

Université de Montréal

**L'immunoprotéasome :
producteur de peptides-CMH I et régulateur de l'expression génique**

**par
Danielle Angeline de Verteuil**

Programme de biologie moléculaire, option biologie des systèmes
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor
en biologie moléculaire
option biologie des systèmes

Janvier 2014

© Danielle Angeline de Verteuil, 2014

RÉSUMÉ

Le système ubiquitine-protéasome est le principal mécanisme par lequel les protéines intracellulaires sont dégradées. Le protéasome dit constitutif (PC) est donc essentiel à l'homéostasie mais aussi à la régulation de la majorité des processus cellulaires importants. La découverte d'un deuxième type de protéasome, appelé immunoprotéasome (IP), soulève toutefois de nouvelles questions. Pourquoi existe-t-il plus d'un type de protéasome ? L'IP a-t-il des rôles redondants ou complémentaires avec le PC ? L'IP étant présent principalement dans les cellules immunitaires ou stimulées par des cytokines, plusieurs groupes ont tenté de définir son rôle dans la réponse immunitaire. Or, l'implication de son homologue constitutif dans un éventail de processus non spécifiquement immunitaires nous laisse croire que l'IP pourrait lui aussi avoir un impact beaucoup plus large. L'objectif de cette thèse était donc de caractériser certains rôles cellulaires de l'IP dans les cellules dendritiques. Nous avons d'abord étudié l'impact global de l'IP sur la présentation antigénique de classe I. Ce faisant, nous avons pu déterminer ses deux contributions principales, soit l'augmentation drastique du nombre et de la diversité des peptides présentés sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I. Les différences de clivage entre le PC et l'IP pourraient expliquer en partie cette diversité du répertoire peptidique, notamment par l'affinité apparente de l'IP pour les régions protéiques non structurées. Dans un deuxième temps, nous avons dévoilé un nouveau rôle de l'IP sur un processus dépassant le cadre immunitaire : la transcription. Nous avons découvert que l'IP modifie l'abondance des ARNm en agissant principalement au niveau de leur synthèse. L'impact de l'IP sur le transcriptome est majeur et serait dû en partie à une dégradation différente de facteurs de transcription des familles IRF, STAT et NF- κ B. Les cellules dendritiques IP-déficientes activent moins efficacement les lymphocytes T CD8⁺ et nous croyons que cette défaillance est causée (du moins en partie) par la perturbation transcriptomique provoquée par l'absence d'IP. Il importe donc de comprendre les différents rôles moléculaires de l'IP afin de mieux définir sa contribution globale au fonctionnement de la cellule et comprendre l'avantage évolutif, au niveau de l'organisme, procuré par une telle plasticité du système ubiquitine-protéasome.

Mots-clés : immunoprotéasome, système ubiquitine-protéasome, présentation antigénique, complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), transcription, cellule dendritique

ABSTRACT

The ubiquitin-proteasome system is the major mechanism by which intracellular proteins get degraded. Constitutive proteasomes (CPs) are thus essential for cellular homeostasis but also to regulate the majority of important cellular processes. However, the discovery of a second type of proteasome, named immunoproteasome (IP), raises new questions. Why are there more than one type of proteasome? Does the IP perform redundant or complementary roles with the CP? The IP is predominantly expressed in immune or cytokine-stimulated cells and several groups worked at defining its role during the immune response. Yet, the implication of its constitutive homolog in a variety of processes suggests that the IP may also have a much broader impact. The objective was to characterize cellular roles of the IP in dendritic cells. We first studied the global impact of the IP on class I antigen presentation. We discovered that the IP drastically increases the number and the diversity of peptide presented by class I major histocompatibility complexes. Cleavage differences between the CP and the IP are likely part of the explanation for this peptide repertoire diversity, notably due to IP's apparent affinity for unstructured protein regions. Second, we discovered a new role for the IP in a process unrestricted to the immune system: transcription. We found that the IP affects transcript abundance mostly at the level of mRNA synthesis. The impact of IPs on the transcriptome is major and would be partly based on a different degradation of IRF, STAT and NF- κ B transcription factor family members by the two types of proteasomes. IP-deficient dendritic cells are less potent activators of CD8⁺ T cells and we believe that this defect is at least partly caused by the transcriptome alterations induced by the absence of IPs. It is therefore important to understand the different molecular roles of the IP in order to better define its global contribution to cellular functions and to understand the evolutionary advantage, at the level of the organism, brought by such plasticity of the ubiquitin-proteasome system.

Keywords : immunoproteasome, ubiquitin-proteasome system, antigen presentation, major histocompatibility complexes of class I (MHC I), transcription, dendritic cell

Table des matières

RÉSUMÉ	ii
ABSTRACT.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xvii
CHAPITRE 1	1
1 Introduction.....	2
1.1 Système immunitaire adaptatif.....	3
1.1.1 Évolution et système immunitaire adaptatif.....	3
1.1.2 Principaux constituants de l'immunité adaptative : les lymphocytes	4
1.1.2.1 Lymphocytes B	4
1.1.2.2 Lymphocytes T.....	6
1.1.3 Cellules dendritiques.....	8
1.1.3.1 Activation des cellules dendritiques.....	8
1.1.3.2 Fonctions des cellules dendritiques	9
1.1.3.3 Sous-types de cellules dendritiques	11
1.1.4 Présentation antigénique	13
1.1.4.1 Présentation antigénique de classe I	13
1.1.4.2 Présentation antigénique de classe II, présentation croisée et autres mécanismes de présentation	15
1.1.4.3 Immunoprotéasome : co-évolution entre immunité et homéostasie ?	17
1.2 Système ubiquitine-protéasome.....	17
1.2.1 Fonction et impact.....	17
1.2.1.1 Protéasome et cancer.....	18
1.2.1.2 Maladies associées à une diminution de l'activité protéolytique.....	19
1.2.2 Ciblage pour la dégradation	20

1.2.2.1 Ubiquitylation des protéines	20
1.2.2.2 Conséquences liées à l'ubiquitylation : différents signaux, différents destins ...	21
1.2.2.3 Déubiquitylation et régulation des pools d'ubiquitine.....	22
1.2.3 Constituants du protéasome	24
1.2.3.1 Protéasome 20S.....	24
1.2.3.2 Particules régulatrices	24
1.3 Immunoprotéasome	26
1.3.1 Conservation et diversité du protéasome 20S	27
1.3.2 Dynamique du protéasome.....	28
1.3.2.1 Expression et régulation du PC et de l'IP	28
1.3.2.2 Assemblage des sous-unités et types de protéasome 20S	30
1.3.2.3 Localisation intracellulaire.....	31
1.3.3 Fonctions connues ou suggérées de l'immunoprotéasome et objectif général	33
1.4 Références bibliographiques.....	35
CHAPITRE 2	53
2 Deletion of Immunoproteasome Subunits Imprints on the Transcriptome and Has a Broad Impact on Peptides Presented by Major Histocompatibility Complex I molecules	54
2.1 Présentation de l'article	55
2.2 Contribution des co-auteurs.....	56
2.3 Abbreviations.....	57
2.4 Summary.....	58
2.5 Introduction	59
2.6 Experimental procedures	61
2.7 Results	66
2.7.1 Experimental design of peptidomic studies	66
2.7.2 The MIP repertoire of DCs conceals a unique signature.....	66
2.7.3 IPs increase the abundance and diversity of MIPs at the surface of DCs	69
2.7.4 IPs have specific cleavage preferences.....	71
2.7.5 IPs have a non-redundant impact on the transcriptome of DCs.....	73
2.8 Discussion.....	76

2.9 Acknowledgements.....	79
2.10 Footnotes	80
2.11 Supplementary material	81
2.11.1 Supplemental figure.....	81
2.11.2 Supplemental tables.....	81
2.12 Bibliography	92
 CHAPITRE 3	 107
3 Immunoproteasomes Shape the Transcriptome and Regulate the Function of Dendritic Cells	108
3.1 Présentation de l'article	109
3.2 Contribution des co-auteurs.....	110
3.3 Summary.....	111
3.4 Highlights	112
3.5 Introduction	113
3.6 Results	115
3.6.1 The effect of IPs on gene expression is cell-autonomous and differentiation stage- dependent.....	115
3.6.2 Relationship between proteasome subunits and differential gene expression	116
3.6.3 IPs do not affect mRNA stability and have a minimal influence on mRNA maturation	118
3.6.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs	119
3.6.5 Variations in histone monoubiquitylation cannot explain the impact of IPs on the transcriptome	122
3.6.6 STAT, IRF and NF- κ B signaling pathways are perturbed in IP-deficient DCs	123
3.6.7 IP-deficiency affects key DC genes and functions.....	126
3.6.8 dKO DCs are functionally deficient <i>in vivo</i>	128
3.7 Discussion.....	129
3.8 Experimental procedures	132
3.9 Acknowledgements.....	134
3.10 Supplementary material.....	135

3.10.1 Supplemental figures	135
3.10.2 Supplemental tables.....	140
3.10.3 Extended experimental procedures	191
3.11 Bibliography	199
CHAPITRE 4.....	208
4. Discussion.....	209
4.1 Rôles cellulaires de l'IP.....	210
4.1.1 Présentation antigénique de classe I.....	210
4.1.1.1 L'IP augmente le nombre et la diversité des peptides sur les CMH I.....	211
4.1.1.2 L'IP clive préférentiellement dans des régions protéiques non-structurées.....	212
4.1.2 Transcription.....	213
4.1.2.1 L'IP affecte la stabilité de certains facteurs de transcription	213
4.1.2.2 L'IP et le PC affectent de façon non-redondante un nombre considérable de transcrits.....	214
4.1.3 Autres rôles potentiels	216
4.2 Ciblage des substrats par le PC et l'IP.....	217
4.2.1 Reconnaissance dépendante de l'activité protéolytique.....	218
4.2.2 Reconnaissance indépendante de l'activité protéolytique.....	219
4.2.3 Un rôle 20S-indépendant pour les sous-unités catalytiques ?.....	220
4.3 Pourquoi plusieurs types de protéasome ?.....	221
4.3.1 L'IP : oui, mais pas trop	222
4.3.2 Rôles non-redondants des différentes sous-unités de l'IP.....	222
4.3.3 Plasticité du système ubiquitine-protéasome	223
4.4 Maladies impliquant l'IP	224
4.4.1 L'IP et les virus.....	225
4.4.2 L'IP et les maladies chroniques	226
4.4.3 Potentiel bénéfique de l'IP hors du contexte immunitaire	227
4.5 Conclusion.....	228
4.6 Références bibliographiques.....	230

