



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

Virginie Ropars<sup>a</sup>, Jean-François Guichou<sup>a</sup>, Daniel Auguin<sup>a</sup>, Philippe Barthe<sup>a</sup>,  
Masayuki Noguchi<sup>b</sup>, Christian Roumestand<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> 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

<sup>b</sup> 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  $\beta$  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  $\beta$ -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](mailto: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 IP<sub>4</sub>, 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 ; IP<sub>4</sub> ; Titration RMN

**Keywords:** Akt (PKB); PH Domain; Inhibitors; IP<sub>4</sub>; 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)P<sub>4</sub> (IP<sub>4</sub>, 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 [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] HSQC qui a pu être attribué presque essentiellement sur la base d'une comparaison avec celui de la construction antérieure. Une expérience 3D [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] 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)P<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>) 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* (NH<sub>2</sub>-AVTDHPDRLWAWEKFCONH<sub>2</sub>) est synthétisé sur un *Pioneer Peptide Synthe-*

sis System de chez Applied Biosystems en utilisant la stratégie Fmoc-tBu, TBTU comme agent de couplage et la résine Pal-Peg-Ps. Les couplages sont effectués avec un excès de quatre équivalents d'acides aminés. Le clivage et la déprotection du peptide sont réalisés par le traitement d'un mélange de TFA 88 %, eau 5 %, phénol 5 % et tri-isopropylsilane 2 %. Le peptide brut est purifié par HPLC préparative sur une colonne C-18 en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile (0,08 % TFA) dans l'eau (0,1 % TFA) sur un système Waters et caractérisé par spectrométrie de masse (ESI-MS) sur un QSTAR de chez Applied Biosystems. La masse du peptide est calculée à partir des rapports de masse à la charge ( $m/z$ ) pour tous les états protonés du peptide (théorique 1870,04 ; calculée 1869,80).

### 2.3. Spectroscopie RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés à 600 MHz (spectromètre Bruker AVANCE, équipé d'une sonde cryogénique triple résonance) et 8 °C sur des échantillons de 0,3 ml (tube Shigemi) à une concentration de 90 µM en protéine uniformément enrichie en  $^{15}\text{N}$  et dissoute dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl et 5 %  $^2\text{H}_2\text{O}$  pour le *lock*. Leur traitement a été réalisé avec le logiciel Gifa (version 4.4) [5]. Les expériences de titrage ont toujours été réalisées par mélange d'une solution de protéine à une concentration de 90 µM avec différentes aliquotes de la même solution de protéine en mélange avec le ligand (Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$  (IP4), *Akt-in*) à la concentration maximum (7 et 6 mM, respectivement), de façon à maintenir une concentration de protéine strictement identique pour tous les points du titrage.

### 2.4. Expériences de titrage

Les constantes de dissociation ( $k_D$ ) ont été obtenues en ajustant les variations de déplacement chimique mesurées sur les pics de corrélation des spectres HSQC en fonction de la concentration en ligand, selon la formule suivante [6] :

$$\Delta\delta = \frac{1}{2}\Delta\delta_{\max} \left[ \left( 1 + \frac{k_D}{[\text{P}_0]} + \frac{[\text{L}]}{[\text{P}_0]} \right) - \sqrt{\left( 1 + \frac{k_D}{[\text{P}_0]} + \frac{[\text{L}]}{[\text{P}_0]} \right)^2 - \frac{4[\text{L}]}{[\text{P}_0]} } \right] \quad [\text{Eq. 1}]$$

où  $[\text{P}_0]$  est la concentration en protéine (90 µM),  $[\text{L}]$  la concentration variable en ligand,  $\Delta\delta_{\max}$  la variation maximum de déplacement chimique (à saturation de ligand),  $\Delta\delta$  la variation de déplacement chimique « moyenne » observée après ajout de ligand et calculée par :

$$\Delta\delta = \sqrt{\left[ \Delta\delta(^{15}\text{N}) \frac{\gamma_{\text{N}}}{\gamma_{\text{H}}} \right]^2 + [\Delta\delta(^1\text{H})]^2} \quad [\text{Eq. 2}]$$

