



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00209**

(22) Data de depozit: **03/04/2019**

(41) Data publicării cererii:
27/11/2020 BOPI nr. **11/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOCHIMIE AL
ACADEMIEI ROMÂNE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **POPA IOANA LILIANA,
BD.GHEORGHE ȘINCAI, NR.11, BL.4, SC.2,
AP.32, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TÂNASE CARMEN ALEXANDRA,
STR.SACHELARIE VISARION, NR.2,
BL.112B, SC.A, APT.6, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **PROTEINE DE FUZIUNE FLUORESCENTE ALE S100P**

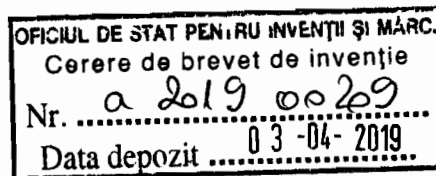
(57) Rezumat:

Invenția se referă la proteine de fuziune fluorescente care pot fi folosite pentru identificarea de compuși cu efecte anti-tumorale și anti-inflamatorii. Proteinele de fuziune generate cuprind secvența proteinei S100P umane la capătul N-terminal și secvența proteinei fluorescente EGFP la capătul C-terminal legate între ele prin diferiți linkeri și având diferite motive structurale necesare pentru purificare. Conform invenției, aceste

proteine de fuziune fluorescente pot fi folosite în experimente in vitro la scară largă pentru a descoperi noi inhibitori ai legării S100O de proteine implicate în oncogeneză și în special metastazare.

Revendicări: 5
Figuri: 16





PROTEINE DE FUZIUNE FLUORESCENTE ALE S100P

Descrierea invenției

Introducere

Invenția se referă la proteine de fuziune ale proteinei S100P cu EGFP și la utilizarea acestora *in vitro* în două metode pe bază de fluorescență pentru găsirea de inhibitori ai interacției S100P cu parteneri implicați în oncogeneză.

Domeniul la care se referă invenția este descoperirea și dezvoltarea de compuși cu efecte antitumorale și anti-inflamatorii.

Problema pe care o rezolvă invenția este obținerea de metode simple, robuste și rapide pe bază de fluorescență pentru descoperirea la scară largă de inhibitori ai legării S100P de proteine implicate în oncogeneză și în special în metastazare. Metodele se pot folosi de asemenea pentru determinarea K_i a inhibitorilor.

Cancerul este cea mai frecventă boală umană la nivel global. Se consideră că o treime din populația lumii suferă de o formă de cancer. Aproape 10 milioane de oameni mor anual din cauza cancerului. Majoritatea deceselor se datorează formelor metastazate de cancer. Între proteinele implicate în procesul de metastazare se numără și unii membrii din familia proteinelor S100, proteine mici de 9-13 kDa care funcționează ca senzori de Ca^{2+} și ca citokine. S100P este un marker oncogenic a cărui expresie în tumorile solide se corelează cu un nivel ridicat de metastazare și cu un prognostic negativ pentru evoluția pacienților.

S100P este o proteină de 95 aminoacizi și o masă moleculară de 10,4 kDa, având două motive structurale de tip EF-hand importante pentru legarea Ca^{2+} . S100P formează dimeri ale căror structură și funcție sunt reglate prin legarea Ca^{2+} (Austermann și colab. (2009), *Biochim Biophys Acta*, 6, 1078-1085). Gena pentru S100P este localizată în cromozomul 4p16 la om.

În condiții fiziologice, S100P este importantă pentru reproducere la mamifere. S100P a fost purificată pentru prima dată din placentă (Becker și colab. (1992), *Eur J Biochem*, 2, 541-547). S100P participă în schimbările periodice ale endometrului, iar expresia sa este reglată de progesteron. Se presupune că S100P are un rol important în reglarea dezvoltării endometrului în timpul ciclului menstrual și în crearea de condiții optime pentru implantarea embrionului (Tabrizi și colab. (2018), *Sci Rep*, 1, 11488; Zhang și colab. (2012), *Reprod Biol Endocrinol*, 106). De asemenea, S100P este exprimată în epiteliul gastric, însă rolul său în acest țesut nu a fost încă investigat.

S100P este supraexprimată în numeroase tipuri de cancer: pancreatic (Arumugam si colab. (2012), *Clin Cancer Res*, 16, 4356-4364; Arumugam si colab. (2005), *Clin Cancer Res*, 15, 5356-5364), pulmonar (Hsu si colab. (2015), *Oncotarget*, 30, 29585-29598), de colon (Dong si colab. (2014), *Mol Cell Biochem*, 1-2, 257-264; Fuentes si colab. (2007), *Dis Colon Rectum*, 8, 1230-1240; Mercado-Pimentel si colab. (2015), *FEBS Lett*, 18, 2388-2393), de sân (Kikuchi si colab. (2018), *Cell Oncol (Dordr)*; Wang si colab. (2006), *Cancer Res*, 2, 1199-1207)), de prostata (Basu si colab. (2008), *Int J Cancer*, 2, 330-339; Mousses si colab. (2002), *Cancer Res*, 5, 1256-1260), hepatic (Kim si colab. (2009), *Int J Oncol*, 6, 1257-1264), si subtipurii scuamoase de cancer endometrial (Guo si colab. (2014), *Int J Clin Exp Pathol*, 5, 2102-2112; Jiang si colab. (2016), *Cancer Invest*, 10, 477-488). Experimente in vitro și in vivo cu celule tumorale transfectate cu S100P au arătat că S100P promovează oncogeneza și metastaza în diferite cancere stimulând tranziția epitelial-mezenchimală, motilitatea, invazivitatea, proliferarea și supraviețuirea celulară (Arumugam si colab. (2013), *Mol Cancer Ther*, 5, 654-662; Arumugam si colab. (2005), *Clin Cancer Res*, 15, 5356-5364; Hsu si colab. (2015), *Oncotarget*, 30, 29585-29598; Jiang si colab. (2011), *Mol Med*, 7-8, 709-716; Shen si colab. (2015), *Oncotarget*, 24, 20672-20684; Wang si colab. (2006), *Cancer Res*, 2, 1199-1207).

Mecanismele moleculare prin care S100P acționează în oncogeneza au început să fie elucidate. S100P funcționează atât ca sensor intracelular de Ca^{2+} care modulează activitatea partenerilor săi, cât și ca factor extracelular. Intracelular, S100P reglează organizarea citoscheletului și adeziunea celulară. Astfel, în celule tumorale pulmonare, S100P leagă și reglează doi componenți importanți ai citoscheletului cortical, ezrina și IQGAP1, promovând migrarea transendotelială a celulelor (Austermann si colab. (2008), *J Biol Chem*, 43, 29331-29340; Heil si colab. (2011), *J Biol Chem*, 9, 7227-7238; Koltzsch si colab. (2003), *Mol Biol Cell*, 6, 2372-2384). În linii celulare de cancer pulmonar de tip non-small, S100P determină tranziția epitelial-mezenchimală și creșterea invazivității stimulând calea de semnalizare integrin $\alpha7$ /FAK/Src/AKT (Hsu si colab. (2015), *Oncotarget*, 30, 29585-29598). S100P se leagă de miozina nemusculară IIA (nonmuscle myosin IIA) cauzând disocierea filamentelor de miozină și dezamblarea situsurilor de adeziune focală (FAS) conducând astfel la reducerea adeziunii celulare (Du si colab. (2012), *J Biol Chem*, 19, 15330-15344). Supraexpresia S100P duce la creșterea expresiei procathepsinei D și a S100A6, la reducerea expresiei citocheratinelor 8, 18 și 19 și la dezorganizarea rețelei citoscheletului actinic crescând astfel capacitatea invazivă a

celulelor tumorale pancreatice (Whiteman si colab. (2007), *Cancer Res*, 18, 8633-8642). S100P formează complexe cu S100PBP (S100P binding protein) și CacyBP/SIP (calcyclin and Siah-1-interacting protein), dar rolul funcțional al acestor asocieri nu a fost investigat până în prezent (Downen si colab. (2005), *Am J Pathol*, 1, 81-92; Filipek si colab. (2002), *J Biol Chem*, 32, 28848-28852).

Pe lângă activitatea sa intracelulară, S100P are și rol de factor extracelular. Singurul receptor extracelular al S00P cunoscut până în prezent este receptorul pentru produși de glicare avansată (RAGE). RAGE este o glicoproteină din membrana plasmatică care face parte din superfamilia imunoglobulinelor, având un domeniu N-terminal extracelular de 321 aminoacizi (secvența 23-342) compus din trei subdomenii similare cu domeniile imunoglobulinelor (domenii numite V, C1, C2), un domeniu transmembranar (343-363) și un scurt domeniu citosolic (364-404) important pentru transducerea semnalului în celulă. RAGE este implicat în etiologia mai multor maladii, inclusiv boli neurodegenerative, ateroscleroza, diabet, cancer și inflamație. Ca și ligandul său S100P, RAGE este supraexprimat în numeroase tipuri de cancer printre care cancerele de colon (Mercado-Pimentel si colab. (2015), *FEBS Lett*, 18, 2388-2393), pancreatice (Kang si colab. (2012), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 18, 7031-7036), de sân (Nasser si colab. (2016), *Oncoscience*, 2, 52-53) și melanoame (Zhu si colab. (2013), *J Dermatol*, 12, 973-979). Până în prezent s-a arătat că axa S100P/RAGE este importantă în special pentru metastazarea cancerelor pancreatic și de colon. În cancerul pancreatic S100P activează NF-κB prin legarea la RAGE (Arumugam si colab. (2013), *Mol Cancer Ther*, 5, 654-662; Arumugam si colab. (2005), *Clin Cancer Res*, 15, 5356-5364). În celule de cancer de colon S100P exogen activează kinaza Akt și factorul de transcripție NF-κB conducând la expresia crescută a unor miRNA oncogenice (miRNA-21 (Mercado-Pimentel si colab. (2015), *FEBS Lett*, 18, 2388-2393) și miRNA-155 (Onyeagucha si colab. (2013), *Exp Cell Res*, 13, 2081-2090)) și a proteinei S100A4 (Zuo si colab. (2018), *J Cell Mol Med*, 4, 2430-2441), crescând astfel capacitatea invazivă a celulelor. S100P secretată de fibroblaste transfectate cu S100P activează Erk și NF-κB prin legarea la RAGE și astfel stimulează supraviețuirea și proliferarea celulelor (Arumugam si colab. (2004), *J Biol Chem*, 7, 5059-5065).

Considerând importanța crucială a proteinei S100P în transformarea mezenchimală a celulelor epiteliale și creșterea invazivității celulelor, descoperirea de compuși capabili să blocheze căile oncogenice induse de S100P este o direcție promițătoare pentru controlul

tumorilor și blocarea metastazării, în special în adenocarcinoamele pancreatice și cancerele de colon.

Până în prezent s-au studiat în teste *in vitro* și modele *in vivo* diverși modulatori ai legării S100P de RAGE, și anume anticorpi specifici pentru S100P (Dakhel si colab. (2014), *Oncogenesis*, e92), anticorpi neutralizanți anti- RAGE (Mercado-Pimentel si colab. (2015), *FEBS Lett*, 18, 2388-2393; Onyeagucha si colab. (2013), *Exp Cell Res*, 13, 2081-2090), peptide derivate din secvența S100P (Arumugam si colab. (2012), *Clin Cancer Res*, 16, 4356-4364), peptide derivate din HMGB1 (Fuentes si colab. (2007), *Dis Colon Rectum*, 8, 1230-1240), un alt ligand al RAGE, molecule mici care se leagă de S100P și competiționează cu RAGE, precum cromolina și derivații săi (Arumugam si colab. (2006), *J Natl Cancer Inst*, 24, 1806-1818; Arumugam si colab. (2013), *Mol Cancer Ther*, 5, 654-662) și pentamidina (Penumutchu si colab. (2014), *PLoS One*, 8, e103947). Nu se cunosc inhibitori ai interacției S100P cu alți parteneri ai săi implicați în patologii.

