

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine membranaire 45A (TMEM45A) dans les cancers du sein triple-négatifs

Dal Maso, Thomas

Award date:
2019

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉ
DES SCIENCES

Caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine membranaire 45A (TMEM45A) dans les cancers du sein triple-négatifs

Dissertation présentée par

Thomas Dal Maso

en vue de l'obtention du grade

de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Yvan De Launoit (Université de Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille)

Prof. Erik Goormaghtigh (Université Libre de Bruxelles)

Dr. Catherine Michaux (Université de Namur, présidente)

Dr. Benjamin Le Calvé (Université de Namur)

Prof. Carine Michiels (Université de Namur)

Prof. Johan Wouters (Université de Namur, promoteur)

2019

Graphisme de couverture : © Presses universitaires de Namur

© Presses universitaires de Namur & Thomas Dal Maso
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre, hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner, est strictement interdite
pour tous pays.

Imprimé en Belgique
ISBN : 978-2-39029-075-9
Dépôt légal: D/2019/1881/26

**Caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine membranaire 45A
(TMEM45A) dans les cancers du sein triple-négatifs**

Par Thomas Dal Maso

Résumé

Le cancer est la seconde cause de mortalité dans le monde. Malgré les récentes avancées dans les domaines des nouvelles thérapies, de nombreux malades meurent encore. Une meilleure compréhension de l'apparition, du développement et du pronostic de cette maladie est donc nécessaire pour obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques chez le patient. C'est dans ce contexte que la protéine transmembranaire TMEM45A a été étudiée pour la première fois. L'équipe du Professeur Carine Michiels l'a étudiée pour son implication dans la résistance à la mort cellulaire des cellules cancéreuses à la chimiothérapie en hypoxie. A côté de ce premier rôle, l'invalidation de l'expression de TMEM45A impacte la prolifération et la migration *in vitro* de cellules provenant d'un cancer ovarien et d'un gliome. Dans ce travail, cette protéine a été étudiée dans le cadre des cancers triple-négatifs du sein. Au vu de la caractérisation insuffisante de cette protéine et du manque d'informations structurales et fonctionnelles concernant la protéine TMEM45A, une stratégie en plusieurs étapes a été établie.

La première partie de ce travail a été consacrée à la caractérisation structurale de la protéine TMEM45A. Des informations sur la structure ont été obtenues grâce au criblage de conditions d'induction pour la production de TMEM45A par des bactéries, à la modélisation par homologie et à une stratégie visant à déterminer la topologie. Malgré des limitations techniques, des éléments de structures secondaires ont été mis en évidence.

La seconde partie de ce travail porte sur le phénotype associé à la déplétion de la protéine TMEM45A dans des lignées provenant de cancers triple-négatifs du sein. L'invalidation de l'expression de TMEM45A a été réalisée en utilisant la technologie d'ARN interférant. L'invalidation de TMEM45A a inhibé la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231, MDA-MB-453 et Hs 578T. Puisque la fonction et le mécanisme d'action de cette protéine étaient encore inconnus, nous avons étudié ses partenaires par le biais d'approches de co-immunoprécipitation et de spectrométrie de masse. Cette étude a montré que TMEM45A régulait le système ubiquitine-protéasome en contrôlant le niveau d'expression d'un régulateur de ce système, CAND1. En conséquence, l'abondance d'une protéine suppresseur de tumeur est modifiée, ce qui impacte directement les capacités migratrices des cellules.

Ce travail a donc permis de découvrir une nouvelle voie régulée par TMEM45A qui pourrait expliquer comment cette protéine module l'agressivité des cellules cancéreuses.

**Structural and functional characterization of the transmembrane protein 45A
(TMEM45A) in triple negative breast cancers**

By Thomas Dal Maso

Abstract

Cancer is the second cause of death over the world. Despite recent advances in new therapies, too many cancer patients still die. A better knowledge of the emergence, development and outcome of this disease is thus required for a better patient outcome. TMEM45A protein was studied for the first time by the team of Professor Carine Michiels in the context of drug resistance to chemotherapeutic agents in hypoxia. Besides this first role, TMEM45A invalidation was shown to affect cell proliferation and migration of ovarian cancer and glioma cells *in vitro*. This work focus on the study of TMEM45A in triple-negative breast cancer. In order to gain insights into the structure and the functions of TMEM45A, a strategy based on several steps was established.

The first part of this work was dedicated to the structural characterization of the protein TMEM45A. Structural evidence was obtained thanks to the screening of induction conditions for TMEM45A production by bacteria, homology modelling and the topology-based strategy. Despite technical limitations, secondary structure elements have been highlighted.

The second part focuses on TMEM45A invalidation-associated phenotype in cell lines derived from triple-negative breast cancer. TMEM45A depletion was performed using shRNA technology. TMEM45A knockdown inhibited cell growth and cell migration in MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cells. Since the function and the mechanism of action of this protein as well as cellular pathways triggered by TMEM45A were still unknown, we investigated its partners through co-immunoprecipitation and mass spectrometry approaches. This study evidenced that TMEM45A regulated the ubiquitin-proteasome system by controlling the protein expression level of one regulator of this system, CAND1. In consequence, the protein abundance of a tumor suppressor protein was modified, which directly impacts the cell migratory capacities.

This work thus unraveled a new pathway regulated by TMEM45A that may explain how this protein modulates cancer cell aggressiveness.

Au terme de cette thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pu participer, de près ou de loin, à l'élaboration, au développement et à l'écriture de ce travail.

Tout d'abord, je remercie mon promoteur, le Professeur Johan Wouters, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi que pour son aide dans la gestion du projet.

Je tiens également à remercier le Professeur Carine Michiels pour avoir encadrer, apporter son soutien et avoir participer de manière très active à ce travail.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement le Dr Benjamin Le Calvé pour son implication, sans laquelle ce travail n'aurait pu avancer de la même manière. Je le remercie également de m'avoir donné l'opportunité de prendre part à des collaborations internationales, me permettant de me former sur des nouvelles techniques.

Je tiens à remercier mon ami et collègue de dur labeur, Sébastien Marx (peut être futur docteur), avec qui j'ai passé de longues heures de travail, mais également partagé de nombreux projets. Merci pour toutes nos discussions scientifiques ou non, ces congrès (l'oiseau t'attend !), sorties extra-boulots (on passera sous silence les gin-tonic !) et tous les dérivés de bêtises s'y rapportant (j'ai toujours des photos de tes méfaits ;)) !

Merci au Professeur Olivier De Backer pour m'avoir donné la possibilité d'utiliser les installations de l'URPHYM. Je tiens à remercier tout particulièrement Dominique Desnoeck pour son aide dans la création des plasmides codant pour TMEM45A.

Je remercie Marc Dieu pour les mesures de spectrométrie de masse.

J'exprime également ma gratitude aux Dr Isabelle Georis et Geoffray Labar (LABIRIS) pour leur implication et leur aide dans le développement de ce travail, ainsi que de m'avoir donné l'accès à leur infrastructure.

Je remercie aussi mes collègues du CBS et de l'URBC. Merci à Andrea et Quentin pour leurs blagues et leur bonne humeur. Merci à Morgane pour ses longues discussions sur le sens du travail. Et un grand merci à Sébastien Penninckx pour sa bonne humeur, son sens de l'humour et ses boutades sans fin !

Merci aux étudiants (stagiaires et mémorants) qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier Nathalie Glorieux pour sa bonne humeur depuis le début de ce doctorat, son soutien dans les moments d'indécision, les verres en terrasse, les restaurants, de nouveau les verres en terrasse et ... le Vino Vino !

Je remercie ma famille pour m'avoir soutenu dans cette expérience de vie et d'avoir cru en moi. Merci à mes amis David, Dylan, Antoine, Cris et Robin sans qui mes week-end auraient été bien longs. A toutes nos sorties et celles à venir !

Pour finir, je tiens à faire une mention spéciale à Mégane Van Gysel pour son soutien malgré mon sale caractère, ses encouragements dans les moments les plus difficiles et d'avoir accepté de participer à la relecture de mon manuscrit (et oui les fautes d'orthographe je connais !).

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	<i>Protein kinase B</i>
APC/C	<i>Anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
ARN	Acide ribonucléique
Asn	Asparagine (N)
ATP	Adénosine triphosphate
ATF3	<i>Activating transcription factor 3</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
β-TRCP/FBXW1A	<i>β-transducin repeat containing/ F-box/WD repeat-containing protein 1A</i>
CAND1	<i>Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1</i>
CK5	<i>Cytokeratin 5</i>
CK7	<i>Cytokeratin 7</i>
CRL	<i>Cullin-RING ligase</i>
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique
CSN	<i>COP9 signalosome complex</i>
Cul1	Culline 1
DM	n-Décyl β-D-maltoside
DDM	n-Dodécyl β-D-maltoside
DO	Densité optique
DRX	Diffraction des rayons X
E1	<i>Ubiquitin-activating enzyme</i>
E2	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>
E3	<i>Ubiquitin-protein ligase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ER-α	<i>Estrogen receptor α</i>
FABP7	<i>Fatty acid binding protein 7</i>
FOXC2	<i>Forkhead box protein C2</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GRB7	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
HECT	<i>Homologous to the E6AP carboxyl terminus</i>
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HNF3α	<i>Hepatocyte nuclear factor 3α</i>
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	Kilo dalton (kg/mol)
k-NN	<i>k-nearest neighbors</i>

Lac I gene	Gène lac I
Lac O	Opéron lactose
LB	<i>Lennox Broth</i> (milieu de culture)
LIV-1	<i>Zinc transporter ZIP6</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MS	Spectrométrie de masse
mTor	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MTSS1/MIM	<i>Metastasis suppressor protein 1/Missing in metastasis</i>
MTX1	<i>Metallothionein 1X</i>
NAD/NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NAE	<i>Nedd8-activating enzyme</i>
NDC1	<i>Nucleoporin NDC1</i>
Nedd8/N8	<i>Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NP-40	<i>Nonyl phenoxypolyethoxylethanol</i> (IGEPAL CA-630)
p53/TP53	<i>Tumor protein 53</i>
PARP	Poly-ADP ribose polymérase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PR	<i>Progesterone receptor</i>
Rad51	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
RBR	<i>RING-between RING-RING</i>
Rbx1	<i>RING box 1</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RMSD	Déviation quadratique moyenne
RS	Reconnaissance au substrat
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SCF	<i>Skp1-cullin-F box</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Sérine (S)
shRNA	<i>Small hairpin ribonucleic acid</i>
Skp1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SNG	Site de N-glycosylation
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (solution tampon)
TBS-t	<i>Tris-buffered saline</i> + 0.1% Tween-20
TEV protéase	Protéase du « <i>Tobacco etch virus</i> »
Thr	Thréonine (T)
TMEM45A	<i>Transmembrane protein 45A</i>
TMEM45B	<i>Transmembrane protein 45B</i>

TMEM45C/TEDDM1	<i>Transmembrane protein 45C/ Transmembrane epididymal protein 1</i>
Ub	Ubiquitine
U-box	<i>U-box domain</i>
UPS	<i>Ubiquitin-proteasome system</i>
X	Acide aminé quelconque
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>

Table des matières

I. Introduction	17
1. Contexte	17
1.1. Le cancer	17
1.2. Contexte du travail	18
2. Cancer du sein	19
2.1. Classification traditionnelle des cancers du sein	19
2.2. Classification moléculaire des cancers du sein	20
2.3. Cancer du sein triple-négatif	22
2.4. Traitements	24
2.4.1. Chirurgie et radiothérapie	24
2.4.2. Hormonothérapie	25
2.4.3. Chimiothérapie	26
2.4.4. Thérapie ciblée	26
2.4.5. Difficultés liées aux traitements des cancers du sein triple-négatifs	27
3. Le processus métastatique	28
4. La protéine TMEM45A	29
4.1. Découverte de TMEM45A	29
4.2. Caractéristiques de TMEM45A	29
4.3. TMEM45A dans le cancer	30
5. Régulation de l'expression des gènes	32
6. Système ubiquitine-protéasome	34
6.1. Complexes ligases E3 et complexes SCF (Skp1-cullin1-F-box)	34
6.2. CAND1 régulateur des complexes SCF	37
7. Stratégie générale	39
II. Résultats et discussion	43
Partie 1 : Caractérisation structurale de la protéine membranaire 45A (TMEM45A)	
Avant-propos	43
1. Génération des modèles topologiques et tridimensionnels	43
2. Validation de la topologie	47
2.1. Stratégie mise en place	47
2.2. Construction des plasmides codant pour TMEM45A	50
2.3. Mise au point des conditions de transfection	51

2.4.	Validation par RT-qPCR	53
2.5.	Validation par marquage en immunofluorescence	53
2.6.	Validation par technique de Western Blot	58
2.7.	Mise au point des conditions de Western Blot	63
3.	Essais de cristallogénèse de TMEM45A	65
3.1.	Conception du plasmide bactérien codant pour la protéine TMEM45A	65
3.2.	Culture bactérienne pour la production de la protéine TMEM45A	66
3.3.	Induction de la protéine TMEM45A	68
4.	Conclusions	70
5.	Matériel et méthodes	72
5.1.	Prédiction des modèles avec I-TASSER	72
5.2.	Clonage de TMEM45A dans le vecteur pcDNA3.1(+)	72
5.3.	Transformation des bactéries compétentes	73
5.4.	Transfection des cellules	73
5.5.	RT-qPCR	74
5.6.	Marquage en immunofluorescence	74
5.7.	Western Blot	75
5.8.	Culture bactérienne et induction de la protéine cible	76
5.9.	Analyse par gel d'électrophorèse SDS-PAGE	77
Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle de la protéine membranaire 45A (TMEM45A) dans le cancer		
	<i>TMEM45A regulates MTSS1 stabilization by modulating proteasome activity</i>	79
	<i>(draft article)</i>	
III.	Discussion générale, conclusions et perspectives	111
1.	Discussion générale	111
1.1.	Problématique des protéines membranaires	111
1.2.	Caractérisation structurale des protéines membranaires	112
1.3.	Caractérisation fonctionnelle des protéines membranaires	116
2.	Conclusions	119
3.	Perspectives	120

IV. Bibliographie **125**

V. Annexe **143**

*Members of the transmembrane protein (TMEM) family: poorly
characterized even if essential for the metastatic process
(review)*

I. Introduction

1 Contexte

1.1 Le cancer

En 2018, la prévalence du cancer dans le monde a été estimée à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès¹. Ces statistiques estiment donc le total de malades à 43,8 millions de personnes à travers le monde. Cette maladie touche aussi bien les hommes que les femmes (9,5 et 8,6 millions de malades respectivement). Au cours de leur existence, il est estimé que 1 homme sur 5 et 1 femme sur 6 développeront un cancer et que 1 homme sur 8 et 1 femme sur 11 en mourront. A la vue de ces chiffres, il est évident que le cancer représente un enjeu socio-économique important et est donc un enjeu de santé publique majeur^{2,3}.

Depuis une cinquantaine d'années, le cancer fait l'objet de recherches visant à mieux comprendre son origine et son développement afin de permettre la recherche de traitements efficaces⁴⁻⁶. Afin de traiter cette maladie, de nombreuses thérapies sont utilisées, souvent en combinaison, comme la chirurgie, la radiothérapie, ou encore la chimiothérapie^{7,8}. Cependant, dans certains types de cancer, les traitements actuellement disponibles ne permettent pas d'obtenir la guérison des patients ou même de permettre de prolonger leur survie. Un des cancers les plus répandus est le cancer du sein qui a touché, en 2018, environ 2,1 millions de femmes (soit 11,6 % de la totalité des cas de cancer et 25% des cancers chez la femme). Il a été la cause de 626 000 décès ($\pm 15\%$ des décès totaux chez la femme) au cours de cette même année. Parmi les cancers du sein, les cancers triple négatifs représentent une sous-classe ($\pm 10-20\%$) de ces derniers. Ils sont connus comme étant les plus agressifs, avec une espérance de survie à 5 ans de seulement 26,1 % pour les stades les plus avancés, et sont difficilement traitables⁹. Comme dans la plupart des cancers, la mortalité dans le cas des cancers triple négatifs est due à la formation de métastases (tumeurs secondaires) au niveau de sites plus ou moins distants de la tumeur primaire¹⁰. Le processus métastatique (abordé ultérieurement dans un point spécifique) englobe toutes les étapes depuis le départ des cellules cancéreuses du site de la tumeur primaire, en passant par le transport de ces cellules dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, l'ancrage,

l'invasion et la colonisation du nouvel organe¹¹. Une meilleure compréhension de ce processus dans les cancers triple négatifs, ainsi que des mécanismes biologiques associés, sont donc essentiels pour le développement de nouvelles thérapies^{12,13}.

1.2 Contexte du travail

L'équipe du Professeur Carine Michiels s'est intéressée à la chimiorésistance des cellules cancéreuses induite par un microenvironnement hypoxique^{14,15}. Bien que certains mécanismes associés à ce type de résistance soient connus (p53 muté, voies d'apoptose inactivées, activation de facteurs de transcription comme HIF, ...), un certain nombre de mécanismes restent à élucider^{16,17}. C'est dans ce cadre de travail que la protéine transmembranaire 45A (TMEM45A) a été investiguée pour la première fois. Il a été montré que l'expression de celle-ci était augmentée en conditions d'hypoxie et que sa surexpression était corrélée avec une résistance dans une lignée d'hépatocarcinome du foie HepG2 et dans une lignée de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231¹⁸. Récemment, deux équipes^{19,20} ont montré l'implication de cette protéine dans la migration et la prolifération de cellules issues d'un cancer ovarien et d'un gliome^{19,20}. En dépit de phénotypes bien établis, les mécanismes cellulaires par lesquels TMEM45A régule la prolifération et la migration des cellules tumorales restent inconnus.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés à la protéine TMEM45A et son implication dans les cancers du sein et plus précisément dans le sous-type triple négatif. Nous avons décidé d'aborder cette problématique en se basant sur la caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine. Ensuite, une approche *in vitro*^{21,22} a permis de déterminer des partenaires protéiques, qui ont ensuite guidé l'investigation de voies spécifiques potentiellement à l'origine de la fonction de TMEM45A dans le cancer.

Afin de permettre une bonne compréhension des résultats présentés dans cette étude, l'introduction reprend l'ensemble des notions qui seront abordées tout au long du travail. Pour commencer, celle-ci présente la problématique des cancers du sein triple négatifs (classification et thérapies utilisées) ainsi que celle de la formation des métastases. La problématique des protéines membranaires et de leurs implications dans

la migration et les processus liés à la formation de métastases sera abordée au sein d'une publication dédiée à ce sujet. Il s'ensuivra un état de l'art sur la protéine TMEM45A et sa relevance dans le cancer ainsi qu'un point spécifique concernant son implication dans la prolifération et la migration dans différents modèles tumoraux. Enfin, et sur base des résultats obtenus au cours de ce travail, il sera également nécessaire d'aborder la problématique des complexes à activité E3 ligase responsables de l'ubiquitination des protéines et de leur dégradation par le protéasome (UPS : « *ubiquitin-proteasome system* »).

2 Cancer du sein

2.1 Classification traditionnelle des cancers du sein

Un des cancers les plus répandus est le cancer du sein qui a touché environ 2,1 millions de femmes (soit 11,6 % de la totalité des cas de cancer et 25% des cancers chez la femme) et a été la cause de 626 000 décès ($\pm 15\%$ des décès totaux chez la femme) en 2018. Ce cancer est donc le premier type de cancer en terme d'incidence et la première cause de mortalité chez les femmes¹. D'un point de vue clinique, il est établi que le cancer du sein est une maladie complexe comprenant de nombreux sous-types avec des caractéristiques biologiques distinctes. Cette diversité conduit à des différences dans le profil des réponses aux traitements ainsi que dans les données cliniques associées^{23,24}. Malgré cette disparité, une classification traditionnelle sur base des caractéristiques biologiques comme la position de la tumeur, la taille de la tumeur, l'atteinte des ganglions, le grade histologique, l'âge du patient, l'expression des récepteurs à estrogène (ER) et à la progestérone (PR) ou encore le statut du récepteur 2 au facteur de croissance épidermique humain (HER-2) a été établie²⁵⁻²⁷. L'appartenance à une catégorie spécifique (cancer provenant du canal lactaire, cancer lobulaire ou encore du mamelon) a pendant longtemps déterminé le type de traitement suivi par le patient⁸. Le traitement du cancer du sein consiste principalement en l'ablation partielle (chirurgie mammaire conservatrice) ou totale du sein (mastectomie). La chirurgie était généralement suivie d'un traitement adjuvant composé d'une combinaison d'agents

chimiothérapeutiques (paclitaxel, doxorubicine, cyclophosphamide,...) et de radiothérapie²⁸.

Le développement du diagnostic sur base de l'expression des récepteurs à hormone (estrogène (ER) et progestérone (PR)), ainsi que les bienfaits de la thérapie hormonale (tamoxifène ciblant le ER) dans la réponse tumorale ont conduit à l'analyse systématique (par marquage immunohistochimique) de l'expression de ces récepteurs dans le cadre de la classification des cancers du sein²⁹. Par la suite, le récepteur HER-2 a été montré comme conférant un phénotype plus agressif aux cancers du sein. L'utilisation du trastuzumab, un anticorps monoclonal ciblant le domaine extracellulaire du récepteur HER-2, a permis d'augmenter significativement la survie des patients présentant une surexpression de ce récepteur³⁰⁻³². Cependant, ce système de classement a montré une certaine limite dans le cadre de traitement personnalisé. En effet, l'apparence histologique des tumeurs peut ne pas être suffisante pour établir le profil des altérations génétiques présentes dans les cellules cancéreuses de la tumeur ou des événements biologiques impliqués dans le développement ou la progression du cancer. Il en résulte donc que des tumeurs ayant une apparence clinique et pathologique similaire peuvent avoir des comportements diamétralement opposés^{23,33}.

2.2 Classification moléculaire des cancers du sein

Grâce au récent développement de nouvelles techniques d'analyse d'expression génique, il a été possible d'établir une classification moléculaire sur base du profil d'expression de différents gènes (et non plus sur base d'observations histopathologiques) au sein de la tumeur³⁴⁻³⁶.

La première distinction a été faite entre les tumeurs positives et négatives pour le récepteur à estrogène (ER)^{37,38}.

1. Les tumeurs ER positives expriment le récepteur à estrogène ainsi qu'un ensemble de gènes cibles de ce dernier ou encore des gènes codant pour des protéines caractéristiques de cellules épithéliales luminales³⁹. Ce groupe porte donc le nom de « luminaire » et peut encore être divisé en deux sous-groupes distincts : luminales A et B. Cette différenciation s'appuie sur

l'expression de gènes spécifiques aux cellules luminales (Era « estrogen receptor α », GATA3 « *GATA binding protein 3* », XBP1 « *X-box binding protein 1* », HNF3 α « *hepatocyte nuclear factor 3 α* » et LIV-1 « *zinc transporter ZIP6* ») entre ces deux sous-groupes. Les luminales A expriment fortement cet ensemble de gènes alors que les luminales B plus modérément⁴⁰.

2. Concernant les tumeurs ER négatives, trois sous-groupes sont établis selon l'expression de certains gènes : HER-2 positif, « *basal-like* » et enfin « *normal breast-like* »³⁹. Les tumeurs HER-2 positives expriment fortement ce récepteur, GRB7 « *growth factor receptor-bound protein 7* » et le facteur nucléaire NF- κ B (« *nuclear factor- κ B* ») alors que l'expression de GATA3 est diminuée⁴¹. Les tumeurs « *basal-like* » présentent généralement une expression faible de ER et HER-2 qui est accompagnée d'une surexpression de gènes associés aux cellules épithéliales basales (MTX1 « *metallothionein 1X* », FABP7 « *fatty acid binding protein 7* », FOXC2 « *forkhead box protein C2* », ATF3 « *activating transcription factor 3* », CK5 « *cytokeratin 5* », CK7 « *cytokeratin 7* » et la P-cadhérine)³⁹. Quant au groupe « *normal breast-like* », il présente les particularités d'un tissu normal du sein avec une surexpression de gènes caractéristiques des cellules adipeuses et non épithéliales. Ce dernier sous-groupe est très peu caractérisé et certains scientifiques émettent même des doutes quant à la réelle existence de celui-ci^{42,43}. Le *Tableau 1* reprend les différents sous-groupes de cancers du sein, ainsi que leurs principales caractéristiques.

Sous-type moléculaire	Prévalence (%)	ER	PR	HER-2	Pronostic	Traitements
Luminal A	50-60	+	+	-	Bon	Hormone
Luminal B HER-2 négatif	15-20	+	+	-	Intermédiaire	Hormone + chimiothérapie
Luminal B HER-2 positif	6	+	+	+	Intermédiaire	Hormone + chimiothérapie + anti-HER-2
HER-2 positif	10-15	-	-	+	Mauvais	Chimiothérapie + anti-HER-2
Basal-like	10-20	-	-	-	Mauvais	Chimiothérapie
Normal breast-like	5-10	-/+	-/+	-/+	Mauvais	(Difficile)

Tableau 1: Sous-types du cancer du sein et leurs principales caractéristiques. Adapté de (Palma, Frasci, et al., 2015)³³.

Cette seconde classification permet d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer du sein. De plus, cela permet de proposer un traitement plus personnalisé en terme d'efficacité et de toxicité pour le patient^{44,45}.

2.3 Cancer du sein triple-négatif

Les cancers du sein triple-négatifs réfèrent à une classe de tumeurs hautement agressives, présentant la particularité de ne pas exprimer les récepteurs ER, PR et HER-2^{38,46}. Bien que les tumeurs triple-négatives partagent les mêmes caractéristiques que les « *basal-like* », elles ne sont pas parfaitement identiques²³. En effet, le terme « triple-négatif » fait référence à la classification immunohistochimique et à l'absence des trois récepteurs cités ci-dessus, alors que le sous-groupe « *basal-like* » est quant à lui déterminé par analyse du profil génique. Selon les études, 20 à 30 % de discordance sont observés dans la répartition des cancers entre ces groupes⁴⁷. Puisque de nos jours, la recherche et les soins se basent principalement sur la détermination du profil génique des tumeurs pour les classer, il est plus adéquat d'utiliser le terme « *basal-like* ».

Cependant d'un point de vue historique et clinique, le terme triple-négatif garde encore tout son sens²³.

Les cancers « *basal-like* » et triple-négatif sont associés à un grade histologique élevé (cellules cancéreuses peu différenciées susceptibles de se diviser plus rapidement et de se propager), la formation de tumeurs solides avec un cœur nécrotique, une délimitation peu définie de la tumeur, un indice prolifératif élevé et/ou encore une instabilité génomique (acquisition plus facile de mutations)⁴⁸.

Parmi ces modifications, on retrouve des mutations dans les gènes TP53 (« *tumor protein 53* ») et BRCA1 (« *breast cancer 1* »), une diminution de l'expression des intégrines (invasion et migration) et une dérégulation des voies cellulaires MAPK (« *mitogen-activated protein kinase* »), PI3K (« *phosphoinositide 3-kinase* »), Akt (« *protein kinase B* ») et NF-κB (« *nuclear factor-κB* »)^{49,50}. La plupart de ces modifications ont été montrées comme directement liées à la prolifération, la migration, l'invasion des cellules et donc à la survie des patients. Les sites préférentiels pour la formation de métastases du cancer du sein sont le cerveau, les poumons, les os et le foie⁵¹.

Une mutation importante dans les cancers de type « *basal-like* » est la mutation du gène BRCA1. En effet, 75% des tumeurs appartenant à ce type présentent cette anomalie. Le gène BRCA1 est un gène suppresseur de tumeur. La protéine BRCA1 agit dans le processus de détection des dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation de ces dommages⁵². Les cellules arborant une mutation pour ce gène présentent une déficience dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, de par l'inactivation des voies de réparation de l'ADN dépendantes de Rad51 (« *DNA repair protein RAD51 homolog 1* », impliqué dans le processus de recombinaison homologue de l'ADN) et p53 (détection des dommages à l'ADN et initiation des réparations ou de l'apoptose)⁵³⁻⁵⁵. Ces cellules sont donc potentiellement plus sensibles aux agents thérapeutiques qui génèrent des dommages à l'ADN (exemple inhibiteur de PARP « *poly-ADP ribose polymerase* » ou cis-platine)⁵⁶.

2.4 Traitements

Les principaux types de traitements pour le cancer du sein sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées. De manière générale, ces différentes thérapies sont données en combinaison selon les caractéristiques de la tumeur²⁸.

2.4.1 Chirurgie et radiothérapie

L'approche la plus conventionnelle pour le traitement du cancer du sein commence par la chirurgie⁸. Elle peut consister en l'ablation totale (mastectomie) ou partielle (chirurgie mammaire conservatrice) du sein. Cette seconde méthode tend à être utilisée davantage car elle améliore la qualité de vie et est estimée moins traumatisante (bénéfice psychologique) pour la patiente. Cependant, la chirurgie mammaire conservatrice ne reste possible que pour des tumeurs de petite taille et localisées⁵⁷. Généralement, la chirurgie est suivie de thérapies adjuvantes afin d'assurer une guérison complète et minimiser le risque de métastases. Les cellules cancéreuses résiduelles (lors de la chirurgie) peuvent être éliminées par radiothérapie⁵⁸. Cette technique consiste à irradier les cellules avec un rayonnement hautement énergétique de rayons X ou de protons. L'utilisation de radiothérapie en combinaison avec la chimiothérapie induit généralement une diminution de la taille de la tumeur. Cependant l'utilisation de radiothérapie n'est pas sans risque puisque des effets secondaires sont également possibles : perte de la sensibilité dans le sein ou sous le bras, problème de peau dans la zone traitée, douleurs, rougeurs et démangeaisons⁵⁹.

De manière à minimiser les rechutes après la chirurgie, un traitement adjuvant systémique est généralement utilisé. Il peut consister en une hormonothérapie et/ou en une chimiothérapie^{28,44}. Le choix du traitement se fait sur base de l'expression des récepteurs ER, PR et HER-2⁴³. Pour des patients présentant un cancer sensible aux hormones, l'hormonothérapie est conseillée et, dans le cas contraire, la chimiothérapie reste le meilleur traitement. La *Figure 1* reprend un résumé des traitements possibles pour chaque type de tumeur.

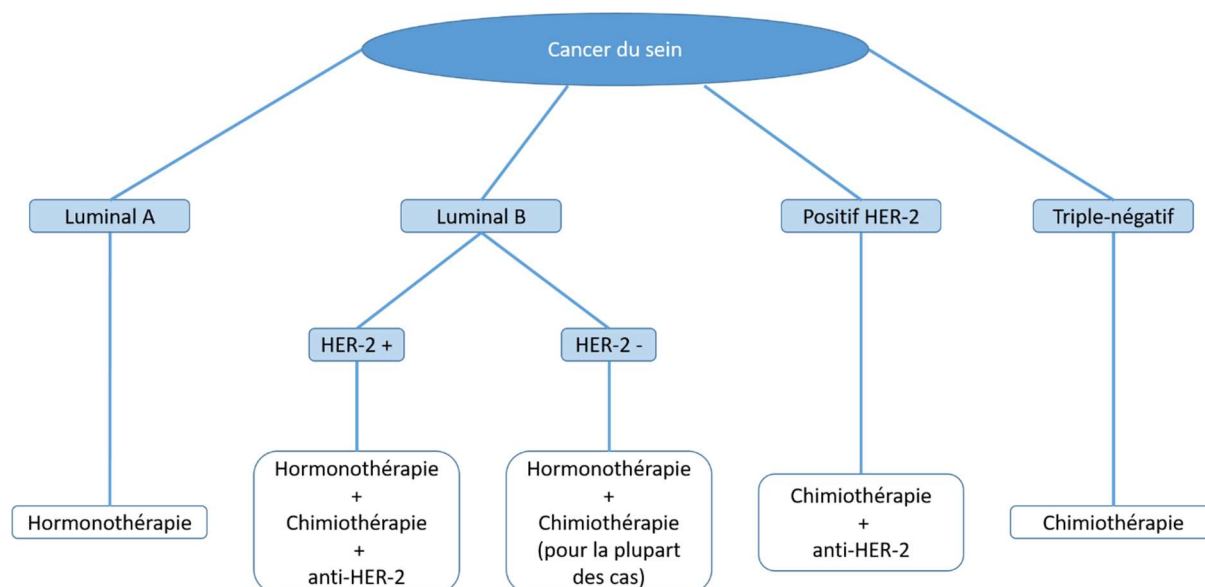


Figure 1 : Thérapies adjuvantes selon le type de cancer du sein. Adapté de (Nounou, ElAmrawy, et al., 2015)⁸.

2.4.2 Hormonothérapie

L'objectif de l'hormonothérapie est d'agir sur certains récepteurs à hormones qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses. L'utilisation de cette thérapie est souvent liée à la présence du récepteur à l'estrogène à la surface des cellules cancéreuses (luminal A et B)⁶⁰. Le choix de l'agent thérapeutique est quant à lui lié au statut ménopausal (pré-ménopause ou post-ménopause) de la patiente⁵⁸. Les patientes en pré-ménopause sont traitées avec le tamoxifène (Nolvadex®) qui est un antagoniste du récepteur ER et agit par inhibition compétitive de la liaison de l'estradiol sur le récepteur⁶¹. Une combinaison de tamoxifène avec un agoniste de GnRH (« *gonadotropin releasing hormone* »), hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires, a montré une efficacité aussi élevée que celle obtenue lors de l'utilisation de certaines chimiothérapies⁶². Ce traitement peut présenter un risque de complication thromboembolique (thrombose et embolie pulmonaire), voire, dans de rares cas, un cancer de l'endomètre⁶³. Pour les patientes en post-ménopause, une combinaison d'anti-inflammatoires (stéroïdiens ou non) avec le tamoxifène est utilisée⁶⁴.

2.4.3 Chimiothérapie

Les effets bénéfiques de la chimiothérapie sont plus prononcés pour les tumeurs n'exprimant pas le récepteur ER. La chimiothérapie est donc principalement utilisée pour traiter les tumeurs de type « *basal-like* » ou positives pour le récepteur HER-2. Le traitement consiste en plusieurs cycles d'administration d'agents thérapeutiques, espacés dans le temps⁴⁴. Les composés utilisés sont administrés en combinaison soit doxorubicine-cyclophosphamide ou cyclophosphamide-méthotrexate-fluorouracile⁶⁵. A ces thérapies, des cycles de taxane, paclitaxel (Taxol®) ou encore du docétaxel (Taxotère®) peuvent être ajoutés pour augmenter l'efficacité ou traiter les tumeurs les plus résistantes^{66,67}. Dans le cadre des tumeurs mutées pour BRCA1, le cisplatine est utilisé. En effet, celui-ci induit des dommages à l'ADN qui inhibent la réplication et la transcription de l'ADN en ARN, provoquant ainsi la mort cellulaire⁶⁸.

2.4.4 Thérapie ciblée

Une thérapie ciblée est un médicament qui agit sur un récepteur ou une voie biologique particulière au sein de la tumeur⁶⁹. Généralement, ce type de thérapie présente moins d'effets secondaires qu'une chimiothérapie. Les composés utilisés interagissent avec des cibles moléculaires spécifiques nécessaires à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses ou au développement de la tumeur⁷⁰. Cette thérapie se différencie donc de la chimiothérapie qui vise à stopper la prolifération ou à détruire les cellules à division rapide, qu'elles soient cancéreuses ou normales. Deux grandes classes de médicaments sont utilisés pour la thérapie ciblée : les petites molécules inhibitrices d'activité enzymatique et les anticorps monoclonaux⁷¹⁻⁷³. L'un des traitements le plus connu est le trastuzumab (Herceptine®, anticorps monoclonal, anti-HER-2) qui est spécifique du domaine extracellulaire du récepteur HER-2^{74,75}. Celui-ci est utilisé pour traiter les tumeurs mammaires positives pour le récepteur HER-2. Le trastuzumab entraîne une réduction significative de la mortalité et une augmentation du taux de rémission.

D'autres voies spécifiques aux cellules cancéreuses peuvent être ciblées comme par exemple la voie de PARP (« *poly-ADP ribose polymerase* ») avec l'olaparib et l'iniparib⁵⁶, la voie PI3K/Akt/mTor avec l'évérolimus (Affinitor®) en combinaison avec

l'exémestane (Aromasine®)^{76,77}. Le choix du traitement dépendra à chaque fois du profil génétique de la tumeur et donc de sa possible réponse au traitement. Il est également important de noter que la plupart de ces traitements peuvent être donnés en tant que thérapie néo-adjuvante pour réduire la taille de la tumeur avant son retrait par chirurgie⁷⁸.

2.4.5 Difficultés liées aux traitements des cancers du sein triple-négatifs

Une caractéristique importante des cellules cancéreuses triple-négatives est leur tendance à migrer plus vite que dans les autres types de tumeurs mammaires^{46,48}. Il en résulte la formation de tumeurs secondaires à des sites spécifiques comme les poumons, les os ou le cerveau⁵¹. La formation de métastases est souvent associée à un mauvais pronostic pour le patient. Par ailleurs, lorsque les cellules cancéreuses ont envahi un nouveau site, le type de traitement à employer peut changer radicalement. En effet, lorsque les cellules cancéreuses forment des métastases dans le cerveau, la radiothérapie, la chirurgie et la chimiothérapie sont difficiles à mettre en œuvre. Selon la position de la tumeur dans le cerveau (à proximité de la boîte crânienne), la radiothérapie ou la chirurgie pourront être utilisées⁷⁹. Concernant la chimiothérapie, elle est soumise à une difficulté constante qui est la distribution de l'agent thérapeutique au cerveau. Après son administration dans le système sanguin, la molécule doit traverser la barrière hémato-encéphalique pour rejoindre le site de la tumeur^{80,81}. Cette barrière permet de protéger le cerveau des agents pathogènes mais filtre aussi les molécules (hormones, nutriments, ...). Le rôle physiologique de la barrière hémato-encéphalique complique donc le traitement par chimiothérapie lors de la formation de métastases au cerveau.

La seconde complication provient de l'acquisition de résistance des cellules cancéreuses. En effet, les cellules qui commencent un processus métastatique ont, pour la plupart, déjà subi l'action d'agents chimiothérapeutiques au sein de la tumeur primaire. Elles peuvent donc acquérir une résistance à l'agent utilisé. De plus, il a été décrit dans la littérature que les cellules engagées dans un processus métastatique subissent un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, voir point sur la migration). Lors de ce changement de statut, il a été montré qu'une série de

facteurs de transcription leur conféraient des caractéristiques proches de cellules souches^{82,83}. Ces cellules cancéreuses souches « cancer stem-like cells » possèdent la plupart des capacités des cellules souches dont celle d'arrêter de proliférer pendant un certain temps. La majorité des composés anti-cancéreux ciblant les cellules à prolifération rapide (caractéristiques des cellules cancéreuses), il en résulte une inefficacité du traitement. Le traitement du patient avant d'atteindre ce stade est donc un facteur important dans la réussite du traitement. La compréhension des différentes étapes régissant le processus métastatique peut donc ouvrir de nouvelles voies de traitement^{84,85}.

3 Le processus métastatique

Le processus métastatique et l'implication de protéines membranaires dans ce dernier est traité dans le cadre d'une publication (*review*) qui a été soumise dans la revue scientifique « *Seminars in Cancer Biology* » (voir Annexe A).

Le processus métastatique est le phénomène par lequel une cellule cancéreuse dite épithéliale acquiert la capacité de migrer (transition épithélio-mésenchymateuse) et peut ainsi former une tumeur secondaire à un site distant. Ce processus a largement été étudié et caractérisé dans la littérature et implique notamment des protéines membranaires avec des fonctions bien déterminées. Cette cascade regroupe plusieurs étapes qui peuvent être divisées en trois grandes phases (détails en annexe):

1. L'invasion locale de la matrice extracellulaire par les cellules cancéreuses issues de la tumeur primaire
2. L'intravasation de cellules migratrices dans les vaisseaux sanguins ainsi que leur survie durant la dissémination dans le système sanguin
3. L'extravasation des cellules cancéreuses depuis les vaisseaux sanguins vers les nouveaux tissus pour former le foyer tumoral secondaire

Parmi toutes ces protéines membranaires ayant un effet sur la migration et l'invasion, TMEM45A (protéine transmembranaire 45A) est la protéine que nous avons étudiée plus particulièrement. En effet, celle-ci a déjà été étudiée au sein de l'Unité de

Recherche en Biologie Cellulaire (Professeur Carine Michiels, UNamur) concernant son implication dans un processus de résistance de cellules cancéreuses triple-négatives (MDA-MB-231) au taxol en condition hypoxique ¹⁸.

4 La protéine TMEM45A

4.1 Découverte de TMEM45A

Les études du Professeur Carine Michiels s'inscrivent dans une thématique de recherche portant sur le rôle de l'hypoxie dans la réponse des cellules cancéreuses à la chimiothérapie ainsi qu'à la radiothérapie. En effet, comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance induite par l'hypoxie est primordial pour permettre l'amélioration des traitements anti-cancéreux¹⁴. Bien que des évidences sur les différents mécanismes de résistance et de progression tumorale commencent à apparaître, de nombreuses questions et incertitudes demeurent. C'est dans ce contexte que la protéine TMEM45A a été démontrée comme étant impliquée dans la résistance en hypoxie de lignées cellulaires issues d'un hépatocarcinome du foie (HepG2) à l'étoposide et d'un cancer du sein (MDA-MB-231) au taxol. De manière à investiguer les gènes dont l'expression est modulée par l'hypoxie et potentiellement responsables de cette résistance, Flamant et al. ont réalisé une analyse Affymétrie. Il en est ressorti que le gène codant pour TMEM45A est le gène dont l'expression est la plus fortement augmentée. Pour confirmer l'implication de TMEM45A dans la résistance à l'hypoxie, les auteurs ont invalidé l'expression de cette protéine et ont démontré que dans ces conditions, la résistance était levée. Cette étude fut la première à mettre en évidence un rôle de TMEM45A dans la résistance à l'apoptose.

4.2 Caractéristiques de TMEM45A

TMEM45A appartient à la famille des protéines transmembranaires 45, famille composée de 3 paralogues (A, B et C = TEDDM1 « *transmembrane epididymal protein 1* »)⁸⁶. Ceux-ci se distinguent principalement par leur localisation dans le corps humain (leurs séquences protéiques étant très similaires). La première forme, TMEM45A, se retrouve principalement au niveau des kératinocytes au sein de

l'épiderme. TMEM45B se retrouve, quant à elle, de façon ubiquitaire dans la majeure partie des organes du corps humain. Alors que TMEM45C ou TEDDM1 se trouve au niveau de l'épithélium de l'épididyme. Au cours de cette thèse, la protéine TMEM45A a été investiguée de façon plus approfondie. TMEM45A comporte trois isoformes se différenciant par leur poids moléculaire⁸⁷. La première présente une séquence de 291 acides aminés pour un poids moléculaire de 33,5 kDa. Les deux autres comptent quant à elles 275 et 191 acides aminés pour des poids respectifs de 31,7 kDa et 21,9 kDa (www.ensembl.org). La *Figure 2* reprend un schéma des différentes isoformes de TMEM45A. Physiologiquement, cette protéine se retrouve dans la peau et semble participer à la différenciation/kératinisation de l'épiderme⁸⁸.

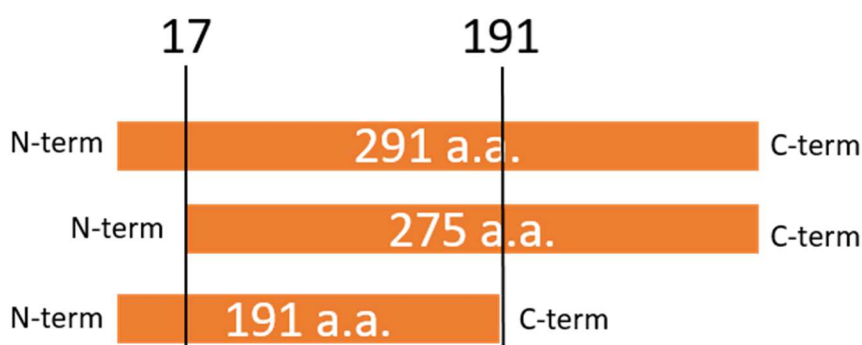


Figure 2 : Représentation des différentes isoformes de TMEM45A à 291, 275 et 191 acides aminés. Les variations correspondent à une perte des 16 premiers acides aminés ou des 100 derniers acides aminés.

Dans cette étude, nous avons, dans un premier temps, investigué la structure et la fonction de la protéine TMEM45A possédant 275 acides aminés, celle-ci étant la forme majoritaire. Wrzesiński et al. ont prédit une structure à 5 ou 7 segments transmembranaires sur base de la séquence en acides aminés et une localisation au sein de la membrane du réticulum endoplasmique⁸⁹. La localisation au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi a été confirmée par la suite au moyen de la microscopie confocale à fluorescence⁸⁸. Malgré ces récents résultats, la structure de TMEM45A reste encore inconnue.

4.3 TMEM45A dans le cancer

Comme mentionné précédemment, l'expression de TMEM45A est augmentée en condition hypoxique. Il a été déterminé que le promoteur du gène codant pour

TMEM45A possède une séquence de liaison pour le facteur de transcription HIF-1 (« *hypoxia inducible factor-1* ») qui est stabilisé en hypoxie⁹⁰, ce qui explique donc l'augmentation de la transcription du gène. Des courbes de survie chez des patientes atteintes de cancer du sein ont montré qu'une forte expression de TMEM45A était corrélée avec un taux de survie plus faible¹⁸, ce qui fait de TMEM45A un marqueur pronostic dans ce type de cancer. De plus, une recherche portant sur l'analyse du transcrit (ARN) de la protéine TMEM45A, dans divers cancers, a été menée dans la base de données Oncomine⁹¹. Les résultats sont repris à la *Figure 3*. Il peut ainsi être observé que tous les cancers du sein analysés présentent une expression plus importante de l'ARN messager de la protéine TMEM45A, en comparaison avec le tissu sain associé. Cette observation conforte donc le choix de modèles provenant de cancer du sein tels que les MDA-MB-231. Cependant, aucune corrélation n'a pu être tirée entre l'expression de l'ARN messager codant pour la protéine TMEM45A et l'agressivité des cancers.