ANNEXE I.....	A-i
AI Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides.....	A-ii
AI.1 Contribution des co-auteurs.....	A-iii
AI.2 Abstract.....	A-iv
AI.3 Background	A-v
AI.4 The nature and role of the immune self recognized by CD8 T cells	A-vii
AI.5 A synopsis of MHC I processing – making the most out of misbegotten polypeptides	A-viii
AI.6 Different types of proteasomes generate different MIP repertoires	A-ix
AI.7 The SMII is complex and is not a representative excerpt from the proteome.....	A-x
AI.8 The SMII conceals a tissue-specific signature.....	A-xii
AI.9 Neoplastic transformation has a broad impact on the SMII.....	A-xii
AI.10 Viral infection causes presentation of cryptic self MIPs	A-xiv
AI.11 The SMII conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation..	A-xiv
AI.12 The immunogenicity of neo-MIPs.....	A-xv
AI.13 The complexity and plasticity of the SMII – A challenge for self tolerance.....	A-xvi
AI.13.1 Neo-self MIPs induced by infection	A-xvii
AI.13.2 Neo-self MIPs induced by metabolic disturbances.....	A-xvii
AI.14 The MHC class II immunopeptidome	A-xvii
AI.15 Perspective – toward a more comprehensive definition of the immune self.....	A-xix
AI.16 Take-home messages	A-xx
AI.17 Acknowledgements	A-xxi
AI.18 Bibliography.....	A-xxii

Liste des figures

Figure 1.1 Rôle des anticorps.....	5
Figure 1.2 Cellule T $\alpha\beta$	6
Figure 1.3 Développement des sous-types de cellules dendritiques.....	11
Figure 1.4 Différents modes de présentation antigénique.....	14
Figure 1.5 Le protéasome, un gourmet.....	18
Figure 1.6 Ubiquitylation des protéines.....	21
Figure 1.7 Fonctions générales des DUBs.....	23
Figure 1.8 Composition du protéasome 26S.....	25
Figure 1.9 Types de protéasome 20S chez les vertébrés.....	28
Figure 1.10 Assemblage du protéasome	31
Figure 2.1 Design of peptidomic studies and characterization of DC populations	67
Figure 2.2 The MIP repertoire conceals a cell-type specific signature.....	68
Figure 2.3 IPs increase the abundance and diversity of MIPs	70
Figure 2.4 IPs have specific cleavage preferences.....	72
Figure 2.5 IPs imprint on the transcriptome	74
Figure 2.S1 dKO DCs are able to activate T cells but are less efficient than WT DCs	81
Figure 3.1 Gene expression changes are cell-autonomous	115
Figure 3.2 Relationship between proteasomes and differential gene expression	117
Figure 3.3 IPs globally do not affect mRNA stability or maturation.....	119
Figure 3.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs	121
Figure 3.5 The broad gene expression changes cannot be explained by variations in histone monoubiquitylation.....	122
Figure 3.6 STAT, IRF and NF- κ B pathways are perturbed in IP-deficient DCs.....	124
Figure 3.7 Presence of IPs is important to maintain DC functional integrity.....	127
Figure 3.S1 related to Figure 3.2	136
Figure 3.S2 related to Figure 3.4	137
Figure 3.S3 related to Figure 3.5	138
Figure 3.S4 related to Figure 3.6	139
Figure AI.1 Plasticity of the SMII.....	A-xv

Liste des tableaux

Table 2.1. Top most overexpressed MIPs in WT relative to dKO DCs	75
Table 2.S1. Total list of MHC I-peptides detected on DCs.....	81
Table 2.S2. Pathways enriched in MIP source genes from DCs and thymocytes.....	82
Table 2.S3. DC- or immune-related function of genes differentially expressed in WT vs. dKO DCs	83
Table 2.S4. Complete list of genes differentially expressed in WT vs. dKO DCs	86
Table 3.S1. Immunoproteasome subunits are differentially expressed in various cancer types	140
Table 3.S2. List of regulators predicted by Ingenuity Pathway Analysis for each differentially expressed gene cluster	141
Table 3.S3. Correlation between mRNA expression and z-score values for each predicted regulator	155
Table 3.S4. GO-term enrichment analysis of regulators identified by Ingenuity Pathway Analysis	158
Table 3.S5. List of biological processes significantly enriched within differentially expressed gene clusters.....	172
Table 3.S6. List of genes differentially expressed between WT and dKO and associated to the inflammatory and/or antiviral responses.....	186
Table 3.S7. Primers used for qPCR experiments.....	189
Table AI.1. MS-based studies of human MIPs	A-v
Table AI.2. MS-based studies of mouse MIPs.....	A-vii
Table AI.3 Representative examples of autoantibodies associated with specific MHC II alleles	A-xviii

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AID : déaminase induite par activation

APOBEC3 : enzyme d'édition de l'ARNm apolipoprotéine B, polypeptide catalytique 3

ARE : élément de réponse antioxydant

ATP : adénosine triphosphate

ARN : acide ribonucléique

β 2m : β_2 -microglobuline

BCR : récepteur de cellule B

CCL : ligand chimiokine à motif C-C

CCR : récepteur de chimiokine à motif C-C

CD : marqueur de surface cellulaire (*cluster of differentiation*)

CD40L : ligand du récepteur CD40

cDC : cellule dendritique classique

CDP : précurseur commun de cellules dendritiques

CIITA : transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CTL : lymphocyte T cytotoxique

CTLA4 : antigène de lymphocyte T cytotoxique 4

DCIR2 : récepteur inhibiteur de cellule dendritique 2

dKO : double knockout pour les sous-unités *Lmp7* et *Mecl1* de l'immunoprotéasome

DUB : enzyme déubiquitylase

EAE : encéphalomyélite autoimmune expérimentale

ERAD : dégradation associée au réticulum endoplasmique

ERAP1 : aminopeptidase du réticulum endoplasmique 1

ERp57 : protéine du réticulum endoplasmique 57

E.S. : erreur standard

FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*U.S. Food and Drug Administration*)

FOXP3 : protéine à boîte de type tête de fourche P3

FRET : transfert d'énergie par résonance de type Förster, ou de fluorescence
GFP : protéine fluorescente verte
HBV : virus de l'hépatite B
HECT : homologue au domaine COOH-terminal de E6-AP
HLA : antigène de leucocyte humain
HSC : cellule souche hématopoïétique
GM-CSF : facteur de stimulation de colonies de granulocytes et de macrophages
IAV : virus de l'influenza A
ICAM1 : molécule d'adhésion intracellulaire 1
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
iNOS : synthase inductible d'oxyde nitrique
IP : immunoprotéasome
JAMM : métalloenzyme JAB1/MPN/MOV34
LAG3 : gène activateur de lymphocyte 3
LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
LMP: polypeptide de petite masse moléculaire
MCMV : cytomégalovirus murin
M-CSF : facteur de stimulation de colonies de macrophages
MECL1 : sous-unité du complexe endopeptidase multicatalytique 1
MDM2 : ubiquitine ligase E3 (*mouse double minute 2*)
MDP : précurseur de macrophages et de cellules dendritiques
MJD : domaine Machado-Josephin
NF- κ B : facteur nucléaire kappa-B
OTU : protéase de tumeur ovarienne
p53 : protéine tumorale 53
PA28 : activateur de protéasome 28
PAC : chaperonne d'assemblage du protéasome
PACE : élément en *cis* activant le promoteur

PDIA3 : associée à la protéine disulfide isomérase 3
PC : protéasome constitutif
PGE2 : prostaglandine E2
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
PMA : phorbol myristate acetate
PML : oncoprotéine de la leucémie promyélocytaire
POMP : protéine de maturation du protéasome
PRR : récepteur de reconnaissance de motifs
PSMD : sous-unité non-ATPase du protéasome 26S (dans la particule régulatrice 19S)
RAR α : récepteur d'acide rétinoïque alpha
RING : domaine structural de type doigt de zinc (*really interesting new gene*)
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
RPL : protéine de la grande sous-unité du ribosome
RPS : protéine de la petite sous-unité du ribosome
RPT : particule régulatrice triple-A du protéasome
RPN : particule régulatrice non-ATPase du protéasome
RT-qPCR : transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase quantitative
sKO : simple knockout pour l'une des trois sous-unité de l'immunoprotéasome
shRNA : petits ARNs en épingle à cheveux
TAP : transporteur associé à la présentation antigénique
TCR : récepteur de cellule T
TGF : facteur de croissance de transformation
T_H : cellule T auxiliaire (*helper T cell*)
TipDC : cellule dendritique productrice de TNF et d'iNOS
TIR : domaine Toll / récepteur d'interleukine-1
tKO : triple knockout pour les sous-unités de l'immunoprotéasome (*Lmp2, Mecl1 et Lmp7*)
TLR : récepteurs de type Toll
TNF : facteur de nécrose tumorale
Treg : cellule T régulatrice
TRIF : adaptateur inducteur d'interféron β contenant un domaine TIR

UBL : molécule de type ubiquitine
UCH : hydrolase C-terminale d'ubiquitine
UMP1 : protéolyse dépendante de l'ubiquitine 1
USP : protéase spécifique à l'ubiquitine
VCAM1 : molécule d'adhésion de cellule vasculaire 1
VCP : protéine contenant la valosine
VDJ : segments variable, de diversité and joignant
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VLR : récepteur variable de lymphocyte
WT : type sauvage

« The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' but 'That's funny...' » -Isaac Asimov

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Claude Perreault, à la fois pour sa confiance et son ouverture d'esprit, la rigueur de son enseignement et sa sagesse de mentor et qui, sans me diriger, m'a aidé à me guider moi-même à différents niveaux. Merci aussi à mes collègues, présents ou passés, qui ont toujours été de bons conseillers et des modèles, pour leur support scientifique et surtout moral. Vous garderez toujours une place spéciale dans ma mémoire. Un merci particulier à Caroline, ma compagne du matin, pour son écoute et ses encouragements dans tout ce que j'ai entrepris et à Alexandre, membre permanent de l'équipe immunoprotéasome. Merci mille fois aux membres de l'IRIC qui m'ont aidé dans différents aspects de mes projets.