Invenția se referă la proteine de fuziune care cuprind secvența proteinei S100P umane și secvența proteinei fluorescente EGFP legate între ele prin diferiți linkeri și având diferite motive structurale necesare pentru purificare. Structurile acestor proteine sunt prezentate schematic în Fig. 1a, iar secvențele de aminoacizi ale proteinelor din care provin în Fig. 1b. De asemenea, în acest brevet sunt propuse două metode *in vitro* noi care folosesc proteinele de fuziune fluorescente generate pentru a descoperi noi inhibitori ai legării S100P de o forma solubilă a receptorului pentru produși de glicare avansată. Proteinele de fuziune și metodele descrise în brevet pot fi folosite în experimente la scară largă similare celor prezentate aici pentru identificarea de compuși care blochează interacția S100P cu alte proteine implicate în oncogeneză (e.g. integrina, ezrina) și pentru a caracteriza interacția S100P cu partenerii săi fiziologici (de exemplu, pentru identificarea cofactorilor care stimulează interacția).

În continuare sunt prezentate pe scurt figurile asociate cu această invenție:

- Fig. 1- (a) Reprezentarea schematică a proteinelor de fuziune; (b) Secvențele proteinelor matriță S100P și EGFP.
- Fig. 2 - Secvențele primerilor folosiți pentru clonare și mutageneză.
- Fig. 3 - Secvențele proteinelor de fuziune descrise în brevet. His-SE (358 aa, Mw 40.21 kDa, pI = 5.43, $\epsilon_{280} = 26360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); His-SE-HL (370 aa, Mw 41.3 kDa, pI=5.45, $\epsilon_{280} = 26360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); His-SE-FL (370 aa, Mw 41.3 kDa, pI=5.51, $\epsilon_{280} = 26360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); GST-SE-FL

- (584 aa, 65.91 kDa, pI 5.5, $\epsilon_{280} = 67730 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); SE-FL (358 AA, 39.5 kDa, pI 5.37, $\epsilon_{280} = 24870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); GST-SE-HL (584 AA, Mw 65.92 kDa, pI = 5.45, $\epsilon_{280} = 67730 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); SE-HL (358 AA, Mw 39.51 kDa, pI 5.3, $\epsilon_{280} = 24870 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- Fig. 4 - Purificarea proteinei His-SE-HL prin cromatografie de afinitate. (a) Cromatograma eluției de pe coloana HisTrap HP 5 ml; (b) Analiza prin 12% SDS-PAGE și colorare cu Coomassie blue staining.
 - Fig. 5 - Purificarea proteinelor SE-HL (a) și SE-FL (b) prin cromatografie de afinitate pe rășină de glutathione-Sepharose 4B și tăiere cu proteaza Prescission. a. 12% SDS-PAGE; b. 10% SDS-PAGE. E1a, E1b, E2a, E2b-diferite fracții în două concentrații, Beads 1,2- rășina după clivarea cu proteaza Prescission.
 - Fig. 6 - Spectre de absorbție și de fluorescență. a, b, His-SE-HL; c, d, SE-HL; e, f, SE-FL; g,h, His-EGFP.
 - Fig. 7 - Analiza prin cromatografie de excludere moleculară a SE-FL (a) și His-SE-HL (b) în 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 8.0 și 1 mM DTT (în cazul proteinei His-SE-HL). În cromatograme sunt indicate volumele de eluție ale markerilor de masa folosiți pentru calibrarea coloanei.
 - Fig. 8 - Analiza prin electroforeză nativă a diverselor variante SE și a complexelor lor cu VC1-His. (a) gel colorat cu Coomassie Blue; (b) Fluorescența intrinsecă a proteinelor de fuziune cu EGFP. Gel nativ 6-10% poli-acrilamida.
 - Fig. 9 - Legarea în funcție de concentrație a His-SE-HL la VC1-His, comparativ cu legarea la proteina control BSA. Legarea specifică între His-SE-HL și VC1-His este calculată ca diferența dintre semnalul obținut după incubarea cu VC1-His (legare totală) și cel înregistrat după incubarea cu BSA (legare nespecifică).
 - Fig. 10 - His-SE-HL și nu EGFP se leagă la VC1-His.
 - Fig. 11 - His-S100B, His-S100P, His-HMGB1 și VC1-His competiționează cu His-SE-HL pentru legarea la VC1-His pre-adsorbit. VC1-His legat de microplăci a fost incubat cu 400nM His-SE-HL în prezență de His-EGFP, His-S100P, His-S100B, His-HMGB1, VC1-His sau BSA, adăugate în reacție în raportul molar specificat în grafic. Semnalul de fluorescență din godeurile cu proteinele competitora a fost normalizat la semnalul control în absența acestora.

- Fig. 12 - His-SE-HL și SE-FL se leagă la fel de eficient de VC1-His pre-adsorbit. Trei concentrații pentru cei doi compuși fluorescenți au fost testate în reacție (200 nM, 400 nM și 800 nM (A)). Pentru a demonstra specificitatea semnalului pentru ambele proteine fluorescente în interacție cu VC1-His s-au folosit drept controale negative godeuri cu BSA incubate cu concentrația cea mai mare de ligand fluorescent (B).
- Fig. 13 - Testarea unei minibiblioteci de compuși naturali pentru găsirea de modulatori ai interacției SE-HL cu VC1. Complexele între His-SE-HL și VC1-His pre-adsorbit s-au format în absența (control pozitiv) ori în prezența unui compus din componența unei biblioteci de compuși naturali. Semnalul de fluorescență din godeurile cu compuși a fost normalizat față de semnalul control în absența oricărui compus.
- Fig. 14 - Analiza prin metoda TR-FRET a legării SE-FL de receptorul VC1 *in vitro*. Concentrații crescătoare de SE-FL (10-800 nM) au fost incubate în prezență de VC1-His (50 nM) și anticorpi marcați cu chelat de Tb (2 nM). Semnalul TR-FRET specific s-a calculat prin scăderea semnalului obținut în absența VC1-His din semnalul înregistrat în prezența VC1-His.
- Fig. 15 - S100B competiționează cu SE-FL pentru legarea la VC1. Concentrații crescătoare de S100B, S100P sau BSA au fost incluse în amestecul de legare conținând 200 nM SE-FL și 50 nM VC1-His. Semnalul TR-FRET s-a înregistrat după incubarea o oră la temperatura camerei în prezență de anticorpi anti-His.
- Fig. 16 - Test pilot pentru identificarea de modulatori ai interacției SE-FL cu VC1 prin TR-FRET. Complexele SE-FL/VC1-His s-au format în prezență de compuși dintr-o bibliotecă comercială de produși naturali în concentrații de 20 μM. Semnalul TR-FRET din godeurile cu compuși a fost normalizat față de semnalul control în absența oricărui compus.

Material

Enzimele de restricție și kitul de mutagenza cu polimeraza Q5 au fost cumpărate de la New England Biolabs. Proteinele VC1-His, His-S100P, His-S100B, His-HMGB1, S100P, S100B și His-EGFP au fost clonate și exprimate în sistem bacterian și purificate până la omogenitate electroforetică în laborator. Proteaza PreScission a fost exprimată și purificată în laborator. Reactivul Pierce 660 și anticorpii anti-His marcați cu chelat de Tb (LanthaScreen Elite Tb-anti-His antibodies) au fost procurați de la ThermoFisher Scientific. Libraria de produși naturali a fost cumpărată de la APEXBIO. Tulpina de *E.coli* BL21-codonPlus(DE3) RP a fost cumpărată de la

Agilent Technologies. Markerii de masă pentru calibrarea coloanei de gel filtrare și rășinile pentru purificarea proteinelor s-au cumpărat de la GE Healthcare. Reactivii pentru electroforeza de ADN și proteine s-au achiziționat de la Promega și Millipore. Inhibitorii de proteaze au fost cumpărați de la Roche. Secvențele primerilor folosiți pentru clonare și mutagenză sunt arătate în Fig. 2. Plasmidele folosite au fost: pEGFP-c2 (Clontech), pHAT2-TEV, pGEX-6P-2 (GE Healthcare). Secvențierea noilor construcții s-a făcut la CeMIA SA.

Determinarea concentrației de proteine

Concentrația proteinelor purificate s-a determinat fie prin metoda colorimetrică cu reactiv Pierce 660 conform protocolului de la ThermoFisher Scientific, fie prin spectrofotometrie UV folosind coeficienții de extincție teoretici pentru calcul.

Se dau în continuare 12 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Construcția plasmidelor de expresie pentru moleculele de fuziune

În această invenție au fost construite proteine de fuziune care au la capătul N-terminal secvența proteinei S100P umane și la capătul C-terminal secvența proteinei fluorescente EGFP. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) este o variantă modificată, mai strălucitoare a proteinei cu fluorescență verde (GFP) din *Aequorea victoria*. Diferite versiuni au fost generate, cu două secvențe de linker între cele două proteine și cu diferite secvențe peptidice pentru purificare.

Noile proteine fluorescente S100P-EGFP (notate pe scurt SE) au fost construite pornind de la secvența EGFP din vectorul pEGFP-c2 (de la Clontech) și de la secvența S100P obținută prin transcrierea inversă a mRNA extras dintr-o linie celulară de melanom și amplificare prin PCR (polymerase chain reaction). Cele două secvențe au fost clonate în cadru, cu S100P la capătul N-terminal și EGFP la C-terminal. RNA total a fost purificat din celule de melanom uman A375 prin extracție cu Trizol-cloroform-isopropanol. Puritatea preparatului de RNA a fost analizată prin electroforeză în gel de agaroză. RNA total izolat a fost folosit pentru sinteza ADNc cu ajutorul kitului SensiFAST cDNA synthesis (Bioline). ADNc pentru gena S100P a fost amplificat prin PCR cu ADN polimeraza Q5 HF (NEB) folosind primerii XmaI-S100P-2 și Sall-S100P-Rev. Produsul de PCR de ~ 300 perechi de baze, corespunzând întregii secvențe a S100P, a fost purificat și tăiat cu două enzime de restricție, XmaI și Sall, pentru clonarea în vectorul pHAT2-TEV.

Fragmentul EGFP a fost obținut prin amplificare PCR folosind ca matriță vectorul pEGFP-c2 și primerii Sall-EGFP și BamHI-EGFP. Produsul de PCR a fost purificat prin gel electroforeză și tăiat cu Sall și BamHI pentru clonarea în pHAT2-TEV. Pentru clonare, vectorul pHAT2-TEV a fost tăiat cu enzimele XmaI și BamHI, defosforilat și purificat din gel.

Cele trei fragmente ADN, pHAT2-TEV, S100P și EGFP cu situsuri de ligare complementare au fost unite într-o reacție comună folosind ligaza T4. Constructul S100P-EGFP (SE) generat a fost verificat prin secvențiere. Deoarece EGFP are capacitatea de a dimeriza, iar versiunea sa cu o Lys în locul Ala din poziția 207 formează numai monomeri, am optat pentru folosirea versiunii Ala207Lys pentru proiectarea proteinelor SE. Această variantă de SE a fost generată folosind kitul de mutagenză direcționată la situs cu polimeraza Q5 conform strategiei de la NEB și primerii de mutagenză A207K_HindIII_For și EGFP_A207K_R. Constructul obținut (notat His-SE) a fost folosit mai departe ca matriță pentru a genera două variante cu linkeri mai lungi.

Varianta His-S100P-EGFP cu linker helical (His-SE-HL) conține secvența AEAAAKEAAKA între secvențele proteinelor S100P și EGFP și a fost generată prin mutagenză cu primerii helical_NcoI_For și helical linker_R. Similar a fost obținută și varianta His-S100P-EGFP cu un linker flexibil (His-SE-FL) cu secvența GSTSGKPSEGKG introdusă între secvențele S100P și EGFP, folosind primerii flexible linker_F și Rigid_BamHI_Rev.

