Ces hélices chez la TopII eucaryote se croisent plus haut sur le domaine N-terminal comparé aux croisements des hélices de l'ADN gyrase. Cette différence a pour conséquence une réduction de l'espace de la cavité de la porte N chez la TopII α comparé à l'ADN gyrase. Cependant, l'espace disponible entre le domaine de liaison de l'ADN et le segment G est similaire chez les deux Top2As. L'espace de la cavité N-terminale de la TopII α est trop restreint pour un ADN double brin de forme B qui a un diamètre de 20 Å (**Figure 104**).

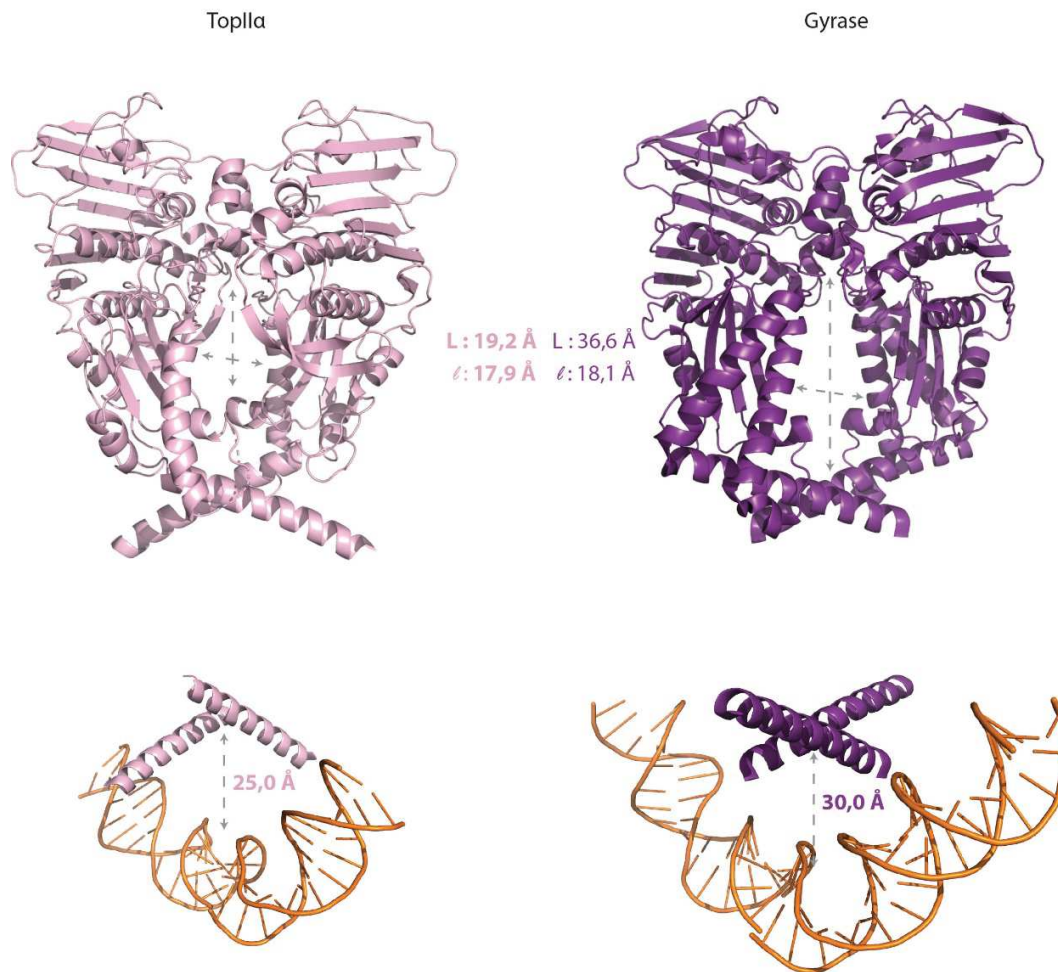
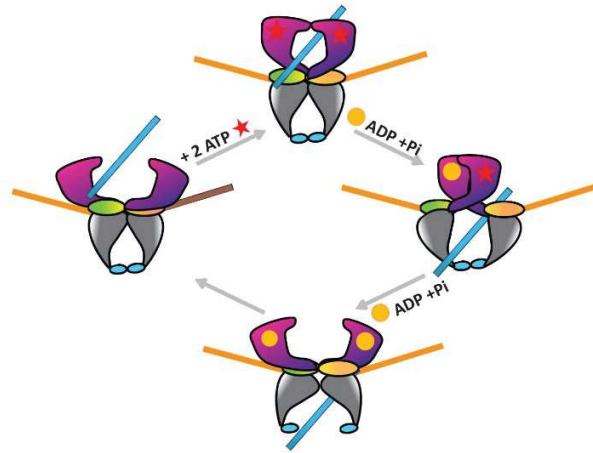


Figure 104 Comparaison des domaines ATPase entiers de la TopII α et de la Gyrase en conformation fermée. Les mesures des distances montrent que la cavité entre les deux monomères sont différentes pour les deux protéines et cet espace est plus grand chez la Gyrase que pour la TopII α . La distance entre le croisement des hélices du Transducer et le segment G est plus grande pour la Gyrase que pour la TopII α .

Cependant, le segment T doit être transporté au travers de la coupure du segment G générée par les Top2s et sortir par la porte C, ce qui signifie que le segment T doit être situé au-dessus du segment G (**Figure 105a**). En ce qui concerne l'ADN gyrase, il est donc possible que le segment T soit présent dans la cavité N-terminale. Cette hypothèse semble envisageable pour l'ADN gyrase mais au vu des mesures effectuées, il est peu probable que ce soit le cas pour les TopII α eucaryotes. **Un des objectifs maintenant est de comprendre où se situe le segment T avant son passage à travers la coupure.** De nombreux éléments montrent que les TopII α sont capables de fixer un

croisement d'ADN et couper un ADN double brin juxtaposé à un autre ADN double brin³³⁸⁻³⁴⁰. Il serait donc possible que le segment T puisse se loger entre le segment G et les hélices de connexion du Transducer (**Figure 105b**). Le nouveau modèle suggéré serait qu'après insertion des deux molécules d'ATP conduisant à la dimérisation de la porte N²⁶⁷ et coupure du segment G, l'hydrolyse de l'ATP induit les changements allostériques nécessaires. Le segment T serait transporté au travers de la porte à ADN probablement par le rapprochement du croisement d'hélices au niveau de cette porte²⁹⁹. Pour terminer le cycle, le segment T est évacué par la porte C et le segment G est reliqué. Il est difficile de montrer par des méthodes biochimiques et biophysiques classiques que le segment T se trouve principalement entre les hélices et le segment G. Mais l'obtention d'une structure des complexes entiers eucaryote et procaryote avec un ADN juxtaposé de type « Holiday junction » ou à partir de mini-cercle d'ADN présentant des croisements serait une première étape pour la caractérisation de cette possible hypothèse.

a.



b.

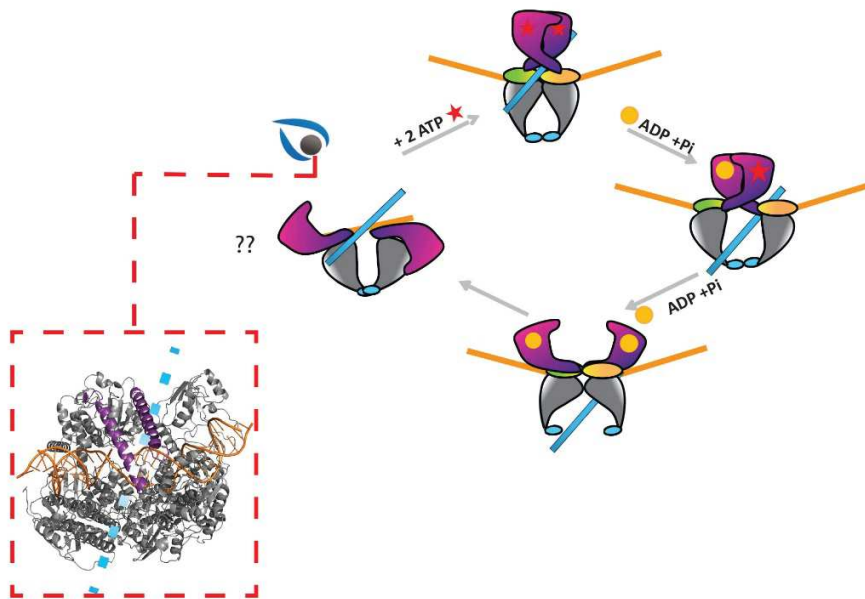


Figure 105 Modèle mécanistique proposé à l'issue de ces travaux. (a) Le modèle mécanistique approuvé par la communauté scientifique. Dans ce modèle le segment T (ligne bleue) peut passer au travers de la porte N (en violet), puis de la coupure du segment G (ligne jaune) pour sortir par la porte C (en bleu). (b) Dans le modèle que nous voulons vérifier, nous tenons en compte les expériences montrant que les Top2As eucaryotes et procaryotes reconnaissent un croisement d'ADN. Le segment T se positionne entre le segment G et les hélices du Transducer. Lorsque la porte N accepte les deux molécules d'ATP, ce dernier se dimérise et les mouvements engendrés par l'hydrolyse successive des deux molécules d'ATP permet le passage du segment T au travers de la coupure puis de sortir de l'enzyme par la porte C.

Conclusion Générale

À l'issue de cette thèse, nous avons pu apporter des éléments de réponses sur les différents objectifs fixés. Dans un premier temps nous avons pu produire et purifier les deux isoformes entières des topoisomérases de type II humaines à partir des cellules de mammifère BHK21 et les tests d'activité montrent que ces enzymes sont actives.

Les travaux du premier chapitre avaient pour but d'identifier les sites de modification post-traductionnelles, plus particulièrement les phosphorylations et les acétylations possibles chez les TopII α humaines et d'évaluer leurs impacts sur la structure et la fonction de ces protéines. L'identification a révélé une distribution commune pour les deux isoformes, la majorité des phosphorylations sont identifiées sur les domaines C-terminaux et la majorité des acétylations sont identifiées sur le corps catalytique. Ces travaux ont permis d'étudier le rôle d'une lysine de la TopII α conservée, sujette à une acétylation et dont la modification ou la mutation en alanine montre son importance dans le couplage entre l'activité ATPase et la formation de l'homodimère.

Afin de comprendre si les phosphorylations impactent les TopII α , nous avons produit la TopII α sous sa forme phosphorylée et déphosphorylée, ainsi que les domaines C-terminaux des deux isoformes. Des résultats préliminaires montrent un impact potentiel des phosphorylations sur les différentes activités ATPase et de modulation de la topologie de l'ADN de la TopII α , cependant des études complémentaires et des réplicats sont nécessaire pour confirmer ces résultats.

Enfin ces travaux ont permis de faire une comparaison entre les isoformes entre eux mais aussi avec les modifications identifiées dans les cellules cancéreuses, mettant en relation la régulation des PTMs et la résistance aux traitements anti-Top2.

Le deuxième chapitre a porté sur l'étude structure/fonction de la TopII α entière en complexe de l'ADN et de l'étoposide. L'obtention d'un modèle à haute résolution a permis pour la première fois d'observer les hélices du domaine Transducer qui font la connexion entre le domaine ATPase et le domaine de liaison de l'ADN. Les analyses fonctionnelles *in vitro* par mutagénèse dirigée montrent que ces hélices sont importante pour les propriété allostérique de l'enzyme. Sur ce même modèle nous observons pour la première fois une partie du domaine CTD allant des résidus 1193 à 1217 qui se situe sous le segment G. Les tests d'activité *in vitro* montrent que la TopII α tronquée

de son CTD mais conservant les résidus jusqu'à 1217 est bien plus active que la protéine sauvage. Ces résultats indiquent que le début du CTD stimule l'activité de la TopII α tandis que le reste de ce domaine contrebalance cet effet.

Le troisième chapitre porte sur la détermination structurale à haute résolution du complexe ADN gyrase-ADN-gépotidacine. Le succès de cette étude est un exemple montrant que l'utilisation de la technique Cryo-EM peut être appliquée à l'étude de complexe avec des inhibiteurs de l'ADN gyrase. La résolution atteinte permet de différencier des conformations adoptées par le complexe lors du cycle catalytique ainsi que des systèmes d'interaction qui sont différents interspèce.

Bien que les enzymes procaryotes et eucaryotes possèdent des domaines catalytiques avec une forte similarité de séquence, leurs activités sont finement régulées par des motifs conservés situés dans les connexions entre ces domaines. D'autre part, les PTMs chez les TopIIs humaines apportent un degré supplémentaire de complexité et ont un impact important sur la relation structure-fonction et le contrôle allostérique des activités de la TopII α . L'analyse des PTMs identifiées chez la TopII α dans les cellules cancéreuses montrent que celles-ci peuvent varier en fonction du type cellulaire et que ces différences pourraient être explorées pour étudier la possible connexion entre les PTMs et les mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux.

Matériel et Méthodes

1. Constructions Plasmidiques-Méthode du Gibson Assembly

Afin d'obtenir les constructions nécessaires à notre étude, nous avons utilisé la méthode dite du « Gibson Assembly »³⁴¹ (**Figure 106**). Elle permet la jonction de plusieurs fragments d'ADN de grande taille lors d'une seule incubation à 50°C. Le principe repose sur la combinaison de trois enzymes : l'exonucléase T5, l'ADN polymérase et la ligase Taq. L'exonucléase T5 dégrade l'extrémité 5' de chaque fragment d'ADN. Cette dégradation va permettre l'hybridation des extrémités 3' complémentaires. L'ADN polymérase incorpore les nucléotides manquants et la ligase lie de façon covalente les deux brins complémentaires d'ADN nouvellement formés.

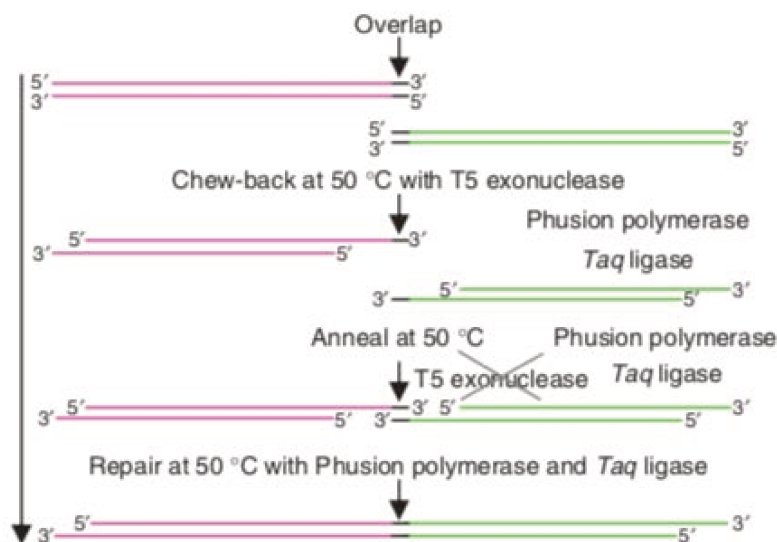


Figure 106 Principe de la technique du Gibson Assembly. Par l'action de la T5 exonucléase les extrémités 3' des ADNs colorés en vert et rose s'apparient. La polymérase et la ligase peuvent ensuite compléter et religuer les paires de base manquantes.

Nous avons ainsi cloné dans le plasmide d'expression pVOTE, utilisé pour la production en cellules de mammifère, les séquences codant pour la TopII α et β (**Figure 107 et 108**). Les séquences codant pour les domaines C-terminaux (CTD) ont quant à elles été clonées dans le plasmide pAX-3 pour l'expression en bactérie (**Figure 109**).

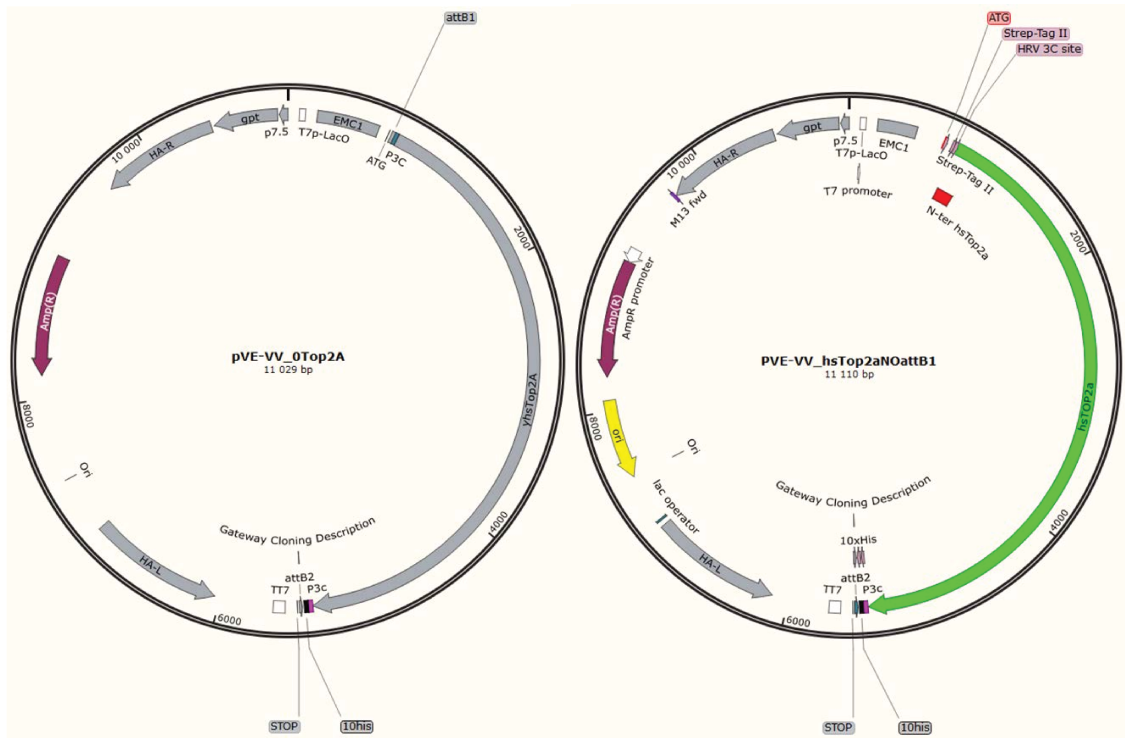


Figure 107 Plasmides codant pour l'expression de la TopII α . L'ancienne construction (plasmide de gauche) ne contient pas les acides nucléiques N-terminal du gène humain manquant, ainsi que les étiquettes de purification Streptavidine. Le nouveau plasmide est affiché à droite.

Clonage des TopII α et β entières

Dans un premier temps, une modification du vecteur pVOTE était nécessaire afin d'éliminer la séquence codant pour l'extrémité N-terminale des Top2 de la levure et le site de recombinaison attB1. Pour cela le plasmide pVE-VV_0TopIIa a été digéré par l'enzyme de restriction AdeI et le plasmide pVE-VV_0TopIIb par AdeI et NsiI. Les enzymes utilisées sont de la gamme Fast-Digest (ThermoFisher). Le mélange suivant a été incubé à 37°C pendant 1h (**Tableau 6**).

	TopIIa_0	TopIIb_0
<i>pVE-VV_0TopIIa</i>	2,5 µg = 3,9 µL	/
<i>pVE-VV_0TopIIb</i>	/	2,5 µg = 11,7 µL
<i>Fast Digest Green Buffer 10X</i>	35 µL	
<i>Adel FD 10 U/µL</i>	10 µL	10 µL
<i>Nsil FD 10 U/µL</i>	/	10 µL
<i>Eau Ultra-Pure</i>	301 µL	283 µL
<i>Volume total</i>	350 µL	

Tableau 6 Volumes et concentrations des différents constituants nécessaires à la première étape du clonage des TopII α et β .