Merci à mon entourage, notamment à Marisol et Marie-Ève, pour leur soutien, leurs critiques (toujours constructives) et leur compréhension; à mes parents, frères, oncles et tantes qui m'ont encouragé à diverses étapes de mes efforts au cours des dernières années et particulièrement à mon amoureux et complice Mathieu, pour sa patience et son soutien dans les périodes difficiles.

Merci aux membres de mon comité de suivi et/ou pré-doctoral, Dre Sylvie Lesage, Dre Sylvie Mader et Dr Alain Lamarre pour leurs précieux conseils ainsi qu'aux membres de mon comité de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Dre Sylvie Lesage (merci deux fois !), Dr Alain Verreault et Dr Joaquín Madrenas.

Merci aux Programmes de Biologie Moléculaire et à la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, au Fond de Recherche du Québec en Santé, aux Instituts de Recherche en Santé du Canada et à la fondation Cole pour leur soutien financier.

Enfin, merci à Serge Léger, qui m'a donné l'étincelle au moment où tout a commencé.

Avant-propos

Le système ubiquitine-protéasome est le principal mécanisme par lequel les protéines intracellulaires sont dégradées. Le protéasome constitutif (PC) est donc essentiel à l'homéostasie cellulaire mais aussi à la régulation de divers processus cellulaires importants. Notamment, le PC agit comme élément crucial de la réponse immunitaire en permettant aux cellules présentatrices d'antigène d'échantillonner l'environnement : les peptides produits par le protéasome sont présentés à la surface cellulaire à titre de signaux reconnus pour le système immunitaire. Or, l'existence d'un deuxième type de protéasome, appelé immunoprotéasome (IP), représente une grande énigme à la fois en immunologie et en biologie moléculaire. Présent strictement chez les vertébrés et dans des contextes environnementaux particuliers, l'IP soulève plusieurs questions : pourquoi existe-t-il plus d'un type de protéasome ? Ont-ils des rôles redondants ou complémentaires ? Quel est l'avantage évolutif que procure ce deuxième type de protéasome ? C'est dans ce contexte que j'ai entrepris de développer ma thèse autour de ce sujet intrigant qu'est l'IP.

Objectif et plan de thèse

L'objectif de cette thèse est de caractériser les rôles cellulaires de l'IP afin de mieux comprendre son impact dans l'organisme. L'ouvrage est divisé en quatre chapitres et une annexe. Le premier chapitre vise à mettre en contexte notre sujet dans le cadre du système immunitaire adaptatif, de développer sur le mécanisme d'action du système ubiquitine-protéasome et de faire état de nos connaissances actuelles sur l'IP.

Dans l'article présenté au chapitre 2, nous répondons à la question suivante : quel est l'impact global de l'IP sur la production de peptides liant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ? Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de spectrométrie de masse à grande échelle nous permettant de séquencer et quantifier de façon relative l'ensemble des peptides liés au CMH I sur des cellules dendritiques dérivées de souris de type sauvage (WT) et des cellules dérivées de souris déficientes en deux des sous-unités catalytiques de l'IP (dKO). Des analyses bioinformatiques nous ont permis de pousser plus loin l'analyse en caractérisant les préférences de clivage de l'IP et du protéasome constitutif (PC). Enfin, nous notons dans ce projet la première observation concrète que l'absence de l'IP affecte le transcriptome des cellules.

Dans l'article présenté au chapitre 3, nous répondons à une question soulevée au chapitre précédent : quel est le rôle de l'IP sur la modulation du transcriptome ? Plusieurs approches de quantification de l'ARNm ont été utilisées dans les cellules dendritiques WT et dKO (qPCR en temps réel et séquençage) afin de déterminer 1) à quel niveau l'abondance des ARNm est régulé (synthèse, maturation ou dégradation) et 2) l'ampleur du rôle de l'IP sur cette abondance (nombre de gènes affectés et effet selon l'état de maturation de la cellule). Enfin, nous avons cherché à évaluer l'impact potentiel de l'IP sur la fonction des cellules dendritiques *in vivo*, particulièrement sur leur rôle en tant qu'activatrices des lymphocytes T.

Cet ouvrage se termine au chapitre 4 avec une discussion des résultats obtenus et des questions soulevées par rapport au mécanisme d'action de l'IP et à sa fonction dans l'organisme. En dernier lieu, l'Annexe I contient une revue de littérature sur nos connaissances du domaine fascinant de l'immunologie qu'est l'origine et la plasticité des peptides présentés sur les CMH I. Cette parenthèse fait référence au rôle de l'IP sur la présentation antigénique décrit au chapitre 2 et permet de comprendre que l'IP n'est que l'un des nombreux éléments forgeant le répertoire de peptides reconnus par notre système immunitaire.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1 Introduction

Historiquement, l'immunoprotéasome (IP) a toujours été fortement associé au système immunitaire. En effet, sa découverte survint au moment même où se dévoilait l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la production des antigènes. Biologiquement, la forte association de l'IP avec cette même réponse immunitaire tient autant du fait de la localisation chromosomique de certains de ses constituants, au beau milieu d'un groupe de gènes associés à la présentation antigénique, que de l'expression ciblée de ses sous-unités dans des tissus et des conditions environnementales immuns. Il a donc semblé naturel de débiter cet ouvrage en mettant d'abord en contexte le système immunitaire et plus précisément les principaux joueurs impliqués dans l'immunité adaptative. Notamment, nous traiterons de la cellule dendritique en tant que cellule importante dans la réponse immunitaire mais aussi en tant que modèle principal utilisé dans nos travaux. Suivra la section 1.2, où seront décrits plus en détail les composants de la voie ubiquitine-protéasome. Nous terminerons, dans la section 1.3, avec la dynamique de l'expression, de l'assemblage et de la localisation des unités catalytiques du protéasome constitutif (PC) et de l'IP. L'objectif de cette finale : mener le lecteur à mieux comprendre la complexité et l'impact potentiellement large de l'IP, au-delà du contexte de la réponse immunitaire.

1.1 Système immunitaire adaptatif

L'IP, notre sujet d'étude principal, est important dans le contexte immunitaire adaptatif. Dans la présente section, nous ferons donc un survol du système immunitaire adaptatif et des principaux joueurs impliqués. Notamment, nous étudierons les lymphocytes et certains de leurs activateurs, les cellules dendritiques, qui représentent aussi le modèle cellulaire utilisé pour les travaux présentés dans cette thèse. Enfin, nous terminerons avec une description de la voie de présentation antigénique, mécanisme important pour la fonction des cellules dendritiques et où le protéasome joue un rôle crucial.

1.1.1 Évolution et système immunitaire adaptatif

L'un des principes fondamentaux à la survie d'un organisme est sa capacité à discriminer le soi du non-soi. Chaque espèce a évolué avec des mécanismes adaptés à sa physiologie et à la nature de ce à quoi elle a du faire face et conséquemment, la composition du système immunitaire varie en fonction des espèces¹. L'activation de l'immunité innée est basée sur la reconnaissance de motifs par des récepteurs (les PRRs). Les motifs reconnus sont des structures moléculaires invariables, spécifiques et essentiels aux micro-organismes et chaque PRR peut reconnaître une diversité de structures avec un motif semblable¹. L'activation du système immunitaire inné via ces PRRs engendre entre autres la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, une vasodilatation et une perméabilisation des vaisseaux sanguins. Ceci permet le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection, l'activation de la cascade du complément, un ensemble de pro-enzymes stimulant la réponse immunitaire, et la sécrétion d'autres molécules qui mènent à l'opsonisation et la phagocytose des pathogènes, principalement par les macrophages et les neutrophiles, deux types de phagocytes¹.

La branche des vertébrés, en plus de l'immunité innée, a vu naître un système de défense beaucoup plus complexe : l'immunité adaptative. Bien qu'elle partage certains joueurs avec l'immunité innée et que leurs constituants respectifs fonctionnent de façon coopérative durant la réponse immunitaire¹, le système adaptatif est pilonné par deux grands concepts : la spécificité et la mémoire (quoique l'association stricte de ces caractéristiques au système adaptatif commence à être remise en question²). La spécificité de la reconnaissance des pathogènes est entre autres possible grâce à la recombinaison somatique chez les lymphocytes. Ce mécanisme implique un réarrangement génomique, cellule indépendante, de la région codant pour les fragments VDJ (variable, de diversité, joignant) des récepteurs de lymphocytes T (TCR) et

B (BCR)³. Par conséquent, chaque cellule T et B est à même d'exprimer un type de récepteur unique et clonogénique et l'ensemble du répertoire de TCRs et BCRs dans l'organisme permet la reconnaissance d'une incroyable diversité de pathogènes. Ce système est bien décrit chez les vertébrés à mâchoire, mais de récentes études ont démontré que la lamproie et la myxine, des vertébrés sans mâchoire, possèdent aussi des cellules de type lymphocyte exprimant des récepteurs apparentés aux TCRs et BCRs, appelés VLRs (récepteurs variables de lymphocytes)⁴. Or, la structure des VLRs, leurs gènes sources et le mécanisme responsable de leur diversité diffèrent des TCRs et BCRs⁴⁻⁶. Cela suggère une évolution convergente du phénomène chez ces deux branches phylogéniques, entre autres à partir de la machinerie de réparation de l'ADN, un mécanisme à la base du réarrangement des récepteurs^{6,7}. Cette évolution convergente témoigne de l'avantage évolutif que procure la spécificité des récepteurs dans l'immunité adaptative.