## 3. Résultats

### 3.1. Cartographie du site d'interaction du peptide *Akt-in* et mesure d'affinité

Les variations de déplacement chimique mesurées sur les pics de corrélation amide sur un spectre HSQC enregistré sur  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD en présence d'une concentration de 4 mM de peptide *Akt-in* concernent essentiellement des résidus situés sur les brins  $\beta 5$  (S56, A58, M63, T65) et  $\beta 6$  (T72, F73, I75) du  $\beta$ -sandwich et l'hélice  $\alpha$  (V90, E95, E97, E98, W99, R101, A 102, M105, S109, L110) C-terminale du domaine PH (Fig. 1). Elles confirment les résultats obtenus avec la construction précédente, à savoir que le peptide se fixe sur un site proche de celui reconnu par la protéine TCL1. De plus, des variations plus faibles mais significatives sont enregistrées sur des résidus situés sur (R15, G16, T21) ou proches (G37) de la boucle VL1 du domaine PH, qui, avec la boucle VL2, forment la « poche » où vient se fixer la tête polaire des phosphatidyl-inositol phosphates (PtdIns).

Les variations de déplacement chimique les plus importantes après ajout de peptide concernent le résidu M63 : ce sont ces variations que nous avons utilisées pour établir la courbe de titrage (Fig. 2). L'ajustement de ces variations en fonction de la concentration en peptide avec l'équation [1] donne une constante de dissociation de  $4,6 \pm 0,5$  mM pour le complexe Akt-PHD : *Akt-in*.

### 3.2. Affinité de Akt-PHD pour IP4

Les variations de déplacement chimique enregistrées sur le spectre du  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD en présence d'IP4 concernent sans surprise essentiellement des résidus localisés dans les boucles VL1 et VL2 (Fig. 3), for-

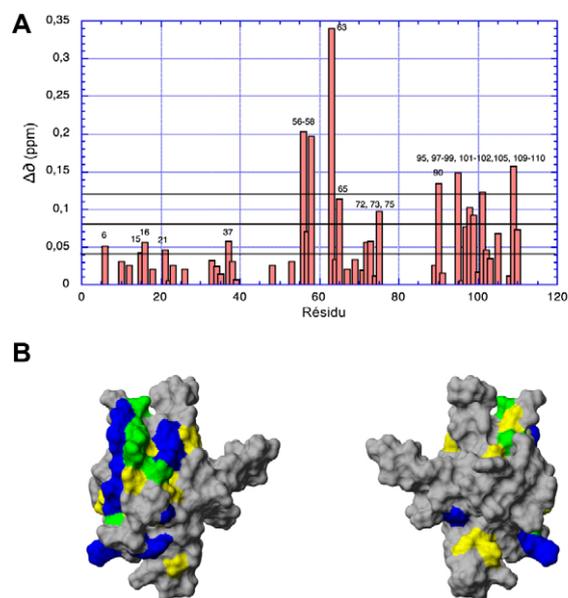


Fig. 1. Site de liaison du peptide inhibiteur *Akt-in* sur la surface du domaine PH d'Akt. (A) Variations de déplacement chimique en fonction de la séquence mesurée entre un spectre HSQC enregistré sur un échantillon de  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD en présence de peptide à une concentration de 4 mM et un spectre HSQC de référence de la protéine marquée. (B) Site de liaison révélé par les variations de déplacement chimique mesurées au niveau des groupements amides d'Akt-PHD en présence d'*Akt-in* (jaune) et de TCL1 (bleu). Les zones reconnues à la fois par le peptide inhibiteur et TCL1 sont coloriées en vert.

mant la « poche » de l'inositol commune à la plupart des domaines PH. Cela confirme nos résultats précédents, obtenus avec une construction légèrement différente pour le domaine PH [4]. Là encore, nous avons utilisé le résidu qui présente les plus grandes variations de déplacement chimique pour construire notre courbe de titrage (Fig. 4) : il s'agit du résidu N53, dont la chaîne latérale est engagée dans une interaction électrostatique avec un des groupes phosphate de l'IP4 [7]. Les courbes de titrage réalisées en suivant sur le spectre HSQC le déplacement chimique des pics correspondant au groupement amide de la chaîne latérale de ce résidu ont permis d'établir une constante de dissociation de  $168 \pm 40 \mu\text{M}$  pour le complexe Akt-PHD : IP4. Ce  $k_D$  atteint  $390 \pm 50 \mu\text{M}$  si le titrage est réalisé strictement dans les mêmes conditions, mais en présence d'une concentration de 2 mM en peptide *Akt-in* dans la solution (soit environ 30 % du complexe Akt-PHD : *Akt-in* en solution), indiquant une baisse significative de l'affinité du domaine PH d'Akt pour l'IP4. Nous avons par ailleurs vérifié que le peptide ne possédait