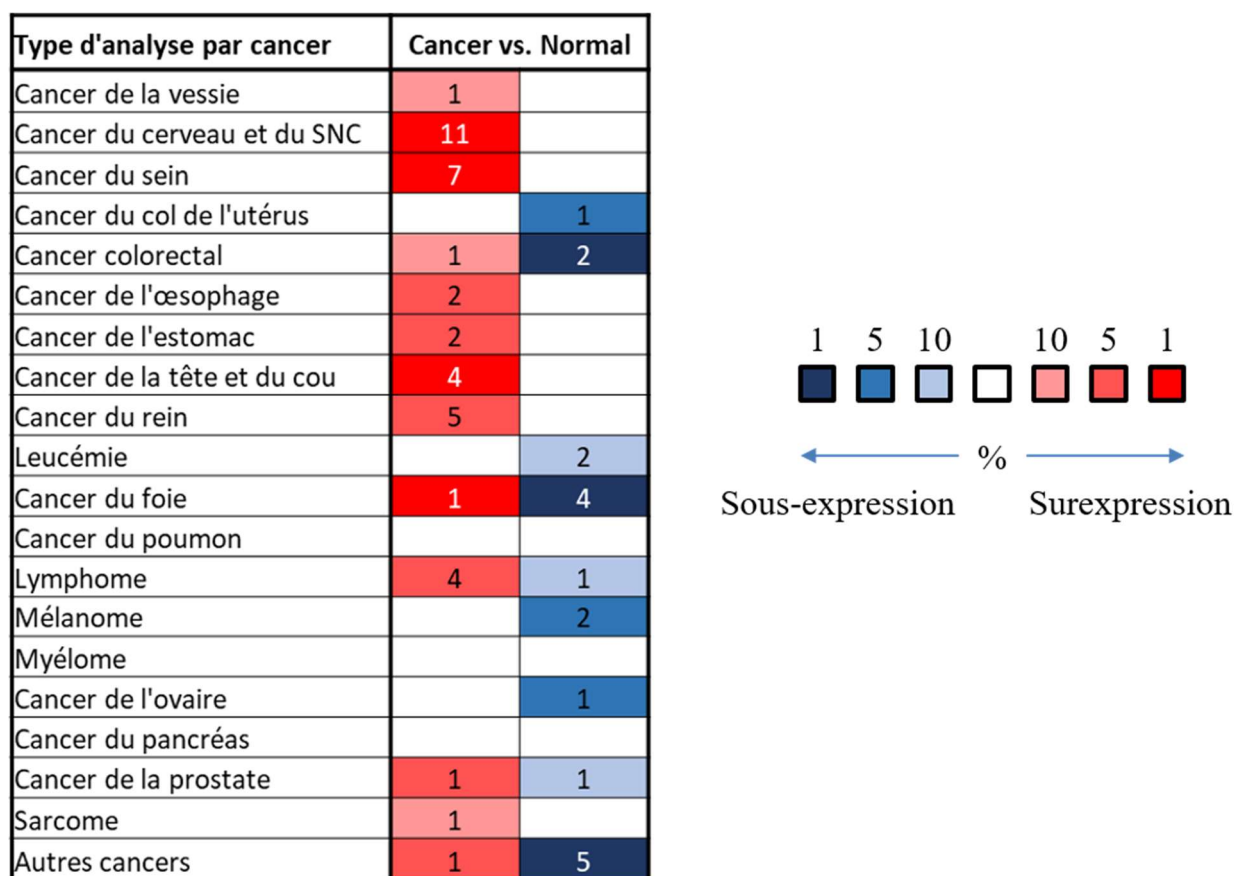


Figure 3 : Expression de TMEM45A dans plusieurs cancers. Analyse de jeux de données de microréseau d'ADN disponibles dans Oncomine. SNC = système nerveux central. Paramètre d'analyse : « *p-value* » = 0,01 ; « *fold change* » = 1,5 et « *gene rank* » = 10%.

En plus du rôle démontré par Flamant *et al.* dans la résistance en hypoxie des cellules cancéreuses mammaires, cette protéine a également été étudiée à plusieurs reprises pour son effet sur le phénotype migratoire et prolifératif dans divers cancers dont le cancer de l'ovaire et le gliome (voir point précédent « Le processus métastatique »)^{19,20}. Guo et al. ont mis en évidence que l'invalidation par shRNA de la protéine TMEM45A entraînait une diminution de la prolifération, de l'adhérence et de la migration dans un modèle cellulaire de lignée de cancer ovarien. Ces mêmes observations ont été réalisées par Sun et al. dans le contexte du gliome. Dans une autre étude menée par Lee et al., il a été démontré qu'un peptide provenant de TMEM45A était capable d'inhiber la lymphangiogenèse (mécanisme responsable de la néoformation de vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux préexistants), mais aussi la migration des cellules MDA-MB-231⁹². Toutes ces données réunies suggèrent que TMEM45A joue un rôle dans la migration des cellules cancéreuses et potentiellement dans l'agressivité des cancers du sein. Durant cette thèse, nous avons montré que TMEM45A interagit avec la protéine CAND1 (« *cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1* »). Cette protéine intervient dans la régulation de l'assemblage des complexes à activité E3 ligase responsable de l'ubiquitination des protéines (modification post-traductionnelle)⁹³. Ces complexes contrôlent donc directement la stabilité des protéines et leur niveau d'expression en régulant leur dégradation par le protéasome⁹⁴.

5 Régulation de l'expression des gènes

L'expression des gènes et des protéines associées est un mécanisme complexe au sein de la cellule⁹⁵. A partir de l'information génétique contenue dans l'ADN (« acide désoxyribonucléique »), la cellule est capable de synthétiser des protéines qui lui seront nécessaires pour son fonctionnement. Une cellule humaine contient plus ou moins 25 000 gènes. Tous ces gènes ne sont cependant pas exprimés de la même façon dans chaque type cellulaire. En effet, chaque type de cellule exerce une fonction qui lui est propre dans l'organisme (exemple une cellule du foie par rapport à une cellule du cerveau) et exprime donc des gènes/protéines spécifiques⁹⁶. Les cellules doivent donc continuellement activer et désactiver des gènes selon leurs besoins ou en réponse à des

stimuli du milieu interne ou externe. Il est donc nécessaire pour la cellule de réguler l'expression de ses différents gènes pour assurer son fonctionnement⁹⁷.

La régulation de l'expression des gènes et/ou de l'abondance des protéines peut se faire à divers niveaux. On distingue ainsi trois grands niveaux de régulations : transcriptionnel (ADN en ARN), post-transcriptionnel (ARN) et post-traductionnel (protéine)⁹⁵. Le contrôle transcriptionnel passe par la régulation de la structure de la chromatine (modification des histones), des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN) ou encore un contrôle de la transcription en elle-même par les facteurs de transcription^{98,99}. La régulation post-transcriptionnelle consiste en la maturation de l'ARN (épissage alternatif), son transport et sa stabilité dans la cellule. Le dernier niveau de contrôle concerne la modification post-traductionnelle des protéines^{100,101}.

Les modifications post-traductionnelles réfèrent à la modification chimique des protéines après leur biosynthèse⁹⁵. Ces modifications peuvent consister en un clivage d'un ou plusieurs acides aminés (peptide signal pour l'adressage des protéines), l'addition de groupement chimique (acétyle, phosphate, méthyle, carboxyle, oligoside,...), de groupement prosthétique (hème, NADH (« *nicotinamide adenine dinucleotide* »),...) ou de protéine (ubiquitine, NEDD8, SUMO,...) sur certains résidus (lysine tri-méthylée, N-glycosylation de l'asparagine, phosphorylation des tyrosines,...)¹⁰²⁻¹⁰⁴. Cela peut également comprendre un clivage protéolytique (clivage de la pro-insuline en insuline, activation des caspases, dégradation des protéines,...)¹⁰⁵. La plupart de ces modifications sont nécessaires pour contrôler l'activité, le temps de demi-vie ou encore l'abondance des protéines au sein de cellules¹⁰⁶.

Au cours de ce travail, la protéine TMEM45A a été montrée comme interagissant avec la protéine CAND1 (« *cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1* »). Cette dernière est connue pour être impliquée dans la régulation des complexes à activité ligase responsables de l'ubiquitination des protéines et de leur dégradation par le protéasome.

6 Système ubiquitine-protéasome

La dégradation des protéines est un processus important pour prévenir l'accumulation de protéines anormales ou non voulues et pour permettre de recycler au sein de la cellule les acides aminés nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines¹⁰⁷. Ce processus est donc naturel dans les cellules, mais il peut être détourné par les cellules cancéreuses afin d'empêcher l'action de certaines protéines comme des protéines suppresseur de tumeurs (p53, BRCA1, MTSS1,...)¹⁰⁸. Un facteur contrôlant ce processus de dégradation est l'ajout d'une ou plusieurs petites protéines ubiquitines (76 acides aminés pour un poids moléculaire de 8,5 kDa) sur les résidus lysines des protéines¹⁰⁹. Les protéines ubiquitinylées sont ensuite dégradées par le protéasome 26S. L'ajout d'ubiquitine sur les protéines est catalysé par trois grandes classes d'enzymes dépendantes de l'ATP, appelée E1 (« *ubiquitin-activating enzyme* »), E2 (« *ubiquitin-conjugating enzyme* ») et E3 (« *ubiquitin-protein ligase* »)¹¹⁰.

6.1 Complexes ligases E3 et complexes SCF (*Skp1-cullin1-F box*)

La cascade d'ubiquitination des protéines est composée de 3 enzymes dépendantes de l'ATP (voir *Figure 4*). La première enzyme, E1 (« *ubiquitin-activating enzyme* »), active l'ubiquitine par une réaction ATP-dépendante pour générer un intermédiaire, E1-Ub (l'ubiquitine étant liée à une cystéine interne de la protéine E1). A ce jour, il n'existe qu'une seule enzyme E1 identifiée. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un membre de la seconde famille d'enzymes E2 (« *ubiquitin-conjugating enzyme* ») pour former l'intermédiaire E2-Ub. Cette classe d'enzymes compte environ 40 membres. Enfin, la dernière étape est catalysée par une enzyme E3 (« *ubiquitin-protein ligase* ») qui permet le transfert de l'ubiquitine sur le substrat^{111,112}. La protéine cible peut être soit mono- ou poly-ubiquitinylée (sur des résidus différents ou en chaîne)^{113,114}. On dénombre plus de 600 protéines E3 chez l'homme. Si l'on considère la multitude de protéines qui sont sujettes à l'ubiquitination et surtout l'effet néfaste que pourrait entraîner une reconnaissance aberrante des protéines substrats, il n'est pas étonnant d'observer une si grande variété et modularité des ligases E3.

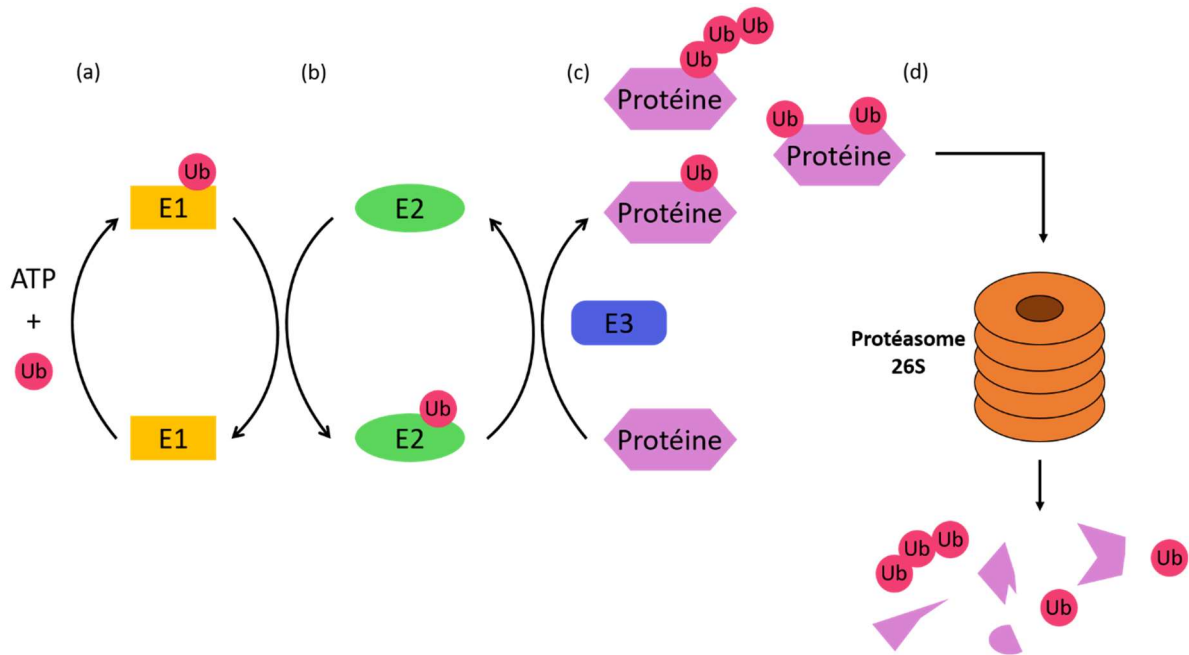


Figure 4 : Représentation du système ubiquitine-protéasome. (a) L'ubiquitine (Ub) est activée au moyen d'ATP pour permettre son transfert sur l'enzyme E1 (« ubiquitin-activating enzyme »). Il s'ensuit la formation d'un intermédiaire E1-Ub. (b) L'ubiquitine activée est ensuite transférée du site actif de l'enzyme E1 sur le site actif de l'enzyme E2 (« ubiquitin-conjugating enzyme ») et pour former un intermédiaire E2-Ub. (c) L'intermédiaire E2-Ub interagit ensuite avec la ligase à ubiquitine E3 (« ubiquitin-protein ligase ») qui transfère le groupement Ub sur son substrat (protéine). Selon les cas, la protéine cible peut se dissocier du complexe E3 (protéine mono-ubiquitinylée) ou subir plusieurs étapes d'ajout d'ubiquitine (protéine poly-ubiquitinylée). (d) Les protéines modifiées sont adressées au protéasome 26S pour clivage protéolytique. Adapté de (Deshaies & Joazeiro, 2009)¹¹⁶.

Les protéines ligases E3 sont divisées en trois grandes familles^{115,116}. La première comprend les ligases contenant un domaine HECT (« homologous to the E6AP carboxyl terminus »)¹¹⁷. Cette famille compte environ une vingtaine de membres et catalyse le transfert de l'ubiquitine au substrat en deux étapes : l'ubiquitine provenant de l'intermédiaire E2-Ub est transférée sur une cystéine catalytique de l'enzyme E3 et ensuite de la protéine E3 sur le substrat¹¹¹. Un schéma du mécanisme est repris à la *Figure 5a*. Les protéines appartenant à cette famille présentent une architecture bilobaire avec un domaine HECT (catalytique) du côté C-terminale et un domaine d'interaction avec la protéine activée E2-Ub du côté N-terminale. Les deux domaines sont reliés par une partie charnière flexible qui permet des changements dans l'orientation relative des deux lobes lors du transfert de l'ubiquitine¹¹⁸. L'activité catalytique des protéines HECT est régulée par des interactions intramoléculaires qui maintiennent la protéine dans un état d'auto-inhibition. Cet état peut être relâché en

réponse à divers signaux comme par exemple la phosphorylation de résidus ou des interactions protéine-protéine¹¹⁹.

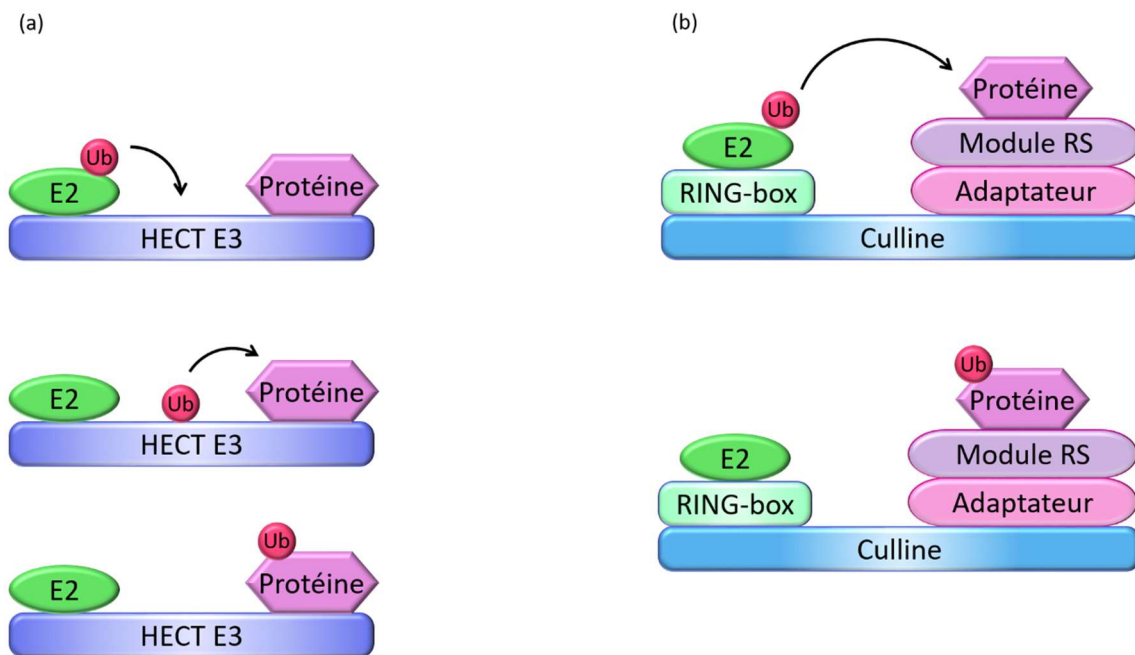


Figure 5 : Mécanisme de transfert de l'ubiquitine pour les familles de ligase HECT (a) et cullin-RING (b). Module RS = module de reconnaissance du substrat. Adapté de (Deshaies & Joazeiro, 2009)¹¹⁶.

La seconde famille correspond aux ligases RBR (« *RING-between RING-RING* »). Cette famille est peu connue mais catalyse le transfert de l'ubiquitine en deux étapes (comme pour les protéines HECT). Le premier domaine RING1 serait responsable du recrutement du complexe E2-Ub, alors que le second domaine RING2 de l'activité catalytique¹²⁰.

La troisième famille est la plus importante et correspond aux protéines ligases RING (« *Really Interesting New Gene* ») et est caractérisée par la présence d'un domaine liant le zinc, appelé RING, ou d'un domaine U-box qui assure la même fonction mais sans ion de zinc¹²¹. Ces domaines (RING ou U-box) sont chargés de recruter l'ubiquitine activée portée par le complexe E2-Ub¹²². Les ligases RING servent d'intermédiaire dans le transfert direct de l'ubiquitine sur le substrat en jouant le rôle d'échafaud moléculaire pour orienter correctement le complexe E2-Ub et la protéine substrat. Ces protéines peuvent fonctionner sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère¹¹⁵. Certaines ligases appartenant à la famille RING sont composées

de plusieurs unités comme le complexe APC/C (« *anaphase-promoting complex/cyclosome* »), avec 19 sous-unités différentes, ou les complexes CRL (« *cullin-RING ligase* »)¹²³. Les complexes CRL sont une classe de ligases très variées présentant des caractéristiques communes. Ils sont assemblés autour d'une protéine centrale, la Culline, qui lie une protéine « RING-box » du côté N-terminale et une protéine adaptatrice ainsi qu'un récepteur au substrat (module RS) du côté C-terminale (voir *Figure 5b*)¹²⁴⁻¹²⁶. L'exemple qui nous intéresse dans cette étude est le complexe SCF ^{β -TRCP}. Celui-ci est composé d'un cœur catalytique CUL1•RBX1 (Culline 1 et *Ring box 1*) lié à un module de reconnaissance du substrat variable FBP•SKP1 (*F box protein* = β -TRCP, responsable de la liaison du substrat, et SKP1 qui est la protéine adaptatrice)¹²⁷. Plus d'une centaine de protéines à boîte F (motif composé d'une cinquantaine d'acides aminés formant trois hélices alpha et identifié pour la première fois au sein de la protéine Cycline F) ont déjà été trouvées, laissant penser que ce complexe serait responsable du contrôle de la dégradation d'une grande partie des protéines.

6.2 CAND1 régulateur des complexes SCF

Au vu de l'importance des complexes SCF dans la cellule, il existe des mécanismes de régulation. La protéine CAND1 (« *cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1* ») a été identifiée comme partenaire de la Culline 1 et, dans un premier temps, a été reconnue comme inhibiteur des complexes SCF. Des études ont montré par la suite que CAND1 favorise la dissociation du module de reconnaissance au substrat (RS) de la Culline 1¹²⁸.

Le mécanisme de contrôle exercé par CAND1 consiste en une régulation dans le temps de la formation des complexes⁹³. En effet, il a été montré qu'un complexe SCF-1 pouvait se dissocier et se reformer pour donner lieu à un complexe SCF-2 pouvant ubiquitiner de nouvelles cibles (changement de protéine à boîte F). Ce mécanisme dynamique est rendu possible par CAND1. Cette protéine joue donc le rôle de facteur d'échange du module de reconnaissance du substrat et permet ainsi de balayer tout le répertoire des protéines à boîte F possible. Cette dynamique permet ainsi à la cellule de

répondre à ses besoins immédiatement^{110,129}. Le mécanisme de formation des complexes SCF par CAND1 est repris à la *Figure 6*.

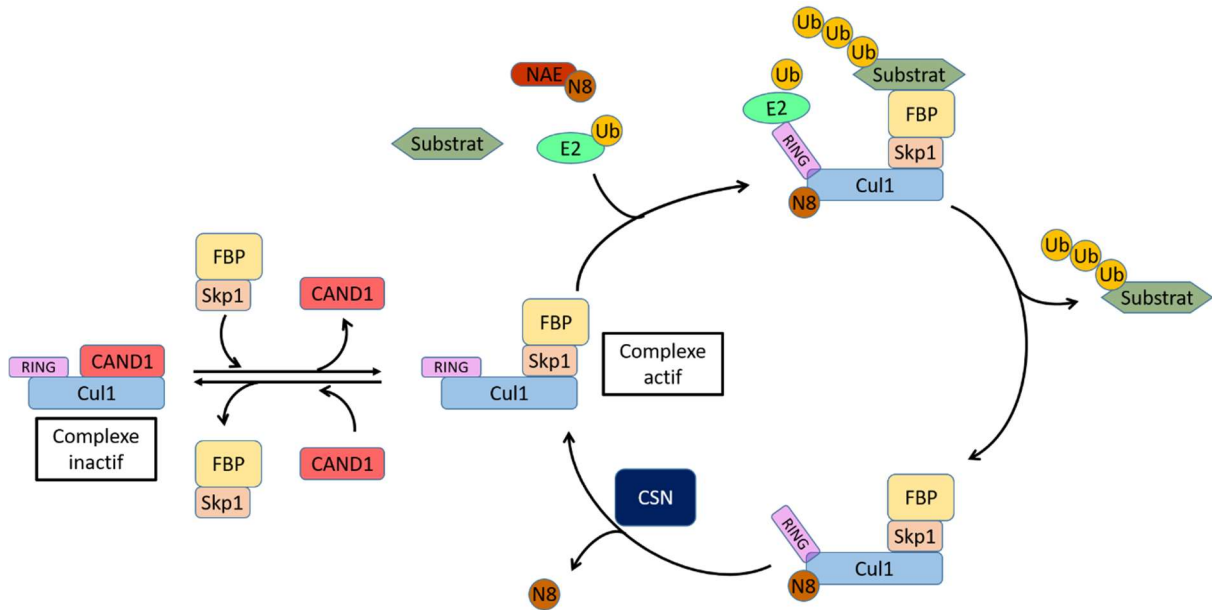


Figure 6 : Mécanisme de formation des complexes SCF (Skp1-cullin1-F box). Les abréviations suivantes ont été utilisées : cul1 = culline 1, RING = RING box protein, FBP = F box protein, NAE = Nedd8-activating enzyme, N8 = Nedd8 et CSN = « *COP9 signalosome complex* ». Adapté de (Reitsma, Liu, et al., 2017)¹⁰⁹.

Il y a donc un équilibre constant entre le complexe CUL1-CAND1 (complexe inactif) et le complexe CUL1-SKP1-FBP (complexe actif). Cet échange est contrôlé par la conjugaison de Nedd8 sur la culline 1^{130,131}. Quand le substrat se lie sur le complexe SCF, Nedd8 stimule la réaction de transfert de l'ubiquitine et empêche CAND1 de venir déloger le module de reconnaissance du substrat (SKP1-FBP). Une fois que le substrat est ubiquitinylé, il se dissocie du reste du complexe SCF. Nedd8 est ensuite retiré au moyen d'un complexe à activité iso-peptidase (COP9 signalosome, CSN) permettant à CAND1 de catalyser l'échange des modules de reconnaissance du substrat¹³². La formation d'un complexe SCF particulier à un temps donné est déterminé par la disponibilité des différents substrats dans la cellule¹³³.

7 Stratégie générale

Les différents points traités dans cette introduction permettent de poser les bases pour les éléments qui seront abordés tout au long de ce travail. La présentation des résultats suivra une stratégie générale comme présenté ci-dessous à la *Figure 7*. Celle-ci repose sur 2 voies (caractérisation de la structure d'une part et de la fonction d'autre part) qui permettent d'acquérir des résultats indépendamment l'une de l'autre. Elle présente donc l'avantage de pouvoir continuer à générer des données sur la protéine TMEM45A même si des difficultés sont rencontrées dans l'une des deux approches.

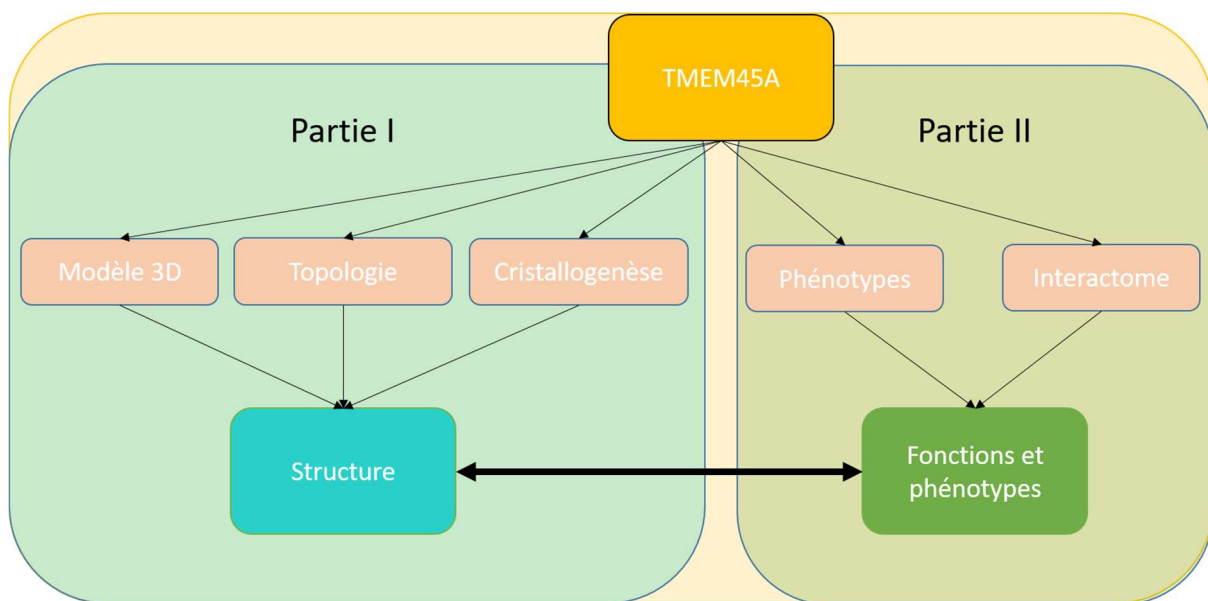


Figure 7 : Schéma représentant la stratégie de ce projet. Celle-ci se compose de deux approches permettant d'étudier la structure et la fonction de la protéine TMEM45A de manière indépendantes.

Les résultats traiteront, dans un premier temps, de l'étude structurale visant à déterminer la structure de TMEM45A. Cette partie sera composée de trois approches différentes que sont la modélisation, la détermination de la topologie et la cristallographie. La seconde partie des résultats est consacrée à l'étude des phénotypes de migration et prolifération associés à la déplétion de la protéine TMEM45A au sein des cellules cancéreuses triples négatives. Les mécanismes et voies cellulaires responsables de ces phénotypes seront investigués par immunoprécipitation et spectrométrie de masse. Cette seconde partie sera présentée sous la forme d'une ébauche de publication.

II. Résultats et discussion

Partie 1 :

Caractérisation structurale de la protéine membranaire 45A (TMEM45A)

Avant-propos

La première partie de la thèse concerne l'investigation de la structure de la protéine TMEM45A. Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été envisagées et/ou appliquées. La première consiste en la prédiction de la structure sur base d'un modèle par homologie pour ensuite essayer de la confirmer de manière expérimentale. La validation se base sur l'observation de variations de poids moléculaire de la protéine d'intérêt générées lorsqu'un site de glycosylation est inséré dans les boucles cytosoliques de la protéine. Ces variations de poids moléculaire sont visibles en Western Blot. Cette stratégie nécessite donc plusieurs prérequis que sont 1) la construction de plasmides codant pour TMEM45A, 2) la validation de ces plasmides par transfection dans les cellules et 3) la validation des anticorps en Western Blot. Cependant, malgré la validation de la stratégie pour une autre protéine membranaire (NDC1)¹³⁴, les résultats obtenus pour TMEM45A n'ont pas pu conduire à une étude poussée dans le domaine structural. En effet, le manque d'anticorps spécifiques pour cette protéine est un frein à son étude. Les résultats discutés dans cette partie présentent donc le cheminement suivi pour essayer de mettre en œuvre la stratégie envisagée et les différents résultats obtenus. La principale limitation rencontrée, l'absence d'anticorps spécifique à TMEM45A, nous a conduit à conclure à l'impossibilité de mettre en œuvre cette stratégie.

1 Génération des modèles topologiques et tridimensionnels

En 2005, Wrzesiński et ses collaborateurs⁸⁹ ont étudié une série de protéines transmembranaires dont TMEM45A. Dans leur étude, la localisation de TMEM45A a été prédite par la méthode des k-plus proches voisins (k-NN : « k-nearest neighbors »). En reconnaissance de forme ou de structure, l'algorithme des k plus proches voisins (k-NN) est une méthode utilisée pour la classification d'entrées. Un objet d'entrée est

classifié selon le résultat majoritaire des statistiques de classes d'appartenance de ses k plus proches voisins, (k est un nombre entier positif généralement petit). Si $k = 1$, alors l'objet est assigné à la classe d'appartenance de son proche voisin. Ainsi sur base de la séquence en acides aminés de TMEM45A et de ses plus proches « voisins », ces auteurs ont pu prédire sa localisation dans le réticulum endoplasmique avec une incertitude sur le nombre de segments transmembranaires (cinq ou sept). En 2014, Hayez et al.⁸⁸ ont montré, par analyse en microscopie confocale, que la protéine était localisée dans l'appareil de Golgi et plus spécifiquement dans le trans-Golgi (co-localisation de TMEM45A avec la golgine-97).

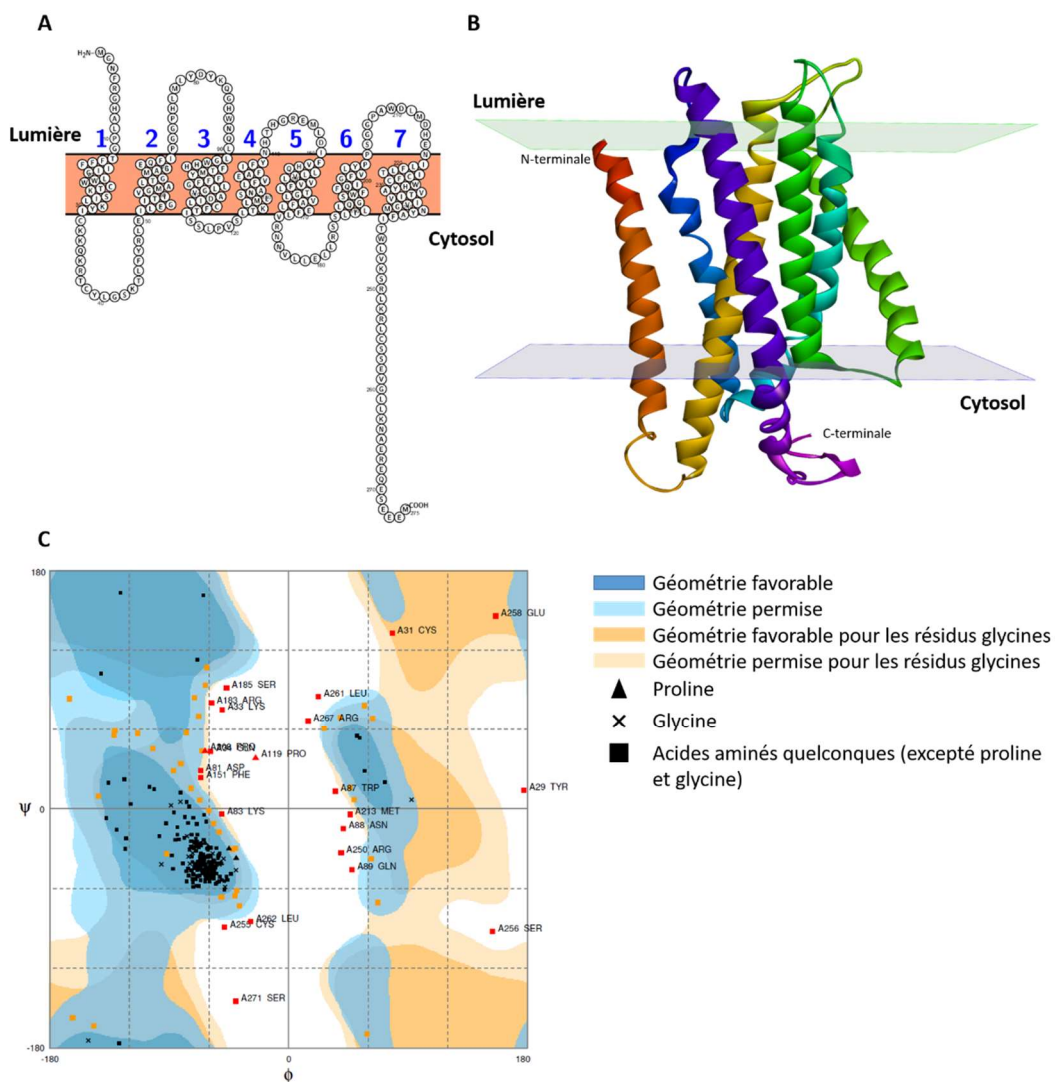


Figure 8 : Modèles prédictifs de la topologie de TMEM45A. A) Représentation graphique du modèle topologique de TMEM45A (généré à partir de Protter). B) Modèle par homologie et reconnaissance de « fold » de TMEM45A (iTasser). C) Graphe de Ramachandran associé au modèle (obtenu par iTasser) de la protéine TMEM45A.

En vue d'obtenir rapidement des informations sur la structure de la protéine, l'option des modèles a été choisie. Pour ce faire, la séquence de TMEM45A répertoriée dans la base de données UniProt (référence Q9NWC5) a été soumise à des serveurs web tels que TOPCONS et CCTOP qui permettent de prédire le nombre de segments transmembranaires (sur base du profil d'hydropathie) ainsi que l'orientation N- et C-terminale des protéines membranaires^{87,135–137}. Ces deux serveurs comparent différents algorithmes (OCTOPUS, Philius, PolyPhobius, SCAMPI, SPOCTOPUS, HMMTOP, Membrain, Memsat-SVM, Pro, Prodiv, TMHMM) pour ensuite créer un modèle commun (consensus) qui reprend les informations générales générées par chacun des algorithmes. Chacun des deux serveurs prédit la protéine membranaire TMEM45A avec 7 segments transmembranaires et une orientation N-terminale dans la lumière de l'appareil de Golgi et C-terminale dans le cytoplasme. La *Figure 8A* reprend un schéma de la topologie de la protéine TMEM45A.

De manière à investiguer plus précisément la structure de TMEM45A, des modèles par homologie ont été générés grâce au serveur *ITASSER* (version classique et spécial GPCR)^{138–141}. Sur base d'une séquence en acides aminés, ce serveur recherche dans la base de données « *Protein Data Bank* »¹⁴², les homologues (« *hits* ») des protéines modèles connues qui présentent des éléments de structure secondaire proches. Ces différents éléments de structure secondaire doivent avoir au minimum 70% d'homologie de séquence avec la protéine cible (alignement local). Ils sont ensuite assemblés en un modèle complet par simulations Monte Carlo à échange de répliques. Les régions non alignées (principalement les boucles) sont construites par modélisation *ab initio* et leur géométrie est optimisée par identification des états de faible énergie (qui seront sélectionnés). La construction du modèle global de la protéine est réalisée par assemblage des différents éléments de structure secondaire identifiés auparavant. La structure totale générée est ensuite optimisée pour réduire les éventuels encombrements stériques. Pour finir, la topologie des boucles de la protéine est affinée par optimisation du réseau des liaisons hydrogènes intramoléculaires. La représentation du modèle le plus probable est reprise à la *Figure 8B*. De plus, le graphe de Ramachandran (généré avec le serveur *RAMPAGE*¹⁴³), repris à la *Figure 8C* indique que 91,6% des résidus composant la protéine et la totalité des résidus formant les hélices

α se retrouvent dans des zones de géométries (angles ψ et ϕ) favorables ou permises. Cependant, 8,4% des résidus se trouvent être dans des zones dites « non-permises ». Ces résidus se situent au niveau des boucles cytosolubles reliant les différents segments transmembranaires. Puisque ces boucles sont relativement de petites tailles (composées d'une dizaine d'acides aminés), il en résulte des contraintes géométriques plus importantes que pour des boucles plus grandes. La topologie proposée par cette seconde technique est très similaire à celle obtenue auparavant par Wrzesiński avec 7 hélices alpha jouant le rôle de segments transmembranaires. L'utilisation des différents serveurs web est détaillée dans la partie « matériel et méthodes ».

Les résultats obtenus par modélisation permettent de valider l'hypothèse des 7 segments transmembranaires émise par Wrzesiński *et al.* Cependant, ces résultats ne relèvent que de modélisation informatique théorique et il paraît bien évident que seule l'obtention d'une structure cristallographique pourrait confirmer de manière exacte la structure de TMEM45A.

2 Validation de la topologie

2.1 Stratégie mise en place

La validation de la topologie de manière expérimentale est un point clé dans la validation d'un modèle théorique. Nous avons envisagé une stratégie se basant sur des mutants d'insertion pour valider notre modèle théorique. Celle-ci consiste à insérer des sites de glycosylation par mutagenèse dirigée dans les boucles reliant les domaines transmembranaires et à observer une variation du poids moléculaire apparent de la protéine en Western Blot^{144–146}. Cette variation de poids moléculaire est la conséquence de la modification post-traductionnelle du site de glycosylation (Asn-X-Thr) par ajout « d'oligosides » (N-acétyl-glucosamine) sur la chaîne latérale du résidu asparagine (N-glycosylation) du site inséré. Comme présenté dans la *Figure 9*, seules les boucles se situant du côté luminal devraient être modifiées par glycosylation et par conséquent augmenter le poids moléculaire de la protéine. De manière naturelle, cette modification post-traductionnelle permet de former des arbres glycosidiques sur certaines protéines^{134,147}.

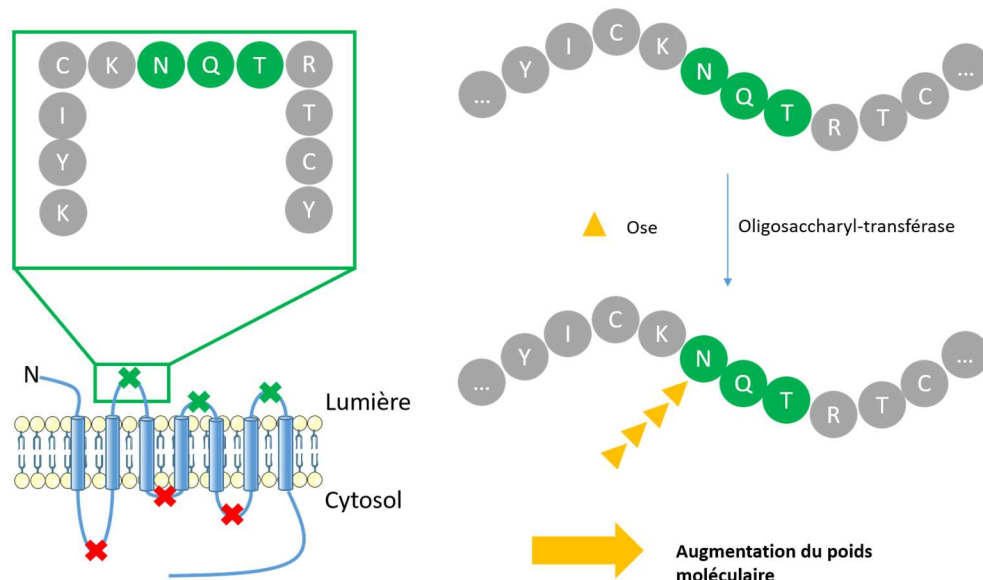


Figure 9 : Principe de la stratégie pour la validation de la topologie de TMEM45A. Des sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) sont ajoutés un à un dans les boucles cytosoliques de la protéine. Si la boucle est située à l'intérieur de l'appareil de Golgi (coté luminal), une oligosaccharyl-transférase devrait catalyser l'ajout d'oligosides sur l'acide aminé asparagine (Asn). Cette réaction conduit à la formation d'une chaîne oligosaccharidique, une des modifications post-traductionnelles majeures au sein des cellules.

Cette stratégie a été employée par Stavru et ses collaborateurs et validée pour la caractérisation de la topologie d'une autre protéine membranaire, TMEM48 (aussi appelée NDC1). Les auteurs ont démontré que l'ajout, par mutagenèse dirigée, de sites de glycosylation (Asn-Gln-Thr) dans les boucles « luminales » de la protéine a conduit à la formation d'arbre glycosidique. Cette modification a pu être observée par analyse Western Blot au moyen d'un anticorps spécifique de NDC1. En guise d'exemple, les résultats obtenus pour cette protéine sont présentés à la *Figure 10*¹³⁴.

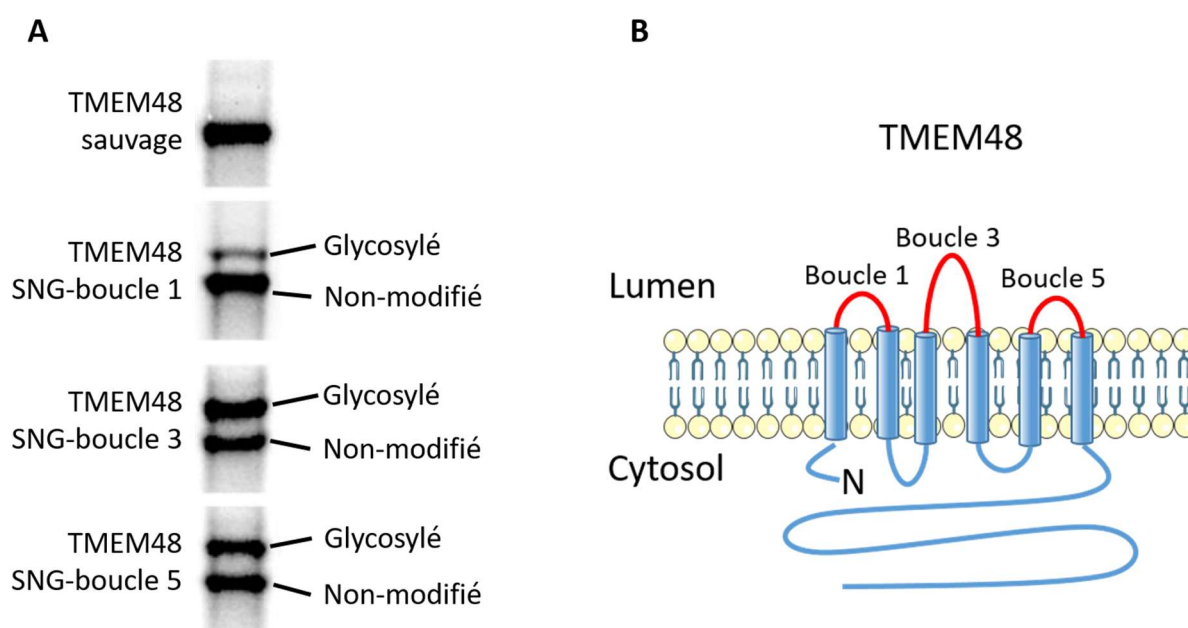


Figure 10 : Représentation schématique des résultats portant sur la topologie de la protéine TMEM48 obtenus par Stavru *et al.* A) Détection en Western Blot de la forme glycosylée de TMEM48 par insertion de site de N-glycosylation (SNG) dans les boucles 1, 3 et 5. B) Modèle topologique de la protéine TMEM48 avec mise en évidence de l'orientation N- et C-terminale et des boucles 1, 3 et 5 (en rouge) portant les sites de glycosylation.

L'analyse de l'état de glycosylation de TMEM48 a confirmé une topologie à 6 segments transmembranaires (dans la membrane du réticulum endoplasmique) avec une orientation des extrémités N- et C-terminales dans le cytosol. En effet, la glycosylation des résidus asparagines ne se produit qu'à l'intérieur du réticulum endoplasmique (côté luminal). Les variations de poids moléculaire observées sont de l'ordre de quelques kDa. La résolution des bandes de Western Blot semble donc être primordiale pour pouvoir obtenir des informations correctes quant à la présence de glycosylation sur les différentes parties de la protéine. Sur base de cette étude structurale de TMEM48, la

stratégie mise en œuvre semble donc être un bon point de départ pour une étude identique pour la protéine TMEM45A. De plus, des anticorps validés sont une nécessité pour permettre la mise en œuvre de cette stratégie. De manière générale, les anticorps, qu'ils soient commerciaux ou non, doivent être validés au préalable pour chacune des techniques pour lesquelles ils sont utilisés. Dans ce travail, ils doivent donc être validés pour l'analyse par Western Blot pour la stratégie mentionnée ci-dessus. Il faut également les valider pour un marquage en immunofluorescence pour observer en microscopie confocale les cellules transfectées à l'aide du plasmide d'expression de TMEM45A.

La protéine TMEM45A est très peu étudiée dans la littérature. De ce fait, peu d'informations (structure, fonction, localisation, partenaires,...) et d'outils (plasmides codant pour la protéine, anticorps, conditions d'extraction et de stabilité,...) sont disponibles. Il est donc nécessaire de mettre en place une série de prérequis pour pouvoir utiliser la stratégie présentée ci-dessus. Ce sont ces prérequis qui sont détaillés ci-dessous.

La première étape consiste à construire, par ingénierie biomoléculaire, des plasmides codant pour TMEM45A. Ceux-ci permettent d'une part de servir de base pour la construction des mutants par mutagenèse dirigée et ensuite de surexprimer la protéine sauvage ou mutée au sein des cellules. La seconde étape à envisager est la mise au point des conditions de transfection des différents plasmides dans les cellules HepG2 et Hek 293T. Cette première lignée (HepG2) a été choisie car il s'agit de la lignée cellulaire dans laquelle TMEM45A a été étudiée au laboratoire. Les cellules Hek 293T furent choisies pour leur grande capacité d'incorporation de l'ADN exogène (plasmide) et de l'expression de ce dernier. Cette surexpression pourra ensuite être validée au niveau ARNm par RT-qPCR (« *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction* ») et protéique par analyse par Western Blot. L'analyse par Western Blot de protéines membranaires est délicate à cause des difficultés d'extraction et de solubilisation de ces protéines. Cette technique nécessite ainsi la mise au point de conditions spécifiques (nature du détergent et du tampon pour l'extraction, température de dénaturation des échantillons, ...). L'absence d'anticorps spécifiques pour

TMEM45A sera compensée par l'utilisation de tags^a (étiquettes protéiques) et d'anticorps qui leur seront spécifiques.