Après incubation, une réaction de déphosphorylation à la phosphatase alcaline Fast AP (ThermoFisher) a été réalisée. Le mélange précédent a été additionné de 10 U de phosphatase et incubé à 37°C pendant 20 minutes. Enfin, une étape d'inactivation à 80°C pendant 30 minutes a été réalisée avant de déposer sur un gel d'agarose 1% (m/V) en tampon Tris Acétate EDTA (TAE). Une tension de 100 V est appliquée pendant 70 minutes. Les bandes contenant les fragments d'ADN de 9500 paires de base (bp) pour le pVOTE-TopIIa_0 (Fr1) et de 10362 bp pour pVOTE-TopIIb_0 (Fr2) ont été découpées sur gel puis purifiées en utilisant le kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

Des gènes synthétiques contenant les séquences codant pour l'extrémité N-terminale des TopIIs humaines, PGS-TopIIa et PGS-TopIIb, ainsi que les séquences chevauchantes utilisées pour le clonage par Gibson ont été synthétisés par ProteoGenix. Ces cassettes, intégrées dans un plasmide, ont été amplifiées par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (**Tableau 7**). Les oligonucléotides et le programme de PCR utilisés sont détaillés dans les tableaux ci-dessous. La polymérase utilisée est la Q5 Hot Start High Fidelity (New England Biolabs) à 0,01 U/µl. 50 ng de chaque plasmide synthétique ont été utilisés comme matrice. Au terme de la PCR, 1 µL d'enzyme DpnI (New England Biolabs) a été ajouté aux mélanges réactionnels pour digérer le plasmide parentale, ceux-ci ont été incubés 1h à 37°C. Après incubation, les produits de réaction ont été déposés sur un gel d'agarose 1% (m/V) en tampon TAE et migrés 70 minutes à 100 V. Les bandes correspondant aux fragments d'ADN de 1720 bp pour la TopII α (I1) et 1125 bp pour la TopII β (I2) ont été découpées et purifiées à l'aide du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.

Oligos	Séquence (5'->3')
<i>CLGShsTOPIIA-for</i>	GCACAACCCCAGTGCCAC
<i>CLGShsTOPIIA-rev</i>	TCAGGATAAGCGTACACTCAGTGGA
<i>CLGShsTOPIIB-for</i>	AGATACACCTGCAAAGGCGG
<i>CLGShsTOPIIB-rev</i>	TTTTCCATCTTAAATTTGGACAGATCTGGTTG

	TopII α	TopII β
<i>Q5 Reaction buffer 5 X</i>	22 μ L	/
<i>dNTPs mix 10 mM</i>	2,2 μ L	/
<i>Q5 Hot Start High Fidelity 2U/μL</i>	0,5 μ L	/
<i>SuperFI PCR MasterMix 2X</i>	/	25 μ L
<i>Matrice : PGS-TopIIa 10 ng/μL</i>	50 ng = 5 μ L	/
<i>Matrice : PGS-TopIIb 10 ng/μL</i>	/	50 ng = 5 μ L
<i>CLGShsTOPIIA-for 10 μM</i>	2,5 μ L	/
<i>CLGShsTOPIIA-rev 10 μM</i>	2,5 μ L	/
<i>CLGShsTOPIIB-for 10 μM</i>	/	2,5 μ L
<i>CLGShsTOPIIB-rev 10 μM</i>	/	2,5 μ L
<i>Eau Ultra-Pure</i>	75,3 μ L	15 μ L
<i>Volume total</i>	110 μ L	50 μ L

Étapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
<i>Dénaturation initiale</i>	1	98	2 minutes
<i>Dénaturation</i> <i>Hybridation</i> <i>Elongation</i>	30	98 60 (TopII α)/ 63 (TopII β) 72	30 secondes 30 secondes 1 minute
<i>Elongation finale</i>	1	72	5 minutes

Tableau 7 Oligos, volumes et paramètres du thermocycler nécessaires à la deuxième étape du clonage des TopII α et β .

La réaction de Gibson a été réalisée à l'aide du Gibson Assembly Mastermix (NEB). Les mélanges réactionnels ont été incubés à 50°C pendant 15 minutes. La composition des mélanges était la suivante (**Tableau 8**) :

	TopII α	TopII β
<i>Gibson Assembly Mastermix (NEB) 2X</i>	10 μ L	10 μ L
<i>Fr1 (37 ng/μL)</i>	50 ng = 1,35 μ L	/
<i>I1 (28 ng/μL)</i>	28 ng = 1 μ L	/
<i>Fr2 (30 ng/μL)</i>	/	50 ng = 1,66 μ L
<i>I2 (10,2 ng/μL)</i>	/	17 ng = 1,68 μ L
<i>Eau Ultra Pure</i>	7,65 μ L	6,66 μ L
<i>Volume total</i>	20 μ L	20 μ L

Tableau 8 Volumes nécessaires pour la réaction du Gibson Assembly.

Des bactéries chimio compétentes TOP10³⁴² ont été transformées avec les produits réactionnels.

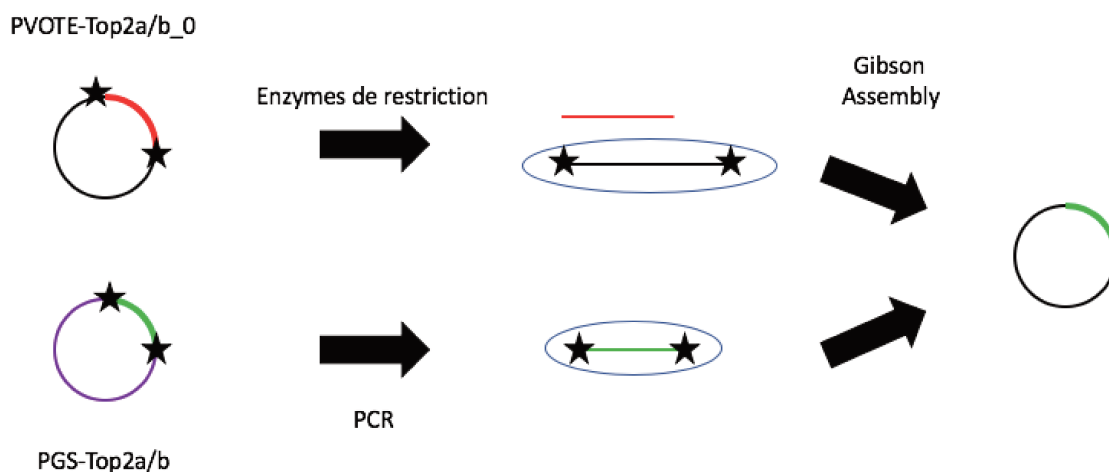


Figure 108 Étapes du protocole de clonage pour les TopII α et β .

Clonage des domaines C-terminaux de la TopII α et β

Le gène codant pour le CTD de l'isoforme α avait déjà été cloné dans le plasmide pAX-3 à mon arrivée dans le laboratoire. Cependant, le gène du CTD de l'isoforme β avait été uniquement cloné dans le plasmide d'expression pSKB2 pour la production en bactérie.

Le gène d'intérêt a donc été amplifié par PCR, les oligonucléotides ainsi que le programme de PCR utilisés sont détaillés dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 9**). La polymérase utilisée est la Phusion High Fidelity (ThermoFisher) à 0,04 U/ μ L. La matrice de PCR utilisée correspond à 82 ng du plasmide pSKB2. Le produit de PCR de 1254 bp (I3) a été purifié sur gel comme décrit précédemment.

Oligos	Séquence (5'->3')
<i>CLCTDIIB-for</i>	TTCCAGGGGCCCCATGCAGGAATGTCTGGAAAAGC
<i>CLCTDIIB-rev</i>	GAACTTCCAGGCCTCGATTAAACATTGCAAAATCAACATCATCT

	CTDIIB
<i>Phusion HF Buffer 5 X</i>	25 μ L
<i>dNTPs mix 10 mM</i>	2,5 μ L
<i>Phusion High Fidelity 2 U/μL</i>	2 μ L
<i>Matrice : pSKB2 64,5 ng/μL</i>	82 ng = 1,27 μ L
<i>CLCTDIIB-for 100 μM</i>	2,3 μ L
<i>CLCTDIIB-rev 100 μM</i>	1,85 μ L
<i>Eau Ultra-Pure</i>	90 μ L
<i>Volume total</i>	125 μ L

Étapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
<i>Dénaturation initiale</i>	1	98	2 minutes
<i>Dénaturation</i>	30	98	30 secondes
<i>Hybridation</i>		53	20 secondes
<i>Elongation</i>		72	40 secondes
<i>Elongation finale</i>	1	72	5 minutes

Tableau 9 Oligos, volumes et paramètres du thermocycler nécessaires à la première étape du clonage du CTDIIB.

Une forme du plasmide pAX-3 exprimant les gènes SUMO, P3C et un double tag 2XStrep en aval du promoteur T7 existait dans le laboratoire à mon arrivée. Il fallait donc remplacer le tag SUMO par l'insert I3. Pour ce faire, le plasmide a été digéré par les enzymes de restrictions NdeI et XhoI de la gamme Fast Digest (ThermoFisher). Le mélange suivant a été incubé à 37°C pendant 1h (**Tableau 10**).

<i>pAX-3</i>	1 µg = 5,3 µL
<i>Cutsmart Buffer 10X</i>	5 µL
<i>NdeI NEB 10 U/µL</i>	1 µL
<i>XhoI NEB 10 U/µL</i>	1 µL
<i>Eau Ultra-Pure</i>	37,7 µL
<i>Volume total</i>	50 µL

Tableau 10 Volume et concentration des différents constituants nécessaires à la première étape du clonage du CTDIIβ.

Les enzymes ont été inactivées avec une incubation à 80°C pendant 30 minutes avant dépôt sur gel. La bande de 5347 bp correspondant au fragment d'ADN de pAX-3 dont la séquence codant pour le tag SUMO a été clivée a été purifiée sur gel comme décrit précédemment.

La réaction de « Gibson Assembly » a été incubée 15 minutes à 50°C, le mélange réactionnel était le suivant (**Tableau 11**):

	CTDIIβ
<i>Gibson Assembly Mastermix (NEB) 2X</i>	15 µL
<i>Fr3 (17,9 ng/µL)</i>	75 ng = 4,2µL
<i>I3 (167 ng/µL)</i>	83,5 ng = 0,5µL
<i>Eau Ultra-Pure</i>	10,2 µL
<i>Volume total</i>	30 µL

Tableau 11 Volumes nécessaires pour la réaction du Gibson Assembly.

Des bactéries chimio compétentes TOP10³⁴² ont été transformées avec les produits réactionnels

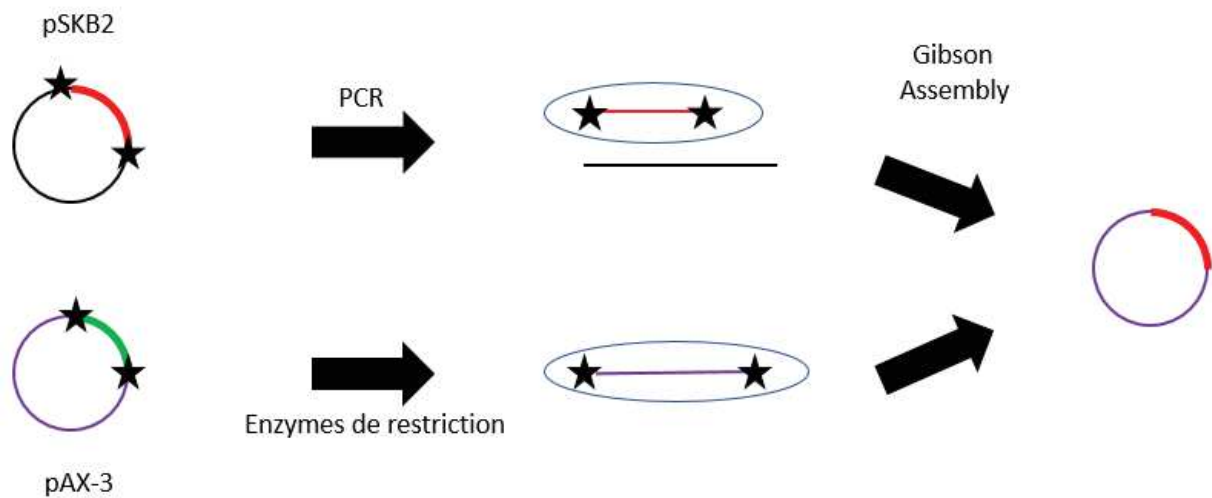


Figure 109 Étape du protocole de clonage du CTDII β .

2. Culture de cellule mammifère BHK21

Une fois le gène d'intérêt cloné dans le plasmide pVOTE (Vaccinia Virus/Lac Operon/T7 RNA polymerase/ EMC) puis intégré dans le génome du virus modifié de la vaccine (MVA), les cultures de BHK21, à confluence, ont été infectées. L'expression de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside (IPTG).

Ce virus modifié est non pathogène pour l'humain, ce qui permet de l'utiliser en laboratoire de classe 1. De plus, cette souche virale modifiée est 4 fois plus efficace pour la production de protéine recombinante que le virus sauvage²⁶⁰.

Le génome de la souche modifiée contient différents éléments essentiels à la production (**Figure 110**). Une première insertion de 5,5 kbp contenant :

- Le gène codant pour la T7 RNA polymérase dont l'expression est contrôlée par le couple répresseur lacI/ opérateur lacO et par un promoteur tardif du développement virale p11. Le gène lacI est lui-même sous le contrôle d'un promoteur précoce p7.5. Enfin l'insertion du gène codant pour la GFP sous le contrôle d'un promoteur précoce pSe, servait initialement à sélectionner la souche de virus contenant l'ensemble des gènes du bloc de 5,5 kbp et facilite la visualisation de la multiplication virale.

Une deuxième insertion de 2,3 kbp contenant :

- Les séquences de recombinaison HA-R et HA-L, un gène codant pour la mCherry sous le contrôle du promoteur pSe, un gène de fusion codant pour la gyrase B/PKR soumis au promoteur p7.5.

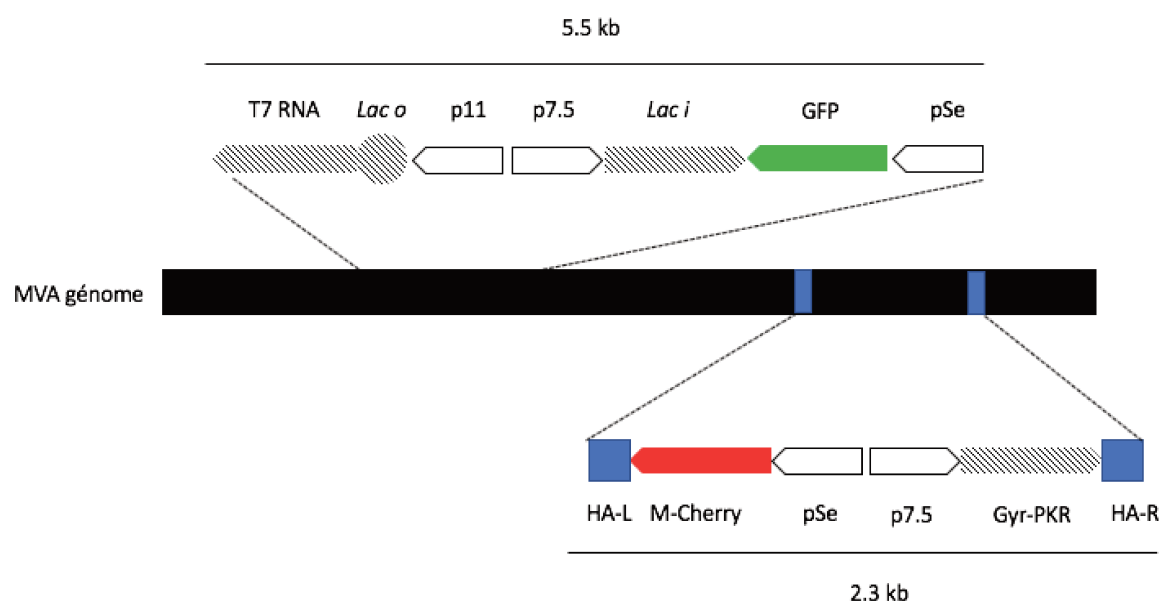


Figure 110 Schématisation du génome du virus modifié de la vaccine utilisé en laboratoire.

Intégration du gène d'intérêt dans le génome viral et sélection du virus recombinant

L'intégration du gène d'intérêt, cloné dans le plasmide pVOTE, dans le génome viral (**Figure 111**) se fait dans les cellules BHK21 adhérentes. Le plasmide a été transfecté en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) comme agent transfectant. Les cellules confluentes en plaque 6 puits (1×10^6 cellules /puits) ont été incubées dans 1 mL de solution de virus modifié parental (environ 1×10^6 PFU/mL) dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pendant 1h. Pendant l'incubation, un mélange composé d'1 µg d'ADN plasmidique pVOTE, de 10 µL de Lipofectamine et de 200 µL de milieu de culture OptiMEM (Gibco) a été préparé. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, la totalité du mélange ADN – Lipofectamine – OptiMEM a été déposée sur les cellules infectées et 800 µL d'OptiMEM supplémentaires ont été ajoutés. Les cellules ont été incubées dans

l'étuve à 37°C, 5% CO₂ pendant 24h. Les cellules ont été récoltées et ont subi plusieurs cycles de congélation/décongélation à -20°C. Le surnageant constituait le stock de virus recombinant. Les virus sont récupérés en gardant le surnageant après plusieurs cycles de congélation/décongélation à -20°C.

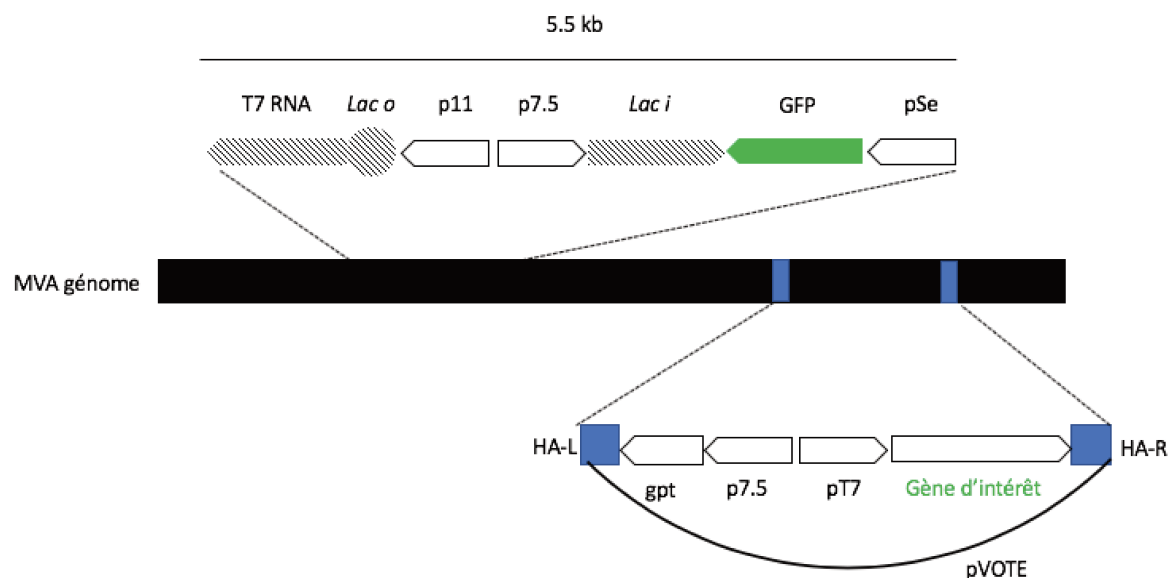


Figure 111 Schématisation de l'intégration par recombinaison des constituants souhaités dans le génome de la vaccine modifiée.

Afin de produire les TopII recombinantes en quantité suffisante, une souche de MVA homogène est nécessaire pour une infection efficace. Afin de distinguer le virus parental du virus recombinant, un système de double sélection a été mis au point.

La nouvelle construction est intégrée au génome du MVA en remplaçant la cassette de 2,3 kbp par recombinaison homologue. Cette recombinaison se fait au niveau des sites de recombinaison HA-L et HA-R dans le plasmide pVOTE et le génome du MVA.

En l'absence de recombinaison et en présence de coumermycine-A1, la sous-unité GyrB dimérise et active la PKR fusionnée ce qui inhibe la réplication virale³⁴³. L'intégration des séquences comprises entre les sites HA-L et HA-R du plasmide pVOTE dans le génome virale, entraîne par conséquent une insensibilité à la coumermycine des cellules infectées par cette souche du virus (sélection négative). Par ailleurs, l'intégration conduit à une non-expression de la mCherry par le

virus recombinant. Enfin, si l'intégration a eu lieu, la présence du gène *gpt* procure une résistance à l'acide mycophénolique qui affecte la voie de biosynthèse de la purine (sélection positive)³⁴⁴.

La disparition du virus parental dans la culture est donc traduite par la non-expression de la mCherry. L'expression de la GFP donne une estimation du taux d'infection des cellules.

La présence ou l'absence de ces protéines dans les cellules peut être visualisée grâce à un microscope à fluorescence (**Figure 112**).

