



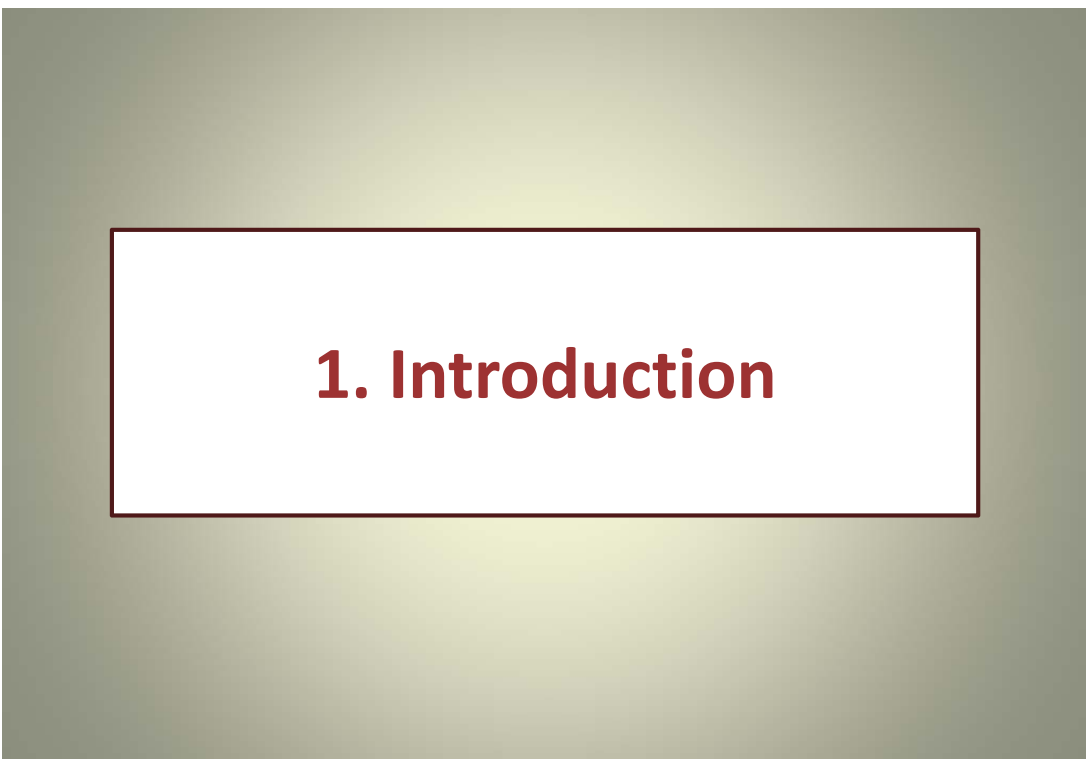
# Spécificité et Complémentarité des méthodes de la biologie structurale

## Illustration par un exemple

### Les topoisomérases de type II

Claudine MAYER [claudine.mayer@gmail.com](mailto:claudine.mayer@gmail.com)

5-12 juin 2015



# 1. Introduction

## 1. Introduction

### 1. Qu'est-ce que la biologie structurale ?

- Observer et décrire en 3D les mécanismes de la vie
- Voir et comprendre les objets subcellulaires et moléculaires
- Taille d'une cellule : en moyenne  $10 \mu\text{m} = 100\,000 \text{ \AA}$ 
  - Exploration des mécanismes de la vie à l'échelle  $10 \mu\text{m} - 0.1 \text{ nm}$  soit  $100\,000$  à  $1 \text{ \AA}$
  - Taille des macromolécules ? **qq 10-100 Å**

- ➔ Plusieurs méthodes permettent de « voir » en 3D les macromolécules
- cristallographie
  - RMN
  - Microscopie électronique
  - SAXS
  - ...

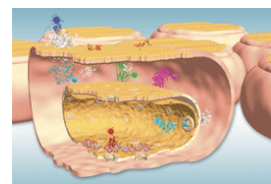
## 1. Introduction

### 1. Qu'est-ce que la biologie structurale ?

- 2 types de biologie structurale
  - Cellulaire (350 ans) et moléculaire (60 ans)
  - Evolution parallèle
  - Depuis quelques années et dans le futur = convergence

### Biologie structurale intégrative

- ➔ Résolution de plus en plus haute pour la visualisation des cellules
- ➔ Structures de complexes de plus en plus grands



Structure d'une cellule à l'échelle atomique

# 1. Introduction

## 2. Et la biologie structurale intégrative ?

### • Définition

Combinaison de différentes techniques de biologie structurale et de biologie pour obtenir des informations optimales pour décrire et comprendre un système biologique

- Combiner le maximum de techniques structurales, biophysiques, ...
- MAIS il faut également intégrer les informations structurales avec les informations de génétique, biochimie, biologie cellulaire, biologie moléculaire, bioinformatique...
- **BSI** : Une des 4 disciplines de la biologie intégrative

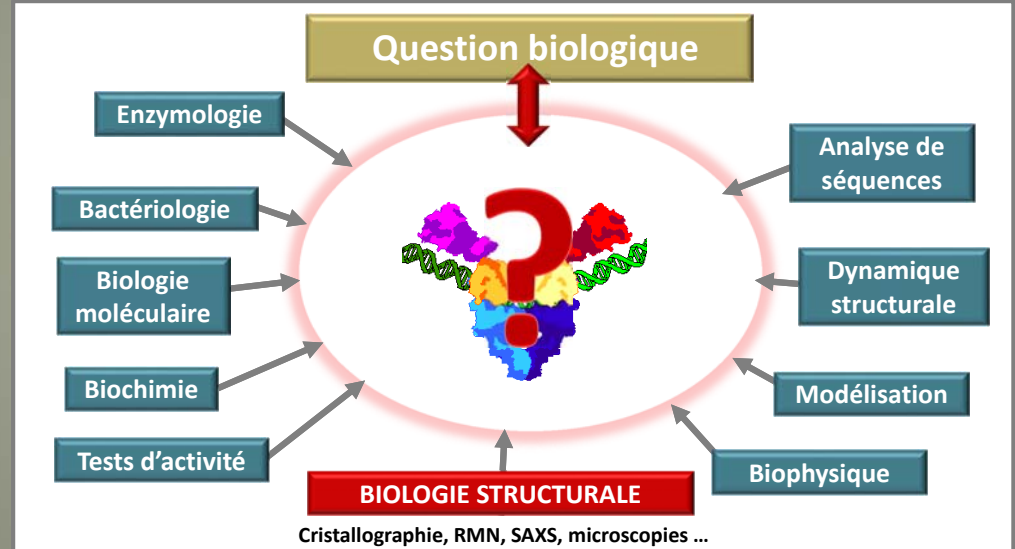
expertise des méthodes et des techniques de la biologie structurale et de l'analyse fonctionnelle des structures 3D

### les 3 autres :

- **bio-analyse** : expertise des méthodes et des outils de la "biologie *in silico*"
- **bio-modélisation** : expertise en modélisation des systèmes biologiques
- **génie bio-informatique** : développements et gestions d'outils et de bases de données spécifiques pour la biologie

# 1. Introduction

## 2. Et la biologie structurale intégrative ?

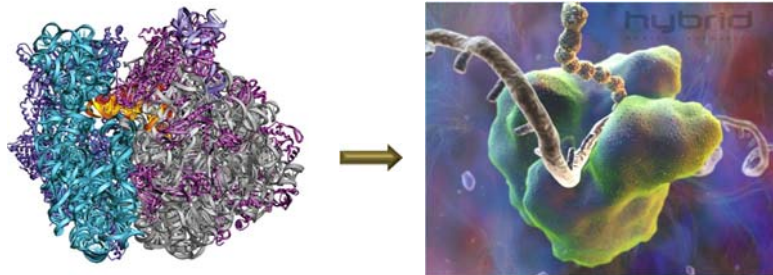


# 1. Introduction

## 3. De la structure à la fonction

- De la structure d'assemblages macromoléculaire à la compréhension des mécanismes de la vie