2.2 Construction des plasmides codant pour TMEM45A

Un nombre limité de vecteurs codant pour TMEM45A sont commercialement disponibles. Ces vecteurs codent pour une protéine de fusion entre TMEM45A et un « tag » (à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine). Plusieurs de ces constructions sont accessibles au laboratoire : plpc_flag-TMEM45A^b, pDEST475_HA-TMEM45A^c et plx304_TMEM45A-V5^d. Pour éviter un effet potentiel du « tag » sur la structure de la protéine et sur les modifications post-traductionnelles dont elle fait l'objet, il est nécessaire de travailler avec la protéine sauvage, c'est-à-dire non taggée^{148–151}. Un plasmide codant pour l'isoforme à 275 acides aminés de TMEM45A a donc été généré par insertion de la séquence d'ADN codant dans un vecteur d'entrée de type pcDNA3.1 (+). Le vecteur nouvellement créé a été validé par séquençage ainsi que par digestion et

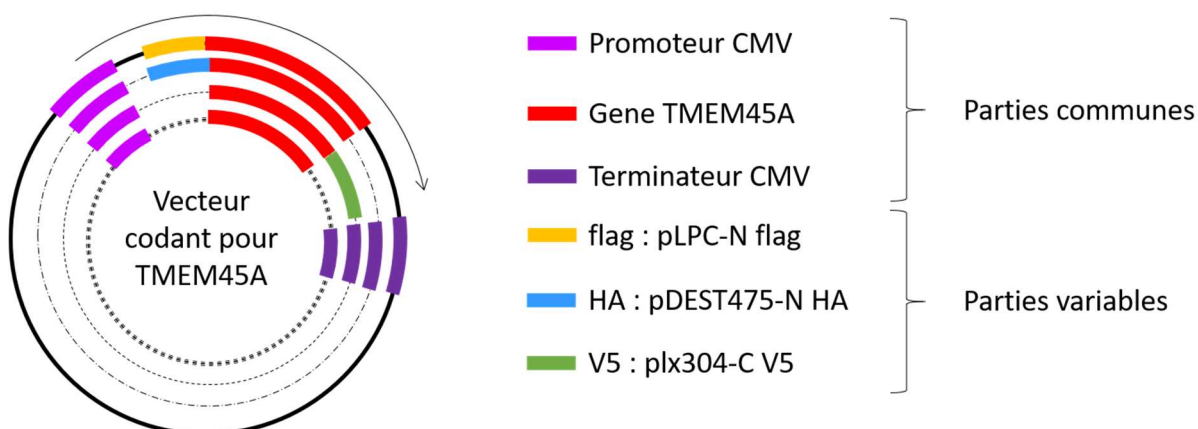


Figure 11 : Schéma reprenant les principales parties (promoteur, gène d'intérêt, tag et terminateur) des vecteurs utilisés. La lecture de la séquence d'ADN se déroule dans le sens de la flèche, soit du promoteur vers le terminateur.

^a Un tag, ou « étiquette », est une séquence en acides aminés qui est ajoutée par biologie moléculaire à une protéine. Il en résulte une protéine de fusion. L'ajout d'une étiquette moléculaire à une protéine permet de rendre l'analyse, la purification, la détection, ... plus simple en utilisant un anticorps dirigé contre ce tag. Cela permet donc de pallier l'absence d'anticorps reconnaissant la forme sauvage de la protéine. Cependant l'ajout d'une séquence supplémentaire à une protéine peut influencer sa structure finale.

^b Séquence de l'étiquette flag : DYKDDDDK.

^c L'étiquette HA correspond à une petite séquence de la protéine hémagglutinine du virus *Influenza* (grippe) : YPYDVPDYA.

^d L'étiquette V5 est dérivée d'un petit épitope de la protéine P et V du virus Simien 5 (SV5) de la famille paramyxovirus : GKPIPPLLGLDST.

analyse sur gel d'agarose. Une représentation graphique des vecteurs commerciaux et du plasmide généré est reprise à la *Figure 11*. Le plasmide que nous avons généré a ensuite été amplifié dans des bactéries compétentes de type *E. coli Dh10b* et purifié par méthode de précipitation à l'isopropanol. Le protocole suivi est décrit dans la partie matériels et méthodes.

2.3 Mise au point des conditions de transfection

La seconde étape consiste en la mise au point des conditions de transfection. La lignée cellulaire choisie est une lignée d'hépatocarcinome humain (HepG2). Cette lignée cellulaire est disponible au laboratoire et a largement été utilisée pour l'étude de la protéine TMEM45A¹⁸. Ce modèle est cependant également reconnu comme étant difficilement transfectable. Afin de contourner ce problème, nous avons testé différents agents de transfection : le FuGene® (Promega), le TurboFect® (ThermoFischer), le jetPRIME® (Polyplus-transfection) et la lipofectamine 2000® (ThermoFischer). La quantité d'ADN (plasmide codant pour TMEM45A = 10 µg) a été gardée constante pour chacun des agents. Seul le rapport ADN/agent de transfection a été adapté en fonction des recommandations du fabricant, respectivement 1 : 5, 1 : 3, 1 : 2 et 1 : 3. Avant de réaliser cette expérience avec le plasmide encodant la protéine TMEM45A, un plasmide codant pour la protéine GFP (plpc_GFP), qui permet une visualisation rapide par microscopie à fluorescence et ne nécessite donc pas toutes les étapes de traitement en immunofluorescence, a été utilisé. Deux temps d'incubation ont été sélectionnés : 24h et 48h. La *Figure 12* reprend les résultats obtenus.

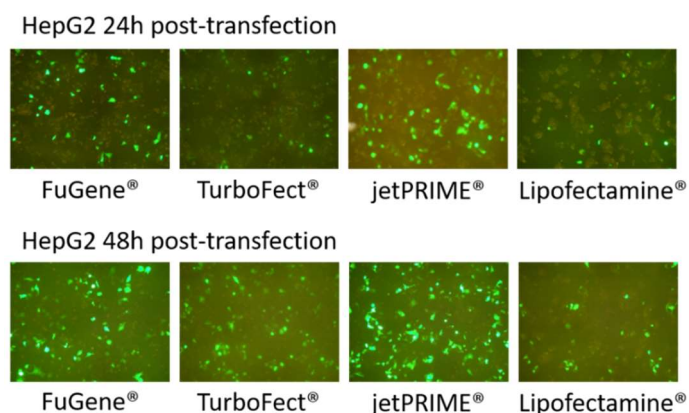


Figure 12 : Image par microscopie à fluorescence de cellules HepG2 transfectées avec le plasmide plpc_GFP. Les cellules vertes représentent les cellules ayant incorporé l'ADN exogène et surexprimant la GFP.

La *Figure 12* montre que les agents de transfection les moins efficaces dans cette expérience sont la Lipofectamine 2000® et le TurboFect®, alors que le FuGene® et le jetPRIME® montrent une meilleure efficacité. Un temps d'incubation plus long (48 heures) semble aussi avoir un impact sur la production de la protéine GFP au sein des cellules. Le signal obtenu pour la GFP, avec les meilleurs agents de transfection dans les meilleures conditions, correspond à environ 15 % de cellules transfectées. Au vu des résultats obtenus, une question se pose pour la suite du projet : la faible efficacité de transfection des cellules HepG2 permettra-t-elle de détecter correctement TMEM45A en western blot et en immunofluorescence ?

Afin de contourner ce problème, et de manière comparative avec la lignée HepG2, le TurboFect® et le jetPRIME® ont été testés dans les mêmes conditions sur la lignée cellulaire Hek293T (cellules embryonnaires du rein). Il peut être observé à la *Figure 13* que l'efficacité de transfection est bien plus élevée dans la lignée cellulaire Hek293T que dans les cellules HepG2.

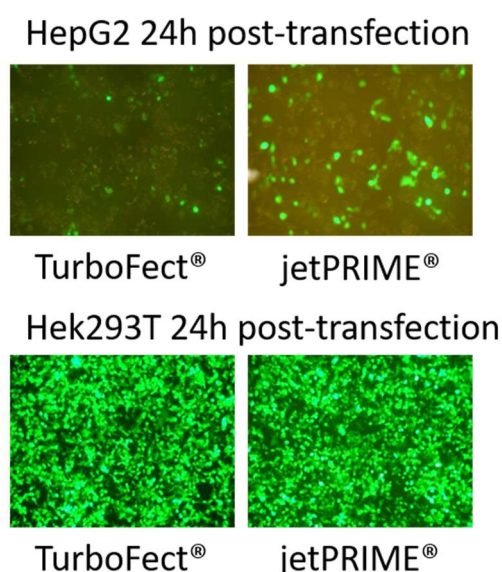


Figure 13 : Image par microscopie à fluorescence de cellules Hek293T (cellules embryonnaires du rein) et de cellules HepG2 transfectées avec le plasmide plpc_GFP. Les cellules vertes représentent les cellules ayant incorporé l'ADN exogène et exprimant la GFP.

2.4 Validation par RT-qPCR

Après la sélection des conditions de transfection (jetPRIME® et 48h post-transfection), une mise au point de la détection de TMEM45A a été menée. Celle-ci doit se faire à deux niveaux. Le premier consiste à déterminer le niveau (quantité) d'ARN messager (par RT-qPCR) codant pour la protéine d'intérêt^{152,153} et le second à détecter la cible de « manière protéique » par Western Blot et/ou immunofluorescence¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. En effet, le niveau d'ARN messager d'une protéine n'est pas lié à l'abondance de cette protéine dans la cellule. Il est donc important de corrélér à chaque fois le niveau d'ARN avec le niveau d'expression protéique d'une cible¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Dans le cadre de la protéine TMEM45A sauvage (pcDNA3.1_TMEM45A), la variation de l'expression relative de la quantité d'ARN messager (« fold induction ») a été déterminée après transfection (jetPRIME® et 48h post-transfection) dans les cellules HepG2 et Hek293T. Ce « fold induction » est de 21 fois pour les cellules HepG2 et 2272 fois pour les cellules Hek293T. Ce résultat est concordant avec celui obtenu avec le plpc_GFP qui montre clairement que dans le cas des cellules Hek293T, l'efficacité de transfection (du plasmide codant pour la GFP) est meilleure que pour les cellules HepG2.

2.5 Validation par marquage en immunofluorescence

Le modèle choisi pour la validation des anticorps ciblant TMEM45A est la lignée Hek293T. Le choix s'est porté sur ce modèle cellulaire pour plusieurs raisons. Les principales sont l'efficacité de transfection élevée et une bonne production de la cible au niveau protéique¹⁶¹. La première technique de validation sélectionnée est le marquage en immunofluorescence et la visualisation par microscopie confocale des cellules¹⁶². Plusieurs anticorps de TMEM45A sont disponibles commercialement mais seulement trois sont préconisés pour les marquages en immunofluorescence : 1) Anti-TMEM45A de la firme Sigma Aldrich®, 2) Anti-TMEM45A (C-13) de la firme Santa Cruz® et 3) Anti-TMEM45A de la société ABCAM®. Le premier anticorps provenant de chez Sigma Aldrich® a largement été utilisé dans les précédentes études de TMEM45A au sein du laboratoire. Cependant, la production a été interrompue par la firme au tout début de ce travail. Cet anticorps ne sera donc pas utilisé malgré sa validation dans de nombreux modèles et techniques de biologie. Celui-ci sera

uniquement utilisé en tant que comparaison avec les autres anticorps. Il reste donc à valider un des deux autres anticorps primaires ciblant la protéine TMEM45A. Pour ce faire, des cellules Hek293T ont été transfectées avec le plasmide pcDNA3.1_TMEM45A (forme sauvage) dans les conditions établies précédemment.

La *Figure 14* montre un marquage en immunofluorescence de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide codant pour la forme sauvage de TMEM45A (pcDNA3.1_TMEM45A). Deux marquages différents de la protéine ont été réalisés au moyen des anticorps primaires anti-TMEM45A de la firme Santa Cruz[®] (C-13) ou de la firme ABCAM[®]. Il peut être constaté que les deux anticorps permettent un marquage en immunofluorescence et qu'un signal est détecté en vert pour chacun d'eux.

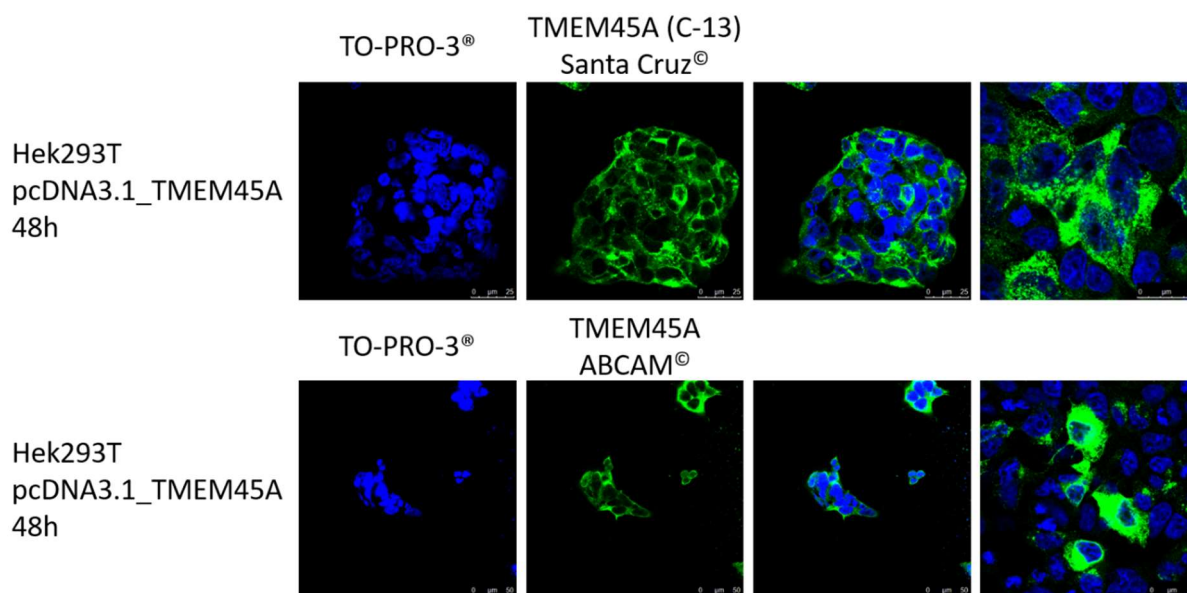


Figure 14 : Marquage en immunofluorescence de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pcDNA3.1_TMEM45A (forme sauvage). Les noyaux sont marqués au TO-PRO-3[®] et sont représentés en bleu. La protéine TMEM45A est marquée (en vert), soit avec l'anticorps anti-TMEM45A de la firme Santa Cruz[®] (ligne du haut), soit avec celui de la firme ABCAM[®] (ligne du bas). Pour chaque anticorps, la troisième image représente une superposition des deux images précédentes. La quatrième, quant à elle, est une image de ces mêmes cellules à un grossissement plus élevé.

La localisation de TMEM45A a été montrée dans la littérature comme étant dans l'appareil de Golgi⁸⁸. Cet organite cellulaire se trouve à priori à proximité du noyau¹⁶³. Dans la figure précédente (*Figure 14*), il est constaté que le marquage de la protéine membranaire TMEM45A n'est pas localisé comme attendu aux alentours du noyau (membrane de l'appareil de Golgi). Le marquage est plutôt « diffus » dans la cellule et

s'observe partout au sein de cette dernière. Un moyen de vérifier la localisation de la protéine au sein de la cellule est de faire différents marquages avec des protéines constitutives d'un organe donné et de chercher dans quels cas une co-localisation est observée. Dans le cas présent, deux questions se posent : 1) est-ce un marquage aspécifique de l'anticorps pour d'autres protéines au sein de la cellule ? ou 2) est-ce la surexpression de TMEM45A qui est trop importante et donc induit une agrégation de la protéine conduisant à une localisation dans le cytosol ? De manière à répondre à la première question, il a été décidé de comparer un marquage en immunofluorescence de la protéine TMEM45A avec un marquage de la protéine par son « tag » (HA ou flag). En général, les anticorps ciblant un « tag » sont beaucoup plus spécifiques que les anticorps visant une protéine « endogène ». Cela s'explique par le fait que comme le « tag » n'est pas une séquence naturelle, il y a peu de chance de la retrouver dans la séquence de protéines endogènes. Concernant la seconde question, il est connu dans la littérature que l'expression d'une protéine en grande quantité (niveau non physiologique) peut entraîner un mauvais repliement de celle-ci et conduire à son agrégation et/ou à une localisation subcellulaire anormale ¹⁶⁴⁻¹⁶⁷.

La *Figure 15* reprend un marquage en immunofluorescence de cellules Hek293T transfectées avec soit le plasmide pDEST475_HA-TMEM45A ou soit le plasmide plpc_flag-TMEM45A. Pour chaque condition, le marquage de TMEM45A a été réalisé avec l'anticorps anti-TMEM45A (C-13) de chez Santa Cruz[®]. Les « tags », HA et flag, ont été respectivement marqués avec un anticorps anti-HA et anti-flag (anti-DDDDK). Le marquage de la protéine cible (par l'anticorps visant TMEM45A ou par celui reconnaissant le « tag ») ne semble pas être identique. En effet, pour l'anticorps anti-TMEM45A, un marquage plus généralisé (diffus au niveau du cytosol) dans la cellule peut être observé comme dans la figure précédente. Concernant le marquage des « tags » HA ou flag, il peut être observé que celui-ci est plus localisé autour du noyau et forme des points focaux plus définis. On observe donc une différence dans le marquage de la protéine TMEM45A en fonction de la révélation choisie (anti-TMEM45A ou « anti-tags »). Il semblerait donc que l'anticorps (anti-TMEM45A) utilisé marque la protéine d'intérêt mais aussi d'autres protéines présentes au sein des cellules (marquage aspécifique). Il n'est pas envisageable que le marquage observé

corresponde à la protéine TMEM45A endogène, puisque celle-ci n'est pas exprimée dans la lignée cellulaire Hek293T. Il aurait été intéressant de réaliser un co-marquage (TMEM45A + « tag ») sur le même échantillon de façon à mieux mettre en évidence le marquage non spécifique lié à l'anticorps anti-TMEM45A utilisé.

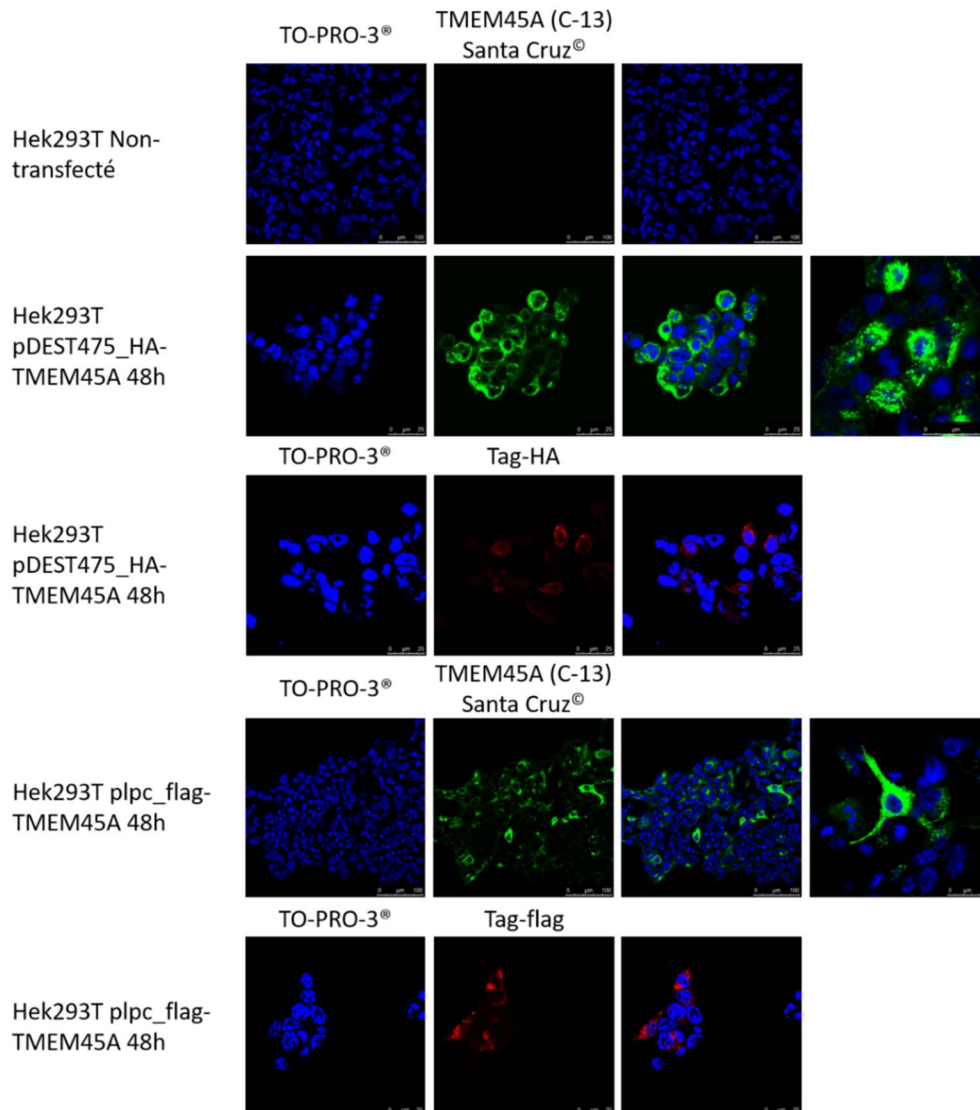


Figure 15 : Marquage en immunofluorescence de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pDEST475_HA-TMEM45A ou plpc_flag-TMEM45A. Les noyaux sont marqués au TO-PRO-3® et sont représentés en bleu. La protéine TMEM45A (en vert) est marquée avec l'anticorps anti-TMEM45A de la firme Santa Cruz®. Le « tag » HA ou flag est marqué (en rouge) avec son anticorps correspondant. Les images de la troisième colonne représentent une superposition des deux images précédentes.

De manière comparative, un marquage de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pDEST475_HA-TMEM45A a été réalisé avec l'anticorps anti-TMEM45A de chez Sigma Aldrich® (dont la production a été interrompue). A la *Figure 16*, il est observé qu'avec les mêmes conditions qu'utilisées précédemment, un marquage

différent est obtenu. En effet, lors de l'utilisation de l'anti-TMEM45A de chez Sigma Aldrich[®], des spots sont observés à la périphérie du noyau, ce qui n'était pas le cas pour les 2 anticorps TMEM45A ((C-13) *Santa Cruz*[®] et ABCAM[®]) précédemment utilisés. Le marquage avec l'anticorps ciblant le « tag », donne le même type de signal que dans l'expérimentation précédente. Ceci confirme donc que les « tags » (HA ou flag) permettent une bonne détection de la protéine TMEM45A. Du fait de sa meilleure spécificité (anti-TMEM45A Sigma Aldrich[®]), le bruit de fond qui lui est associé est plus faible et permet donc d'avoir une meilleure visualisation de la protéine en immunofluorescence (par rapport aux autres anticorps). La superposition du canal de TMEM45A (en vert) et du « tag » HA (en rouge), laisse apparaître des « spots jaunes », indiquant une co-localisation entre les deux types de marquages (vert et rouge). Ce résultat confirme donc que l'anticorps provenant de la firme Sigma Aldrich[®] a une meilleure spécificité pour la protéine TMEM45A en comparaison avec les autres anticorps commercialement disponibles. L'utilisation des « tags » est donc une bonne alternative dans ce cas de figure.

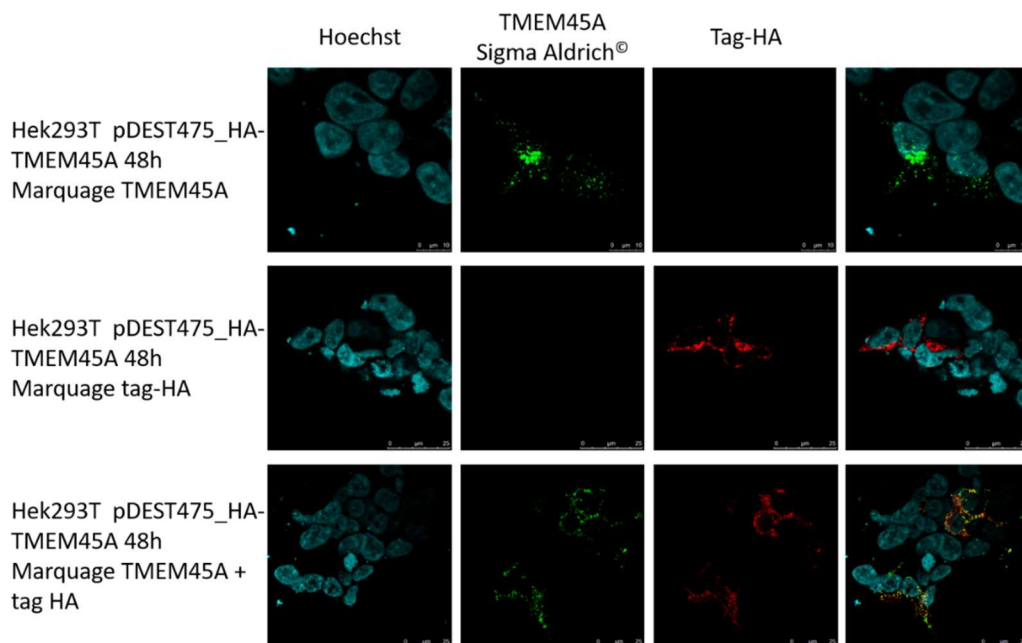


Figure 16 : Marquage en immunofluorescence de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pDEST475_HA-TMEM45A. Les noyaux sont marqués au colorant de Hoechst et sont représentés en bleu clair. La protéine TMEM45A (en vert) est marquée avec l'anticorps anti-TMEM45A de la firme Sigma Aldrich[®]. Le « tag » HA est marqué (en rouge) avec un anti-HA de chez Cell Signaling[®]. La dernière image représente une superposition des trois images précédentes. Le co-marquage de deux anticorps, observé en jaune, consiste en une superposition de vert et de rouge.

2.6 Validation par technique de Western Blot

La seconde méthode utilisée pour la validation des anticorps est le Western Blot. Cette technique semi-quantitative occupe une place importante en biologie et permet de détecter et identifier des protéines spécifiques. Il est important de noter qu'un anticorps pouvant être utilisé en immunofluorescence n'est pas automatiquement transposable à la technique de Western Blot. En effet, la reconnaissance protéine-anticorps se base sur un principe de reconnaissance antigène-anticorps. L'anticorps reconnaît une séquence particulière de l'antigène, appelé épitope. La structure de l'épitope doit donc être complémentaire avec le site de fixation de l'anticorps. La structure mise en jeu peut être soit la structure primaire (épitope séquentiel) ou soit la structure tertiaire (épitope de conformation). Dans le cas du Western Blot, les protéines subissent une étape de dénaturation avant d'être séparées par gel d'électrophorèse et transférées sur membrane pour analyse. Les protéines transférées ne présentent donc plus une structure tertiaire native (elles sont dépliées). Les anticorps utilisés en Western Blot doivent donc être capables de reconnaître une séquence primaire d'acides aminés. Dans le cas du marquage, ce sont les protéines natives qui sont marquées. Les anticorps utilisés doivent donc en plus d'être capables de reconnaître une séquence primaire d'acides aminés spécifiques, reconnaître la structure tertiaire du peptide associé à la protéine. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher des anticorps ciblant la protéine d'intérêt et étant compatibles avec cette deuxième technique. Pour ce faire, un lysat cellulaire de Hek293T surexprimant ou non TMEM45A (sauvage ou avec « tag ») est analysé par Western Blot. Dans cette expérience, les mêmes échantillons ont été chargés sept fois pour être détectés dans sept conditions différentes. Il est également important de noter que toutes les étapes doivent être réalisées à 4°C, depuis la migration sur gel SDS-PAGE jusqu'au transfert sur membrane de nitrocellulose, afin de pouvoir observer correctement la protéine. De plus, la protéine n'est jamais observée au poids moléculaire attendu de plus ou moins 32 kDa mais plutôt aux alentours de 25 kDa. L'explication de ces particularités viendra par la suite dans la rubrique « Mise au point des conditions de Western Blot ».

La *Figure 17A* montre que les différents anticorps anti-TMEM45A (anti-TMEM45A (C-13), (Y-16) et (P-18) *Santa Cruz*® et anti-TMEM45A ABCAM®) utilisés ne permettent pas tous de détecter la surexpression de la protéine d'intérêt. En effet, la bande associée à la protéine est plus ou moins visible en fonction de l'anticorps. De plus, il peut être remarqué que pour certains anticorps comme l'anti-TMEM45A (C-13) et anti-TMEM45A (P-18), la protéine apparaît sous « forme de trainée » (*smear*) sur la membrane de Western Blot. Pour d'autres anticorps, anti-TMEM45A (Y-16) et anti-TMEM45A ABCAM®, aucune bande n'est détectée. En vue de faciliter la validation des anticorps, les constructions de TMEM45A fusionnée à un « tag » HA (pDEST475_HA-TMEM45A), V5 plx304_TMEM45A-V5 et flag (plpc_flag-TMEM45A) ont été utilisées. De cette manière, la protéine a pu être révélée soit par un anticorps spécifique pour TMEM45A ou soit par un anticorps ciblant le « tag ». L'utilisation des « tags », pour la révélation de la protéine, a été validée comme observé à la *Figure 17A*. Dans le cas de l'anticorps anti-HA, deux bandes apparaissent. La plus élevée possède un poids moléculaire de plus ou moins 32 kDa et la plus basse d'environ 25 kDa. Cette double bande n'est pas observée avec les anticorps anti-V5 et anti-flag (une seule bande à 25 kDa). Des données cliniques (non publiées) provenant d'un patient atteint d'un cancer tête et cou (carcinome d'une glande sous-maxillaire) ont montré une mutation du gène codant pour TMEM45A. La mutation consiste en une translocation d'une partie du gène qui correspondrait à une perte des 64 premiers acides aminés (en N-terminale) et donnant lieu à une isoforme de 211 acides aminés. Le poids moléculaire théorique de cette nouvelle forme est d'environ 25 kDa. Cependant, l'hypothèse de cette mutation n'est pas envisageable dans notre modèle puisque nous utilisons des constructions de TMEM45A fusionnée à des « tags », aussi bien en N- que C-terminale, et que ceux-ci sont détectés quelles que soient leur position.

La *Figure 17B* présentée ci-dessus est un exemple type de bandes aspécifiques observées lors de l'utilisation d'anticorps anti-TMEM45A pour la révélation de cette protéine. Le cas présent, l'anticorps anti-TMEM45A (P-18) de chez *Santa Cruz*® a été utilisé. Des bandes aspécifiques similaires sont observées avec chacun des anticorps anti-TMEM45A (C-13), (Y-16) et ABCAM® utilisés.

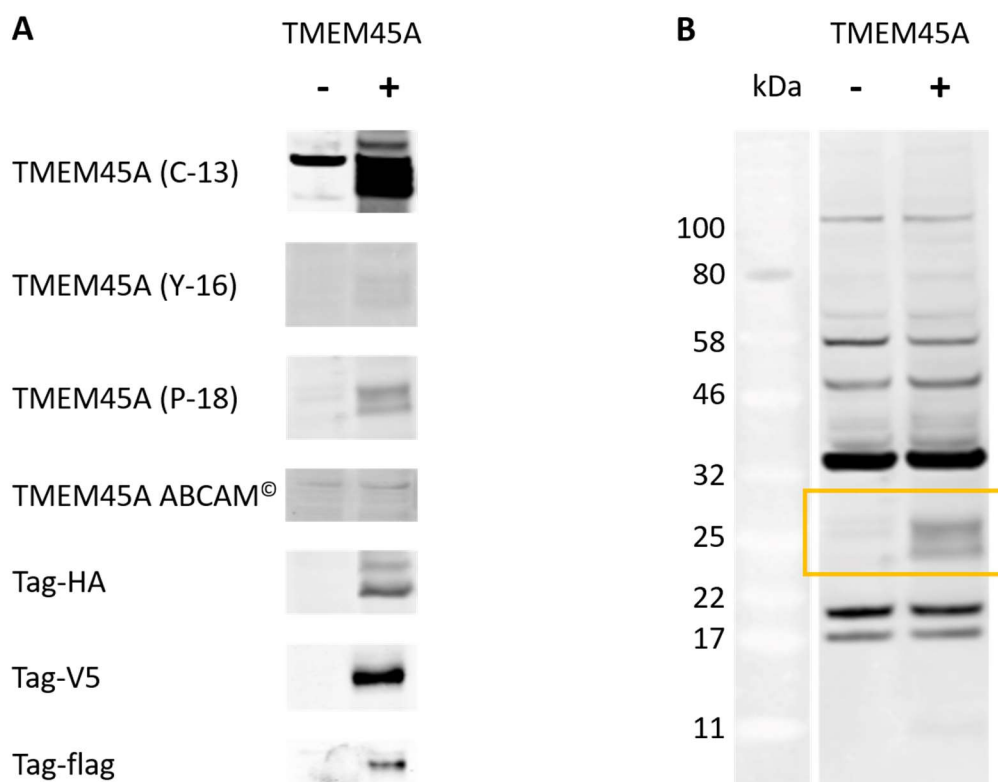


Figure 17 : Validation par Western Blot des anticorps ciblant la protéine TMEM45A ou les « tags » HA, V5 et flag. Pour la validation des anticorps anti-TMEM45A et anti-V5, l'extrait est un lysat cellulaire de cellules Hek293T transfectées avec la construction pDEST475_HA-TMEM45A. Pour les anticorps anti-V5 et anti-flag, les lysats cellulaires analysés proviennent de cellules Hek293T transfectées respectivement avec le plasmide plx304_TM45A-V5 et plpc_flag-TMEM45A. A) Analyse par Western Blot d'extrait cellulaire de Hek293T pour la validation des anticorps anti-TMEM45A (C-13), (Y-16), (P-18), ABCAM® et des anticorps anti-HA, anti-V5 et anti-flag. B) Mise en évidence des bandes aspécifiques observées en Western Blot lors de la révélation avec l'anticorps anti-TMEM45A (P-18). Le lysat cellulaire utilisé provient de cellules Hek293T transfectées avec le plasmide pDEST475_HA-TMEM45A.

Suite aux résultats présentés pour la validation des anticorps, plusieurs problèmes apparaissent. La première difficulté rencontrée est le marquage sous forme de « smear » de la protéine TMEM45A. En effet, la stratégie établie pour la détermination de la topologie de la protéine se base sur l'observation de variation de poids moléculaire liée à la glycosylation (comme expliqué à la *Figure 9* de la partie « Stratégie mise en place » à la page 47). La présence de ces différentes bandes pose donc un problème dans l'observation de ce phénomène.

Dans le cas de TMEM45A, les anticorps (anti-TMEM45A (C-13) et (P-18)) ne semblent donc pas offrir la qualité de détection nécessaire pour réaliser ce type de

manipulation. La seconde complication consiste en la présence de nombreuses bandes aspécifiques à divers poids moléculaires. Celles-ci pourraient être un obstacle quant à l'observation des variations de poids moléculaires. Des solutions ont été envisagées comme : 1) utiliser les « anti-tags » qui semblent mieux convenir à la problématique de la protéine TMEM45A et 2) produire un anticorps spécifique pour TMEM45A. La première issue a déjà été traitée dans les résultats présentés auparavant dans ce travail. L'utilisation d'anticorps spécifiques pour des « tags » est donc parfaitement envisageable et fonctionne. Concernant le second point, une tentative de développement d'un nouvel anticorps anti-TMEM45A a été réalisée au cours d'une thèse (2011-2015) au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC), mais sans aboutir à des résultats concluants. Durant cette période, une demande d'étude a donc été effectuée auprès de la société Eurogentec[®], spécialiste dans le domaine du développement d'anticorps, afin de créer un anticorps ciblant la protéine TMEM45A. Ce dernier fut testé dans nos conditions de travail et les résultats sont repris à la *Figure 18A*. En dernier point, l'anticorps anti-TMEM45A provenant de la firme Sigma Aldrich[®] a été testé au même titre que celui provenant de chez Eurogentec[®] et est présenté à la *Figure 18B*.

Les résultats de la *Figure 18* montrent qu'aucun des deux anticorps testés ne permet de mettre en évidence la protéine TMEM45A qui est surexprimée dans les cellules (validation par la détection du « tag » V5). Les résultats présentés ci-dessus confirment donc l'inefficacité des anticorps spécifiques à TMEM45A et soulignent la difficulté de développer des anticorps contre cette protéine. Dans la littérature, de nombreux papiers abordent la problématique des anticorps dirigés contre des protéines membranaires¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. La difficulté de cibler de telles protéines vient de plusieurs facteurs : la quantité et la pureté de la protéine recombinante (antigène) pour l'immunisation et le criblage de l'hybridome, l'utilisation de peptide, et non de la protéine complète, pour l'immunisation, l'expression en système procaryote (protéine non-fonctionnelle et absence de modifications post-traductionnelles) et la haute homologie dans les séquences extracellulaires entre les protéines humaines et leurs

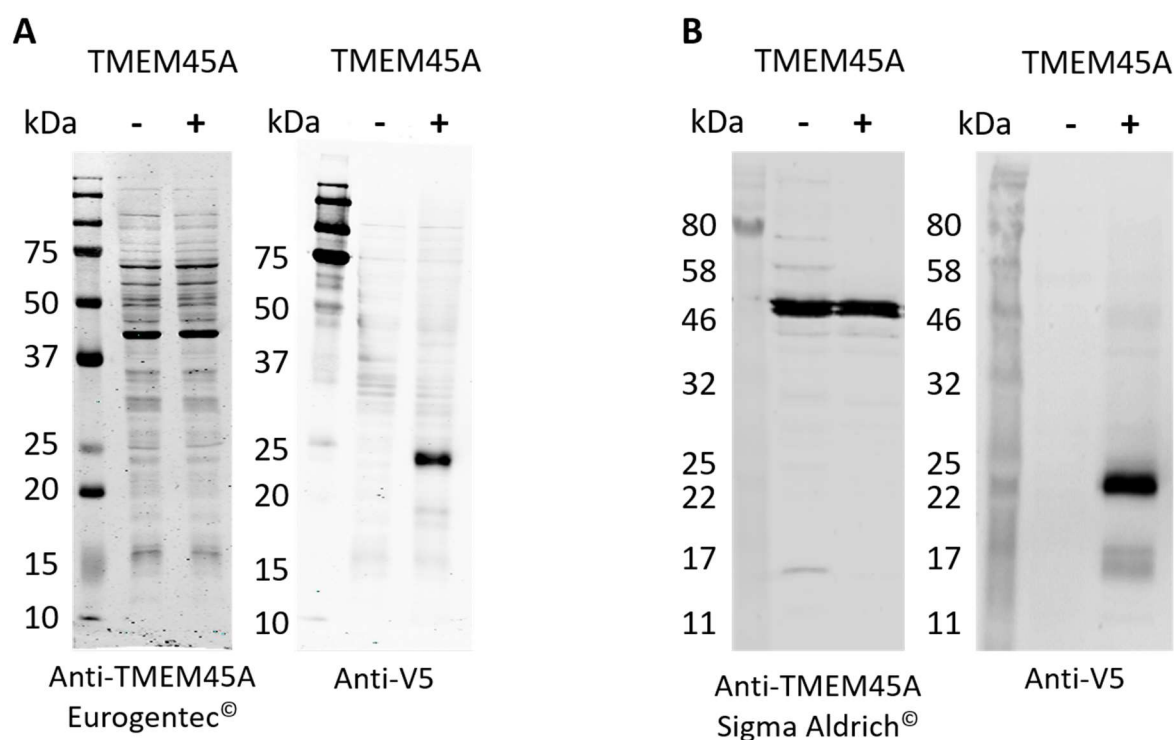


Figure 18 : Validation par Western Blot des anticorps anti-TMEM45A de chez Eurogentec® et Sigma Aldrich®. Pour la validation des anticorps anti-TMEM45A, un extrait cellulaire de Hek293T transfectées avec la construction plx304_TMEM45A-V5 a été utilisé. A) Analyse par Western Blot d'extraits cellulaires de cellules Hek293T pour la validation des anticorps anti-TMEM45A de la firme Eurogentec®. Validation de la présence de TMEM45A par une révélation du « tag » V5. B) Analyse par Western Blot d'extraits cellulaires de cellules pour la validation des anticorps anti-TMEM45A de la firme Sigma Aldrich®. Validation de la présence de TMEM45A par une révélation du « tag » V5.

homologues chez les animaux. Tous ces facteurs rendent donc la production d'anticorps contre les protéines membranaires très difficile^{171,172}. Cependant, de nouvelles techniques apparaissent et engendrent de bons résultats comme par exemple l'immunisation des animaux avec des cellules eucaryotes surexprimant les antigènes à leur surface¹⁶⁸. Les avantages de cette technique sont que la protéine est produite avec sa conformation naturelle au sein de la membrane (peu de risque de dénaturation). Elle possède ses modifications post-traductionnelles natives et ne nécessite pas d'étape de purification au cours de laquelle une perte de rendement ou une dénaturation de la protéine pourrait avoir lieu. Cette partie pourrait être envisagée si ce travail est poursuivi.

2.7 Mise au point des conditions de Western Blot

La protéine TMEM45A étant une protéine membranaire, l'analyse par western blot est rendue plus difficile. En effet, comme décrit dans la littérature, plusieurs facteurs peuvent influencer la détection de telles protéines par cette technique^{173,174}. Les principaux paramètres sont l'extraction de la protéine (au moyen d'un détergent), le chauffage de la protéine pour l'analyse par SDS-PAGE, le type de transfert (liquide, semi-sec ou Trans-blot Turbo®), la température du transfert, le type de membrane, etc¹⁷⁵. Les paramètres qui ont été étudiés dans ce travail sont : l'effet de la température et le type de détergent. Afin de pouvoir étudier l'effet de la température sur la détection de la protéine TMEM45A, des cellules Hek293T ont été transfectées avec le plasmide plx304_TM45A-V5. La présence de la protéine est mise en évidence par un anticorps spécifique pour le « tag » V5. Les résultats sont repris dans la *Figure 19*.

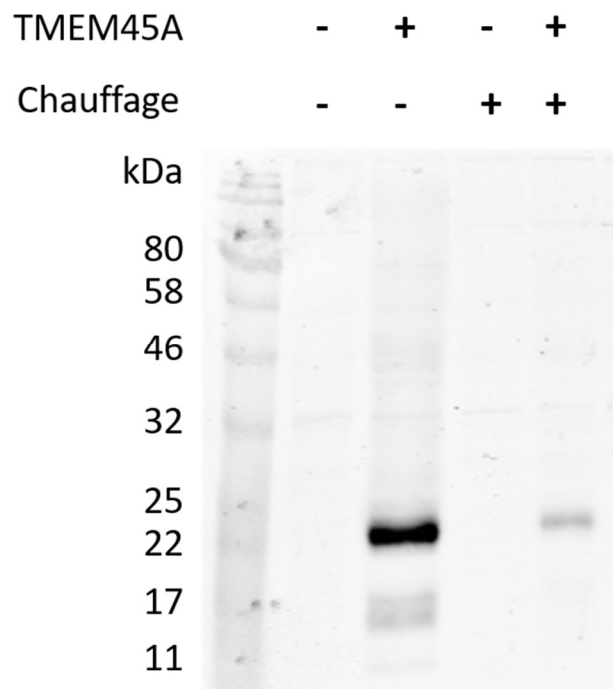


Figure 19 : Effet de la température sur la détection de la protéine TMEM45A et TMEM45B. A) Détection de la protéine TMEM45A par la présence du « tag » V5 lors du chauffage (70°C) ou non (4°C) de l'échantillon.

Il peut être constaté sur la *Figure 19* que le chauffage de l'échantillon à 70°C avant l'analyse par gel SDS-PAGE a un impact important sur la détection de cette dernière. La même conclusion a été tirée dans la littérature pour la protéine TMEM45B qui est un paralogue de TMEM45A¹⁷⁶. Okada *et al.* ont mis en évidence que lors du

chauffage de la protéine, celle-ci s'agrégeait. En conséquence, la protéine ne migre pas dans le gel et n'est pas détectable par Western Blot. Les auteurs ont également déterminé que les segments 4 à 7 étaient responsables de l'agrégation de la protéine. De plus, le poids moléculaire observé (entre 25 et 32 kDa) de TMEM45B n'est pas concordant avec le poids moléculaire théorique ($\pm$ 32 kDa). Tout comme TMEM45A, la protéine TMEM45B est composée de 275 acides aminés. Ces deux protéines partagent une identité de séquence de 44% et une similarité de séquence de 64%. Il peut donc être supposé que ces deux protéines ont un comportement de migration et une stabilité similaires. Ces résultats confortent donc ceux obtenus jusqu'à présent pour la protéine TMEM45A. De nombreux articles de la littérature décrivent le comportement anormal des protéines membranaires lors de la migration sur gel d'électrophorèse. Rath *et al.* ont montré que ce comportement était lié à la nature des protéines membranaires qui sont capables de former des interactions avec les molécules de dodécylsulfate de sodium (SDS) utilisées pour dénaturer les protéines^{177,178}. Des observations similaires ont été faites pour d'autres protéines par Miyake *et al.*¹⁷⁹.

Le second paramètre étudié est le détergent à utiliser pour l'extraction de la protéine à partir des cellules^{180–183}. Pour ce faire, quatre détergents (Triton X-100, n-Décyl β -D-maltoside, n-Dodécyl β -D-maltoside et NP-40) ont été testés sur des cellules Hek293T surexprimant TMEM45A fusionnée au « tag » HA. Le premier est un détergent classique pour l'extraction totale de protéines (protéines cytosoliques et membranaires), alors que les 3 molécules suivantes sont plutôt décrites pour l'extraction spécifique de protéines membranaires^{184–186}. Le n-Décyl β -D-maltoside et le n-Dodécyl β -D-maltoside sont également des molécules largement utilisées dans les tampons de criblage de conditions de cristallisation des protéines membranaires. Les résultats concernant cette mise au point ne sont pas présentés mais le n-Décyl β -D-maltoside, le n-Dodécyl β -D-maltoside et le NP-40 ont montré une efficacité similaire dans l'extraction de TMEM45A. Les prix des deux premiers réactifs étant assez élevés, c'est donc la dernière molécule qui a été retenue pour l'extraction de TMEM45A pour la suite de ce travail.

3 Essais de cristallogénèse de TMEM45A

3.1 Conception du plasmide bactérien codant pour la protéine TMEM45A

Afin d'essayer de résoudre la structure de la protéine TMEM45A, une dernière stratégie a été envisagée. Celle-ci concerne les mises au point pour des essais de cristallogénèse. Dans un premier temps, un vecteur de surexpression bactérien codant pour TMEM45A humain a été conçu. Ensuite, un criblage des souches bactériennes de surexpression et des conditions d'induction a été réalisé.

Le vecteur a été conçu et commandé chez la firme VectorBuilder[®]. Pour ce faire, la séquence codante pour l'isoforme humaine à 275 acides aminés de TMEM45A a été optimisée pour la production en bactéries. La séquence a été clonée dans un vecteur de surexpression bactérien de type pET contenant les éléments suivants : un « tag » 6 x histidine, un « tag » MBP (*maltose binding protein*) et un site de clivage à la TEV protéase (*Tobacco Etch Virus*). Ces éléments ont été fusionnés à la partie N-terminale de TMEM45A (pET_hTMEM45A). Le poids moléculaire total de la construction est d'environ 74 kDa. Un schéma du plasmide est repris à la Figure 20.