Două isoforme ale S100P-EGFP cu cei doi linkeri, helical și flexibil, dar fără secvența de 6xHis, au fost generate prin subclonarea secvențelor SE-HL și SE-FL în vectorul pGEX-6P-2. Astfel, plasmidele pHAT-SE-HL și pHAT-SE-FL au fost tăiate cu enzimele de restricție NotI-HF și XmaI, iar fragmentele cu secvențele corespunzătoare S100P-EGFP au fost ligate în vectorul pGEX-6P-2 tăiat cu aceleași enzime. Au fost obținute astfel plasmidele pGEX-SE-HL și pGEX-SE-FL care codifică proteinele GST-SE-HL și GST-SE-FL.

Toti construcții generați fie prin ligare, fie prin mutagenză au fost selectați prin digestie cu enzime de restricție și secvențele lor au fost determinate prin secvențiere Sanger.

Exemplul 2. *Expresia și purificarea proteinelor de fuziune*

Toate proteinele clonate descrise în exemplul 1 au fost exprimate în sistem procariot. Trei dintre aceste proteine, GST-SE-HL, GST-SE-FL și His-SE-HL, au fost exprimate în cantități suficiente pentru a fi folosite în teste de interacție *in vitro*. Secvențele de aminoacizi ale acestor proteine sunt prezentate în Fig. 3, iar structura lor este reprezentată schematic în Fig. 1a.

His-S100P-EGFP-HL a fost exprimată în tulpina BL21-CodonPlus (DE3)-RP de *E.coli*, care conține un plasmid ce codifică genele pentru tRNA care recunosc codoni pentru Arg și Pro specifici pentru mamifere. Bacteriile transformate cu plasmidele de interes au fost crescute în mediu LB cu ampicilină. Celulele au fost induse cu 0.5 mM IPTG și expresia proteinei s-a realizat peste noapte la 18°C pentru a mări eficiența plierii proteinei EGFP.

Proteina His-SE-HL a fost purificată într-o singură etapă de cromatografie de afinitate pe coloană HisTrap HP de 5 ml, folosindu-se capacitatea secvenței de 6xHis de a se lega specific de rășina încărcată cu Ni. Pe scurt, celulele au fost sparte în tampon TrisHCl pH 8.0 (conținând inhibitori de proteaze, Triton X-100, lizozim și 20 mM imidazol) și proteinele solubile au fost recuperate în supernatantul rezultat prin ultracentrifugarea lizatului celular la 100.000xg. Purificarea proteinei s-a realizat cu un sistem cromatografic AKTA în tamponul de legare 20 mM Tris HCl, pH 8, cu 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM DTT, iar eluția proteinei legate pe coloană s-a făcut cu un gradient liniar de imidazol (20-250 mM). Purificarea a fost urmărită prin măsurarea absorbției la 280 nm. Frațiile conținând proteina au fost analizate prin SDS-gel electroforeză și colorare cu Coomassie Blue (Fig. 4). Proteina His-SE-HL are o masă aparentă de 41 kDa. Frațiile cu proteina de interes au fost dializate pentru reducerea concentrației de sare la 100 mM și îndepărtarea imidazolului. Proteina purificată a fost păstrată la -80 °C în tampon conținând 1 mM DTT și 2 mM CaCl₂. Puritatea estimată prin analiza SDS-PAGE a fost de 95%. Randamentul de purificare a fost de 15 mg din 500 ml cultură bacteriană.

Proteinele GST-SE-HL și GST-SE-FL au fost exprimate în tulpina BL21 de *E.coli* la 18° C peste noapte prin inducerea expresiei cu 0.5 mM IPTG. Pentru purificarea proteinelor fără 6 His (notate SE-HL și SE-FL), proteinele de fuziune cu GST au fost adsorbite pe rășina de glutation Sepharoză și tăiate de pe rășină cu proteaza PreScission. Același protocol s-a folosit în cazul ambelor versiuni. Pe scurt, celulele bacteriene au fost sparte cu cicluri scurte de sonicare pe gheață în tamponul de legare (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) care conține 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 100 ug/ml lizozim, 1x inhibitori de proteaze, 5 ug/ml DNase, și 2 mM CaCl₂. Proteinele solubile au fost izolate prin ultracentrifugare și încărcate pe rășina de glutation Sepharoza echilibrată cu tamponul de legare. După îndepărtarea proteinelor nelegate pe rășină prin spălări repetate, proteinele de fuziune cu GST au fost tăiate cu proteaza PreScission, în tamponul de legare cu 1 mM DTT, folosind un raport enzimă:substrat = 1:40 (w/w). Astfel, SE-HL și SE-FL au fost eliberate în eluat, iar proteaza și GST au rămas adsorbite pe rășină. Masa

aparentă a celor două proteine de interes este 40 kDa (Fig. 5). Randamentul de purificare și puritatea au fost estimate la 22 mg din 500 ml cultură și 90% puritate pentru SE-HL și 3 mg din 250 ml cultură și 95% puritate pentru SE-FL.

Exemplul 3. Caracterizarea proteinelor de fuziune: spectre de absorbție și fluorescență

Toate proteinele de fuziune SE cu sau fără 6xHis raportate în acest brevet au spectre de absorbție și de fluorescență identice, cu maxime la 488 nm și respectiv 510 nm. Spectrele de absorbție ale proteinelor purificate au fost înregistrate cu un spectrofotometru Nanodrop 2000, iar spectrele de fluorescență cu un fluorospectrometru Nanodrop 3300. Aceste spectre sunt redate în Fig. 6.

Exemplul 4. Caracterizarea proteinelor de fuziune prin cromatografie de excludere moleculară și electroforeză nativă

Starea de oligomerizare a proteinelor de fuziune His-SE-HL și SE-FL a fost analizată prin gel filtrare pe o coloană HiLoad 16/60 Superdex_200_pg (GE Healthcare). Proteina His-SE-HL are secvența MSHHHHHHSMDIEENLYFQGPG (22 AA) la capătul N-terminal. Forma fără motivul de 6xHis (notată SE-FL) are la capătul N-terminal secvența GPLGSPGIPG (10 AA) generată prin clivarea fuziunii GST-SE-FL cu proteaza PreScission.

Cromatograma de gel filtrare arată că SE-FL formează în principal dimeri (cu Mw 105 kDa), dar și hexameri (cu Mw 296 kDa), precum și o mică fracție de oligomeri cu masa de peste 600 kDa. În contrast, proteina His-SE-HL formează numai dimeri cu masa aparentă de 125.5 kDa (Fig.7).

Starea de oligomerizare a trei dintre proteinele SE obținute, His-SE-HL, SE-HL și SE-FL, a fost analizată și prin electroforeză nativă (Fig. 8). Și prin această metodă s-a observat că His-SE-HL este mai omogenă, formând numai dimeri, în timp ce proteinele SE-FL și SE-HL formează atât dimeri cât și diferiți oligomeri, sugerând că prezența secvenței GPLGSPGIPG la capătul N terminal al S100P induce o pliere a S100P care favorizează formarea de oligomeri ai acestor proteine de fuziune.

Exemplul 5. Interacția proteinelor SE cu VC1 (RAGE) analizată in vitro prin electroforeză nativă

Una dintre cele mai investigate interacții fiziologice ale S100P este cea cu receptorul pentru produși de glicare avansată (RAGE). Domeniul extracelular al RAGE cuprinde trei subdomenii similare celor din structura imunoglobulinelor, în ordine de la capătul N terminal,

domeniile V (23-116), C1 (124-221) și C2 (227-317). Penumutthu și colab au arătat că proteina S100P se leagă de RAGE prin domeniul V al receptorului (Penumutthu și colab. (2014), *PLoS One*, 8, e103947). Prin calorimetrie de titrare izotermică și măsurători de spectroscopie de fluorescență intrinsecă a triptofanilor s-a determinat o constantă de disociere de $\sim 6 \mu\text{M}$ pentru complexul V-RAGE/S100P (Penumutthu și colab. (2014), *PLoS One*, 8, e103947).

Interacția proteinelor de fuziune His-SE-HL, SE-FL și SE-HL cu o forma trunchiată a receptorului pentru produși de glicare avansată cuprinzând domeniile V și C1 (23-232) a fost studiată prin electroforeză nativă în gel de poliacrilamidă (Fig.8). Variantele SE menționate au fost incubate cu $1 \mu\text{M}$ VC1-His într-un raport molar 2:1 (ligand: receptor) în tamponul de legare (20 mM Tris HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM DTT) o oră la temperatura camerei în 40 μl . Drept control au fost incubate în același tampon numai proteinele SE. Complexele formate au fost analizate prin electroforeză nativă. Toate cele trei forme de SE au format complexe cu VC1 sugerând ca acești construcți permit interacția porțiunii S100P cu receptorul său.

Exemplul 6. Interacția His-SE-HL cu VC1 adsorbit în microplăci

Un exemplu de model experimental dezvoltat cu ajutorul proteinelor de fuziune S100P-EGFP (ex His-HL-SE sau SE-FL) a constatat în detecția semnalului de fluorescență corespunzător proteinei de fuziune care se leagă la varianta solubilă a RAGE, VC1-His, pre-adsorbită. Pentru aceasta, s-au folosit microplăci de polistiren negre, cu 96 de godeuri (Perkin-Elmer) tratate așa încât să aibă capacitate mare de legare a proteinelor și anticorpilor, fiind potrivite pentru tehnici de tip ELISA în fază solidă. Metoda de lucru presupune incubarea peste noapte în microplacă a proteinei receptor ex VC1-His ($0.2\text{-}2 \mu\text{g/godeu}$) în tampon Hepes, pH 8.0, conținând 100-300 mM NaCl și 1-2 mM DTT. A doua zi se spală de câteva ori cu tamponul în care s-a realizat etapa de adsorbție de proteină, iar apoi se blochează situsurile de legare nespecifică prin adăugarea a 1.5-3% BSA și 0.02-0.05% Tween-20 și incubarea la temperatura camerei cel puțin 2 hr. Legarea ligandului fluorescent se efectuează prin incubarea la temperatura camerei $\geq 2\text{hr}$ a diferite concentrații de proteine SE (His-SE-HL sau SE-FL) în tampon Hepes, pH 8.0, suplimentat cu 100-200 mM NaCl, 2-4 mM CaCl_2 , 0.5-1 mM DTT, în prezența unor concentrații mai scăzute de BSA și Tween-20 pentru a reduce legarea nespecifică. Proteina fluorescentă nelegată este îndepărtată prin spălări succesive cu tampon de legare în timp ce fracția de proteină care a interacționat cu VC1-His este determinată prin citirea fluorescenței având $E_{\text{ex}}480/E_{\text{em}}520\text{nm}$.

În calitate de control pentru specificitatea interacției His-SE-HL cu receptorul solubil adsorbit s-a folosit albumina serică bovină (BSA). VC1-His și BSA pre-adsorbite în godeuri au fost incubate cu His-SE-HL având concentrații molare crescătoare, și anume 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 μM . În Fig. 9 se arată legarea crescătoare, în funcție de concentrație, a ligandului His-SE-HL la VC1-His. Legarea specifică dintre His-SE-HL și VC1-His a fost calculată prin scăderea legării nespecifice, reprezentată de semnalul fluorescent obținut prin incubarea His-SE-HL cu BSA adsorbit în microplacă, din legarea totală înregistrată după incubarea His-SE-HL cu VC1-His pre-adsorbit. Curba de legare a fost folosită pentru măsurarea tăriei interacției dintre proteina receptor și ligandul său, pe baza modelului cel mai probabil cu un situs de legare, constanta de disociere calculată fiind de 3.796 μM .