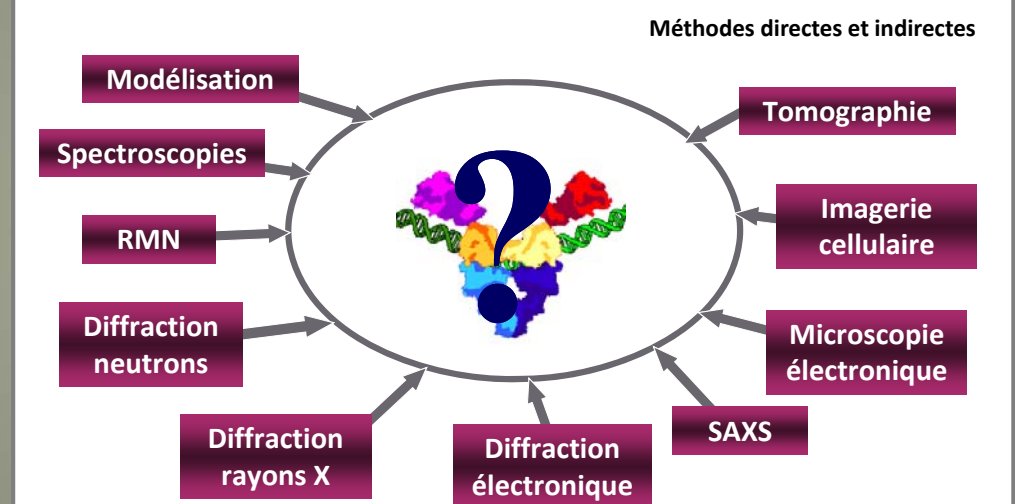
Intégrer les informations acquises à différents niveaux d'approche pour donner une explication et une signification aux processus étudiés



Réussir à expliquer toutes les étapes de la synthèse des protéines à partir de l'ensemble des données structurales disponibles

# 1. Introduction

## 4. Les méthodes de détermination de structures



# 1. Introduction

	Principe	Pré-requis	Résolution	PM	Applications
1. RX	Diffraction de RX par les électrons	Cristaux 3D	atomique	Pas de limite	Petites molécules Protéines, AN Gros assemblages
2. RMN	Transitions de spin nucléaire	Solution concentrée	/	30 kDa	Petites molécules Protéines solubles
3. DE	Diffraction électrons par les charges	Cristaux 2D	3 Å	Pas de limite	Protéines membranaires
4. ME	Diffraction électrons + focalisation	Particules isolées	10 - 15 Å	> 200 kDa	Gros assemblages Organelles Cellules
5. DN	Diffraction de neutrons par les noyaux	Cristaux 3D > 1 mm	atomique	Pas de limite	Petites molécules Protéines
6. SAXS	Diffusion de RX par les électrons	Solution diluée	équivalente à ~20 Å	Pas de limite	Protéines, AN Gros assemblages

9

# 1. Introduction

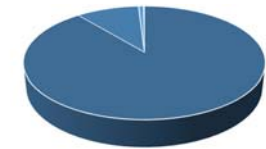
## 4. Les méthodes de détermination de structures

### • La Protein Data Bank (PDB)

Regroupe l'ensemble des informations structurales des protéines, des acides nucléiques et des complexes

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

- Au 01/06/15 **109 093** structures  
 97 084 structures par Diffraction des RX  
 10 888 structures par RMN  
 787 structures par ME  
 83 structures par DN  
 47 structures par DE  
 47 structures par SAXS



■ RX ■ RMN ■ RMN solide ■ ME ■ DE ■ Neutron ■ SAXS

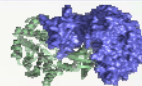
10

# 1. Introduction

## Cristallographie

Principe : interaction rayons X - électrons

- + positions des atomes  
pas de limite de taille
- cristal, pb des phases, atomes H



## RMN

Principe : transitions de spins nucléaires

- + en solution  
dynamique
- limite de taille (< 35 kDa)



## Microscopie électronique

Principe : interaction électrons - matière

- + pas de pb de phase  
limite de taille (> 300 kDa)
- basse résolution



## SAXS

Principe : interaction rayons X - électrons

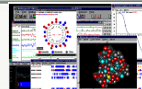
- + en solution  
pas limite de taille
- basse résolution



## Bioinformatique structurale

Principe : modélisation *in silico*

- + peu cher  
souvent rapide
- pb précision



## Physico-chimie et biophysique

Principe : marquage, spectroscopie, biochimie, ...

- + informations hétérogènes  
mesure indirecte
- interprétation



11

# 1. Introduction

## 4. Qualité des informations structurales

### • La notion de résolution

Résolution = niveau de détails

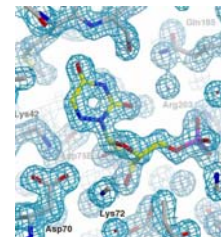
SAXS

> 20 Å



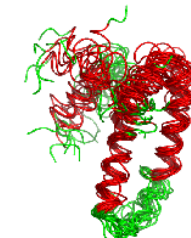
DRX

0.6 - 5 Å

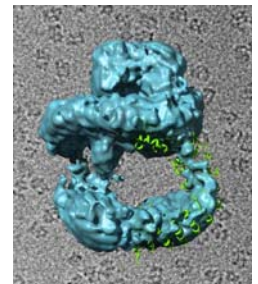


RMN

Résolution atomique



cryoME



3 - 25 Å

12

# 1. Introduction

## 4. Qualité des informations structurales

### • La notion de résolution

Protéine	Acides nucléiques	Résolution (Å)
Forme générale	Distinction protéine/AN	20
	Double hélice	12
Hélices $\alpha$	Simple brin	9
Feuillets $\beta$	Paires de base, phosphate et riboses	4
Grosses chaînes latérales		3.5
Forme des petites cl	Distinction Py/Pu	3.2
Conformation chaînes latérales		2.9
Carbonyles, plans peptidiques	Bases individuelles	2.7
	Plissement du sucre	2.4
Plissement des P, trous noyaux		2.0
	Atomes individuels	1.5

13

# 2. Les topoisomérases de type II

## 2. Les topoisomérases de type II

### 1. Introduction

#### Contrôle de la topologie de l'ADN par les topoisomérases de type II

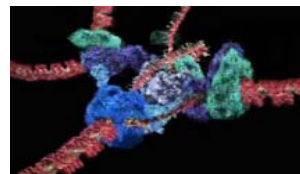
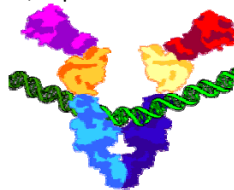
- contrôlent la structure topologique de l'ADN en générant des coupures transitoires
- catalysent le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer
- permettent notamment d'ajouter et d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN
- jouent un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc...)