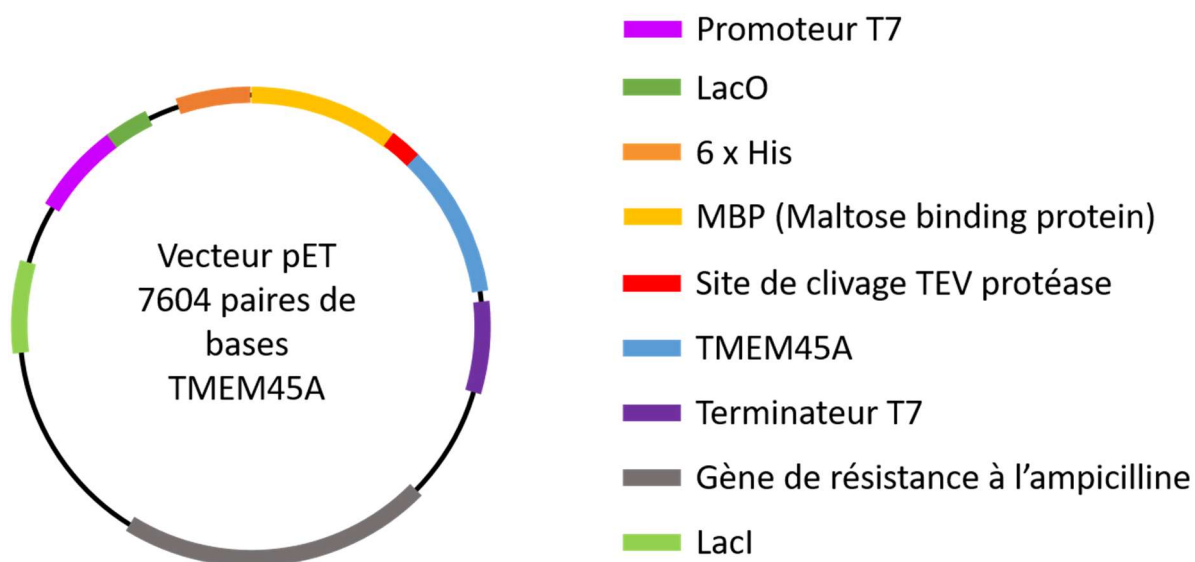


Figure 20 : Schéma du plasmide bactérien codant pour TMEM45A commandé chez VectorBuilder[®].

La présence des deux « tags » s'insère dans une logique de purification. Le premier « tag » histidine permet une purification par chromatographie d'affinité aux

ions métalliques Ni^{2+} immobilisés^{187–189}. Quant au second « tag » (MBP = *Maltose Binding Protein*), celui-ci permet de fusionner une protéine (MBP $\pm$ 40 kDa) cytosoluble et donc de potentiellement augmenter la solubilité de la protéine membranaire TMEM45A. Cette technique a largement été décrite dans la littérature comme pouvant apporter un plus à la production de protéines de type transmembranaire^{190–193}. Le site de clivage à la TEV protéase permet d'enlever les « tags » et de réaliser les essais de cristallogénèse sur la protéine native¹⁹⁴. Le plasmide a été acquis déjà incorporé dans une souche de bactérie *E. coli Stbl3*. Cette souche possède la caractéristique de répliquer rapidement l'ADN. Après culture, extraction et purification de l'ADN, il est possible d'obtenir une grande quantité de plasmide.

3.2 Culture bactérienne pour la production de la protéine TMEM45A

Des bactéries *E. coli* C41 (DE3) ont été transformées avec le plasmide nouvellement obtenu. Cette souche dérive de *E. coli* BL21 et a été spécialement sélectionnée pour la surexpression de protéines membranaires et leur stockage au sein d'invaginations membranaires^{195,196}. Ces bactéries possèdent un système d'induction sous le contrôle du promoteur T7 qui permet d'utiliser la technologie des plasmides « pET system »¹⁹⁷. Le gène d'intérêt est cloné dans un vecteur pET sous le contrôle d'un promoteur T7 (ARN polymérase T7). La cellule hôte (bactérie) possède le gène phagique de l'ARN polymérase T7 sous contrôle du promoteur-opérateur lactose. En condition normale, un répresseur lac I est produit à partir du gène lac I et empêche l'ARN polymérase de *E. coli* de venir se fixer sur le promoteur lactose. Il n'y a donc pas de production de l'ARN polymérase T7 pour la transcription du gène d'intérêt. Lors de l'ajout d'IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside), le répresseur lac ne peut plus se lier au promoteur lac. La transcription de l'ARN polymérase T7 (par l'ARN polymérase de *E. coli*) peut commencer ainsi que celle du gène d'intérêt. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans un milieu LB (*Lennox Broth*) et la densité optique (DO) à 600 nm est suivie au cours du temps. Comme observé à la *Figure 21A*, la DO souhaitée n'a jamais été atteinte. Il peut être observé que les bactéries *E. coli* C41 (DE3) transformées avec le vecteur pET_hTMEM45A croissent jusqu'à une densité optique de plus ou moins 0,5. Une diminution de la DO est ensuite constatée jusqu'à parvenir à

un plateau. Les bactéries « sauvages » quant à elles présentent une croissance linéaire et atteignent un plateau à une DO de 1,5 après approximativement 300 minutes. L'expérience a été répétée à plusieurs reprises et le même phénomène est à chaque fois constaté. Une mortalité des bactéries a donc été supposée¹⁹⁸.

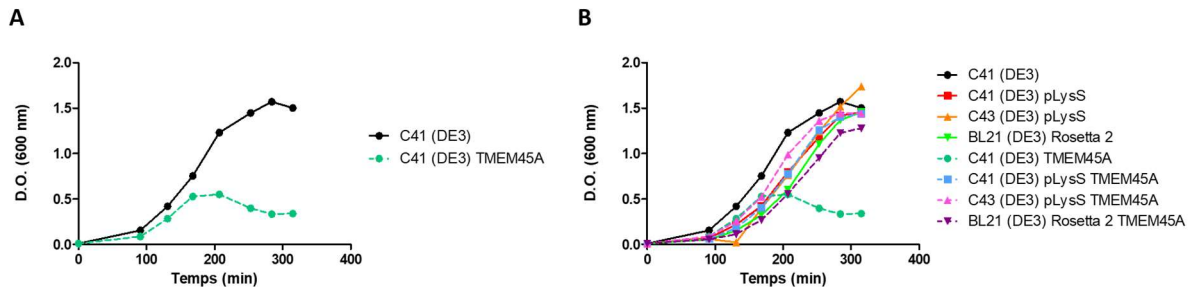


Figure 21 : Graphe de la croissance cellulaire au cours du temps pour les souches *E. coli* C41 (DE3), C41 (DE3) pLysS, C43 (DE3) pLysS et BL21 (DE3) Rosetta 2. A) Effet de la présence du plasmide codant pour TMEM45A sur la croissance des bactéries *E. coli* C41 (DE3). B) Courbe de comparaison montrant l'effet du plasmide codant pour TMEM45A sur la croissance des souches *E. coli* C41 (DE3), C41 (DE3) pLysS, C43 (DE3) pLysS et BL21 (DE3) Rosetta 2.

Sur base de résultats provenant de la littérature, deux paramètres induisant ce phénomène de mort cellulaire ont été suspectés. Le premier est lié à la nature de la protéine étudiée. Les protéines membranaires, lorsqu'elles sont surexprimées, sont connues comme étant létales pour les bactéries¹⁹⁹. Le second est plutôt dépendant de l'expression basale de la protéine étudiée^{200,201}. Puisque celle-ci est potentiellement toxique pour les bactéries, si ces dernières l'expriment faiblement avant le début de l'induction, cela pourrait induire un ralentissement et un arrêt de la prolifération cellulaire. Comme la nature de la protéine ne peut pas être changée, seul le second paramètre a été étudié. Pour ce faire, des souches contenant un vecteur accessoire « *pLysS* » ont été utilisées. Ce plasmide est utilisé pour supprimer l'expression basale du promoteur T7 par production du lysosyme T7, un inhibiteur naturel de la T7 ARN polymérase^{202,203}.

La prolifération de différentes souches bactériennes a été contrôlée au cours du temps après transformation, ou non, avec le plasmide pET_hTMEM45A. Les souches bactériennes sélectionnées (*E. coli* C41 (DE3), C41 (DE3) pLysS, C43 pLysS (DE3) et BL21 (DE3) Rosetta 2) sont les principales souches décrites dans la littérature pour la

production de protéines membranaires^{204,205}. Les résultats obtenus sont repris à la *Figure 21B*.

La comparaison entre les souches « sauvages » et transformées des différentes lignées de *E. coli* testées met en avant que la souche C41 (DE3) est la plus sensible à la présence du vecteur pET_hTMEM45A. Cette sensibilité n'a pas été observée avec la souche *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 qui n'est pourtant pas sélectionnée pour la production de protéines toxiques ou membranaires. Les souches contenant le plasmide *pLysS* en plus du pET_hTMEM45A ne semblent pas être impactées par la présence de ce dernier. Il semblerait donc qu'une production basale de la protéine TMEM45A (dans la lignée C41 (DE3)) soit responsable de la mort cellulaire constatée. Les souches testées présentent toutes une courbe de croissance normale suite à leur transformation par le plasmide pET_hTMEM45A, mais les essais d'induction de la protéine seront seulement effectués sur les souches *E. coli* C41 (DE3) *pLysS* et C43 (DE3) *pLysS*.

3.3 Induction de la protéine TMEM45A

L'induction de la protéine est démarrée à l'aide de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) qui permet une activation du système T7 présent dans la construction du vecteur pET_hTMEM45A. Sur base de la littérature, les paramètres suivants ont été évalués : la souche (*E. coli* C41 (DE3) *pLysS* ou C43 (DE3) *pLysS*), le temps d'induction (3h ou « *over night* »), la température d'induction (37°C, température ambiante ou 15°C) et la concentration en IPTG (0,2 mM, 0,7 mM ou 1 mM)^{206–209}. Après induction, les bactéries sont lysées dans un tampon d'échantillon et le lysat cellulaire est analysé par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (migration à 4°C). La révélation se fait au bleu de Coomassie. Les détails techniques sont explicités dans la partie matériel et méthodes. Les résultats pour un seul temps d'induction (« *over night* ») sont repris à la *Figure 22* (les résultats sont identiques pour un temps de 3 heures).

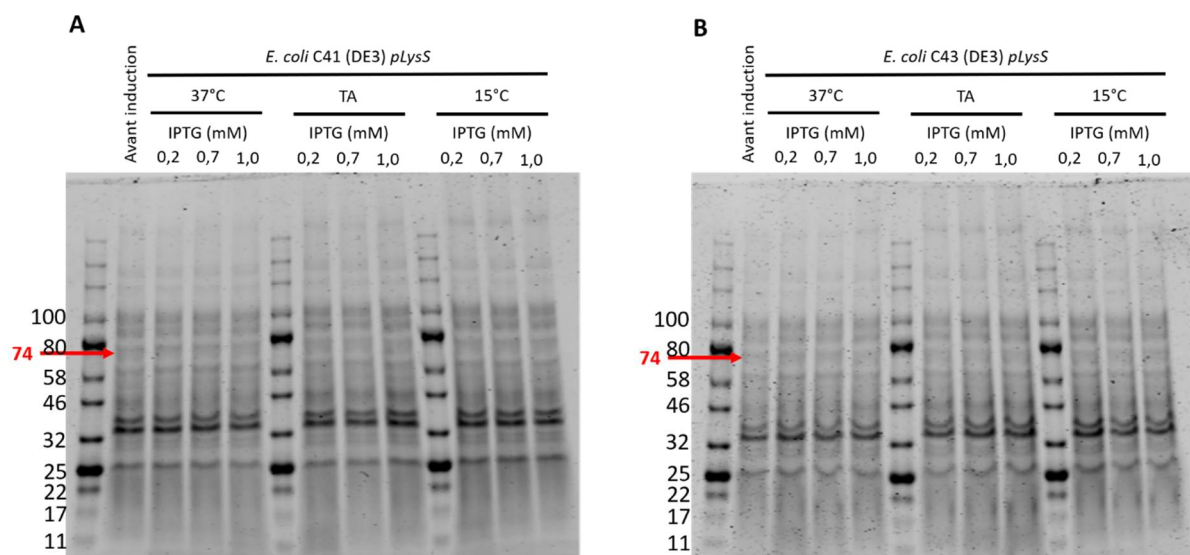


Figure 22 : Analyse sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE des échantillons pour le test d'induction et coloration au bleu de Coomassie. Les paramètres que nous avons fait varier sont la souche, la température et la concentration en inducteur (IPTG). A) Optimisation de l'induction pour les bactéries *E. coli* C41 (DE3) *pLysS* transformées avec le plasmide pET_hTMEM45A. B) Optimisation de l'induction pour les bactéries *E. coli* C43 (DE3) *pLysS* transformées avec le plasmide pET_hTMEM45A.

Le poids moléculaire de la protéine de fusion (« tag » 6 x histidine + MBP + site de clivage TEV protéase + TMEM45A) est de plus ou moins 74 kDa. Une bande correspondant à ce poids moléculaire est donc attendue lors de l'induction de la protéine. A la *Figure 22*, il peut être remarqué qu'aucune bande n'apparaît lors de l'ajout de l'IPTG quelle que soit la concentration, la température ou la souche. De façon à s'assurer de la conclusion de l'expérience (absence de la protéine), les échantillons correspondant aux *E. coli* C41 (DE3) *pLysS* et C43 (DE3) *pLysS* à 37°C ont été analysés par Western Blot avec une révélation par un anticorps ciblant le « tag » MBP. Une révélation par un anticorps anti-TMEM45A n'est pas envisageable au vu des résultats présentés précédemment. La *Figure 23* reprend les résultats de Western Blot pour cette analyse.

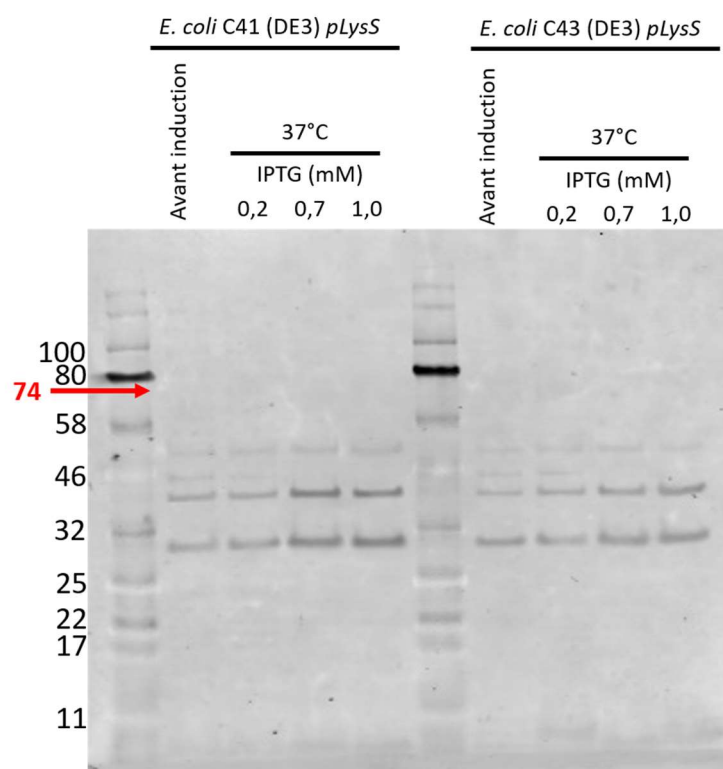


Figure 23 : Analyse Western Blot d'échantillons après induction pour un lysat cellulaire de *E. coli* C41 (DE3) *pLysS* et *E. coli* C43 (DE3) *pLysS*. La membrane est hybridée avec un anticorps primaire anti-MBP et un anticorps secondaire (spécifique de l'espèce de l'anticorps primaire) M800 pour une révélation en fluorescence.

Sur la membrane reprise à la *Figure 23*, il peut être observé plusieurs bandes aspécifiques liées à la révélation par l'anticorps anti-MBP. Aucune bande n'apparaît dans la zone correspondant au poids moléculaire attendu pour la protéine de fusion après induction. Les résultats de la *Figure 23* confirment donc ceux obtenus à la *Figure 22*.

4 Conclusions

Dans cette partie consacrée à l'étude de la structure de la protéine membranaire TMEM45A, des conditions de transfection ont été optimisées dans un hépatocarcinome du foie (HepG2). Ces conditions ont ensuite été validées, dans la lignée cellulaire Hek293T, par quantification de l'ARN messager associé à la protéine cible et par détection de la protéine en immunofluorescence et Western Blot. Il a été démontré qu'un seul anticorps (ciblant la forme sauvage de la protéine TMEM45A) fonctionnait par marquage en immunofluorescence. Les autres anticorps présentaient quant à eux un marquage aspécifique assez important. De plus, ces anticorps n'ont pas pu être validés

en Western Blot, ce qui limite de manière importante leur usage dans le cadre de la détermination de la topologie par détection de variation de poids moléculaire (glycosylation). Une stratégie se basant sur l'utilisation de protéines de fusion (avec des « tags ») a été mise en place. Les résultats ont montré que l'utilisation d'anticorps visant les « tags » HA, flag ou V5 était une bonne méthode pour la détection de la protéine d'intérêt. Des conditions expérimentales pour le Western Blot ont également été optimisées pour la détection de protéines membranaires telles que TMEM45A. Celles-ci ont révélé que le chauffage de la protéine était un paramètre important pour la détection de la protéine.

Dans un second temps, des essais cristallographiques sur la protéine TMEM45A ont été envisagés. Un plasmide codant pour la protéine d'intérêt a été commandé et transformé dans une souche bactérienne de type *E. coli* C41 (DE3). La présence du plasmide a montré une toxicité cellulaire sur cette souche. Un criblage de différentes souches bactériennes (*E. coli* C41 (DE3), C41 (DE3) *pLysS*, C43 (DE3) *pLysS* et BL21 (DE3) *Rosetta 2*) fut donc réalisé. Ensuite, un certain nombre de paramètres tels que : la souche de bactérie (pour éviter une mortalité des cellules), le temps d'induction, la température d'induction, la densité optique à 600 nm de la culture bactérienne lors de l'induction, la concentration en inducteur et les différentes techniques de détection (gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie ou Western Blot), furent testés mais aucune induction de la protéine membranaire 45A n'a pu être constatée.

Sur base des résultats présentés, les informations suivantes doivent être retenues : 1) les anticorps anti-TMEM45A proposés commercialement n'ont pas tous la même sélectivité pour la détection de la protéine d'intérêt (marquage aspécifique), 2) les anticorps ciblant le tag ont montré une meilleure spécificité comparé aux anticorps anti-TMEM45A, 3) les conditions et les vecteurs utilisés permettent une production de la protéine dans les cellules HepG2 et Hek293T, 4) la présence de bandes aspécifiques rend plus difficile la détection de variation de poids moléculaire.

Au regard des résultats présentés et du manque d'un anticorps valide, il a été envisagé d'arrêter cette partie en faveur d'une étude plus mécanistique et fonctionnelle de la protéine TMEM45A.

5 Matériel et méthodes

5.1 Prédiction des modèles avec I-TASSER

La séquence de la protéine humaine TMEM45A (UniprotKB : Q9NWC5) a été extraite de la base de données UniProt ⁸⁷. Cette protéine est composée de 275 acides aminés pour un poids moléculaire de 31,68 kDa. La séquence cible a été soumise au programme I-TASSER (une application Web conçue pour la prédiction de structure tridimensionnelle sur base de reconnaissance d'éléments de structure secondaire) ^{138,139,141}. Ce programme possède un algorithme, appelé LOMETS, qui permet de rechercher les modèles possédant une structure ou des éléments de structure similaires dans une librairie de structures PDB ¹⁴². Si des modèles proches sont identifiés, un modèle prédictif complet de la protéine cible est construit. Cette construction passe par des étapes d'assemblage d'éléments de structure secondaire. Le fichier des résultats de la modélisation par I-TASSER contient les 5 meilleurs modèles prédits pour la protéine d'intérêt. A chaque modèle est associé un « C-score » et un « TM-score ». Le premier est un score de confiance permettant d'estimer la qualité des modèles prédits, alors que le second reflète la similarité structurale entre deux structures. Ce dernier score tient compte de la déviation quadratique moyenne (RMSD) entre deux atomes ou résidus. Puisque le RMSD est sensible à l'erreur locale (ex : mauvaise orientation des chaînes latérales, motifs non-structurés, etc...), une correction est nécessaire en vue d'obtenir le meilleur TM-score possible. En effet, un grand RMSD peut être observé alors que la topologie globale de la protéine est correcte. Le modèle présentant les meilleurs scores est considéré comme le plus vraisemblable.

5.2 Clonage de TMEM45A dans le vecteur pcDNA3.1(+)

L'ARN total de kératinocytes humains à deux jours post-confluence (moment où l'expression de TMEM45A est la plus élevée) a été extrait au moyen du kit « RNeasy mini kit » (Qiagen) suivant le protocole décrit par le fabricant. L'ARN obtenu est ensuite quantifié (à 260 nm) par absorbance UV/visible (spectrophotomètre NanoDrop). 2 µg d'ARN total ont été rétro-transcrits avec le kit « Transcriptor First-strand cDNA Synthesis kit » (Roche) et en utilisant l'amorce « oligo (dT)₁₈ » selon les spécifications

du fabricant. L'ADNc ainsi obtenu est amplifié par *PCR* (*polymerase chain reaction*) avec la polymérase « Q5 High-Fidelity DNA Polymerase » (NEB) et les oligonucléotides suivants : 1) CAATGCTAGCTAAACAGACCAAGTTGGATCATG et 2) TCGTCTCGAGACTGGAAGCTCATCAAAGTCA. Les paramètres modifiés par rapport aux recommandations d'utilisation du fabricant sont : 1) le temps de dénaturation initial qui est programmé à 60 secondes et 2) la température d'hybridation des amorces qui a été paramétrée à 63°C. Le produit de PCR recueilli est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment d'ADN nouvellement créé est ensuite cloné dans le vecteur pcDNA3.1(+) (Invitrogen) au moyen des enzymes de restriction XhoI et NheI. Le plasmide généré a été séquencé par la société *GENEWIZ*®, transformé dans des bactéries compétentes *E. coli Dh5α* (ElectroMAX™ DH5α-E Competent Cells, Thermo Fischer Scientific) par électroporation, amplifié et purifié avec le kit « PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit » (Thermo Fischer Scientific) selon les instructions fournies.

5.3 Transformation des bactéries compétentes

Après décongélation des bactéries (Dh5α, Dh10b, Stbl3, C41, C41 pLysS, C43 et C43 pLysS) sur glace, 1 µL de plasmide (dilué à 50 ng/µL) est ajouté. Le mélange bactéries/plasmide est ensuite transféré dans un tube en polypropylène de 15 mL pré-refroidi et est incubé sur glace pendant 30 minutes. La transformation est réalisée par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes dans un bain marie. Les bactéries sont ensuite directement remises sur glace pendant 2 minutes. 950 µL de milieu LB sont ajoutés aux bactéries. Le tube est ensuite incubé 1 heure à 37°C. Enfin, celles-ci sont étalées sur plaque de LB-agar (ne contenant pas d'antibiotique) au moyen d'une anse ou d'un râteau. La plaque est incubée « over night » à 37°C afin de laisser pousser les colonies.

5.4 Transfection des cellules

Trois millions de cellules (le nombre peut varier en fonction de la lignée cellulaire) sont repiquées dans une boîte de Pétri. Les cellules sont laissées dans l'incubateur « over night » à 37°C. Le lendemain, les cellules sont transfectées selon les

instructions du fabricant. Les rapports ADN/agent de transfection ont été adaptés pour une concentration totale en ADN de 10 µg. Le temps de transfection varie de 24h à 48h en fonction des conditions sélectionnées.

Plasmides commercialement disponibles : 1) plx304_TM45A-V5 (DNAsu, HsCD00443757) ; 2) pLPC-N flag (Addgene, Plasmid #12521) et pcDNA3.1(+) (Thermo Fischer Scientific, V79020).

5.5 RT-qPCR

L'ARN total est isolé à partir des cellules avec le « RNeasy mini kit » (Qiagen) selon le programme automatique « Large sample with DNase » disponible sur le Qiacube (Qiagen). La transcription inverse est réalisée à partir de 2 µg d'ARN total au moyen du « Reverse Transcription kit » (Promega) et des amorces oligodT. La PCR en temps réel est effectuée avec le « PowerSYBRGreenPCR Master Mix » (Applied Biosystems) et 300 nM d'amorces (IDT). Le gène de ménage choisi pour la normalisation est le gène 23kDa. La séquence des amorces utilisée est la suivante : TM45A sens 5'-TTA-TGC-AGT-AAC-CAT-TGT-CAT-CGT-T-3' ; anti-sens 5'-TGA-TTC-TTG-TTC-TCG-TTC-AGC-ATT-3' et 23KD sens 5'-GCC-TAC-AAG-AAA-GTT-TGC-CTA-TCT-G-3' et anti-sens 5'-TGA-GCT-GTT-TCT-TCT-TCC-GGT-AGT-3'. Le niveau d'expression de l'ARN messager a été analysé selon le « cycle threshold » (seuil d'analyse) de la méthode qui est fixé à 0,2.

5.6 Marquage en immunofluorescence

Les cellules sont fixées 10 minutes avec une solution de paraformaldéhyde 4% dans du PBS et ensuite perméabilisées avec une solution de triton 0,1% pendant 5 minutes. Une fois les cellules rincées à trois reprises avec un mélange PBS-BSA (albumine de sérum bovin) 2%, celles-ci sont incubées « over night » à 4°C avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires sont dilués à 1 :250 (TM45A, Sigma Aldrich, HPA024082), 1 :250 (TM45A (C-13), Santa Cruz, sc-100196), 1 :250 (TM45A, Abcam, ab166899), 1 : 250 (anti-HA, Cell Signaling, #23675) ou 1 : 250 (anti-flag (anti-DDDDK), Abcam, 1162) dans une solution de PBS-BSA 2%. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS-BSA 2% et incubées 1h à

température ambiante avec un anticorps secondaire dilué à 1 : 1000 (Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody, Molecular Probes, #A11034) ou 1 : 1000 (Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG antibody, Molecular Probes, #A11032) correspondant à l'anticorps primaire utilisé. Après avoir lavé les cellules trois fois au PBS, les noyaux sont soit marqués au TOPRO-3 (dilution 1 : 80 dans une solution de PBS contenant 2 mg/mL de RNase) ou soit au réactif de Hoechst (dilué 10 fois dans l'eau puis 500 fois dans une solution de PBS-BSA 2%, le marquage peut se faire en même temps que le marquage par l'anticorps secondaire). Les cellules sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS. La lamelle de support est ensuite montée (cellules vers le bas) sur une lame de microscope sur laquelle une goutte de Mowiol (Sigma) a été préalablement déposée. Les cellules sont observées au microscope confocal (SP5, Leica). Après réglage de l'appareil, les photos sont prises avec une valeur de gain et de puissance de laser constante.

5.7 Western Blot

500 µL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% IGEPAL®-CA-630, contenant un mélange d'inhibiteur de protéases (1 mini tablette pour 10 mL de tampon de lyse, « Complete » de Roche Molecular Biochemicals)) sont ajoutés sur les cellules contenues dans une boîte de Pétri (diamètre 10 cm). Les cellules sont décrochées à l'aide d'un rateau et placées dans un eppendorf. Le lysat est incubé 20 min à 4°C sous agitation sur roue avant d'être centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 RPM. Le surnageant est récupéré et les protéines totales sont dosées par un test colorimétrique au réactif de Pierce (22660, Thermo Fischer Scientific). La lecture de la plaque se déroule à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible (BioRad). Les protéines (20 à 25 µg) sont séparées par SDS-PAGE à 12% de réticulation (gel « home-made » et tampon de migration 2,5mM Tris, 19,2 mM Glycine, 0,1% SDS, pH = 8,3/8,5) dans un système à 4°C (SE 250 Minivertical Unit, Amersham Biosciences) à 200V. Après séparation, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,2 µm, #1620112) dans un système de transfert liquide (tampon de transfert (2,5 mM Tris, 15 mM Glycine, 20% Méthanol, pH = 8,3) à 100V pendant 2h. Selon la méthode de révélation choisie, la membrane est bloquée 1 heure à température ambiante soit dans

une solution de lait 5% dans du TBS-t (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl et 0,1% Tween 20), soit dans une solution 1 : 1 de Licor TBS (#LI 927-50003 (Westburg)) dans du TBS. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du TBS et incubée « over night » à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-t (TBS + 0,1% Tween 20) contenant 1% de BSA (albumine de sérum bovin) et 0,02% d'azoture de sodium (NaN_3) ou dans une solution de Licor TBS. Après trois lavages au TBS-t, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire préparé dans un mélange 1) de TBS-t contenant 5% de lait ou 2) du Licor TBS. Selon la méthode de détection choisie, les protéines sont détectées soit par chimioluminescence au moyen d'un réactif au luminol (Clarity™ Western ECL Substrate, #1705060, Biorad) et de film autoradiographique (*Ultra Cruz autoradiography film*, SC-201697), soit par fluorescence (*Odyssey LICOR scanner*).

Les anticorps et les dilutions utilisés sont : 1) 1/500 Anti-TMEM45A (lapin, polyclonal, HPA024082, Sigma Aldrich®) ; 2) 1/500 Anti-TMEM45A (C-13) (lapin, polyclonal, sc-100196, Santa Cruz®) ; 3) 1/500 Anti-TMEM45A (Y-16) (lapin, polyclonal, sc-100198, Santa Cruz®) ; 4) 1/500 Anti-TMEM45A (P-18) (lapin, polyclonal, sc-100197, Santa Cruz®) ; 5) 1/500 Anti-TMEM45A (lapin, monoclonal, ab166899, ABCAM®) ; 6) 1/1000 V5-tag (D3H8Q) (lapin, monoclonal, #13202S, Cell Signaling®) ; 7) 1/1000 HA-tag (6E2) (souris, monoclonal, #2367S, Cell Signaling®) ; 7) 1/1000 Anti-DDDDK tag (« tag » flag) (lapin, polyclonal, ab1162, ABCAM®) ; 8) 1/2000 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (chèvre, #7074, Cell Signaling®) ; 9) 1/2000 Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7076S) ; 10) 1/10 000 R700 (IRDye 680RD Goat anti-Rabbit IgG, chèvre, #LI 926-68071, Licor Biosciences®) ; 11) 1/10 000 R800 (IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG, chèvre, #LI 926-32211, Licor Biosciences®) ; 12) 1/10 000 M700 (IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG, chèvre, #LI 926-68070, Licor Biosciences®) et 13) 1/10 000 M800 (IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG, chèvre, #LI 926-32210, Licor Biosciences®).

5.8 Culture bactérienne et induction de la protéine cible

Une préculture est réalisée dans 5 mL de milieu de culture LB (Lennox Broth, Carl Roth). Des antibiotiques spécifiques au plasmide utilisé y sont ajoutés (kanamycine : concentration finale (Cf) = 50 µg/mL, chloramphénicol Cf = 34 µg/mL

et ampicilline Cf = 100 µg/mL) ainsi que 50 µL de bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt. La préculture est incubée « over night » à 37°C sous agitation (150 RPM).

La culture bactérienne est réalisée en ajoutant 2,5 mL de préculture dans un litre de milieu LB (divisé entre 4 flasques) contenant les antibiotiques spécifiques et à la concentration finale mentionnée ci-dessus. Les boîtes de culture sont incubées à 37°C sous agitation à 150 RPM et la croissance cellulaire est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$). Une fois que la densité optique atteint une valeur de 0,6, de l'IPTG (isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside) est ajouté à une concentration finale de 1 mM pour induire la protéine d'intérêt. Le culot bactérien est récupéré (après incubation à la température et durant un temps souhaité) par centrifugation 7000 RPM, 4°C, 30 minutes dans un rotor JA-20 et une centrifugeuse « Beckman Coulter Avanti J-E centrifuge ».

5.9 Analyse par gel d'électrophorèse SDS-PAGE

Un protocole identique à celui décrit dans la rubrique « Western Blot » est suivi jusqu'à l'étape de migration. Une fois les protéines séparées dans le gel, celles-ci sont fixées 1 heure dans une solution d'acide acétique 10% puis colorées 1 heure au moyen d'une solution de bleu de Coomassie (GelCode Blue Stain Reagent, Thermo Fischer Scientific). Le gel est ensuite lavé avec de l'eau ultrapure pour réduire le bruit de fond. Lorsque la décoloration est jugée suffisante, le gel peut être scanné.

Partie 2 :

Caractérisation fonctionnelle de la protéine membranaire 45A (TMEM45A) dans le cancer

TMEM45A regulates MTSS1 stabilization by modulating proteasome activity

**Dal Maso Thomas¹, Marx Sébastien¹, Fransolet Maude², Dieu Marc², Wouters
Johan¹, Michiels Carine², Le Calvé Benjamin^{2,*}**

¹ Department of Chemistry, Namur MEDicine & Drug Innovation Center (NAMEDIC-NARILIS), University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium.

² Department of Biology, URBC – NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, Namur, Belgium

Running title: Identification of TMEM45A function

*Corresponding author: Le Calvé Benjamin benjamin.lecalve@unamur.be

Keywords: CAND1/function/migration/MTSS1/TMEM45A

Abstract

TMEM45A, a transmembrane protein, has been reported to be overexpressed in several types of cancers (breast, ovarian cancers and gliomas) however without identifying the biological function of this protein. The phenotype associated with TMEM45A depletion in cancer cells is mainly reported to be the decrease in cell proliferation and invasion. In this study, we observed a significant alteration in cell proliferation and migration when Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) cell lines were depleted for TMEM45A. The proteins potentially bound to TMEM45A were investigated by co-immunoprecipitation associated with mass spectrometry. CAND1, a regulator of ubiquitin-proteasome system, was identified as a potential partner. Metastasis Tumor Suppressor 1 (MTSS1) was revealed as a substrate of proteasome whose protein level is potentially regulated by the TMEM45A-CAND1 pathway. MTSS1 is known to regulate cell migration capacities. Hence, MTSS1 is a potential regulator responsible for proliferation arrest and migration inhibition in TMEM45A-depleted TNBC cell lines.

Introduction

Many transmembrane proteins have been described to play a role in cancer cell proliferation and cell migration¹. Some of them are well characterized, such as TMEM16^{2,3} or TMEM216 (also called STING)⁴⁻⁶, but others are still poorly studied such as TMEM45A and B, TMEM7, TMEM206. For example, depletion of TMEM45A protein is already described to significantly impact tumor growth and cell migration in human ovarian cancer⁷ and glioma⁸. Moreover, this protein has been also reported to be upregulated in breast cancer⁹ especially in Triple-Negative Breast Cancer subtype (TNBC)¹⁰. TNBC is a subset of breast cancers that presents a lack in estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression and which represent ten to twenty percent of all breast cancers. These cancer cells are known to be very aggressive and invasive allowing dissemination and metastasis formation¹¹.

Recently, Metastasis Tumor Suppressor 1 (MTSS1), also called Missing in Metastasis (MIM), has been characterized as a tumor suppressor protein¹² and its expression is downregulated in most of metastatic cancer cell lines (bladder, prostate, kidney, gastric and breast cancer metastases) compared to normal tissue or non-metastatic counterparts¹³⁻¹⁷. This protein was shown to play a role in cell growth and migration/invasion by regulating cytoskeleton dynamics and actin polymerization¹⁸⁻²⁰. The presence of WASP homology domain 2 (WH2) and Insulin receptor substrate p53/MIM (IMD) domains in the structure of MTSS1 suggests a scaffolding function²¹ and could explain a functional link with the actin cytoskeleton. The recruitment of MTSS1 to the cytoskeletal network underlies the regulation of cell shape as well as of migratory capacities. It was also demonstrated that MTSS1 could bind to some other proteins linked to cellular structure such as the Rho-GTPase Rac, actin, actin-associated proteins and the cytoplasmic domain of receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) protein family¹⁸⁻²⁰. RPTP proteins are known to control tyrosine phosphorylation-dependent signalling involved in the signal transduction events and as critical regulators of cell migration, invasion and cell-cell interaction^{20,22,23}. Moreover, overexpression of MTSS1 is associated with suppression of metastasis abilities in bladder, ovarian,

pancreatic, glioblastoma and breast cancer^{16,24–27} while the depletion of MTSS1 enhances these properties.

MTSS1 expression can be regulated by DNA methylation on CpG islands^{22,28} or by post-translational modifications by the ubiquitin-proteasome system (UPS)²⁹. UPS plays a central role in the regulation of protein level expression through degradation by proteasome of ubiquitinated proteins^{30,31}. This system depends on ubiquitination cascade provided respectively by the ubiquitin-activating enzyme (E1), the ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and the ubiquitin ligase (E3), responsible for substrate specificity^{30–32}. MTSS1 is selectivity linked to E3 ubiquitin ligase complex SCF (Skp1-Cullin1-F-box) containing β TRCP domain (F-box protein)²⁹. At least 69 possible distinct SCF complexes have been identified and 42 have been confirmed^{33,34}. All of them comprise a Cull1•Rbx1 catalytic core binding to a variable F-box protein (FBP)•Skp1 Substrate Recognition (SR) module^{35–37}. SR module tightly binds to Cull1 but this interaction is rendered dynamic by CAND1 (cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1) which is a SR exchange factor (SREF). CAND1 allows equilibrating Cull1 with the cellular pool of SR modules^{38–40} and the exchange is regulated by NEDD8 conjugation^{41–44}. Here, we propose TMEM45A as a novel regulator of SCF complex regulator through the binding of CAND1, inducing the dysregulation of MTSS1 degradation by the ubiquitin-proteasome system.

Results

TMEM45A knockdown alters the migration of metastatic breast cancer cells

Real-time PCR analyses were performed to determine mRNA level of TMEM45A, vimentin and E-cadherin in different breast cancer cell lines (**Fig 1A**). TMEM45A was found to be highly expressed in all of them compared to non triple-negative breast cancer MCF7 (negative control). MDA-MB-453, MDA-MB-231, Hs 578T and BT-549 expressed vimentin compared to MCF 10A, a normal breast tissue (negative control), and MDA-MB-468 that expressed both markers. MCF7 cell line, which is hormone positive breast cancer (not TNBC), is the only one that presents E-cadherin (classified as epithelial cells: positive control). In order to explore the functions of TMEM45A in TNBC, we selected three cell lines: MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cell

lines. TNBCs are known to be more aggressive than other types of breast cancer. It is interesting to note that TNBCs also express a higher level of TMEM45A compared to these other types of cancer. Therefore, we wonder whether TMEM45A might play a major function in TNBCs. We thus silenced the expression of TMEM45A by using lentiviral-mediated delivery of shRNA. In this study, two shRNA sequences (sh1 and sh2) targeting the human TMEM45A gene were designed and a non-specific scramble shRNA sequence was used as the negative control (shNTC). The silencing effect of the TMEM45A shRNA was confirmed in MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cells (**Fig 1B**) by RT-qPCR: a knockdown of >95% for sh1 and about 80% for sh2 in all three cell lines.

Depletion of TMEM4A in TBNC cells inhibits cell proliferation and migration

To investigate the effect of TMEM45A on cell proliferation, we assessed the proliferation of selected cell lines depleted or not for TMEM45A using a clonogenic assay (**Fig 1C**). Cell growth was impaired when using shRNA targeting TMEM45A (sh1 and sh2) compared to control condition (shNTC) in the three TNBC cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T. The extent of inhibition seems to vary according to the level of TMEM45A invalidation. The effect of TMEM45A silencing on cell migration was also explored by chemotaxis assays (upon a FBS gradient) using Boyden chambers (**Fig 1D**). The migration capacity of MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cells (to pass) through the membrane of the chamber was significantly inhibited by TMEM45A knockdown. The extent of migration inhibition seems to be correlated to the effect on cell proliferation. In addition, MDA-MB-231 cell migration was analyzed by scratch assays (see **Supplemental I**) in the presence of mitomycin C. The results confirmed the data obtained using Boyden chambers. Altogether, these data suggest that TMEM45A is involved in the regulation of TNBC cell proliferation and migration.

Identification of protein partners and associated cellular pathways by mass spectrometry

Cellular pathways, in which TMEM45A is involved, are still unknown. In order to unravel the TMEM45A-associated pathways, we have followed an interactant-based

strategy by using co-immunoprecipitation coupled to mass spectrometry analysis^{45,46}. This strategy has been used to determine the interactome of several proteins including members of TMEM family^{47–49}. Tagged-TMEM45A was overexpressed in HEK 293T cells before the immunoprecipitation of the protein and its interactants. The proteins were identified by mass spectrometry analysis. Two constructions of TMEM45A were used, the first one contained a C-terminus V5 tag (pLX304 vector) and the second an N-terminus flag (DYKDDDDK) tag (pLPC-N flag vector). Empty vectors were used as negative controls to remove background from non-specific interactions (**Fig 2A**). TMEM45A protein was immunoprecipitated using the corresponding antibody (anti-V5 or anti-flag) coupled on protein A/G agarose beads. After on-beads digestion, the mix was analyzed by LC/MS (liquid chromatography-mass spectrometry). By cross-checking the data obtained for each tag and by removing the background, we were able to identify ten partners of TMEM45A (**Figure 2B** and **Table 1**). From this interactome, we were searching for partners that might be involved in the regulation of invasion and proliferation of cancer cells. We decided to investigate CAND1 which is described to regulate protein expression of several whose MTSS1 (metastasis suppressor-1) protein level. The interaction between CAND1 (overexpression of MYC-CAND1) and TMEM45A was validated by co-immunoprecipitation using V5 tag and Western Blot analysis (**Fig 2B, C and D**). As shown in **Fig 2B**, CAND1 and TMEM45A can be detected in the input samples using, respectively, anti-MYC and anti-V5 antibodies, confirming the overexpression of the two recombinant proteins in cells. **Fig 2C** corresponds to cell extracts that were immunoprecipitated by the anti-V5 antibody. CAND1 was detected in the samples in which both CAND1 and TMEM45A were overexpressed. These data confirmed the interaction between the two proteins.

TMEM45A knockdown induces MTSS1 stabilization

CAND1 is known to interact with Cullin1, which is a component of the SCF complex involved in the ubiquitination of protein for protein degradation regulation. One target of this complex is MTSS1 and this protein is described to regulate cell proliferation and migration^{29,50}. Based on evidence from literature, we decided to investigate the role of MTSS1 as a candidate protein whose expression is regulated by CAND1. In order to evaluate the relevance of MTSS1 implication in TNBC cell migration, we first

determined MTSS1 protein expression level in breast cancer and TNBC cell lines. As observed in **Fig 3A**, MTSS1 level was relatively low in Triple-Negative Breast Cancer cells compared to classical breast cancer (MCF7) and healthy breast tissue cells (MCF 10A). This is relevant to the aggressiveness of TNBC cell lines. Secondly, we tried to investigate TMEM45A-depletion impact on MTSS1 protein abundance in MDA-MB-231 (**Fig 3B**), MDA-MB453 (**Fig 3C**) and Hs 578T (**Fig 3D**). A stabilization of MTSS1 is observed when using both shRNA targeting TMEM45A (sh1 and sh2) in MDA-MB-231 cells. MG132, also called carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal, was used as a positive control. Thanks to its proteasome inhibitor function, a decrease in MTSS1 degradation is expected in the presence of MG132. For MDA-MB-231, MDA-MB-543 and Hs 578T cell lines, we observed an effect of cell confluence on MTSS1 stabilization leading to a variation of MTSS1 protein abundance despite TMEM45A mRNA invalidation. However, the TMEM45A-depletion cell proliferation and migration phenotypes can be observed.

Discussion

Flamant et al. have shown that TMEM45A is upregulated in hypoxic conditions in MDA-MB-231 and HepG2 cells. They have also reported the involvement of this protein in the chemoresistance of these two cell lines in hypoxia to paclitaxel and etoposide respectively⁹. Sun et al. and Guo et al. have demonstrated that the depletion of TMEM45A is linked to a decrease in proliferation and migration of human ovarian cancer cells⁷ and of glioma cells (T98G)⁵¹ respectively. Although these two phenotypes are well characterized, the underlying mechanism is still unknown.

Our study aims to highlight the cellular pathways by which TMEM45A is involved in the regulation of cell migration. Since TMEM45A has been shown to regulate cell proliferation and cell migration and to be overexpressed in breast cancer⁹, Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) models were chosen based on their high basal expression of TMEM45A and their ability to migrate. TNBCs are well known to be biologically aggressive⁵² and invasive cancer¹¹ notably through the process of epithelial to mesenchymal transition (EMT)^{53,54}. In order to study the phenotype associated with TMEM45A depletion in these models, cell lines from TNBC have been screened by

RT-qPCR as outlined in **Fig 1A**. mRNA level of TMEM45A was higher in TNBC cells compared to non-TNBC cells (MCF7 and SK-BR-3). The high level of TMEM45A in MCF10A is linked to the epithelial character of this cell line. Indeed, TMEM4A has been shown to be involved in epidermal keratinization⁵⁵. This observation suggests a potential role of TMEM45A in TNBC cells. Moreover, well known markers of EMT process are vimentin and E-cadherin^{56–59}. EMT was investigated by vimentin and E-cadherin mRNA level analysis. Balance of expression between these two proteins (markers) allows cells to go from epithelial (high level of E-cadherin) to mesenchymal (high level of vimentin) status^{60,61}. Selected cell lines were MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578t due to their high expression of TMEM45A and mesenchymal marker expression. Two-shRNA sequences targeting human TMEM45A gene were validated in the three selected cell lines (**Fig 1B**). One of the two shRNA (sh1) has a better knockdown efficiency compared to the second (sh2). shRNAs were also tested in MDA-MB-468 cells but shRNA efficiency was not marked due to the very high basal level of mRNA coding for TMEM45A (compared to other TNBC cell lines, **Fig 1A**).

The effect of TMEM45A invalidation was assessed on MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578t cell proliferation. A strong inhibition was observed (**Fig 1C**). In most malignancies, anomalous cell proliferation is generally linked to abnormal cell cycle regulation. *Guo et al.* and *Sun et al.* have respectively demonstrated, in human ovarian cancer cells⁷ and glioma cells⁵¹, that silencing of TMEM45A induced cell cycle arrest in the G1-phase through a decrease in the expression of Cyclin D1, CDK4 and PCNA. TMEM45A depletion is also linked to a decrease in cell migration (**Fig 1D**). Our data indicated an important loss of migration ability when silencing TMEM45A. In human ovarian cancer cells, TMEM45A was suggested to correlate with the TGF- β signaling pathway. TGF- β signaling pathway has also been considered to promote tumor progression and invasion. In response to elevated TGF- β levels, cancer cells become more migratory and invasive⁷. In glioma cells, the authors have shown that TMEM45A siRNA decreased the expression of MMP-2 and MMP-9 (matrix metalloproteinase) that degrade extracellular matrix (ECM), hence promoting the invasion of cancer cells⁵¹.

Although indirect evidence of the cellular mechanism is provided for each of these two models, we decided to further investigate TMEM45A pathway by interactome analysis. In our study, we highlight ten proteins as partners of TMEM45A (**Table 1**). We were looking for proteins that might regulate migration and/or proliferation of cancer cells. CAND1 appeared as a potential target due to its role in the regulation of the formation of Skp1-Cullin-F-box (SCF) ubiquitin E3 ligase complex^{39,62}. SCF contains a Cull1/Rbx1 catalytic core bound to variable substrate recognition modules (composed of F-box protein/Skp1) for protein ubiquitination⁶³. CAND1 equilibrates Cull1 with the cellular pool of substrate recognition modules and plays the role of substrate recognition exchange factor. SCF complex controls protein levels of many regulatory proteins (p27, IκB, etc.) through ubiquitin-dependent proteasome degradation⁶⁴. MTSS1 (metastasis suppressor 1) was reported as a target of SCF^{β-TRCP} complex in breast cancer²⁹ and to be degraded by the proteasome.