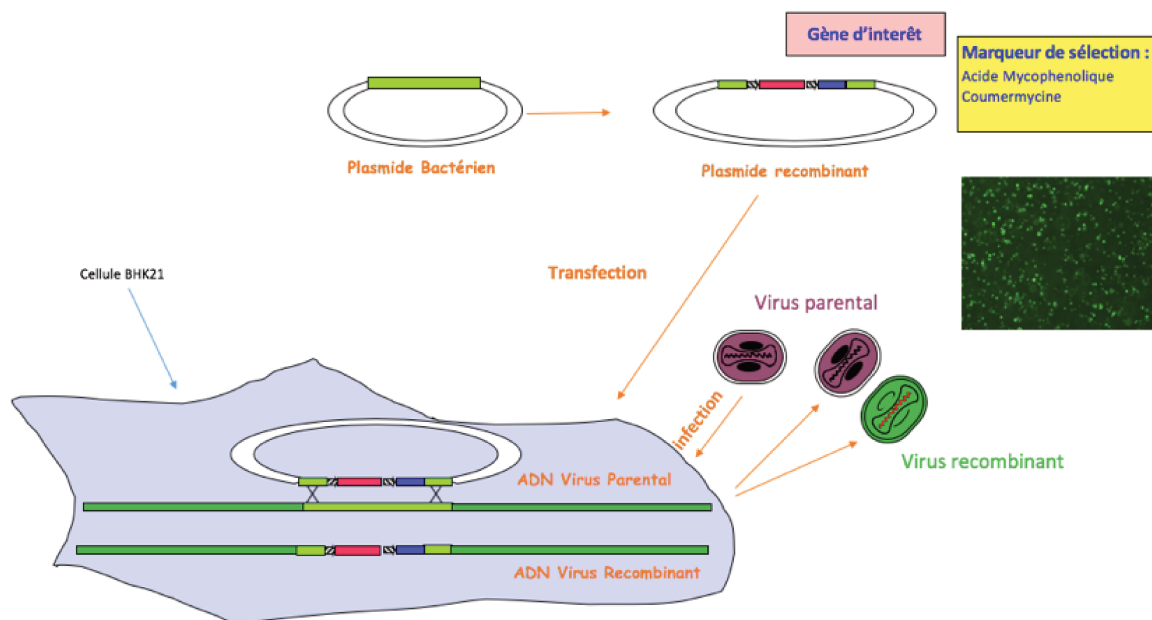


Figure 112 Schéma récapitulatif de la génération du virus recombinant de la vaccine modifié. Après transfection du plasmide pVOTE et infection au sein des cellules BHK21, la recombinaison à lieu. Les virus recombinants sont ensuite sélectionnés par l'utilisation des marqueurs de sélection acide mycophénolique et coumermycine. Les virus recombinants émettent un signal GFP lors de l'infection des cellules.

Surexpression des TopII α

Les cellules BHK21 en suspension ont été cultivées dans du milieu GMEM (Gibco) avec 10% de sérum bovin (Gibco) ; 1,5 g/L de bactotryptose et 40 μ g/mL de gentamicine. Les cultures ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ sous agitation rotative. Les cellules ont été passées jusqu'à obtenir 6 L

de culture à une densité comprise entre 1 et 2×10^6 cellules/mL. Les cellules ont été infectées avec 600 mL de culture préalablement infectée avec la souche de virus recombinant. L'infection et la surexpression des 6 L de culture cellulaire additionnée de 1 mM d'IPTG pour l'induction de l'expression s'est déroulée pendant 24h en suivant les conditions d'incubations décrites ci-dessus. Après 24h, les cellules ont été centrifugées à $2000 \times g$ pendant 30 minutes à 4°C . Les culots ont été resuspendus dans 50 mL de tampon phosphate salin (PBS) (Gibco). Les suspensions ainsi obtenues ont été centrifugées à $4000 \times g$ pendant 5 minutes à 4°C . Les culots ont été congelés à -196°C , en azote liquide, puis conservés à -80°C .

3. Production des TopIIIs dans le système d'expression *S.cerevisiae*

L'expression et la purification des TopIIIs humaines dans le système de levure *S.cerevisiae* a été développé par Claire Bedez, une ancienne doctorante du laboratoire. Les détails du protocole sont reportés dans son manuscrit de thèse paru en 2015

4. Purification des TopIIIs

Le protocole de purification des TopIIIs à partir des culots de cellules BHK21 ou de *S. cerevisiae* est identique. L'ancien protocole ne sera pas détaillé dans cette partie. Les culots ont été resuspendus à 4°C dans du tampon de lyse (25 mM HEPES pH 8 ; 500 mM NaCl ; 500 mM KCl ; 10 % glycérol ; 20 mM imidazole ; 1 mM MgCl_2 ; 2 mM β -mercaptoéthanol (BME) ; 0,5 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et 1 tablette de cocktail d'inhibiteur de protéase (PIC) (Roche) par litre de culture). Un culot de 1 L de culture était resuspendu dans 10 mL de tampon. Les suspensions cellulaires ont été lysées par un homogénéisateur à haute pression (EmulsiFlex-C3) en 3 passages à une pression d'environ 10,4 MPa. Après chaque passage, l'extrait a été récupéré dans un bécher refroidi à 4°C . L'extrait total ainsi obtenu a été centrifugé à $50\,000 \times g$ pendant 1 h à 4°C .

Toutes les étapes de purifications décrites ci-dessous se déroulent à 4°C .

La fraction soluble a été injectée à 2,5 mL/min sur deux colonnes HiTrap Chelating HP (GE Healthcare) de 5 mL branchées en tandem et préalablement équilibrées avec 5 volumes colonne (CV) de NiSO₄ à 0,2 M et 5 CV de tampon de lyse. Après diminution du signal d'absorbance à 260 et 280 nm, deux étapes de lavages successives ont été réalisées à 57 et 75 mM d'imidazole avec le tampon d'élution Nickel (25 mM HEPES pH 8 ; 300 mM NaCl ; 300 mM KCl ; 10 % glycérol ; 250 mM imidazole ; 1 mM MgCl₂ et 2 mM BME). Les colonnes HiTrap Chelating ont été branchées en tandem avec deux colonnes StrepTrap HP (GE Healthcare) de 5 mL préalablement équilibrées avec le tampon d'élution nickel, puis l'élution a été effectuée avec 100 % de tampon d'élution Nickel. Après diminution du signal à 260 et 280 nm, 5 CV de tampon charge Strep (25 mM HEPES pH 8 ; 200 mM NaCl ; 200 mM KCl ; 10 % glycérol ; 1 mM MgCl₂ ; 2 mM dithiothréitol (DTT)) ont été passés. L'élution des colonnes StrepTrap a été réalisée avec du tampon de charge Strep additionné de 3 mM de Desthiobiotine.

Après cette première étape de purification, l'éluât a été incubé avec de la protéase P3C (produite dans le laboratoire) sur la nuit à 4°C en utilisant un ratio d'1 mg de P3C pour 40 mg de TopIIs taguées.

Une fois l'étiquette de purification clivée, les TopIIs ont été injectées sur une colonne HiTrap Heparin HP de 5 mL (GE Healthcare) équilibrée en tampon de charge Strep. Après diminution du signal d'absorbance à 260 et 280 nm, l'élution a été effectuée avec un pallier de 30 % du tampon d'élution Héparine (25 mM HEPES pH 8 ; 750 mM NaCl ; 750 mM KCl ; 10 % Glycérol ; 1 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT). Les fractions contenant les TopIIs ont ensuite été congelées en azote liquide puis conservées à -80°C.

5. Test topologiques

5.1. Test de relâchement d'un ADN surenroulé négativement

Le test de relâchement d'ADN surenroulé négativement a été réalisé avec 6 nM de plasmide PUC 19 et une gamme de concentration allant jusqu'à 100 nM de TopII. Le tampon utilisé était composé de 50 mM d'acétate de potassium, 20 mM de Tris-acétate pH 8, 10 mM d'acétate de magnésium, 0,1 mg/ml de BSA et 1 mM d'ATP. Le mélange réactionnel de 20 µL a été incubé pendant 30

minutes à 37°C. Afin d'arrêter la réaction, 1 µL de SDS 20 % a été ajouté et le mélange réactionnel a été agité en utilisant un vortex. Avant électrophorèse sur gel, 2 µL de colorant de charge d'ADN 6X ont été ajoutés. Les échantillons ont été déposés et ont migré à travers un gel d'agarose 1 % Tris-Borate-EDTA (TBE), pendant 180 minutes à 90 V. Afin d'observer les différents topoisomères, le gel a été incubé dans 100 mL de tampon TBE, 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium (BET) pendant 15 minutes, puis décoloré dans de l'eau pendant 5 minutes. Le gel a ensuite été révélé à la lumière UV avec la machine GENIUS : 3 de la marque OZYME.

5.2. Test de décaténation d'un ADN

Le test de décaténation a été réalisé avec une gamme de concentration identique à celle utilisée lors du test de relâchement et 200 ng d'ADN kinétoplastique, réseaux d'ADN circulaires (minicercles) enchaînés les uns aux autres produits par la société Topogen. Le tampon de réaction utilisé était composé de 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,03 mg/mL de BSA et 2 mM d'ATP. Pour mettre fin à la réaction, 1 µL de SDS 20 % et 5 µL de Protéinase K, à une concentration finale de 0,3 mg/mL, ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé 15 minutes à 37°C. Au terme de l'incubation, 5 µL de sarkosyl 5 %, 25 % de glycérol et 0,125 % de bleu de bromophénol ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Enfin, une extraction phénol/chloroforme à pH 8 a été réalisée. A l'instar du test de relâchement, l'analyse des différentes formes topologiques a été réalisée sur un gel d'agarose 1%, TBE. Une tension de 60 V est appliquée pendant 1 heure. La révélation est identique à celle utilisée pour le test de relâchement.

5.3. Test de clivage

Le protocole expérimental du test de clivage est identique à celui du test de relâchement. Néanmoins, 5 mM d'étoposide ont été ajoutés dans le tampon de réaction afin de stabiliser le complexe de clivage TopII – ADN. La réaction a été arrêtée comme lors du protocole de décaténation, afin de décrocher les TopIIs liées de façon covalente à l'ADN. Les échantillons ont été déposés sur gel d'agarose 1% TBE et ont migré pendant 180 minutes à 60V. La méthode de révélation était identique aux tests précédents.

6. Test d'activité ATPase

Ce test d'activité permet de déterminer les constantes cinétiques K_m et K_{cat} de l'hydrolyse de l'ATP par les TopII et de leurs mutants (**Figure 113**).

Les TopII sont des enzymes michaeliennes³⁴⁵ ce qui signifie qu'elles suivent les lois de Michaelis-Menten, à savoir la transformation d'un substrat, ici l'ATP, en un produit, l'ADP, via la formation d'un intermédiaire réactionnel entre l'enzyme et le substrat ; le complexe TopII - ATP.



Les constantes sont calculées à partir des approximations suivantes :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

$$K_m = \frac{V_{max}}{2}$$

Figure 113 Équation de Michaelis-Menten pour le calcul de la constante de Michaelis K_m et de la constante catalytique k_{cat}

Le K_{cat} ou constante catalytique qui exprime la vitesse maximale de conversion du substrat en produit et le K_m ou constante de Michaelis qui est reliée à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

Conversion du NADH en NAD^+

Ce premier test consiste à observer la conversion de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme réduite) en NAD^+ par réaction d'oxydo-réduction (**Figure 114**). Le NADH absorbe à 340 nm, la conversion en NAD^+ entraîne donc une diminution de l'absorption à cette longueur d'onde. Lors de l'hydrolyse de l'ATP, l'ADP formé va interagir avec du phosphoenolpyruvate (PEP) qui, en présence de Pyruvate Kinase (PK) va former du pyruvate. Le pyruvate pourra alors avec le NADH et la Lactate déshydrogénase (LDH) faire une réaction d'oxydo-réduction et former du NAD^+ et du lactate.

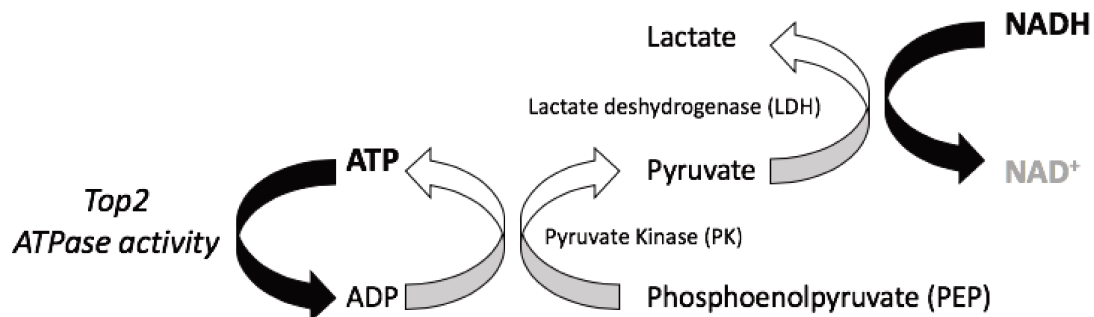


Figure 114 Cascade enzymatique opérant lors des tests d'hydrolyse de l'ATP utilisant le NADH. Après hydrolyse de l'ATP, ce dernier est régénéré par l'action du phosphoenolpyruvate qui par l'action de la pyruvate kinase se transforme en pyruvate. Ce dernier par une réaction d'oxydo-réduction avec du NADH va former du NAD⁺ l'espèce absorbant à 340 nm.

Le mélange réactionnel est composé de 115 nM de TopII, 21 nM d'ADN plasmidique PUC19, 4 U/5 U de PK/LDH (Sigma-Aldrich), 2 mM de PEP et 0,2 mM de NADH (Sigma-Aldrich). La réaction a été lancée par l'ajout d'ATP et a été suivie sur le spectrophotomètre Shimadzu 1700, dans des cuvettes en quartz individuelles, pendant 4 minutes à 37°C. Les absorbances ont été converties en concentration avec la loi de Beer-Lambert ($\epsilon_{\text{NADH}}^{340\text{nm}} = 6220 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Afin de calculer le K_{cat} , une concentration saturante en ATP de 1,5 mM pour se placer à la vitesse maximale de réaction V_{max} . Pour le calcul du K_{m} , une gamme d'ATP a été réalisée.

Conversion du MESH en PNP

Afin de pallier aux inconvénients du premier test qui sont l'utilisation de cuvettes individuelles et l'utilisation de 115 nM de TopII, ce qui représente 20 µg de protéine par cuve, une autre stratégie a été utilisée. De nouveaux réactifs permettant de calculer les constantes cinétiques en utilisant 6 µg de TopII ont été utilisés (**Figure 115**). Le principe de ce test repose sur la conversion du 2-amino-6-mercapto-7-méthylpurine riboside (MESH) en 2-amino-6-mercapto-7-méthyl-purine (MMP) par l'action d'un phosphate inorganique produit durant l'hydrolyse de l'ATP et de la purine nucléoside phosphorylase (PNP)³⁴⁶. La conversion de MESH en MMP est suivie en temps réel par une augmentation de l'absorbance à 360 nm. La réaction se fait dans le tampon de stockage des

TopII avec 115 nM de TopII, 4 μ M de MESG et 0,5 U de PNP. Le mélange réactionnel, de 150 μ L, a été transféré dans une plaque 96 puits. Les constantes ont été calculées grâce à la loi de Beer-Lambert ($\epsilon_{\text{MMP}}^{360\text{nm}} = 12000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

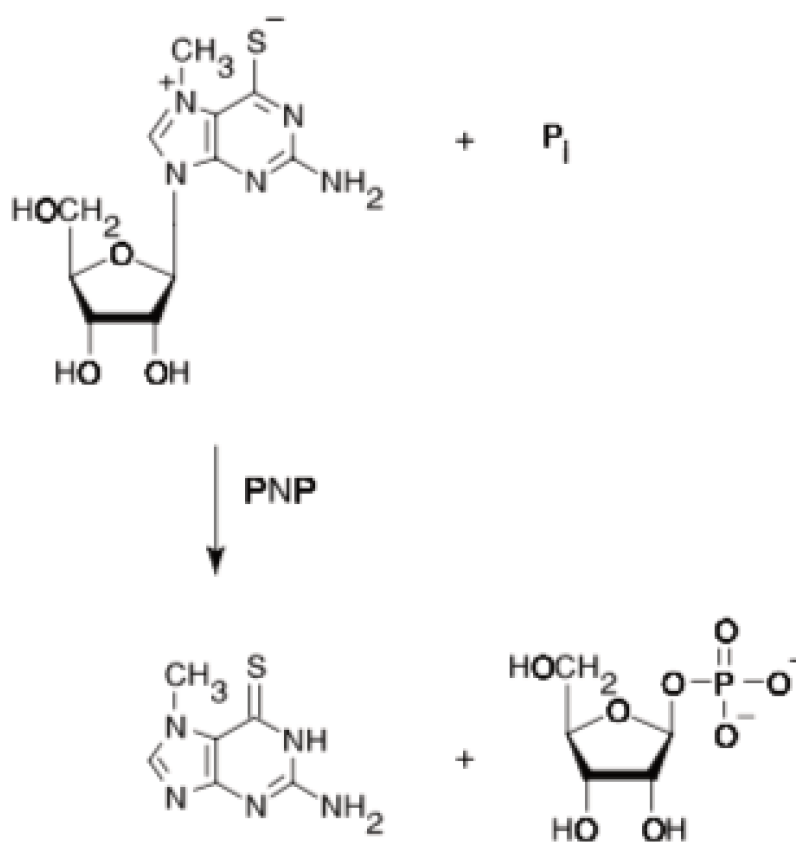


Figure 115 Réaction enzymatique opérant durant le test d'hydrolyse de l'ATP avec le composé MESG. Le composé MESG avec le phosphate issu de l'hydrolyse de l'ATP va former avec l'action de la purine nucléoside phosphorylase (PNP) le composé MMP, l'espèce absorbant à 360 nm.

7. Production de la λ -Phosphatase

Nous avons utilisé le plasmide pET-28 contenant la séquence codant pour la λ -Phosphatase (LPP) flanquée d'un tag 6his et son protocole de production transmis par l'équipe de Natacha Rochel (de

l'IGBMC, Strasbourg). Des bactéries de souche BL21 DE3 LOBSTR³⁰³ ont été transformées avec le plasmide. Cette souche est dépourvue de certains contaminants protéiques susceptibles de se lier à la résine Nickel³⁰³. L'antibiotique de sélection utilisé est la kanamycine. La surexpression de La LPP a eu lieu dans du milieu LB, additionné de kanamycine 50 µg/mL et d'avec 1mM d'IPTG. La culture a été incubée à 25°C pendant 3 h et sous agitation, suivi d'une incubation sous agitation pendant 3h à 25°C (**Figure 116**).

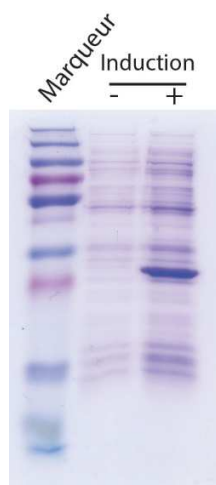


Figure 116 Induction de l'expression à l'IPTG sur des bactéries LOBSTR de LPP.

Les culots bactériens ont été resuspendus dans 50 mM Tris pH 7,5 ; 10% Glycérol ; 500 mM NaCl. Le volume de resuspension est de 10 ml de tampon de lyse pour 1 L de culot. Un culot d'1 L de culture était resuspendu dans 10 mL de tampon. La lyse est a été réalisée par un homogénéisateur à haute pression (à l'aide de l'EmulsiFlex C3) en 3 passages à une pression d'environ 10,4 MPa. Après centrifugation à 50 000 x g pendant 1 h, une première étape de purification sur colonne d'affinité Nickel Ni²⁺Hitrap Chelating de 5 mL a été réalisée à l'aide d'une colonne Hitrap Chelating 5 mL. La fraction soluble a été injectée. Après injection à 2,5 mL/min, une étape de lavage a été réalisée avec du tampon lyse additionné de 40 mM d'imidazole. La protéine a été éluée avec du tampon d'éluion (tampon de lyse, 250 mM d'imidazole). L'éluat ainsi obtenu a été concentré dans un concentrateur (VIVASPIN, membrane PES, cut-off 10 KDa, Sartorius) jusqu'à obtenir un volume final de 4mL. La deuxième étape de purification est a été réalisée à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Superdex 75 16/60 (GE Healthcare). La colonne a été équilibrée avec du tampon de lyse (**Figure 117**). Les fractions correspondant au deuxième et

troisième pic d'absorption en sortie de colonne ont été dialysées contre 2 L de tampon (50 mM HEPES pH 7,5 ; 100 mM NaCl ; 50% de glycérol) sur la nuit à 4°C. Le rendement obtenu était de 6 mg/L de culture. La pureté de l'échantillon obtenu était suffisante pour utiliser la LPP en tant qu'agent de déphosphorylation.