Type I



Type II



- Lors de la réplication procaryote, elle est associée à la primase en primosome
- Chez les eucaryotes, on parle de toposome

Elles sont les cibles pharmacologiques d'importants agents anticancéreux et antibactériens

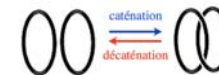
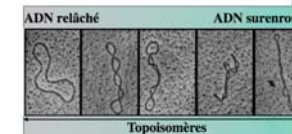
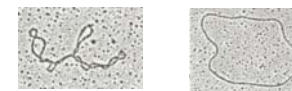
15

## 2. Les topoisomérases de type II

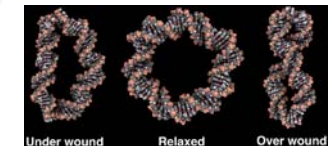
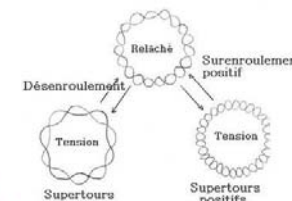
### 1. Introduction

#### • La topologie de l'ADN

##### topoisomères



##### Activités des topoisomérases



Forme vrillée  
Formation d'une superhélice

Surenroulement négatif = hélice dénoulée (gauche)  
Pour « compenser » : supertours droits

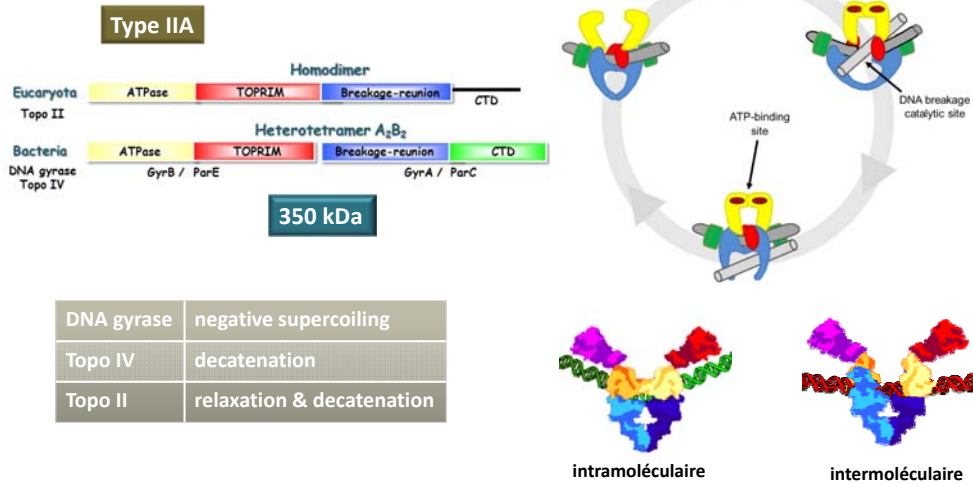
16



## 2. Les topoisomérases de type II

### 1. Introduction

#### • Les topoisomérases de type II



17

## 2. Les topoisomérases de type II

### 1. Introduction

#### • Problématique

Enzymes multi-domaines

Protéines de grande taille

Particulièrement flexibles et dynamiques

Obtenir le maximum de données structurales en combinant plusieurs méthodes afin d'expliquer d'un point de vue tridimensionnel le mode de fonctionnement de cette enzyme

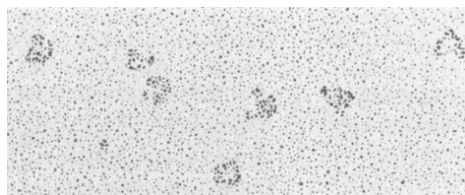
18

## 2. Les topoisomérases de type II

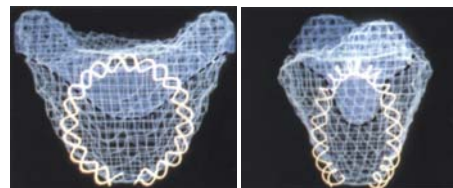
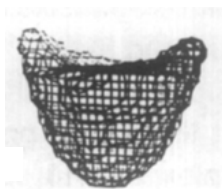
### 2. Premières informations structurales

#### • Microscopie électronique

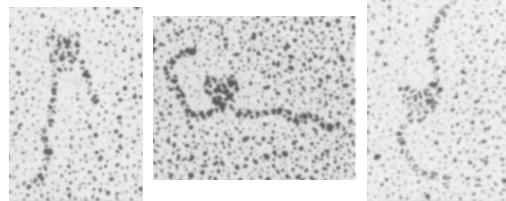
Kirchhausen et al, Cell 1985



Hétérotétramère de l'ADN gyrase de *M. luteus*



Première enveloppe proposant un modèle pour l'ADN gyrase entière



ADN gyrase en complexe avec l'ADN (541 pb)

19

## 2. Les topoisomérases de type II

### 2. Premières informations structurales

#### • Microscopie électronique

Kirchhausen et al, Cell 1985



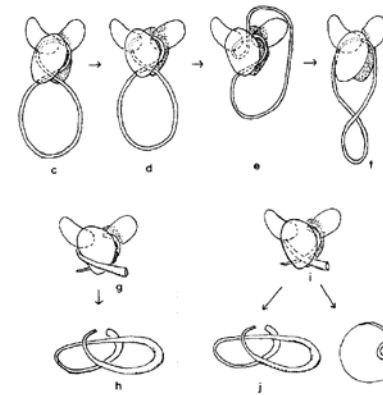
#### Possible Conformational States of DNA Gyrase and of the Gyrase-DNA Complex

Schematic representation of arrangement of A and B subunits in DNA gyrase

(a) (c) closed A-A contact and an open B-B contact (c) + DNA

(b) (d) open A-A contact and a closed B-B contact (c) + DNA

Note that opening the A-A contact in (d) involves double-strand scission

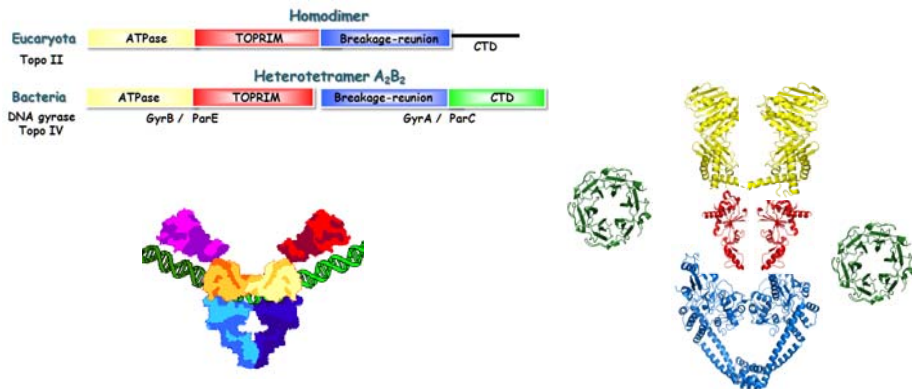


The loop of DNA is shown contained between lobes of the two B subunits. Alternatively, in (g), the arms of the DNA loop pass across the outer surface of the B subunits. (g-h) show one way in which strand passage can occur. A segment of the closed circular DNA passes through the open A-A contact and through the double-strand break. The gyrase molecule is omitted in (h) for clarity. This picture is consistent with either mode of B subunit/DNA interaction, as illustrated in (i) and (j). Completion of a reaction following this course would require closing the A-A contact and opening the B-B contact to allow exit of the inserted segment. (d-f) show an alternative picture, consistent only with the S subunit/DNA binding mode shown in (d) and (i). One of the two arms of the DNA loop, constrained between B subunits and trapped by closure of the B-B contact, diffuses through the double-strand break (e). Completion of the reaction cycle requires rearrangement of the DNA after strand passages, closure of the A-A contact to open the B-B contact (f), and reformation of a bound DNA loop as in (d).

20

## 2. Les topoisomérases de type II

### First step : crystal structure of isolated domains



Color code not conserved !!