La deuxième caractéristique du système immunitaire adaptatif est sa capacité à produire des cellules dites « mémoire ». Suivant une infection, l'activation du système immunitaire mène à la transformation de cellules T et B naïve à la fois en cellules effectrices et en cellules mémoires. Ces dernières acquièrent des propriétés effectrices accrues par rapport aux cellules naïves, permettant une réponse beaucoup plus rapide, spécifique et de grande amplitude suivant une deuxième stimulation avec le pathogène^{8,9}.

La spécificité et la mémoire du système immunitaire adaptatif sont donc maintenus par deux types cellulaires principaux : les lymphocytes T et B. Les organes lymphoïdes primaires, le thymus et la moelle osseuse, permettent de procurer un microenvironnement propice au développement et d'assurer un contrôle de qualité des lymphocytes (sélection positive de cellules reconnaissant un antigène et sélection négative de cellules auto-réactives), alors que les organes lymphoïdes secondaires, rate et ganglions lymphatiques, permettent de réguler l'efficacité de la réponse immunitaire (production de cellules mémoire ou délétion) en périphérie⁶.

1.1.2 Principaux constituants de l'immunité adaptative : les lymphocytes

1.1.2.1 Lymphocytes B

Les cellules B sont produites dans la moelle osseuse et se développent grâce aux interactions avec les cellules et les cytokines présentes dans le stroma, puis migrent dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques pour leur maturation finale¹⁰. La reconnaissance d'un antigène soluble par le lymphocyte B se fait via

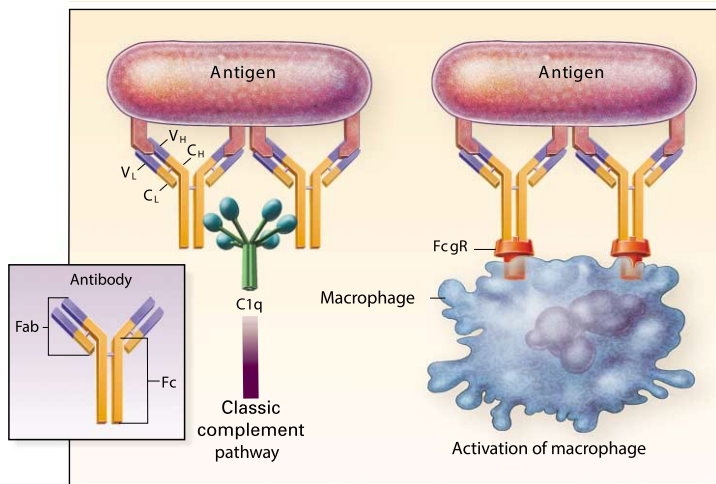


Figure 1.1 Rôles des anticorps. Le BCR et sa version soluble, l'immunoglobuline (Ig ou anticorps), sont composés de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. La portion Fab reconnaît spécifiquement l'antigène alors que le fragment Fc permet la fonction effectrice de la molécule. Ici, la liaison de l'Ig à un antigène active la cascade du complément (gauche) ou se lie au récepteur à Fc d'un macrophage (droite) pour être ultimement phagocyté. Reproduit avec permission de Delves PJ et Roitt IM ¹¹, copyright Massachusetts Medical Society (2000).

le récepteur BCR, formé d'un assemblage de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. À l'extrémité du complexe se trouve une région variable responsable de la reconnaissance spécifique de l'antigène. C'est cette région qui subit une recombinaison somatique afin de produire un récepteur unique pour chacune des cellules B.

Suivant son activation, par la reconnaissance d'un antigène via le BCR et par l'intermédiaire de cellules T auxiliaires (voir section suivante), la cellule B se divise par expansion clonogénique puis se différencie en cellule mémoire ou en plasmocyte⁹. Dans cette dernière, un changement dans l'épissage des transcrits codant pour les BCRs permet la production de récepteurs solubles, les immunoglobulines (Igs ou anticorps)¹². Les Ig ainsi sécrétées agiront à titre de signaux : la région « Fab » liant l'antigène avec même spécificité que le BCR d'origine, et la portion restante (fragment « Fc ») permettant l'action effectrice (voir figure 1.1). Le rôle de cette dernière portion consiste à activer la cascade du complément de l'immunité innée, activer les cellules immunitaires possédant un récepteur à Fc (entre autres pour favoriser la phagocytose et la cytolyse) et/ou permettre le transport de l'Ig à travers la membrane épithéliale (par exemple pour le transfert de la mère au fœtus)¹³. Alors que la recombinaison somatique permet de varier la spécificité de reconnaissance des antigènes de chaque BCR, durant la réponse immunitaire, la présence de certaines cytokines et du ligand de CD40 pousse les cellules B à moduler la fonction effectrice (portion Fc) de leurs Igs. Cela permet de passer de la sécrétion d'IgM aux IgG, IgA ou IgE (phénomène appelé commutation isotypique), chacune ayant une fonction effectrice propre, ce qui contribue à la diversité de la réponse immunitaire adaptative¹⁴.

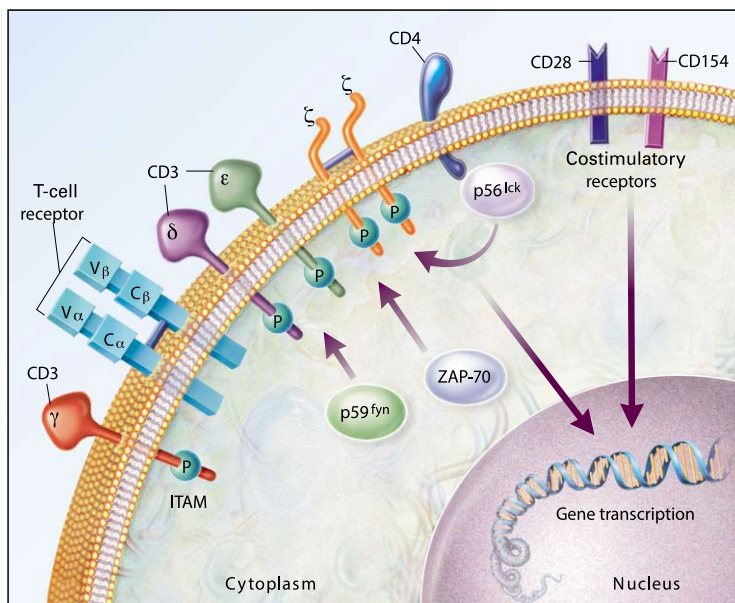


Figure 1.2 Cellule T $\alpha\beta$. La cellule T reconnaît l'antigène par son TCR, formé d'une chaîne α et d'une chaîne β chacune ancrée dans la membrane plasmique. La transduction du signal d'activation se fait par la portion intracellulaire des différentes molécules CD3 associés au TCR. Les co-récepteurs CD4 (cellule T auxiliaire) et CD8 (cellule T cytotoxique, non illustré) permettent de stabiliser l'interaction entre le TCR et le complexe formé de l'antigène et du CMH de classe II ou I, respectivement. D'autres molécules de co-stimulation comme CD28 et CD154 (aussi appelé CD40L) sont aussi nécessaire à l'activation de la cellule T : l'activation du TCR indépendamment de ces co-activateurs peut mener à l'anergie ou l'apoptose de la cellule. Reproduit avec permission de Delves PJ et Roitt IM¹¹, copyright Massachusetts Medical Society (2000).

1.1.2.2 Lymphocytes T

Deux types de récepteurs spécifiques aux antigènes peuvent être exprimés par les cellules T, chacun comportant deux chaînes distinctes : les TCRs $\alpha\beta$ et les TCRs $\gamma\delta$. Ceux-ci contiennent une région variable qui reconnaît l'antigène et une région constante ancrée dans la membrane plasmique (voir figure 1.2). Contrairement aux cellules B, les lymphocytes T $\alpha\beta$ ne reconnaissent pas les antigènes sous forme soluble mais en fragments protéiques de longueur variable. Ces peptides sont présentés à la surface cellulaire, liés à des récepteurs membranaires appelés complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)¹⁵. Or, les lymphocytes T doivent savoir différencier les peptides antigéniques, provenant de pathogènes ou de cellules anormales, des peptides provenant de protéines normales du soi. Les cellules T $\gamma\delta$ représentent environ 1-10% des lymphocytes T dans le sang périphérique¹⁶. Le rôle de ces cellules T atypiques reste encore à définir mais elles pourraient reconnaître des ligands différents des cellules T $\alpha\beta$, notamment des peptides phosphorylés ou des lipides. Pour simplifier la suite de cette thèse, nous allons nous concentrer uniquement sur les cellules T $\alpha\beta$ typiques et la mention générale de lymphocytes T réfèrera à ces derniers.