MTSS1 protein level expression analysis in Triple-Negative Breast Cancer (**Fig 3A**) has revealed a low expression in these cell lines. This result was expected because it is already known that decreased MTSS1 expression is associated with a more aggressive form of breast and prostate cancers²⁹. MTSS1 controls tumor growth and tumor metastasis through the regulation of membrane deformation, endocytosis, cytoskeleton, Sonic hedgehog and epidermal growth factor signaling pathways^{29,65}. Based on this evidence, we decided to further investigate the relevance of MTSS1. TMEM45A-knockdown MDA-MB-231 cells showed an increase in MTSS1 protein level compared to control cells. High MTSS1 level was already correlated with less migratory phenotype in MDA-MB-231, PC3 and PANC-1^{16,29,50}. Our results are thus coherent with the data from the literature. A proteasome inhibitor, MG132, was used as positive control^{66,67} and maximal amount of MTSS1 is already stabilized when using shRNA-targeting TMEM45A in MDA-MB-231. Addition of MG132 to TMEM45A invalidated cells did not seem to stabilize more MTSS1. Interestingly, two different works reported the effect of TMEM45A⁷ or MTSS1⁶⁸ on cell proliferation and migration phenotype in human ovarian cancer. The first group correlated TMEM45A silencing to a decrease in cell proliferation and migration, while the second linked the overexpression of MTSS1 to a reduction of growth rate and invasion ability. The

underlying cellular mechanism was still unknown. Besides, Parr et al. have observed suppression of invasive, migratory, growth and adherence properties when overexpressing MTSS1 in breast cancer cell lines¹⁶. Based on our evidence and the fact that TMEM45A silencing induces MTSS1 stabilization, we can hypothesize a role of TMEM45A protein in the acquisition of migration properties.

In conclusion, we have shown that TMEM45A interacts with CAND1 involved in SCF complex formation, which is responsible for the regulation of protein level through the ubiquitin-proteasome system. MTSS1 is a target of this system and its abundance seems to be impacted by TMEM45A depletion. Several works have highlighted the role of MTSS1 in cell proliferation and migration in different types of cancers. At the end of this study, we propose a hypothesis concerning the cellular pathway in which TMEM45A is involved via the regulation of MTSS1 level.

Materials and Methods

1. Cell culture

MDA-MB-231, MDA-MB-453, Hs 578T, MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-468, BT-549 and T98G human breast cancer cells and human brain cancer cells were maintained in culture in 75-cm² polystyrene flasks (Corning®) with respectively 15 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (#341966-029 DMEM 1X; ThermoFisher, Gibco®) containing 4,5g/L of glucose, 10% of fetal calf serum (#10270 ThermoFisher, Gibco®) and supplemented with penicillin-streptomycin 10,000 U/ml (#15140 ThermoFisher, Gibco®) incubated under an atmosphere containing 5% CO₂. MCF-10A human non-tumorigenic breast epithelial cells were maintained in 75-cm² polystyrene flasks (Corning®, Strassen, Luxembourg) with 15 mL of Gibco® (Geel, Belgium) F-12 Nutrient Mixture (Ham) containing 5% of horse serum (Invitrogen®) supplemented with 10 µg/mL of human Insulin (Sigma®, Schnelldorf, Germany), 0.5 µ/mL of Hydrocortisone (Sigma®, Schnelldorf, Germany) and 20 ng/mL of Epidermal Growth Factor (Peprotech®, London, UK) incubated under an atmosphere containing 5% CO₂.

2. Clonogenic assay

Cells were seeded at 1,000 cells per well (6 well plates) and incubated for 7 days in complete medium. Cells were stained with crystal violet. The quantification was performed after solubilization 1 mL of 10% acetic acid solution. After incubation of 15 min, absorbance was determined at 595nm.

3. Relative quantification of mRNA levels

Total RNA was extracted from cells with RNeasy mini kit and DNase digest protocol (#74116 QIAGEN) Reverse transcription was performed on 2 µg using Reverse Transcription Kit PROMEGA® GoScript (# A2791). The quantitative Real-Time PCR was performed using Viia 7 (Thermo Fisher Scientific) with GoTaq®qPCR Master Mix (#A6002 Promega®) and primers (IDT, 300 nM). 23 kDa was selected as the housekeeping gene for normalization, based on its constant expression within all samples. The primers used for RT-qPCR : 23kDa (reverse 5'-TGA-GCT-GTT-TCT-TCT-TCC-GGT-AGT-3', forward 5'-GCC-TAC-AAG-AAA-GTT-TGC-CTA-TCT-G-3'); TMEM45A (reverse 5'-TGA-TTC-TTG-TTC-TCG-TTC-AGC-ATT-3', forward 5'-TTA-TGC-AGT-AAC-CAT-TGT-CAT-CGT-T-3'); E-cadherin (reverse, 5'- GGA-GTT-TTC-TGG-CAA-GTT-GA-3', forward 5'-GGC-AGT-AAA-ATT-GAG-CCT-GA-3'), vimentin (reverse 5'-TTC-ATT-TCA-CGC-ATC-TGG-CGT-TC-3', forward, 5'-GAG-GCT-GCC-AAC-CGG-AAC-AAT-G-3').

4. Lentivirus-based transduction of cells with shRNA

Glycerol stocks of shRNA hairpins were obtained from Sigma® and isolation of plasmids was carried out with the PureLink® HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen). HEK293T cells were seeded 24 h before transfection. For each T-25 flask, 500 µL 2xHeBS (274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 12 mM Dextrose, 50 mM Hepes in 500 ml MilliQ water at pH 7.05) was added into a sterile Eppendorf tube. In another sterile Eppendorf tube, 3 µg of plasmid DNA of interest, 2 µg of packaging vector pCMV-dR8.91, 1 µg of VSV-G envelope vector, 63 µl 2 M CaCl₂ and distilled water were added to bring up to 500 µL. The CaCl₂/plasmid DNA mix was added to the 2xHeBS and incubated for 20 min and then added to the cells.

The medium was refreshed after 24 h. The supernatant of HEK293T cells containing lentivirus was collected after 48 h to infect cells with polybrene at 1/1000 dilution (Millipore) for 24 h. After 24 h, the second transduction was performed during 8h. Then, the medium was refreshed after lentivirus infection and the cells were selected with puromycin. Individual shRNA vectors used were collected from the human TRC library (Sigma): TRC2 pLKO.5-puro Non-Target shRNA Control (NTC); TMEM45A (shRNA 1 : TRCN0000147692 ; shRNA 2 TRCN0000149328).

5. Migration assay

5.1 Boyden chamber assay

Membrane from a Transwell was hydrated by adding 200 μ L of culture media (DMEM 4.5 g/L glucose, penicillin/streptomycin and containing 1% FBS) in the upper well. After 30 min of hydration, 100 μ L of a suspension of 500.000 or 250.000 cells/mL in DMEM 1% FBS was added to the 200 μ L of medium. 750 μ L of culture medium supplemented with 10% FBS was added to the lower compartment of the chamber. Plates were incubated for 24h or 48h at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Cells that do not migrate (contained in the upper surface of the membrane) were removed using a cotton swab. Cells that migrated are washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 5 min, permeabilized for 5 min with methanol and stained by 0.2% of crystal violet for 5 min. In order to remove the excess of crystal violet, membranes were washed with PBS. Migrating cells were observed with a microscope (Leica). Quantification was performed using 500 μ L of a solution 10% acetic acid.

5.2 Scratch assay

Cells were seeded in 10 cm tissue culture plates for wound closure assay. *In vitro* wounds were created by scraping a 75–80% confluent cells monolayer with a 200 μ L pipette tip in a straight line across the plate. Cells were then treated with mitomycin C (10 μ g/ml) to inhibit cell proliferation. The migration path of cells at the leading edge of the scratch was tracked using time-lapse imaging (every 20 minutes) with Iprasense Cytonote device. Images from time-lapse sequences were analyzed with Horus software.

6. (Co-)Immunoprecipitation for mass spectrometry analysis

Hek293t cells were transfected with 10 µg of DNA from combination of following vectors pLX304_TM45A (DNASU, USA), pLX304 (#25890, addgene), pLPC-N flag_TM45A or pLPC-N flag (#12521, addgene) using X-tremeGene™ 9 DNA transfection reagent (ratio 1:3 DNA/transfection reagent) (Roche). Cells were lysed with IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL®-CA-630 and protease inhibitor cocktail) on ice for 15 min and then sonicated 20 s at the lowest intensity. Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min and 100 µL of each sample are kept for input analysis (controls of protein overexpression). Clarified lysates were incubated overnight at 4°C with V5-Probe (2 µg for 500 µg of proteins, mouse, monoclonal, sc-271944, Santa Cruz®) for V5 tagged proteins and 1/40 Anti-DDDDK tag (flag tag) (12.5 µg for 500 µg of proteins, rabbit, polyclonal, ab1162, ABCAM®) followed by 4 hrs with a mix of 100 µL of Protein A and G Agarose, Fast Flow sepharose beads (#16-156, #16-266, Millipore) at 4°C under gentle shaking. Before immunoprecipitation, protein A and G sepharose beads were blocked overnight at 4°C in IP buffer containing 2.5 % BSA (Sigma-Aldrich), 0.16 µg/µl salmon sperm DNA Thermo Fischer Scientific) and 0.16 µg/µl E.coli tRNA (Sigma-Aldrich). Then, all immunoprecipitates were washed three times in IP buffer.

7. Sample preparation for mass spectrometry analysis

Sample preparation for on-beads digestion. 2 mg of RapiGest (Waters) were dissolved in 666.66 µL of TD100 buffer (containing 100 mM NH₄HCO₃ (#A 6141, Sigma-Aldrich)). Beads were resuspended in 166.6 µL of TD100 + 0.3% RapiGest and mixed with 5 µL of 1 M DTT (1,4-dithiothreitol, Sigma-Aldrich). Samples are incubated 45 min at 37°C with shaking. Then 18 µL of 1.1 M iodoacetamide (#I1149, Sigma-Aldrich) were added to beads and incubated as before. After incubation, digestion was performed by adding 5 µL of 100 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich) and 0.5 µg of Trypsin Gold (Mass spectrometry Grade, Promega) and incubation overnight at 37°C. Digestion reactions were stop using trifluoroacetic acid (TFA) at 1% final concentration (pH < 2) and incubation for 45 min at 37°C with agitation. Mixtures were centrifuged 5 min at 2200 RPM (room temperature) to pellet the beads. Supernatants, containing digested proteins, were concentrated by speed vacuum. Proteins were then loaded on Pierce C18

Spin Tips (Thermo Fischer Scientific) for concentration and desalting of samples. Elution was performed using 20 μ L of 0.1% TFA in 80% acetonitrile. Samples were concentrated using speed vacuum and resuspended in 10 μ L of 0.1% TFA in 2% acetonitrile.

8. Mass spectrometry analysis

Generated digestion products were analyzed thanks to nano-liquid chromatography (RSLC) system Ultimate 3000 (Thermo) connected to a maXis Impact electrospray Ultra-High Resolution Q-TOF mass spectrometer (Bruker). Peptide separation occurs at 30°C through a C18 column (75 μ m X 250 mm reverse phase Acclaim PepMap 100 from Thermo Fischer Scientific) in the Ultimate 3000 LC system. The first mobile phase was composed of 0.1% formic acid in 2% acetonitrile, while the second one contained 0.1% formic acid in 80% acetonitrile. 17 μ L of the sample were injected to the LC and the organic content of the mobile phase was linearly increased from 5% B to 40% during 175 minutes, from 40% B to 90% B for the next 5 minutes, maintained at 90% B for 15 minutes and then decreased at 5% B for the last 20 minutes. As the column is directly coupled with electrospray ionization (ESI) CaptiveSpray (Bruker), the flow-through underwent an ionization step leading to the transformation of this liquid into electrically charged droplets. After a long reverse-phase chromatography separation, the peptides were sequenced by tandem mass spectrometry. In the survey scan, MS spectra were acquired for 0.5 s in the m/z range between 50 and 2200. The 10 most intense peptides ions 2^+ , 3^+ or 4^+ were sequenced. The collision-induced dissociation (CID) energy was automatically set according to mass to charge (m/z) ratio and charge state of the precursor ion. MaXis and Thermo systems were piloted by Compass HyStar 3.2 (Bruker).

9. Database searching

Tandem mass spectra were extracted, charge state deconvoluted and deisotoped by DataAnalysis (Bruker) version 4.2. All MS/MS samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1) and X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1)). Mascot was set up to search the UniRef100_2017_09 database (selected for Homo sapiens, September 2017, 245965

entries) assuming the digestion enzyme trypsin. X! Tandem was set up to search a reverse concatenated subset of the UniRef100_2017_09 database (17882 entries) (only "281474976724112 (F057997)") also assuming trypsin, a reverse concatenated subset of the UniRef100_2017_09 database (22174 entries) (only "281474976724133 (F058019)") also assuming trypsin, a reverse concatenated subset of the UniRef100_2017_09 database (23502 entries) (only "281474976724129 (F058015)") also assuming trypsin and a reverse concatenated subset of the UniRef100_2017_09 database (25444 entries) (only "281474976724131 (F058016)") also assuming trypsin. Mascot and X! Tandem were searched with a fragment ion mass tolerance of 0.050 Da and a parent ion tolerance of 7.0 PPM. Gln → pyro-Glu of the N-terminus, oxidation of methionine and carbamidomethyl of cysteine were specified in Mascot as variable modifications. Glu → pyro-Glu of the N-terminus, ammonia-loss of the N-terminus, Gln → pyro-Glu of the N-terminus, oxidation of methionine and carbamidomethyl of cysteine were specified in X! Tandem as variable modifications.

10. Protein identification from mass spectrometry analysis

Scaffold (version Scaffold_4.8.4, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 78.0% probability to achieve an FDR less than 1.0% by the Scaffold Local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 5.0% probability to achieve an FDR less than 1.0% and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, Al et al Anal. Chem. 2003;75(17):4646-58). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

11. Co-immunoprecipitation validation

Hek293t cells were transfected with 5 µg of DNA (see list of vectors below) using XtremeGene™ 9 DNA transfection reagent (ratio 1:3 DNA/transfection reagent) (Roche). Cells were lysed with IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA,

150 mM NaCl, 1% IGEPAL®-CA-630 and protease inhibitor cocktail) on ice for 15 min and then sonicated 20 s at the lowest intensity. Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min and 100 µL of each sample were kept for input analysis (controls of protein overexpression). Clarified lysates were incubated overnight at 4°C with V5-Probe (2 µg for 500 µg of proteins, mouse, monoclonal, sc-271944, Santa Cruz®) followed by 4 hrs with a mix of 100 µL of Protein A and G Agarose, Fast Flow sepharose beads (#16-156, #16-266, Millipore) at 4°C under gentle shaking. Before immunoprecipitation, protein A and G sepharose beads were blocked overnight at 4°C in IP buffer containing 2.5 % BSA (Sigma-Aldrich), 0.16 µg/µl salmon sperm DNA (Thermo Fischer Scientific) and 0.16 µg/µl E.coli tRNA (Sigma-Aldrich). Then, all immunoprecipitates were washed three times in IP buffer, denatured at 95°C for 10 min and separated on 12 % SDS-PAGE for western blot analysis.

Vectors used for immunoprecipitation: 1) pLX304_TM45A (DNASU, USA) ; 2) pLX304 (#25890, addgene) ; 3) pcDNA3-Myc3-CAND1 (#19948, addgene) ; 4) pcDNA3-3xMyc.

12. Western Blot analysis

Western blotting analysis was performed from adapted protocols. Cells seeded in 25 cm² flasks 1 day before incubation, were scrapped in 150 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1 % IGEPAL®-CA-630) containing a protease inhibitor mixture (a mini tablet for 10 mL lysis buffer, «Complete» from Roche Molecular Biochemicals,). The lysate was then centrifuged 15 minutes at 15,000 rpm at 4°C and the supernatant was collected. Proteins were then separated by 12 % SDS-PAGE at 200V for 45 min. (homemade gel with Tris running buffer (2.5mM Tris, 19.2 Mm Glycin, 0.1 % SDS, pH = 8.3/8.5)) and transferred onto a nitrocellulose membrane (0.2 µm, #1620112) in a wet transfer system (transfer buffer (2.5 mM Tris, 15 mM Glycin, 20 % Methanol, pH = 8.3) at 100V for 2h. The membrane was blocked 1h at room temperature in 5 % milk in 1X TBS-T (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 % Tween 20) and incubated with primary antibody diluted in 1 % BSA, 0.1 % sodium azide in TBS-Tween were incubated overnight at 4°C. After 3 washes with 1X TBS-Tween, the membrane was incubated for 1 h with secondary antibody diluted in

5 % milk in TBS-Tween and washed at least 6 times with 1X TBS-T. The proteins were detected by Ultra Cruz autoradiography film (SC-201697) with Western Blotting Luminol Reagent (SC-2048) from Santa Cruz according to instructions. The quantity of proteins loaded on the gel was assayed with Pierce colorimetric assay using a range of BSA concentration between 0-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. The revelation of a housekeeping gene such as α -tubulin allowed to determine the total amount of proteins loaded on the gel and was used for normalization.

Working antibodies and conditions of use: 1) 1/1000 V5-tag (D3H8Q) (rabbit, monoclonal, #13202S, Cell Signaling[®]) ; 2) MYC-tag (9B11) (mouse, monoclonal, #2276S, Cell Signaling[®]) ; 3) MTSS1 (SS-3) (mouse, monoclonal, SC-101204, Santa Cruz[®]) ; 4) 1/2000 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (goat, #7074, Cell Signaling[®]) ; 5) 1/2000 Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (horse, #7076S, Cell Signaling[®]) ; 6) VeriBlot for IP Detection Reagent (HRP) (ab131366, ABCAM[®]).

13. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Sigma Stat software. Data are presented as mean $\pm$ SD and were evaluated by unpaired student T-test (Two-tailed), after checking the variance equivalence using a Fischer test ($p > 0.05$ meaning a variance equivalence) and performing a Welch's correction in case of no equivalence of variances.

Acknowledgments

The authors thank the University of Namur Mass Spectrometry platform (MaSUN) for sample analysis.

Author contributions

Conception and design of the work: Dal Maso Thomas, Marx Sébastien, Le Calvé Benjamin, Wouters Johan, Michiels Carine; **acquisition of data:** Dal Maso Thomas, Marx Sébastien, Dieu Marc, Fransolet Maude; **analysis and interpretation of data:** Dal Maso Thomas, Marx Sébastien, Le Calvé Benjamin, Wouters Johan, Michiels

Carine; redaction of the manuscript: Dal Maso Thomas, Le Calvé Benjamin, Wouters Johan, Michiels Carine. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

Thomas Dal Maso is a recipient of a FRIA Grant (FNRS, Belgium). Sebastien Marx is a recipient of a Télévie grant (FNRS, Belgium). Benjamin Le Calvé is recipient of a postdoctoral Télévie grant (FNRS, Belgium).

References

1. Grimm, D. *et al.* Diagnostic and Therapeutic Use of Membrane Proteins in Cancer Cells. *Curr. Med. Chem.* **18**, 176–190 (2011).
2. Liu, J., Liu, Y., Ren, Y., Kang, L. & Zhang, L. Transmembrane protein with unknown function 16A overexpression promotes glioma formation through the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **9**, 1068–1074 (2014).
3. Paulino, C., Kalienkova, V., Lam, A. K. M., Neldner, Y. & Dutzler, R. Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM. *Nature* **552**, 421–425 (2017).
4. McCaffary, D. STING signalling: an emerging common pathway in autoimmunity and cancer. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **39**, 253–258 (2017).
5. Berger, G., Marloye, M. & Lawler, S. E. Pharmacological Modulation of the STING Pathway for Cancer Immunotherapy. *Trends Mol. Med.* **25**, 412–427 (2019).
6. Ranoa, D. R. E. *et al.* STING promotes homeostasis via regulation of cell proliferation and chromosomal stability. *Cancer Res.* **79**, 1465–1479 (2019).
7. Guo, J. *et al.* Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 3124–3130 (2015).
8. Sun, W. *et al.* Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation , migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 12657–12667 (2015).
9. Flamant, L. *et al.* TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 391 (2012).
10. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* **109**, 1721–1728 (2007).
11. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl.*

- J. Med.* 1938–48 (2010).
12. Lee, Y.-G., Macoska, J. A., Korenchuk, S. & Pienta, K. J. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* **4**, 291–294 (2002).
13. Nixdorf, S. *et al.* Expression and regulation of MIM (Missing in Metastasis), a novel putative metastasis suppressor gene, and MIM-B, in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett.* **215**, 209–220 (2004).
14. Loberg, R. D. *et al.* Differential expression analysis of MIM (MTSS1) splice variants and a functional role of MIM in prostate cancer cell biology. *Int. J. Oncol.* **26**, 1699–1705 (2005).
15. Du, P., Ye, L., Yang, Y. & Jiang, W. G. The tumour suppressive role of metastasis suppressor-1, MTSS1, in human kidney cancer, a possible connection with the SHH pathway. *J. Exp. Ther. Oncol.* **10**, 91–99 (2012).
16. Parr, C. & Jiang, W. G. Metastasis suppressor 1 (MTSS1) demonstrates prognostic value and anti-metastatic properties in breast cancer. *Eur. J. Cancer* **45**, 1673–1683 (2009).
17. Liu, K. *et al.* Downregulation of metastasis suppressor 1(MTSS1) is associated with nodal metastasis and poor outcome in Chinese patients with gastric cancer. *BMC Cancer* **10**, 1–9 (2010).
18. Yamagishi, A., Masuda, M., Ohki, T., Onishi, H. & Mochizuki, N. A Novel Actin Bundling/Filopodium-forming Domain Conserved in Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53 and Missing in Metastasis Protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 14929–14936 (2004).
19. Mattila, P. K., Salminen, M., Yamashiro, T. & Lappalainen, P. Mouse MIM, a tissue-specific regulator of cytoskeletal dynamics, interacts with ATP-actin monomers through its C-terminal WH2 domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 8452–8459 (2003).
20. Woodings, J. A., Sharp, S. J. & Machesky, L. M. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase δ . *Biochem. J.* **371**, 463–471 (2003).
21. Machesky, L. M. & Johnston, S. A. MIM: A multifunctional scaffold protein. *J. Mol. Med.* **85**, 569–576 (2007).
22. Utikal, J. *et al.* The expression of metastasis suppressor MIM/MTSS1 is regulated by DNA methylation. *Int. J. Cancer* **119**, 2287–2293 (2006).
23. Suetsugu, S. *et al.* The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* **281**, 35347–35358 (2006).
24. Liu, Z. *et al.* MiR-182 overexpression in tumourigenesis of high-grade serous ovarian carcinoma. *J. Pathol.* **228**, 204–215 (2012).
25. Du, P., Ye, L., Ruge, F., Yang, Y. & Jiang, W. G. Metastasis suppressor-1, MTSS1, acts as a putative tumour suppressor in human bladder cancer. *Anticancer Res.* **31**, 3205–3212 (2011).
26. Zhang, S. & Qi, Q. MTSS1 suppresses cell migration and invasion by targeting CTTN in glioblastoma. *J. Neurooncol.* **121**, 425–431 (2015).
27. Zhou, L. *et al.* Expression and Significances of MTSS1 in Pancreatic Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **22**, 7–14 (2016).

28. Giacobbe, A. *et al.* p63 controls cell migration and invasion by transcriptional regulation of MTSS1. *Oncogene* **35**, 1602–1608 (2016).
29. Zhong, J. *et al.* SCF-BTRCP targets MTSS1 for ubiquitination-mediated destruction to regulate cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget* **4**, (2013).
30. Dye, B. T. & Schulman, B. A. Structural Mechanisms Underlying Posttranslational Modification by Ubiquitin-Like Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 131–150 (2007).
31. Husnjak, K. & Dikic, I. Ubiquitin-Binding Proteins: Decoders of Ubiquitin-Mediated Cellular Functions. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 291–322 (2012).
32. Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307 (2014).
33. Jin, J. *et al.* Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev.* **18**, 2573–2580 (2004).
34. Lee, J. E. *et al.* The Steady-State Repertoire of Human SCF Ubiquitin Ligase Complexes Does Not Require Ongoing Nedd8 Conjugation. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.006460 (2011).
35. Feldman, R. M. R., Correll, C. C., Kaplan, K. B. & Deshaies, R. J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221–230 (1997).
36. Kamura, T. *et al.* Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science (80-.)*. **284**, 657–661 (1999).
37. Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. & Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219 (1997).
38. Olma, M. H. & Dikic, I. Cullins getting undressed by the protein exchange factor cand1. *Cell* **153**, 14–16 (2013).
39. Pierce, N. W. *et al.* Cand1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* **153**, 206–215 (2013).
40. Wu, S. *et al.* CAND1 controls in vivo dynamics of the cullin 1-RING ubiquitin ligase repertoire. *Nat. Commun.* **4**, 1642–1649 (2013).
41. Soucy, T. A., Dick, L. R., Smith, P. G., Milhollen, M. A. & Brownell, J. E. The NEDD8 conjugation pathway and its relevance in cancer biology and therapy. *Genes and Cancer* **1**, 708–716 (2010).
42. Bornstein, G., Ganoth, D. & Hershko, A. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11515–11520 (2006).
43. Emberley, E. D., Mosadeghi, R. & Deshaies, R. J. Deconjugation of Nedd8 from Cull1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylation of SCF by a noncatalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 29679–29689 (2012).
44. Schmidt, M. W., McQuary, P. R., Wee, S., Hofmann, K. & Wolf, D. A. F-Box-Directed CRL Complex Assembly and Regulation by the CSN and CAND1. *Mol. Cell* **35**, 586–597 (2009).

45. Free, R. B., Hazelwood, L. A. & Sibley, D. R. Identifying novel protein-protein interactions using co-IP and mass spectrometry. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2** 1–19 (2009). doi:10.1002/0471142301.ns0528s46. Identifying
46. Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Bamberger, A. & Yates Illrd, J. R. Deep interactome profiling of membrane proteins by Co- interacting Protein Identification Technology (CoPIT). *Nat. Protoc.* **11**, 2515–2528 (2016).
47. Kan, A. *et al.* An improved method for the detection and enrichment of low-abundant membrane and lipid raft-residing proteins. *J. Proteomics* **79**, 299–304 (2013).
48. Moretti, F. *et al.* TMEM41B is a novel regulator of autophagy and lipid mobilization. *EMBO Rep.* **19**, e45889 (2018).
49. Yu, X. *et al.* Cytosolic TMEM88 promotes triple-negative breast cancer by interacting with Dvl. *Oncotarget* **6**, (2015).
50. Zeleniak, A. E., Huang, W., Brinkman, M. K., Fishel, M. L. & Hill, R. Loss of MTSS1 results in increased metastatic potential in pancreatic cancer. *Oncotarget* **8**, 16473–16487 (2017).
51. Sun, W. *et al.* Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 12657–12667 (2015).
52. Ahmed Wahba, H. & Ahmed El-Hadaad, H. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med* **12**, 106–116 (2015).
53. Jang, M. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Chung, Y. R. & Park, S. Y. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Hum. Pathol.* **46**, 1267–1274 (2015).
54. Jiang, Z. *et al.* RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple negative breast cancer. *Cell Cycle* **10**, 1563–1570 (2011).
55. Hayez, A. *et al.* High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp. Dermatol.* **23**, 339–344 (2014).
56. Wu, S. *et al.* Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
57. Werner, S., Stenzl, A., Pantel, K. & Todenh, T. Expression of Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Markers in Circulating Tumor Cells. in *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells. Advances in Experimental Medicine and Biology* (eds. Magbanua, M. & Park, J.) **994**, 205–228 (Springer, 2017).
58. Li, L. & Li, W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol. Ther.* **150**, 33–46 (2015).
59. Chen, T., You, Y., Jiang, H. & Wang, Z. Z. Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **232**, 3261–3272 (2017).
60. Liu, C.-Y., Lin, H.-H., Tang, M.-J. & Wang, Y.-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* **6**, (2015).
61. Chaw, S. Y. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers - E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin - In oral squamous cell carcinogenesis and

- transformation. *Oral Oncol.* **48**, 997–1006 (2012).
62. Zheng, J. *et al.* CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol. Cell* **10**, 1519–1526 (2002).
 63. Reitsma, J. M. *et al.* Composition and Regulation of the Cellular Repertoire of SCF Ubiquitin Ligases. *Cell* **171**, 1326–1339.e14 (2017).
 64. Liu, X. *et al.* Cand1-Mediated Adaptive Exchange Mechanism Enables Variation in F-Box Protein Expression. *Mol. Cell* **69**, 773–786.e6 (2018).
 65. Xie, F., Ye, L., Ta, M., Zhang, L. & Jiang, W. G. MTSS1: a multifunctional protein and its role in cancer invasion and metastasis. *Front. Biosci.* **1**, 621–631 (2011).
 66. Han, Y. H., Moon, H. J., You, B. R. & Park, W. H. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Oncol. Rep.* **22**, 215–221 (2009).
 67. Zeleniak, A. E., Huang, W., Fishel, M. L. & Hill, R. PTEN-Dependent Stabilization of MTSS1 Inhibits Metastatic Phenotype in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Neoplasia (United States)* **20**, 12–24 (2018).
 68. Liu, R. *et al.* Metastasis suppressor 1 expression in human ovarian cancer: The impact on cellular migration and metastasis. *Int. J. Oncol.* **47**, 1429–1439 (2015).

Figure and Table legends

Figure 1. A: Cell line selection from Triple-Negative Breast Cancer (SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-231, Hs 578T and BT-549) based on mRNA level of TMEM45A, vimentin and E-cadherin. MCF7 was used as control for normalisation. **B:** Validation of TMEM45A knockdown using sh1 and sh2 in MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T. shNTC, scrambled shRNA viral-infected cells; sh1 and sh2, TMEM45A-shRNA-1 and -2 viral-infected cells. TMEM45A mRNA level was assessed by RT-qPCR. **C:** Cell proliferation assay (clonogenic assay) was performed in control and TMEM45A-depleted MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cells (must be added). Representative images of the clonogenic assays are shown (upper panel). Quantitative results of the cell proliferation assays by measuring absorbance at 595 nm after dissolution of crystal violet in 1 mL of 10% acetic acid (lower panel, must be added). **D:** Cell migration assays of control and TMEM45A-knockdown MDA-MB-231, MDA-MB-453 and Hs 578T cells in Transwell chambers. Cells that migrated from the upper well into the lower well were stained. All data from cell proliferation and cell migration assays are representative results of three independent experiments. Quantification represent the mean value $\pm$ SD of three independent experiments. ns: $p > 0.05$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$ and ****: $p \leq 0.0001$.

Figure 2. A: Schematic representation of protein conditions from interactome analysis by mass spectrometry. Circles annotated TMEM45A-V5, Control V5 tag, TMEM45A-flag and Control flag tag correspond to each condition that was analyzed by mass spectrometry. **B, C and D:** Validation of the interaction between TMEM45A and CAND1 by co-immunoprecipitation and Western Blot analysis. Each sample was analyzed before (**B**) and (**C and D**) after immunoprecipitation using V5 tag from TMEM45A. CAND1 was revealed using MYC-tag antibody (**C**) and TMEM45A with V5-tag antibody (**D**).

Table 1. List of overlapped TMEM45A interactants in immunoprecipitation experiments using V5 or flag tags.

Figure 3. A: MTSS1 expression in Triple-Negative Breast Cancer cells (SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-453, MDA-MB-231, Hs 578T and BT-549), in MCF 10A cells and in MCF7 was detected by western blotting. **B, C and D:** Effect of TMEM45A depletion on MTSS1 protein level in MDA-MB-231 (**B**), MDA-MB-453 (**C**) and Hs 578T (**D**) cells. MG132 was used as proteasome inhibitor for positive control. Loading control was performed using GAPDH protein. shNTC, scrambled shRNA viral-infected cells; sh1 and sh2, TMEM45A-shRNA-1 and -2 viral-infected cells.

Supplemental I. A: Migratory properties of MDA-MB-231 cells was quantified using scratch assays. **B:** Wound size was reported over the time.

Expanded view Figure legends

Mass spectrometry table. Total TMEM45A interactants identified by Mass Spectrometry analysis using V5 and flag tag immunoprecipitation (controls included).

Figures

Figure 1

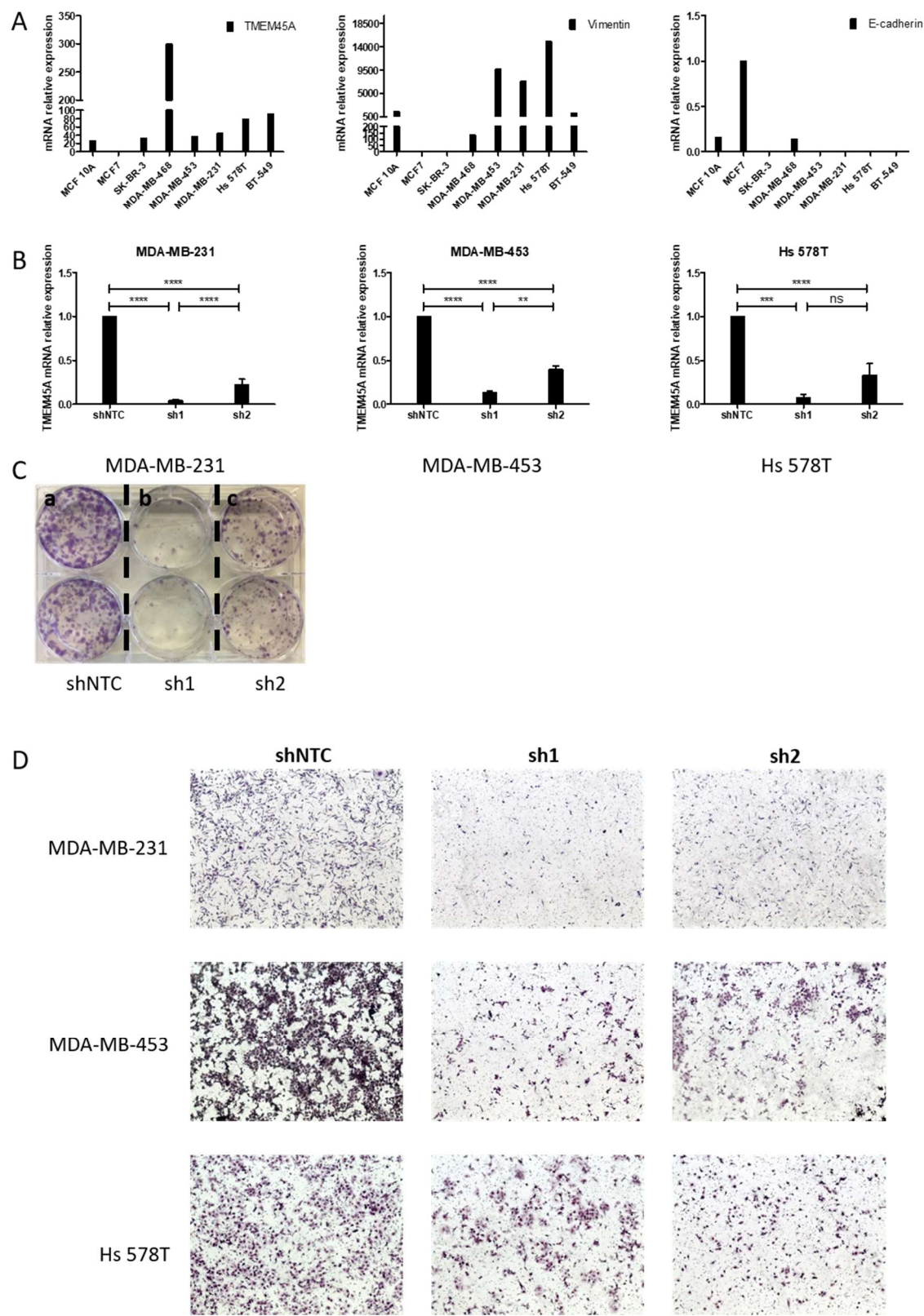


Figure 2

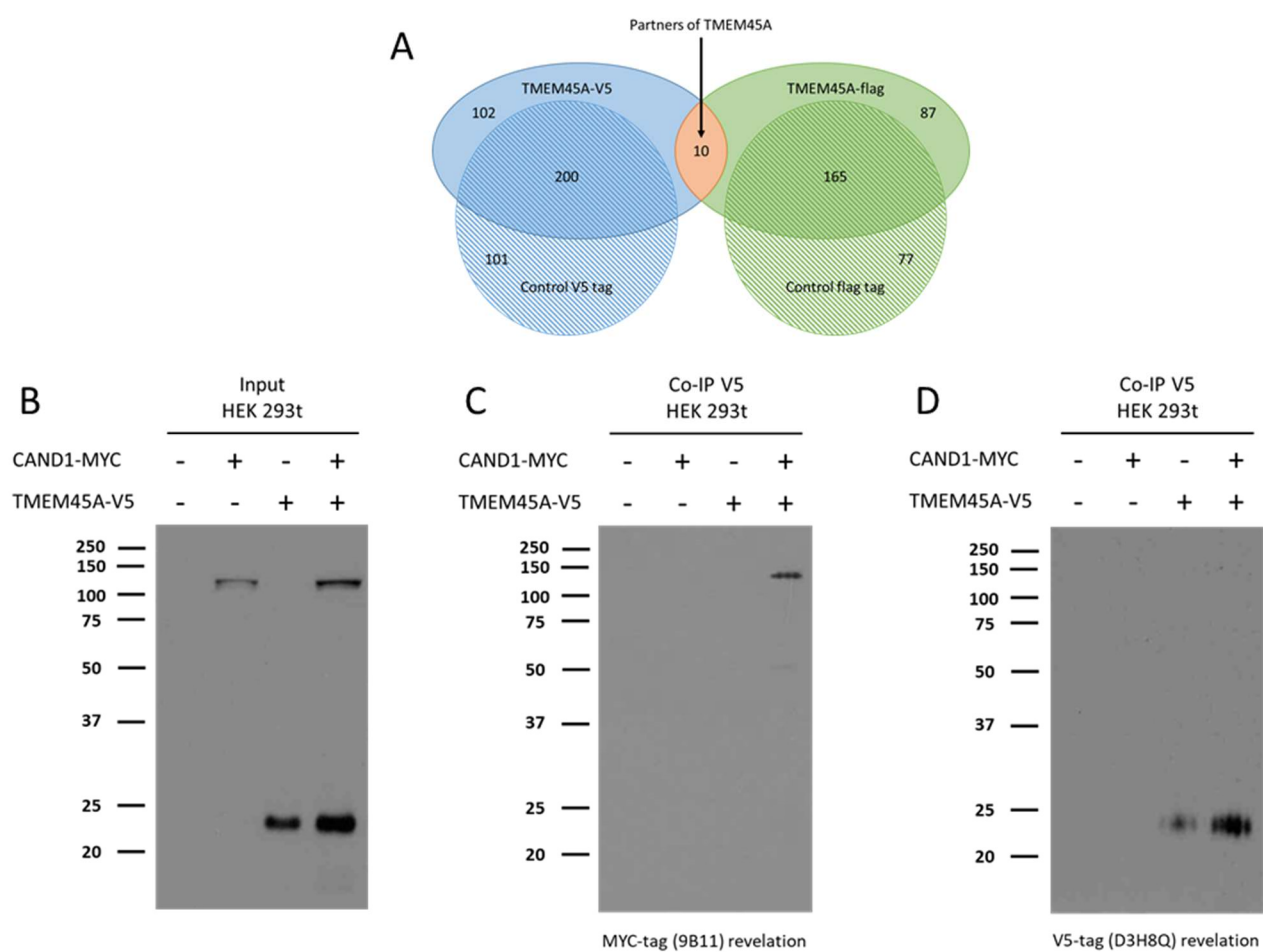
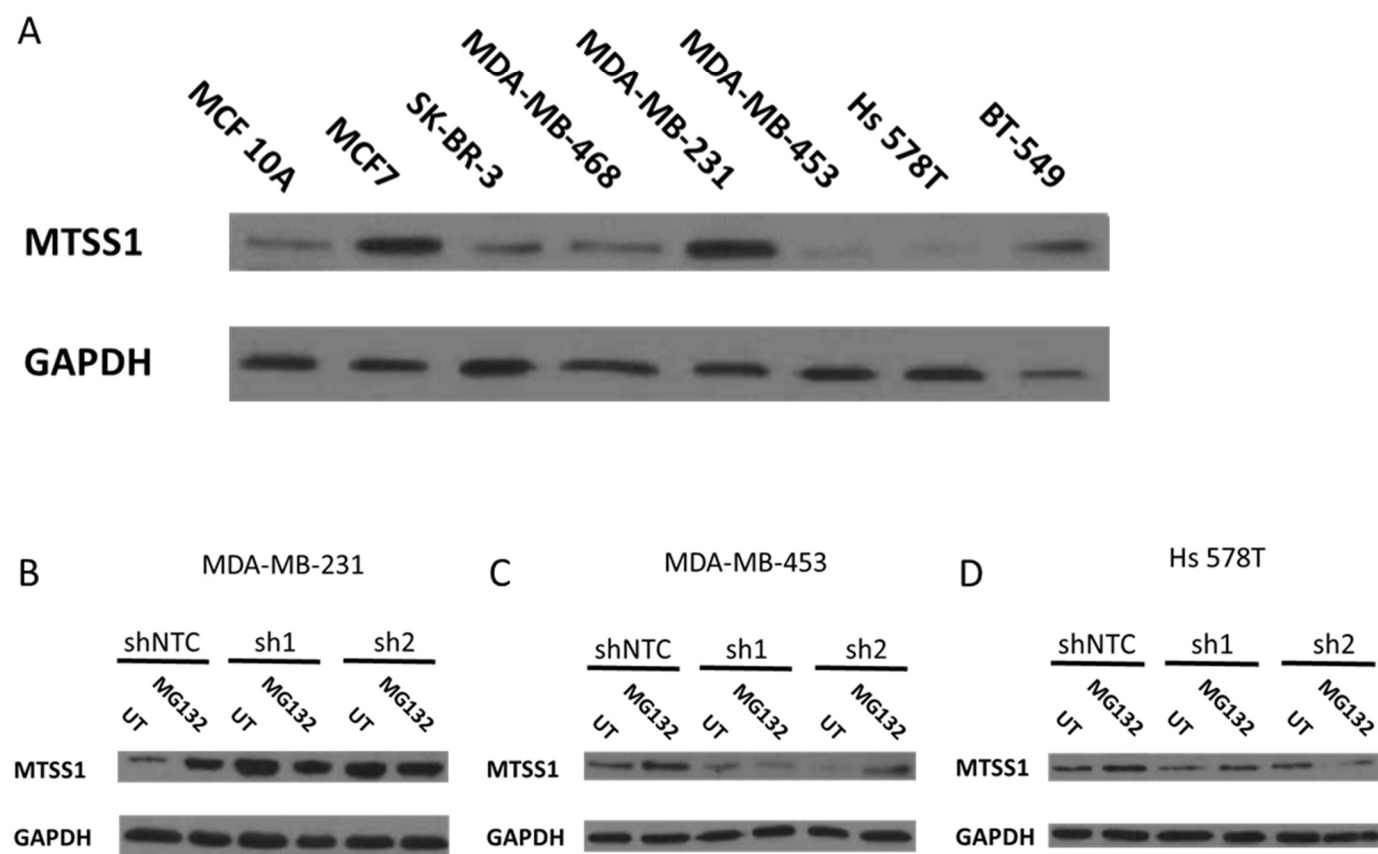


Table 1

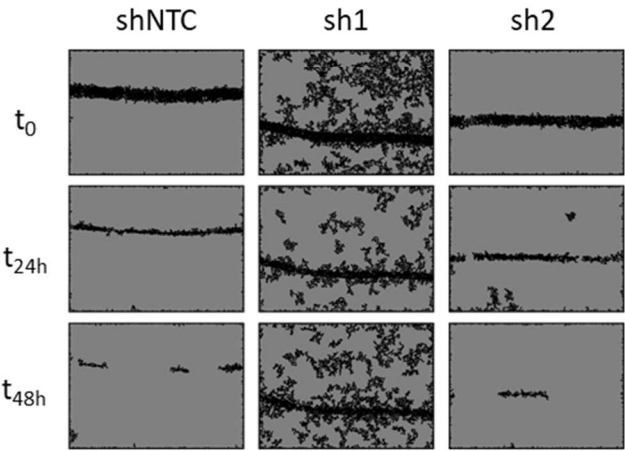
Protein entry	Protein accession	Gene name	Protein description	Cellular component	Biological process	Molecular function
Q9HC52	CBX8_HUMAN	CBX8	Chromobox protein homolog 8 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CBX8 PE=1 SV=3	Nucleus, component of a Polycomb group (PcG) multiprotein PRC1-like complex	Regulation of gene expression through chromatin remodeling and histone modifications	Monoubiquitination of histone H2A 'Lys-119'
U3KQ12	U3KQ12_HUMAN	SAP18	Histone deacetylase complex subunit SAP18 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SAP18 PE=1 SV=1	Nucleus	Deacetylation of lysine residues on histones, regulation of transcription by epigenetic repression, cell cycle progression and developmental events	Enzyme, acetyl group cleavage activity
P62318-2	SMD3_HUMAN	SNRPD3	Isoform 2 of Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SNRPD3	Nucleus, cytoplasm, spliceosomal complex	Spliceosomal snRNP assembly and small nuclear ribonucleoprotein biogenesis	RNA binding, catalytic activity (transesterification and nucleophilic attack)
Q86TM3	DDX53_HUMAN	DDX53	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX53 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DDX53 PE=1 SV=3	Nucleus	RNA metabolism process (ribosome biogenesis, pre-mRNA splicing, and translation initiation)	RNA binding, RNA helicase activity, nucleoside-triphosphatase activity
P35659	DEK_HUMAN	DEK	Protein DEK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DEK PE=1 SV=1	Nucleus	Chromatin organization	DNA binding
P27694	RPA1_HUMAN	RPA1	Replication protein A 70 kDa DNA- binding subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RPA1 PE=1 SV=2	Nucleus, component of the heterotrimeric replication protein A complex (RPA/RP-A)	DNA replication, DNA repair, DNA recombination	DNA binding, nucleic acid binding
Q9NQZ2	SAS10_HUMAN	UTP3	Something about silencing protein 10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UTP3 PE=1 SV=1	Nucleus	Structure of silenced chromatin, brain development	DNA binding
UPI0002380B1E Q86VP6	CAND1_HUMAN	CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAND1	Nucleus, cytoplasm	SCF complex assembly, regulation of Cullin-Ring ubiquitin ligases, regulation of gene expression	Protein binding, inhibitor of cullin neddylation and of Skp1, cullin, and F box ubiquitin ligase complex assembly and activity
B4DRY7	B4DRY7_HUMAN		cDNA FLJ51286, highly similar to WD repeat protein 12 OS=Homo sapiens OX=9606 PE=2 SV=1	Nucleus, component of a nucleolar protein complex	Coordination of multi-protein complex assemblies, maturation of the large ribosomal subunit (60S), substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex	Protein binding
UPI0005D015FC Q96I24	FUBP3_HUMAN	FUBP3	Far upstream element-binding protein 3 isoform X2	Nucleus, component of the far- upstream element (FUSE)	Gene expression regulation	Single-stranded DNA binding

Figure 3

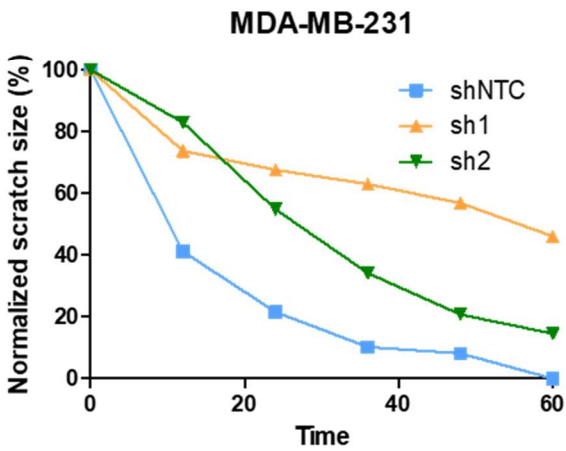


Supplemental I

A



B



III. Discussion générale, conclusions et perspectives

1 Discussion générale

1.1 Problématique des protéines membranaires

La famille des protéines membranaires est une vaste famille regroupant toutes les protéines composées d'au moins un segment transmembranaire qui traverse complètement (polytopique) ou partiellement (monotopique) une membrane biologique²¹⁰. Dans cette famille, certains groupes de protéines sont très bien caractérisés (ex : GPCR : récepteur couplé aux protéines G) et d'autres moins. Les protéines pour lesquelles peu d'informations, structurales ou fonctionnelles, sont disponibles, sont regroupées dans la sous famille des « TMEMs ».