Exemplul 7. Specificitatea de legare între His-SE-HL și VC1 adsorbit în microplăci

Pentru a demonstra că legarea His-SE-HL cu RAGE se realizează prin intermediul domeniului S100P și nu prin EGFP, s-a analizat interacția RAGE cu His-EGFP în paralel cu interacția sa cu His-SE-HL. S-a folosit modelul experimental prezentat în exemplul 6, cu VC1-His adsorbit pe placă și adăugate de proteine fluorescente (His-SE-HL sau His-EGFP, concentrația în amestecul de incubare 400 nM). În paralel, a fost testată și interacția celor două proteine fluorescente cu proteina control BSA adsorbită. În cazul proteinei de fuziune His-SE-HL incubate cu VC1-His s-a obținut un semnal de fluorescență de aproximativ 5 ori mai mare decât semnalul obținut după incubarea EGFP cu VC1-His, acesta fiind la nivelul celui înregistrat pentru controlul BSA în reacție cu ambele proteine fluorescente (Fig.10).

Specificitatea interacției receptor adsorbit-ligand fluorescent a fost testată și în experimente de legare competitivă cu VC1-His liber sau cu alte proteine care interacționează cu VC1-His (Fig. 11). Pentru aceasta, în amestecul de incubare conținând His-SE-HL și VC1-His adsorbit am adăugat alți liganzi ai receptorului RAGE (ex: His-S100B, His-HMGB1) ori S100P-nefluorescent (ex: His-S100P). Drept proteine control în competiție am folosit BSA și EGFP în același raport molar cu al celorlalți competitori testați. Legarea His-SE-HL la VC1-His pre-adsorbit a fost inhibată de His-S100B, His-S100P, His-HMGB și VC1-His într-o manieră dependentă de concentrația competitorului. În contrast, BSA și EGFP nu au inhibat semnificativ interacția dintre VC1-His și His-SE-HL, demonstrând specificitatea metodei propuse în brevet.

Exemplul 8. Comparare între legarea His-SE-HL și SE-FL la VC1-His adsorbit

Capacitatea de legare de VC1-His adsorbit a constructului SE-FL a fost analizată în comparație cu cea a proteinei His-SE-HL. Diferite concentrații (200, 400 și 800 nM) ale celor două proteine fluorescente au fost incubate cu receptorul pre-adsorbit conform protocolului din exemplul 6 din acest brevet. Pentru ambii liganzi fluorescenți s-a obținut un semnal fluorescent aproximativ egal și crescător o dată cu creșterea concentrației acestora în reacția cu VC1-His (Fig. 12A), acest rezultat indicând faptul că cele două variante ale proteinei de fuziune a S100P cu EGFP se leagă la VC1-His cu afinități comparabile. Pentru a determina specificitatea interacției dintre SE-FL și VC1, aceeași concentrație de proteină fluorescentă (800 nM) a fost adăugată în godeuri cu BSA și în godeuri cu VC-His. Semnalul obținut în godeurile cu BSA a fost de peste 10 ori mai mic comparativ cu cel din godeurile în care His-SE-HL și SE-FL s-au legat la VC1-His (Fig. 12B), demonstrând că legarea SE-FL, ca și legarea His-SE-HL, de VC1 este specifică.

Exemplu 9. Teste de identificare de modulatori ai interacției dintre His-SE-HL și VC1-His pre-adsorbit

Pentru a identifica noi compuși capabili să moduleze interacția dintre His-SE-HL și VC1-His am efectuat un experiment pilot în care am interogată o bibliotecă conținând 137 compuși naturali. Fiecare reacție între SE-HL și VC1-His în microplacă a inclus 200 nM SE-HL și 20 μM compus natural. Semnalul de fluorescență a fost înregistrat la Eex/Eem: 480/520nm și rezultatul pentru fiecare compus testat a fost exprimat ca fracție din legarea SE-HL la VC1-His în absența oricărui compus (Fig. 13). Șase dintre compușii testați au arătat o inhibare $\geq 50\%$ a semnalului de fluorescență a SE-HL legat la VC1 în microplăci, în două experimente independente, ceea ce validează metoda ca fiind potrivită pentru testarea la scară largă de compuși potențial modulatori ai interacției între S100P și VC1.

Exemplul 10. Interacția SE-FL cu VC1 analizată *in vitro* prin TR-FRET

Interacția proteinei de fuziune SE-FL cu receptorul său VC1-His a fost investigată *in vitro* și într-un sistem omogen pe bază de transfer de energie prin rezonanță în fluorescență (fluorescence resonance energy transfer (FRET)). În cadrul metodei elaborate în acest brevet donatorul este chelatul de Tb care este legat covalent de anticorpi anti-His, iar acceptorul este EGFP din structura proteinei SE. Anticorpii marcați cu chelat de Tb sunt prezenți în amestecul de legare conținând SE și VC1-His și se leagă specific de secvența de 6xHis a VC1-His. În condițiile în care VC1-His complexat cu anticorpi anti-His se leagă de ligandul său SE, într-o orientare care

permite transferul de energie între cei doi fluorofori, se înregistrează un semnal FRET. Chelatul de Tb are un timp de emisie mai lung decât al altor fluorofori folosiți în experimente FRET obișnuite și de aceea semnalele de fluorescență ale Donorului și Acceptorului se pot măsura cu întârziere de sute de msec (time resolved (TR)-FRET), ceea ce permite înregistrarea semnalului specific interacției după stingerea eventualei fluorescențe date de componente perturbatoare din mediul de reacție.

Metoda de lucru constă în incubarea VC1-His (concentrație finală 50 nM) cu diverse concentrații de SE-FL (10-800 nM) în tamponul de legare optimizat (20 mM TrisHCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Tween-20, 0.1% BSA) la temperatura camerei, în microplăci de polistiren albe cu 96 de godeuri cu arie redusă și cu o suprafață care împiedică legarea moleculelor organice (Corning® 96 Well Half-Area Microplate, #3642) în volum total de 80 μl. După o oră de incubare s-au adăugat anticorpul anti-His marcați cu chelat de Tb, într-o concentrație finală de 2 nM. Întregul amestec a fost incubat în continuare 1-3 ore la temperatura camerei. Înregistrarea semnalului s-a făcut cu un cititor de microplăci FluoStar Omega (BMG Labtech) dotat cu un cap optic special pentru TRF, cu un filtru de excitație la 337 ± 30 nm și două filtre de emisie 530 ± 10 nm (pentru acceptor EGFP) și 490 ± 10 nm (pentru donor, chelat de Terbium). Setările folosite au fost: 100 μs timp de întârziere și 200 μs timp de înregistrare semnal. Controlul negativ a fost un amestec care conținea numai anticorpul marcați și acceptorul SE-FL în același tampon de reacție. Semnalul TR-FRET se calculează raportând fluorescența acceptorului la fluorescența donorului *10000 pentru fiecare godeu. Citirile s-au făcut în triplicat. Pentru calcularea factorului Z' s-a aplicat formula $1-3 \cdot (SD_S + SD_B) / (\mu_S - \mu_B)$, unde SD_S este deviația standard a probei, SD_B este deviația standard a controlului negativ, μ_S este media probei, iar μ_B este media controlului negativ. Factorul Z' reflectă calitatea metodei și indică dacă un test se poate aplica în experimente la scară largă (HTS). Un factor Z' între 0.5 și 1 indică faptul că o metodă este potrivită pentru HTS. S/B reprezintă raportul μ_S / μ_B. Toate experimentele au fost analizate cu Microsoft Excel. Afinitatea de legare s-a evaluat cu GraphPad Prism versiunea 6.0.

Măsurând semnalul TR-FRET pentru diferite concentrații de ligand SE-FL (Fig. 14) și calculând legarea specifică (semnal-control, S-B) s-a determinat tăria de legare a celor doi parteneri, datele conducând la un model de legare cu un situs de legare cu constanta de disociere 574.6 nM. Aceste valori sunt mai mici decât cele raportate pentru interacția V-RAGE cu S100P de ~ 6 μM (Penumutchu si colab. (2014), *PLoS One*, 8, e103947). Această creștere cu un ordin de

mărime a afinității s-ar putea datora atât diferențelor de conformație a S100P când este prezentă în proteina de fuziune vs S100P liberă, cât și diferențelor de pliere a domeniului V în cadrul VC1 față de forma sa liberă.

Pe de altă parte s-a constatat că testul TR-FRET cu SE-FL și VC1 este sensibil și robust cu un raport S/B ≥ 3.5 la concentrații de SE-FL mai mari sau egale cu 100 nM și valori Z' ≥ 0.5 pentru toate concentrațiile SE-FL testate (Fig.14). În plus, s-a determinat că semnalul TR-FRET înregistrat în condițiile descrise crește în timp până la 1 h și este stabil până la 3 h după adăugarea anticorpilor. Astfel, testul este stabil pe o perioadă suficient de lungă pentru a permite folosirea sa în experimente de analiză la scară largă.

Exemplul 11. Specificitatea de legare între SE-FL și VC1 prin metoda TR-FRET

Specificitatea testului pentru legarea SE-FL cu VC1 a fost determinată prin experimente de legare competitivă cu liganzi cunoscuți ai RAGE, S100P și S100B. Drept control negativ s-a folosit albumina serică bovină (BSA), o proteină care nu se leagă de RAGE. Astfel, interacția dintre VC1-His (50 nM) și SE-FL (200 nM) a fost analizată în prezență de concentrații crescătoare de S100B, S100P sau BSA (2-5000 nM). S-a observat că interacția SE-FL cu VC1 a fost inhibată de S100B, dar nu de BSA (Fig. 15). Concentrația de S100B care a redus interacția SE-FL cu VC1 la jumătate (IC_{50}) a fost calculată la 190 nM. Pe de altă parte, S100P nu a putut competiționa cu SE-FL pentru legarea acestuia la VC1 în domeniul de concentrații analizat, sugerând că SE-FL se leagă cu o afinitate mult mai mare de VC1 decât S100P.

Exemplul 12. Teste de indentificare de modulatori ai interacției SE-FL cu VC1 prin TR-FRET

Folosind proteinele recombinante SE-FL și VC1-His în testul TR-FRET descris în exemplul 10 am analizat capacitatea unor compuși naturali cu moleculă mică de a interfera cu legarea S100P de receptorul său RAGE. În amestecul de legare au fost incluse 50 nM VC1-His, 200 nM SE-FL, 2 nM Tb anti-His și diverși compuși în concentrație 20 μ M, în tamponul de legare în prezență de 2% DMSO. Din 137 de compuși testați, patru au redus semnalul FRET sub 50%, sugerând că au un efect inhibitor asupra formării complexului VC1-His/SE-FL (Fig. 16). Acest experiment validează testul TR-FRET propus și constructul SE-FL obținut pentru folosirea lor în experimente la scară largă cu scopul identificării de inhibitori ai interacției S100P cu partenerii săi implicați în oncogeneză.