Originaires de la moelle osseuse, le développement et la sélection des lymphocytes T appropriés se fait durant leur séjour dans le thymus. Ce passage comprend une série de transformations incluant le réarrangement de leur TCR par recombinaison somatique¹⁷. Les lymphocytes immatures subissent aussi deux étapes importantes : 1) la sélection positive, dans le cortex, qui permet de ne conserver que les lymphocytes T pouvant entrer en interaction avec les complexes peptide/CMH via leur TCR et 2) la sélection négative, dans la médulla, qui permet d'éliminer les lymphocytes ayant une trop forte affinité pour les CMH associés à des peptides du soi¹⁷. À chaque étape, les lymphocytes T ayant failli sont éliminés par apoptose. Ce faisant, le cheminement dans le thymus permet d'éliminer les cellules T inutiles (incapables de reconnaître un complexe peptide/CMH) et dangereux (pouvant potentiellement induire une réaction autoimmunitaire).

Différents types de lymphocytes T existent, caractérisés selon la présence des co-récepteur CD4 ou CD8 et ayant des fonctions effectrices particulières. Les cellules T CD8⁺ s'associent aux peptides présentés sur les CMH de type I, présents sur toute cellule nucléée de l'organisme (voir section 1.1.4). Advenant l'interaction du TCR avec un peptide reconnu comme étant du « non-soi », i.e. pour lequel le lymphocyte n'aurait pas été sélectionné négativement dans le thymus (ou été toléré par d'autres mécanismes en périphérie), la cellule T CD8⁺ s'active, prolifère et se différencie en cellules mémoires et en cellules T cytotoxiques (CTL). Ces dernières provoquent la destruction des cellules présentant le peptide en question par deux mécanismes¹⁸ : 1) l'activation du récepteur FAS de la cellule cible par son ligand (FASL) sur le CTL et 2) la sécrétion de perforines et de granzymes par le CTL, les premières formant des pores dans la membrane de la cellule cible pour permettre l'entrée des secondes. Les deux mécanismes induisent l'activation des caspases et l'apoptose de la cellule cible¹⁸.

De son côté, la cellule T CD4⁺ est aussi appelée auxiliaire (ou T_H, pour *helper T cell*). Après son activation, par liaison d'un peptide présenté sur un CMH de class II à la surface d'une cellule dite présentatrice d'antigène (voir section 1.1.4), celle-ci peut initier et maintenir l'activité effectrice à la fois des CTLs, des lymphocytes B et de cellules du système immunitaire inné¹. Différents types de lymphocytes T auxiliaires existent et seraient produits préférentiellement selon les signaux fournis par la cellule présentatrice d'antigène^{1,19}. Les T_H1 sécrètent de l'interféron (IFN)- γ et activent les CTLs, les macrophages et les cellules B productrices d'IgG. Les T_H2 sécrètent de l'interleukine (IL)-4, IL5 et IL13 et activent les éosinophiles, basophiles et mastocytes, cellules entre autres associées aux mécanismes de l'allergie, de même que les cellules B productrices d'IgE (réponse phagocyte-indépendante). Enfin, les T_H17 favorisent la protection contre les bactéries et les fongiques en produisant de l'IL17, qui induit la sécrétion de

chimiokines par les cellules épithéliales afin de recruter les neutrophiles.

Un autre type de lymphocyte CD4⁺ appelé cellule T régulatrice (Treg) exprime le facteur de transcription FOXP3 (protéine à boîte de type tête de fourche P3) et le récepteur CD25²⁰. Les Tregs sont responsables du maintien de la tolérance aux peptides du soi en périphérie afin de prévenir l'autoimmunité et l'inflammation chronique. Les Tregs peuvent être produits dans le thymus ou dériver de cellules T effectrices durant la réponse immunitaire, avenue qui semble favorable en présence de TGFβ et/ou d'IL10²⁰. Les Tregs utilisent différents mécanismes pour inhiber la réaction immunitaire : sécrétion de cytokines inhibitrices (TGFβ et IL10), cytolysse des cellules immunitaires (sécrétion de granzymes et de perforines), inhibition métabolique des cellules T environnantes (un mécanisme potentiel par « surconsommation » de l'IL2 environnant) et modulation de la maturation ou de la fonction des cellules dendritiques (via le co-récepteur CTLA4, antigène de lymphocyte T cytotoxique 4, ou LAG3, un homologue de CD4)²⁰.

1.1.3 Cellules dendritiques

Les cellules présentatrices d'antigènes sont les seules à exprimer le CMH II et ont donc la capacité unique de présenter des peptides par la voie antigénique de classe II et activer les cellules T CD4⁺. Ce groupe spécialisé comprend les lymphocytes B activés, les macrophages et les cellules dendritiques, les dernières étant les plus efficaces pour activer et promouvoir l'activité effectrice de cellules T naïves²¹. Les cellules dendritiques agissent par ailleurs à titre de sentinelles dans l'organisme : leur rôle consiste à échantillonner l'environnement par endocytose, transmettre le signal sous forme de peptide aux organes lymphoïdes et moduler la réponse des lymphocytes T. Contrairement aux autres cellules présentatrices d'antigènes, qui permettent uniquement d'amplifier la réponse immunitaire, les cellules dendritiques sont aussi à même de l'amorcer²¹.

1.1.3.1 Activation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont activées via une variété de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaire, très conservés et associés au système immunitaire inné, les récepteurs de type Toll (TLRs). Ceux-ci représentent la famille de PRRs les mieux caractérisés chez les mammifères²². Dix TLRs existent chez la souris, plusieurs ayant une spécificité pour un type

de ligand particulier, d'autres pouvant reconnaître une diversité de motifs²²⁻²⁴. Quatre TLRs associés à la membrane endolysosomale reconnaissent des acides nucléiques : TLR7 et TLR8 s'associent à l'ARN viral simple-brin, alors que TLR3 et TLR9 ont une préférence pour l'ARN viral double-brin ou l'ADN bactérien, respectivement²³. À la surface cellulaire et sous forme de dimères, les autres TLRs reconnaissent plutôt des éléments structurels bactériens : TLR1-2, TLR2-6 (bactéries Gram-positives et fongiques) et les homodimères TLR4 (bactéries Gram-négatives) et TLR5 (bactéries flagellées)²³. Enfin, le seul ligand connu de TLR11 (présent chez la souris mais non chez l'humain) est la protéine profilin présente à la surface de *T. gondii* (et possiblement d'autres bactéries)²⁴, alors que TLR10, présent chez l'humain mais inactif chez la souris, dimériserait avec TLR2 pour s'associer à *L. monocytogenes* et d'autres pathogènes²⁵⁻²⁷. La liste de TLRs exprimés diffère quelque peu selon le type de cellule dendritique : celles-ci vont par conséquent répondre différemment aux pathogènes²².

La stimulation des TLRs active des cascades signalétiques résultant en la maturation des cellules dendritiques, généralement perçue par 1) la présence d'une plus grande quantité de CMH et de molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) à la surface cellulaire et 2) la production de cytokines pro-inflammatoires. Deux cascades (non mutuellement exclusives) sont typiquement induites par l'activation : la signalisation via l'adaptateur MYD88, qui mène généralement à une réponse pro-inflammatoire dépendante du facteur nucléaire kappa-B (NF- κ B), ou via l'adaptateur inducteur d'IFN β contenant un domaine TIR (TRIF), qui favorise la production d'IFN de type I (IFN α et β)²³.

Les cellules dendritiques peuvent aussi être activées indirectement par des cytokines pro-inflammatoires comme TNF α et IFN γ . Cependant, ce genre de stimulation ne permet pas une activation complète de la cellule dendritique : bien qu'elle puisse alors exprimer les marqueurs de maturation et induire la prolifération des lymphocytes, elle ne peut pas activer efficacement la fonction effectrice de ces derniers^{28,29}. La présence de cellules T auxiliaires mémoires peut toutefois « compléter » l'activation de ces cellules dendritiques²⁹. Étant donné qu'une telle cellule dendritique ne présentent pas de peptide immunogène sur ses CMH (la maturation n'est pas induite par un pathogène), elles pourraient être importantes dans le maintien de la tolérance au soi²⁹.

1.1.3.2 Fonctions des cellules dendritiques

La fonction principale des cellules dendritiques est de soutenir le développement et

l'activation des lymphocytes T, à trois niveaux : 1) en forgeant le répertoire des lymphocytes T, par leur participation à la sélection négative dans le thymus, 2) en prélevant et en présentant à leur surface des antigènes pour permettre leur reconnaissance par les lymphocytes et 3) en induisant la réponse immunitaire appropriée (fonction effectrice ou mémoire, expansion ou tolérance)³⁰. De plus, l'interaction constante entre les cellules dendritiques présentant des peptides du soi et les lymphocytes T hors du thymus est essentielle pour le maintien de la survie et de la fonctionnalité de ces derniers^{31,32}. Pour combler tous ces rôles, les cellules dendritiques sont présentes dans une multitude de tissus lymphoïdes et périphériques et leur fonction varie selon leur sous-type, leur localisation et leur stade d'activation.

À l'état immature (ou naïf), les cellules dendritiques maintiennent une grande activité de phagocytose et d'endocytose afin d'échantillonner l'environnement²¹. À ce stade, les cellules expriment de faibles niveaux de CMH I et II et de marqueurs de co-stimulation (CD40, CD80, CD86). Après stimulation et durant leur maturation, leur activité de phagocytose est réduite au profit de la présentation antigénique (augmentation de la présentation en surface cellulaire de CMH I et II), de la migration vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les ganglions lymphatiques (grâce à la surexpression du récepteur CCR7, qui reconnaît les ligands CCL19 et CCL21, possiblement combiné à la présence du marqueur CD47³³) et de l'induction de l'activation des lymphocytes T (surexpression des marqueurs de co-stimulation et de certaines cytokines)³⁴.