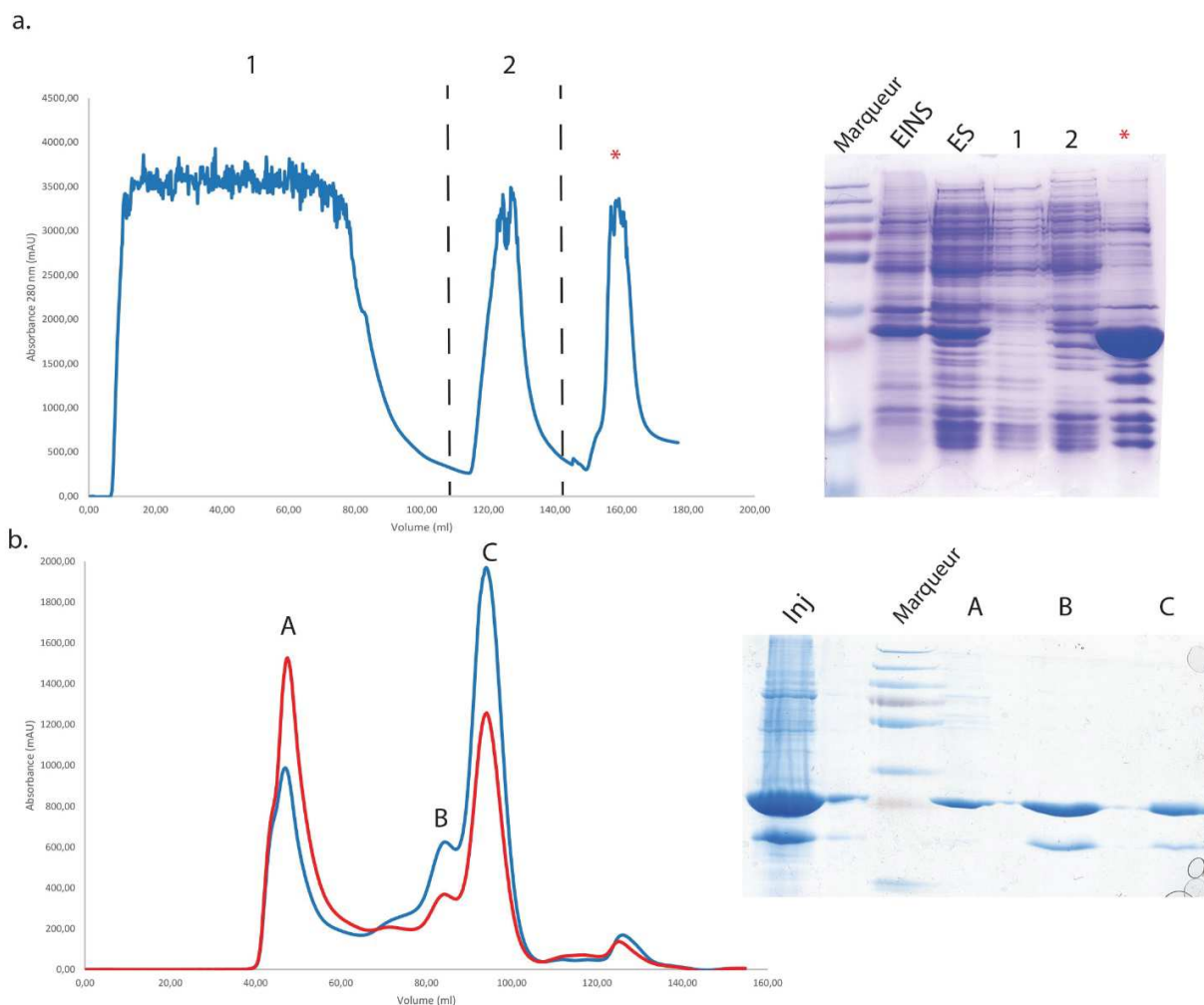


Figure 117 Purification de la LPP. (a) Après lyse une première étape de purification sur une colonne d'affinité Nickel. Les fractions 1 et 2 correspondent dans l'ordre à 1 : l'injection de la fraction soluble, 2 : lavage avec 40 mM d'imidazole. L'astérisque correspond au pic d'élué avec 250 mM d'imidazole. (b) Deuxième étape de purification sur une colonne d'exclusion stérique Superdex75 16/60. Les fractions A, B et C correspondent aux fractions contenant de la LPP. Les courbes bleu et rouge correspondent respectivement aux signaux à 280 et 260 nm.

8. Production de la Caséine kinase II α

Afin de phosphoryler les domaines C-terminaux des TopII α et β , nous avons produit la Caséine kinase II α (CKII). Nous avons utilisé la construction plasmidique codant pour la CKII flanquée d'un tag 6-histidine en N-terminal développée dans l'équipe de Gilles Travé (IGBMC, Strasbourg). Le protocole de purification utilisé a été adapté des travaux réalisés par Zandomeni *et al.* décrivant la purification de la CKII de *Bos Taurus*³⁴⁷. Des bactéries BL21-DE3 LOBSTR ont été transformées avec le plasmide pGEX-CKII. La CKII a été exprimée en milieu LB, 100 μ g/mL d'ampicilline et 1 mM d'IPTG pendant 3 h à 37°C (**Figure 118**).

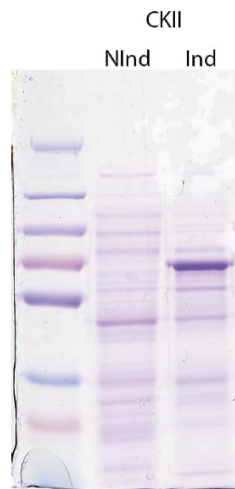


Figure 118 Induction de l'expression à l'IPTG sur des bactéries LOBSTR de CK2.

Les culots bactériens ont été resuspendus dans du tampon de lyse (25 mM HEPES pH 7,5 ; 100 mM NaCl ; 100 mM KCl ; 10 % glycérol ; 1 mM PMSF ; 2 mM DTT ; 1 tablette PIC/L de culture). La technique de lyse utilisée était la même que décrite précédemment. L'extrait total a été centrifugé à 50 000 x g pendant 1 h. La première étape de purification a été réalisée sur 2 colonnes Hitrap Chelating branchées en tandem et chargées en ion Ni²⁺ à 2 mL/min. Une étape de lavage a été effectuée avec 40 mM d'imidazole. La protéine a été éluée avec 250 mM d'imidazole de ce tampon. L'éluât a ensuite été concentré dans un concentrateur (VIVASPIN, membrane PES, cut-off de 10 KDa) jusqu'à obtenir un volume final de 4 mL. La deuxième étape de purification a été réalisée grâce à une colonne de chromatographie d'exclusion Superdex 200 16/60 (GE Healthcare), équilibrée en tampon de lyse sans PMSF et tablette PIC additionné de 0,1 mM de EDTA. Les fractions correspondant au deuxième pic d'éluion ont été récupérées et congelées en azote liquide, puis conservées à -80°C. Le rendement était de 1,16 mg/L de culture. La pureté de l'échantillon

obtenu était suffisante pour réaliser les réactions de phosphorylation des domaines C-terminaux (**Figure 119**).

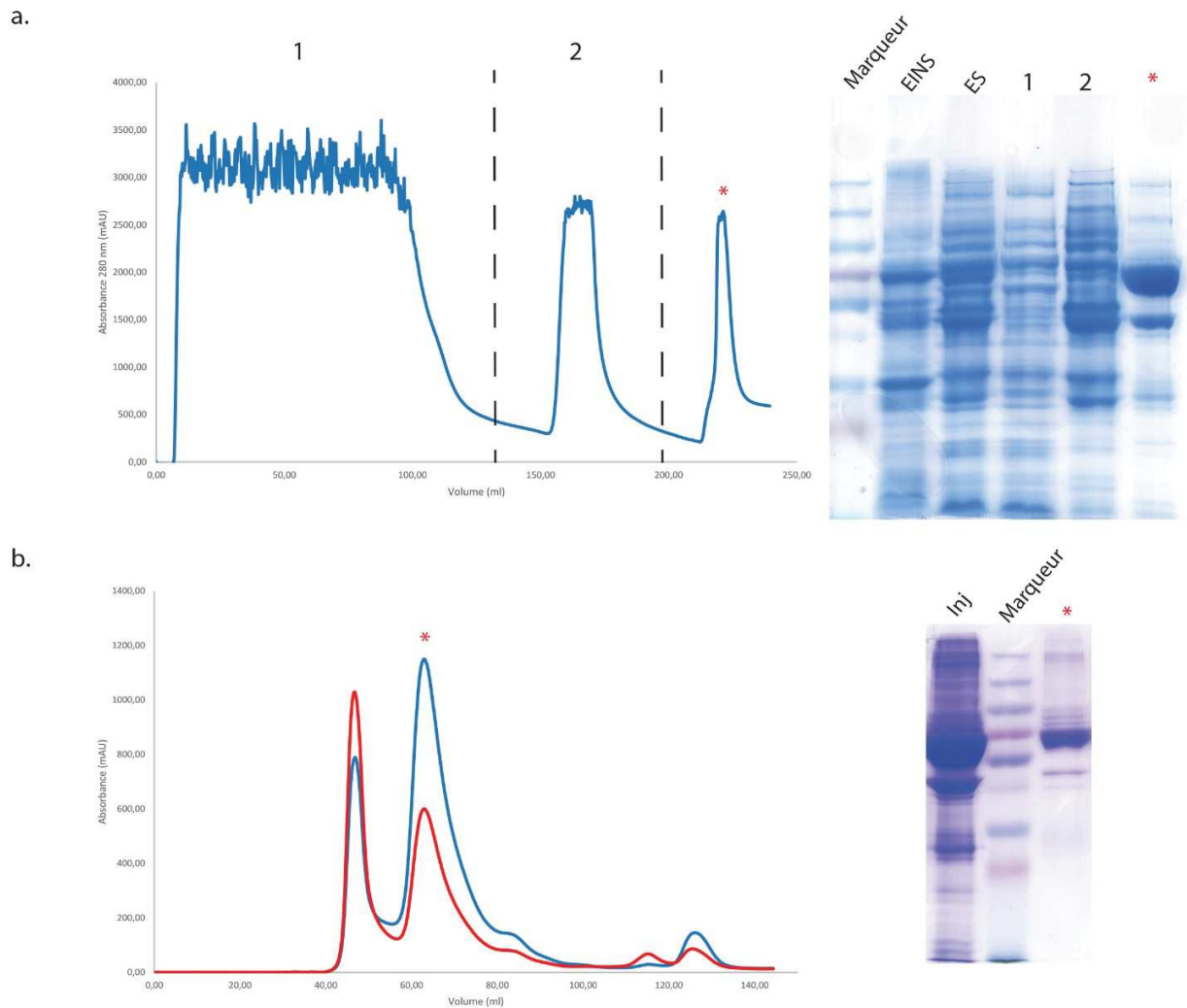


Figure 119 Purification de CK2. (a) Après lyse une première étape de purification sur une colonne d'affinité Nickel. Les fractions 1 et 2 correspondent dans l'ordre à 1 : l'injection de la fraction soluble, 2 : lavage avec 40 mM d'imidazole. L'astérisque correspond au pic d'élué avec 250 mM d'imidazole. (b) Deuxième étape de purification sur une colonne d'exclusion stérique Superdex 200 16/60 . L'astérisque correspond à la fraction contenant la CK2. . Les courbes bleu et rouge correspondent respectivement aux signaux à 280 et 260 nm.

9. Analyse par spectrométrie de masse

Les étapes de traitement de l'échantillon, la réalisation de l'analyse ainsi que la mise en forme des résultats ont été réalisées par la plateforme de protéomique de l'IGBMC.

9.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons ont été fournis à la plateforme, sous forme liquide ou en gel SDS-PAGE. Les échantillons liquides de 100 μ L contenaient entre 10 et 15 μ g de protéine. Les échantillons en gel étaient préparés en déposant 4 à 5 μ g de protéine sur gel, coloré au Bleu de Coomassie après migration.

Traitement des échantillons liquides

Une incubation des échantillons en présence d'acide trichloroacétique a été réalisée sur la nuit à 4°C. Après une étape de centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C, les culots obtenus ont été dénaturés par une solution d'urée 8 M, 100 μ M Tris-HCl pH 8.0. Une première étape de réduction a été réalisée dans une solution contenant 5 mM de tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP). Une seconde réduction a été réalisée dans 10 mM de DTT, 100 mM de bicarbonate d'ammonium (BA), suivie d'une réaction d'alkylation dans 55 mM d'iodoacétamide, 100 mM de BA. Toutes les réactions suivant la centrifugation ont été effectuées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

Traitement des échantillons en gel SDS-PAGE

Les bandes d'intérêt ont été découpées au scalpel puis décolorées lors de lavages successifs avec une solution de BA à 25 mM. Une fois les bandes décolorées, 100 μ L d'acétonitrile ont été ajoutés. Le mélange ainsi obtenu a été incubé durant 20 minutes à température ambiante. Les fragments de gels ont été séchés pendant 10 minutes sous vide dans un appareil SpeedVac. Les protéines présentes dans le gel ont été réduites dans 10 mM de DTT et 100 mM de BA puis alkylées dans 55 mM d'iodoacétamide et 100 mM de BA. Chaque réaction a été réalisée à 56 °C, à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Trois lavages successifs avec 200 μ L de BA à 25 mM ont été effectués, avant que les bandes de gels ne soient à nouveau séchées dans 100 μ L d'acétonitrile pendant 15 minutes à l'aide du SpeedVac.

Digestion à la trypsine et la chymotrypsine

Les échantillons en gel ont été incubés avec 70 µL de trypsine ou chymotrypsine à 20 µg/ml (Promega) pendant la nuit à 37 °C. Après élimination du surnageant, le culot a été re-solubilisé dans une solution de BA à 25 mM pendant 12 heures à 37 °C. Les peptides ainsi obtenus ont été extraits en utilisant un mélange d'acide acétique 10 % et d'acétonitrile 45 %. Les échantillons qui en résultent ont été centrifugés à 10 000 g pendant 5 minutes. Une seconde étape d'extraction a été effectuée en utilisant un mélange d'acide acétique 5%, acétonitrile 95%. Le surnageant a été évaporé en utilisant le SpeedVac.

Les échantillons liquides ont été soumis à une double digestion. La première a été réalisée par l'endoprotéase Lys-C (Wako) avec un ratio massique enzyme/protéine de 1:100 dans une solution d'urée 8 M pendant 4 heures à 37°C. Puis, une digestion par la trypsine à 20 µg/ml (Promega) a été réalisée en présence d'urée 2 M durant la nuit à 37°C. Enfin, les peptides ont été dessalés par une cartouche C18 et séchés à l'aide du SpeedVac.

9.2. Analyse LC-MS/MS

5 µL de mélange peptidique ont été injectés sur une colonne C18 Acclaim PepMap 100 trap-column (Thermo Fisher Scientific). Le débit de l'éluant (2% d'acétonitrile, 0,1% formaldéhyde), était de 5 µL/min. Les peptides ont ensuite été séparés en utilisant une colonne C18 Accucore nano-column (Thermo Fisher Scientific). La séparation a été réalisée par un gradient de 0 à 100 % d'acétonitrile sur 120 minutes à 38°C, à un débit de 200 nL/min. Cette séparation était composée de 3 phases à différentes concentrations d'acétonitrile: 1) 90 minutes, 5 à 35%, 2) 20 minutes, 35 à 80%, 3) 5 minutes, 99%.

Le spectromètre de masse utilisé est un LTQ Velos Pro (Thermo Fisher Scientific), couplé à un Orbitrap Elit (Thermo Fisher Scientific). La méthode d'analyse est basée sur une première fragmentation de tous les peptides suivie par une mesure de leur spectre respectif via le LTQ Velos Pro à une sensibilité donnée de 300 ppm. Les 20 pics les plus intenses ont ensuite été re-fragmentés pour une deuxième analyse (MS₂) dans l'Orbitrap Elit à une sensibilité de 10 ppm. La base de données utilisée pour l'identification des protéines associées aux peptides est SequestHT, associée

au logiciel Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific). La confiance accordée aux spectres ainsi obtenus est paramétrée avec un taux de faux positif à 1%.

Bibliographie

- 1 Lyubchenko, Y. L., Gall, A. A. & Shlyakhtenko, L. S. Visualization of DNA and protein-DNA complexes with atomic force microscopy. *Methods Mol Biol* **1117**, 367-384, doi:10.1007/978-1-62703-776-1_17 (2014).
- 2 Delgado, J. L., Hsieh, C. M., Chan, N. L. & Hiasa, H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J* **475**, 373-398, doi:10.1042/Bcj20160583 (2018).
- 3 King, I. F. *et al.* Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* **501**, 58+, doi:10.1038/nature12504 (2013).
- 4 Tiwari, V. K. *et al.* Target genes of Topoisomerase II beta regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *P Natl Acad Sci USA* **109**, E934-E943, doi:10.1073/pnas.1119798109 (2012).
- 5 Chen, T., Sun, Y., Ji, P., Kopetz, S. & Zhang, W. Topoisomerase II alpha in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene* **34**, 4019-4031, doi:10.1038/onc.2014.332 (2015).
- 6 Redwood, C., Davies, S. L., Wells, N. J., Fry, A. M. & Hickson, I. D. Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II alpha in a phosphorylation-independent manner. *J Biol Chem* **273**, 3635-3642, doi:10.1074/jbc.273.6.3635 (1998).
- 7 Wu, C. C., Li, Y. C., Wang, Y. R., Li, T. K. & Chan, N. L. On the structural basis and design guidelines for type II topoisomerase-targeting anticancer drugs. *Nucleic Acids Res* **41**, 10630-10640, doi:10.1093/nar/gkt828 (2013).
- 8 Papillon, J. *et al.* Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic Acids Res* **41**, 7815-7827, doi:10.1093/nar/gkt560 (2013).
- 9 Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular-Structure of Nucleic-Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic-Acid. *Jama-J Am Med Assoc* **269**, 1966-1967, doi:10.1001/jama.269.15.1966 (1993).
- 10 Buck, D. DNA Topology. *American Mathematical Society* **66**, 1-28 (2009).
- 11 Richmond, T. J., Finch, J. T. & Klug, A. The Structure of the Nucleosome Core Particle. *Biochem Soc T* **14**, 221-221 (1986).

- 12 Gupta, P., Zlatanova, J. & Tomschik, M. Nucleosome Assembly Depends on the Torsion in the DNA Molecule: A Magnetic Tweezers Study. *Biophys J* **97**, 3150-3157, doi:10.1016/j.bpj.2009.09.032 (2009).
- 13 Lynch, A. S. & Wang, J. C. 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, doi:10.1128/Jb.175.6.1645-1655.1993 (1993).
- 14 A.D., B. & A, M. DNA Topology. *Oxford University Press* (2005).
- 15 Bauer, W. R., Crick, F. H. C. & White, J. H. Supercoiled DNA. *Sci Am* **243**, 118-& (1980).
- 16 White, J. H. & Cozzarelli, N. R. A Simple Topological Method for Describing Stereoisomers of DNA Catenanes and Knots. *P Natl Acad Sci-Biol* **81**, 3322-3326, doi:10.1073/pnas.81.11.3322 (1984).
- 17 Vologodskii, A. V. & Cozzarelli, N. R. Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA. *Annu Rev Bioph Biom* **23**, 609-643, doi:10.1146/annurev.bb.23.060194.003141 (1994).
- 18 Schvartzman, J. B., Hernandez, P., Krimer, D. B., Dorier, J. & Stasiak, A. Closing the DNA replication cycle: from simple circular molecules to supercoiled and knotted DNA catenanes. *Nucleic Acids Res* **47**, 7182-7198, doi:10.1093/nar/gkz586 (2019).
- 19 Vologodskii, A. V., Lukashin, A. V., Anshelevich, V. V. & Frankkamenetskii, M. D. Fluctuations in Superhelical DNA. *Nucleic Acids Res* **6**, 967-982, doi:10.1093/nar/6.3.967 (1979).
- 20 Espeli, O. & Marians, K. J. Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* **52**, 925-931, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04047.x (2004).
- 21 Falaschi, A. *et al.* Molecular and structural transactions at human DNA replication origins. *Cell Cycle* **6**, 1705-1712, doi:10.4161/cc.6.14.4495 (2007).
- 22 Travers, A. & Muskhelishvili, G. A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *Embo Rep* **8**, 147-151, doi:10.1038/sj.embor.7400898 (2007).
- 23 Postow, L., Crisona, N. J., Peter, B. J., Hardy, C. D. & Cozzarelli, N. R. Topological challenges to DNA replication: Conformations at the fork. *P Natl Acad Sci USA* **98**, 8219-8226, doi:10.1073/pnas.111006998 (2001).