Bibliografie

- Arumugam, T., V. Ramachandran, S.B. Gomez, A.M. Schmidt, and C.D. Logsdon. 2012. S100P-derived RAGE antagonistic peptide reduces tumor growth and metastasis. *Clin Cancer Res.* 18:4356-4364.
- Arumugam, T., V. Ramachandran, and C.D. Logsdon. 2006. Effect of cromolyn on S100P interactions with RAGE and pancreatic cancer growth and invasion in mouse models. *J Natl Cancer Inst.* 98:1806-1818.
- Arumugam, T., V. Ramachandran, D. Sun, Z. Peng, A. Pal, D.S. Maxwell, W.G. Bornmann, and C.D. Logsdon. 2013. Designing and developing S100P inhibitor 5-methyl cromolyn for pancreatic cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 12:654-662.
- Arumugam, T., D.M. Simeone, A.M. Schmidt, and C.D. Logsdon. 2004. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *J Biol Chem.* 279:5059-5065.
- Arumugam, T., D.M. Simeone, K. Van Golen, and C.D. Logsdon. 2005. S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion. *Clin Cancer Res.* 11:5356-5364.
- Austermann, J., A.R. Nazmi, A. Heil, G. Fritz, M. Kolinski, S. Filipek, and V. Gerke. 2009. Generation and characterization of a novel, permanently active S100P mutant. *Biochim Biophys Acta.* 1793:1078-1085.
- Austermann, J., A.R. Nazmi, C. Muller-Tidow, and V. Gerke. 2008. Characterization of the Ca²⁺-regulated ezrin-S100P interaction and its role in tumor cell migration. *J Biol Chem.* 283:29331-29340.
- Basu, G.D., D.O. Azorsa, J.A. Kiefer, A.M. Rojas, S. Tuzmen, M.T. Barrett, J.M. Trent, O. Kallioniemi, and S. Mousses. 2008. Functional evidence implicating S100P in prostate cancer progression. *Int J Cancer.* 123:330-339.
- Becker, T., V. Gerke, E. Kube, and K. Weber. 1992. S100P, a novel Ca(2+)-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties. *Eur J Biochem.* 207:541-547.
- Dakhel, S., L. Padilla, J. Adan, M. Masa, J.M. Martinez, L. Roque, T. Coll, R. Hervas, C. Calvis, R. Messeguer, F. Mitjans, and J.L. Hernandez. 2014. S100P antibody-mediated therapy as a new promising strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Oncogenesis.* 3:e92.
- Dong, L., F. Wang, X. Yin, L. Chen, G. Li, F. Lin, W. Ni, J. Wu, R. Jin, and L. Jiang. 2014. Overexpression of S100P promotes colorectal cancer metastasis and decreases chemosensitivity to 5-FU in vitro. *Mol Cell Biochem.* 389:257-264.
- Downen, S.E., T. Crnogorac-Jurcevic, R. Gangeswaran, M. Hansen, J.J. Eloranta, V. Bhakta, T.A. Brentnall, J. Luttes, G. Kloppel, and N.R. Lemoine. 2005. Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer. *Am J Pathol.* 166:81-92.
- Du, M., G. Wang, T.M. Ismail, S. Gross, D.G. Fernig, R. Barraclough, and P.S. Rudland. 2012. S100P dissociates myosin IIA filaments and focal adhesion sites to reduce cell adhesion and enhance cell migration. *J Biol Chem.* 287:15330-15344.
- Filipek, A., B. Jastrzebska, M. Nowotny, and J. Kuznicki. 2002. CacyBP/SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem.* 277:28848-28852.
- Fuentes, M.K., S.S. Nigavekar, T. Arumugam, C.D. Logsdon, A.M. Schmidt, J.C. Park, and E.H. Huang. 2007. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Dis Colon Rectum.* 50:1230-1240.

- Guo, L., S. Chen, H. Jiang, J. Huang, W. Jin, and S. Yao. 2014. The expression of S100P increases and promotes cellular proliferation by increasing nuclear translocation of beta-catenin in endometrial cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 7:2102-2112.
- Heil, A., A.R. Nazmi, M. Koltzsch, M. Poeter, J. Austermann, N. Assard, J. Baudier, K. Kaibuchi, and V. Gerke. 2011. S100P is a novel interaction partner and regulator of IQGAP1. *J Biol Chem.* 286:7227-7238.
- Hsu, Y.L., J.Y. Hung, Y.Y. Liang, Y.S. Lin, M.J. Tsai, S.H. Chou, C.Y. Lu, and P.L. Kuo. 2015. S100P interacts with integrin alpha7 and increases cancer cell migration and invasion in lung cancer. *Oncotarget.* 6:29585-29598.
- Jiang, H., H. Hu, F. Lin, Y.P. Lim, Y. Hua, X. Tong, and S. Zhang. 2016. S100P is Overexpressed in Squamous Cell and Adenosquamous Carcinoma Subtypes of Endometrial Cancer and Promotes Cancer Cell Proliferation and Invasion. *Cancer Invest.* 34:477-488.
- Jiang, L., Y.K. Lai, J. Zhang, H. Wang, M.C. Lin, M.L. He, and H.F. Kung. 2011. Targeting S100P inhibits colon cancer growth and metastasis by Lentivirus-mediated RNA interference and proteomic analysis. *Mol Med.* 17:709-716.
- Kang, R., T. Loux, D. Tang, N.E. Schapiro, P. Vernon, K.M. Livesey, A. Krasinskas, M.T. Lotze, and H.J. Zeh, 3rd. 2012. The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:7031-7036.
- Kikuchi, K., K.M. McNamara, Y. Miki, E. Iwabuchi, A. Kanai, M. Miyashita, T. Ishida, and H. Sasano. 2018. S100P and Ezrin promote trans-endothelial migration of triple negative breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr).*
- Kim, J.K., K.H. Jung, J.H. Noh, J.W. Eun, H.J. Bae, H.J. Xie, Y.M. Ahn, J.C. Ryu, W.S. Park, J.Y. Lee, and S.W. Nam. 2009. Targeted disruption of S100P suppresses tumor cell growth by down-regulation of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 35:1257-1264.
- Koltzsch, M., C. Neumann, S. Konig, and V. Gerke. 2003. Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P. *Mol Biol Cell.* 14:2372-2384.
- Mercado-Pimentel, M.E., B.C. Onyeagucha, Q. Li, A.C. Pimentel, J. Jandova, and M.A. Nelson. 2015. The S100P/RAGE signaling pathway regulates expression of microRNA-21 in colon cancer cells. *FEBS Lett.* 589:2388-2393.
- Mousses, S., L. Bubendorf, U. Wagner, G. Hostetter, J. Kononen, R. Cornelison, N. Goldberger, A.G. Elkahloun, N. Willi, P. Koivisto, W. Ferhle, M. Raffeld, G. Sauter, and O.P. Kallioniemi. 2002. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Res.* 62:1256-1260.
- Nasser, M.W., D.K. Ahirwar, and R.K. Ganju. 2016. RAGE: A novel target for breast cancer growth and metastasis. *Oncoscience.* 3:52-53.
- Onyeagucha, B.C., M.E. Mercado-Pimentel, J. Hutchison, E.K. Flemington, and M.A. Nelson. 2013. S100P/RAGE signaling regulates microRNA-155 expression via AP-1 activation in colon cancer. *Exp Cell Res.* 319:2081-2090.
- Penumutchu, S.R., R.H. Chou, and C. Yu. 2014. Structural insights into calcium-bound S100P and the V domain of the RAGE complex. *PLoS One.* 9:e103947.
- Shen, Z., H. Deng, Y. Fang, X. Zhu, G.T. Ye, L. Yan, H. Liu, and G. Li. 2015. Identification of the interplay between SOX9 and S100P in the metastasis and invasion of colon carcinoma. *Oncotarget.* 6:20672-20684.

- Tabrizi, M.E.A., T.L. Lancaster, T.M. Ismail, A. Georgiadou, A. Ganguly, J.J. Mistry, K. Wang, P.S. Rudland, S. Ahmad, and S.R. Gross. 2018. S100P enhances the motility and invasion of human trophoblast cell lines. *Sci Rep.* 8:11488.
- Wang, G., A. Platt-Higgins, J. Carroll, S. de Silva Rudland, J. Winstanley, R. Barraclough, and P.S. Rudland. 2006. Induction of metastasis by S100P in a rat mammary model and its association with poor survival of breast cancer patients. *Cancer Res.* 66:1199-1207.
- Whiteman, H.J., M.E. Weeks, S.E. Downen, S. Barry, J.F. Timms, N.R. Lemoine, and T. Crnogorac-Jurcevic. 2007. The role of S100P in the invasion of pancreatic cancer cells is mediated through cytoskeletal changes and regulation of cathepsin D. *Cancer Res.* 67:8633-8642.
- Zhang, D., C. Ma, X. Sun, H. Xia, and W. Zhang. 2012. S100P expression in response to sex steroids during the implantation window in human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 10:106.
- Zhu, L., T. Ito, T. Nakahara, K. Nagae, Y. Fuyuno, M. Nakao, M. Akahoshi, R. Nakagawa, Y. Tu, H. Uchi, and M. Furue. 2013. Upregulation of S100P, receptor for advanced glycation end products and ezrin in malignant melanoma. *J Dermatol.* 40:973-979.
- Zuo, Z., P. Zhang, F. Lin, W. Shang, R. Bi, F. Lu, J. Wu, and L. Jiang. 2018. Interplay between Trx-1 and S100P promotes colorectal cancer cell epithelial-mesenchymal transition by up-regulating S100A4 through AKT activation. *J Cell Mol Med.* 22:2430-2441.

PROTEINE DE FUZIUNE FLUORESCENTE ALE S100P**Revendicări**

1. Proteine de fuziune caracterizate prin faptul că au la capătul N-terminal secvența proteinei S100P și la capătul C-terminal secvența EGFP unite prin diferiți linkeri
2. Proteine de fuziune fluorescente caracterizate prin spectre de absorbție și fluorescență similare proteinei EGFP
3. Proteine de fuziune S100P-EGFP caracterizate prin faptul că se pot lega de receptorul pentru produși de glicare avansată (RAGE) adsorbit în microplăci.
4. O proteină de fuziune S100P-EGFP capabilă să interacționeze cu receptorul pentru produși de glicare avansată într-un test pe bază de transfer de energie prin rezonanță în fluorescență (time resolved-fluorescence resonance energy transfer).
5. Proteine de fuziune cu S100P conform revendicarilor 1-4 care pot fi aplicate în teste *in vitro* la scară largă pentru identificarea de compuși care blochează interacția S100P cu o formă solubilă a RAGE.

PROTEINE DE FUZIUNE FLUORESCENTE ALE S100P

Desene

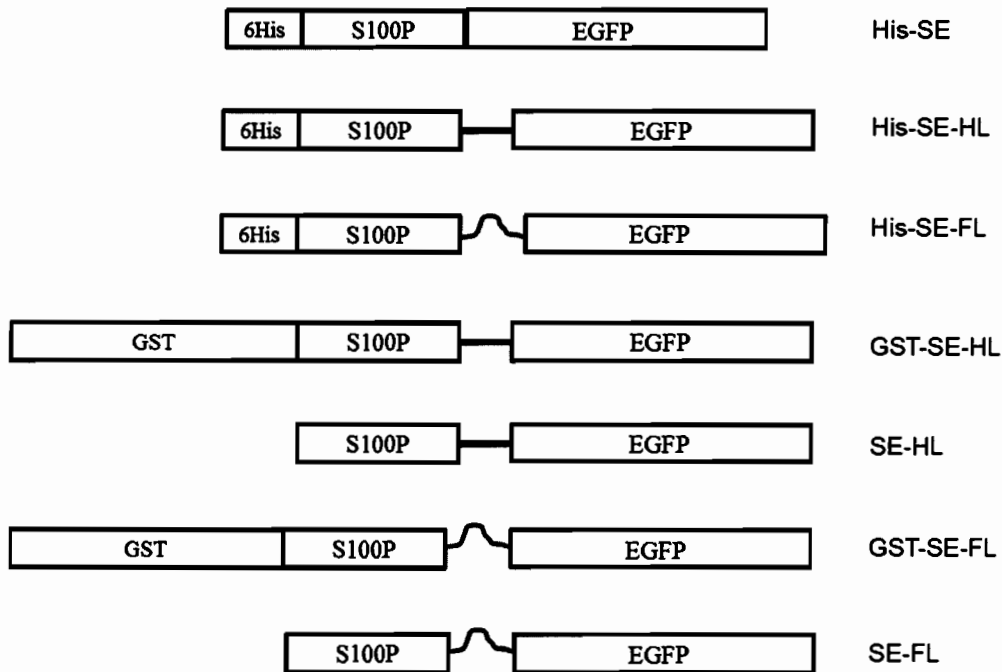


Fig.1a

S100P umană

>NP_005971.1 protein S100-P [Homo sapiens]

MTELETAMGMIIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQSGKDKDAVDKLLK
 DLDANGDAQVDFSEFIVFVAITSACHKYFEKAGLK

>AAB08058.1 Enhanced Green Fluorescent Protein [Cloning vector pEGFP-C2]

MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWP
 TLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEF
 DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV
 QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE
 LYK