21

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Les domaines de coupure-ligation et TOPRIM

Les 1<sup>ères</sup> structures

1996 : DCL + TOPRIM de la topo II de *S. cerevisiae* 1BGW

1997 : DCL de l'ADN gyrase de *E. coli* 1AB4

1999 : DCL + TOPRIM de la topo II de *S. cerevisiae* 1BJT



Berger et al, Nature 1996

Cabral et al, Nature 1997

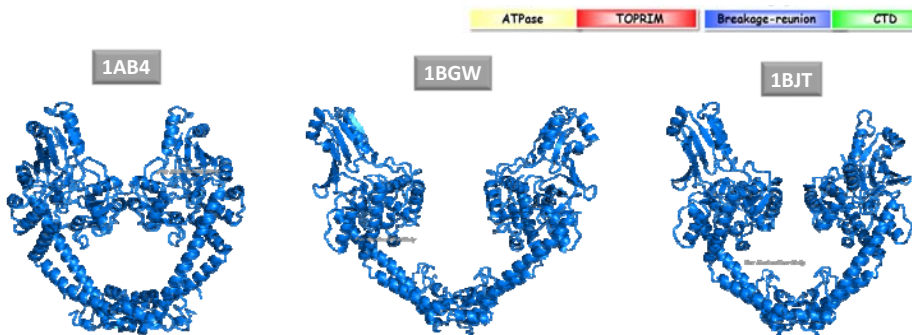
Structure conservée du DCL organisée en 4 régions

22

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Les domaines de coupure-ligation et TOPRIM



Dynamique structurale des portes

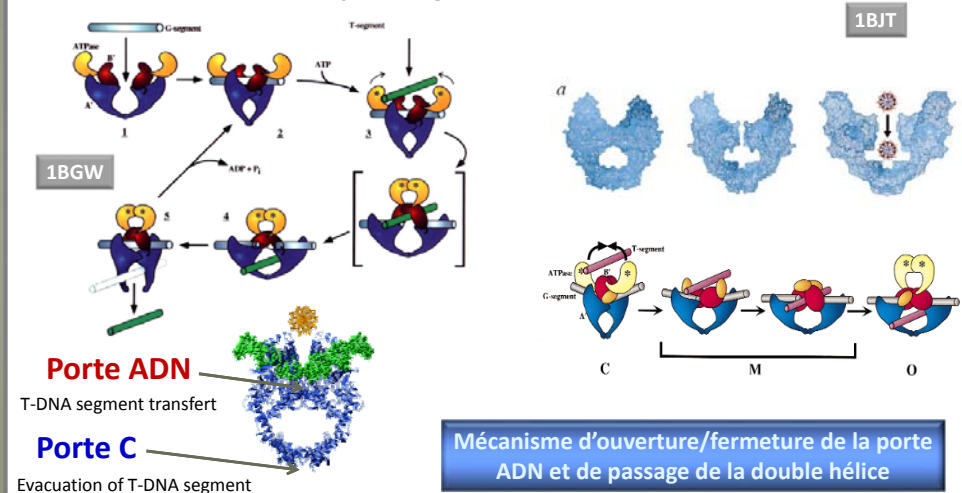
Le DCL est un dimère en forme de cœur comportant deux portes et une cavité pour le passage de l'ADN

23

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Les domaines de coupure-ligation et TOPRIM

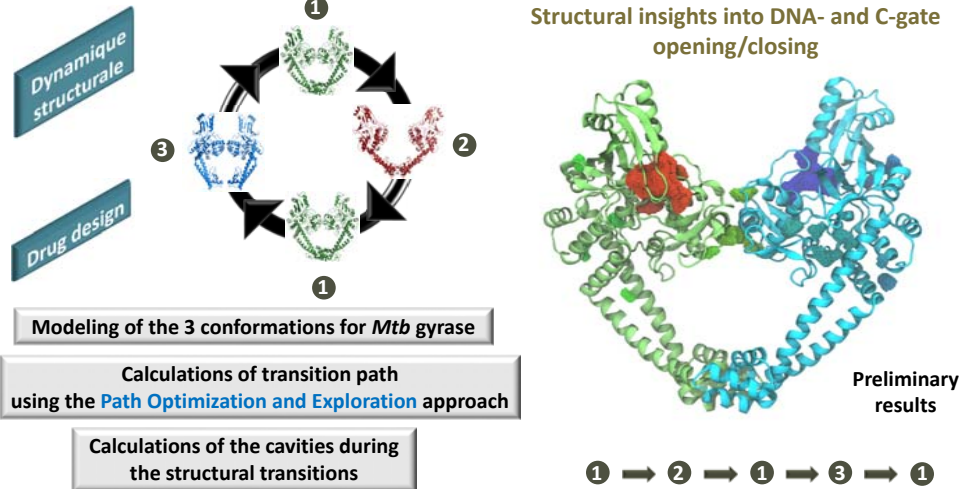


24

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Les domaines de coupure-ligation et TOPRIM