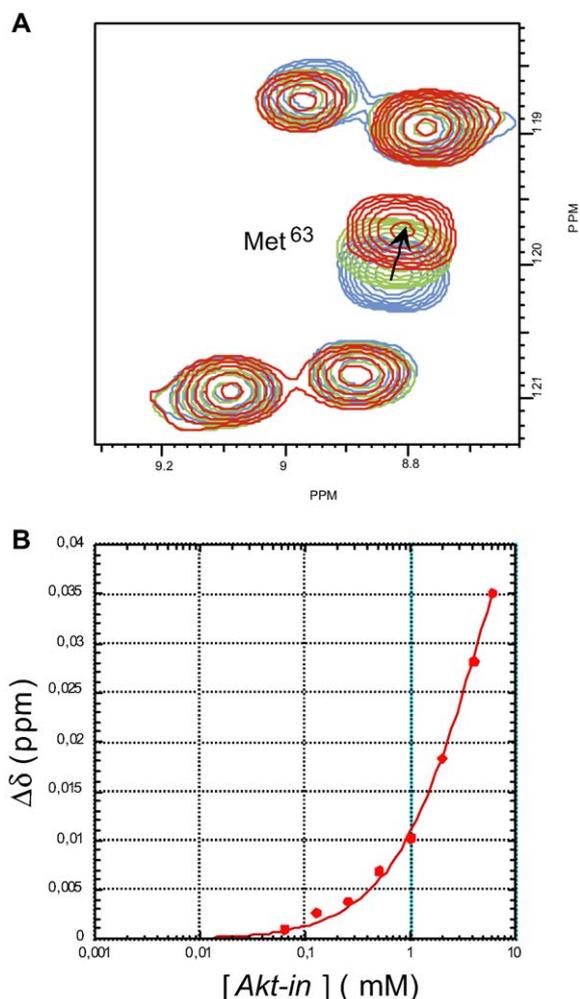


Fig. 2. Expérience de titrage de la protéine  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD par le peptide *Akt-in*. (A) Superposition d'extraits de l'expérience HSQC montrant les variations de déplacement chimique du groupement amide du résidu Met-63 sous l'effet de l'addition de concentrations croissantes de peptide inhibiteur *Akt-in* ( $[\text{Akt-in}] = 0 \text{ mM}$  (bleu), 2 mM (vert), 6 mM (rouge)). (B) Courbe de titrage obtenue en ajustant la variation de déplacement chimique moyen (Eq. 2) du groupement amide de Met-63 en fonction de la concentration en *Akt-in* avec l'équation 1.

aucune affinité par lui-même pour l'IP4 : son spectre demeure inchangé en présence d'IP4 à une concentration de 0,6 mM.

#### 4. Discussion

Ce travail confirme des résultats précédents, à savoir que le peptide *Akt-in* lie le domaine PH de la kinase