Trois signaux induits par l'interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte T déterminent l'avenir de ce dernier : le signal 1 (de stimulation), soit l'interaction entre le CMH couplé à un peptide et le TCR, le signal 2 (de co-stimulation), déterminé par l'interaction entre les marqueurs de co-stimulation, comme CD80 et CD86 sur la cellule dendritique mature et CD28 sur la cellule T, et le signal 3 (de polarisation), induit par la sécrétion de cytokines par la cellule dendritique²¹. La combinaison des signaux 1 et 2 est associée à l'induction de la réponse effectrice, de l'expansion des lymphocytes et du développement de la réponse mémoire²¹. La présence unique du signal 1 promeut un phénotype d'anergie ou de tolérance et représente un mécanisme important dans le maintien de la tolérance au soi en périphérie (hors du thymus)²¹. L'induction de la tolérance est donc souvent attribuée aux cellules dendritiques immatures, qui expriment peu de marqueurs de co-stimulation. Cependant, l'interaction entre les marqueurs de co-stimulation des cellules dendritiques et CTLA4 sur la cellule T peut aussi mener à la tolérance^{21,35}. De plus, l'existence de cellules dendritiques spécifiquement tolérogéniques dans le thymus pourrait promouvoir le développement de Tregs³⁶. Enfin, divers signaux de polarisation sont envoyés par la cellule dendritique pour déterminer le type de réponse produit par la cellule T.

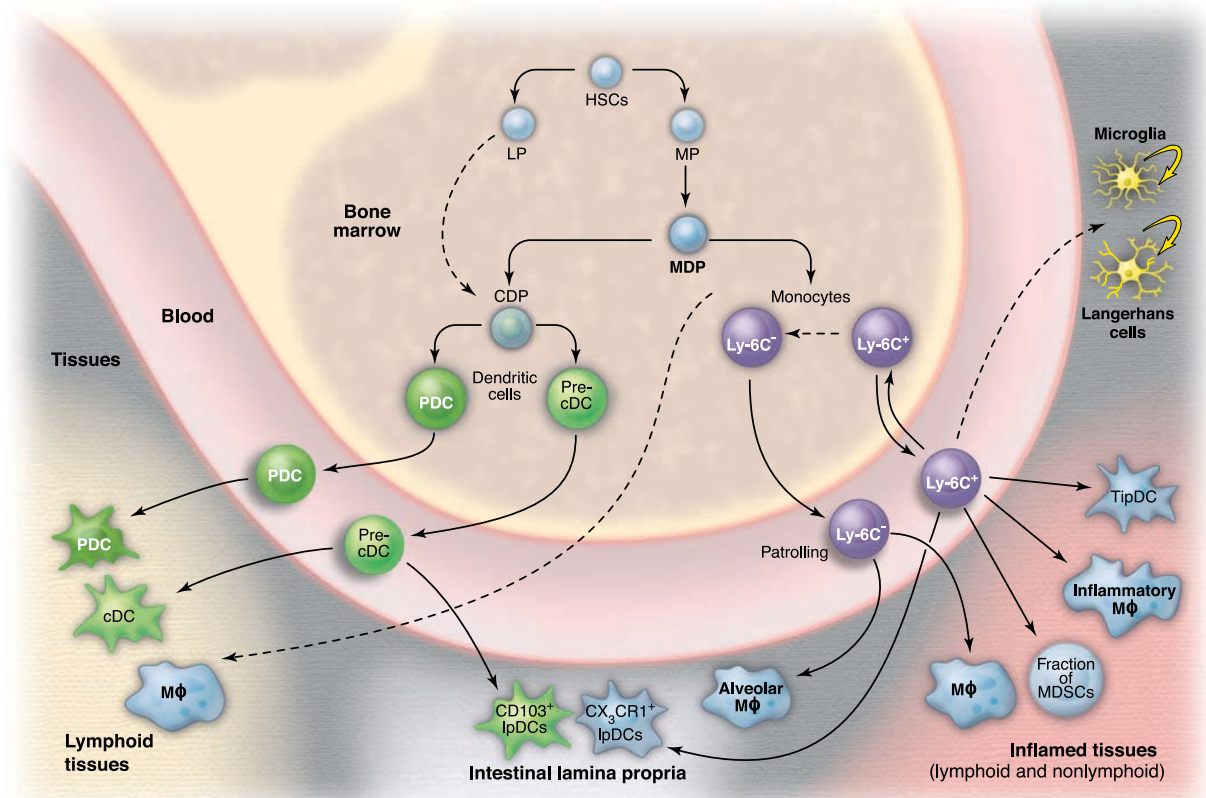


Figure 1.3 Développement des sous-types de cellules dendritiques. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) de la moelle osseuse en cellules dendritiques requiert plusieurs stades. Un progéniteur myéloïde (MP) se développe en progéniteur de macrophages et de cellules dendritiques (MDP), précurseur à la fois des cellules dendritiques résidentes et migratoires des organes lymphoïdes. Les résidentes, incluant les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et classiques (cDCs) dérivent d'un précurseur commun des cellules dendritiques (CDP) et quittent la moelle osseuse pour s'établir dans les tissus lymphoïdes. Les migratoires, incluant les cellules dendritiques inflammatoires (TipDCs), les cellules de Langerhans et autres cellules immunitaires comme les macrophages (Mφ), dérivent de monocytes Ly6C⁺ ou Ly6C⁻, à l'exception des cellules CD103⁺ qui proviennent, comme les cellules résidentes, de précurseurs de cDCs (pre-cDCs) et s'établissent dans les tissus périphériques. Tiré de Geissmann F *et al*, 2010³⁴. Reproduit avec la permission de AAAS.

Par exemple, IL12, IL27, les IFNs de type I et la molécule d'adhésion intracellulaire (ICAM) -1 favorisent l'activation des cellules T_H1 et CTLs, alors qu'un ligand du récepteur Notch, CCL2 et OX40L induisent une réponse de type T_H2, et que IL10 et TGFβ permettent d'activer les Tregs³⁷. Enfin, la combinaison de TGFβ avec l'IL6 de même que IL23 favorisent le développement et l'activation de cellules T_H17³⁸.

1.1.3.3 Sous-types de cellules dendritiques

Les différents types de cellules dendritiques expriment tous le marqueur CD11c mais

sont distinguables grâce à d'autres marqueurs de surface spécifiques. Les cellules dendritiques présentes dans les organes lymphoïdes comme la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus forment environ 1-3% de la cellularité totale de ces organes. Parmi les cellules dendritiques dites résidentes, on retrouve les sous-types « classique » (cDC) et « plasmacytoïde » (pDC, voir figure 1.3). Ces deux groupes dérivent d'un précurseur commun de la moelle osseuse (CDP), lui-même provenant d'un précurseur partagé aux macrophages (MDP)^{34,39}. Le reste de la population de cellules dendritiques des organes lymphoïdes est composé de cellules migratoires provenant des organes périphériques.

Chez la souris, deux types de cDCs sont identifiables selon la présence ou non du marqueur CD8. Les cDCs CD8⁺, communément appelées « lymphoïdes », expriment le marqueur CD205, un récepteur membranaire impliqué dans l'endocytose⁴⁰. À l'état immature, elles seraient entre autres spécialisées dans l'endocytose de cellules mortes et dans la présentation sur les CMH de classe I de peptides provenant de protéines intracellulaires (présentation antigénique de classe I) ou de protéines exogènes (présentation croisée, voir section 1.1.4)^{41,42}. Après activation, les cDCs CD8⁺ sécrètent de l'IL12 et induisent l'activation des cellules T de type T_H1 et CTL⁴⁰. Les cDCs CD8⁻ (« myéloïdes »), d'un autre côté, expriment le marqueur DCIR2 impliqué dans la phagocytose. Cela concorde avec leur préférence pour la présentation antigénique de classe II, la voie classique par laquelle les cellules présentent des antigènes dérivant de protéines exogènes (voir section 1.1.4)⁴². Par ailleurs, après activation, les cDCs CD8⁻ vont plutôt favoriser la réponse de type T_H2⁴³. Enfin, les pDCs (CD11c^{low}B220⁺), qui peuvent activer à la fois les cellules T CD4⁺ et CD8⁺, sont surtout caractérisés par leur sécrétion massive d'IFN de type I suivant leur activation, une particularité utile dans la réponse antivirale⁴⁴.

Enfin, d'autres populations de cellules dendritiques occupent les organes périphériques. Par exemple, les tissus inflammés comprennent les TipDCs (cellules dendritiques productrices de TNF et d'iNOS), dérivés des monocytes Gr1⁺Ly6C^{high} et reconnus pour leur production de TNF α , d'oxyde nitrique, et de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène). Détectées dans la rate durant une infection, elles joueraient apparemment un rôle important dans la réponse aux bactéries^{45,46}. Certaines populations sont aussi détectées dans le poumon (CD103⁺) et le derme (CX₃CR1⁺), les deux populations étant également présentes dans la lamina propria de l'intestin³⁴. Les cellules dendritiques CD103⁺ de la peau, du poumon et de l'intestin, tout comme les cellules CD11b⁺CD103⁻⁴⁷ sont migratoires et sont donc aussi retrouvées dans les organes lymphoïdes. Contrairement aux autres sous-types de cellules dendritiques, les cellules de Langerhans (exprimant le marqueur CD207/langerin), nichés au niveau épidermal, ne sont pas repeuplés par des progéniteurs de la moelle osseuse et assurent un auto-renouvellement local de leur

population³⁴. Les cellules de Langerhans ont une grande capacité de phagocytose et, tout comme les précédentes, migrent vers les organes lymphoïdes pour présenter les antigènes récoltés aux lymphocytes T⁴⁸.