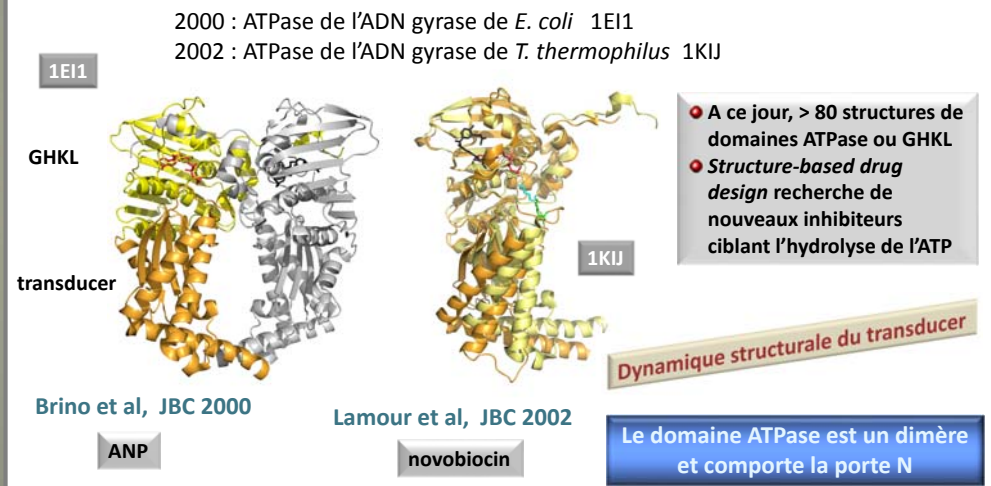
Thèse Nathan DESDOUITS

25

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Le domaine ATPase



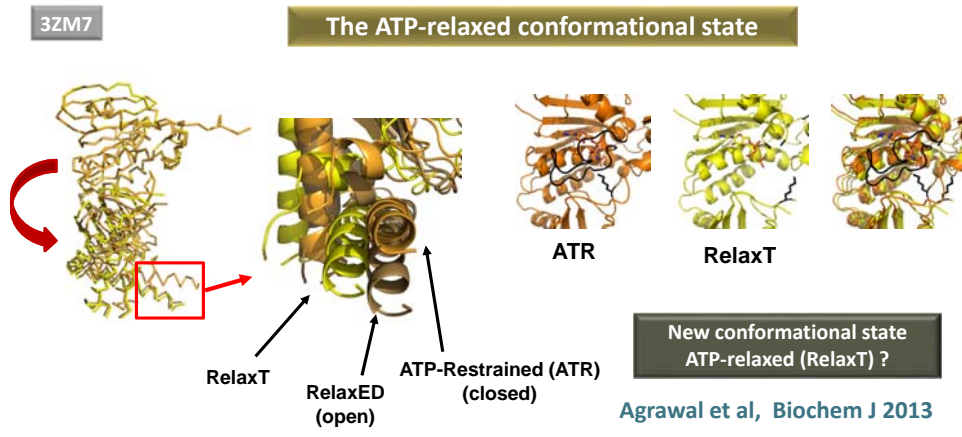
26

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Le domaine ATPase

2013 : ATPase de l'ADN gyrase de *M. tuberculosis* 3ZM7

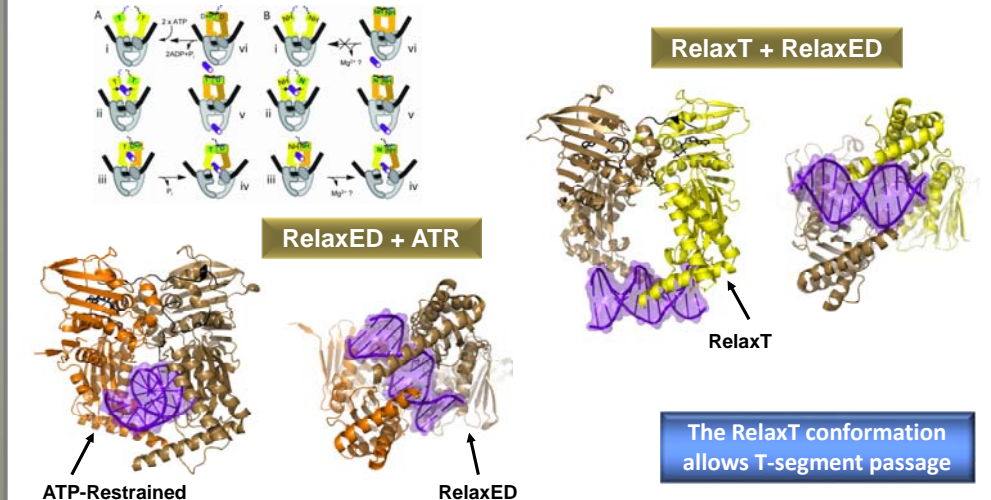


27

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Le domaine ATPase



28



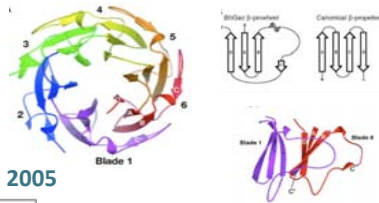
## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Le domaine CTD



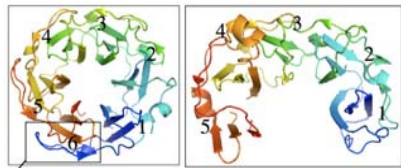
2004 : CTD de l'ADN gyrase de *B. burgdorferi* 1SUU  
 2005 : CTD de la topoisomérase IV de *E. coli* 1ZVT



DNA gyrase : 6 pales  
 Topo IV : 4 à 8 pales

Corbett et al, PNAS 2004

Corbett et al, JMB 2005



ADN gyrase

Topo IV

1ZVT

Responsable de la spécificité de  
 fonction ADN gyrase / topo IV

Le CTD possède un repliement  
 original en moulin à vent

29

## 2. Les topoisomérases de type II

### 3. Cristallographie : structures des domaines isolés

#### • Le domaine CTD

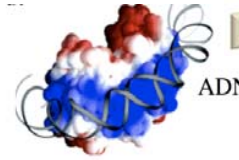


2005 : CTD de l'ADN gyrase de *E. coli* 1Z10



Ruthenburg et al, JBC 2005

2 conformations  
 ou 2 structures ?



Interaction avec l'ADN

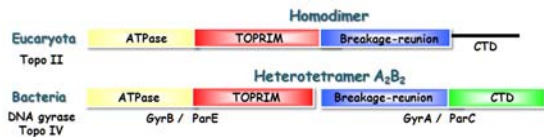
ADN

Le CTD existe sous 2  
 formes (plate et spirale)

30

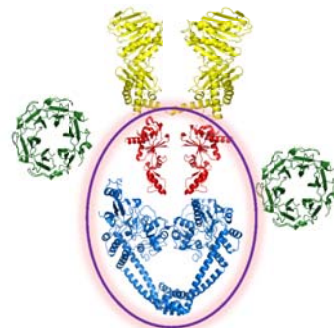
## 2. Les topoisomérases de type II

### Second step : crystal structure of associated domains



Color code not conserved !!

Bacteriology  
 Resistance to antibiotics  
 Molecular medicine



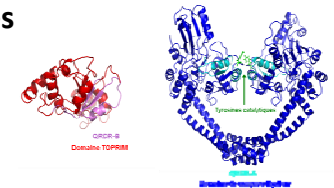
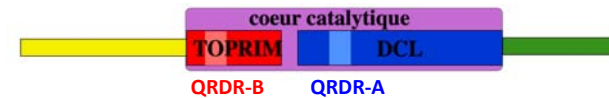
The catalytic core  
 The catalytic core

31

## 2. Les topoisomérases de type II

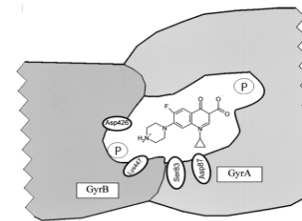
### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • La poche de liaison à l'ADN et aux quinolones



Yoshida et al., 1990, 1991

Séquençage de l'ADN gyrase de souches cliniques résistantes aux quinolones :  
 mutations localisées dans 2 zones spécifiques dénommées QRDR



A priori, il existe une poche  
 unique de liaison aux  
 quinolones, à l'interface entre  
 les 2 sous-unités

Heddle & Maxwell, 2002

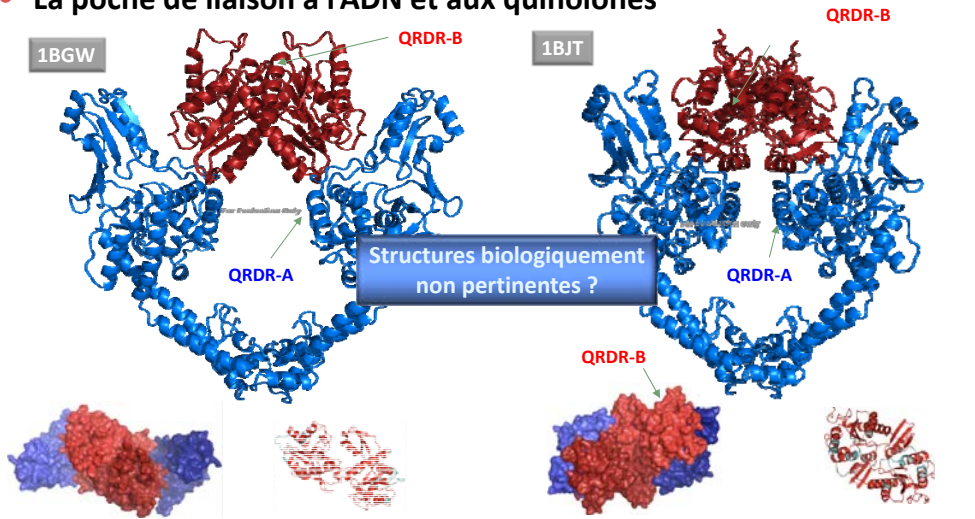
32



## 2. Les topoisomérases de type II

### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • La poche de liaison à l'ADN et aux quinolones



33

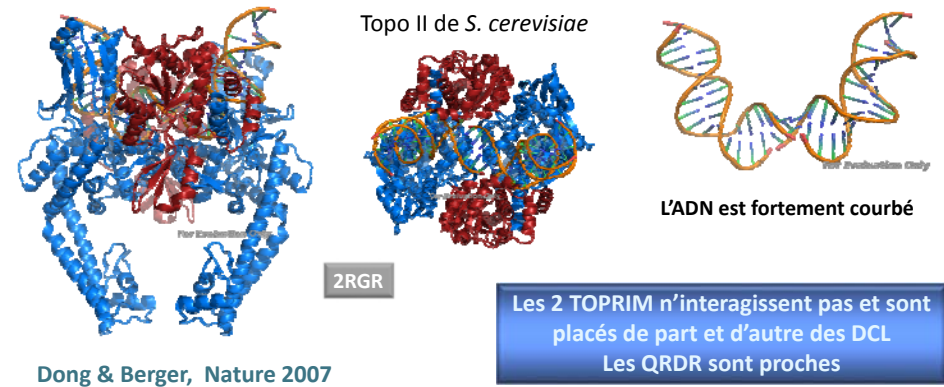
## 2. Les topoisomérases de type II

### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • Le cœur catalytique

ATPase TOPRIM Breakage-reunion CTD

Les 2 structures DCL+TOPRIM n'avaient pas apporté d'informations quant à la QBP  
2007 : 1<sup>ère</sup> structure de complexe DCL+TOPRIM avec l'ADN