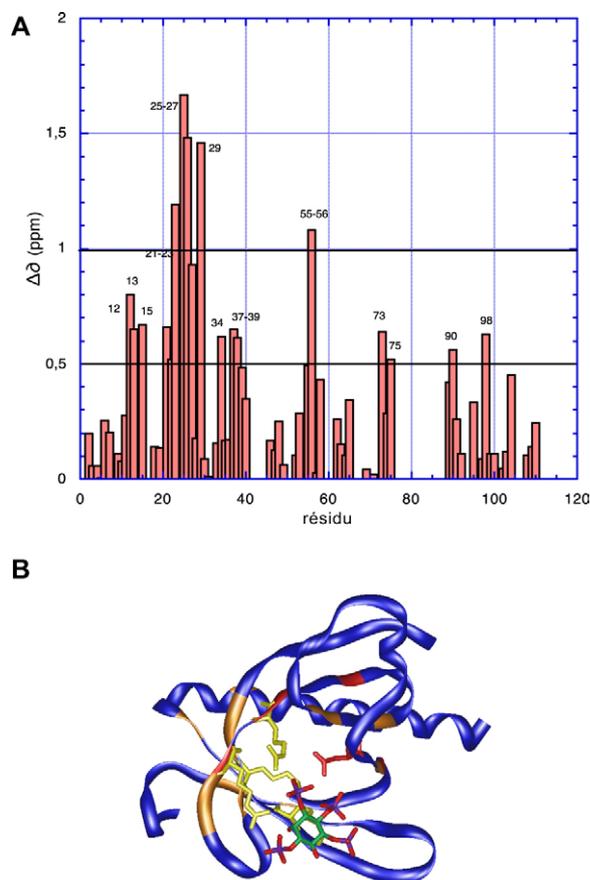


Fig. 3. Cartographie du site de liaison de l'IP4 sur la surface du domaine PH d'Akt. L'IP4 est représenté dans la position qu'il occupe dans la structure cristalline du domaine PH d'Akt1 [7]. Position de l'IP4 est dans Les variations de déplacements chimiques (A) mesurées entre un spectre HSQC de référence et un spectre HSQC enregistré sur un échantillon de  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD en présence d'IP4 à une concentration de 666  $\mu\text{M}$  ont été utilisées pour colorer le diagramme en ruban de la protéine (B), avec le code couleur suivant : orange pour  $0,5 \text{ ppm} < \Delta\delta < 1 \text{ ppm}$ , et rouge  $\Delta\delta > 1 \text{ ppm}$ . Les chaînes latérales directement impliquées dans la liaison aux groupes phosphates de l'IP4 sont reportées (celle du résidu  $\text{Asn}^{53}$  qui a servi pour l'expérience de titrage est coloriée en rouge).

Akt sur un site inclus dans la surface d'interaction déterminée pour le complexe Akt-PHD : TCL1 [3]. Des perturbations sont également enregistrées à plus longue distance, au niveau des déplacements chimiques de résidus impliqués dans la liaison aux phosphatidyl-inositol-phosphates membranaires. Ces variations sont probablement dues à des réarrangements conformationnels,