Fig. 1b

XmaI-S100P-2: AAACCCGGGATGACGGAAGTAGAGACAGCCATGG
Sall-S100P-Rev: GGGGTCGACTTTGAGTCCTGCCTTCTCAAAGTAC
Sall-EGFP: AAAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
BamHI-EGFP: AAAGGATCCTCACTTGTACAGCTCGTCCATG
A207K_HindIII_For: CACCCAGTCCAAGCTTAGCAAAGACCC
EGFP_A207K_R: CTCAGGTAGTGGTTGTCG
Helical_NcoI_For: GAAGCGGCGGCGAAAGCCATGGTGAGCAAGGGCGAG
Helical linker_R: TTTCGCCGCCGCTTCCGCGTCGACTTTGAGTCCTGCC
Flexible linker_F: CCGAGCGAAGGCAAAGGCATGGTGAGCAAGGGCGAG
Rigid linker_BamHI_Rev: TTTGCCGCTGGTGGATCCGTCGACTTTGAGTCCTGCC

Fig. 2

His-S100P-EGFP

MSHHHHHHSMDIEENLYFQGPGMTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKV
 LMEKELPGFLQSGKDKDAVDKLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEK
 AGLKVD MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGK
 LPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRA
 EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRH
 NIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAG
 ITLGMDELYK

His-S100P-EGFP-HL

MSHHHHHHSMDIEENLYFQGPGMTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKV
 LMEKELPGFLQSGKDKDAVDKLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEK
 AGLKVD AEA AAKEAAKAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY G
 KLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFF
 KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQK
 NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH
 MVLLEFVTAAGITLGMDELYK

His-S100P-EGFP-FL

MSHHHHHHSMDIEENLYFQGPGMTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKV
 LMEKELPGFLQSGKDKDAVDKLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEK
 AGLKVDGSTSGKPSEGKGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT
 YGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
 IFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADK
 QKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKR
 DHMVLLFVTAAGITLGMDELYK

GST-S100P-EGFP-HL

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYI
 DGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLK
 VDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKL
 VCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVL FQGPLGSPGIPG
MTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQSGKDKDAVD
KLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEKAGLKVDAEAAAKEAAKAMVS
 KGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLV T
 LT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV
 NRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
 HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKR DHMVLLFVTAAGITLGMDELYK

S100P-EGFP –HL (după tăierea cu Precision a GST-SE-HL)

GPLGSPGIPGMTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQSG
GKDKDAVDKLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEKAGLKVDAEAAAKE
AAKAMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLP
 VPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEV
 KFEGDTLVNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE
 DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKR DHMVLLFVTAAGITL
 GMDELYK

GST-S100P-EGFP-FL

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYI
 DGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLK
 VDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKL
 VCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVL FQGPLGSPGIPG
MTELETAMGMIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQSGKDKDAVD
KLLKDL DANGDAQVDFSEFIVFVA AITSACHKYFEKAGLKVDGSTSGKPSEGKGMVS
 KGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLV T
 LT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV

NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYSNHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD
HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

S100P-EGFP-FL (după tăierea cu Precision a GST-SE-FL)

GPLGSPGIPGMTELETAMGMIIDVFSRYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQS
GKDKDAVDKLLKDLDANGDAQVDFSEFIVFVAAITSA**CHKYFEKAGLK**VDG**STSGKP**
SEGKGMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT**LKFI**CTTGKLP
VPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA**EV**
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYSNHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE
DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITL
GMDELYK

Fig. 3

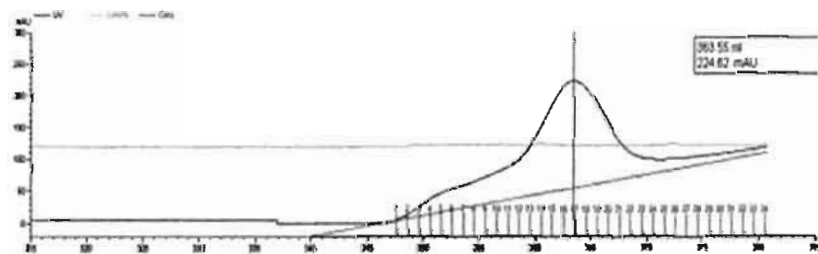


Fig. 4a

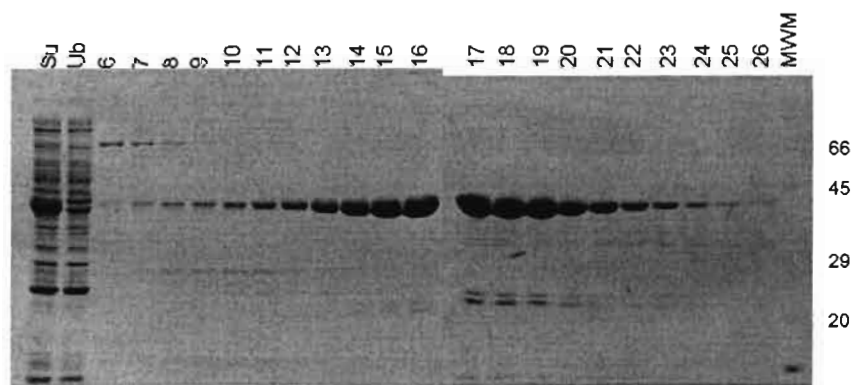


Fig. 4b

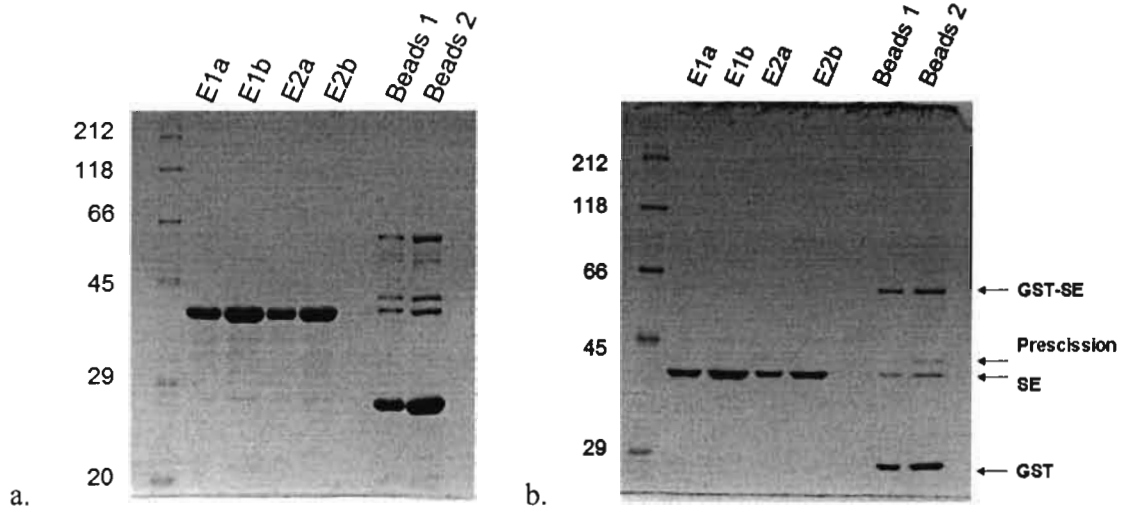
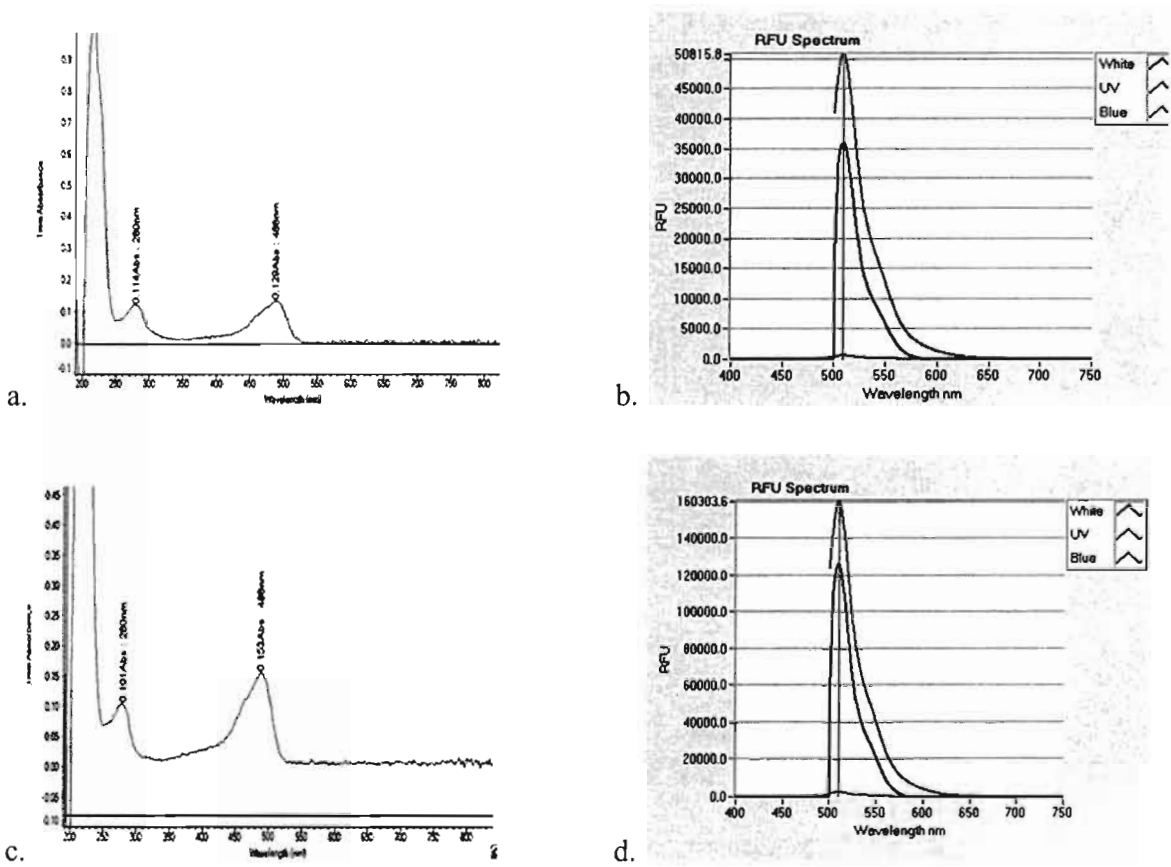


Fig. 5



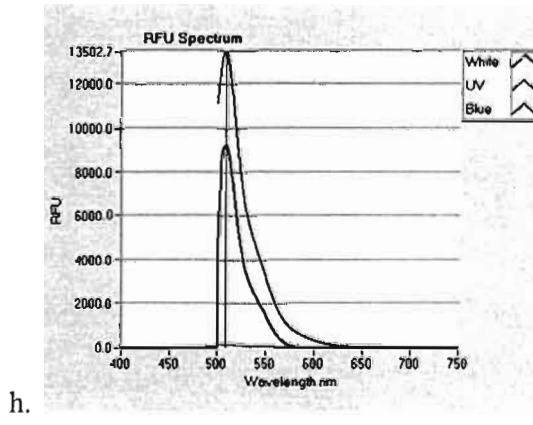
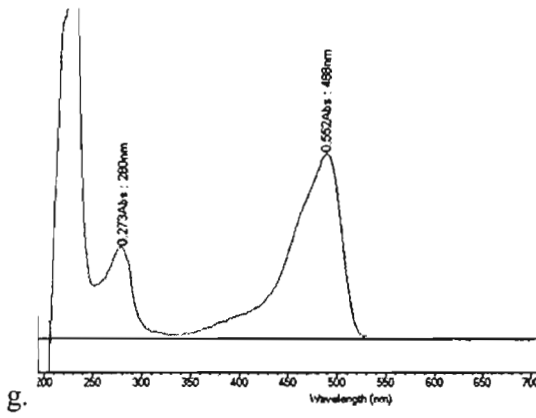
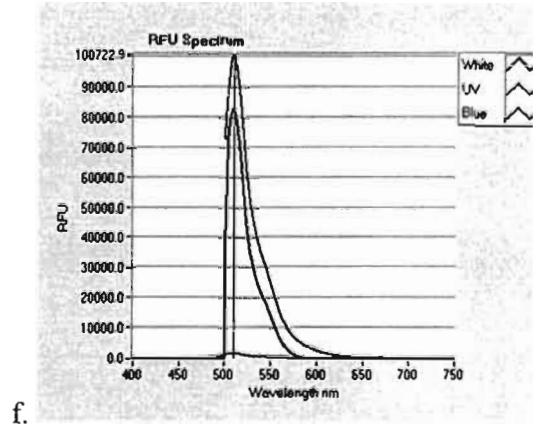
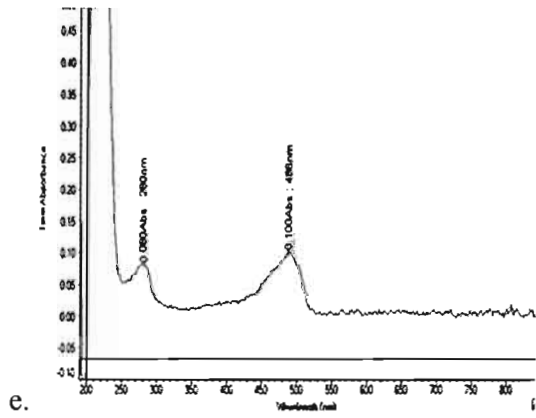