In vitro, les différentes populations de cellules dendritiques (et autres cellules immunitaires) peuvent être dérivées de mêmes précurseurs dépendamment du contexte de stimulation. Par exemple, un monocyte peut se différencier en macrophage de type M1 (M-CSF avec IFN γ ou LPS) ou M2 (M-CSF avec IL4), en cellule dendritique (GM-CSF avec IL4) ou encore en cellule de Langerhans (TGF β 1)³⁴. L'utilisation de différentes molécules stimulatrices comme GM-CSF et FLT3 vont aussi induire différents phénotypes de cellules dendritiques⁴⁹. L'environnement est donc un facteur clé dans le développement d'un précurseur et va guider le choix du programme transcriptionnel approprié pour la différenciation³⁴.

Bref, les cellules dendritiques représentent une population cellulaire particulièrement diversifiée. Leur comportement variant selon leur mode d'activation, la cascade signalétique induite, leur sous-type et leur environnement ainsi que la variété de signaux émis pour guider cellules T ajoutent à la grande plasticité de la réponse immunitaire.

1.1.4 Présentation antigénique

1.1.4.1 Présentation antigénique de classe I

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes sous forme de peptides liés au CMH (appelé HLA, antigène de leucocyte, chez l'humain) de classe I ou de classe II dans la voie de présentation antigénique de classe I et II, respectivement. Chez la souris et l'humain, presque toutes les cellules de l'organisme expriment le CMH I⁵⁰. Celui-ci est composé d'une chaîne lourde transmembranaire et d'une chaîne légère invariable appelée β_2 -microglobuline (β_2m). L'assemblage du CMH I se fait dans le réticulum endoplasmique avec l'aide des chaperonnes calréticuline et ERp57 (protéine du réticulum endoplasmique 57)⁵¹.

La présentation antigénique de classe I permet de présenter des peptides dérivant de protéines intracellulaires par un mécanisme protéasome-dépendant^{51,52} (voir figure 1.4a). Les protéines ciblées, typiquement via l'attachement d'une chaîne de poly-ubiquitine, sont principalement dégradées dans le cytoplasme par le protéasome, carboxypeptidase majeure dans la dégradation des protéines intracellulaires⁵³ (voir section 1.2). Parmi les peptides produits,

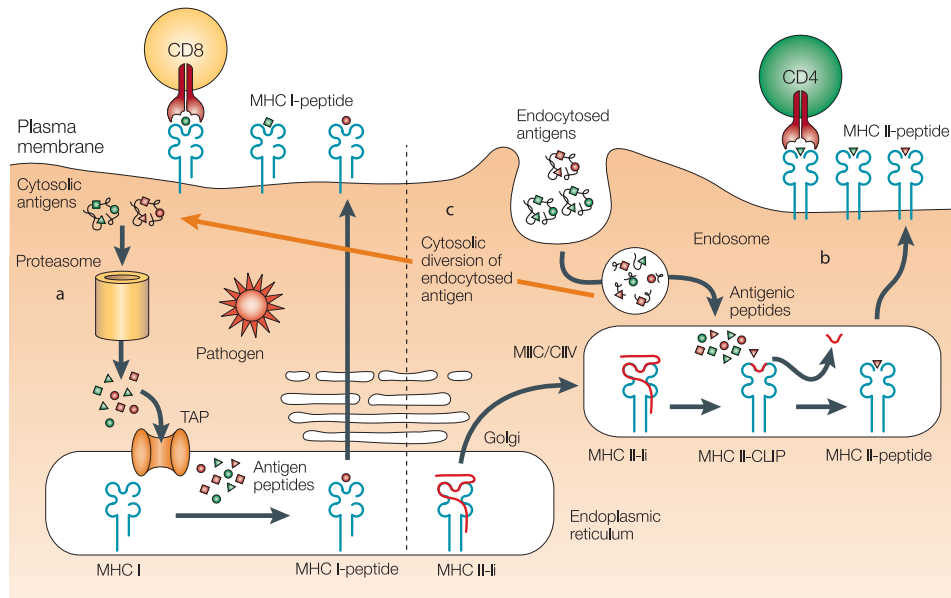


Figure 1.4 Différents modes de présentation antigénique. a) La présentation de classe I implique la dégradation de protéines intracellulaires par le protéasome, la translocation des fragments produit dans le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP, le taillage par des aminopeptidases (non illustré), le chargement sur les complexes majeurs d’histocompatibilité (CMH) de classe I à l’aide de chaperonnes et le transport du complexe peptide / CMH I à la surface cellulaire par voie vésiculaire. **b)** La présentation de classe II consiste en l’internalisation par endocytose ou phagocytose de protéines extracellulaires, la fusion des vésicules avec des lysosomes pour permettre la dégradation des protéines par les cathepsines (non illustré) et le chargement des peptides sur les CMH II avant leur transport à la surface cellulaire. La chaîne invariable (Ii) dans le sillon du CMH II prévient la liaison précoce d’un peptide jusqu’à sa libération par la peptidase CLIP. **c)** La présentation croisée consiste en la présentation de peptides provenant de protéines exogènes sur les CMH I et fait le pont entre les présentations de classe I et II. Les peptides présentés sur les CMH I et II sont reconnus par les cellules T CD8⁺ et CD4⁺, respectivement. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews in Immunology (Heath WR et Carbone FR ⁵⁵), copyright (2001).

une fraction est transloquée dans le réticulum endoplasmique via le transporteur associé à la présentation antigénique (TAP). Les peptides sont taillées à une longueur optimale de 8-11 acides aminés entre autres par l’aminopeptidase du réticulum endoplasmique ERAAP (aussi appelée ERAAP) avant d’être chargés, avec l’assistance de la chaperonne tapasine, sur le CMH I. La présence de tapasine augmente aussi la demi-vie des complexes peptide / CMH I en diminuant leur taux de dissociation⁵⁴. Les complexes peptide / CMH I formés sont finalement transportés par voie sécrétoire jusqu’à la surface cellulaire.

Le nombre de CMH I à la membrane plasmique varie en fonction de la quantité de peptides produits à l’intérieur de la cellule. Cette quantité dépend de nombreux processus, notamment du taux de traduction et de dégradation des protéines. En effet, un blocage de l’une ou l’autre de ces voies avec des inhibiteurs comme la cycloheximide et MG132, respectivement, mène à une diminution rapide de la quantité de complexes peptide / CMH I à la surface cellulaire ^{53,56}. Des

critères d'ordre qualitatifs influencent aussi la présentation antigénique. Le fragment protéique doit avoir une longueur et un motif adéquats pour lier à la fois TAP et le CMH I. Les produits de dégradation du protéasome varient entre 4 et 20 acides aminés : environ 60% des peptides produits sont trop courts pour lier le CMH I alors que 20%, trop longs, doivent être taillés davantage par les aminopeptidases⁵². Les aminopeptidases cytosoliques sont aussi très actives et il a été estimé que 99% des peptides sont détruits avant d'atteindre le transporteur TAP⁵⁷. De plus, une fois dans le réticulum endoplasmique, les chaînes lourdes des CMH I, encodés par différents allèles, vont lier préférentiellement différents motifs peptidiques⁵⁰. Bref, alors qu'environ 2 millions de peptides sont produits par le protéasome à chaque seconde, seulement 150 sont chargés sur un CMH I⁵². L'ensemble des étapes de production antigénique et des processus connexes qui peuvent influencer cette voie, notamment la source des peptides, sont donc un grand sujet d'étude en immunologie et sont discutés dans l'Annexe I.

1.1.4.2 Présentation antigénique de classe II, présentation croisée et autres mécanismes de présentation

La voie de présentation antigénique de classe II permet la présentation de peptides provenant de protéines exogènes via la voie lysosomale (figure 1.4b). Contrairement à la voie de classe I, celle-ci est propre aux cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules B, les macrophages et, particulièrement, les cellules dendritiques. Les deux chaînes transmembranaires variables α et β composant le CMH II sont, comme celles du CMH I, synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Cependant, les molécules conformées vont ensuite être transportées par voie vésiculaire aux lysosomes⁵¹. Parallèlement, les protéines extracellulaires sont internalisées par endocytose et progressent des phagosomes (ou endosomes) précoces aux phagosomes tardifs. Cette transition et surtout la fusion avec les lysosomes permet un passage vers des compartiments plus acides où les cathepsines et autres hydrolases, alors plus actives, vont dégrader les protéines en peptides⁵¹. La fusion des phagosomes avec les lysosomes forme des phagolysosomes contenant à la fois les peptides exogènes et les CMH II, permettant donc le chargement puis le transport vésiculaire vers la surface cellulaire des complexes peptide / CMH II⁵¹. Les motifs des peptides de classe II sont beaucoup moins conservés que ceux liant les CMH I⁵⁸ : les intervenant de la voie de présentation de classe II sont moins sélectifs et le site de liaison des CMH II est beaucoup plus permissif en terme de longueur de peptides (accommodant des fragments autour de 14-21 acides aminés avec une longueur optimale entre 18-20 résidus)^{59,60}.

Les voies de présentation de classe I et de classe II ne sont pas mutuellement exclusives :

des antigènes de classe I peuvent provenir de protéines exogènes par un processus appelé présentation croisée (figure 1.4c). La voie privilégiée est celle selon laquelle des fragments protéiques exogènes passeraient des phagosomes au cytoplasme pour être taillés par le protéasome, puis seraient transloqués dans le réticulum endoplasmique suivant la voie canonique de classe I. Cette voie ne serait pas propre à toutes les cellules présentatrices d'antigène, mais chez l'humain, les pDCs et cDCs CD8⁺ auraient une bonne capacité de présentation croisée⁶¹. Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer comment les peptides pourraient passer de la voie endolysosomale vers le cytoplasme dans la présentation croisée, mais peu est connu sur la proportion des peptides provenant de ces différentes voies. Par exemple, le processus de dégradation associé au réticulum endoplasmique (ERAD), par lequel les protéines résidentes de cette organelle mais dénaturées, en fin de vie ou défectueuses seraient transloquées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome⁶², pourrait être impliqué. En effet, il a été proposé que la fusion d'une partie du réticulum endoplasmique avec les phagosomes puisse mettre à disposition les molécules impliquées dans ERAD, permettant la translocation des fragments de protéines exogènes vers le cytoplasme. Les peptides, une fois taillés par le protéasome, seraient transloqués via TAP dans le réticulum endoplasmique, ou encore dans les vésicules réticulo-endosomales contenant, du même coup, la machinerie de présentation antigénique de classe I^{63,64}.