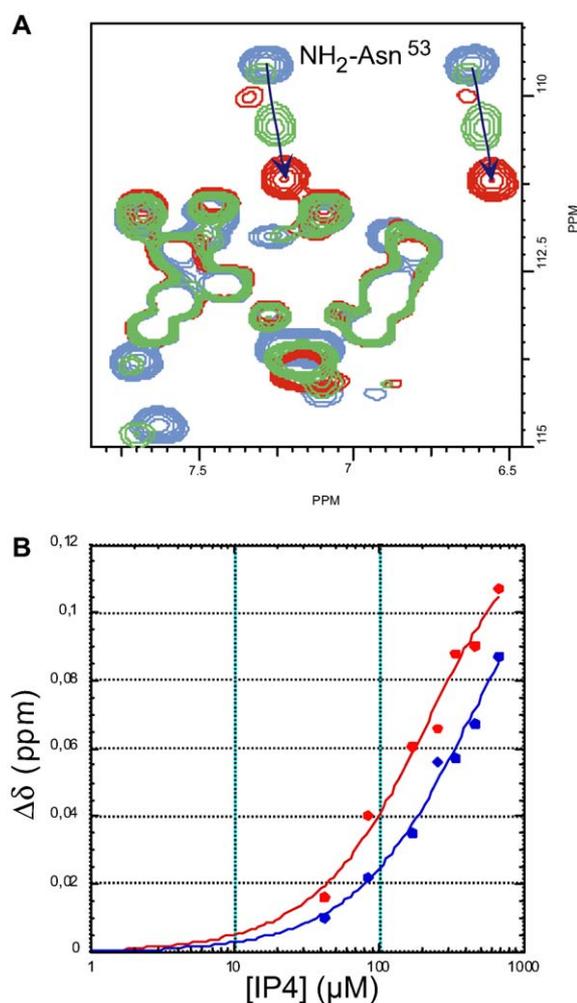


Fig. 4. Expérience de titrage de la protéine  $^{15}\text{N}$ -Akt-PHD par l'IP4. (A) Superposition d'extraits de l'expérience HSQC montrant les variations de déplacement chimique du groupement amide porté par la chaîne latérale du résidu  $\text{Asn}^{53}$  sous l'effet de l'addition de concentrations croissantes d'IP4 ( $[\text{IP4}] = 0 \text{ mM}$  (bleu),  $0,166 \text{ mM}$  (vert),  $0,666 \text{ mM}$  (rouge)). (B) Courbe de titrage obtenue en ajustant la variation de déplacement chimique moyen (Eq. 2) du groupement amide de la chaîne latérale de  $\text{Met}^{63}$  en fonction de la concentration en IP4 avec l'équation 1 (rouge). La même expérience réalisée en présence de peptide inhibiteur *Akt-in* à une concentration de  $2 \text{ mM}$  en solution (bleu).

éventuellement associés à une perturbation de la dynamique interne de la boucle VL1. Si le peptide lié au domaine PH adopte une conformation similaire au brin A du tonneau  $\beta$  de TCL1, son extrémité C-terminale – relativement hydrophobe et initialement structurée en coude  $\beta$  entre les brins A et B de TCL1 – pourrait venir

se plaquer contre la boucle VL1 – également hydrophobe – sur la face opposée au site de l'inositol.

Les résultats présents ont également permis de mesurer l'affinité du domaine PH pour l'inhibiteur : cette affinité est certes relativement faible, mais reste conforme à l'affinité attendue pour un « hit » peptidique envers une cible protéique. Enfin, nous avons pu démontrer que la liaison du peptide au domaine PH diminuait significativement l'affinité de ce dernier pour l'IP4, la tête polaire des phosphatidyl-inositol-phosphates, cibles responsables de l'ancrage membranaire de la kinase. Là encore, ces résultats confirment en solution et permettent de quantifier des résultats précédents obtenus par des expériences de « pull-down » [3]. Cet effet est certainement à relier aux perturbations structurales (ou dynamiques ?) observées sur le domaine PH au niveau de la poche de l'inositol. L'ancrage membranaire est essentiel à l'activation complète d'Akt : son inhibition, même partielle, peut expliquer les perturbations des voies de signalisation de l'apoptose cellulaire.

En résumé, ces résultats sont un premier pas vers la démonstration du mécanisme d'action du peptide inhibiteur *Akt-in*. Ils doivent être encore affinés par une étude structurale du complexe Akt-PHD : *Akt-in*, en cours au laboratoire. Nous rappellerons que la conception d'inhibiteurs spécifiques de la kinase Akt consti-

tue une voie prometteuse dans la thérapie anticancéreuse.

## Remerciements

Virginie Ropars est financée par une bourse de la Ligue contre le cancer. Ce projet est également soutenu par l'Association pour la recherche contre le cancer.

## Références

- [1] G. Künstle, J. Laine, G. Pierron, S. Kagami, H. Nakajima, F. Hoh, C. Roumenstand, M.-H. Stern, M. Noguchi, *Mol. Cell Biol.* 22 (2002) 1513.
- [2] D. Auguin, P. Barthe, C. Royer, M.-H. Stern, M. Noguchi, S.T. Arold, C. Roumestand, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35890.
- [3] M. Hiromura, F. Okada, T. Obata, D. Auguin, T. Shibata, C. Roumestand, M. Noguchi, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53407.
- [4] D. Auguin, P. Barthe, M.-T. Augé-Sénégas, M.-H. Stern, M. Noguchi, C. Roumestand, *J. Biomol. NMR* 28 (2004) 137.
- [5] J.-L. Pons, T.-E. Malliavin, M.-A. Delsuc, *J. Biomol. NMR* 8 (1996) 445.
- [6] N.J. Murray, M.P. Williamson, T.H. Lilley, E. Haslam, *Eur. J. Biochem.* 219 (1994) 923.
- [7] C.C. Thomas, M. Deak, D.R. Alessi, D.M. van Aalten, *Curr. Biol.* 12 (2002) 1256.