Fig. 6

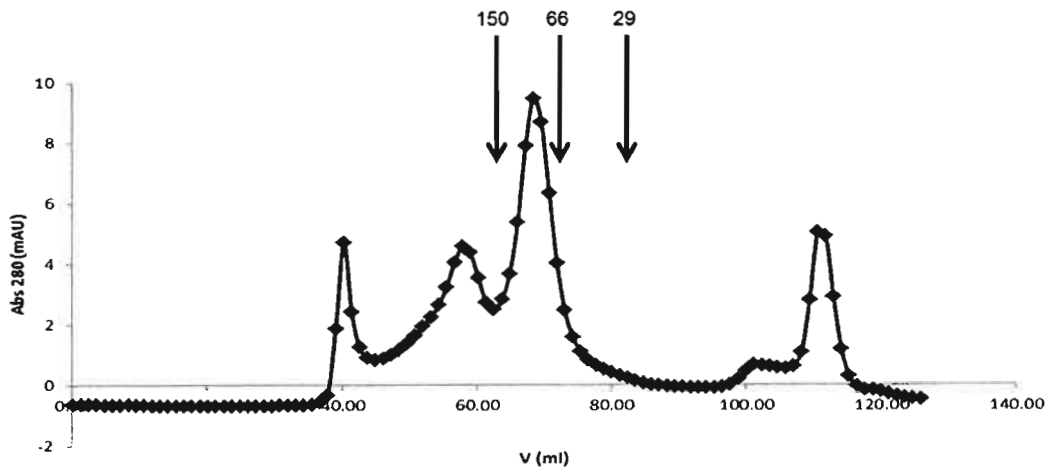


Fig. 7a

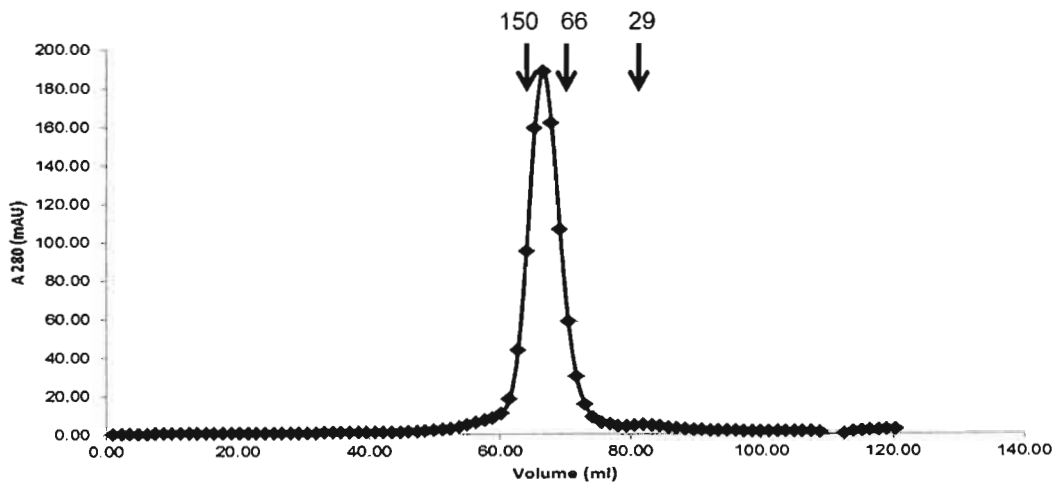


Fig. 7b

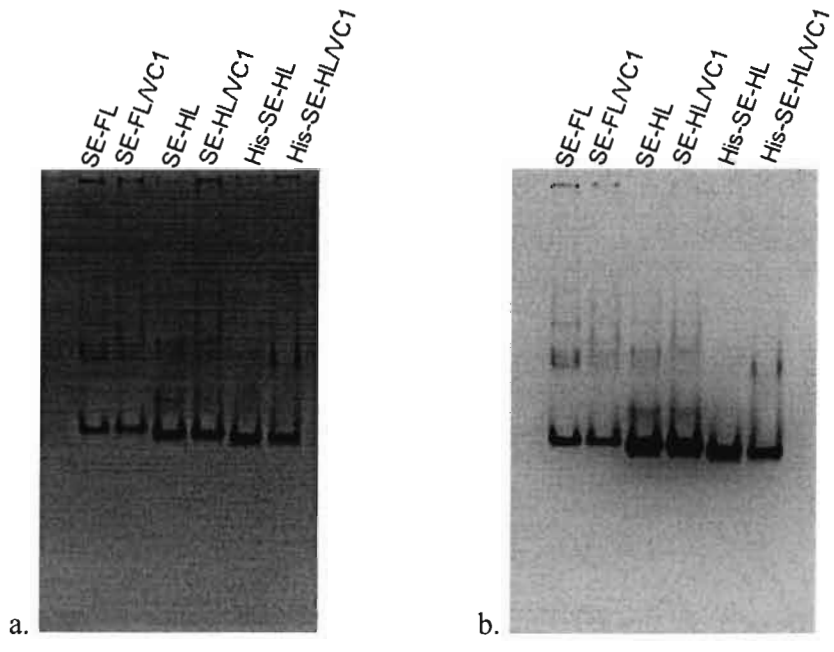


Fig. 8

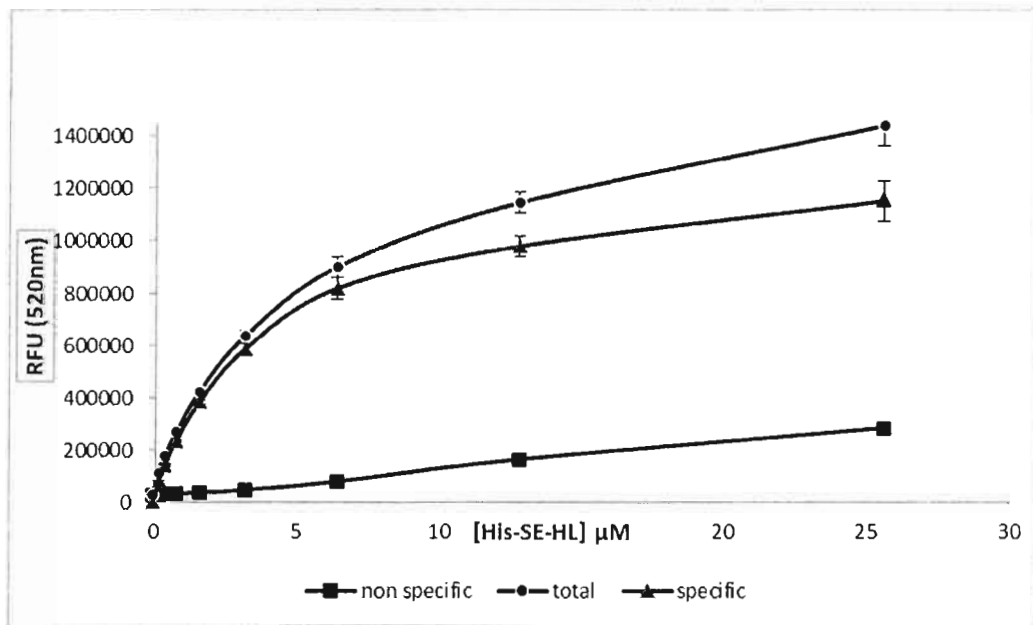


Fig. 9

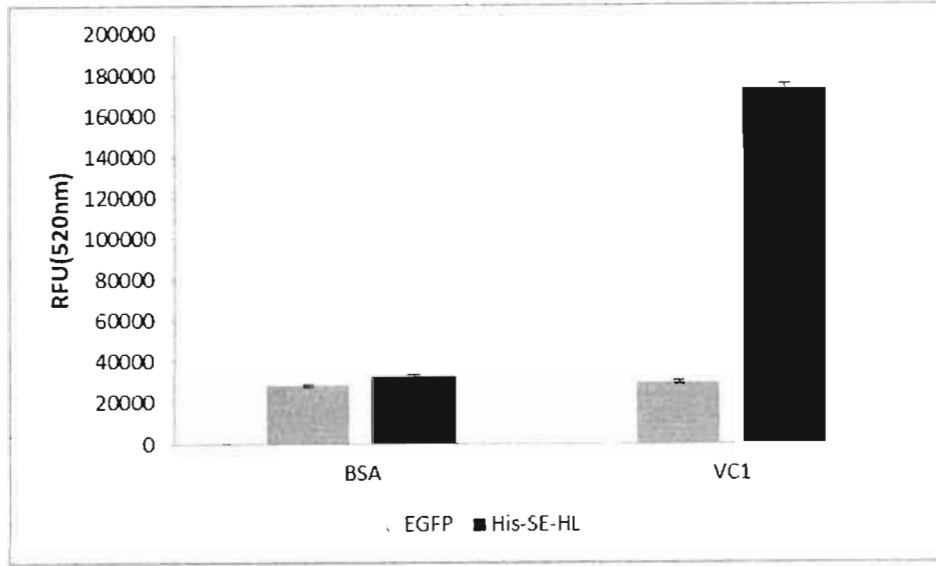


Fig. 10

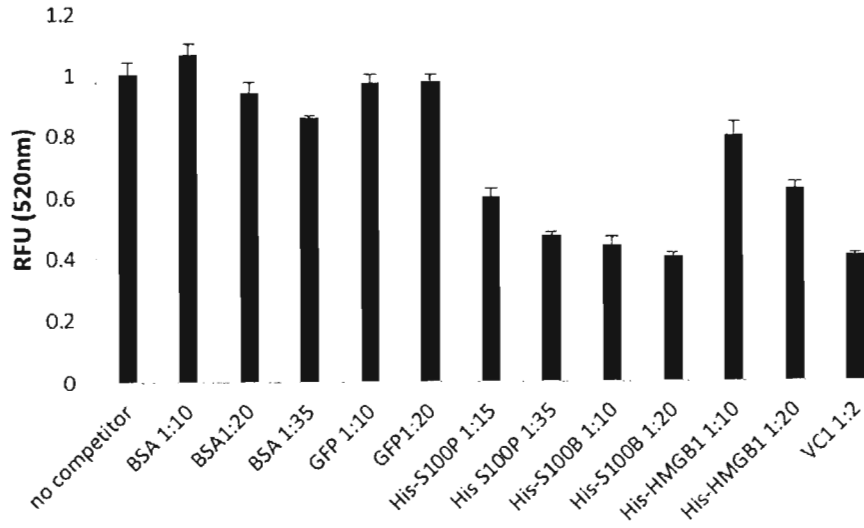


Fig. 11

