



Bases structurales de l'inhibition de la kinase Akt (PKB) par le peptide inhibiteur Akt-in : une étude RMN

Virginie Ropars^a, Jean-François Guichou^a, Daniel Auguin^a, Philippe Barthe^a,
Masayuki Noguchi^b, Christian Roumestand^{a,*}

^a Centre de biochimie structurale, UMR CNRS 5048, Inserm 554, UM I, faculté de pharmacie, 15, avenue Charles-Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier cedex 05, France

^b Division of Cancer Biology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Japan

Reçu le 5 avril 2005 ; accepté le 5 juin 2005

Disponible sur internet le 26 août 2005

Résumé

La kinase Akt (PKB) joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose, et sa dérégulation se trouve de ce fait souvent associée à la progression de différents cancers : la recherche d'inhibiteurs spécifiques d'Akt ouvre donc une voie intéressante vers la découverte de nouvelles substances antitumorales. Nous avons déjà démontré que les protéines de la famille TCL1 (un proto-oncogène impliqué dans des leucémies polymphocytaires T) interagissaient avec Akt au niveau de son domaine PH (Akt-PHD), et fonctionnaient comme des coactivateurs de cette kinase. Nous avons alors émis et vérifié l'hypothèse qu'un peptide (*Akt-in*) dont la séquence correspondait au brin β A de TCL1 (directement impliqué dans le site de liaison à Akt-PHD) pouvait se lier à Akt-PHD et moduler l'activité de la kinase. Des expériences RMN ont suggéré qu'*Akt-in* liait le domaine PH sur un site identique à celui de TCL1, mais provoquait également des changements conformationnels à plus longue distance, au niveau de la boucle VL1, le site de liaison aux phosphatidyl-inositol-phosphates. Dans ce manuscrit, nous avons utilisé des expériences de titrage RMN pour démontrer que la liaison d'*Akt-in* à Akt-PHD entraînait une diminution significative de l'affinité du domaine PH pour l'IP₄, la tête sucrée des phosphatidyl-inositol-phosphates. Ces lipides sont responsables de l'ancrage membranaire de la kinase, une étape essentielle pour son activation. **Pour citer cet article :** V. Ropars et al., C. R. Chimie 9 (2006).

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Structural basis for the Akt (PKB) kinase inhibition by the peptide Akt-in: an NMR study. Akt (PKB) plays a central role in the regulation of cellular antiapoptosis and, thus, is a core intracellular survival factor underlying various human neoplastic diseases. Hence, Akt specific inhibitors create an attractive target for anticancer therapy. We have previously demonstrated that proteins of the TCL1 family (a protooncogene underlying human T cell polymphocytic leukemia) interact with Akt and functions as Akt kinase coactivators. TCL1 coactivate Akt by binding to its pleckstrin homology domain (Akt-PHD). Then, with the aim to develop an Akt kinase inhibitor, we have hypothesized and verified that a peptide, which spans the Akt binding site (the A β -strand of human TCL1), binds to Akt and modulates Akt kinase activity and its downstream biological responses. Nuclear magnetic studies suggested that *Akt_in* shares a similar binding site with TCL1, but causes remote conformational

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : christian.roumestand@cbs.cnrs.fr (C. Roumestand).

changes on the variable loop 1 of the PH domain, the locus mediating phosphoinositide binding. In the present paper, we used NMR titration experiments to demonstrate that the binding of *Akt-in* to Akt-PHD significantly decreases the affinity of the PH domain for IP₄, the sugar headgroup of phosphatidyl-inositol phosphate lipids, responsible for the membrane anchorage of the kinase and its subsequent activation. **To cite this article:** V. Ropars et al., C. R. Chimie 9 (2006).

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Akt (PKB) ; Domaine PH ; Inhibiteurs ; IP₄ ; Titration RMN

Keywords: Akt (PKB); PH Domain; Inhibitors; IP₄; NMR titration

1. Introduction

La protéine Akt (aussi appelée PKB) joue un rôle essentiel dans la régulation de l'apoptose cellulaire et se retrouve de ce fait, impliquée dans un grand nombre de processus néoplasique. Ainsi, la recherche d'inhibiteurs spécifiques d'Akt constitue un axe prometteur dans la découverte de nouvelles substances anticancéreuses. Dans une démarche rationnelle, la connaissance du site d'interaction spécifique d'un effecteur physiologique avec sa protéine cible constitue une étape importante dans la conception d'inhibiteurs. La définition de ce site d'interaction peut être apportée par la résolution de la structure 3D du complexe cible-effecteur. Nous avons déjà démontré que les protéines de la famille TCL1 (un proto-oncogène impliqué dans des leucémies de type T) interagissaient avec le domaine homologue à la pleckstrine (PHD) d'Akt et fonctionnaient comme des coactivateurs de cette kinase [1]. Une approche combinant les techniques de RMN et de SAXS nous a permis de déterminer les affinités, les surfaces d'interaction, ainsi que d'obtenir une structure à basse résolution du complexe Akt-PHD : TCL1 [2]. Sur la base de ces informations, nous avons synthétisé un peptide (*Akt-in*) correspondant au brin A du tonneau β de TCL1, directement impliqué dans l'interaction avec Akt-PHD. Nous avons pu démontrer que ce peptide inhibait la prolifération cellulaire, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [3]. Une étude RMN préliminaire suggérait que ce peptide liait le domaine PH d'Akt sur une surface similaire à celle reconnue par TCL1, mais provoquait également des changements conformationnels à plus longue distance, au niveau de la boucle VL1 du domaine PH [3]. Cette boucle, située à l'opposé du site reconnu par TCL1, forme avec la boucle VL2 la « poche de l'inositol », site de reconnaissance des têtes polaires des phosphatidyl-inositol-phosphates commun à la plupart des domaines PH. C'est cette reconnaissance qui

permet l'ancrage membranaire de la kinase, une étape essentielle pour son activation. Nous avons donc émis l'hypothèse que la baisse de l'activité d'Akt due à la fixation du peptide *Akt-in* pourrait être corrélée à la baisse de l'affinité de son domaine PH pour les phosphatidyl-inositols membranaires [3]. Afin d'appuyer cette hypothèse, nous présentons dans ce manuscrit des expériences de titration RMN qui montrent une baisse d'affinité significative d'Akt-PHD pour l'Ins(1,3,4,5)P₄ (IP₄, la tête polaire des phosphatidyl-inositols membranaires) en présence du peptide *Akt-in* en solution.

2. Matériel et méthodes

2.1. La protéine Akt-PHD

La construction du domaine PH de la kinase Akt (isoforme 2) (Akt-PHD) utilisée pour les expériences de titration comprend sept résidus en C-terminal de plus que celle utilisée dans les publications précédentes. Cette modification conduit à peu de perturbations dans le spectre [¹H-¹⁵N] HSQC qui a pu être attribué presque essentiellement sur la base d'une comparaison avec celui de la construction antérieure. Une expérience 3D [¹H-¹⁵N] NOESY-HSQC a permis de compléter et vérifier cette attribution. Cette nouvelle construction est plus stable en solution que la précédente, et ne nécessite ni l'ajout d'Ins(1,4,5)P₃ (IP₃) comme agent stabilisateur, ni le traitement préliminaire des tubes avec de la silicose. Sa production, son marquage à l'azote-15 et sa purification sont autrement similaires à celles de la construction précédente [4].

2.2. Synthèse du peptide inhibiteur *Akt-in*

Le peptide *Akt-in* (NH₂-AVTDHPDRLWAWEKFCONH₂) est synthétisé sur un *Pioneer Peptide Synthe-*

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/171741>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/171741>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)