- 24 Watson, J. D. & Crick, F. H. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **171**, 964-967, doi:10.1038/171964b0 (1953).
- 25 Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Bio* **3**, 430-440, doi:10.1038/nrm831 (2002).
- 26 Niehus, E., Cheng, E. & Tan, M. DNA supercoiling-dependent gene regulation in Chlamydia. *J Bacteriol* **190**, 6419-6427, doi:10.1128/Jb.00431-08 (2008).
- 27 Sheval, E. V., Prusov, A. N., Kireev, I. I., Fais, D. & Polyakov, V. Y. Organization of higher-level chromatin structures (chromomere, chromonema and chromatin block) examined using visible light-induced chromatin photo-stabilization. *Cell Biol Int* **26**, 579-591, doi:10.1006/cbir.2002.0879 (2002).
- 28 Ou, H. D. *et al.* ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* **357**, doi:ARTN eaag0025 10.1126/science.aag0025 (2017).
- 29 C., R. über Zellteilung. *Morph Jahrb* **10**, 210-230 (1885).
- 30 Bolzer, A. *et al.* Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *Plos Biol* **3**, 826-842, doi:ARTN e157 10.1371/journal.pbio.0030157 (2005).
- 31 Lieberman-Aiden, E. *et al.* Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* **326**, 289-293, doi:10.1126/science.1181369 (2009).
- 32 Matharu, N. & Ahituv, N. Minor Loops in Major Folds: Enhancer-Promoter Looping, Chromatin Restructuring, and Their Association with Transcriptional Regulation and Disease. *Plos Genet* **11**, doi:ARTN e1005640 10.1371/journal.pgen.1005640 (2015).
- 33 Gonzalez-Sandoval, A. & Gasser, S. M. On TADs and LADs: Spatial Control Over Gene Expression. *Trends Genet* **32**, 485-495, doi:10.1016/j.tig.2016.05.004 (2016).
- 34 Racko, D., Benedetti, F., Dorier, J. & Stasiak, A. Are TADs supercoiled? *Nucleic Acids Res* **47**, 521-532, doi:10.1093/nar/gky1091 (2019).
- 35 McClendon, A. K. & Osheroff, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res-Fund Mol M* **623**, 83-97, doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.06.009 (2007).

- 36 Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. Topoisomerase-Iv Is a Target of Quinolones in Escherichia-Coli. *P Natl Acad Sci USA* **92**, 11801-11805, doi:10.1073/pnas.92.25.11801 (1995).
- 37 Sundin, O. & Varshavsky, A. Arrest of Segregation Leads to Accumulation of Highly Intertwined Catenated Dimers - Dissection of the Final Stages of Sv40 DNA-Replication. *Cell* **25**, 659-669, doi:10.1016/0092-8674(81)90173-2 (1981).
- 38 Ebisuya, M., Yamamoto, T., Nakajima, M. & Nishida, E. Ripples from neighbouring transcription. *Nat Cell Biol* **10**, 1106-1113, doi:10.1038/ncb1771 (2008).
- 39 Ashley, R. E. *et al.* Activities of gyrase and topoisomerase IV on positively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res* **45**, 9611-9624, doi:10.1093/nar/gkx649 (2017).
- 40 Sen, N. *et al.* Physical Proximity of Sister Chromatids Promotes Top2-Dependent Intertwining. *Mol Cell* **64**, 134-147, doi:10.1016/j.molcel.2016.09.007 (2016).
- 41 Gemble, S. *et al.* Topoisomerase IIalpha prevents ultrafine anaphase bridges by two mechanisms. *Open Biol* **10**, 190259, doi:10.1098/rsob.190259 (2020).
- 42 De La Fuente, R., Baumann, C. & Viveiros, M. M. ATRX contributes to epigenetic asymmetry and silencing of major satellite transcripts in the maternal genome of the mouse embryo. *Development* **142**, 1806-1817, doi:10.1242/dev.118927 (2015).
- 43 Li, L. F., Barth, N. K. H., Pilarsky, C. & Taher, L. Cancer Is Associated with Alterations in the Three-Dimensional Organization of the Genome. *Cancers* **11**, doi:ARTN 1886 10.3390/cancers11121886 (2019).
- 44 Diaz, N. *et al.* Chromatin conformation analysis of primary patient tissue using a low input Hi-C method. *Nat Commun* **9**, doi:ARTN 4938 10.1038/s41467-018-06961-0 (2018).
- 45 Bacolla, A., Tainer, J. A., Vasquez, K. M. & Cooper, D. N. Translocation and deletion breakpoints in cancer genomes are associated with potential non-B DNA-forming sequences. *Nucleic Acids Res* **44**, 5673-5688, doi:10.1093/nar/gkw261 (2016).
- 46 Kouzine, F. & Levens, D. Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Front Biosci-Landmrk* **12**, 4409-4423, doi:10.2741/2398 (2007).
- 47 Ye, F. *et al.* Flagellar and global gene regulation in Helicobacter pylori modulated by changes in DNA supercoiling. *Int J Med Microbiol* **297**, 65-81, doi:10.1016/j.ijmm.2006.11.006 (2007).

- 48 Fournier, B. & Klier, A. Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol-Sgm* **150**, 3807-3819, doi:10.1099/mic.0.27194-0 (2004).
- 49 Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* **181**, 4198-4204, doi:10.1128/Jb.181.14.4198-4204.1999 (1999).
- 50 Dorman, C. J. DNA Supercoiling and Environmental-Regulation of Gene-Expression in Pathogenic Bacteria. *Infect Immun* **59**, 745-749, doi:10.1128/Iai.59.3.745-749.1991 (1991).
- 51 Dorman, C. J., Colgan, A. & Dorman, M. J. Bacterial pathogen gene regulation: a DNA-structure-centred view of a protein-dominated domain. *Clin Sci* **130**, 1165-1177, doi:10.1042/Cs20160024 (2016).
- 52 Gellert, M., Mizuuchi, K., Odea, M. H. & Nash, H. A. DNA Gyrase - Enzyme That Introduces Superhelical Turns into DNA. *P Natl Acad Sci USA* **73**, 3872-3876, doi:10.1073/pnas.73.11.3872 (1976).
- 53 Kirkegaard, K. & Wang, J. C. Escherichia-Coli DNA Topoisomerase I Catalyzed Linking of Single-Stranded Rings of Complementary Base Sequences. *Nucleic Acids Res* **5**, 3811-3820, doi:10.1093/nar/5.10.3811 (1978).
- 54 Corbett, K. D. & Berger, J. M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Bioph Biom* **33**, 95-118, doi:10.1146/annurev.biophys.33.110502.140357 (2004).
- 55 Schoeffler, A. J. & Berger, J. M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys* **41**, 41-101, doi:10.1017/S003358350800468x (2008).
- 56 Mills, W. E., Spence, J. M., Fukagawa, T. & Farr, C. J. Site-Specific Cleavage by Topoisomerase 2: A Mark of the Core Centromere. *Int J Mol Sci* **19**, doi:ARTN 534 10.3390/ijms19020534 (2018).
- 57 Bates, A. D. & Maxwell, A. The role of ATP in the reactions of type II DNA topoisomerases. *Biochem Soc T* **38**, 438-442, doi:10.1042/Bst0380438 (2010).
- 58 Brino, L. *et al.* Dimerization of Escherichia coli DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J Biol Chem* **275**, 9468-9475, doi:10.1074/jbc.275.13.9468 (2000).

- 59 Corbett, K. D. & Berger, J. M. Structure of the topoisomerase VI-B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. *Embo J* **22**, 151-163, doi:10.1093/emboj/cdg008 (2003).
- 60 Kampranis, S. C., Bates, A. D. & Maxwell, A. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *P Natl Acad Sci USA* **96**, 8414-8419, doi:10.1073/pnas.96.15.8414 (1999).
- 61 Xie, P. Dynamics of strand passage catalyzed by topoisomerase II. *Eur Biophys J Biophys* **39**, 1251-1259, doi:10.1007/s00249-010-0578-y (2010).
- 62 Wei, H., Ruthenburg, A. J., Bechis, S. K. & Verdine, G. L. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **280**, 37041-37047, doi:10.1074/jbc.M506520200 (2005).
- 63 Schmidt, B. H., Osheroff, N. & Berger, J. M. Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1147-+, doi:10.1038/nsmb.2388 (2012).
- 64 Lapogonov, I. *et al.* Trapping of the transport-segment DNA by the ATPase domains of a type II topoisomerase. *Nat Commun*, doi:10.1038/s41467-018-05005-x (2018).
- 65 Oestergaard, V. H. *et al.* The transducer domain is important for clamp operation in human DNA topoisomerase II alpha. *J Biol Chem* **279**, 1684-1691, doi:10.1074/jbc.M309624200 (2004).
- 66 Bjergbaek, L. *et al.* Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of human topoisomerase II alpha. *J Biol Chem* **275**, 13041-13048, doi:10.1074/jbc.275.17.13041 (2000).
- 67 Aravind, L., Leipe, D. D. & Koonin, E. V. Toprim - a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 4205-4213, doi:10.1093/nar/26.18.4205 (1998).
- 68 Morant-Lhomel, A. *et al.* Self-association and DNA binding properties of the human topoisomerase IIA alpha 2HTH module. *Biochimie* **88**, 253-263, doi:10.1016/j.biochi.2005.08.003 (2006).
- 69 Deweese, J. E. & Osheroff, N. The use of divalent metal ions by type II topoisomerases. *Metallomics* **2**, 450-459, doi:10.1039/c003759a (2010).
- 70 Chen, S. F. *et al.* Structural insights into the gating of DNA passage by the topoisomerase II DNA-gate. *Nat Commun* **9**, doi:ARTN 3085 10.1038/s41467-018-05406-y (2018).

- 71 Lee, I., Dong, K. C. & Berger, J. M. The role of DNA bending in type IIA topoisomerase function. *Nucleic Acids Res* **41**, 5444-5456, doi:10.1093/nar/gkt238 (2013).
- 72 Fass, D., Bogden, C. E. & Berger, J. M. Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat Struct Biol* **6**, 322-326 (1999).
- 73 Laponogov, I. *et al.* Structure of an 'open' clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport. *Nucleic Acids Res* **41**, 9911-9923, doi:10.1093/nar/gkt749 (2013).
- 74 Onoda, A. *et al.* Nuclear dynamics of topoisomerase II beta reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* **42**, 9005-9020, doi:10.1093/nar/gku640 (2014).
- 75 Kawano, S. *et al.* DNA-binding activity of rat DNA topoisomerase II alpha C-terminal domain contributes to efficient DNA catenation in vitro. *J Biochem* **159**, 363-369, doi:10.1093/jb/mvv110 (2016).
- 76 Dickey, J. S. & Osheroff, N. Impact of the C-terminal domain of topoisomerase II alpha on the DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry-Us* **44**, 11546-11554, doi:10.1021/bi050811i (2005).
- 77 Linka, R. M. *et al.* C-terminal regions of topoisomerase II alpha and II beta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res* **35**, 3810-3822, doi:10.1093/nar/gkm102 (2007).
- 78 McClendon, A. K. *et al.* Bimodal Recognition of DNA Geometry by Human Topoisomerase II alpha: Preferential Relaxation of Positively Supercoiled DNA Requires Elements in the C-Terminal Domain. *Biochemistry-Us* **47**, 13169-13178, doi:10.1021/bi800453h (2008).
- 79 Meczes, E. L., Gilroy, K. L., West, K. L. & Austin, C. A. The Impact of the Human DNA Topoisomerase II C-Terminal Domain on Activity. *Plos One* **3**, doi:ARTN e1754 10.1371/journal.pone.0001754 (2008).
- 80 Gilroy, K. L. & Austin, C. A. The Impact of the C-Terminal Domain on the Interaction of Human DNA Topoisomerase II alpha and beta with DNA. *Plos One* **6**, doi:ARTN e14693 10.1371/journal.pone.0014693 (2011).

- 81 Corbett, K. D., Shultzaberger, R. K. & Berger, J. M. The C-terminal domain of DNA gyrase A adopts a DNA-bending beta-pinwheel fold. *P Natl Acad Sci USA* **101**, 7293-7298, doi:10.1073/pnas.0401595101 (2004).
- 82 Kramlinger, V. M. & Hiasa, H. The "GyrA-box" is required for the ability of DNA gyrase to wrap DNA and catalyze the supercoiling reaction. *J Biol Chem* **281**, 3738-3742, doi:10.1074/jbc.M511160200 (2006).
- 83 Lanz, M. A. & Klostermeier, D. The GyrA-box determines the geometry of DNA bound to gyrase and couples DNA binding to the nucleotide cycle. *Nucleic Acids Res* **40**, 10893-10903, doi:10.1093/nar/gks852 (2012).
- 84 Corbett, K. D., Schoeffler, A. J., Thomsen, N. D. & Berger, J. M. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol* **351**, 545-561, doi:10.1016/j.jmb.2005.06.029 (2005).
- 85 Lanz, M. A. & Klostermeier, D. Guiding strand passage: DNA-induced movement of the gyrase C-terminal domains defines an early step in the supercoiling cycle. *Nucleic Acids Res* **39**, 9681-9694, doi:10.1093/nar/gkr680 (2011).
- 86 Neuman, K. C. The tail that wags the dog: Topoisomerase IV ParC C-Terminal domain controls strand passage activity through multipartite topology-dependent interactions with DNA. *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2013.07.004 (2013).
- 87 Levine, C., Hiasa, H. & Marians, K. J. DNA gyrase and topoisomerase IV: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Bba-Gene Struct Expr* **1400**, 29-43, doi:10.1016/S0167-4781(98)00126-2 (1998).
- 88 Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B. & Cozzarelli, N. R. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in Escherichia coli. *Gene Dev* **11**, 2580-2592, doi:10.1101/gad.11.19.2580 (1997).
- 89 Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. Roles of Topoisomerase-Iv and DNA Gyrase in DNA Unlinking during Replication in Escherichia-Coli. *Gene Dev* **9**, 2859-2869, doi:10.1101/gad.9.22.2859 (1995).
- 90 Lopez, V., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., Krimer, D. B. & Schwartzman, J. B. Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Res* **40**, 3563-3573, doi:10.1093/nar/gkr1237 (2012).

- 91 Zechiedrich, E. L. *et al.* Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**, 8103-8113, doi:10.1074/jbc.275.11.8103 (2000).
- 92 Charvin, G., Strick, T. R., Bensimon, D. & Croquette, V. Topoisomerase IV bends and overtwists DNA upon binding. *Biophys J* **89**, 384-392, doi:10.1529/biophysj.105.060202 (2005).
- 93 Neuman, K. C., Charvin, G., Bensimon, D. & Croquette, V. Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV. *P Natl Acad Sci USA* **106**, 6986-6991, doi:10.1073/pnas.0900574106 (2009).
- 94 Seol, Y., Hardin, A. H., Strub, M. P., Charvin, G. & Neuman, K. C. Comparison of DNA decatenation by *Escherichia coli* topoisomerase IV and topoisomerase III: implications for non-equilibrium topology simplification. *Nucleic Acids Res* **41**, 4640-4649, doi:10.1093/nar/gkt136 (2013).
- 95 Stelljes, J. T., Weidlich, D., Gubaev, A. & Klostermeier, D. Gyrase containing a single C-terminal domain catalyzes negative supercoiling of DNA by decreasing the linking number in steps of two. *Nucleic Acids Res* **46**, 6773-6784, doi:10.1093/nar/gky470 (2018).
- 96 Schoeffler, A. J., May, A. P. & Berger, J. M. A domain insertion in *Escherichia coli* GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function. *Nucleic Acids Res* **38**, 7830-7844, doi:10.1093/nar/gkq665 (2010).
- 97 Saijo, M., Ui, M. & Enomoto, T. Growth-State and Cell-Cycle Dependent Phosphorylation of DNA Topoisomerase-II in Swiss 3t3 Cells. *Biochemistry-US* **31**, 359-363, doi:10.1021/bi00117a007 (1992).
- 98 Burden, D. A., Goldsmith, L. J. & Sullivan, D. M. Cell-Cycle-Dependent Phosphorylation and Activity of Chinese-Hamster Ovary Topoisomerase-II. *Biochem J* **293**, 297-304, doi:10.1042/bj2930297 (1993).
- 99 Ali, Y. & Abd Hamid, S. Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumor Biol* **37**, 47-55, doi:10.1007/s13277-015-4270-9 (2016).
- 100 Gilson, E. & Geli, V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Bio* **8**, 825-838, doi:10.1038/nrm2259 (2007).
- 101 Srikantan, S. *et al.* Translational Control of TOP2A Influences Doxorubicin Efficacy. *Mol Cell Biol* **31**, 3790-3801, doi:10.1128/Mcb.05639-11 (2011).

- 102 Fielding, A. B. *et al.* The deubiquitylase USP15 regulates topoisomerase II alpha to maintain genome integrity. *Oncogene* **37**, 2326-2342, doi:10.1038/s41388-017-0092-0 (2018).
- 103 Eguren, M. *et al.* A Synthetic Lethal Interaction between APC/C and Topoisomerase Poisons Uncovered by Proteomic Screens. *Cell Rep* **6**, 670-683, doi:10.1016/j.celrep.2014.01.017 (2014).
- 104 Bauer, D. L. V., Marie, R., Rasmussen, K. H., Kristensen, A. & Mir, K. U. DNA catenation maintains structure of human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res* **40**, 11428-11434, doi:10.1093/nar/gks931 (2012).
- 105 Nielsen, C. F. *et al.* PICH promotes sister chromatid disjunction and co-operates with topoisomerase II in mitosis. *Nat Commun* **6**, doi:ARTN 8962 10.1038/ncomms9962 (2015).
- 106 Daniloski, Z., Bisht, K. K., McStay, B. & Smith, S. Resolution of human ribosomal DNA occurs in anaphase, dependent on tankyrase 1, condensin II, and topoisomerase II alpha. *Gene Dev* **33**, 276-281, doi:10.1101/gad.321836.118 (2019).
- 107 d'Alcontres, M. S., Palacios, J. A., Mejias, D. & Blasco, M. A. TopoII alpha prevents telomere fragility and formation of ultra thin DNA bridges during mitosis through TRF1-dependent binding to telomeres. *Cell Cycle* **13**, 1463-1481, doi:10.4161/cc.28419 (2014).
- 108 Uemura, T. *et al.* DNA Topoisomerase-II Is Required for Condensation and Separation of Mitotic Chromosomes in S-Pombe. *Cell* **50**, 917-925, doi:10.1016/0092-8674(87)90518-6 (1987).
- 109 Cuvier, O. & Hirano, T. A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation. *J Cell Biol* **160**, 645-655, doi:10.1083/jcb.200209023 (2003).
- 110 Kimura, K. & Hirano, T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: A biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* **90**, 625-634, doi:10.1016/S0092-8674(00)80524-3 (1997).
- 111 Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T. & Cozzarelli, N. R. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: Implications for chromosome condensation. *Cell* **98**, 239-248, doi:10.1016/S0092-8674(00)81018-1 (1999).

- 112 Lin, S. J. & O'Connell, M. J. DNA Topoisomerase II modulates acetyl-regulation of cohesin-mediated chromosome dynamics. *Curr Genet* **63**, 923-930, doi:10.1007/s00294-017-0691-x (2017).
- 113 Gomez, R. *et al.* Cohesin removal precedes topoisomerase II alpha-dependent decatenation at centromeres in male mammalian meiosis II. *Chromosoma* **123**, 129-146, doi:10.1007/s00412-013-0434-9 (2014).
- 114 Ishida, R. *et al.* Mitotic specific phosphorylation of serine-1212 in human DNA topoisomerase II alpha. *Cell Struct Funct* **26**, 215-226, doi:10.1247/csf.26.215 (2001).
- 115 Zhang, M. *et al.* Histone H2A phosphorylation recruits topoisomerase II alpha to centromeres to safeguard genomic stability. *Embo J* **39**, doi:ARTN e101863 10.15252/embj.2019101863 (2020).
- 116 Hassebroek, V. *et al.* PICH promotes SUMOylated TopoisomeraseII α dissociation from mitotic centromeres for proper chromosome segregation. *bioRxiv*, doi:10.1101/781401 (2019).
- 117 Luo, K. T., Yuan, J., Chen, J. J. & Lou, Z. K. Topoisomerase II alpha controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 204-U196, doi:10.1038/ncb1828 (2009).
- 118 Carpenter, A. J. & Porter, A. C. G. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II alpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell* **15**, 5700-5711, doi:10.1091/mbc.E04-08-0732 (2004).
- 119 Lee, J. H. & Berger, J. M. Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *Genes-Basel* **10**, doi:ARTN 859 10.3390/genes10110859 (2019).
- 120 Cuvier, O., Stanojcic, S., Lemaitre, J. M. & Mechali, M. A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition. *Gene Dev* **22**, 860-865, doi:10.1101/gad.445108 (2008).
- 121 Capranico, G., Tinelli, S., Austin, C. A., Fisher, M. L. & Zunino, F. Different Patterns of Gene-Expression of Topoisomerase-II Isoforms in Differentiated Tissues during Murine Development. *Biochim Biophys Acta* **1132**, 43-48, doi:10.1016/0167-4781(92)90050-A (1992).
- 122 Yang, X., Li, W., Prescott, E. D., Burden, S. J. & Wang, J. C. DNA topoisomerase II beta and neural development. *Science* **287**, 131-134, doi:10.1126/science.287.5450.131 (2000).