34

## 2. Les topoisomérases de type II

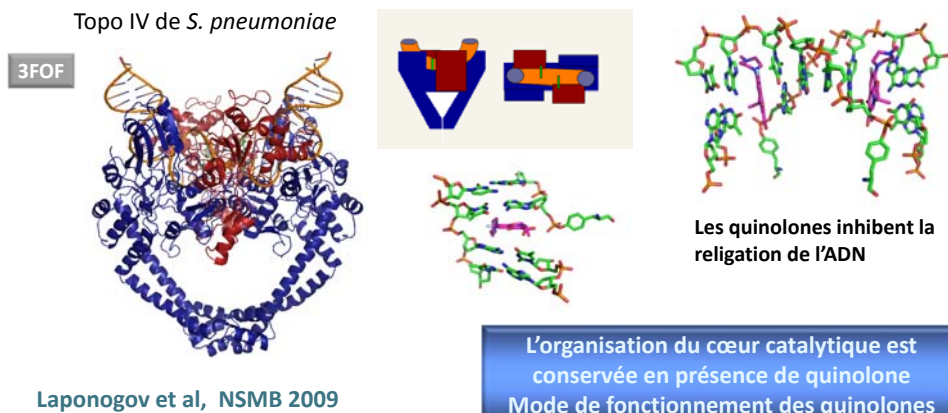
### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • Le cœur catalytique

ATPase TOPRIM Breakage-reunion CTD

2009 : 1<sup>ères</sup> structures de complexe DCL+TOPRIM avec l'ADN et une fluoroquinolone

Topo IV de *S. pneumoniae*



35

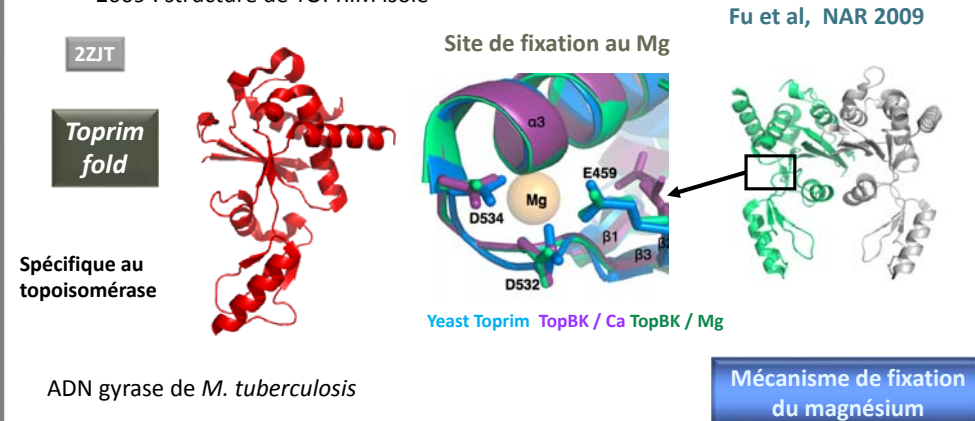
## 2. Les topoisomérases de type II

### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • Le domaine TOPRIM

ATPase TOPRIM Breakage-reunion CTD

2007 : 1<sup>ère</sup> structure de complexe DCL+TOPRIM avec l'ADN  
2009 : structure de TOPRIM isolé