Pendant longtemps, les protéines appartenant à la famille des TMEMs ont été classées sur base du nombre de segments transmembranaires qui les composaient, permettant ainsi de corréler une fonction à leur structure supposée. Par exemple, il a longtemps été présumé que les canaux à ions étaient composés de six segments alors que les GPCR sont composés de sept segments transmembranaires²¹¹. La résolution de la structure d'un certain nombre de protéines membranaires a montré que cette méthode de classification (détermination de la fonction sur base de la structure) n'est pas nécessairement pertinente dû à la complexité des protéines membranaires (ex : TMEM206). Suite à la détermination de la structure ou de la fonction de ces protéines, elles peuvent être re-classées dans des catégories plus spécifiques de protéines (ex : canal à ions, ...).

En raison de leur nombre important et de leurs diverses fonctions biologiques, les protéines membranaires sont très intéressantes pour le développement de nouveaux traitements²¹². En effet, elles représentent la cible d'environ 60% des médicaments commercialisés¹⁸⁵. Le développement de nouvelles thérapies est basé sur des cibles protéiques potentielles pour lesquelles la structure ou la fonction est bien caractérisée. Cependant, peu de structures de protéines transmembranaires sont disponibles dans les bases de données (Protein Data Bank (PDB)¹⁴², Membrane proteins of known structure (mpstruc)²¹³...). Ce manque d'informations structurelles provient de la nature des protéines d'intérêt qui sont intégrées dans la bicouche lipidique. Cette localisation pose

un problème majeur pour déterminer avec précision la structure de ce type de protéines en raison de la difficulté à les purifier. Pour éviter le défi de la cristallographie des protéines membranaires, des algorithmes d'homologie et de reconnaissance d'éléments de structure secondaire sont utilisés²¹⁴.

Dans l'étude des protéines membranaires, le phénotype associé à la déplétion de la protéine est généralement étudié sans *a priori* sur la structure ou la fonction de celle-ci. Cependant, certaines protéines appartenant à la famille des TMEMs sont bien caractérisées d'un point de vue structural, permettant une meilleure compréhension de leur fonction biologique. L'acquisition de données structurales sur une protéine est très utile dans le développement de composés agonistes ou antagonistes. Par exemple, TMEM16A est l'une des protéines transmembranaires la mieux caractérisée depuis qu'elle a été décrite comme un transporteur des ions chlorure activé par le calcium et ayant un impact sur la migration des cellules cancéreuses^{215,216}. La structure a été déterminée après cristallisation de la protéine, démontrant que TMEM16A est formée de dix segments transmembranaires et qu'elle dimérise dans la membrane pour former le canal ionique actif²¹⁷. La connaissance de la structure 3D de TMEM16A a permis de concevoir des composés agonistes et antagonistes afin d'impacter les propriétés pro- ou anti-métastatiques de cette protéine. Plusieurs composés ayant une activité sur TMEM16A ont été identifiés par criblage à haut débit. Les composés identifiés ont été divisés en trois grandes classes : activateurs, modulateurs et inhibiteurs^{218,219}. La principale limitation à l'utilisation de ces composés est le manque de sélectivité vis-à-vis de cette famille de protéine (canaux ioniques activés par le calcium)^{220,221}. Au vu de sa fonction centrale dans le corps, il est attendu que l'inhibition de cette protéine entraîne certains effets indésirables (cardiaque et neuronal)²²².

1.2 Caractérisation structurale des protéines membranaires

La détermination de structures de protéine représente un défi dans le milieu de la biologie structurale²²³. En effet, elle nécessite de faire appel à diverses techniques et principes de biologie moléculaire, biochimie ou encore de biophysique dans le but d'élucider la structure moléculaire, mais aussi la dynamique de ces systèmes biologiques²²⁴. L'obtention de la structure tridimensionnelle des protéines fournit de

nombreuses informations sur le mécanisme et la fonction associés à ces protéines et de surcroît sur le traitement potentiel de la maladie associée. De plus, la composante structurale permet de développer des approches rationnelles dans la conception de médicaments^{225,226}. De nos jours, quatre grandes techniques sont couramment utilisées pour la résolution expérimentale de structures protéiques : la diffraction des rayons X (DRX)²²⁷, la résonance magnétique nucléaire (RMN)^{228,229}, la cryo-microscopie électronique (cryo-EM)^{230,231} ou encore la spectrométrie de masse (MS)^{232,233}. Bien que 90 % des structures connues à ce jour soient déterminées par diffraction des rayons X, il n'existe pas de méthode universelle qui puisse fonctionner pour n'importe quel système protéique. Le choix d'une méthode par rapport à une autre est donc dépendant des avantages et inconvénients de chacune de ces techniques et surtout du système étudié. Le tableau 2 reprend une comparaison de ces différentes techniques.

Dans le cas de l'étude de protéines membranaires, deux techniques ne peuvent être utilisées : la RMN et la spectrométrie de masse. En effet, la première technique (RMN) nécessite de travailler en solution aqueuse.^{229,234} La solubilisation des protéines membranaires nécessite l'utilisation de détergents, induisant des bruits de fonds importants lors de l'acquisition des données RMN. Cependant, cette technique semble être énormément utilisée dans la caractérisation de la dynamique des protéines membranaires et de leurs interactions avec leur environnement²³⁵. La seconde technique (spectrométrie de masse) nécessite quant à elle de réticuler (« cross-linking ») la protéine sur des résidus lysines (Lys, K)^{236,237}. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse requiert une digestion des protéines par des protéases (ex : trypsine) pour obtenir de petits peptides analysables. Une limitation de cette technique est donc l'accessibilité aux résidus lysines et sites de clivages de la protéine par l'agent de réticulation ou la protéase. Dans le cas de protéines membranaires, en condition native, la protéine se trouve au sein d'une membrane biologique et une fois solubilisée, au sein de micelles (détergents). Il est donc facilement imaginable que la nature de la protéine soit un frein à l'utilisation de cette technique.

	Avantages	Inconvénients	Résolution
DRX	• Bien développé • Résolution atomique • Vaste gamme de poids moléculaire • Protéines cytosolubles, membranaires et complexes • Quantité échantillon	• Pureté échantillon • Cristallisation • Diffraction • Etat cristallin (statique)	Haute
Cryo-EM	• Structure de l'état natif • Faible quantité de protéine • Facilité de résolution par les « nanobody »	• Faible résolution • Protéines de haut poids moléculaires (>150 kDa) • Coût • Utilisation de « nano-» ou « megabody »	Faible
RMN	• Haute résolution • Solution • Structure dynamique • Protéines cytosolubles	• Pureté échantillon • Quantité échantillon • Préparation de l'échantillon • Temps d'acquisition des données • Temps pour la résolution de la structure • Pas applicable aux protéines membranaires • Petit système (40-50 kDa) • Marquage ^{15}N et ^{13}C	Haute
MS	• Solution • Faible quantité • Protéines cytosolubles	• Réticulation • Protéines membranaires • Large système • Analyse des résultats	Faible

Tableau 2 : Comparaison de la diffraction des rayons X (DRX), de la résonance magnétique nucléaire (RMN), de la cryo-microscopie électronique (cryo-EM) et de la spectrométrie de masse (MS) dans le cadre de la résolution de structures protéiques.

Les deux techniques couramment utilisées pour la résolution de structure de protéines membranaires sont la DRX et la cryo-EM. La DRX est la méthode la plus développée pour obtenir la structure tridimensionnelle des protéines²²⁴. Cependant, elle présente un certain nombre d'inconvénients : la production et la purification de la protéine, l'obtention de cristaux et l'obtention de données utilisables^{227,238}. La partie la plus limitante étant l'étape de cristallisation des protéines. Pour les protéines membranaires, des techniques spécialisées ont été développées pour permettre d'augmenter la probabilité de formation des cristaux comme par exemple la cristallisation en phase cubique lipidique^{239,240}. Cependant, la nature de ces protéines reste un frein à leur étude. Une technique récente, la cryo-EM, a vu le jour pour la résolution de structures²⁴¹. Cette technique consiste à geler rapidement les protéines et les molécules d'eau, de façon à ce que ces dernières ne cristallisent pas et forment un solide « amorphe ». L'échantillon gelé ainsi obtenu est analysé par microscopie électronique et une série d'images (en deux dimensions) sont prises. Sur base de plusieurs jeux d'images représentant diverses orientations de la protéine d'intérêt, un modèle de la structure tridimensionnelle peut être généré^{242,243}. Cette technique présente cependant des inconvénients, comme la mise au point des conditions cryoscopiques et l'obtention de suffisamment de jeux d'images. Le nombre d'images pour chacune des orientations de protéine est un facteur limitant dans la résolution de sa structure par cette technique. De plus, l'accès à ce genre d'équipement est limité et représente un certain coût (technique relativement récente).

Dans le cadre de l'étude de TMEM45A, l'approche par modélisation a été utilisée suite aux diverses difficultés rencontrées lors de la production de la protéine en système bactérien. La génération du modèle de la structure a permis d'obtenir des informations sur les types d'éléments de structures secondaires et surtout sur le nombre de segments transmembranaires composant la protéine TMEM45A. La validation du modèle au moyen du graphe de Ramachandran met en évidence que 8% des résidus sont modélisés avec une géométrie qui n'est *a priori* pas permise. Suite à l'analyse plus détaillée de ces résidus, il se trouve être que ceux-ci sont principalement situés au sein de petites boucles cytosolubles reliant deux segments transmembranaires. La taille relativement petite de ces boucles (formées d'une dizaine d'acides aminés) induit des

contraintes géométriques plus importantes aux résidus les composant en comparaison aux boucles de plus grandes tailles. Des améliorations du modèle pourraient être envisagées pour la suite du projet.

1.3 Caractérisation fonctionnelle des protéines membranaires

Pour la plupart des protéines membranaires, la structure et la fonction ne sont pas connues. Des stratégies permettant d'investiguer leur rôle potentiel ont donc été établies. Une stratégie très intéressante (et qui a été utilisée dans ce travail), consiste à contourner la difficulté de l'étude structurale d'une protéine en s'intéressant à ses partenaires protéiques *in cellulo*. L'étude de ses derniers est rendue possible après co-immunoprécipitation de la protéine cible et de ses partenaires et analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, grâce à cette technique, la fonction de plusieurs membres appartenant à la famille des TMEMs a pu être déterminée : TMEM41B, TMEM88, TMEM126B and TMEM206^{244–247}. Dans le cas de TMEM206, cette stratégie a permis de montrer son implication dans la voie cellulaire de Akt (survie et croissance cellulaire)²⁴⁷. Récemment, la fonction de la protéine TMEM206 a été découverte. Cette protéine est un pore régulant l'entrée d'ions chlorures dans la cellule et ce de manière pH dépendant (activation à pH < 5,5)²⁴⁸. Physiologiquement, il a été montré que l'afflux de chlorure induit par TMEM206 pourrait aggraver l'issue d'un accident vasculaire cérébral ischémique. L'inhibition de ce canal semblerait donc être favorable au traitement du cancer et à la prévention de la thrombose veineuse.

De manière plus spécifique, il est également important de discuter certains points abordés dans la seconde partie des résultats. En effet, l'étude *in vitro* des cellules cancéreuses implique que celles-ci se trouvent dans un environnement différent de celui rencontré dans une tumeur ou encore *in vivo*. Dès lors, il paraît évident que des divergences peuvent être observées au niveau des résultats obtenus lors d'expériences *in vitro* ou *in vivo*. Bien que celles-ci soient menées pour mimer le plus fidèlement les conditions physiologiques, des limitations techniques apparaissent assez rapidement. Une des principales divergences est la culture *in vitro* en deux dimensions des cellules. En effet, lors de la culture et de la réalisation des expériences, les cellules se trouvent à tout moment dans une « couche 2D » de cellules, alors que dans le corps et plus

particulièrement dans les tumeurs, les cellules se trouvent dans un environnement tridimensionnel. Il peut donc en résulter un biais dans les résultats obtenus. De façon à pallier à ce problème, des cultures en 3D de cellules cancéreuses ont été développées. Cependant, ce type de culture ne se prête à toutes les lignées cancéreuses et présente encore quelques variances par rapport à la réalité biologique (cellules du système immunitaire, fibroblaste, ...). Des études ont ainsi pu montrer des divergences dans l'efficacité de certains composés chimiothérapeutiques lors de leur utilisation sur des MDA-MB-231 cultivées en 2D par rapport à une culture 3D²⁴⁹.

Le second point important à discuter concerne l'expérience d'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse. La protéine TMEM45A a été surexprimée dans la lignée cellulaire Hek293T (provenant du rein), alors que l'étude porte sur les cancers du sein triple-négatifs et plus particulièrement sur la lignée MDA-MB-231. Ce choix a été réalisé pour plusieurs raisons. La première est l'absence d'anticorps spécifique à TMEM45A. Bien qu'il soit préférable d'étudier la protéine endogène, cela n'est pas possible dans le cas de TMEM45A. Il en résulte donc la nécessité d'utiliser une protéine exogène portant un tag (étiquette protéique) pour réaliser les manipulations. La protéine étudiée étant une protéine exogène, la lignée cellulaire utilisée ne doit pas exprimer de TMEM45A endogène qui pourrait interférer lors des expériences. En effet, la présence de la protéine endogène pourrait perturber l'interaction de la protéine exogène (la protéine étudiée) avec ses partenaires potentiels et ainsi fausser l'analyse par spectrométrie de masse. Si la protéine endogène est présente en même temps que la protéine exogène, cette première liera ses partenaires et ceux-ci seront moins disponibles pour leurs interactions avec la protéine exogène. Il risquerait d'en résulter que des partenaires réels ne soient pas détectés lors de l'analyse en spectrométrie de masse simplement car leur signal serait trop faible et passerait donc dans le bruit de fond. Pour finir, il faut rester critique vis-à-vis des résultats obtenus par spectrométrie de masse. En effet, le nombre d'interactants spécifiques de la protéine TMEM45A est très certainement sous-estimé par rapport à la réalité. De façon à éviter les faux positifs, des contrôles ont été réalisés avec chacun des deux tags utilisés (le tag V5 et le tag flag). Un nombre important de protéines a été obtenu pour ces contrôles, respectivement 301 et 242 protéines présentant une liaison spécifique.

Cependant, il faut savoir que parmi ces protéines dites aspécifiques, 193 sont communes aux deux contrôles. Ce nombre très élevé peut indiquer que les interactions aspécifiques observées ne proviennent pas en majorité des tags mais plutôt des billes d'agarose utilisées comme support pour réaliser l'immunoprécipitation. Les tags V5 et flag induisent donc potentiellement des interactions aspécifiques avec 108 et 49 protéines différentes, respectivement. Une hypothèse permettant d'expliquer le grand nombre de protéines détectées dans chacune des deux conditions (TMEM45A-V5 et TMEM45A-flag) peut être que lors de l'immunoprécipitation, des morceaux de membranes contenant la protéine TMEM45A mais aussi d'autres protéines ont été capturées au moyen des billes. Il en résulte ainsi que des protéines additionnelles sont détectées alors qu'elles ne présentent pas d'interactions directes avec TMEM45A mais partagent tout simplement une proximité au sein du même compartiment cellulaire, à savoir les bicouches lipidiques.

De plus, il est important de garder à l'esprit qu'une seule protéine (sur les 10 partenaires potentiels) a été investiguée dans ce travail. Le choix s'est porté sur CAND1 pour plusieurs raisons dont l'originalité (mécanisme inconnu) et la thématique dans laquelle cette protéine est inscrite, soit la régulation de l'expression des gènes. Il est fort probable que des effets sur les phénotypes de prolifération et de migration (voire d'autres phénotypes) soient observés lors de l'étude des autres partenaires. La cible envisagée dans ce travail, MTSS1, a été choisie de manière arbitraire sur base de données provenant de la littérature. Au vu de l'importance des complexes SCF dans la régulation de l'expression des gènes, il est fort probable que l'inactivation de TMEM45A n'impacte pas seulement la protéine MTSS1 mais beaucoup d'autres gènes. L'identification de ces gènes pourrait donc conduire à une détermination plus précise du mécanisme et de la voie cellulaire dans laquelle TMEM45A est impliquée.

Concernant la protéine MTSS1, une observation assez inattendue a été constatée lors de la détection de la protéine par Western Blot. En effet, il a été observé que l'abondance de la protéine MTSS1 variait selon la confluence des cellules avant leur lyse et extraction de leurs contenus protéiques. Cette observation, n'a encore jamais été

reportée dans la littérature et une démonstration plus complète de ce phénomène sera nécessaire pour la suite de ce travail.

2 Conclusion

Le premier objectif de ce travail était de déterminer la structure de la protéine TMEM45A. Pour ce faire, une approche topologique a été menée au sein de cellules eucaryotes mais n'a pas pu aboutir suite au manque d'anticorps spécifiques pour TMEM45A. Une alternative plus classique a été utilisée, consistant à produire la protéine en bactéries pour ensuite la purifier et réaliser des essais de cristallisation. Cependant, après optimisation de la souche bactérienne, une faible induction de la protéine a été obtenue, ceci ne permettant pas de continuer cette voie d'investigation. Pour finir, des éléments de la structure secondaire de la protéine ont pu être obtenus par modélisation par homologie. La protéine TMEM45A serait composée de 7 segments transmembranaires et uniquement d'hélice α . Cette structure potentielle est présentée à la *Figure 24*.

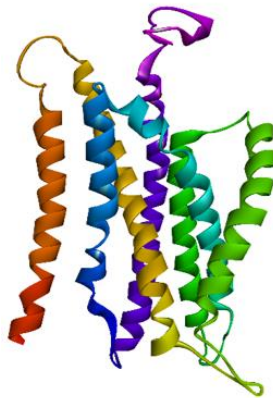


Figure 24 : Modèle par homologie de la structure de la protéine TMEM45A (iTASSER).

Le second objectif de cette étude porte sur la détermination de la fonction de TMEM45A. L'investigation a été menée en suivant une stratégie se basant sur la détermination des partenaires de la protéine d'intérêt par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse. Les données obtenues ont révélé une interaction entre TMEM45A et CAND1. L'invalidation de TMEM45A dans des lignées de cancer du sein triple négatif ont montré un effet sur la prolifération et la migration des cellules

cancéreuses. La protéine suppresseur de tumeur MTSS1 a été investiguée dans ces lignées cellulaires. Lors de l'invalidation de TMEM45A dans ces modèles, une stabilisation de MTSS1 a été observée. Cela en concordance avec les données de la littérature. Ces données sont résumées dans la *Figure 25*.

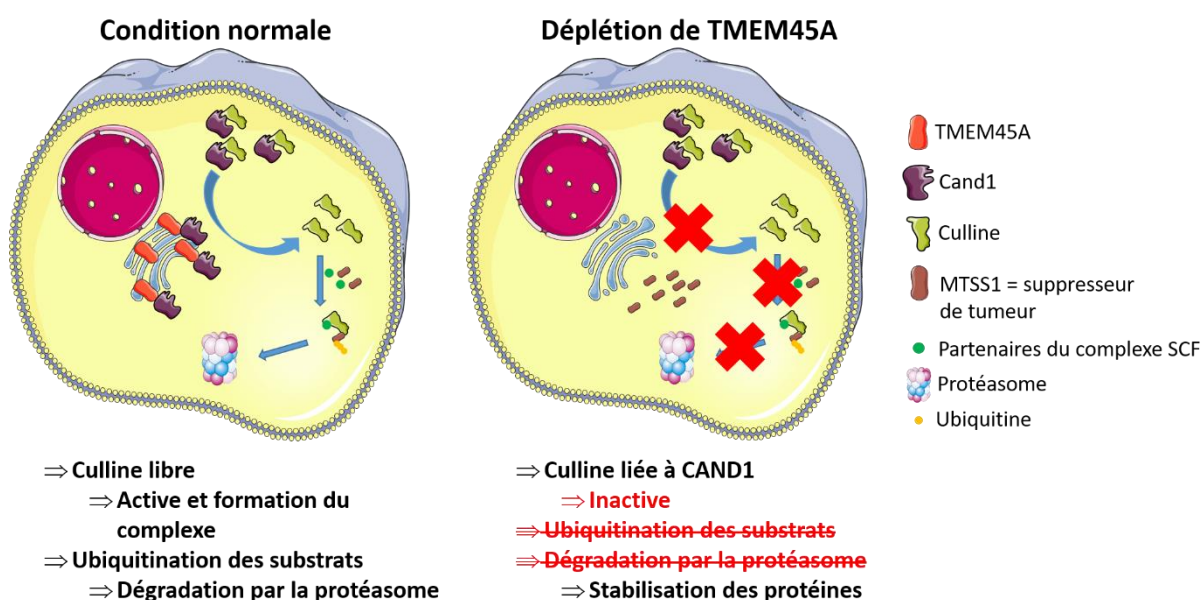


Figure 25 : Mécanisme hypothétique de la régulation de l'expression de protéine par TMEM45A.

Concernant la protéine d'intérêt de ce travail, TMEM45A, la découverte de son implication dans la régulation de l'ubiquitination de différentes protéines pourrait ouvrir de nouvelles voies de traitements contre le cancer.

3 Perspectives

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Dans un premier temps, il serait intéressant d'approfondir la composante bactérienne et les essais cristallographiques. La souche bactérienne, le type d'induction et les conditions d'induction de la protéine pourraient être investigués. En effet, de nombreuses souches bactériennes ont été transformées dans ce travail, mais seule une a été testée pour l'induction. Il serait donc intéressant de réaliser l'induction sur les souches restantes (*E. coli* C41 pLysS, *E. coli* Rosetta 2, ...). Le type de promoteur pour la production de la protéine peut également être modifié (et la souche de production qui y est associée

en parallèle). En effet, le promoteur le plus utilisé est le promoteur T7 permettant une induction de l'expression de la protéine au moyen du lactose ou de ses dérivés (IPTG).

Dans le cas où la protéine TMEM45A venait à être produite et purifiée, une caractérisation plus approfondie de son interaction avec CAND1 serait intéressante. En effet, la compréhension de cette interaction protéine-protéine (d'un point de vue structurale et caractérisation biochimique) pourrait conduire à long terme au développement de peptides permettant de déstabiliser cette interaction et induire un effet similaire à l'invalidation de TMEM45A *in vitro*.

Toujours dans le cadre de l'étude structurale, il pourrait être intéressant de poursuivre les efforts dans la détermination de la topologie. La stratégie envisagée a déjà fait ses preuves dans la littérature mais est rendue plus complexe dans le cas de TMEM45A (manque d'anticorps fonctionnels). La validation expérimentale de la topologie pourrait confirmer le modèle de la structure obtenu par modélisation par homologie ; ce modèle pouvant également être amélioré par dynamique moléculaire. La protéine pourrait aussi être insérée dans une bicouche lipidique et ensuite sa structure optimisée afin que le maximum de résidus correspondent à une géométrie acceptée sur le graphe de Ramachandran associé.

Concernant la fonction de TMEM45A, des étapes de validation sont encore nécessaires. Tout d'abord, il faudrait vérifier le lien entre la stabilisation de MTSS1 et la perte de ses modifications post-traductionnelles (ubiquitine). Cela peut être réalisé en immunoprécipitant les protéines ubiquitinyllées provenant d'un lysat cellulaire, invalidé ou non pour TMEM45A. Ces protéines seront ensuite analysées par spectrométrie de masse. Cette expérience permettrait de mettre en évidence MTSS1 comme cible dont l'ubiquitination est modifiée et peut être aussi d'identifier d'autres protéines qui pourraient avoir un rôle dans le phénotype observé.

Dans un second temps, la validation des résultats pourrait être renforcée par un « rescue » du phénotype. Cela consiste à réverter le phénotype induit par la déplétion de TMEM45A. Dans ce cas, il s'agirait d'invalider la protéine MTSS1, en plus de la déplétion de TMEM45A. Puisque l'invalidation de TMEM45A induit une stabilisation

de MTSS1, un double shRNA ciblant à la fois TMEM45A et MTSS1 devrait conduire au même phénotype qu'obtenu dans les conditions contrôles.

De manière à investiguer plus en détail le mécanisme de TMEM45A, il serait intéressant d'étudier les autres partenaires (9 au total) obtenus par co-immunoprécipitation et spectrométrie de masse. La protéine CAND1 étant impliquée dans la formation des complexes SCF et ces derniers contrôlant le niveau d'expression d'un grand nombre de gènes, dont MTSS1, il serait intéressant d'identifier les protéines dont l'expression serait impactée par la déplétion de TMEM45A. Cela permettrait d'améliorer la compréhension de la fonction de cette protéine dans le corps humain et plus particulièrement dans le cancer.

Les phénotypes de prolifération et de migration pourraient également être étudiés dans des modèles *in cellulo* 3D de cellules cancéreuses MDA-MB-231 (culture 3D). Cela permettrait ainsi de mimer au mieux l'architecture 3D de la tumeur et son environnement et ainsi renforcer les phénotypes observés précédemment. Finalement, une étude *in vivo* pourrait être menée. L'étude consisterait à réaliser des xénogreffes de cellules MDA-MB-231 (injection par la veine caudale), invalidées ou non pour TMEM45A. Les paramètres qui pourraient être étudiés sont le poids de la souris, la prise tumorale mais également la vitesse de développement de la tumeur. De plus, puisque les cellules MDA-MB-231 sont un modèle de cellules métastatiques, il serait intéressant d'utiliser ces cellules surexprimant la luciférase afin de suivre (par bioluminescence) l'évolution et la répartition d'éventuelles métastases au sein de l'organisme de la souris.

IV. Bibliographie

1. Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. (2018). Available at: <https://gco.iarc.fr/today>. (Accessed: 2nd July 2019)
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
3. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
4. Baudino, T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **12**, 3–20 (2015).
5. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 87 (2011).
6. Shaffer, B. C. *et al.* Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist. Updat.* **15**, 62–69 (2012).
7. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. & Yeoh, K. W. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 193–199 (2012).
8. Nounou, M. I. *et al.* Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **9**, 17–34 (2015).
9. Skandan, S. P. 5 year Overall survival of triple negative breast cancer: A single institution experience. *J. Clin. Oncol.* **34**, e12580–e12580 (2016).
10. Chaudhary, F., Lucito, R. & Tonks, N. K. Missing-in-Metastasis regulates cell motility and invasion via PTP δ -mediated changes in SRC activity. *Biochem. J.* **1**, 89–101 (2015).
11. Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J. & Jiang, W. G. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. in *Metastatic Cancer: Clinical and Biological Perspectives* (ed. Jandial, R.) (2013).
12. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* **7**, re8 (2014).
13. Li, L. *et al.* Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med. Oncol.* **34**, (2017).
14. Sermeus, A. *et al.* Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity. *Mol. Cancer* **7**, 27 (2008).
15. Flamant, L., Notte, A., Ninane, N., Raes, M. & Michiels, C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol. Cancer* **9**, 191 (2010).
16. Minassian, L. M., Cotechini, T., Huitema, E. & Graham, C. H. Hypoxia-Induced Resistance to Chemotherapy in Cancer. in *Hypoxia and Cancer Metastasis* (ed. Gilkes, D. M.) 123–139 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-12734-3_9
17. Luo, W. & Wang, Y. Hypoxia Mediates Tumor Malignancy and Therapy Resistance. in *Hypoxia and Cancer Metastasis* (ed. Gilkes, D. M.) 1–18 (Springer International

- Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-12734-3_1
18. Flamant, L. *et al.* TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 391 (2012).
 19. Guo, J. *et al.* Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 3124–3130 (2015).
 20. Sun, W. *et al.* Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation , migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 12657–12667 (2015).
 21. Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Bamberger, A. & Yates Illrd, J. R. Deep interactome profiling of membrane proteins by Co- interacting Protein Identification Technology (CoPIT). *Nat. Protoc.* **11**, 2515–2528 (2016).
 22. Free, R. B., Hazelwood, L. A. & Sibley, D. R. Identifying novel protein-protein interactions using co-IP and mass spectrometry. *Curr. Protoc. Neurosci.* **2** 1–19 (2009). doi:10.1002/0471142301.ns0528s46.Identifying
 23. Yersal, O. & Barutca, S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 412–424 (2014).
 24. Jang, M. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Chung, Y. R. & Park, S. Y. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Hum. Pathol.* **46**, 1267–1274 (2015).
 25. Jiang, Z. *et al.* RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple negative breast cancer. *Cell Cycle* **10**, 1563–1570 (2011).
 26. Charafe-jauffret, E. *et al.* How to best classify breast cancer Conventional and novel classi. *Int. J. Oncol.* **27**, 1307–1313 (2005).
 27. Chuang, H. Y., Lee, E., Liu, Y. T., Lee, D. & Ideker, T. Network-based classification of breast cancer metastasis. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 1–10 (2007).
 28. Ahmed Wahba, H. & Ahmed El-Hadaad, H. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol Med* **12**, 106–116 (2015).
 29. Craig Jordan, V. The role of tamoxifen in the treatment and prevention of breast cancer. *Curr. Probl. Cancer* **16**, 134–176 (1992).
 30. Slamon, D. J. *et al.* Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2neu Oncogene. *Science (80-.).* **235**, 177–182 (1997).
 31. Slamon, D. J. *et al.* Use of Chemotherapy Plus a Monoclonal Antibody Against Her2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpress HER2. *New Engl* **344**, 783–792 (2001).
 32. Mendes, D. *et al.* The benefit of HER2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic HER2-positive breast cancer - a systematic review. *Breast Cancer Res.* **17**, 1–14 (2015).
 33. Palma, G. *et al.* Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget* **6**, (2015).
 34. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).

35. Braicu, C. *et al.* Novel insight into triple-negative breast cancers, the emerging role of angiogenesis, and antiangiogenic therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **18**, 1–14 (2016).
36. Wesolowski, R. & Ramaswamy, B. Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management. *Gene Expr.* **15**, 105–115 (2018).
37. Pusztai, L., Mazouni, C., Anderson, K., Wu, Y. & Symmans, W. F. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential. *Oncologist* **11**, 868–877 (2006).
38. Garrido-Castro, A. C., Lin, N. U. & Polyak, K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. *Cancer Discov.* **9**, 176–198 (2019).
39. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S. & Ellis, I. O. Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2568–2581 (2008).
40. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869 LP – 10874 (2001).
41. Bertucci, F. *et al.* Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* **23**, 2564–2575 (2004).
42. Karn, T. *et al.* Homogeneous Datasets of Triple Negative Breast Cancers Enable the Identification of Novel Prognostic and Predictive Signatures. *PLoS One* **6**, e28403 (2011).
43. Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* **22**, 1736–1747 (2011).
44. Harbeck, N. & Gnant, M. Breast Cancer. *Lancet* **389**, 181–194 (2017).
45. Berrada, N., Delaloge, S. & André, F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Ann. Oncol.* **21**, vii30–vii35 (2010).
46. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* **109**, 1721–1728 (2007).
47. Kreike, B. *et al.* Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* **9**, R65 (2007).
48. Heitz, F. *et al.* Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur. J. Cancer* **45**, 2792–2798 (2009).
49. Criscitiello, C., Azim Jr, H. A., Schouten, P. C., Linn, S. C. & Sotiriou, C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann. Oncol.* **23**, vi13–vi18 (2012).
50. Foulkes, W. D. *et al.* The Prognostic Implication of the Basal-Like (Cyclin E^{high}/p27^{low}/p53⁺/

- sup>/Glomeruloid-Microvascular-Proliferation⁺)
Phenotype of BRCA1 Cancer Res. **64**, 830 LP – 835 (2004).
51. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1938–48 (2010).
 52. Abdulkarim, B. S. *et al.* Increased Risk of Locoregional Recurrence for Women With T1-2N0 Triple-Negative Breast Cancer Treated With Modified Radical Mastectomy Without Adjuvant Radiation Therapy Compared With Breast-Conserving Therapy. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2852–2858 (2011).
 53. Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E. & Jankowska, A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Prz. menopauzalny= Menopause Rev.* **15**, 215 (2016).
 54. Silver, D. P. & Livingston, D. M. Mechanisms of BRCA1 tumor suppression. *Cancer Discov.* **2**, 679–684 (2012).
 55. Paull, T. T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S. J. & Gellert, M. Direct DNA binding by Brca1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 6086–6091 (2001).
 56. Fong, P. C. *et al.* Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *N. Engl. J. Med.* **361**, 123–134 (2009).
 57. Matsen, C. B. & Neumayer, L. A. Breast Cancer: A Review for the General Surgeon Breast Cancer Breast Cancer. *JAMA Surg.* **148**, 971–980 (2013).
 58. Dhankhar, R. *et al.* Advances in Novel Drug Delivery Strategies for Breast Cancer Therapy. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* **38**, 230–249 (2010).
 59. Akram, M. & Siddiqui, S. Breast cancer management: Past, present and evolving. *Indian J. Cancer* **49**, 277–282 (2012).
 60. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–784 (2011).
 61. Hirsimäki, P., Aaltonen, A. & Mäntylä, E. Toxicity of Antiestrogens. *Breast J.* **8**, 92–96 (2002).
 62. Dowsett, M., Stein, R. C. & Coombes, R. C. Aromatization inhibition alone or in combination with GnRH agonists for the treatment of premenopausal breast cancer patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 155–159 (1992).
 63. Puhalla, S., Brufsky, A. & Davidson, N. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. *The Breast* **18**, S122–S130 (2009).
 64. Davies, C. *et al.* Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* **381**, 805–816 (2013).
 65. Shao, N. *et al.* Sequential versus concurrent anthracyclines and taxanes as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: A meta-analysis of phase III randomized control trials. *The Breast* **21**, 389–393 (2012).
 66. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between

- different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432–444 (2012).
67. Valero, V. Docetaxel and cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors. *Oncology (Williston Park)*. **11**, 21–23 (1997).
 68. Byrski, T. *et al.* Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **115**, 359–363 (2009).
 69. Ross, J. S. & Fletcher, J. A. The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Stem Cells* **16**, 413–428 (1998).
 70. Gerber, D. E. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments. *Am. Fam. Physician* **77**, 319 (2008).
 71. Ross, J. S. *et al.* Targeted Therapy in Breast Cancer. *Mol. & Cell. Proteomics* **3**, 379 LP – 398 (2004).
 72. Esteva, F. J. Monoclonal antibodies, small molecules, and vaccines in the treatment of breast cancer. *Oncologist* **9**, 4–9 (2004).
 73. Imai, K. & Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 714–727 (2006).
 74. Callahan, R. & Hurvitz, S. HER2-positive breast cancer: current management of early, advanced, and recurrent disease. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **23**, 37 (2011).
 75. O’Sullivan, C. C. *et al.* Efficacy of Adjuvant Trastuzumab for Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Early Breast Cancer and Tumors ≤ 2 cm: A Meta-Analysis of the Randomized Trastuzumab Trials. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2600–2608 (2015).
 76. Vinayak, S. & Carlson, R. W. mTOR inhibitors in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer* **27**, (2013).
 77. Yardley, D. A. Combining mTOR Inhibitors with Chemotherapy and Other Targeted Therapies in Advanced Breast Cancer: Rationale, Clinical Experience, and Future Directions. *Breast Cancer Basic Clin. Res.* **7**, BCBCR.S10071 (2013).
 78. Papademetriou, K., Ardavanis, A. & Kountourakis, P. Neoadjuvant therapy for locally advanced breast cancer: Focus on chemotherapy and biological targeted treatments’ armamentarium. *J. Thorac. Dis.* **2**, 160 (2010).
 79. Philip-Ephraim, E. E., Eyong, K. I., Williams, U. E. & Ephraim, R. P. The role of radiotherapy and chemotherapy in the treatment of primary adult high grade gliomas: assessment of patients for these treatment approaches and the common immediate side effects. *ISRN Oncol.* **2012**, (2012).
 80. Kemper, E. M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, J. H. & van Tellingen, O. Modulation of the blood–brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat. Rev.* **30**, 415–423 (2004).
 81. van Tellingen, O. *et al.* Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resist. Updat.* **19**, 1–12 (2015).
 82. Phi, L. T. H. *et al.* Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic

- implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.* **2018**, (2018).
83. Simpson, C. D., Anyiwe, K. & Schimmer, A. D. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.* **272**, 177–185 (2008).
 84. Liotta, L. A. Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Sci. Am.* **266**, 54–63 (1992).
 85. Coleman, R. E. & Rubens, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br. J. Cancer* **55**, 61–66 (1987).
 86. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
 87. The UniProt Consortium. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
 88. Hayez, A. *et al.* High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp. Dermatol.* **23**, 339–344 (2014).
 89. Wrzesiński, T. *et al.* Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer* **15**, 518 (2015).
 90. Benita, Y. *et al.* An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4587–4602 (2009).
 91. Rhodes, D. R. *et al.* ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **6**, 1–6 (2004).
 92. Lee, E., Rosca, E. V., Pandey, N. B. & Popel, A. S. Small peptides derived from somatotropin domain-containing proteins inhibit blood and lymphatic endothelial cell proliferation, migration, adhesion and tube formation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1812–1821 (2011).
 93. Liu, X. *et al.* Cand1-Mediated Adaptive Exchange Mechanism Enables Variation in F-Box Protein Expression. *Mol. Cell* **69**, 773–786.e6 (2018).
 94. Coux, O. & Piechaczyk, M. Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe (s) pour dégrader les protéines. (2000).
 95. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (Macmillan Higher Education, 2013).
 96. Chandler, V. L. & Vaucheret, H. Gene activation and gene silencing. *Plant Physiol.* **125**, 145–148 (2001).
 97. Prud'homme, B., Gompel, N. & Carroll, S. B. Emerging principles of regulatory evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8605–8612 (2007).
 98. Groppo, R. & Richter, J. D. Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 444–451 (2009).
 99. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 75–100 (2007).
 100. Keene, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 533 (2007).
 101. Walsh, G. & Jefferis, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic

- proteins. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1241–1252 (2006).
102. Krishna, R. G. & Wold, F. Post-Translational Modifications of Proteins BT - Methods in Protein Sequence Analysis. in (eds. Imahori, K. & Sakiyama, F.) 167–172 (Springer US, 1993). doi:10.1007/978-1-4899-1603-7_21
 103. Maltese, W. A. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J.* **4**, 3319–3328 (1990).
 104. Lis, H. & Sharon, N. Protein glycosylation. *Eur. J. Biochem.* **218**, 1–27 (1993).
 105. Shi, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell* **9**, 459–470 (2002).
 106. Seo, J. & Lee, K. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 35–44 (2004).
 107. Ciechanover, A. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17**, 7151–7160 (1998).
 108. Zhong, J. *et al.* SCF-BTRCP targets MTSS1 for ubiquitination-mediated destruction to regulate cancer cell proliferation and migration. *Oncotarget* **4**, (2013).
 109. Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13–21 (1994).
 110. Reitsma, J. M. *et al.* Composition and Regulation of the Cellular Repertoire of SCF Ubiquitin Ligases. *Cell* **171**, 1326–1339.e14 (2017).
 111. Berndsen, C. E. & Wolberger, C. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 301–307 (2014).
 112. Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E. & Weissman, A. M. RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 47–60 (2014).
 113. Cromm, P. M. & Crews, C. M. Targeted Protein Degradation: from Chemical Biology to Drug Discovery. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1181–1190 (2017).
 114. Grumati, P. & Dikic, I. Ubiquitin signaling and autophagy. *J. Biol. Chem.* **293**, 5404–5413 (2018).
 115. Morreale, F. E. & Walden, H. Types of Ubiquitin Ligases. *Cell* **165**, 248–248.e1 (2016).
 116. Metzger, M. B., Hristova, V. A. & Weissman, A. M. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 531 LP – 537 (2012).
 117. Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. P. RING Domain E3 Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399–434 (2009).
 118. Rotin, D. & Kumar, S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 398 (2009).
 119. Vittal, V., Stewart, M. D., Brzovic, P. S. & Klevit, R. E. Regulating the regulators: recent revelations in the control of E3 ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* **290**, 21244–21251 (2015).
 120. Spratt, D. E., Walden, H. & Shaw, G. S. RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem. J.* **458**, 421–437 (2014).

121. Hatakeyama, S. & Nakayama, K. I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 635–645 (2003).
122. Budhidarmo, R., Nakatani, Y. & Day, C. L. RINGs hold the key to ubiquitin transfer. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 58–65 (2012).
123. Primorac, I. & Musacchio, A. Panta rhei: The APC/C at steady state. *J. Cell Biol.* **201**, 177 LP – 189 (2013).
124. Zimmerman, E. S., Schulman, B. A. & Zheng, N. Structural assembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 714–721 (2010).
125. Kamura, T. *et al.* Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science (80-.)*. **284**, 657–661 (1999).
126. Feldman, R. M. R., Correll, C. C., Kaplan, K. B. & Deshaies, R. J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221–230 (1997).
127. Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. & Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219 (1997).
128. Pierce, N. W. *et al.* Cand1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins. *Cell* **153**, 206–215 (2013).
129. Olma, M. H. & Dikic, I. Cullins getting undressed by the protein exchange factor cand1. *Cell* **153**, 14–16 (2013).
130. Bornstein, G., Ganoth, D. & Hershko, A. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11515–11520 (2006).
131. Emberley, E. D., Mosadeghi, R. & Deshaies, R. J. Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylation of SCF by a noncatalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 29679–29689 (2012).
132. Schmidt, M. W., McQuary, P. R., Wee, S., Hofmann, K. & Wolf, D. A. F-Box-Directed CRL Complex Assembly and Regulation by the CSN and CAND1. *Mol. Cell* **35**, 586–597 (2009).
133. Lee, J. E. *et al.* The Steady-State Repertoire of Human SCF Ubiquitin Ligase Complexes Does Not Require Ongoing Nedd8 Conjugation. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.006460 (2011).
134. Stavru, F. *et al.* NDC1: A crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.* **173**, 509–519 (2006).
135. Dobson, L., Reményi, I. & Tusnády, G. E. The human transmembrane proteome. *Biol. Direct* **10**, 1–18 (2015).
136. Dobson, L., Reményi, I. & Tusnády, G. E. CCTOP: A Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res.* **43**, W408–W412 (2015).
137. Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. & Elofsson, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic*

- Acids Res.* **43**, W401–W407 (2015).
138. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738 (2010).
 139. Yang, J. *et al.* The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8 (2015).
 140. Zhang, J., Yang, J., Jang, R. & Zhang, Y. GPCR-I-TASSER: A Hybrid Approach to G Protein-Coupled Receptor Structure Modeling and the Application to the Human Genome. *Structure* **23**, 1538–1549 (2015).
 141. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 (2008).
 142. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
 143. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by Ca geometry: ϕ, ψ and $\text{C}\beta$ deviation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **50**, 437–450 (2003).
 144. Wo, Z. G. & Oswald, R. E. Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci.* **18**, 161–168 (1995).
 145. Welply, J. K., Shenbagamurthi, P., Lennarz, W. J. & Naiderp, F. Substrate Recognition by Oligosaccharyltransferase. *J Biol Chem* **258**, 11856–11863 (1983).
 146. Michikawa, T. *et al.* Transmembrane Topology and Sites of N-Glycosylation of Inositol. **269**, 9184–9189 (1994).
 147. van Geest, M. & Lolkema, J. S. Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 13–33 (2000).
 148. Li, D. F., Feng, L., Hou, Y. J. & Liu, W. The expression, purification and crystallization of a ubiquitin-conjugating enzyme E2 from *Agrocybe aegerita* underscore the impact of His-tag location on recombinant protein properties. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **69**, 153–157 (2013).
 149. Zhao, D. & Huang, Z. Effect of His-Tag on Expression, Purification, and Structure of Zinc Finger Protein, ZNF191(243-368). *Bioinorg. Chem. Appl.* **2016**, 1–6 (2016).
 150. Chant, A., Kraemer-Pecore, C. M., Watkin, R. & Kneale, G. G. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expr. Purif.* **39**, 152–159 (2005).
 151. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C. & DeLucas, L. J. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **63**, 295–301 (2007).
 152. Godbey, W. T., Zhang, X. & Chang, F. The importance of and a method for including transfection efficiency into real-time PCR data analyses. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 765–772 (2008).
 153. VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619–26 (2008).
 154. Gilda, J. E. *et al.* Western blotting inaccuracies with unverified antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).

155. Mishra, M., Tiwari, S. & Gomes, A. V. Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 1037–1053 (2017).
156. Signore, M., Manganelli, V. & Hodge, A. Antibody Validation by Western Blotting. in *Molecular Profiling* **1606**, 48–66 (2014).
157. Donaldson, J. G. Immunofluorescence Staining Julie. *Curr Protoc Cell Biol* 1–36 (2016). doi:10.1002/0471143030.cb0403s00.UNIT
158. De Sousa Abreu, R., Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **5**, 1512–1526 (2009).
159. Chen, G. *et al.* Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 304–13 (2002).
160. Guo, Y. *et al.* How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **40**, 426–36 (2008).
161. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
162. Stephens, D. J. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science (80-.)*. **82**, 82–87 (2003).
163. Berger, E. G. & Roth, J. *The Golgi Apparatus*. (1997).
164. Yen, H. S., Xu, Q., Chou, D. M., Zhao, Z. & Elledge, S. J. Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells. *Science (80-.)*. **322**, 918–923 (2008).
165. Mellman, I. & Nelson, W. J. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 833 (2008).
166. Tyedmers, J., Mogk, A. & Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 777 (2010).
167. Kopito, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524–530 (2000).
168. Dreyer, A. M., Beauchamp, J., Matile, H. & Pluschke, G. An efficient system to generate monoclonal antibodies against membrane-associated proteins by immunisation with antigen-expressing mammalian cells. *BMC Biotechnol.* **10**, (2010).
169. Dodd, R. B., Wilkinson, T. & Schofield, D. J. Therapeutic Monoclonal Antibodies to Complex Membrane Protein Targets: Antigen Generation and Antibody Discovery Strategies. *BioDrugs* **32**, 339–355 (2018).
170. Douthwaite, J. A., Finch, D. K., Mustelin, T. & Wilkinson, T. C. I. Development of therapeutic antibodies to G protein-coupled receptors and ion channels: Opportunities, challenges and their therapeutic potential in respiratory diseases. *Pharmacol. Ther.* **169**, 113–123 (2017).
171. Hashimoto, Y. *et al.* Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci. Rep.* **8**, 1–12 (2018).
172. Tamura, T. & Chiba, J. Production of Antibodies against Multipass Membrane Proteins Expressed in Human Tumor Cells Using Dendritic Cell Immunization. *J. Biomed.*

- Biotechnol.* **2009**, 1–9 (2009).
173. Gregoriades, A. & Markarian, K. Anomalous electrophoretic behavior of the membrane (M) protein of influenza virus in polyacrylamide gels. *Arch. Virol.* **76**, 263–267 (1983).
 174. Crichton, P. G., Harding, M., Ruprecht, J. J., Lee, Y. & Kunji, E. R. S. Lipid, detergent, and coomassie blue G-250 affect the migration of small membrane proteins in blue native gels: Mitochondrial carriers migrate as monomers not dimers. *J. Biol. Chem.* **288**, 22163–22173 (2013).
 175. Bradd, S. J. & Dunn, M. J. Analysis of Membrane Proteins by Western Blotting and Enhanced Chemiluminescence. in *Biomembrane Protocols* **19**, 211–218 (1993).
 176. Okada, N. *et al.* Identification of TMEM45B as a protein clearly showing thermal aggregation in SDS-PAGE gels and dissection of its amino acid sequence responsible for this aggregation. *Protein Expr. Purif.* **77**, 118–123 (2011).
 177. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber, C. M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS* **7**, 5862–5 (2009).
 178. Rath, A. & Deber, C. M. Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **434**, 67–72 (2013).
 179. Miyake, J., Ochiai-yanagi, S., Kasumi, T. & Takagi, T. Isolation of a membrane protein from *R. rubrum* chromatophores and its abnormal behavior in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis due to a high binding capacity for SDS. *J. Biochem.* **83**, 1679–1686 (1978).
 180. Jones, M. N. Surfactants in membrane solubilisation. *Int. J. Pharm.* **177**, 137–159 (1999).
 181. Banerjee, P., Joo, J. B., Buse, J. T. & Dawson, G. Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem. Phys. Lipids* **77**, 65–78 (1995).
 182. Luche, S., Santoni, V. & Rabilloud, T. Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in twodimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249–253 (2003).
 183. Arachea, B. T. *et al.* Detergent selection for enhanced extraction of membrane proteins. *Protein Expr. Purif.* **86**, 12–20 (2012).
 184. Shimizu, H. *et al.* Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: A case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 858–862 (2008).
 185. Rawlings, A. E. Membrane proteins: always an insoluble problem? *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 790–795 (2016).
 186. Maschberger, M., Hüttl, S., Mueller, T. D. & Breitsprecher, D. *Thermal Unfolding of Membrane Proteins Detergent Screen for solubilized membrane proteins – Case study on the SLAC-protein HiTehA from Haemophilus influenzae.* (2015).