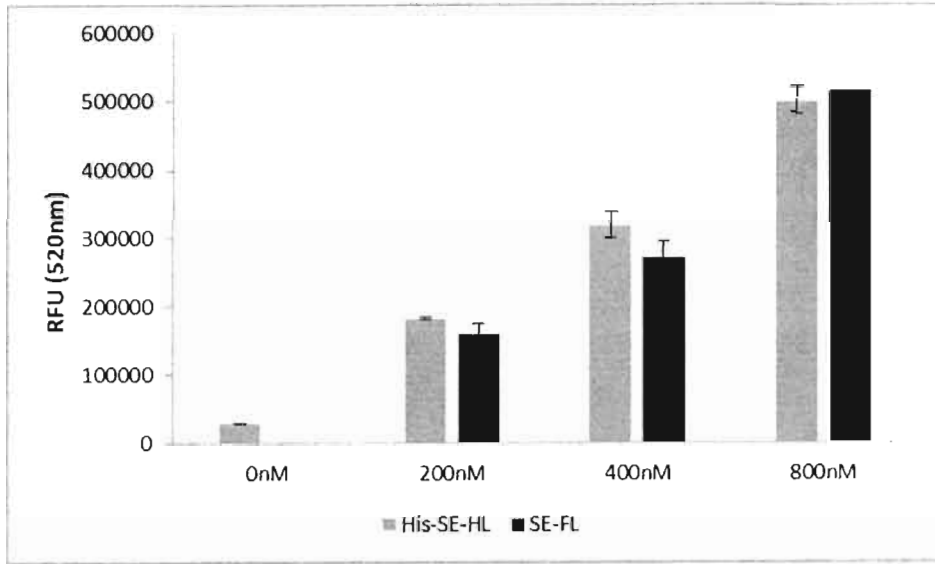


Fig. 12a

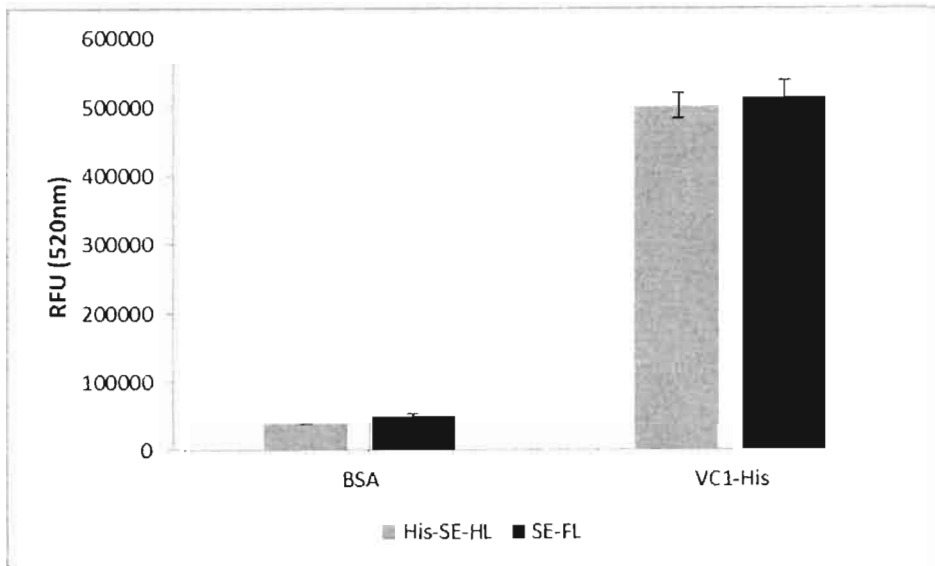


Fig. 12b

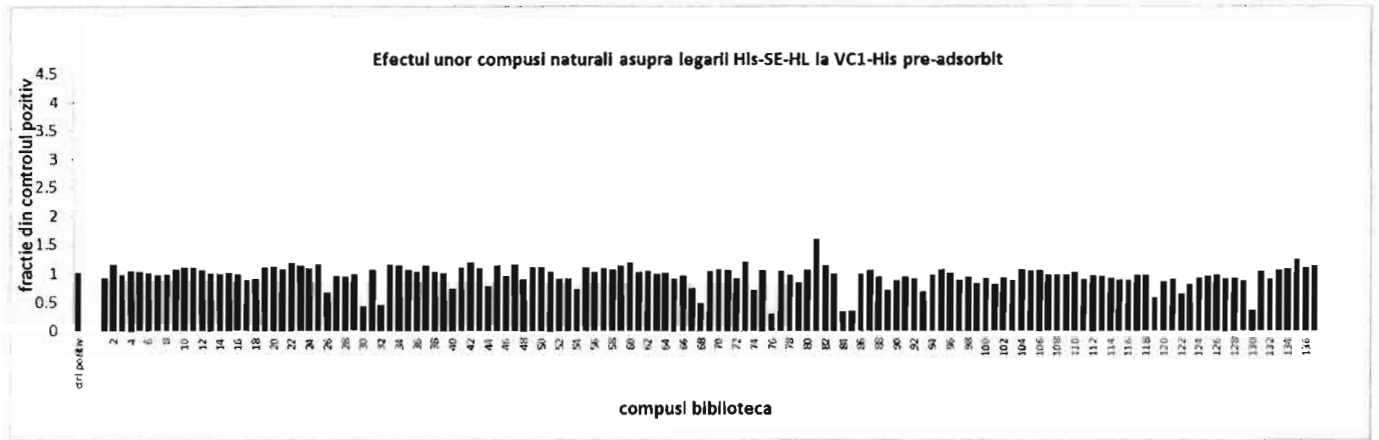


Fig.13

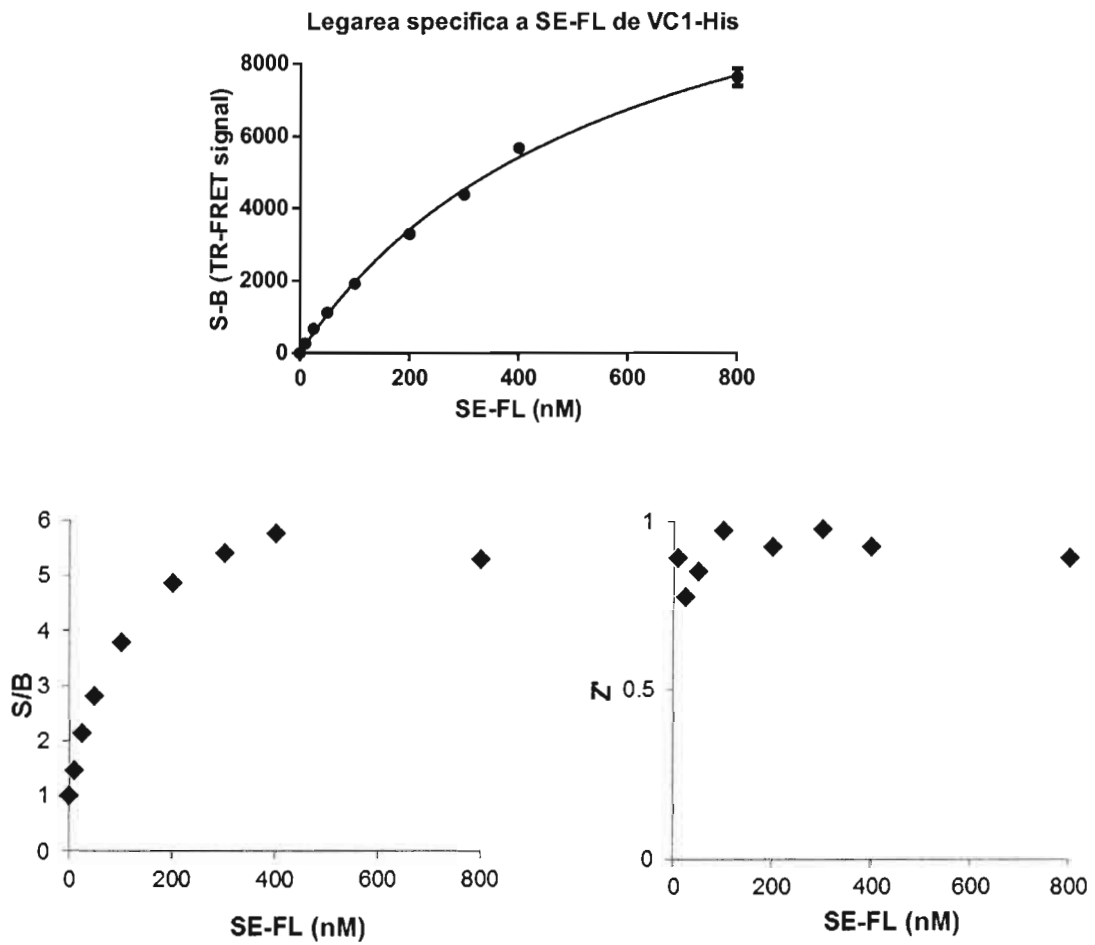


Fig. 14

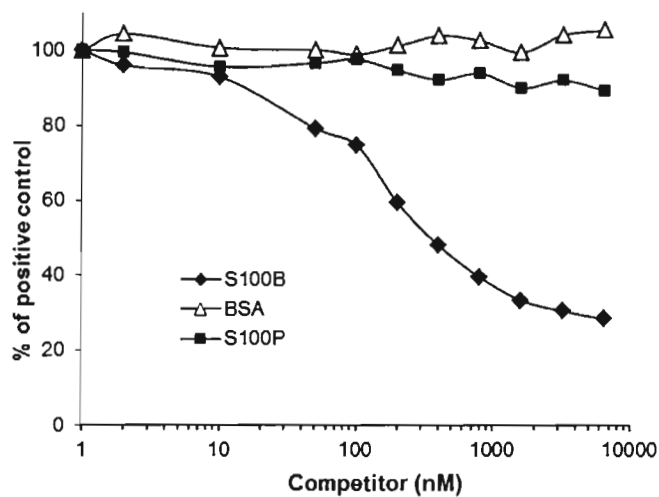


Fig. 15

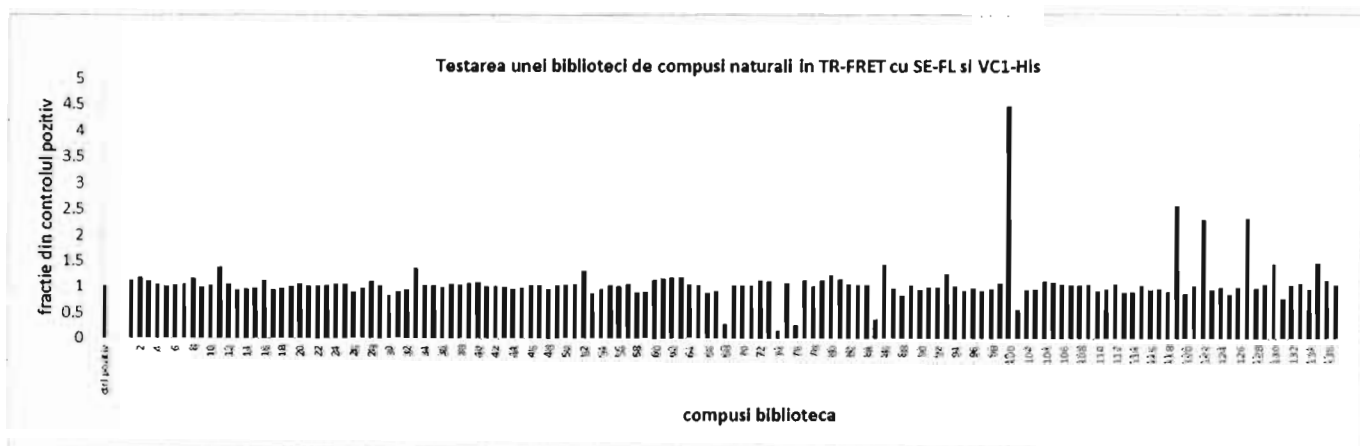


Fig. 16