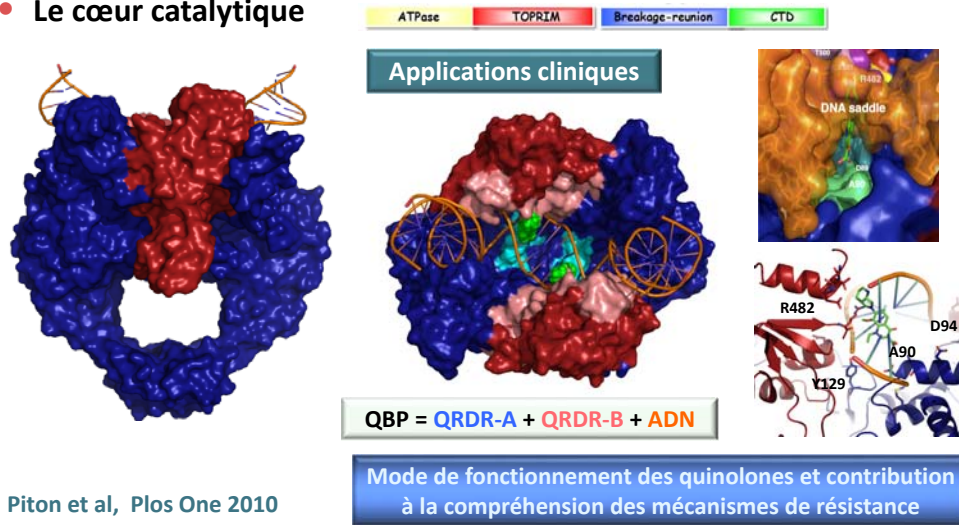


36

## 2. Les topoisomérases de type II

### 4. Cristallographie : structures de domaines « associés »

#### • Le cœur catalytique

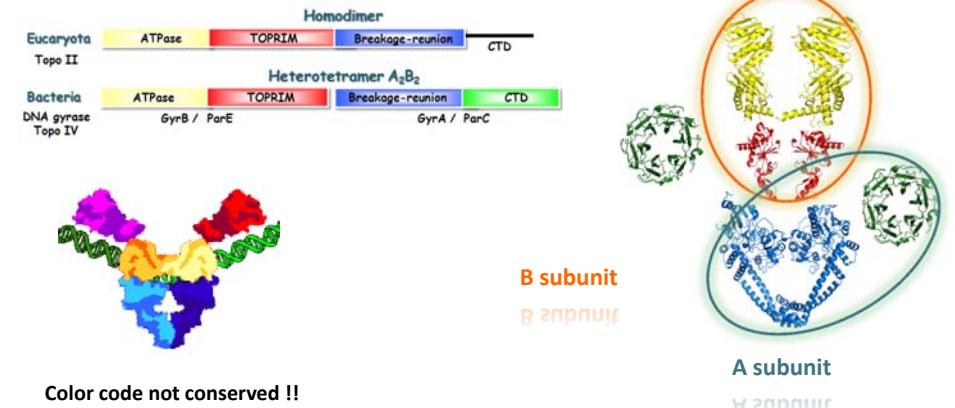


Piton et al, Plos One 2010

37

## 2. Les topoisomérases de type II

### Third step : SAXS envelope of entire subunits



38

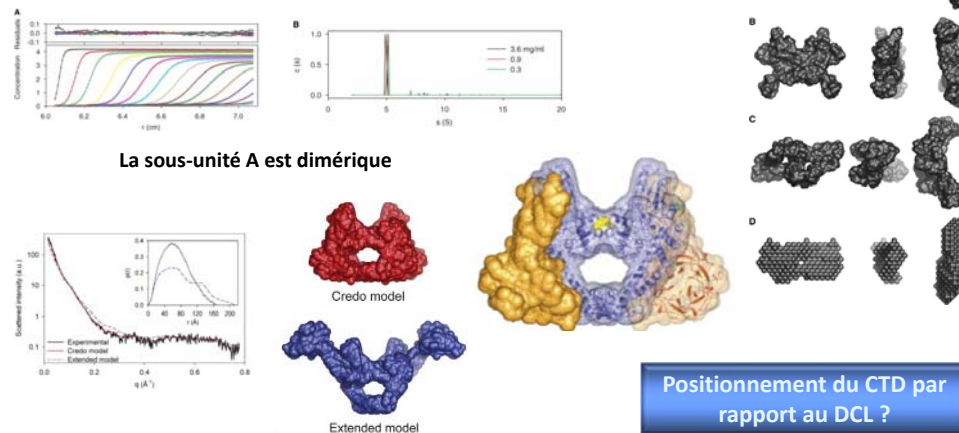
## 2. Les topoisomérases de type II

### 5. Les données SAXS sur les deux sous-unités

#### • La sous-unité A

Costenaro et al, Structure 2005

2005 : 1<sup>ère</sup> enveloppe SAXS d'une sous-unité entière



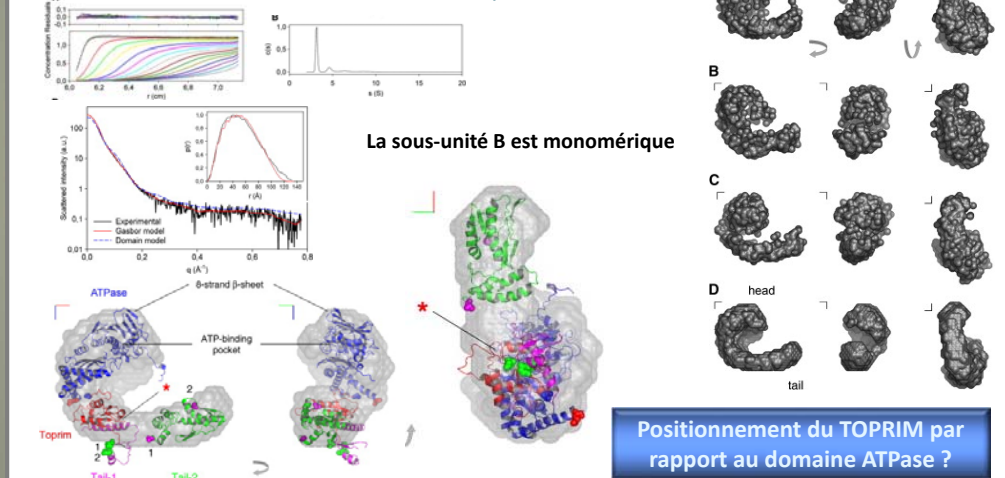
39

## 2. Les topoisomérases de type II

### 5. Les données SAXS sur les deux sous-unités

#### • La sous-unité B

Costenaro et al, Structure 2007

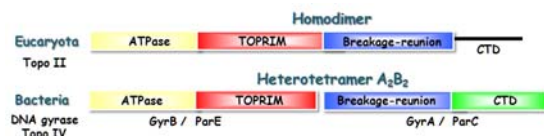


40



## 2. Les topoisomérases de type II

### Fourth step : toward the structure of an entire enzyme ?



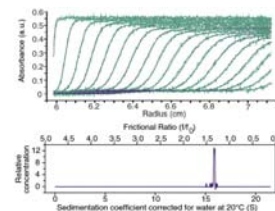
Color code not conserved !!

41

## 2. Les topoisomérases de type II

### 6. Les données SAXS sur l'enzyme entière

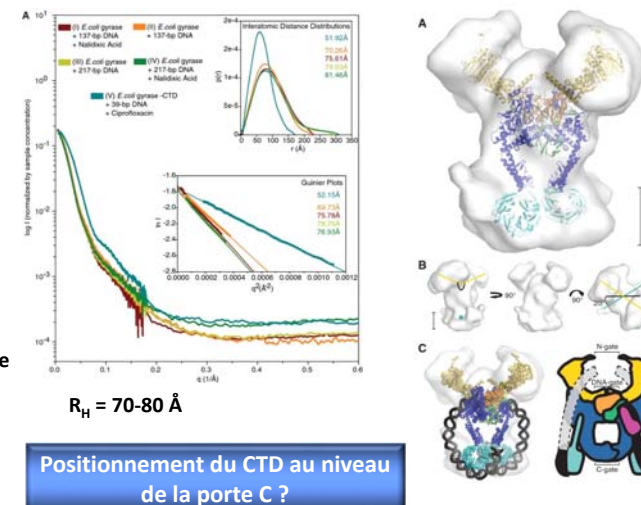
#### • La sous-unité B



ADN 137 pb

L'enzyme entière est dimérique

Baker et al, NAR 2010



$R_H = 70-80 \text{ \AA}$

Positionnement du CTD au niveau de la porte C ?

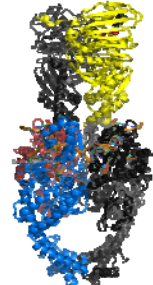
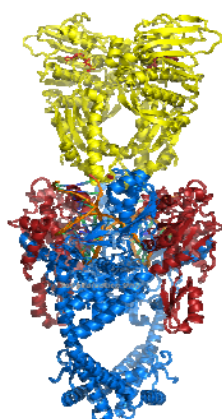
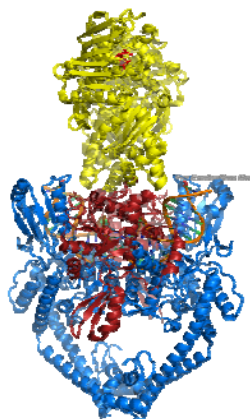
42

## 2. Les topoisomérases de type II

### 7. Vers une structure entière par cristallographie ?

#### • Les trois domaines : domaine ATPase + TOPRIM + DCL

Schmidt et al, NSMB 2012



faible résolution

4.4 Å

24.1 % / 27.5 %

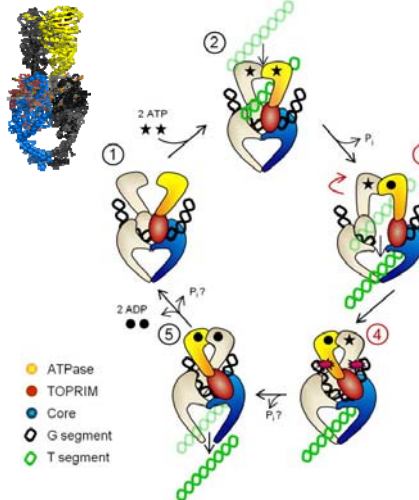
Positionnement et orientation du domaine ATPase par rapport au domaine catalytique  
Organisation « en hélice »

43

## 2. Les topoisomérases de type II

### 7. Vers une structure entière par cristallographie ?

#### • Les trois domaines : domaine ATPase + TOPRIM + DCL



#### Unexpected complexities in the type IIA topoisomerase catalytic cycle

- (1) Homodimer at the beginning of cycle  
The enzyme binds and bends a G-segment (black)
- (2) The binding of two ATP (stars) promotes T-segment capture (green).
- (3) Hydrolysis of one ATP to ADP (circle) leads to G-segment cleavage and T-segment transport through the break  
Following strand transport the ATPase domains swivel about each other to impede backward translocation of the T-segment
- (4) G-segment ends are brought back together for relegation  
K-loop contacts are proposed to trigger hydrolysis of the second ATP
- (5) T-segment escape, followed by ADP release, resets the enzyme

Steps (3) and (4) are highlighted in red to denote the new findings from this work

- as many prokaryotic type IIA topoisomerases appear to lack a K-loop, interactions between this region and G-segment DNA (step 4) may be limited to eukaryotic topo II homologs
- The precise point of  $P_i$  release following the second hydrolysis step is not known (question marks).