- 123 Harkin, L. F. *et al.* Distinct expression patterns for type II topoisomerases IIA and IIB in the early foetal human telencephalon. *J Anat* **228**, 452-463, doi:10.1111/joa.12416 (2016).
- 124 Watanabe, M., Tsutsui, K., Tsutsui, K. & Inoue, Y. Differential-Expressions of the Topoisomerase Ii-Alpha and Ii-Beta Messenger-Rnas in Developing Rat-Brain. *Neurosci Res* **19**, 51-57, doi:10.1016/0168-0102(94)90007-8 (1994).
- 125 Zandvliet, D. W. J. *et al.* Analysis of foetal expression sites of human type II DNA topoisomerase alpha and beta mRNAs by in situ hybridisation. *Bba-Gene Struct Expr* **1307**, 239-247, doi:10.1016/0167-4781(96)00063-2 (1996).
- 126 Heng, X. & Le, W. D. The function of DNA topoisomerase II beta in neuronal development. *Neurosci Bull* **26**, 411-416, doi:10.1007/s12264-010-0625-9 (2010).
- 127 Sano, K., Miyaji-Yamaguchi, M., Tsutsui, K. M. & Tsutsui, K. Topoisomerase II beta Activates a Subset of Neuronal Genes that Are Repressed in AT-Rich Genomic Environment. *Plos One* **3**, doi:ARTN e4103 10.1371/journal.pone.0004103 (2008).
- 128 Zylka, M. J., Simon, J. M. & Philpot, B. D. Gene Length Matters in Neurons. *Neuron* **86**, 353-355, doi:10.1016/j.neuron.2015.03.059 (2015).
- 129 Visel, A., Thaller, C. & Eichele, G. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Res* **32**, D552-D556, doi:10.1093/nar/gkh029 (2004).
- 130 Telley, L. *et al.* Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science* **364**, 547-+, doi:ARTN eaav2522 10.1126/science.aav2522 (2019).
- 131 Song, S.-H. & Kim, T.-Y. CTCF, Cohesin, and Chromatin in Human Cancer. *Genomics Inform* **15**, doi:10.5808/GI.2017.15.4.114 (2017).
- 132 Orlandini, E., Marenduzzo, D. & Michieletto, D. Synergy of topoisomerase and structural-maintenance-of-chromosomes proteins creates a universal pathway to simplify genome topology. *P Natl Acad Sci USA* **116**, 8149-8154, doi:10.1073/pnas.1815394116 (2019).
- 133 Madabhushi, R. The Roles of DNA Topoisomerase II beta in Transcription. *Int J Mol Sci* **19**, doi:ARTN 1917 10.3390/ijms19071917 (2018).
- 134 Haffner, M. C., De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Nelson, W. G. & Yegnasubramanian, S. Transcription-Induced DNA Double Strand Breaks: Both Oncogenic Force and Potential

- Therapeutic Target? *Clin Cancer Res* **17**, 3858-3864, doi:10.1158/1078-0432.Ccr-10-2044 (2011).
- 135 Morimoto, S. *et al.* Type II DNA Topoisomerases Cause Spontaneous Double-Strand Breaks in Genomic DNA. *Genes-Basel* **10**, doi:ARTN 868 10.3390/genes10110868 (2019).
- 136 Canela, A. *et al.* Genome Organization Drives Chromosome Fragility. *Cell* **170**, 507-521 e518, doi:10.1016/j.cell.2017.06.034 (2017).
- 137 Kellner, U., Sehested, M., Jensen, P. B., Gieseler, F. & Rudolph, P. Culprit and victim - DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* **3**, 235-243, doi:10.1016/S1470-2045(02)00715-5 (2002).
- 138 Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**, 338-350, doi:10.1038/nrc2607 (2009).
- 139 Marinello, J., Delcuratolo, M. & Capranico, G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. *Int J Mol Sci* **19**, doi:ARTN 3480 10.3390/ijms19113480 (2018).
- 140 Ling, Y. H., ElNaggar, A. K., Priebe, W. & PerezSoler, R. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34(cdc2)/cyclin B-1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. *Mol Pharmacol* **49**, 832-841 (1996).
- 141 Zhao, L. Q. & Zhang, B. L. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep-Uk* **7**, doi:ARTN 44735 10.1038/srep44735 (2017).
- 142 Mir, O., Dahut, W., Goldwasser, F. & Heery, C. in *DNA Topoisomerases and Cancer* (ed Y. Pommier) 279-307 (2012).
- 143 Posner, L. E., Dukart, G., Goldberg, J., Bernstein, T. & Cartwright, K. Mitoxantrone - an Overview of Safety and Toxicity. *Invest New Drug* **3**, 123-132 (1985).
- 144 Heidemann, E. *et al.* Is first-line single-agent mitoxantrone in the treatment of high-risk metastatic breast cancer patients as effective as combination chemotherapy? No difference in survival but higher quality of life were found in a multicenter randomized trial. *Ann Oncol* **13**, 1717-1729, doi:10.1093/annonc/mdf306 (2002).

- 145 Najafian, J., Nasri, A., Etemadifar, M. & Salehzadeh, F. Late Cardiotoxicity in MS Patients Treated with Mitoxantrone. *Int J Preventive Med* **10**, doi:ARTN 211 10.4103/ijpvm.IJPVM_477_17 (2019).
- 146 Rossato, L. G. *et al.* Mitoxantrone: A comparative study of early and late toxic effects in rats. *Toxicol Lett* **211**, S76-S76, doi:10.1016/j.toxlet.2012.03.293 (2012).
- 147 Pommier, Y., Orr, A., Kohn, K. W. & Riou, J. F. Differential-Effects of Amsacrine and Etoposide on Topoisomerase-II Cleavage in the Human C-Myc Protooncogene. *Cancer Res* **52**, 3125-3130 (1992).
- 148 Pommier, Y., Capranico, G., Orr, A. & Kohn, K. W. Distribution of Topoisomerase-II Cleavage Sites in Simian Virus-40 DNA and the Effects of Drugs. *J Mol Biol* **222**, 909-924, doi:10.1016/0022-2836(91)90585-T (1991).
- 149 Wang, Y. R. *et al.* Producing irreversible topoisomerase II-mediated DNA breaks by site-specific Pt(II)-methionine coordination chemistry *Nucleic Acids Res* **45**, 10920-10920, doi:10.1093/nar/gkx806 (2017).
- 150 Wu, C. C. *et al.* Structural Basis of Type II Topoisomerase Inhibition by the Anticancer Drug Etoposide. *Science* **333**, 459-462, doi:10.1126/science.1204117 (2011).
- 151 Hellmann, K., Newton, K. A., Whitmore, D. N., Hanham, I. W. & Bond, J. V. Preliminary clinical assessment of I.C.R.F. 159 in acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J* **1**, 822-824, doi:10.1136/bmj.1.5647.822 (1969).
- 152 Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R. & Andoh, T. Inhibition of Topoisomerase-II by Antitumor Agents Bis(2,6-Dioxopiperazine) Derivatives. *Cancer Res* **51**, 4903-4908, doi:10.1083/jcb.126.6.1341 (1991).
- 153 Classen, S., Olland, S. & Berger, J. M. Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10629-10634, doi:10.1073/pnas.1832879100 (2003).
- 154 Roca, J., Ishida, R., Berger, J. M., Andoh, T. & Wang, J. C. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1781-1785, doi:10.1073/pnas.91.5.1781 (1994).
- 155 Sargent, J. M., Williamson, C. J., Yardley, C., Taylor, C. G. & Hellmann, K. Dexrazoxane significantly impairs the induction of doxorubicin resistance in the human leukaemia line, K562. *Brit J Cancer* **84**, 959-964, doi:10.1054/bjoc.2001.1697 (2001).

- 156 Hasinoff, B. B., Patel, D. & Wu, X. A QSAR study that compares the ability of bisdioxopiperazine analogs of the doxorubicin cardioprotective agent dexrazoxane (ICRF-187) to protect myocytes with DNA topoisomerase II inhibition. *Toxicol Appl Pharm* **399**, doi:ARTN 115038 10.1016/j.taap.2020.115038 (2020).
- 157 Lyu, Y. L. *et al.* Topoisomerase II beta-Mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**, 8839-8846, doi:10.1158/0008-5472.Can-07-1649 (2007).
- 158 Gibson, E. G., Bax, B., Chan, P. F. & Osheroff, N. Mechanistic and Structural Basis for the Actions of the Antibacterial Gepotidacin against *Staphylococcus aureus* Gyrase. *Acs Infect Dis* **5**, 570-581, doi:10.1021/acsinfecdis.8b00315 (2019).
- 159 Bax, B. D. *et al.* Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* **466**, 935-U951, doi:10.1038/nature09197 (2010).
- 160 Chan, P. F. *et al.* Structural basis of DNA gyrase inhibition by antibacterial QPT-1, anticancer drug etoposide and moxifloxacin. *Nat Commun* **6**, doi:ARTN 10048 10.1038/ncomms10048 (2015).
- 161 Xiong, X. L., Bromley, E. H. C., Oelschlaeger, P., Woolfson, D. N. & Spencer, J. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* **39**, 3917-3927, doi:10.1093/nar/gkq1296 (2011).
- 162 Hegde, S. S., Vetting, M. W., Mitchenall, L. A., Maxwell, A. & Blanchard, J. S. Structural and Biochemical Analysis of the Pentapeptide Repeat Protein EfsQnr, a Potent DNA Gyrase Inhibitor. *Antimicrob Agents Ch* **55**, 110-117, doi:10.1128/Aac.01158-10 (2011).
- 163 Hooper, D. C. & Jacoby, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann Ny Acad Sci* **1354**, 12-31, doi:10.1111/nyas.12830 (2015).
- 164 Vos, S. M. *et al.* Direct control of type IIA topoisomerase activity by a chromosomally encoded regulatory protein. *Gene Dev* **28**, 1485-1497, doi:10.1101/gad.241984.114 (2014).
- 165 Sengupta, S. & Nagaraja, V. YacG from *Escherichia coli* is a specific endogenous inhibitor of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res* **36**, 4310-4316, doi:10.1093/nar/gkn355 (2008).
- 166 Willmore, E., Frank, A. J., Padget, K., Tilby, M. J. & Austin, C. A. Etoposide targets topoisomerase II alpha and II beta in leukemic cells: Isoform-specific cleavable complexes

- visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol* **54**, 78-85 (1998).
- 167 Cornarotti, M. *et al.* Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases II alpha (p170) and II beta (p180). *Mol Pharmacol* **50**, 1463-1471 (1996).
- 168 Duret, L., Gasteiger, E. & Perriere, G. LALNVIEW: A graphical viewer for pairwise sequence alignments. *Comput Appl Biosci* **12**, 507-510 (1996).
- 169 Zhang, S. *et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**, 1639-+, doi:10.1038/nm.2919 (2012).
- 170 Lotz, C. & Lamour, V. The interplay between DNA topoisomerase 2 α post-translational modifications and drug resistance. *Cancer Drug Resist*, 149-160, doi:10.20517/cdr.2019.114 (2020).
- 171 Ganapathi, R. *et al.* Resistance to etoposide in human leukemia HL-60 CELLS: Reduction in drug-induced DNA cleavage associated with hypophosphorylation of topoisomerase II phosphopeptides. *Mol Pharmacol* **50**, 243-248 (1996).
- 172 Ritke, M. K., Allan, W. P., Fattman, C., Gunduz, N. N. & Yalowich, J. C. Reduced Phosphorylation of Topoisomerase-II in Etoposide-Resistant Human Leukemia K562 Cells. *Mol Pharmacol* **46**, 58-66 (1994).
- 173 Takano, H., Kohno, K., Ono, M., Uchida, Y. & Kuwano, M. Increased Phosphorylation of DNA Topoisomerase-II in Etoposide-Resistant Mutants of Human Cancer Kb Cells. *Cancer Res* **51**, 3951-3957 (1991).
- 174 Cuijpers, S. A. G. & Vertegaal, A. C. O. Guiding Mitotic Progression by Crosstalk between Post-translational Modifications. *Trends Biochem Sci* **43**, 251-268, doi:10.1016/j.tibs.2018.02.004 (2018).
- 175 Frye, M. & Blanco, S. Post-transcriptional modifications in development and stem cells. *Development* **143**, 3871-3881, doi:10.1242/dev.136556 (2016).
- 176 Barber, K. W. & Rinehart, J. The ABCs of PTMs. *Nat Chem Biol* **14**, 188-192, doi:10.1038/nchembio.2572 (2018).
- 177 Deutscher, J. & Saier, M. H. Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - For long time neglected, now well established. *J Mol Microb Biotech* **9**, 125-131, doi:10.1159/000089641 (2005).

- 178 Cruz, E. R., Nguyen, H., Nguyen, T. & Wallace, I. S. Functional analysis tools for post-translational modification: a post-translational modification database for analysis of proteins and metabolic pathways. *Plant J* **99**, 1003-1013, doi:10.1111/tpj.14372 (2019).
- 179 Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. & Lo Muzio, L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy. *Int J Mol Med* **40**, 271-280, doi:10.3892/ijmm.2017.3036 (2017).
- 180 Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912+, doi:10.1126/science.1075762 (2002).
- 181 Sundaram, M. V. RTK/Ras/MAPK signaling. *Wormbook*, doi:10.1895/wormbook.1.80.1. (2006).
- 182 Salaroglio, I. C., Mungo, E., Gazzano, E., Kopecka, J. & Riganti, C. ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci* **20**, doi:ARTN 2505 10.3390/ijms20102505 (2019).
- 183 Chen, X. F., Pan, Y. S., Zheng, B. & Lu, Q. p38gamma overexpression promotes renal cell carcinoma cell growth, proliferation and migration. *Biochem Bioph Res Co* **516**, 466-473, doi:10.1016/j.bbrc.2019.06.056 (2019).
- 184 O'Connor, D. S., Wall, N. R., Porter, A. C. G. & Altieri, D. C. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**, 43-54, doi:10.1016/S1535-6108(02)00084-3 (2002).
- 185 Lal, H., Ahmad, F., Woodgett, J. & Force, T. The GSK-3 Family as Therapeutic Target for Myocardial Diseases. *Circ Res* **116**, 138-149, doi:10.1161/Circresaha.116.303613 (2015).
- 186 Welsh, G. I. & Proud, C. G. Glycogen-Synthase Kinase-3 Is Rapidly Inactivated in Response to Insulin and Phosphorylates Eukaryotic Initiation-Factor Elf-2b. *Biochem J* **294**, 625-629, doi:10.1042/bj2940625 (1993).
- 187 Gowda, C. *et al.* Casein Kinase II (CK2), Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) and Ikaros mediated regulation of leukemia. *Adv Biol Regul* **65**, 16-25, doi:10.1016/j.jbior.2017.06.001 (2017).
- 188 Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806, doi:10.1038/414799a (2001).
- 189 Lizcano, J. M. & Alessi, D. R. The insulin signalling pathway. *Curr Biol* **12**, R236-238, doi:10.1016/s0960-9822(02)00777-7 (2002).

- 190 Thornton, T. M. *et al.* Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 beta inactivation. *Science* **320**, 667-670, doi:10.1126/science.1156037 (2008).
- 191 Beurel, E. *et al.* GSK-3 beta inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression. *Exp Cell Res* **300**, 354-364, doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.001 (2004).
- 192 McCubrey, J. A. *et al.* Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv Biol Regul* **57**, 75-101, doi:10.1016/j.jbior.2014.09.016 (2015).
- 193 Takahashi-Yanaga, F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target. *Biochem Pharmacol* **86**, 191-199, doi:10.1016/j.bcp.2013.04.022 (2013).
- 194 Gross, S. D. & Anderson, R. A. Casein kinase I: Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**, 699-711, doi:10.1016/S0898-6568(98)00042-4 (1998).
- 195 Fish, K. J., Cegielska, A., Getman, M. E., Landes, G. M. & Virshup, D. M. Isolation and Characterization of Human Casein Kinase I-Epsilon (Cki), a Novel Member of the Cki Gene Family. *J Biol Chem* **270**, 14875-14883, doi:10.1074/jbc.270.25.14875 (1995).
- 196 Price, J. L. *et al.* Double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**, 83-95, doi:10.1016/S0092-8674(00)81224-6 (1998).
- 197 Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. & Graff, J. M. Casein kinase I transduces Wnt signals. *Dev Biol* **222**, 228-228 (2000).
- 198 Ghoshal, N. *et al.* A new molecular link between the fibrillar and granulovacuolar lesions of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 1163-1172, doi:10.1016/S0002-9440(10)65219-4 (1999).
- 199 Venerando, A., Ruzzene, M. & Pinna, L. A. Casein kinase: the triple meaning of a misnomer. *Biochem J* **460**, 141-156, doi:10.1042/Bj20140178 (2014).
- 200 Ackermann, K., Neidhart, T., Gerber, J., Waxmann, A. & Pyerin, W. The catalytic subunit alpha ' gene of human protein kinase CK2 (CSNK2A2): Genomic organization, promoter identification and determination of Ets1 as a key regulator. *Mol Cell Biochem* **274**, 91-101, doi:10.1007/s11010-005-3076-2 (2005).

- 201 Fitzgerald, T. L. *et al.* Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells. *Adv Biol Regul* **59**, 65-81, doi:10.1016/j.jbior.2015.06.003 (2015).
- 202 Litchfield, D. W. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**, 1-15, doi:10.1042/Bj20021469 (2003).
- 203 Martel, V. *et al.* Visualization and molecular analysis of nuclear import of protein kinase CK2 subunits in living cells. *Mol Cell Biochem* **227**, 81-90, doi:10.1023/A:1013181427390 (2001).
- 204 Filhol, O. *et al.* Live-cell fluorescence imaging reveals the dynamics of protein kinase CK2 individual Subunits. *Mol Cell Biol* **23**, 975-987, doi:10.1128/Mcb.23.3.975-987.2003 (2003).
- 205 Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. & Ahmed, K. CK2: A key player in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1858-1867, doi:10.1007/s00018-009-9154-y (2009).
- 206 Hanna, D. E., Rethinaswamy, A. & Glover, C. V. C. Casein Kinase-II Is Required for Cell-Cycle Progression during G(1) and G(2)/M in *Saccharomyces-Cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 25905-25914, doi:10.1074/jbc.270.43.25905 (1995).
- 207 Lee, G. *et al.* Casein kinase II-mediated phosphorylation regulates alpha-synuclein/synphilin-1 interaction and inclusion body formation. *J Biol Chem* **279**, 6834-6839, doi:10.1074/jbc.M312760200 (2004).
- 208 Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. *Adv Genet* **74**, 175-230, doi:10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4 (2011).
- 209 Biondi, R. M. *et al.* High resolution crystal structure of the human PDK1 catalytic domain defines the regulatory phosphopeptide docking site. *Embo J* **21**, 4219-4228, doi:10.1093/emboj/cdf437 (2002).
- 210 Knighton, D. R. *et al.* Crystal-Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine-Monophosphate Dependent Protein-Kinase. *Science* **253**, 407-414, doi:10.1126/science.1862342 (1991).
- 211 Pearce, L. R., Komander, D. & Alessi, D. R. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Bio* **11**, 9-22, doi:10.1038/nrm2822 (2010).
- 212 Hirai, T. & Chida, K. Protein kinase C zeta (PKC zeta): Activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* **133**, 1-7, doi:10.1093/jb/mvg017 (2003).