187. Kimple, M. E., Brill, A. L. & Pasker, R. L. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 608–616 (2013). doi:10.1002/0471140864.ps0909s73
188. Harder, D. & Fotiadis, D. Purification of His - tagged membrane proteins from detergent - solubilized membranes. *Nat. Protoc. Exch.* 4–5 (2012).
189. Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 7, 620–634 (2012).
190. Esposito, D. & Chatterjee, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 353–358 (2006).
191. Malhotra, A. Chapter 16 Tagging for Protein Expression. in *Methods in Enzymology* 463, 239–258 (Elsevier Inc., 2009).
192. Eshaghi, S. & Hedrén, M. An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein ...* 21, 676–683 (2009).
193. Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., Mcgrath, W. J., Listwan, P. & Kobe, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* 12, 1313–1322 (2003).
194. Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr. Purif.* 80, 283–293 (2011).
195. Wagner, S. *et al.* Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14371–14376 (2008).
196. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: A comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* 37, 203–206 (2004).
197. Tabor, S. Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1–11 (2004). doi:10.1002/0471142727.mb1602s11
198. Kwon, S. K., Kim, S. K., Lee, D. H. & Kim, J. F. Comparative genomics and experimental evolution of Escherichia coli BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Sci. Rep.* 5, 16076 (2015).
199. Gialama, D. *et al.* Development of Escherichia coli Strains That Withstand Membrane Protein-Induced Toxicity and Achieve High-Level Recombinant Membrane Protein Production. *ACS Synth. Biol.* 6, 284–300 (2017).
200. Dubendorfft, J. W., Studier, W. & August, R. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with lac Repressor. *J. Mol. Biol.* 45–59 (1991). doi:10.1016/0022-2836(91)90856-2
201. Pan, S. H. & Malcolm, B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques* 29, 1234–1238 (2000).
202. Studier, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37–44 (1991).
203. Spehr, V., Frahm, D. & Meyer, T. F. Improvement of the T7 expression system by the use of T7 lysozyme. *Gene* 257, 259–267 (2000).

204. Schlegel, S. *et al.* Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microb. Biotechnol.* **3**, 403–411 (2010).
205. Schlegel, S., Hjelm, A., Baumgarten, T., Vikström, D. & de Gier, J.-W. Bacterial-based membrane protein production. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1739–1749 (2014).
206. Drew, D., Lerch, M., Kunji, E., Slotboom, D.-J. & de Gier, J.-W. Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions. *Nat. Methods* **3**, 303–313 (2006).
207. Mus-Veteau, I. Membrane proteins production for structural analysis. *Membr. Proteins Prod. Struct. Anal.* 1–425 (2014). doi:10.1007/978-1-4939-0662-8
208. Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. a & Olins, P. O. Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli Michael J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 494–499 (1996).
209. Francis, D. M. & Page, R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 1–29 (2010). doi:10.1002/0471140864.ps0524s61
210. Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S. Insertion of Membrane Proteins into the ER Membrane. in *Molecular Cell Biology* (ed. W.H.Freeman) (2000).
211. Kihara, D., Shimizu, T. & Kanehisa, M. Prediction of membrane proteins based on classification of transmembrane segments. *Protein Eng. Des. Sel.* **11**, 961–970 (1998).
212. Rawson, S., Davies, S., Lippiat, J. D. & Muench, S. P. The changing landscape of membrane protein structural biology through developments in electron microscopy. *Mol. Membr. Biol.* **33**, 12–22 (2016).
213. White, S. Membrane proteins of known structure. (2019). Available at: <https://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>. (Accessed: 12th August 2019)
214. SIPOS, L. & VON HEIJNE, G. Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1333–1340 (1993).
215. Caputo, A. *et al.* TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity. *Science* (80-.). 590–594 (2008).
216. Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Expression Cloning of TMEM16A as a Calcium-Activated Chloride Channel Subunit. *Cell* **134**, 1019–1029 (2008).
217. Brunner, J. D., Lim, N. K., Schenck, S., Duerst, A. & Dutzler, R. X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase. *Nature* **516**, 207–212 (2014).
218. Reyes, J. P., Huanosta-Gutiérrez, A., López-Rodríguez, A. & Martínez-Torres, A. Study of permeation and blocker binding in TMEM16A calcium-activated chloride channels. *Channels* **9**, 88–95 (2015).
219. Ni, Y. L., Kuan, A. S. & Chen, T. Y. Activation and inhibition of TMEM16A calcium-activated chloride channels. *PLoS One* **9**, 4–6 (2014).
220. Picollo, A., Malvezzi, M. & Accardi, A. TMEM16 proteins: Unknown structure and confusing functions. *J. Mol. Biol.* **427**, 94–105 (2015).
221. Berglund, E. *et al.* Functional role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel DOG1/TMEM16A

- in gastrointestinal stromal tumor cells. *Exp. Cell Res.* **326**, 315–325 (2014).
222. Yang, Y. D. *et al.* TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* **455**, 1210–1215 (2008).
223. Slabinski, L. *et al.* The challenge of protein structure determination—lessons from structural genomics. *Protein Sci.* **16**, 2472–2482 (2007).
224. Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 957 (2000).
225. Blundell, T. L. Structure-based drug design. *Nature* **384**, 23 (1996).
226. Anderson, A. C. The process of structure-based drug design. *Chem. Biol.* **10**, 787–797 (2003).
227. Ilari, A. & Savino, C. Protein Structure Determination by X-Ray Crystallography. *Methods Mol. Biol.* **452**, 63–87 (2008).
228. Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311–333 (1991).
229. Wuthrich, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science (80-.)*. **243**, 45–50 (1989).
230. Bai, X., McMullan, G. & Scheres, S. H. W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 49–57 (2015).
231. Wang, R. Y.-R. *et al.* De novo protein structure determination from near-atomic-resolution cryo-EM maps. *Nat. Methods* **12**, 335 (2015).
232. Leitner, A. *et al.* Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 1634–1649 (2010).
233. Sinz, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein–protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 663–682 (2006).
234. Kabsch, W. & Rösche, P. Nuclear magnetic resonance: Protein structure determination. *Nature* **321**, 469–470 (1986).
235. Kaplan, M., Pinto, C., Houben, K. & Baldus, M. Nuclear magnetic resonance (NMR) applied to membrane–protein complexes. *Q. Rev. Biophys.* **49**, (2016).
236. Back, J. W., de Jong, L., Muijsers, A. O. & de Koster, C. G. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *J. Mol. Biol.* **331**, 303–313 (2003).
237. Sinz, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. mass Spectrom.* **38**, 1225–1237 (2003).
238. Krishnan, V. V & Rupp, B. Macromolecular structure determination: comparison of X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *e LS* (2012).
239. Landau, E. M. & Rosenbusch, J. P. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14532–14535 (1996).

240. Rummel, G. *et al.* Lipidic Cubic Phases: New Matrices for the Three-Dimensional Crystallization of Membrane Proteins. *J. Struct. Biol.* **121**, 82–91 (1998).
241. Callaway, E. The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nat. News* **525**, 172 (2015).
242. Glaeser, R. M. Proteins, interfaces, and cryo-EM grids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **34**, 1–8 (2018).
243. Carroni, M. & Saibil, H. R. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods* **95**, 78–85 (2016).
244. Moretti, F. *et al.* TMEM41B is a novel regulator of autophagy and lipid mobilization. *EMBO Rep.* **19**, e45889 (2018).
245. Yu, X. *et al.* Cytosolic TMEM88 promotes triple-negative breast cancer by interacting with Dvl. *Oncotarget* **6**, (2015).
246. Fuhrmann, D. C., Wittig, I. & Brüne, B. TMEM126B deficiency reduces mitochondrial SDH oxidation by LPS, attenuating HIF-1 α stabilization and IL-1 β expression. *Redox Biol.* **20**, 204–216 (2019).
247. Zhao, J. *et al.* TMEM206 promotes the malignancy of colorectal cancer cells by interacting with AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* **234**, 10888–10898 (2019).
248. Ullrich, F. *et al.* Identification of TMEM206 proteins as pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride channels. *Elife* **8**, e49187 (2019).
249. Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* **33**, 1837–1843 (2015).

V. Annexe

Transmembrane (TMEM) protein family members: poorly characterized even if essential for the metastatic process

Marx Sébastien^{1*}, Dal Maso Thomas^{1*}, Chen Jia-Wei², Bury Marina³, Wouters Johan¹, Michiels Carine², Le Calvé Benjamin²

¹Department of Chemistry, NAMur MEDicine & Drug Innovation Center (NAMEDIC-NARILIS), University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium.

²NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

³de Duve Institute, 75 Avenue Hippocrate, 1200 Bruxelles, Belgium

* Both authors contributed equally to this work

Corresponding author at NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium. Tel. +0032 (0)81 72 41 26.

Email address: benjamin.lecalve@unamur.be

Abbreviations:

AMP: Adenosine MonoPhosphate

ATP: Adenosine TriPhosphate

CaCC: Calcium-Activated Chloride Channel

CAMKII: Calmodulin-dependent protein kinase II

CDN: Cyclic DiNucleotides

cGAS: cyclic GMP-AMP synthase

CIN: Chromosomal Instability

ECM: ExtraCellular Matrix

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition

Erk: Extracellular signal-Regulated Kinase

FAK: Focal Adhesion Kinase

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

GPCR: G Protein-Coupled Receptor

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule

INF: Interferon

IR: Insulin Receptor

IRF3: Interferon Regulatory transcription Factor 3

JAK: Janus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MET: Mesenchymal-Epithelial Transition

MMP: Matrix Metallo Proteinase

NF- κ B: Nuclear factor-kappa B

PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PACC: “Proton Activated Chloride Channel 1”

PI3K: PhosphoInositide 3-Kinase

RTK: Receptor Tyrosine Kinase

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STING: Stimulator of Interferon Genes

TBK1: TANK-Binding Kinase

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TNF: Tumor Necrosis Factor

TMEM: Transmembrane

TRPM7: Transient Receptor Potential-Melastatin-like 7

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Zeb1: Zinc finger E-box binding homeobox 1

Abstract

The majority of cancer-associated deaths are related to secondary tumor formation. This multistep process involves the migration of cancer cells to anatomically distant organs. Metastasis formation relies on cancer cell dissemination and survival in the circulatory system, as well as adaptation to the new tissue notably through genetic and/or epigenetic alterations. A large number of proteins are clearly identified to play a role in the metastatic process but the structures and modes of action of these proteins are essentially unknown or poorly described. In this review, we detail the involvement of members of the transmembrane (TMEM) protein family in the formation of metastases or in the mechanisms leading to cancer cell dissemination such as migration and extra-cellular matrix remodelling. While the phenotype associated with TMEM over or down-expression is clear, the mechanisms by which these proteins allow cancer cell spreading remain, for most of them, unclear. In parallel, the 3D structures of these proteins are presented. Moreover, we proposed that TMEM proteins could be used as prognostic markers in different types of cancers and could represent potential targets for cancer treatment. A better understanding of this heterogeneous family of poorly characterized proteins thus opens perspectives for better cancer patient care.

Introduction

Membrane proteins represent a large part of all proteins, constituting approximately 30% of the proteome [1,2]. When located at the plasma membrane, membrane proteins allow cell-cell and cell-environment (proteins of the extracellular matrix, immune system cells...) communication notably through the fixation of ligands to receptors or through the internalization of small biological molecules. Most of the membrane proteins from mammalian cells are very well characterized in term of biological functions and their structures are clearly identified [3]. These proteins can be classified as receptors ("G protein-coupled receptors" (GPCR), Tyrosine Kinase Receptors (RTK)...) [4], pore-forming membrane proteins (glucose transporters, ion channels, aquaporins...) [5], enzymes (ATP synthase, metalloproteinases,...) [6], anchorage proteins (connexin, cadherin, occludin...) [7], or as structural proteins, i.e., those involved in the structure of caveolae, rafts, filipodia as well as those regulating endocytosis. They can also be categorized according to the nature of their interaction with the lipid bilayer as peripheral, anchored or integral membrane proteins [8]. Most of them play a fundamental role during cancer development or cancer cell dissemination notably by transmitting information between the extracellular environment and the cytoplasmic proteins. For example, RTK comprise several subfamilies that include epidermal growth factor receptors (EGFRs), fibroblast growth factor receptors (FGFRs), insulin and insulin-like growth factor receptors (IR and IGFR and platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs). These receptors transfer, by dimerizing, the signal into the cytoplasm after ligand binding [9]. Several pathways are controlled by this receptor family such as Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), Janus Kinase/Signal Transducers, Activators of Transcription (JAK/STAT) and PhosphoInositide 3-Kinases (PI3K)/AKT regulating migration, proliferation and other biological functions [10]. Finally, and because of their large number and various biological functions, membrane proteins are very interesting for therapy development [11]. Indeed, they represent the target for approximately 60% of marketed drugs [12]. For example, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is overexpressed in cancer cells and VEGFR sustains the neoangiogenesis process [13]. Based on this function, inhibitors of VEGFR have been developed and commercialized for cancer treatment

such as bevacizumab [14], sunitinib [15] or sorafenib [16]. These molecules are mostly used in the first-line treatments of breast, colon, lung and renal cancers.

Nevertheless, many transmembrane proteins are poorly described and are grouped in the transmembrane protein (TMEM) family. To be regarded as TMEM members, these proteins have to contain at least one putative transmembrane segment that spans completely (integral polytopic) or partially (integral monotopic) through biological membranes [17]. The name of TMEM proteins comes from the nature of the protein but also originates from the lack of information about their possible structures, functions and mechanisms. Most of the time, they can be renamed and reclassified, after further characterization, into more specific categories such as GPCR proteins or ion channels.

In this review, we will describe the most important TMEM family members involved in modulating cancer cell dissemination in order to illustrate their role in the metastatic process. The structures and modes of action of these proteins are essentially unknown or poorly described, however, they appear crucial for some steps of the metastatic cascade in several cancer types and their expression is often correlated with a poor prognosis for patient survival. Hence, TMEM proteins could be considered as significant prognosis markers and potentially as valuable targets for cancer treatment.

1. The metastatic cascade and TMEM implications

The “invasion-metastasis cascade” describes the behavior of cancer cells leaving primary tumor sites to form metastatic colonies in distant organs. This process is a critical hallmark of cancer that constitutes the last steps of malignant progression. It is largely responsible for cancer-associated mortality [18,19]. This cascade encompasses several steps that can be broadly separated in three main phases : (1) local invasion by cancer cells (single or multiple cells) from the primary tumor through surrounding extracellular matrix (ECM) and stromal cell layers, (2) intravasation of migrating cancer cells into the lumina of blood vessels or in the lymphatic route and survival during hematogenous dissemination in the circulatory system, (3) extravasation of cancer cells from the micro-vessels into the parenchyma of distant tissues [20,21]. All these mechanisms are summarized in Figure 1 which describes the TMEM proteins implicated in these three different steps of metastasis formation and their connections

with the major actors of cancer cell dissemination. Cancers can also originate in mesenchymal tissues, thus bypassing the need of EMT for dissemination.

1.1 Local invasion

The process of local invasion is mainly characterized by the loss of cell-cell adhesion that allows cancer cells to dissociate from the primary tumor as well as by the modification of cell-matrix interactions [22]. The first event needed to reach a migratory phenotype is the acquisition of the mesenchymal state in which epithelial carcinoma cells progressively undergo the cellular program called Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). During this process, epithelial cells progressively lose their polygonal morphology to adopt a spindle-shaped mesenchymal morphology and an anterior-posterior polarity. The reversible process enabling mesenchymal cells to revert back to an epithelial state is called Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) [23]. Initiation of the EMT program entails the loss of cell-cell adhesion, the activation of transcription factors such as Slug (SNAI2), Snail (SNAI1) [24], Zeb1 (Zinc finger E-box binding homebox 1) or Twist [25], that regulate the expression of hundreds of genes. This process also induces cytoskeleton reorganization, triggers the expression of specific cytoskeletal proteins (vimentin) as well as the production of ECM proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9. These enzymes induce the remodeling of the neighboring tissues, hence facilitating cancer cell motility (Figure 1A) [26–28]. In these early steps of metastasis, some TMEM proteins seem to operate. “Passenger mutations” and epigenetic changes in metastasis virulence genes can also initiate the metastasis formation in highly mutable cancer cell [29].

TMEM45B is overexpressed in clinical samples of gastric cancers and its depletion in cancer cell lines using RNA interference strategies is associated with an inhibition of the migration and invasion phenotype. One of the major effects observed is the alteration of JAK2/STAT3 pathway [30] that controls, notably, IL-6 secretion. IL-6 is a major regulator of cancer cell dissemination [31,32]. In lung cancer patients, TMEM45B expression is associated with poor prognosis while *in vitro* TMEM45B knockdown in lung cancer cell lines altered the expression MMP-9, reducing the invasive potential of these cells [33]. Moreover, in osteosarcoma cell lines [34],

TMEM45B depletion is linked to a decrease in β -catenin expression, which is a transcription factor regulating the expression of EMT genes such as Twist or Snail [35].

TMEM48, localized in the nuclear membrane, was shown to be involved in the invasion of lung cancer cells lines. Furthermore, MMP-2 and MMP-9 expression is decreased in TMEM48 silenced-cells [36]. As well, a decreasing in MMP-2 and -9 expression is also correlated with TMEM98 knockdown in lung cancers [37]. In contrary, TMEM176A negatively regulates cell invasion as it reduces the expression of MMP-2/9 in different types of cancer such as glioma, colorectal, liver and oesophageal cancers [38–41]. In these studies, dysregulation of TMEM176A expression is due to gene promoter methylation and is associated with a poor prognosis in patients. EMT can also be initiated by other intracellular signaling pathways including Transforming Growth factor β (TGF- β) [42], NOTCH [43], mitogenic growth factors [44] and Wnt [45]. The tumor microenvironment, mainly composed of cancer-associated fibroblasts (CAFs), immune cells such as tumor-infiltrating lymphocytes and macrophages, activates these different pathways by releasing cytokines or chemokines [23]. Beyond the activation of molecular pathways, cell migration requires the concerted action of ion channels (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), cytoskeleton elements, adhesion molecules and signaling cascades [28,46]. For example, potassium channel 2.1 (Kir2.1) [47,48] and transient receptor potential-melastatin-like 7 (TRPM7), a calcium transporter, play a pivotal role in regulating cell motility and cytoskeletal rearrangement as well as in the EMT process. Ion transport proteins and aquaporins, small integral plasma membrane proteins implicated in the transport of water or solutes, promote cell migration and invasion by inducing cellular volume changes and/or modeling Ca^{2+} and H^+ signaling [49–52]. The calcium ion is one of the key factors since it promotes the oligomerization of cadherin [53], a calcium-dependent adhesion molecule and mediates tyrosine phosphorylation of FAK, which induces actin cytoskeleton reorganization [54]. Some members of the TMEM family are identified as ion transporters. TMEM206, also called PACC (Proton-Activated Chloride Channel 1), is overexpressed in colon cancer samples compared to normal tissues and promotes cell migration and invasion in colon cancer lines by activating AKT and FAK [55]. In the same manner, TMEM16A, a Ca^{2+} transporter

described more precisely hereunder, stimulates the Akt pathway and influences colon cancer cells motility [55].

1.2 Intravasation/extravasation

The processes of intravasation and extravasation are similar because they require the same biological characteristics: survival to anoikis and to immune cells, notably by interacting with platelets, neutrophils and endothelial cells via Intercellular Adhesion Molecule (ICAM) and Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) [56–59]. These characteristics allow metastatic cells, firstly, to leave the primary tumor site by entering into the lumina of lymphatic or blood vessels; secondly, to survive in the hostile bloodstream environment and finally, to colonize a secondary site to establish metastases [60–62]. All these abilities are potentially regulated by TMEM proteins. For example, TMEM140 and TMEM158 were revealed as playing a role in the intravasation/extravasation process by downregulating the expression of plasma membrane proteins such as ICAM1 or VCAM [63,64]. TMEM140 is highly expressed in human glioma samples compared to normal brain tissues and its expression is strongly correlated to the tumor size, to the histological grade and to a poor prognosis. *In vitro*, TMEM140 knockdown in glioma cancer cell lines significantly decreased the expression of ICAM1, VCAM1 and syndecan1, hence limiting the invasive abilities of cancer cells. Similarly, in ovarian cancer cells (a highly metastatic model of cancer), the level of TMEM158 mRNA is higher than in the corresponding normal tissues. TMEM158 depletion also significantly decreased the expression of ICAM1 and VCAM1, two proteins responsible for the binding of cancer to endothelial cells. The decrease in the expression of these two proteins is due to TGF- β signaling pathway deregulation [64]. A recent study, performed in the atherosclerosis disease, has demonstrated the connection between TMEM98 and the expression of ICAM1 in endothelial cells. Therefore, TMEM98 could impact ICAM1 expression in the context of cancer by promoting invasive cancer cell adhesion to endothelium and fostering intravasation/extravasation processes [65]. Even if all these proteins are not fully characterized in terms of structure and function, their role in the metastatic cascade

seems to be important. A better understanding of their function remains necessary in order to clearly identify how they regulate the migration and the invasion processes.

2. Transmembrane proteins and other links with the metastatic process

2.1 Calcium regulation in metastatic cells: TMEM16A

TMEM16A, also known as ANO1, belongs to the protein family of TMEM16. This family of proteins comprises 10 members (ranging from TMEM16A/ANO1 to TMEM16K/ANO10) that are also called anoctamins due to their putative structure containing 8 transmembrane domains [66]. Despite their predicted structural similarities, the members of TMEM16 proteins exert different cellular and biological activities. Whereas most of these paralogs are calcium-dependent phospholipid scramblases that help the translocation of phospholipids between the two phospholipid leaflets of the cell membrane [67], TMEM16A is the first anoctamin to be discovered as being a calcium-activated chloride channel (CaCC) [68–70]. Since the identification of its function, TMEM16A has been the most studied among the family members. TMEM16A is expressed in a variety of cells including secretory epithelia, airway and vascular smooth muscle cells, vascular endothelium, nociceptive neurons and interstitial cells of Cajal (the pacemaker cells in the gastrointestinal tract) [71]. It regulates many physiological functions such as fluid secretion in secretory epithelial, smooth muscle contraction and nociception [72]. Like other CaCCs, TMEM16A recapitulates all the biophysical hallmarks of this type of channels which include activation by submicromolar concentrations of cytosolic calcium, outward rectification at low intracellular Ca^{2+} and anion selectivity [73]. This protein acts as a homodimer and each of the two subunits is composed of 10 transmembrane α -helices and are activated independently [72]. Recent studies performed on the mouse and based on cryo-electron microscopy enabled to characterize in details the mechanism of activation of TMEM16A [74,75]. They suggested a mechanism of gating where Ca^{2+} , here the ligand, directly interacts with the pore region within the transmembrane domain. This binding triggers a conformational rearrangement of the transmembrane helices responsible for the gating in response to the physical contact with the bound ligand. The electrostatic properties are altered and it thereby leads to pore opening and ion

conduction [76–78]. Before the identification of its function, a link between TMEM16A and tumorigenesis had already been established. This protein was found to be highly expressed in many human cancers including head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), glioma, gastrointestinal, lung, oral, esophageal and breast cancers [55,72,79]. In many cases, the overexpression of TMEM16A is due to the amplification of the 11q13 core region in which the gene encoding TMEM16A is located. However, TMEM16A was also found to be overexpressed without the 11q13 amplification. Its overexpression can be regulated transcriptionally but also epigenetically via the methylation of the promoter, the better being observed in head and neck cancer cells [80]. TMEM16A expression is also controlled by microRNAs as shown in gastric cancer cells [81]. The link between ion channels and migration of cancer cells is quite well characterized more especially in glioma [82]. This concept has been established by the fact that most of cancer cells, which are non-excitable cells, overexpress several types of channels (potassium, chloride ...). Many *in vitro* studies have shown the ability of TMEM16A to enhance cell proliferation and/or migration depending on the type of cancer cells [71,83]. Interestingly, *TMEM16A* gene is amplified in different types of cancer: in 30% of esophagus cancers, in 25% of HNSCC and in 15% of breast or lung cancers. The activity of this channel modifies the MAPK pathway, which regulates cell proliferation. Moreover, ERK/MEK pathway inhibitors suppressed the effect of TMEM16A overexpression on proliferation [84]. Another study confirmed the pro-tumoral potential of TMEM16A: by analyzing its function in head and neck squamous cell carcinoma [85] from 83 patient samples, it was shown that the amplification or the overexpression of *TMEM16A* gene is associated with a high risk of metastasis and poor survival. These results have been confirmed by *in vitro* experiments where TMEM16A overexpression increased the migration and proliferation of SCC-25 cancer cells. At the opposite, T16Ainh-A01, a TMEM16 specific inhibitor, alters significantly proliferation of pancreatic cancer cells [86]. How TMEM16A promotes tumor progression is still unclear but the effect could be explained by the disturbance of Cl⁻ and K⁺ efflux that causes cell shrinkage and may favor cancer cell migration into the ECM [87]. The opening of chloride channels can also lead to a modification in the intracellular Cl⁻ concentration that may activate many signaling pathways such as Akt,

Ras or p38 [71]. Another example is the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway activated through the interaction between TMEM16A and EGFR in HNSCC [88]. EGFR activation was further demonstrated in breast cancer cell lines in which TMEM16A overexpression increased EGFR expression and autocrine secretion of EGFR-ligand, that subsequently activates the AKT/sarcoma viral oncogene homolog (v-SRC)/extracellular signal-regulated kinase (Erk) pathway [88,89]. Moreover, this pathway is also activated by TMEM16A via Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII) signaling [89]. Another involved pathway is the MAPK signaling, in which TMEM16A activated MEK and ERK1/2 in HNSCC, bladder and colorectal cancer cells [84,90]. In hepatocellular carcinoma cells, MAPK signaling is activated by TMEM16A through the phosphorylation of p38, ERK1/2 and JNK [91]. Knockdown of TMEM16A also inhibits the induction of tumor growth of prostate models by inducing apoptosis via the activation of TNF- α signaling [92]. In contrast, the upregulation of TMEM16A is significantly correlated with proliferation and dissemination of metastasis in prostate cancer. The analysis of TMEM16A expression in benign prostate hyperplasia compared to adenocarcinoma display a higher expression of the protein in cancer tissues compared to normal samples. Liu *et al* have demonstrated the association between TMEM16A expression and significant reduction of proliferation, migration and invasion of prostate cancer cells, as well as the inhibition of tumor growth by intra-tumoral injection of ShRNAs in mice grafted with PC3 cancer cells [93]. In both studies, the depletion of TMEM16A by shRNA strategy significantly impacts the migration, proliferation and invasion of prostate cancer cells. In addition, in glioma human samples, TMEM16A is overexpressed in high grade tumors. NF- κ B pathway seems to be activated by TMEM16A overexpression in glioma cell lines [94]. Finally, in gastric cancer cell lines, the function of TMEM16A seems to be linked to the modulation of TGF- β signaling pathway [81,95]. Expression of MiR-381, a tumor suppressor microRNA, is negatively associated with metastasis, advanced stage and poor prognosis in patients. Moreover, TMEM16A mRNA expression is controlled by miR-381 and the overexpression of this microRNA decreases TMEM16A translation and consequently, the invasive properties of cancer. The effect is probably linked TGF- β pathway inhibition [81]. In another study, TMEM16A expression was higher in 367

tumor samples of gastric cancer compared to normal adjacent tissues. TMEM16A silencing in cancer cell lines reduced TGF- β secretion and impaired the migration phenotype [95]. Altogether, these data demonstrate that TMEM16A is an important transmembrane protein implicated in tumor progression as well as in metastatic formation and cancer cell dissemination.

2.2 Modulation of the immune response: TMEM173 (STING)

The Stimulator of Interferon Genes (STING), also referenced as TMEM173, is primarily expressed in hematopoietic cells and immune tissues, such as thymus and spleen [96]. The structure of STING has been characterized by X-ray diffraction experiments. They revealed that this protein consists of four transmembrane domains that are associated in two distinct dimers allowing ligand binding [97]. STING has been discovered to play an important role in host defences against pathogenic infections via the regulation of type-I interferon (IFN) signalling and innate immunity.

cGAS-STING (cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes) pathway enables the activation of the expression of type I IFN and other inflammatory cytokines in response to bacterial or viral infections. cGAS-STING pathway activation is illustrated in Figure 2. STING directly senses cyclic dinucleotides (CDNs) such as c-di-AMP (cyclic di-adenylate monophosphate), c-di-CMP (cyclic di-guanylate monophosphate) and cyclic di-GMP-AMP produced by cGAS (cyclic CMP-AMP Synthase) from double stranded-DNA coming from bacteria, viruses or tumor cells. The binding of these ligands promotes the translocation of STING from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus [98,99] and allows the activation with TANK-Binding Kinase 1 (TBK1). This kinase then activates interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) and NF- κ B via several phosphorylation steps. Thereafter, these transcription factors translocate into the nucleus and trigger the expression of inflammatory cytokines (IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α) and of type I IFN [100]. Since the infiltration of T cells into the tumor is largely dependent on the type I IFN signaling [101], STING activation favors tumor control by the immune system [102–104].

In contrast to its tumor suppressor activity, STING pathway is potentially a key player in metastasis formation. Indeed, due to the production of

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and/or cytokines, STING pathway promotes the formation and dissemination of metastases [96]. The activation of STING, through the secretion of TNF- α and IFN- β in metastatic cancer cells allows the cooperation with astrocytes through the expression of connexin 43 (Cx43) facilitating metastasis expansion in the brain [105]. The pro-metastatic effect of STING remains unclear but the secretion of cytokines and NF- κ B pathway activation, two mechanisms linked to STING, could enhance cancer cells migration or dissemination [106,107]. Recently, Chromosomal Instability (CIN), a phenomenon present in 60-80% of cancer cells and producing errors during mitosis chromosome segregation, was hypothesized to be a driver of metastases in cooperation with the STING pathway [108]. Chronic activation of STING pathway, due to the CIN, fosters cell migration, invasion and therefore metastasis formation. This concept is based on the fact that cytokines induce the migration of normal cells such as myeloid cells and that the cancer cells could engage the same response under inflammatory context [109]. In the same line regarding the ambivalent pro- or antitumor role of STING, some other studies described this pathway as a restrictor of metastasis formation [108]. It has been shown that STING protein expression is down-regulated in gastric tumor tissues and hepatocellular carcinoma compared to the corresponding non-tumor tissues and that this lower expression is directly correlated with tumor size, invasion [110] and lymph node metastasis [111]. Moreover, *in vitro* knockdown of STING is associated with colony formation, migration and invasion of gastric cancer cells, as well as with a defect in cytolytic DNA sensing [112]. Cytosolic DNA sensing controls the accumulation of dsDNA in the cytoplasm allowing tumor progression and regulates secretion of cytokines implicated in the antitumor immunity. A dysregulation of this system could lead to an accumulation of dsDNA in cytoplasm escaping to immune system and leading the cell transformation. *In vivo* experiments confirmed this trend in a breast metastatic model of mice by using c-di-GMP injection that was shown to block cancer cell dissemination [113]. Finally, functional mutations in *STING-cGAS* genes are rarely observed but epigenetic regulations are frequently implicated since promoter methylation has been reported in colorectal carcinoma [114]. In several colorectal cancer cell lines, demethylation of

DNA by treatment with azacytidine allows partial re-expression of STING-cGAS pathway suggesting that methylation represses the expression of STING [114]

Altogether, these studies demonstrate that the STING-cGAS pathway plays a major but ambiguous function in regulating metastasis formation. Depending on the level of activation of this pathway, STING-cGAS could favor or impair cancer cell dissemination.

3. TMEM proteins as a potential marker of prognosis

With the development of high throughput methods, gene expression can be correlated to the survival of patients and allow the identification of prognostic markers despite the lack of knowledge regarding their biological functions. Several TMEM proteins have been associated with migration, proliferation or invasion phenotypes and their expression significantly correlates with patient survival in several types of cancers. For example, TMEM16A expression is negatively correlated with patient survival in gastric and head and neck squamous cell carcinoma as shown by RT-qPCR and proteomic analyse of human cancer samples [84,95]. In the contrary, proteomic and RT-qPCR analyses have respectively revealed that lower expression of TMEM17 in lung cancer and of TMEM25 in breast cancer is associated with shorter overall survival for patients [116,117]. Furthermore, the high expression of TMEM17 protein in invasive triple negative breast cancer, as measured by immunostaining of human samples, is correlated with lower relapse-free survival and lower distant metastasis-free survival of patients [116,118]. TMEM25 is an immunoglobulin superfamily member with uncharacterized function. Hrasovec *et al.* revealed the importance of TMEM25 promoter hypermethylation negatively impacts *TMEM25* mRNA expression [119]. In a large majority of colorectal cancer samples, CpG island hypermethylation close to the *TMEM25* gene is inversely correlated with the expression of the protein [119]. TMEM7 is a transmembrane protein mainly expressed in the liver which presents an important homology with 28 kDa interferon- α responsive protein. TMEM7 mRNA is highly expressed in normal hepatic cells compared to hepatocellular carcinoma (HCC) in which TMEM7 is downregulated (85% of the samples).

TMEM7 expression is epigenetically regulated by aberrant DNA methylation and histone deacetylation causing transcriptional silencing of this gene [120]. In hepatic cancer cell lines, the re-expression of this protein by transient transfection is associated with higher proliferation, colony formation and cell migration. Moreover, IFN- α treatments significantly increase TMEM7 expression and impair cell migration in a model of human hepatocellular carcinoma [120]. These results suggest that TMEM7 has pro-tumoral properties.

TMEM45A is a protein localized in the membrane of the Golgi apparatus which is highly expressed in epidermal keratinocytes [121,122]. It is overexpressed in ovarian and glioma cancer samples [123,124] and RT-qPCR analysis has demonstrated that its expression is associated to a poor prognosis in breast [125], brain [126], renal [127], bladder [128] and ovarian cancers [129]. TMEM45A depletion using shRNA in two glioma cell lines decreases their aggressiveness, probably by altering MMP2/9 expression. Similarly, in ovarian cancer cell lines, the same strategy induced the same effect on cancer cell migration. Recently, this protein has been shown to enhance the chemoresistance of liver and breast cancer cells under hypoxic conditions [125]. In the same manner, it was shown by mRNA level analysis of human samples that TMEM45B and TMEM48 overexpression is associated with a poor prognosis for lung cancer patients [33,36]. Immunodetection analysis has shown that the high expression of TMEM88 in non-small cell lung cancer is associated with poor survival and more frequent lymph node metastases [130]. Regarding TMEM98 protein, it was shown by mRNA level and proteomic analysis that its higher expression is associated with a poor survival and lymph node metastasis for patients with ovarian cancer, glioma and lung cancer [131–133]. TMEM140 protein expression is significantly higher in glioma than in normal brain tissues and TMEM140 overexpression is correlated with lower overall survival time and a larger tumor size and histologic grade in gliomas [63].

4. The topology of TMEM proteins and potential targeted therapies

Most of TMEM proteins previously described seem to be involved at the early stage of metastasis and/or before the emergence of chemo- and radiotherapy resistance [134–137]. Hence, they represent new possible targets to prevent these processes.

Development of new therapies is based on potential targets for which the structure or the function is well characterized. However, only a few structures of transmembrane proteins are available in databases (Protein Data Bank (PDB)...). This lack of structural information comes from the nature of the proteins of interest that are embedded in the lipid bilayer. This poses a major problem to precisely determine the structure of this kind of proteins due to the difficulties to purify them. To avoid the challenge of membrane protein crystallography, homology and fold recognition algorithms are used to assess their 3D properties [138]. To determine the structure topology of TMEM proteins, we submitted their protein sequences downloaded from UniProt to TOPCONS and CCTOP. These servers can predict the number of transmembrane domains and the N- and C-terminus orientation thanks to different algorithms (OCTOPUS, Philius, PolyPhobius, SCAMPI, SPOCTOPUS, HMMTOP, Membrain, Memsat-SVM, Pro, Prodiv, TMHMM). These algorithms analyze the amino acid sequence in order to determine the hydrophobicity pattern of each protein. Indeed, membrane segments are preferentially composed hydrophobic (such as alanine, leucine, isoleucine, valine) or aromatic (tryptophan, tyrosine, and phenylalanine) residues. Amino acid sequence analysis allows to determine the transmembrane domains of integral membrane proteins [139]. Based on these *in silico* analyses, we have modeled the structure of the different TMEM proteins presented in the previous parts of this review. They are displayed in Table 1.

Some TMEM family members are well characterized in terms of the structure allowing a better understanding of biological functions or the development of agonist/antagonist compounds. For example, TMEM16A is one of the best-characterized transmembrane proteins since it has been described as a calcium-activated chloride channel [68,70]. The structure has been determined after crystallization of the protein [140] demonstrating that TMEM16A is composed of ten transmembrane segments dimerizing in the membrane to form the active ion channel. The knowledge of TMEM16A 3D structure makes possible to design agonist and antagonist compounds in order to impact on its pro- or anti-metastatic properties. Moreover, several compounds have been identified by high-throughput screening to act, on calcium-activated chloride channel functions, as activators (N-aroylaminothiazole “activators”

compounds (E_{act})), modulators (tetrazolylbenzamide “potentiator” compounds (F_{act})) or as inhibitors (tannic acid, gallotannins and arylaminothiophene $CaCC_{inh}$ -A01)[141,142]. Most of these molecules are nonselective inhibitors of this protein family [143,144]. However, in 2011, Namkung *et al.* have discovered selective inhibitors (aminophenylthiazole compounds) including T16A_{inh}-A01 targeting TMEM16A activity [145,146]. A recent study published in 2019 by Miner *et al.* highlighted drug repurposing of Anthelmintics Niclosamide and Nitazoxanide as potent TMEM16A antagonists hence proposing new treatments for preventing cancer cell migration/invasion [147]. However due to its central function in the body, some adverse effects are expected, notably in cardiac myocytes or for neuronal cell excitability [69].

5. Identification of TMEM protein functions through the identification of interactants

Most of the time, studies of the phenotype associated with TMEM depletion or overexpression are performed without *a priori* knowledge of the structure and/or the function of the protein of interest. However, an interesting strategy has been established in a few studies based on the identification of partners, using immunoprecipitation assays coupled to mass spectrometry analysis. The function of several TMEMs has been determined by using this strategy for TMEM41B, TMEM88, TMEM126B and TMEM206 [55,148–150]. TMEM41B has been characterized as a novel regulator of autophagy and lipid mobilization through its interaction with sequestrin (p62) and with other mitochondrial and endoplasmic reticulum proteins [148]. Moreover, TMEM41B depletion was related to the arrest of autophagosome biogenesis and to alteration of the lysosomal flux of autophagy cargo receptors [151]. Regarding TMEM88, it has been shown that this protein interacts with Dishevelled Segment Polarity Protein (DVL-1 and DVL-3) proteins which are known to be implicated in Wnt and P38/JNK signaling that is known to promote proliferation and metastasis of non–small cell lung cancer cells [130,149]. Co-immunoprecipitation experiments also identified the interaction between TMEM206 and AKT protein. TMEM206 promotes the development and progression of colorectal cancer by activating the AKT and ERK signaling pathways [55]. Recently TMEM206 has discovered to be a pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride

channels. This channel regulates the entry of chloride anion in the cells through its activation by acid condition ($\text{pH} < 5.5$). It has been suggested that ASOR-mediated chloride influx may worsen the outcome of ischemic stroke. Inhibition of this channel seems to be favorable for treatment of cancer and to prevent venous thrombosis [152].

In some other studies, TMEM proteins have been classified according to their number of transmembrane segments in order to correlate their functions to their structure. For example, ion channels are hypothesized to be composed of six-transmembrane segments while G protein-coupled receptor contains seven transmembrane segments [153]. Structure determination has shown that this way of classification (structure-based function determination) is not always relevant due to the complexity of membrane proteins. Only full structural and functional characterization of such proteins can uncover the mystery of membrane proteins.

Conclusion

Metastasis development is a complex mechanism involving different proteins that promote migration/invasion of cancer cells. This process is also mostly responsible for treatment failure since the secondary tumors are highly resistant to chemotherapy. The mechanisms by which the metastases appear are complex and a large panel of pathways and proteins are involved. In this review, we have highlighted that proteins of the TMEM family are potential contributors to cancer cell dissemination. This demonstrates the real impact of these proteins in the biology of cancer cells. For a large number of them, a function has been highlighted but only a few of them are well characterized. For a large majority of TMEM proteins, their mechanisms of action remain unclear or partially described that makes it difficult to perfectly understand the way through which they act. Intensive research on this family of proteins could thus open the way to the discovery of new targets that would allow the development of efficient new therapies.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

All authors participate in the redaction of the manuscript and approved the final version.

Funding

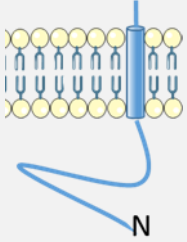
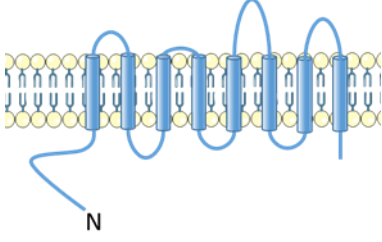
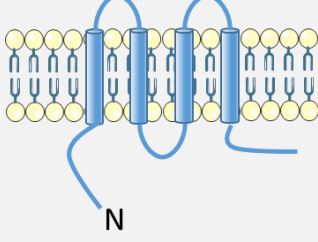
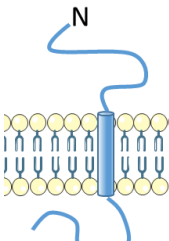
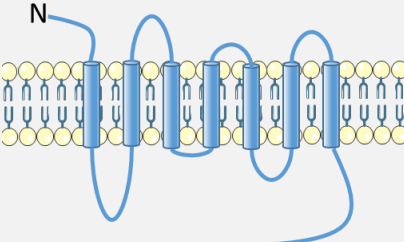
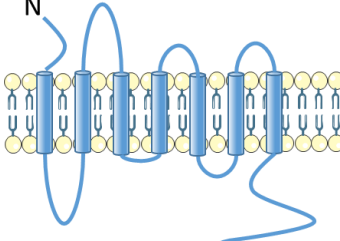
Sebastien Marx is a recipient of a Télémie grant (FNRS, Belgium). Benjamin Le Calvé is a recipient of a postdoctoral Télémie grant (FNRS, Belgium). Thomas Dal Maso is a recipient of a FRIA Grant (FNRS, Belgium), Jia-Wei is a recipient of a Région Wallonne Grant (ProtherWal project).

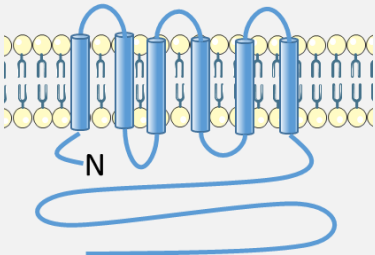
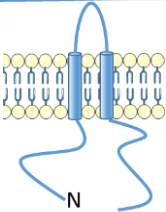
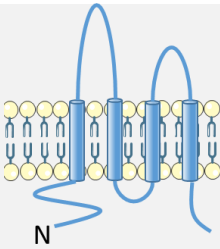
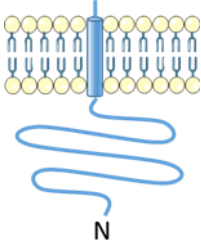
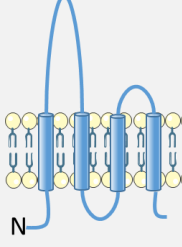
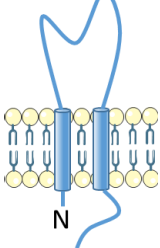
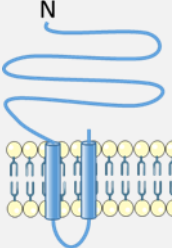
Figure 1: Schematic representation of the three major steps of the metastatic cascade. A. Invasion and EMT, B. Intravasation, C. Extravasation. Adapted from [19,20] and designed with Smart Servier Medical Art tools.[154]

Figure 2: Schematic representation of the cGAS-STING pathway activation by Cyclic Dinucleotides and production of cytokines. Adapted from [155] and designed with Smart Servier Medical Art tools [154].