44

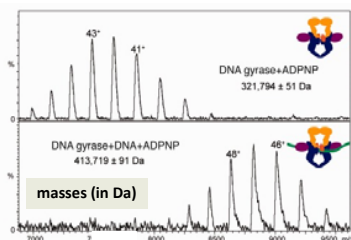


## 2. Les topoisomérases de type II

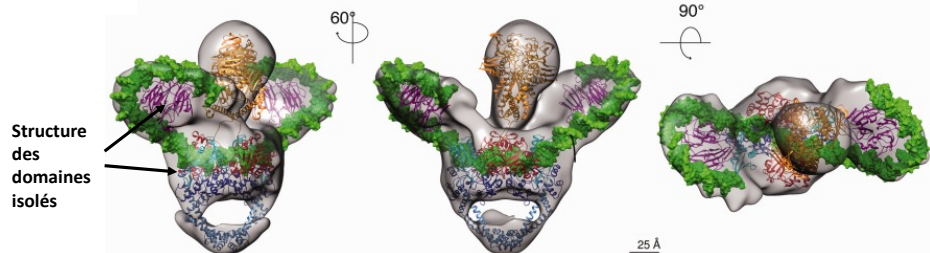
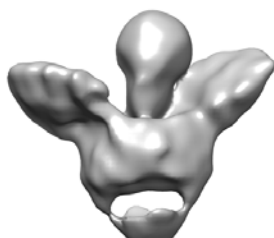
### 8. Microscopie électronique : structure entière

#### • Microscopie électronique, 30 après...

Papillon et al, NAR 2013



Native MS on the holoenzyme and DNA-bound complex showing the presence of the dimeric A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> form of the fusion DNA gyrase in presence of ADPNP and formation of the complex with DNA (green) as shown by the total shift of the mass spectra.



45

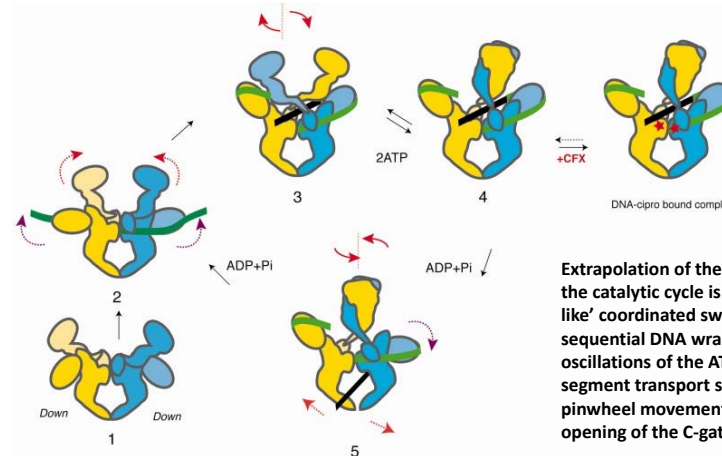
## 2. Les topoisomérases de type II

### 8. Microscopie électronique : structure entière

#### • Microscopie électronique, 30 après...

Papillon et al, NAR 2013

#### Cycle catalytique lors de l'activité de surenroulement



46

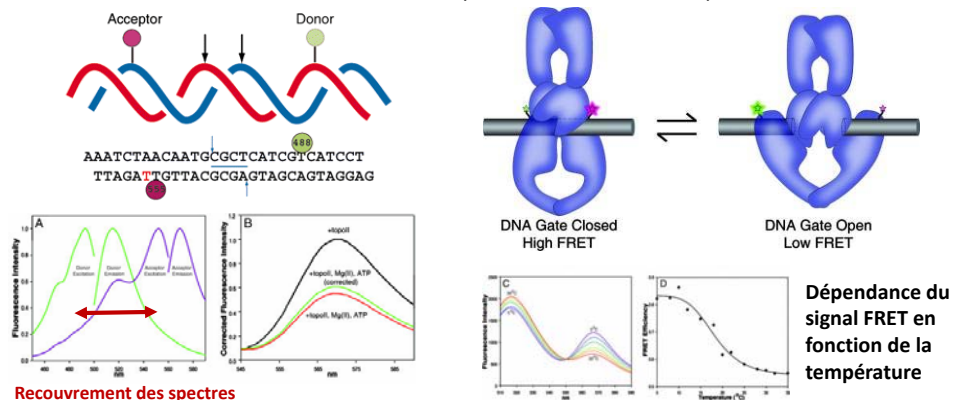
## 2. Les topoisomérases de type II

### 9. Autres techniques biophysiques

#### • Single-molecule FRET

Smiley et al, PNAS 2007

2007 : 1<sup>ères</sup> données smFRET sur la topoisomérase II de drosophile



Suivi de l'ouverture/fermeture de la porte ADN par fluorescence

47

## 2. Les topoisomérases de type II

### 9. Autres techniques biophysiques

#### • Single-molecule FRET

<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Nucleotide cycle	Göttler et al, JMB 2007
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	DNA-gate predominantly in the closed conformation	Gubaev et al, PNAS 2009
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Role of CTD in supercoiling cycle	Lanz et al, NAR 2011
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Role of N-gate in T-segment capture and strand passage	Gubaev et al, PNAS 2011
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Role of K <sup>+</sup> in nucleotide induced closure of N-gate	Gubaev et al, JBC 2012
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Role of GyrA-box in DNA binding	Lanz et al, NAR 2012
<i>E. coli</i> topo IV	Role of CTD in substrate discrimination	
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Spectrum of conformational states of DNA- and C-gates	
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase	Mechanism of DNA supercoiling	Gubaev et al, DNAR 2014
<i>B. subtilis</i> DNA gyrase		

Lanz et al

48

## 2. Les topoisomérases de type II

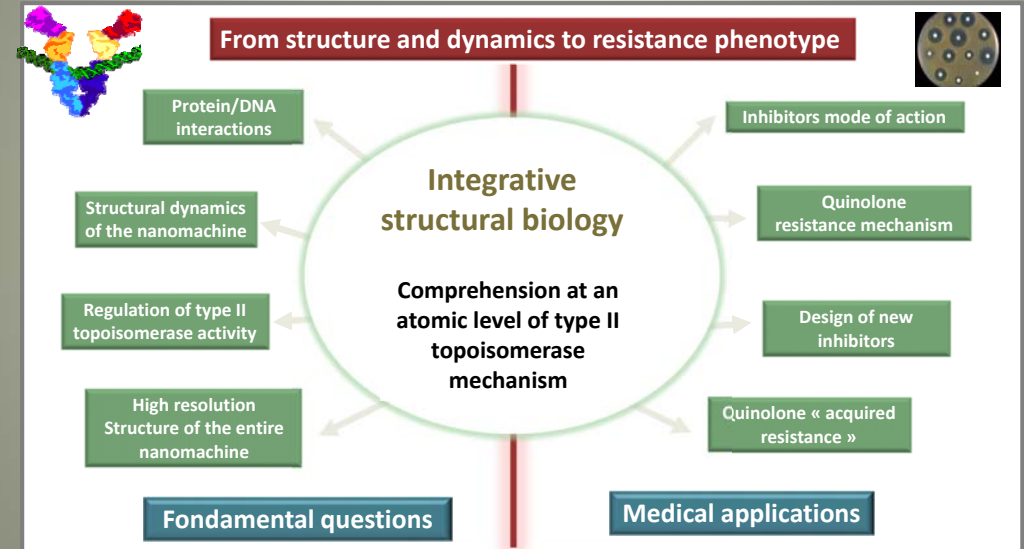
### 8. Conclusion

- La combinaison de la cristallographie, du SAXS, de la microscopie électronique, de méthodes d'analyse de la dynamique
- ainsi que les techniques de biochimie et de biologie moléculaire
- permet de reconstruire progressivement le puzzle complexe que constitue le mode de fonctionnement des topoisomérases de type IIA
- de l'échelle atomique à l'échelle moléculaire
- De nombreux éléments et détails structuraux sont encore nécessaires à la description fine et complète de cette famille d'enzymes

49

## 2. Les topoisomérases de type II

### 8. Conclusion



50