- 213 Leroux, A. E., Schulze, J. O. & Biondi, R. M. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol* **48**, 1-17, doi:10.1016/j.semcancer.2017.05.011 (2018).
- 214 Jang, Y. J., Lin, C. Y., Ma, S. & Erikson, R. L. Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *P Natl Acad Sci USA* **99**, 1984-1989, doi:10.1073/pnas.042689299 (2002).
- 215 Parrilla, A. *et al.* Mitotic entry: The interplay between Cdk1, Plk1 and Bora. *Cell Cycle* **15**, 3177-3182, doi:10.1080/15384101.2016.1249544 (2016).
- 216 Rashid, A., Naaz, A., Rai, A., Chatterji, B. P. & Panda, D. Inhibition of polo-like kinase 1 suppresses microtubule dynamics in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem* **465**, 27-36, doi:10.1007/s11010-019-03664-y (2020).
- 217 Xu, D. Z., Dai, W. & Li, C. Polo-like kinase 3, hypoxic responses, and tumorigenesis. *Cell Cycle* **16**, 2032-2036, doi:10.1080/15384101.2017.1373224 (2017).
- 218 Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R. & Arnesen, T. The world of protein acetylation. *Bba-Proteins Proteom* **1864**, 1372-1401, doi:10.1016/j.bbapap.2016.06.007 (2016).
- 219 Filippakopoulos, P. & Knapp, S. The bromodomain interaction module. *Febs Lett* **586**, 2692-2704, doi:10.1016/j.febslet.2012.04.045 (2012).
- 220 Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Bio* **15**, 703-708, doi:10.1038/nrm3890 (2014).
- 221 Zhang, J. M. *et al.* Lysine Acetylation Is a Highly Abundant and Evolutionarily Conserved Modification in Escherichia Coli. *Mol Cell Proteomics* **8**, 215-225, doi:10.1074/mcp.M800187-MCP200 (2009).
- 222 Henriksen, P. *et al.* Proteome-wide Analysis of Lysine Acetylation Suggests its Broad Regulatory Scope in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Proteomics* **11**, 1510-1522, doi:10.1074/mcp.M112.017251 (2012).
- 223 Lundby, A. *et al.* Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Rep* **2**, 419-431, doi:10.1016/j.celrep.2012.07.006 (2012).
- 224 Ohtake, F. *et al.* Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation. *Embo Rep* **16**, 192-201, doi:10.15252/embr.201439152 (2015).

- 225 Malynn, B. A. & Ma, A. Ubiquitin Makes Its Mark on Immune Regulation. *Immunity* **33**, 843-852, doi:10.1016/j.immuni.2010.12.007 (2010).
- 226 Grice, G. L. & Nathan, J. A. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci* **73**, 3497-3506, doi:10.1007/s00018-016-2255-5 (2016).
- 227 Lou, Z. K., Minter-Dykhouse, K. & Chen, J. J. BRCA1 participates in DNA decatenation. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 589-593, doi:10.1038/nsmb953 (2005).
- 228 Tatham, M. H. *et al.* Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**, 35368-35374, doi:10.1074/jbc.M104214200 (2001).
- 229 Nijman, S. M. B. *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-786, doi:10.1016/j.cell.2005.11.007 (2005).
- 230 Pickart, C. M. & Eddins, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Bba-Mol Cell Res* **1695**, 55-72, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019 (2004).
- 231 Praefcke, G. J. K., Hofmann, K. & Dohmen, J. SUMO playing tag with ubiquitin. *Trends Biochem Sci* **37**, 23-31, doi:10.1016/j.tibs.2011.09.002 (2012).
- 232 Sun, Y. *et al.* A conserved SUMO-Ubiquitin pathway directed by RNF4/SLX5-SLX8 and PIAS4/SIZ1 drives proteasomal degradation of topoisomerase DNA-protein crosslinks. *BioRxiv*, doi:<https://doi.org/10.1101/707661> (2019).
- 233 Sarge, K. D. & Park-Sarge, O. K. Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem Sci* **34**, 200-205, doi:10.1016/j.tibs.2009.01.004 (2009).
- 234 Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369-381, doi:10.1038/nrc1881 (2006).
- 235 Bielskiene, K., Bagdoniene, L., Mozuraitiene, J., Kazbariene, B. & Janulionis, E. E3 ubiquitin ligases as drug targets and prognostic biomarkers in melanoma. *Medicina-Lithuania* **51**, 1-9, doi:10.1016/j.medici.2015.01.007 (2015).
- 236 Correira, S. C., Carvalho, C., Cardoso, S. & Moreira, P. I. Post-translational modifications in brain health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, doi:10.1016/j.bbadis.2019.05.006 (2019).
- 237 Mathias, R. A., Guise, A. J. & Cristea, I. M. Post-translational Modifications Regulate Class IIa Histone Deacetylase (HDAC) Function in Health and Disease. *Mol Cell Proteomics* **14**, 456-470, doi:10.1074/mcp.O114.046565 (2015).

- 238 Jin, H. & Zangar, R. C. Protein modifications as potential biomarkers in breast cancer. *Biomark Insights* **4**, 191-200, doi:10.4137/bmi.s2557 (2009).
- 239 Chen, L., Liu, S. & Tao, Y. G. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduct Tar* **5**, doi:10.1038/s41392-020-0196-9 (2020).
- 240 Markovits, J. *et al.* Inhibitory Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor Genistein on Mammalian DNA Topoisomerase-Ii. *Cancer Res* **49**, 5111-5117 (1989).
- 241 Lassola, P., Singh, G. & Kramer, R. Mechanism of topoisomerase II inhibition by staurosporine and other protein kinase inhibitors *J Biol Chem*, 26418-26423, doi:10.1074/jbc.271.42.26418 (1996).
- 242 Azuma, Y., Onishi, Y., Sato, Y. & Kizaki, H. Effects of Protein-Tyrosine Kinase Inhibitors with Different Modes of Action on Topoisomerase Activity and Death of Il-2-Dependent Ctl-2 Cells. *J Biochem* **118**, 312-318, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124908 (1995).
- 243 Doshi, K. A. *et al.* Pim kinase inhibition sensitizes FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells to topoisomerase 2 inhibitors through increased DNA damage and oxidative stress. *Oncotarget* **7**, 48280-48295, doi:10.18632/oncotarget.10209 (2016).
- 244 Chen, M. C. *et al.* Novel Mechanism by Which Histone Deacetylase Inhibitors Facilitate Topoisomerase II alpha Degradation in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Hepatology* **53**, 148-159, doi:10.1002/hep.23964 (2011).
- 245 Cowell, I. G., Papageorgiou, N., Padget, K., Watters, G. P. & Austin, C. A. Histone deacetylase inhibition redistributes topoisomerase II beta from heterochromatin to euchromatin. *Nucleus-Phila* **2**, 61-71, doi:10.4161/nucl.2.1.14194 (2011).
- 246 Gray, J., Cubitt, C. L., Zhang, S. M. & Chiappori, A. Combination of HDAC and topoisomerase inhibitors in small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* **13**, 614-622, doi:10.4161/cbt.19848 (2012).
- 247 Lee, K. C., Bramley, R. L., Cowell, I. G., Jackson, G. H. & Austin, C. A. Proteasomal inhibition potentiates drugs targeting DNA topoisomerase II. *Biochem Pharmacol.* **103**, 29-39, doi:10.1016/j.bcp.2015.12.015 (2016).
- 248 Cowell, I. G., Ling, E. M., Swan, R. L., Brooks, M. L. W. & Austin, C. A. The Deubiquitinating Enzyme Inhibitor PR-619 is a Potent DNA Topoisomerase II Poison. *Mol Pharmacol* **96**, 562-572, doi:10.1124/mol.119.117390 (2019).

- 249 Mondal, N. & Parvin, J. D. DNA topoisomerase II α is required for RNA polymerase II
transcription on chromatin templates. *Nature* **413**, 435-438, doi:10.1038/35096590 (2001).
- 250 Nitiss, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat
Rev Cancer* **9**, 327-337, doi:10.1038/nrc2608 (2009).
- 251 Ju, B. G. *et al.* A topoisomerase II beta-mediated dsDNA break required for regulated
transcription. *Science* **312**, 1798-1802, doi:10.1126/science.1127196 (2006).
- 252 Wells, N. J., Fry, A. M., Guano, F., Norbury, C. & Hickson, I. D. Cell-Cycle Phase-Specific
Phosphorylation of Human Topoisomerase II-Alpha - Evidence of a Role for Protein-
Kinase-C. *J Biol Chem* **270**, 28357-28363 (1995).
- 253 Meyer, K. N. *et al.* Cell cycle-coupled relocation of types I and II topoisomerases and
modulation of catalytic enzyme activities. *J Cell Biol* **136**, 775-788,
doi:10.1083/jcb.136.4.775 (1997).
- 254 Shapiro, P. S. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase II alpha
through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**, 3551-3560 (1999).
- 255 Devore, R. F., Corbett, A. H. & Osheroff, N. Phosphorylation of Topoisomerase-II by
Casein Kinase-II and Protein-Kinase-C - Effects on Enzyme-Mediated DNA Cleavage
Religation and Sensitivity to the Antineoplastic Drugs Etoposide and 4'-(9-
Acridinylamino)Methane-Sulfon-M-Anisidide. *Cancer Res* **52**, 2156-2161 (1992).
- 256 Lane, A. B., Gimenez-Abian, J. F. & Clarke, D. J. A novel chromatin tether domain controls
topoisomerase II alpha dynamics and mitotic chromosome formation. *J Cell Biol* **203**, 471-
486, doi:10.1083/jcb.201303045 (2013).
- 257 Tsai, S. C. *et al.* Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat
Genet* **26**, 349-353 (2000).
- 258 Johnson, C. A., Padget, K., Austin, C. A. & Turner, B. M. Deacetylase activity associates
with topoisomerase II and is necessary for etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **276**,
4539-4542, doi:10.1074/jbc.C000824200 (2001).
- 259 Pradeau-Aubretton, K., Ruff, M., Gamier, J. M., Schultz, P. & Drillien, R. Vectors for
recombinational cloning and gene expression in mammalian cells using modified vaccinia
virus Ankara. *Anal Biochem* **404**, 103-105, doi:10.1016/j.ab.2010.04.039 (2010).

- 260 Hebben, M. *et al.* High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: Modified vaccinia virus Ankara. *Protein Express Purif* **56**, 269-278, doi:10.1016/j.pep.2007.08.003 (2007).
- 261 He, Y. *et al.* Antibodies to the A27 protein of vaccinia virus neutralize and protect against infection but represent a minor component of Dryvax vaccine-induced immunity. *J Infect Dis* **196**, 1026-1032, doi:10.1086/520936 (2007).
- 262 Singh, R. S. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12. *Indian J Exp Biol* **51**, 997-1003 (2013).
- 263 Efremov, A. K. *et al.* Transcriptional Repressor TrmBL2 from *Thermococcus kodakarensis* Forms Filamentous Nucleoprotein Structures and Competes with Histones for DNA Binding in a Salt- and DNA Supercoiling-dependent Manner. *J Biol Chem* **290**, 15770-15784, doi:10.1074/jbc.M114.626705 (2015).
- 264 Robertson, M. P. & Ellington, A. D. In vitro selection of nucleoprotein enzymes. *Nat Biotechnol* **19**, 650-655, doi:10.1038/90256 (2001).
- 265 Shapiro, A. B. & Austin, C. A. A high-throughput fluorescence anisotropy-based assay for human topoisomerase II beta-catalyzed ATP-dependent supercoiled DNA relaxation. *Anal Biochem* **448**, 23-29, doi:10.1016/j.ab.2013.11.029 (2014).
- 266 Silva, A. M. N., Vitorino, R., Domingues, M. R. M., Spickett, C. M. & Domingues, P. Post-translational Modifications and Mass Spectrometry Detection. *Free Radical Bio Med* **65**, 925-941, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.184 (2013).
- 267 Bedez, C. *et al.* Post-translational modifications in DNA topoisomerase 2 alpha highlight the role of a eukaryote-specific residue in the ATPase domain. *Sci Rep-Uk* **8**, doi:ARTN 9272 10.1038/s41598-018-27606-8 (2018).
- 268 Shu, J. F. *et al.* SCF beta-TrCP-mediated degradation of TOP2 beta promotes cancer cell survival in response to chemotherapeutic drugs targeting topoisomerase II. *Oncogenesis* **9**, doi:ARTN 8 10.1038/s41389-020-0196-1 (2020).
- 269 Hirano, H., Kimura, Y. & Kimura, A. Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J Proteomics* **134**, 37-46, doi:10.1016/j.jprot.2015.11.016 (2016).

- 270 Wendorff, T. J., Schmidt, B. H., Heslop, P., Austin, C. A. & Berger, J. M. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol* **424**, 109-124, doi:10.1016/j.jmb.2012.07.014 (2012).
- 271 Kozuki, T. *et al.* Roles of the C-terminal domains of topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta in regulation of the decatenation checkpoint. *Nucleic Acids Res* **45**, 5995-6010, doi:10.1093/nar/gkx325 (2017).
- 272 Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* **43**, D512-D520, doi:10.1093/nar/gku1267 (2015).
- 273 Choudhary, C., Weinert, B. T., Nishida, Y., Verdin, E. & Mann, M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Bio* **15**, 536-550, doi:10.1038/nrm3841 (2014).
- 274 Caron, C., Boyault, C. & Khochbin, S. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* **27**, 408-415, doi:10.1002/bies.20210 (2005).
- 275 Mayer, A., Siegel, N. R., Schwartz, A. L. & Ciechanover, A. Degradation of Proteins with Acetylated Amino Termini by the Ubiquitin System. *Science* **244**, 1480-1483, doi:10.1126/science.2544030 (1989).
- 276 Wells, N. J. & Hickson, I. D. Human Topoisomerase II-Alpha Is Phosphorylated in a Cell-Cycle Phase-Dependent Manner by a Proline-Directed Kinase. *Eur J Biochem* **231**, 491-497, doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20723.x (1995).
- 277 Escargueil, A. E., Plisov, S. Y., Filhol, O., Cochet, C. & Larsen, A. K. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem* **275**, 34710-34718, doi:10.1074/jbc.M005179200 (2000).
- 278 Kang, Z. J. *et al.* The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer* **35**, doi:ARTN 48 10.1186/s40880-016-0108-0 (2016).
- 279 Deininger, M. W. N. *et al.* BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* **60**, 2049-2055 (2000).

- 280 Park, J. & Liu, A. Y. C. Pervanadate induces the hyperphosphorylation but not the activation of human heat shock factor 1. *J Cell Physiol* **185**, 348-357, doi:10.1002/1097-4652(200012)185:3<348::Aid-Jcp5>3.0.Co;2-3 (2000).
- 281 Imbert, V. *et al.* Induction of Tyrosine Phosphorylation and T-Cell Activation by Vanadate Peroxide, an Inhibitor of Protein-Tyrosine Phosphatases. *Biochem J* **297**, 163-173, doi:10.1042/bj2970163 (1994).
- 282 Harhaj, E. W. & Sun, S. C. The serine/threonine phosphatase inhibitor calyculin A induces rapid degradation of I kappa B beta - Requirement of both the N- and C-terminal sequences. *J Biol Chem* **272**, 5409-5412, doi:10.1074/jbc.272.9.5409 (1997).
- 283 Libermann, T. A. & Zerbini, L. F. Targeting transcription factors for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* **6**, 17-33, doi:10.2174/156652306775515501 (2006).
- 284 Wojciechowski, M., Grycuk, T., Antosiewicz, J. M. & Lesyng, B. Prediction of secondary ionization of the phosphate group in phosphotyrosine peptides. *Biophys J* **84**, 750-756, doi:10.1016/S0006-3495(03)74894-2 (2003).
- 285 Mayer, B. J. Clues to the evolution of complex signaling machinery. *P Natl Acad Sci USA* **105**, 9453-9454, doi:10.1073/pnas.0804669105 (2008).
- 286 Huang, Y. M. & Chang, C. A. Mechanism of PhosphoThreonine/Serine Recognition and Specificity for Modular Domains from All-atom Molecular Dynamics. *BMC Biophys.*, doi:10.1186/2046-1682-4-12 (2011).
- 287 Margreitter, C., Petrov, D. & Zagrovic, B. Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Res* **41**, W422-W426, doi:10.1093/nar/gkt416 (2013).
- 288 Margreitter, C., Reif, M. M. & Oostenbrink, C. Update on Phosphate and Charged Post-Translationally Modified Amino Acid Parameters in the GROMOS Force Field. *J Comput Chem* **38**, 714-720, doi:10.1002/jcc.24733 (2017).
- 289 Petrov, D., Margreitter, C., Grandits, M., Oostenbrink, C. & Zagrovic, B. A Systematic Framework for Molecular Dynamics Simulations of Protein Post-Translational Modifications. *Plos Comput Biol* **9**, doi:ARTN e1003154 10.1371/journal.pcbi.1003154 (2013).

- 290 Akimov, V. *et al.* UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 631-+, doi:10.1038/s41594-018-0084-y (2018).
- 291 Kim, W. *et al.* Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Mol Cell* **44**, 325-340, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025 (2011).
- 292 Hendriks, I. A. *et al.* Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 927-936, doi:10.1038/nsmb.2890 (2014).
- 293 Tsai, C. F. *et al.* Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nat Commun* **6**, doi:ARTN 6622 10.1038/ncomms7622 (2015).
- 294 Bian, Y. Y. *et al.* An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J Proteomics* **96**, 253-262, doi:10.1016/j.jprot.2013.11.014 (2014).
- 295 Kettenbach, A. N. *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells. *Sci Signal* **4**, doi:ARTN rs5 10.1126/scisignal.2001497 (2011).
- 296 Zhuo, S., Clemens, J. C., Hakes, D. J., Barford, D. & Dixon, J. E. Expression, Purification, Crystallization, and Biochemical-Characterization of a Recombinant Protein Phosphatase. *J Biol Chem* **268**, 17754-17761 (1993).
- 297 Cohen, P. T. W., Collins, J. F., Coulson, A. F. W., Berndt, N. & Silva, O. B. D. Segments of Bacteriophage-Gamma (Orf-221) and Phi-80 Are Homologous to Genes-Coding for Mammalian Protein Phosphatases. *Gene* **69**, 131-134, doi:10.1016/0378-1119(88)90385-X (1988).
- 298 Agrawal, G. K. & Thelen, J. J. A high-resolution two dimensional Gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods Mol Biol* **527**, 3-19, ix, doi:10.1007/978-1-60327-834-8_1 (2009).
- 299 Vanden Broeck, A., Lotz, C., Drillien, R., Bedez, C. & Lamour, V. Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 α . *BiorXiv*, doi:<https://doi.org/10.1101/2020.08.23.263558> (2020).

- 300 Ackerman, P., Glover, C. V. C. & Osheroff, N. Phosphorylation of DNA Topoisomerase-Ii by Casein Kinase-Ii - Modulation of Eukaryotic Topoisomerase-Ii Activity In Vitro. *P Natl Acad Sci USA* **82**, 3164-3168, doi:10.1073/pnas.82.10.3164 (1985).
- 301 Saijo, M., Enomoto, T., Hanaoka, F. & Ui, M. Purification and Characterization of Type-Ii DNA Topoisomerase from Mouse Fm3a Cells - Phosphorylation of Topoisomerase-Ii and Modification of Its Activity. *Biochemistry-Us* **29**, 583-590, doi:10.1021/bi00454a036 (1990).
- 302 Shiozaki, K. & Yanagida, M. Functional Dissection of the Phosphorylated Termini of Fission Yeast DNA Topoisomerase-Ii. *J Cell Biol* **119**, 1023-1036, doi:10.1083/jcb.119.5.1023 (1992).
- 303 Andersen, K. R., Leksa, N. C. & Schwartz, T. U. Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. *Proteins* **81**, 1857-1861, doi:10.1002/prot.24364 (2013).
- 304 Ishida, R. *et al.* Threonine 1342 in human topoisomerase II alpha is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem* **271**, 30077-30082, doi:10.1074/jbc.271.47.30077 (1996).
- 305 Ishida, T. & Kinoshita, K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res* **35**, W460-W464, doi:10.1093/nar/gkm363 (2007).
- 306 Wells, N. J., Addison, C. M., Fry, A. M., Ganapathi, R. & Hickson, I. D. Serine-1524 Is a Major Site of Phosphorylation on Human Topoisomerase Ii-Alpha Protein in-Vivo and Is a Substrate for Casein Kinase-Ii in-Vitro. *J Biol Chem* **269**, 29746-29751 (1994).
- 307 Daum, J. R. & Gorbsky, G. J. Casein kinase II catalyzes a mitotic phosphorylation on threonine 1342 of human DNA topoisomerase II alpha which is recognized by the 3F3/2 phosphoepitope antibody. *J Biol Chem* **273**, 30622-30629, doi:10.1074/jbc.273.46.30622 (1998).
- 308 Garcia-Garcia, T. *et al.* Role of Protein Phosphorylation in the Regulation of Cell Cycle and DNA-Related Processes in Bacteria. *Front Microbiol* **7**, doi:ARTN 184 10.3389/fmicb.2016.00184 (2016).
- 309 Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**, 1351-1362, doi:10.1006/jmbi.1999.3310 (1999).