Table 1: Summary of TMEM protein properties: name, cellular localization, structure and role in the metastatic cascade. ER (Endoplasmic Reticulum), NR (Not Reported),

Table 1

NAME	LOCALIZATION	STRUCTURE	FUNCTION IN METASTASIS
TMEM7	NR		NR
TMEM16A (ANO1)	Plasma membrane, cytosol		Association with pro-metastatic cellular pathways
TMEM17	Plasma membrane (cilia)		Migration/invasion
TMEM25	Plasma membrane		NR
TMEM45A	ER, Golgi		NR
TMEM45B	ER		Migration/invasion

TMEM48	Nuclear membrane		Migration/invasion
TMEM88	Plasma membrane		Migration/invasion
TMEM97 (MAC30)	ER, nuclear membrane		Migration/invasion
TMEM98	ER, cytosol, nuclear membrane		Intravasation/extravasation
TMEM140	NR		Intravasation/extravasation
TMEM156	Plasma membrane		NR
TMEM158	NR		Intravasation/extravasation

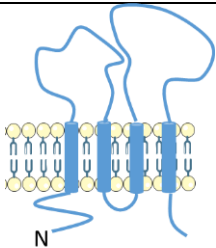
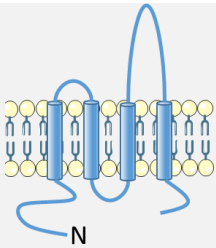
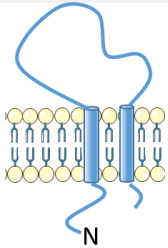
TMEM173 (STING)	Plasma membrane, ER, mitochondria		Modulation of the immune response
TMEM176A	Plasma membrane, mitochondria		Migration/invasion
TMEM206	Plasma membrane		Migration/invasion

Figure 1

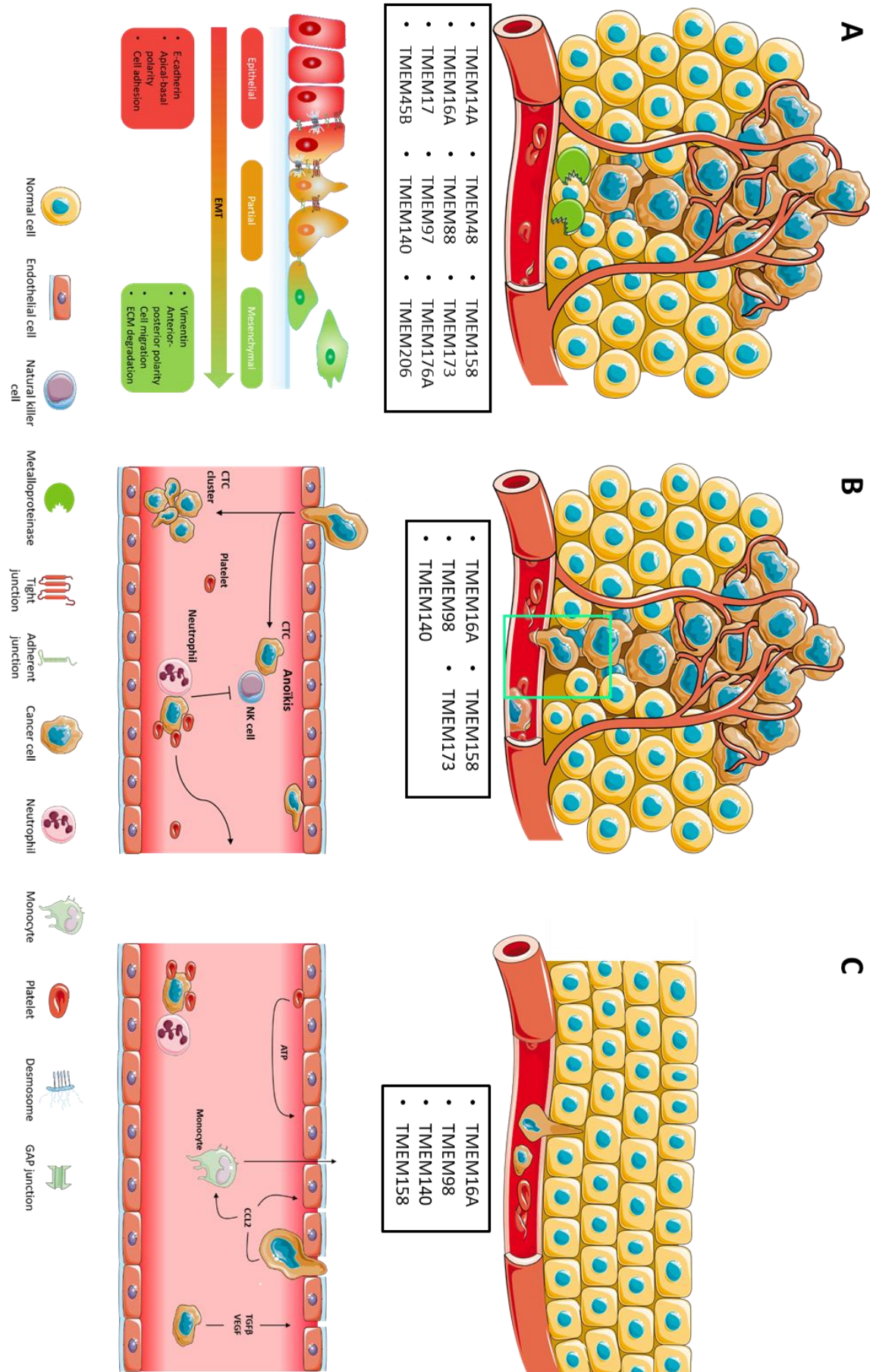
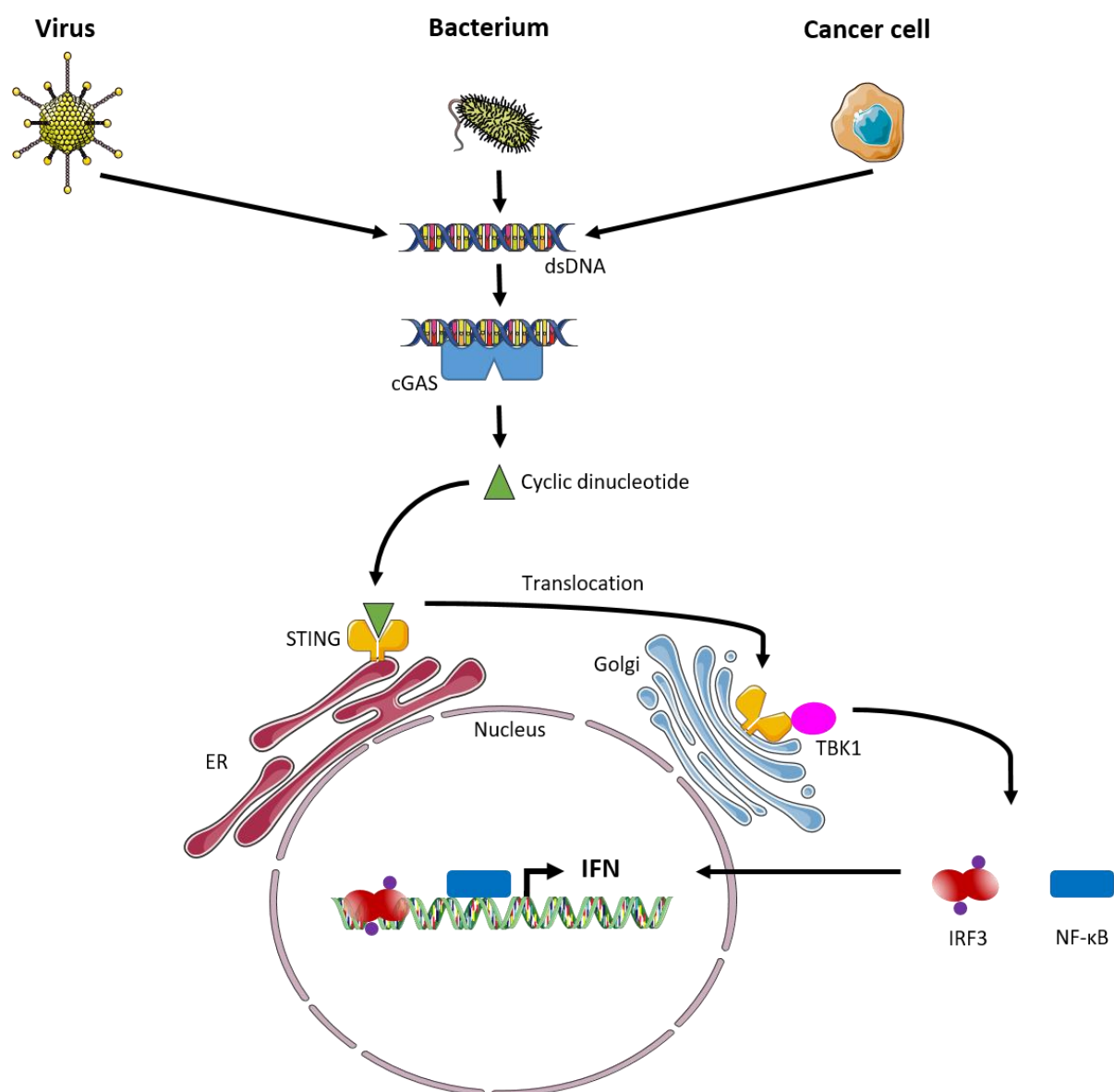


Figure 2



References

- [1] E.P. Carpenter, K. Beis, A.D. Cameron, S. Iwata, Overcoming the challenges of membrane protein crystallography, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 581–586. doi:10.1016/j.sbi.2008.07.001.
- [2] J.J. Babcock, M. Li, Deorphanizing the human transmembrane genome: A landscape of uncharacterized membrane proteins, *Acta Pharmacol. Sin.* 35 (2014) 11–23. doi:10.1038/aps.2013.142.
- [3] M. Schmick, P.I.H. Bastiaens, The interdependence of membrane shape and cellular signal processing, *Cell.* 156 (2014) 1132–1138. doi:10.1016/j.cell.2014.02.007.
- [4] I. Shimada, T. Ueda, Y. Kofuku, M.T. Eddy, K. Wüthrich, GPCR drug discovery: Integrating solution NMR data with crystal and cryo-EM structures, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2018) 59–82. doi:10.1038/nrd.2018.180.
- [5] S.H. White, Biophysical dissection of membrane proteins, *Nature.* 459 (2009) 344–346. doi:10.1038/nature08142.
- [6] A. Hahn, K. Parey, M. Bublitz, D.J. Mills, V. Zickermann, J. Vonck, W. Kühlbrandt, T. Meier, Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology, *Mol. Cell.* 63 (2016) 445–456. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.037.
- [7] N. Borgese, S. Colombo, E. Pedrazzini, The tale of tail-anchored proteins: Coming from the cytosol and looking for a membrane, *J. Cell Biol.* 161 (2003) 1013–1019. doi:10.1083/jcb.200303069.
- [8] P. Yeagle, Membrane Proteins, in: Academic Press (Ed.), *Membr. Cells*, 3rd ed., Cambridge, 2013: pp. 337–342. doi:10.1201/b15106-33.
- [9] T. Regad, Targeting RTK signaling pathways in cancer, *Cancers (Basel).* 7 (2015) 1758–1784. doi:10.3390/cancers7030860.
- [10] M.A. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases., *Cell.* 141 (2010) 1117–34. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- [11] S. Rawson, S. Davies, J.D. Lippiat, S.P. Muench, The changing landscape of membrane protein structural biology through developments in electron microscopy, *Mol. Membr. Biol.* 33 (2016) 12–22. doi:10.1080/09687688.2016.1221533.
- [12] A.E. Rawlings, Membrane proteins: always an insoluble problem?, *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2016) 790–795. doi:10.1042/bst20160025.
- [13] H. Goel, A. Mercurio, VEGF targets the tumour cell Hira, *Nat Rev Cancer.* 13 (2013) 871–882. doi:10.1038/mp.2011.182.doi.
- [14] N. Ferrara, K.J. Hillan, H.P. Gerber, W. Novotny, Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 391–400. doi:10.1038/nrd1381.
- [15] R. Roskoski, Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356 (2007) 323–328. doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.156.
- [16] S.M. Wilhelm, L. Adnane, P. Newell, A. Villanueva, J.M. Llovet, M. Lynch, Preclinical

- overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3129–3140. doi:10.1158/1535-7163.mct-08-0013.
- [17] H. Lodish, A. Berk, S. Zipursky, Insertion of Membrane Proteins into the ER Membrane, in: W.H.Freeman (Ed.), *Mol. Cell Biol.*, 4th ed., New-York, 2000.
- [18] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [19] A. Dongre, R.A. Weinberg, New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 69–84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
- [20] A.W. Lambert, D.R. Pattabiraman, R.A. Weinberg, Emerging Biological Principles of Metastasis., *Cell.* 168 (2017) 670–691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037.
- [21] S. Valastyan, R.A. Weinberg, Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms The Invasion-Metastasis Cascade, *Cell.* 147 (2011) 275–292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [22] M. Yilmaz, G. Christofori, EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion, *Cancer Metastasis Rev.* 28 (2009) 15–33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0.
- [23] A. Dongre, R.A. Weinberg, New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20 (2019) 69–84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
- [24] Y. Lin, C. Dong, B.P. Zhou, Epigenetic regulation of EMT: the Snail story., *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 1698–705. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888971><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4005722>.
- [25] S. Goossens, N. Vandamme, P. Van Vlierberghe, G. Berx, EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1868 (2017) 584–591. doi:10.1016/j.bbcan.2017.06.006.
- [26] D.M. Gonzalez, D. Medici, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Sci. Signal.* 7 (2014) re8. doi:10.1126/scisignal.2005189.
- [27] S.P. Turunen, O. Tatti-Bugaeva, K. Lehti, Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864 (2017) 1974–1988. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.002.
- [28] C. Stock, A. Schwab, Ion channels and transporters in metastasis, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1848 (2015) 2638–2646. doi:10.1016/j.bbamem.2014.11.012.
- [29] S. Valastyan, R.A. Weinberg, Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms The Invasion-Metastasis Cascade, *Cell.* 147 (2011) 275–292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [30] K. Shen, W. Yu, Y. Yu, X. Liu, X. Cui, Biomedicine & Pharmacotherapy Knockdown of TMEM45B inhibits cell proliferation and invasion in gastric cancer, *Biomed. Pharmacother.* 104 (2018) 576–581. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.016.
- [31] H. Itoh, T. Kadomatsu, H. Tanoue, M. Yugami, K. Miyata, M. Endo, J. Morinaga, E.

- Kobayashi, T. Miyamoto, R. Kurahashi, K. Terada, H. Mizuta, Y. Oike, TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma, *Oncogene*. 37 (2018) 2903–2920. doi:10.1038/s41388-018-0160-0.
- [32] D. Johnson, R. O’Keefe, J. Grandis, Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer Daniel, *Nat Rev Clin Oncol*. 15 (2018) 234–248. doi:10.1002/cnrcr.27633.Percutaneous.
- [33] R. Hu, F. Hu, X. Xie, L. Wang, G. Li, T. Qiao, M. Wang, H. Xiao, TMEM45B, up-regulated in human lung cancer, enhances tumorigenicity of lung cancer cells, *Tumor Biol*. (2016). doi:10.1007/s13277-016-5063-5.
- [34] Y. Li, W. Guo, S. Liu, B. Zhang, B. Yu, B. Yang, S. Kan, S. Feng, Silencing Transmembrane Protein 45B (TMEM45B) Inhibits Proliferation , Invasion , and Tumorigenesis in Osteosarcoma Cells, 25 (2018) 1021–1026.
- [35] T. Valenta, G. Hausmann, K. Basler, The many faces and functions of β -catenin, *EMBO J*. 31 (2012) 2714–2736. doi:10.1038/emboj.2012.150.
- [36] W. Qiao, Y. Han, W. Jin, M. Tian, P. Chen, J. Min, H. Hu, B. Xu, W. Zhu, L. Xiong, Q. Lin, Overexpression and biological function of TMEM48 in non-small cell lung carcinoma, *Tumor Biol*. 37 (2016) 2575–2586. doi:10.1007/s13277-015-4014-x.
- [37] M. Mao, J. Chen, X. Li, Z. Wu, siRNA-TMEM98 inhibits the invasion and migration of lung cancer cells, *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 8 (2015) 15661–15669.
- [38] H. Li, M. Zhang, E. Linghu, F. Zhou, J.G. Herman, L. Hu, M. Guo, Epigenetic silencing of TMEM176A activates ERK signaling in human hepatocellular carcinoma., *Clin. Epigenetics*. 10 (2018) 137. doi:10.1186/s13148-018-0570-4.
- [39] Y. Wang, Y. Zhang, J.G. Herman, E. Linghu, M. Guo, Epigenetic silencing of TMEM176A promotes esophageal squamous cell cancer development, *Oncotarget*. 8 (2017) 70035–70048. doi:10.18632/oncotarget.19550.
- [40] Z. Liu, H. An, P. Song, D. Wang, S. Li, K. Chen, Potential targets of TMEM176A in the growth of glioblastoma cells, (n.d.) 7763–7775.
- [41] D. Gao, Y. Han, Y. Yang, J.G. Herman, E. Linghu, Q. Zhan, F. Fuks, Z.J. Lu, M. Guo, Methylation of TMEM176A is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development, *Epigenetics*. 12 (2017) 575–583. doi:10.1080/15592294.2017.1341027.
- [42] A. Calon, D.V.F. Tauriello, E. Batlle, TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis, *Semin. Cancer Biol*. 25 (2014) 15–22. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.008.
- [43] L. Li, P. Tang, S. Li, X. Qin, H. Yang, C. Wu, Y. Liu, Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy, *Med. Oncol*. 34 (2017). doi:10.1007/s12032-017-1039-6.
- [44] I. Khan, P.S. Steeg, Metastasis suppressors: Functional pathways, *Lab. Investig*. 98 (2018) 198–210. doi:10.1038/labinvest.2017.104.
- [45] R. Tabatabai, Y. Linhares, D. Bolos, M. Mita, A. Mita, Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics, *Target. Oncol*. 12 (2017) 623–641.

doi:10.1007/s11523-017-0507-4.

- [46] A. Schwab, A. Fabian, P.J. Hanley, C. Stock, Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration, *Physiol. Rev.* 92 (2012) 1865–1913. doi:10.1152/physrev.00018.2011.
- [47] C.D. Ji, Y.X. Wang, D.F. Xiang, Q. Liu, Z.H. Zhou, F. Qian, L. Yang, Y. Ren, W. Cui, S.L. Xu, X.L. Zhao, X. Zhang, Y. Wang, P. Zhang, J.M. Wang, Y.H. Cui, X.W. Bian, Kir2.1 interaction with Stk38 promotes invasion and metastasis of human gastric cancer by enhancing MEKK2–MEK1/2–ERK1/2 signaling, *Cancer Res.* 78 (2018) 3041–3053. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3776.
- [48] F. Davis, I. Azimi, R. Faville, A. Peters, K. Jalink, J. Putney, G. Goodhill, E. Thompson, S. Roberts, G. Monteith, Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent Felicity, *Oncogene.* 33 (2014) 2307–2316. doi:10.4172/2157-7633.1000305.Improved.
- [49] Z. He, W. Dong, J. Hu, X. Ren, AQP5 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF- κ B-regulated epithelial-mesenchymal transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490 (2017) 343–348. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.046.
- [50] E. Monzani, A. Shtil, C. La Porta, The Water Channels, New Druggable Targets to Combat Cancer Cell Survival, Invasiveness and Metastasis, *Curr. Drug Targets.* 8 (2007) 1132–1137. doi:10.2174/138945007782151342.
- [51] W. Lai, L. Liu, Y. Zeng, H. Wu, H. Xu, S. Chen, Z. Chu, I. Azimi, S.J. Roberts-Thomson, G.R. Monteith, P. Mo, S. Yang, A. Aggarwal, H. Schulz, T. Manhardt, M. Bilban, R. V. Thakker, E. Kallay, The store-operated calcium channels in cancer metastasis: from cell migration, invasion to metastatic colonization., *Front. Biosci. (Landmark Ed.* 1864 (2017) 1241–1256. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.01.017.
- [52] S. Yang, J.J. Zhang, X.Y. Huang, Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis, *Cancer Cell.* 15 (2009) 124–134. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.019.
- [53] J. Vendome, K. Felsovalyi, H. Song, Z. Yang, X. Jin, J. Brasch, O.J. Harrison, G. Ahlsen, F. Bahna, A. Kaczynska, P.S. Katsamba, D. Edmond, W.L. Hubbell, L. Shapiro, B. Honig, Structural and energetic determinants of adhesive binding specificity in type I cadherins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) E4175–E4184. doi:10.1073/pnas.1416737111.
- [54] P. Mo, S. Yang, The store-operated calcium channels in cancer metastasis: from cell migration, invasion to metastatic colonization., *Front. Biosci. (Landmark Ed.* 23 (2018) 1241–1256.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930597%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5632947>.
- [55] J. Zhao, D. Zhu, X. Zhang, Y. Zhang, J. Zhou, M. Dong, TMEM206 promotes the malignancy of colorectal cancer cells by interacting with AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 10888–10898. doi:10.1002/jcp.27751.
- [56] D.F. Legler, E. Uetz-Von Allmen, M.A. Hauser, CCR7: Roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 54 (2014) 78–82. doi:10.1016/j.biocel.2014.07.002.

- [57] A. Ben-Baruch, Organ selectivity in metastasis: Regulation by chemokines and their receptors, *Clin. Exp. Metastasis*. 25 (2008) 345–356. doi:10.1007/s10585-007-9097-3.
- [58] A. Muller, B. Homey, H. Soto, H. Ge, D. Catron, M. Bucanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. Wagner, J. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, A. Zlotnik, Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis, 410 (2001) 50–56. doi:10.1038/35065016.
- [59] M. Schlesinger, G. Bendas, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) - An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis, *Int. J. Cancer*. 136 (2015) 2504–2514. doi:10.1002/ijc.28927.
- [60] X. Liu, Q. Chen, J. Yan, Y. Wang, C. Zhu, C. Chen, X. Zhao, M. Xu, Q. Sun, R. Deng, H. Zhang, Y. Qu, J. Huang, B. Jiang, J. Yu, MiRNA-296-3p-ICAM-1 axis promotes metastasis of prostate cancer by possible enhancing survival of natural killer cell-resistant circulating tumour cells, *Cell Death Dis.* 4 (2013) 1–15. doi:10.1038/cddis.2013.458.
- [61] R. Sharma, R. Sharma, T.P. Khaket, C. Dutta, B. Chakraborty, T.K. Mukherjee, Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1, *Cell. Oncol.* 40 (2017) 199–208. doi:10.1007/s13402-017-0324-x.
- [62] B. Hurt, R. Schulick, B. Edil, K.C. El Kasmi, C. Barnett, Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils, *Am. J. Surg.* 214 (2017) 938–944. doi:10.1016/j.amjsurg.2017.08.003.
- [63] B. Li, M.Z. Huang, X.Q. Wang, B.B. Tao, J. Zhong, X.H. Wang, W.C. Zhang, S.T. Li, TMEM140 is associated with the prognosis of glioma by promoting cell viability and invasion, *J. Hematol. Oncol.* 8 (2015) 1–11. doi:10.1186/s13045-015-0187-4.
- [64] Z. Cheng, J. Guo, L. Chen, N. Luo, W. Yang, X. Qu, Overexpression of TMEM158 contributes to ovarian carcinogenesis., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 34 (2015) 75. doi:10.1186/s13046-015-0193-y.
- [65] G. Lv, H. Zhu, C. Li, J. Wang, D. Zhao, S. Li, L. Ma, G. Sun, F. Li, Y. Zhao, Y. Gao, Inhibition of IL-8-mediated endothelial adhesion, VSMCs proliferation and migration by siRNA-TMEM98 suggests TMEM98's emerging role in atherosclerosis, *Oncotarget*. 8 (2017) 88043–88058. doi:10.18632/oncotarget.21408.
- [66] C. Duran, H.C. Hartzell, Physiological roles and diseases of tmem16/anoctamin proteins: Are they all chloride channels?, *Acta Pharmacol. Sin.* 32 (2011) 685–692. doi:10.1038/aps.2011.48.
- [67] J. Whitelock, H.C. Hartzell, Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles, (2016) 119–143.
- [68] A. Caputo, E. Caci, L. Ferrera, N. Pedemonte, C. Barsanti, E. Sondo, U. Pfeffer, R. Ravazzolo, O. Zegarra-moran, L.J. V Galletta, TMEM16A, A Membrane Protein Associated with Calcium-Dependent Chloride Channel Activity, *Science* (80-.). (2008) 590–594.
- [69] Y.D. Yang, H. Cho, J.Y. Koo, M.H. Tak, Y. Cho, W.S. Shim, S.P. Park, J. Lee, B. Lee, B.M. Kim, R. Raouf, Y.K. Shin, U. Oh, TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance, *Nature*. 455 (2008) 1210–1215. doi:10.1038/nature07313.

- [70] B.C. Schroeder, T. Cheng, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Expression Cloning of TMEM16A as a Calcium-Activated Chloride Channel Subunit, *Cell*. 134 (2008) 1019–1029. doi:10.1016/j.cell.2008.09.003.
- [71] H. Wang, L. Zou, K. Ma, J. Yu, H. Wu, M. Wei, Q. Xiao, Cell-specific mechanisms of TMEM16A Ca²⁺-activated chloride channel in cancer, *Mol. Cancer*. 16 (2017) 1–17. doi:10.1186/s12943-017-0720-x.
- [72] U. Oh, J. Jung, Cellular functions of TMEM16/anoctamin, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 468 (2016) 443–453. doi:10.1007/s00424-016-1790-0.
- [73] F. Huang, X. Wong, L.Y. Jan, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXV: Calcium-Activated Chloride Channels, *Pharmacol. Rev.* 64 (2012) 1–15. doi:10.1124/pr.111.005009.
- [74] S. Dang, S. Feng, J. Tien, C.J. Peters, D. Bulkley, M. Lolicato, J. Zhao, K. Zuberbühler, W. Ye, L. Qi, T. Chen, C.S. Craik, Y.N. Jan, D.L. Minor, Y. Cheng, L.Y. Jan, Cryo-EM structures of the TMEM16A calciumactivated chloride channel, *Nature*. 552 (2017) 426–429. doi:10.1038/nature25024.
- [75] C. Paulino, V. Kalienkova, A.K.M. Lam, Y. Neldner, R. Dutzler, Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM, *Nature*. 552 (2017) 421–425. doi:10.1038/nature24652.
- [76] C.J. Peters, J.M. Gilchrist, J. Tien, N.P. Bethel, L. Qi, T. Chen, L. Wang, Y.N. Jan, M. Grabe, L.Y. Jan, The Sixth Transmembrane Segment Is a Major Gating Component of the TMEM16A Calcium-Activated Chloride Channel, *Neuron*. 97 (2018) 1063–1077.e4. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.048.
- [77] S. Dang, S. Feng, J. Tien, C.J. Peters, D. Bulkley, M. Lolicato, J. Zhao, K. Zuberbühler, W. Ye, L. Qi, T. Chen, C.S. Craik, Y.N. Jan, D.L. Minor, Y. Cheng, L.Y. Jan, Cryo-EM structures of the TMEM16A calciumactivated chloride channel, *Nature*. 552 (2017) 426–429. doi:10.1038/nature25024.
- [78] C. Paulino, V. Kalienkova, A.K.M. Lam, Y. Neldner, R. Dutzler, Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM, *Nature*. 552 (2017) 421–425. doi:10.1038/nature24652.
- [79] L. Jia, W. Liu, L. Guan, M. Lu, K.W. Wang, Inhibition of calcium-activated chloride channel ANO1/TMEM16A suppresses tumor growth and invasion in human lung cancer, *PLoS One*. 10 (2015) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0136584.
- [80] D.J. Shiwerski, C. Shao, A. Bill, J. Kim, D. Xiao, C.A. Bertrand, R.S. Seethala, D. Sano, J.N. Myers, P. Ha, J. Grandis, L.A. Gaither, M.A. Puthenveedu, U. Duvvuri, To “grow” or “go”: TMEM16A expression as a switch between tumor growth and metastasis in SCCHN, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 4673–4688. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0363.
- [81] Q. Cao, F. Liu, K. Ji, N. Liu, Y. He, W. Zhang, L. Wang, MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36 (2017) 1–16. doi:10.1186/s13046-017-0499-z.
- [82] H. Sontheimer, An Unexpected Role for Ion Channels in Brain Tumor Metastasis, *Exp. Biol. Med.* 233 (2008) 779–791. doi:10.3181/0711-mr-308.
- [83] Z. Qu, W. Yao, R. Yao, X. Liu, K. Yu, C. Hartzell, The Ca(2+) -activated Cl(-) channel,

- ANO1 (TMEM16A), is a double-edged sword in cell proliferation and tumorigenesis, *Cancer Med.* 3 (2014) 453–461. doi:10.1002/cam4.232.
- [84] U. Duvvuri, D.J. Shiwariski, D. Xiao, C. Bertrand, X. Huang, R.S. Edinger, J.R. Rock, B.D. Harfe, B.J. Henson, K. Kunzelmann, R. Schreiber, R.S. Seethala, A.M. Egloff, X. Chen, V.W. Lui, J.R. Grandis, S.M. Gollin, TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression, *Cancer Res.* 72 (2012) 3270–3281. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0475-T.
- [85] C. Ayoub, C. Wasylyk, Y. Li, E. Thomas, L. Marisa, A. Robé, M. Roux, J. Abecassis, A. De Reyniès, B. Wasylyk, ANO1 amplification and expression in HNSCC with a high propensity for future distant metastasis and its functions in HNSCC cell lines, *Br. J. Cancer.* 103 (2010) 715–726. doi:10.1038/sj.bjc.6605823.
- [86] A. Mazzone, S. Eisenan, T. Strege, Z. Yao, T. Ordog, S. Gibbons, G. Farrugia, Inhibition of Cell Proliferation by a Selective Inhibitor of the Ca^{2+} - activated Cl^{-} Channel, *Ano1 Amelia, Biochem Biophys Res Commun.* 427 (2012) 248–253. doi:10.1038/jid.2014.371.
- [87] N. Pedemonte, L. Galletta, STRUCTURE AND FUNCTION OF TMEM16 PROTEINS (ANOCTAMINS), *Physiol Rev.* 94 (2014) 419–459.
- [88] A. Bill, A. Gutierrez, S. Kulkarni, C. Kemp, D. Bonenfant, H. Voshol, U. Duvvuri, L.A. Gaither, ANO1 interacts with EGFR and correlates with sensitivity to EGFR-targeting therapy in head and neck cancer, *Oncotarget.* 6 (2015). doi:10.18632/oncotarget.3277.
- [89] A. Britschgi, A. Bill, H. Brinkhaus, C. Rothwell, I. Clay, S. Duss, M. Rebhan, P. Raman, C. Guy, K. Wetzel, E. George, M.O. Popa, S. Lilley, H. Choudhury, M. Gosling, L. Wang, S. Fitzgerald, J. Borawski, J. Baffoe, M. Labow, L.A. Gaither, M. Bentires-Alj, Abstract LB-205: The calcium activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR- and CAMK-signaling., *Cancer Res.* 73 (2013) LB-205-LB-205. doi:10.1158/1538-7445.am2013-lb-205.
- [90] Y. Sui, M. Sun, F. Wu, L. Yang, W. Di, G. Zhang, L. Zhong, Z. Ma, J. Zheng, X. Fang, T. Ma, Inhibition of TMEM16A expression suppresses growth and invasion in human colorectal cancer cells, *PLoS One.* 9 (2014) 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0115443.
- [91] L. Deng, J. Yang, H. Chen, B. Ma, K. Pan, C. Su, F. Xu, J. Zhang, Knockdown of TMEM16A suppressed MAPK and inhibited cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma, *Onco. Targets. Ther.* 9 (2016) 325–333. doi:10.2147/OTT.S95985.
- [92] Y. Song, J. Gao, L. Guan, X. Chen, J. Gao, K. Wang, Inhibition of ANO1/TMEM16A induces apoptosis in human prostate carcinoma cells by activating $\text{TNF-}\alpha$ signaling, *Cell Death Dis.* 9 (2018). doi:10.1038/s41419-018-0735-2.
- [93] W. Liu, M. Lu, B. Liu, Y. Huang, K.W. Wang, Inhibition of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma, *Cancer Lett.* 326 (2012) 41–51. doi:10.1016/j.canlet.2012.07.015.
- [94] J. Liu, Y. Liu, Y. Ren, L. Kang, L. Zhang, Transmembrane protein with unknown function 16A overexpression promotes glioma formation through the nuclear factor- κB signaling pathway, *Mol. Med. Rep.* 9 (2014) 1068–1074. doi:10.3892/mmr.2014.1888.
- [95] F. Liu, Q.-H. Cao, D.-J. Lu, B. Luo, X.-F. Lu, R.-C. Luo, X.-G. Wang, TMEM16A

- overexpression contributes to tumor invasion and poor prognosis of human gastric cancer through TGF- β 2 signaling, *Oncotarget*. 6 (2015). doi:10.18632/oncotarget.3412.
- [96] Q. Chen, L. Sun, Z.J. Chen, Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 1142–1149. doi:10.1038/ni.3558.
- [97] D. McCaffary, STING signalling: an emerging common pathway in autoimmunity and cancer, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 39 (2017) 253–258. doi:10.1080/08923973.2017.1350704.
- [98] A. Ablasser, M. Goldeck, T. Cavlar, T. Deimling, G. Witte, Europe PMC Funders Group cGAS produces a 2' -5' -linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING, 498 (2014) 380–384. doi:10.1038/nature12306.cGAS.
- [99] J. Wu, L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen, Z.J. Chen, Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA, *Science* (80-.). 339 (2013) 826–830. doi:10.1126/science.1229963.
- [100] G. Berger, M. Marloye, S.E. Lawler, Pharmacological Modulation of the STING Pathway for Cancer Immunotherapy, *Trends Mol. Med.* 25 (2019) 412–427. doi:10.1016/j.molmed.2019.02.007.
- [101] S. Woo, M.B. Fuertes, L. Corrales, S. Spranger, J. Michael, M.Y.K. Leung, R. Duggan, Y. Wang, G.N. Barber, A. Katherine, M. Alegre, T.F. Gajewski, STING-dependent cytosolic DNA, 41 (2015) 830–842. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.017.STING-Dependent.
- [102] H. Wang, S. Hu, X. Chen, H. Shi, C. Chen, L. Sun, Z.J. Chen, cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) 1637–1642. doi:10.1073/pnas.1621363114.
- [103] C.R. Ager, M.J. Reilley, C. Nicholas, T. Bartkowiak, R. Ashvin, M.A. Curran, Generates Systemic Antitumor Immunity, 5 (2018) 676–684. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0049.Intratumoral.
- [104] A. Li, M. Yi, S. Qin, Y. Song, Q. Chu, K. Wu, Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy, *J. Hematol. Oncol.* 12 (2019) 1–12. doi:10.1186/s13045-019-0721-x.
- [105] Q. Chen, A. Boire, X. Jin, M. Valiente, E. Er, A. Lopez-Soto, L. Jacob, R. Patwa, H. Shah, K. Xu, J. Cross, J. Massague, Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer, *Nature*. 118 (2016) 6072–6078. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous.
- [106] L. He, X. Xiao, X. Yang, Z. Zhang, L. Wu, Z. Liu, STING signaling in tumorigenesis and cancer therapy: A friend or foe?, *Cancer Lett.* 402 (2017) 203–212. doi:10.1016/j.canlet.2017.05.026.
- [107] K.W. Ng, E.A. Marshall, J.C. Bell, W.L. Lam, cGAS–STING and Cancer: Dichotomous Roles in Tumor Immunity and Development, *Trends Immunol.* 39 (2018) 44–54. doi:10.1016/j.it.2017.07.013.
- [108] S.F. Bakhoun, L.C. Cantley, The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment, *Cell*. 174 (2018) 1347–1360. doi:10.1016/j.cell.2018.08.027.

- [109] S.F. Bakhoun, B. Ngo, A.M. Laughney, J. Cavallo, J. Murphy, P. Ly, P. Shah, R.K. Sriram, T.B.K. Watkins, K. Neil, M. Duran, C. Pauli, C. Shaw, K. Chadalavada, V.K. Rajasekhar, G. Genovese, S. Venkatesan, J. Nicolai, Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response, *Nature*. 553 (2018) 467–472. doi:10.1038/nature25432.Chromosomal.
- [110] Y. Bu, F. Liu, Q.-A. Jia, S.-N. Yu, Decreased Expression of TMEM173 Predicts Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma, *PLoS One*. 11 (2016) 11. doi:10.1371/journal.pone.0165681.
- [111] X. Qiao, S. Ding, F. Liu, G.L. Kucera, U. Bierbach, Investigating the cellular fate of a DNA-targeted platinum-based anticancer agent by orthogonal double-click chemistry, *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (2014) 415–426. doi:10.1007/s00775-013-1086-1.
- [112] S. Song, P. Peng, Z. Tang, J. Zhao, W. Wu, H. Li, M. Shao, L. Li, C. Yang, F. Duan, M. Zhang, J. Zhang, H. Wu, C. Li, X. Wang, H. Wang, Y. Ruan, J. Gu, Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13. doi:10.1038/srep39858.
- [113] D. Chandra, W. Tintaya, A. Jahangir, A. Adjei, I. Ramos, H. Sintim, J. Zhou, Y. Hayakawa, D. Karaolis, C. Gravekamp, STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer, *Cancer Immunol Res.* 9 (2014) 901–910. doi:10.1016/j.virol.2011.01.029.The.
- [114] T. Xia, H. Konno, J. Ahn, G. Barber, Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA-Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis, 118 (2016) 6072–6078. doi:10.1002/cncr.27633.Percutaneous.
- [115] Y. Li, H.L. Wilson, E. Kiss-Toth, Regulating STING in health and disease, *J. Inflamm.* 14 (2017) 11. doi:10.1186/s12950-017-0159-2.
- [116] X. Zhang, Y. Zhang, Y. Miao, H. Zhou, G. Jiang, E. Wang, TMEM17 depresses invasion and metastasis in lung cancer cells via ERK signaling pathway, *Oncotarget*. 8 (2017) 70685–70694. doi:10.18632/oncotarget.19977.
- [117] P. Doolan, M. Clynes, S. Kennedy, J.P. Mehta, S. Germano, C. Ehrhardt, J. Crown, L. O'Driscoll, TMEM25, REPS2 and Meis 1: Favourable prognostic and predictive biomarkers for breast cancer, *Tumor Biol.* 30 (2009) 200–209. doi:10.1159/000239795.
- [118] Y. Zhao, K. Song, Y. Zhang, H. Xu, X. Zhang, L. Wang, C. Fan, G. Jiang, E. Wang, TMEM17 promotes malignant progression of breast cancer via AKT/GSK3 β signaling, *Cancer Manag. Res.* 10 (2018) 2419–2428. doi:10.2147/CMAR.S168723.
- [119] S. Hrašovec, N. Hauptman, D. Glavač, F. Jelenc, M. Ravnik-Glavač, TMEM25 Is a Candidate Biomarker Methylated and Down-Regulated in Colorectal Cancer , *Dis. Markers*. 34 (2013) 93–104. doi:10.1155/2013/427890.
- [120] X. Zhou, N.C. Popescu, G. Klein, S. Imreh, The interferon- α responsive gene TMEM7 suppresses cell proliferation and is downregulated in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Genet. Cytogenet.* 177 (2007) 6–15. doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.04.007.
- [121] A. Hayez, J. Malaisse, E. Roegiers, M. Reynier, C. Renard, M. Haftek, V. Geenen, G. Serre, M. Simon, C.L. de Rouvroit, C. Michiels, Y. Poumay, High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization, *Exp. Dermatol.* 23 (2014) 339–344. doi:10.1111/exd.12403.

- [122] A. Hayez, E. Roegiers, J. Malaisse, B. Balau, C. Sterpin, TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis , Keratinization and Barrier Formation, (2016) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0147069.
- [123] J. Guo, L. Chen, N. Luo, W. Yang, X. Qu, Z. Cheng, Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells, *Oncol. Rep.* 33 (2015) 3124–3130. doi:10.3892/or.2015.3902.
- [124] W. Sun, G. Qiu, Y. Zou, Z. Cai, P. Wang, X. Lin, J. Huang, Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation , migration and invasion of glioma cells, *Int J Clin Exp Pathol.* 8 (2015) 12657–12667.
- [125] L. Flamant, E. Roegiers, M. Pierre, A. Hayez, C. Sterpin, O. De Backer, T. Arnould, Y. Poumay, C. Michiels, TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells., *BMC Cancer.* 12 (2012) 391. doi:10.1186/1471-2407-12-391.
- [126] A. Manawapat-Klopfer, L.T. Thomsen, P. Martus, C. Munk, R. Russ, H. Gmuender, K. Frederiksen, J. Haedicke-Jarboui, F. Stubenrauch, S.K. Kjaer, T. Iftner, TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions, *Am. J. Cancer Res.* 6 (2016) 1524–1536.
- [127] B.J. Thibodeau, D. Ph, M. Fulton, M. D, L.E. Fortier, M. S, T.J. Geddes, B. S, B.L. Pruetz, B. S, S. Ahmed, M.P. H, A. Banes-berceli, D. Ph, P.L. Zhang, D. Ph, G.D. Wilson, D. Ph, J. Hafron, M. D, Characterization of clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 34 (2016) 168.e1-168.e9. doi:10.1016/j.urolonc.2015.11.001.
- [128] V. Urquidi, S. Goodison, Y. Cai, Y. Sun, C. Rosser, A Candidate Molecular Biomarker Panel for the Detection of Bladder, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 21 (2012) 2149–2158. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0428.A.
- [129] A.P.G. Crijns, R.S.N. Fehrmann, S. De Jong, F. Gerbens, G.J. Meersma, H.G. Klip, H. Hollema, R.M.W. Hofstra, G.J.T. Meerman, E.G.E. De Vries, A.G.J. Van Der Zee, Survival-related profile, pathways, and transcription factors in Ovarian cancer, *PLoS Med.* 6 (2009) 0181–0193. doi:10.1371/journal.pmed.1000024.
- [130] X. Zhang, X. Yu, G. Jiang, Y. Miao, L. Wang, Y. Zhang, Y. Liu, C. Fan, X. Lin, Q. Dong, Q. Han, H. Zhao, Y. Han, X. Han, X. Rong, S. Ding, E. Wang, E. Wang, Cytosolic TMEM88 Promotes Invasion and Metastasis in Lung Cancer Cells by Binding DVLS, *Cancer Res.* 75 (2015) 4527–4537. doi:10.1158/0008-5472.can-14-3828.
- [131] G. Qiu, W. Sun, Y. Zou, Z. Cai, P. Wang, X. Lin, J. Huang, L. Jiang, X. Ding, G. Hu, RNA interference against TMEM97 inhibits cell proliferation, migration, and invasion in glioma cells, *Tumor Biol.* 36 (2015) 8231–8238. doi:10.1007/s13277-015-3552-6.
- [132] H. Ding, X. Gui, X. Lin, R. Chen, T. Ma, Y. Sheng, H. Cai, Y. Fen, The Prognostic Effect of MAC30 Expression on Patients With Non–Small Cell Lung Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy, *Technol. Cancer Res. Treat.* 16 (2017) 645–653. doi:10.1177/1533034616670443.
- [133] S. Yang, H. Li, Y. Liu, X. Ning, F. Meng, M. Xiao, D. Wang, G. Lou, Y. Zhang, Elevated expression of MAC30 predicts lymph node metastasis and unfavorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, *Med. Oncol.* 30 (2013). doi:10.1007/s12032-012-0324-7.

- [134] X. Zheng, J.L. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C.-C. Wu, V.S. LeBleu, R. Kalluri, Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer., *Nature*. 527 (2015) 525–530. doi:10.1038/nature16064.
- [135] S. Acharyya, T. Oskarsson, S. Vanharanta, S. Malladi, J. Kim, P.G. Morris, K. Manova-Todorova, M. Leversha, N. Hogg, V.E. Seshan, L. Norton, E. Brogi, J. Massagué, A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis, *Cell*. 150 (2012) 165–178. doi:10.1016/j.cell.2012.04.042.
- [136] J. Ni, P. Cozzi, J. Hao, J. Beretov, L. Chang, W. Duan, S. Shigdar, W. Delprado, P. Graham, J. Bucci, J. Kearsley, Y. Li, Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 2736–2748. doi:10.1016/j.biocel.2013.09.008.
- [137] L. Chang, P.H. Graham, J. Hao, J. Bucci, P.J. Cozzi, J.H. Kearsley, Y. Li, Emerging roles of radioresistance in prostate cancer metastasis and radiation therapy, *Cancer Metastasis Rev.* 33 (2014) 469–496. doi:10.1007/s10555-014-9493-5.
- [138] L. SIPOS, G. VON HEIJNE, Predicting the topology of eukaryotic membrane proteins, *Eur. J. Biochem.* 213 (1993) 1333–1340. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17885.x.
- [139] M.B. Ulmschneider, M.S.P. Sansom, Amino acid distributions in integral membrane protein structures, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1512 (2001) 1–14. doi:10.1016/S0005-2736(01)00299-1.
- [140] J.D. Brunner, N.K. Lim, S. Schenck, A. Duerst, R. Dutzler, X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase., *Nature*. 516 (2014) 207–212. doi:10.1038/nature13984.
- [141] J.P. Reyes, A. Huanosta-Gutiérrez, A. López-Rodríguez, A. Martínez-Torres, Study of permeation and blocker binding in TMEM16A calcium-activated chloride channels, *Channels*. 9 (2015) 88–95. doi:10.1080/19336950.2015.1027849.
- [142] Y.L. Ni, A.S. Kuan, T.Y. Chen, Activation and inhibition of TMEM16A calcium-activated chloride channels, *PLoS One*. 9 (2014) 4–6. doi:10.1371/journal.pone.0086734.
- [143] A. Picollo, M. Malvezzi, A. Accardi, TMEM16 proteins: Unknown structure and confusing functions, *J. Mol. Biol.* 427 (2015) 94–105. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.028.
- [144] E. Berglund, P. Akcakaya, D. Berglund, F. Karlsson, V. Vukojević, L. Lee, D. Bogdanović, W.O. Lui, C. Larsson, J. Zedenius, R. Fröbom, R. Bränström, Functional role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel DOG1/TMEM16A in gastrointestinal stromal tumor cells, *Exp. Cell Res.* 326 (2014) 315–325. doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.003.
- [145] W. Namkung, Z. Yao, W.E. Finkbeiner, A.S. Verkman, Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction, *FASEB J.* 25 (2011) 4048–4062. doi:10.1096/fj.11-191627.
- [146] W. Namkung, P.W. Phuan, A.S. Verkman, TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 2365–2374. doi:10.1074/jbc.M110.175109.

- [147] K. Miner, K. Labitzke, B. Liu, P. Wang, K. Henckels, K. Gaida, R. Elliott, J.J. Chen, L. Liu, A. Leith, E. Trueblood, K. Hensley, X.Z. Xia, O. Homann, B. Bennett, M. Fiorino, J. Whoriskey, G. Yu, S. Escobar, M. Wong, T.L. Born, A. Budelsky, M. Comeau, D. Smith, J. Phillips, J.A. Johnston, J.G. McGivern, K. Weikl, D. Powers, K. Kunzelmann, D. Mohn, A. Hochheimer, J.K. Sullivan, Drug repurposing: The anthelmintics niclosamide and nitazoxanide are potent TMEM16A antagonists that fully bronchodilate airways, *Front. Pharmacol.* 10 (2019). doi:10.3389/fphar.2019.00051.
- [148] F. Moretti, P. Bergman, S. Dodgson, D. Marcellin, I. Claerr, J.M. Goodwin, R. DeJesus, Z. Kang, C. Antczak, D. Begue, D. Bonenfant, A. Graff, C. Genoud, J.S. Reece-Hoyes, C. Russ, Z. Yang, G.R. Hoffman, M. Mueller, L.O. Murphy, R.J. Xavier, B. Nyfeler, TMEM41B is a novel regulator of autophagy and lipid mobilization, *EMBO Rep.* 19 (2018) e45889. doi:10.15252/embr.201845889.
- [149] X. Yu, X. Zhang, Y. Zhang, G. Jiang, X. Mao, F. Jin, Cytosolic TMEM88 promotes triple-negative breast cancer by interacting with Dvl, *Oncotarget.* 6 (2015). doi:10.18632/oncotarget.4379.
- [150] D.C. Fuhrmann, I. Wittig, B. Brüne, TMEM126B deficiency reduces mitochondrial SDH oxidation by LPS, attenuating HIF-1 α stabilization and IL-1 β expression, *Redox Biol.* 20 (2019) 204–216. doi:10.1016/j.redox.2018.10.007.
- [151] F. Moretti, P. Bergman, S. Dodgson, D. Marcellin, I. Claerr, J.M. Goodwin, R. DeJesus, Z. Kang, C. Antczak, D. Begue, D. Bonenfant, A. Graff, C. Genoud, J.S. Reece-Hoyes, C. Russ, Z. Yang, G.R. Hoffman, M. Mueller, L.O. Murphy, R.J. Xavier, B. Nyfeler, TMEM41B is a novel regulator of autophagy and lipid mobilization, *EMBO Rep.* 19 (2018) e45889. doi:10.15252/embr.201845889.
- [152] F. Ullrich, S. Blin, K. Lazarow, T. Daubitz, J.P. von Kries, T.J. Jentsch, Identification of TMEM206 proteins as pore of PAORAC/ASOR acid-sensitive chloride channels, *Elife.* 8 (2019) e49187.
- [153] D. Kihara, T. Shimizu, M. Kanehisa, Prediction of membrane proteins based on classification of transmembrane segments, *Protein Eng. Des. Sel.* 11 (1998) 961–970. doi:10.1093/protein/11.11.961.
- [154] Smart Servier Medical Art, (n.d.). <https://smart.servier.com>.
- [155] L.T. Khoo, L. Chen, Role of the cGAS–STING pathway in cancer development and oncotherapeutic approaches, *EMBO Rep.* 19 (2018) e46935. doi:10.15252/embr.201846935.

