

## Using NanoBRET® PPI to better understand multiple myeloma pathogenesis.

---

BARTHÉLEMY J<sup>1,2</sup>, SÉITÉ P<sup>1</sup> and JAHNKE VE<sup>2</sup>

1. CoMeT laboratory, UR 24334, Faculty of Fundamental and Applied Sciences, University of Poitiers, Poitiers, France

2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Eurofins, Discovery, Eurofins Cerep, Celle-Lévescault, France

The objective of my thesis project is to study the role of a newly discovered TrkC/Sortilin/Connexin 43 complex in the medullar microenvironment during multiple myeloma progression. The aim of the project is to identify a potential therapeutic inhibitor to cure this pathology.

The first part of the project was to establish an *in vitro* model to assess protein-protein interactions. To do so, the NanoBRET® PPI Starter Systems kit (Promega®) was selected and vectors expressing the tagged proteins were designed. For each protein of interest, I designed 2 vectors with the HaloTag® at the N-terminal or C-terminal position, and 2 vectors with the NanoLuc® at the N-terminal or C-terminal position. The NanoBRET® PPI Control Pair (Promega®), in presence or absence of Nutlin-3, was used as respectively positive and negative interaction control. HEK293-H cells were co-transfected with the two tagged vectors using the FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega®). Following the instructions of the NanoBRET™ Protein Interaction System technical manual, the amounts of luminescence and fluorescence were measured using a Multilabel Plate Reader (EnVision™, Revvity) before the BRET ratio was calculated. All the possible combinations of vectors were first tested in order to select the best 2 pairs for each interaction for further experiments. Homodimeric (TrkC - TrkC, Sortilin - Sortilin, Connexin 43 - Connexin 43) and heterodimeric TrkC - Sortilin complexes were found as expected according to the literature. Even if no direct interaction was described for the other pairs, our data show the existence of a direct interaction between TrkC and Connexin 43. Once validated, the *in vitro* model will next be used to screen molecules able to disrupt or inhibit the complex.

The second part of the project was to visualize the localization of the complex at the cellular level. At this time, there is no imaging device available to visualize luminescence. To overcome this limitation, I combined two technologies: small animal imaging and confocal microscopy. I thus conducted the BRET tests as described previously but in 24-well plates. The cells were seeded on each well on a coated glass coverslip. After 72h, the luminescence and fluorescence were measured using the IVIS Lumina III *in vivo* imaging system (Revvity). The image resolution of the IVIS does not allow the observation of individual cells, therefore, after the BRET reaction, the cells were fixed, immunolabeled using the Anti-HaloTag® and Anti-NanoLuc® (Promega®) and observed by confocal microscopy. The initial results valid the use of the IVIS Lumina III for the measurement of bioluminescence and fluorescence with NanoBRET® Nano-Glo® Detection Systems (Promega®) and can be interestingly coupled with confocal microscopy to precise the cellular localization of the associated proteins.

# Utilisation du NanoBRET® PPI pour mieux comprendre la pathogenèse du myélome multiple.

---

**BARTHÉLEMY J<sup>1,2</sup>, SÉITÉ P<sup>1</sup> and JAHNKE VE<sup>2</sup>**

1. Laboratoire CoMeT, UR 24334, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Université de Poitiers, Poitiers, France
2. Département de biochimie et biologie moléculaire, Eurofins, Discovery, Eurofins Cerep, Celle-Lévescault, France

L'objectif de mon projet de thèse est d'étudier le rôle d'un nouveau complexe TrkC/Sortiline/Connexine 43 dans le microenvironnement médullaire au cours de la progression du myélome multiple. Le but du projet est d'identifier un potentiel inhibiteur thérapeutique pour guérir cette pathologie.

La première partie du projet a consisté à établir un modèle *in vitro* pour évaluer les interactions protéine-protéine. Pour ce faire, j'ai utilisé le kit NanoBRET® PPI Starter Systems (Promega®) pour concevoir des vecteurs exprimant les protéines d'intérêts marquées. Pour chaque protéine, j'ai conçu 2 vecteurs avec le HaloTag® en position N-terminale ou C-terminale, et 2 vecteurs avec le NanoLuc® en position N-terminale ou C-terminale. J'ai également utilisé le NanoBRET® PPI Control Pair (p53 – MDM2) (Promega®), en présence ou en absence de Nutlin-3, comme contrôle d'interaction positif et négatif. Les cellules HEK293-H ont été co-transfectées avec les deux vecteurs marqués en utilisant le réactif de transfection FuGENE® HD (Promega®). En suivant les recommandations de Promega®, les quantités de luminescence et de fluorescence ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de plaques (EnVision™, Revvity) puis j'ai calculé le ratio BRET. Toutes les combinaisons possibles de vecteurs ont d'abord été testées afin de sélectionner les 2 meilleures paires pour chaque interaction pour des expériences ultérieures. J'ai montré la formation de complexes homodimériques (TrkC - TrkC, Sortiline - Sortiline, Connexine 43 - Connexine 43) et hétérodimériques TrkC - Sortiline comme prévu selon la littérature. Même si aucune interaction directe n'a été décrite pour les autres paires, nos données montrent l'existence d'une interaction directe entre TrkC et la Connexine 43. Une fois validé, le modèle *in vitro* sera ensuite utilisé pour cribler des molécules capables de perturber ou d'inhiber le complexe.

La deuxième partie du projet consistait à visualiser la localisation du complexe au niveau cellulaire. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'appareil d'imagerie permettant de visualiser la luminescence. Pour surmonter cette limite, j'ai combiné deux technologies : l'imagerie du petit animal et la microscopie confocale. J'ai ainsi réalisé les tests BRET comme décrit précédemment, mais dans des plaques de 24 puits. Les cellules ont été ensemencées dans chaque puits sur une lamelle de verre. Après 72h, la luminescence et la fluorescence ont été mesurées à l'aide du système d'imagerie *in vivo* IVIS Lumina III (Revvity). La résolution d'image de l'IVIS ne permet pas l'observation de cellules individuelles, par conséquent, après la réaction BRET, les cellules ont été fixées puis immunomarquées à l'aide de l'Anti-HaloTag® et de l'Anti-NanoLuc® (Promega®) et observées par microscopie confocale. Les premiers résultats valident l'utilisation de l'IVIS Lumina III pour la mesure de la bioluminescence et de la fluorescence avec les systèmes de détection NanoBRET® Nano-Glo® (Promega®) et peut être couplés de manière intéressante à la microscopie confocale pour préciser la localisation cellulaire des protéines associées.