- 310 Goswami, P. C., Roti, J. L. R. & Hunt, C. R. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase II alpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **16**, 1500-1508 (1996).
- 311 Ait-Bouziad, N. *et al.* Phosphorylation of the overlooked tyrosine 310 regulates the structure, aggregation, and microtubule- and lipid-binding properties of Tau. *J Biol Chem* **295**, 7905-7922, doi:10.1074/jbc.RA119.012517 (2020).
- 312 Kwon, I. *et al.* Phosphorylation-Regulated Binding of RNA Polymerase II to Fibrous Polymers of Low-Complexity Domains. *Cell* **155**, 1049-1060, doi:10.1016/j.cell.2013.10.033 (2013).
- 313 Macek, B. *et al.* Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **17**, 651-664, doi:10.1038/s41579-019-0243-0 (2019).
- 314 Kobir, A. *et al.* Phosphorylation of Bacillus subtilis gene regulator AbrB modulates its DNA-binding properties. *Mol Microbiol* **92**, 1129-1141, doi:10.1111/mmi.12617 (2014).
- 315 Didier, J. P., Cozzone, A. J. & Duclos, B. Phosphorylation of the virulence regulator SarA modulates its ability to bind DNA in Staphylococcus aureus. *Fems Microbiol Lett* **306**, 30-36, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01930.x (2010).
- 316 Amaral, M. V. S. *et al.* Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. *Anticancer Res* **39**, 6443-6455, doi:10.21873/anticancer.13858 (2019).
- 317 Khazeem, M. M., Cowell, I. G., Harkin, L. F., Casement, J. W. & Austin, C. A. Transcription of carbonyl reductase 1 is regulated by DNA topoisomerase II beta. *Febs Lett*, doi:10.1002/1873-3468.13904 (2020).
- 318 LaFleur, M. W. *et al.* A CRISPR-Cas9 delivery system for in vivo screening of genes in the immune system. *Nat Commun* **10**, doi:ARTN 1668 10.1038/s41467-019-09656-2 (2019).
- 319 Nitiss, J. L., Soans, E., Rogojina, A., Seth, A. & Mishina, M. Topoisomerase Assays. *Curr Protoc Pharmacol*, doi:10.1002/0471141755.ph0303s57 (2013).
- 320 Damelin, M. & Bestor, T. H. The decatenation checkpoint. *Brit J Cancer* **96**, 201-205, doi:10.1038/sj.bjc.6603537 (2007).

- 321 Olsen, J. V. *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. *Sci Signal* **3**, doi:ARTN ra3 10.1126/scisignal.2000475 (2010).
- 322 Clarke, D. J. & Azuma, Y. Non-Catalytic Roles of the Topoisomerase II C-Terminal Domain. *Int J Mol Sci* **18**, doi:ARTN 2438 10.3390/ijms18112438 (2017).
- 323 Salceda, J., Fernandez, X. & Roca, J. Topoisomerase II, not topoisomerase I, is the proficient relaxase of nucleosomal DNA. *Embo J* **25**, 2575-2583, doi:10.1038/sj.emboj.7601142 (2006).
- 324 Fernandez, X., Diaz-Ingelmo, O., Martinez-Garcia, B. & Roca, J. Chromatin regulates DNA torsional energy via topoisomerase II-mediated relaxation of positive supercoils. *Embo J* **33**, 1492-1501, doi:10.15252/emj.201488091 (2014).
- 325 Furuyama, T. & Henikoff, S. Centromeric Nucleosomes Induce Positive DNA Supercoils. *Cell* **138**, 104-113, doi:10.1016/j.cell.2009.04.049 (2009).
- 326 Vlijm, R., Kim, S. H., De Zwart, P. L., Dalal, Y. & Dekker, C. The supercoiling state of DNA determines the handedness of both H3 and CENP-A nucleosomes. *Nanoscale* **9**, 1862-1870, doi:10.1039/c6nr06245h (2017).
- 327 Donnarumma, D., Faleri, A., Costantino, P., Rappuoli, R. & Norais, N. The role of structural proteomics in vaccine development: recent advances and future prospects. *Expert Rev Proteomic* **13**, 55-68, doi:10.1586/14789450.2016.1121113 (2016).
- 328 Carragher, B. *et al.* Current outcomes when optimizing 'standard' sample preparation for single-particle cryo-EM. *J Microsc-Oxford* **276**, 39-45, doi:10.1111/jmi.12834 (2019).
- 329 Glaeser, R. M. How good can cryo-EM become? *Nat Methods* **13**, 28-32, doi:10.1038/nmeth.3695 (2016).
- 330 Rozbesky, D. *et al.* Impact of Chemical Cross-Linking on Protein Structure and Function. *Anal Chem* **90**, 1104-1113, doi:10.1021/acs.analchem.7b02863 (2018).
- 331 Chen, J., Noble, A. J., Kang, J. Y. & Darst, S. A. Eliminating effects of particle adsorption to the air/water interface in single-particle cryo-electron microscopy: Bacterial RNA polymerase and CHAPSO. *J Struct Biol X* **1**, doi:10.1016/j.yjsbx.2019.100005 (2019).

- 332 Andrea, J. E., Adachi, K. & Morgan, A. R. Fluorometric Assays for DNA Topoisomerases and Topoisomerase-Targeted Drugs - Quantitation of Catalytic Activity and DNA Cleavage. *Mol Pharmacol* **40**, 495-501 (1991).
- 333 Drake, F. H. *et al.* Purification of Topoisomerase-II from Amsacrine-Sensitive and Amsacrine-Resistant Sublines of P388 Murine Leukemia. *P Am Assoc Canc Res* **28**, 292-292 (1987).
- 334 Ruthenburg, A. J., Graybosch, D. M., Huetsch, J. C. & Verdine, G. L. A superhelical spiral in the Escherichia coli DNA gyrase A C-terminal domain imparts unidirectional supercoiling bias. *J Biol Chem* **280**, 26177-26184, doi:10.1074/jbc.M502838200 (2005).
- 335 Stanger, F. V., Dehio, C. & Schirmer, T. Structure of the N-Terminal Gyrase B Fragment in Complex with ADP center dot P-i Reveals Rigid-Body Motion Induced by ATP Hydrolysis. *Plos One* **9**, doi:ARTN e107289 10.1371/journal.pone.0107289 (2014).
- 336 Tingey, A. P. & Maxwell, A. Probing the role of the ATP-operated clamp in the strand-passage reaction of DNA gyrase. *Nucleic Acids Res* **24**, 4868-4873, doi:10.1093/nar/24.24.4868 (1996).
- 337 Lamour, V., Hoermann, L., Jeltsch, J. M., Oudet, P. & Moras, D. Crystallization of the 43 kDa ATPase domain of Thermus thermophilus gyrase B in complex with novobiocin. *Acta Crystallogr D* **58**, 1376-1378, doi:10.1107/S0907444902010429 (2002).
- 338 Seol, Y. & Neuman, K. C. The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology. *Biophys Rev* **8**, 101-111, doi:10.1007/s12551-016-0240-8 (2016).
- 339 Liu, Z., Zechiedrich, L. & Chan, H. S. Action at hooked or twisted-hooked DNA juxtapositions rationalizes unlinking preference of type-2 topoisomerases. *J Mol Biol* **400**, 963-982, doi:10.1016/j.jmb.2010.05.007 (2010).
- 340 Roca, J. & Wang, J. C. The probabilities of supercoil removal and decatenation by yeast DNA topoisomerase II. *Genes Cells* **1**, 17-27, doi:10.1046/j.1365-2443.1996.01001.x (1996).
- 341 Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-U341, doi:10.1038/Nmeth.1318 (2009).
- 342 Chan, W. T., Verma, C. S., Lane, D. P. & Gan, S. K. E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Bioscience Rep* **33**, 931-U172, doi:ARTN e00086 10.1042/BSR20130098 (2013).

- 343 White, S. D., Conwell, K., Langland, J. O. & Jacobs, B. L. Use of a negative selectable marker for rapid selection of recombinant vaccinia virus. *Biotechniques* **50**, 303-+, doi:10.2144/000113667 (2011).
- 344 Falkner, F. G. & Moss, B. Escherichia-Coli Gpt Gene Provides Dominant Selection for Vaccinia Virus Open Reading Frame Expression Vectors. *J Virol* **62**, 1849-1854, doi:10.1128/Jvi.62.6.1849-1854.1988 (1988).
- 345 Hammonds, T. R. & Maxwell, A. The DNA dependence of the ATPase activity of human DNA topoisomerase II alpha. *J Biol Chem* **272**, 32696-32703, doi:10.1074/jbc.272.51.32696 (1997).
- 346 Webb, M. R. A Continuous Spectrophotometric Assay for Inorganic-Phosphate and for Measuring Phosphate Release Kinetics in Biological-Systems. *P Natl Acad Sci USA* **89**, 4884-4887, doi:10.1073/pnas.89.11.4884 (1992).
- 347 Zandomeni, R., Zandomeni, M. C. & Weinmann, R. A Rapid Purification Method for Calf Thymus Casein Kinase-Ii. *Febs Lett* **235**, 247-251, doi:10.1016/0014-5793(88)81272-9 (1988).

Annexe 1
Alignement de séquences TopII α et
TopII β

Top2a 1 MEVSPLOPVN-----ENMQVNNKI-----KKNEDAKKRLSVERIYQKKTQLEHILLRPPDTYIGSVELVTQOMVVYDEDEDVGLINVRE
 Top2b 1 MAKSGCGAGAGVGGGNGALTWVTLFDQNNAAKKEESETANKNDSKKLSSVERVYQKKTQLEHILLRPPDTYIGSVEPLTQFMVVYDEDEDVGMNCRE
 Top2a 75 VTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRPKMSCIRVTIDPENNLISIWNNKGKIPVVEHKVEKMYVPALIFGOLLTSSNYDDDEKVKVTGGRNGYGAKL
 Top2b 96 VTFVPGLYKIFDEILVNAADNKQRDNMTCKVSDPESNIIISIWNNKGKIPVVEHKVEKMYVPALIFGOLLTSSNYDDDEKVKVTGGRNGYGAKL
 Top2a 170 CNIFSTKFTVETASREYKMKFKQTWMDNMGRAEMELKPFNGEDYTCITFPDLSKFKMQSLDKDIVALMVRRAYDIAGSTKDVVKVFLNGNKKLPV
 Top2b 191 CNIFSTKFTVETACKKEYKHSFKQTWNNMMKTSSEAKIKHFDGEDYTCITFPDLSKFKMKEKLDKDIVALMTRRAYDLAGSCRGVKVMFNGKLLPV
 Top2a 265 KGRSYVDMYLDKDKLDETGNSLKVVIHEQVNRHREVCLTMSKGFQOISFVNSIATSKGGRHVDYVADQIVTKLVDVVKKKNKGGVAVKAHQVKNH
 Top2b 286 NGRSYVDLYVKDKLDETGVALKVIHELANERMDVCLTISEKGFQOISFVNSIATSKGGRHVDYVVDQVVKLIEVVKKKNKAGVSVKPFQVKNH
 Top2a 360 MWIFVNALIENPTFDSQTKENMTLOPKSFGSLCOLSEKFIKAAICGIVESILNWVKFAQVQLNKKCSAVKHNRIKGIPLKDDANDAGGRNSTE
 Top2b 381 IWFINCLLIENPTFDSQTKENMTLOPKSFGSLCOLSEKFFKAASNCGIVESILNWVKFAQTOLNKKCSVVKYSKIKKGIPLKDDANDAGGKHSLE
 Top2a 455 CTLILTEGDSAKTLAVSGLGVGRDKYGVFPLRGKILNVREASHKQIMENAEINNIKIVGLOYKKNYEDEDLSKTLRYGKIMIMTDQDQDGGSHI
 Top2b 476 CTLILTEGDSAKSLAVSGLGVIGRDYGVFPLRGKILNVREASHKQIMENAEINNIKIVGLOYKKSYYDDAESLTLRYGKIMIMTDQDQDGGSHI
 Top2a 550 KGLLINFIHNNWPSILLRFLLEEFITPIVKKVSKNKQEMAFYSIPEFEMKSSPTNKKMKVKYKGLGTSSTKEAKEYFADMKRHRIOFKYSGPE
 Top2b 571 KGLLINFIHNNWPSLLKHGFLLEEFITPIVKAASKNQELSFYSIPEFDEWKKHIEHQKAWKIKYKGLGTSSTAKEAKEYFADMERHRILFRYAGPE
 Top2a 645 DDAIISLAFSKKQIDRRKWLTFMEDRRORRKLGLPEDYLYGQTTLYLTYNDFINKELILFNSDNERSIKPSMDVGLKPGORRVLFTCFKRRNDK
 Top2b 666 DDAITLAFSKKQIDRRKWLTFMEDRRORRLHGLPEQFLYGTATKHTLYNDFINKELILFNSDNERSIKPSMDVGLKPGORRVLFTCFKRRNDK
 Top2a 740 REVKVAQLAGSVAEMSSYHHGEMSLMMTIINLAQNFVGSNNLNLLOPIGQFGTRLHGKGDSSAPRYIFTMLSSLARLLFPKDDHTLKFLYDDNQ
 Top2b 761 REVKVAQLAGSVAEMSAYHHGEQALMMTIVNLAQNFVGSNNLNLLOPIGQFGTRLHGKGDSSAPRYIFTMLSSLARLLFPKDDHTLKFLYDDNQ
 Top2a 835 RVEPEWYIPIIPMVLINGAEGIGTGWSCKIIPNFDVREIVNNIRRLMDGEEPLPMLPSYKNFKGTIEELAPNOYVISGEVAIILNSTIEISELPVR
 Top2b 856 RVEPEWYIPIIPMVLINGAEGIGTGWACKLPNYDAREIVNNVRRMLDGLDHPMLPNYKNFKGTIQELGQNOYAVSGEIFVVDNRNTEIITELPVR
 Top2a 930 TWTQYKEQVLEPMLNGTEKTPPLITDYREYHTDITVYKVVVKMTEKLAEAERVGLHKVFKLQTSLTCNSMVLFDHVGCCLKKYDTVLDILRDFFE
 Top2b 951 TWTQYKEQVLEPMLNGTDKTPALISDYKEYHTDITVYKVVVKMTEKLAQAEEAAGLHKVFKLQTLTCNSMVLFDHMGCLKKYETVQDILKEFFD
 Top2a 1025 LRLKYGLRKEWLVGMLGAESAKLNNQARFILLEKIDGKIIENKPKKELIKVLIQRYGDSPPVKAWKAAQKVPDEEENEESDNKETEKSDSVT
 Top2b 1046 LRLSYGLRKEWLVGMLGAESTKLNQARFILLEKIQGKITENRSKKDLIQMLVQRYGSDPPVKAWKAAQEKAAEED---ETQNHDDSSSSDSGT
 Top2a 1120 DSGPTFNLYLDMPLWYLTKEKKDELCLRNEKQELDLTKRKSPPSLLWKEDLATFIEELEAVEAKEKQDEQVGLPGK-----GKAKGKKTQMAE
 Top2b 1138 PSGPFDNYILNMSLWYLTKEKVEELIKQDQAKGREVNDLTKRKSPPSLLWKEDLAAVEELDQVESQEREDVLAGMSGKAIKGVCKPKVKKLQLEE

Top2a 1210 VLFSPRGQRVIPRITIEMKAFAEKKNKKIKNE-----KQRLKQKQKREPGTKTKKQTTLAFKPI
 Top2b 1233 TMSPYGRRRIPEIT-AMKADASKLLKKKGGDLDTAAVKVEFDEEFCAPVEGA-GEEALTPSVPINKGPKPKREKKEPGRVVRKKTPTSSGKPS
 Top2a 1286 -KKGKRNPNWSDSESRRSSD--ESNFDVPPRETEPRRAA-TKTKFTMDLDSDEDFSDDFDEKT-----DEDFVFSDA---
 Top2b 1326 AKVKKRNPNWSDDESSESLEETEVPVIPRDSLLRRAAARPKYTFDFSEEDL-DADDDDDNNDLEELKVKASPIINDGEDEFVFSGLDKD
 Top2a 1354 ---SPPKTKTSPKLSNKEIKPONS-----VVSDEADVKGSVPL--SSPPATHFFPDETEITNPPVKKNVTVKKTAAKSOSSTSTTGAKK
 Top2b 1420 EYTFSPGSKATPEKSLHDKKSQDFGNLFSFPPSYSKSEDDSAKFDSSNEEDSASVFSPS--FGLKQTDKVPKTVAAKKG----KPSSTTVPKP
 Top2a 1435 RAAPKGTKRDPALNS-----GVSQKPDPAKTKNR--RKRKPSLSD--SDSNFEKIVSKAVTSKKSKEGSE--DDFHMDFD SAVAPRAKSY
 Top2b 1508 KRAPKQKKVVEAVNSDSEFGIIPKKTTPKGGKRGAKKRRKASGSENEGDIYNPGRKTSKT-TSKKPKKTSFDQDSVDVDFPSPDFFTEPPLPRTG
 Top2a 1514 RAKKPIKYLEESDEDD--LF-----
 Top2b 1602 RARKEVKYFAESDEEEEDDVFAMFN

c : Modification identifiée sur la TopII α dans les cellules cancéreuses

c : Modification identifiée sur la TopII β dans les cellules cancéreuses

□ : Phosphorylation identifiée sur la TopII α dans les cellules en équilibre homéostatique

□ : Phosphorylation identifiée sur la TopII β dans les cellules en équilibre homéostatique

***** : Acétylation identifiée sur la TopII α dans les cellules en équilibre homéostatique

***** : Acétylation identifiée sur la TopII β dans les cellules en équilibre homéostatique

□ : Modification identifiée sur les TopII α et β

Résumé

Les ADN topoisomérases de type 2 (Top2s) régulent la topologie de l'ADN dans de nombreux processus cellulaires. Ce sont des cibles majeures dans le traitement face au cancer et à certains agents pathogènes. Cependant l'administration des molécules anti Top2s peut entraîner des effets secondaires. Des connaissances structurales supplémentaires sur les Top2s sont donc nécessaires afin de développer des molécules plus spécifiques.

Nous avons dans un premier temps étudié la régulation de l'activité de la TopII α par les modifications post-traductionnelles (PTMs). L'identification des PTMs a mis en avant une lysine dont la modification perturbe le couplage structure/fonction a été mise en évidence. La caractérisation de la TopII α déphosphorylée a montré que ces modifications modulent son activité catalytique. Les PTMs affectent des positions clés, et ont un impact majeur sur la relation structure-fonction de TopII α permettant de réguler l'activité lors du cycle catalytique. Une revue de la littérature a permis d'observer des différences dans les PTMs suivant les phases du cycle cellulaire.

Enfin, nous avons obtenu les structures de la TopII α humaine et la TopII procaryote, l'ADN Gyrase, montrant des différences au niveau des connexions entre les domaines. L'étude des activités a montré que ces connexions sont importantes pour la communication allostérique entre les domaines.

L'ensemble de ces informations apportent des éléments sur la modulation de l'activité des TopIIs expliquée par leurs structures et les PTMs.

Mot clés : ADN topoisomérases, modifications post-traductionnelles, structure, allostérie, activités catalytiques

Résumé en anglais

Type 2 DNA topoisomerases (Top2s) regulate DNA topology in many cellular processes. They are major targets in the treatment of cancer and against certain pathogens. However, the administration of anti-Top2 molecules can cause side effects. Additional structural knowledge on TopIIs is therefore necessary in order to develop more specific molecules.

We first studied the regulation of TopII by post-translational modifications (PTMs). The identification of PTMs highlighted a lysine whose modification disrupts the structure/function coupling. The characterization of dephosphorylated TopII α showed that these modifications influence catalytic activities. PTMs affect key positions and have a major impact on the structure-function relationship of TopII α allowing to regulate the activity during the catalytic cycle. A review of the literature showed differences in PTMs according to cell status.

In a second project we obtained the structures of human TopII α and prokaryotic TopII, DNA gyrase, showing differences in the connections between the domains. The study of the activities showed that these connections are important for the allosteric communication between the domains. All this information provides elements on the modulation of the activity of the TopIIs explained by their structure and PTMs.

Keywords : DNA topoisomerases, post-translational modifications, structure, allostery, catalytic activity