D'autre part, des antigènes de classe II peuvent dériver de protéines intracellulaires. D'ailleurs, une étude de peptidomique à grande échelle a démontré que 63% des peptides présentés sur la molécule de classe II H2A^b proviennent de protéines intracellulaires⁶⁵. Le processus d'autophagie, selon lequel du matériel cytosolique (organelles, protéines solubles, pathogènes) est séquestré par une double membrane lipidique (autophagosome) et éventuellement mené vers la voie de dégradation endolysosomale, pourrait être une explication à ce phénomène^{51,66}. Par ailleurs, l'autophagie est un processus constitutif mais davantage induit dans les cellules dendritiques activées par les TLRs⁵¹.

Enfin, les complexes peptides / CMH peuvent être obtenus par trogocytose, un échange membranaire entre deux cellules appelé « *cross-dressing* » dans le cadre de la présentation antigénique⁶⁷. Ce phénomène aurait été démontré par l'activation de cellules T par des cellules dendritiques n'ayant pas été mises en contact direct avec un antigène, mais plutôt avec d'autres cellules pulsées avec un peptide particulier⁶⁷. Toutefois, la présentation antigénique impliquant la trogocytose pourrait favoriser l'activation de cellules T CD8⁺ mémoires plutôt que naïves⁶⁷.

1.1.4.3 Immunoprotéasome : co-évolution entre immunité et homéostasie ?

Alors que le système de présentation antigénique (notamment les gènes codant pour les CMH et TAP) sont exprimés seulement chez les vertébrés, les seuls à avoir développé un système immunitaire adaptatif, le protéasome est présent dans l'ensemble des cellules du règne vivant. Nous avons déjà mentionné l'hypothèse voulant que le développement de la recombinaison somatique prenne origine des mécanismes de réparation de l'ADN (voir section 1.1.1). Similairement, les vertébrés pourraient avoir bénéficié des systèmes de dégradation des protéines déjà en place, notamment la voie lysosomale et le système ubiquitine-protéasome, pour présenter des antigènes à la surface cellulaire comme signal de reconnaissance par le système immunitaire. Un opportunisme payant dans la lutte contre les microorganismes pathogènes.

La dégradation des protéines par le protéasome est une étape majeure dans la présentation des peptides via la voie classique de classe I mais aussi par la présentation croisée. De plus, la découverte d'un deuxième type de protéasome, l'IP (voir section 1.3), illustre la co-évolution particulière entre le protéasome et le système immunitaire et particulièrement avec la présentation antigénique : deux des trois sous-unités catalytiques de l'IP sont encodées dans la région chromosomique codant pour les gènes du CMH et son expression est associée au système immunitaire adaptatif. Or, comme le PC a évolué avec un rôle important dans la présentation antigénique, l'IP pourrait tout autant s'être développé en maintenant des fonctions importantes dans l'homéostasie cellulaire.

1.2 Système ubiquitine-protéasome

La présente section a pour but de décrire les subtilités du système ubiquitine-protéasome, le principal mécanisme par lequel les protéines intracellulaires sont dégradées. Nous y développerons sa fonction globale dans la cellule, son mécanisme d'action et ses principaux constituants afin de mieux comprendre par la suite le contexte mécanistique dans lequel intervient l'IP.

1.2.1 Fonction et impact

La principale fonction du système ubiquitine-protéasome est de dégrader sélectivement

les protéines intracellulaires. Cette activité remplit à la fois un rôle de maintien de l'homéostasie cellulaire, en éliminant les protéines mutées, mal conformées, endommagées ou en fin de vie, mais aussi un rôle crucial dans la régulation de presque tous les processus cellulaires⁶⁹. Ceux-ci comprennent le cycle et la différenciation cellulaires, la réponse au stress et aux effecteurs extracellulaires, la présentation antigénique, la modulation des récepteurs membranaires et de la voie de sécrétion, la réparation de l'ADN, la transcription et la biogenèse des organelles⁶⁹. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité catalytique du protéasome résulte éventuellement en la mort cellulaire par apoptose⁷⁰ et un mauvais fonctionnement de ce système peut mener au développement de certaines maladies.

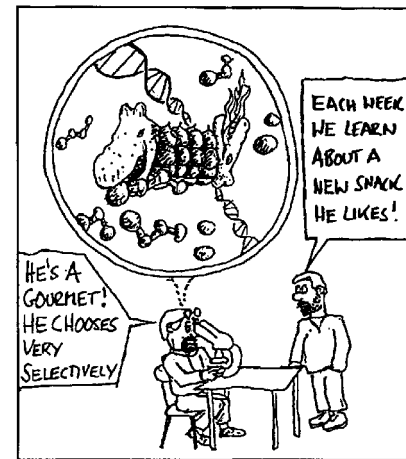


Figure 1.5 Le protéasome, un gourmet. Illustration décrivant le répertoire vaste mais non aléatoire des substrats du protéasome. Reproduit de Hilt W et Wolf DH ⁶⁸, copyright (1996), avec permission de Elsevier.

1.2.1.1 Protéasome et cancer

Bien que l'activité protéolytique soit cruciale dans toutes les cellules vivantes, les cellules cancéreuses sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs spécifiques du protéasome^{71,72}. L'une des explications est la rapidité de prolifération des cellules cancéreuses, due à un mauvais fonctionnement des points de contrôle du cycle cellulaire. Ces cellules accumulent donc plus facilement des protéines mal conformées ou défectueuses et sont par conséquent davantage dépendantes du protéasome. L'utilisation de bortezomib, un inhibiteur spécifique du protéasome, sur des lignées dérivées de myélome multiple et d'autres tissus permet d'inhiber la croissance cellulaire et d'accroître le taux d'apoptose^{70,71}. Notamment, bortezomib induit l'expression de caspases et de la protéine tumorale p53, promeut la dégradation de MDM2 (*mouse double minute 2*) et inhibe la réparation de l'ADN⁷³. Un autre mécanisme de susceptibilité aux inhibiteurs du protéasome, qui pourrait prévaloir dans les cellules cancéreuses quiescentes, impliquerait le facteur de transcription NF- κ B dont l'activité, souvent induite par la radiothérapie ou la chimiothérapie⁷⁰, est hautement régulé par le protéasome⁷². Une activation persistante de la voie NF- κ B et la conséquente sécrétion d'IL6 est associée au développement de divers cancers incluant la leucémie lymphoblastique aiguë. L'inhibition de NF- κ B par des inhibiteurs du protéasome induirait une diminution de l'angiogenèse et la sous-expression de VCAM1 (molécule d'adhésion de cellule vasculaire 1) et d'ICAM1 (molécule d'adhésion intracellulaire

1) dans certaines lignées cancéreuses ou tumeurs^{72,74,75}. Ces deux dernières molécules sont entre autres nécessaires à l'adhésion des cellules du myélome multiple au stroma de la moelle osseuse et, par conséquent, à la résistance des cellules cancéreuses aux traitements en clinique⁷⁶.

Les inhibiteurs du protéasome ont donc rapidement été ciblés comme molécules thérapeutiques prometteuses en combinaison avec les traitements conventionnels contre le cancer. Certains inhibiteurs sont étudiés en clinique pour leurs propriétés antinéoplasiques (bortezomib⁷⁷) ou anti-inflammatoires (PS-519⁷⁸). Bien que le mécanisme varie entre les molécules inhibitrices, l'objectif est le même : induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses et augmentation de la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques standards⁷⁰. Les résultats prometteurs d'une étude clinique en phase II, démontrant une réponse complète, partielle ou légère chez 35% des patients traités avec bortezomib (Velcade), ont mené la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) à accepter en 2003 son utilisation pour le traitement de patients atteints de myélome multiple ayant fait une rechute suite à deux thérapies conventionnelles⁷⁷. Des essais sont aussi en cours pour étendre l'utilisation à d'autres types de cancers hématopoïétiques, mais aussi des cancers touchant tête et cou, pancréas, ovaires, prostate, sein, poumon, rein, vessie, peau, estomac, système nerveux et système endocrinien⁷⁰.

1.2.1.2 Maladies associées à une diminution de l'activité protéolytique

Alors qu'une plus grande activité protéasomale est généralement associée aux cancers, certaines maladies neurodégénératives et le vieillissement sont plutôt associés à une baisse de l'activité du protéasome. Les protéinopathies sont associées à une aggrégation cytosolique ou nucléaire de protéines. Les mutations causatrices engendrent la production de protéines anormales généralement bénignes, mais dont les fragments résultant de leur dégradation peuvent être toxiques pour la cellule (par exemple le fragment amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer⁷⁹ ou la production de fragments poly-glutamines dans la maladie de Huntington et l'ataxie spinocérébrale de type 3^{80,81}). Ces fragments, produits par différentes protéases, et les agrégats de protéines peuvent être éliminés par deux moyens : le système ubiquitine-protéasome ou la digestion par autophagie⁸². Les maladies à prions, comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob, pourraient aussi impliquer le système ubiquitine-protéasome. Il a été démontré qu'une variante mal conformée du prion, insoluble, transmissible et résistante aux protéases, peut spécifiquement bloquer l'activité catalytique du protéasome, mécanisme qui pourrait être à l'origine de sa toxicité^{83,84}. Parallèlement, le vieillissement est entre autres caractérisé par une augmentation du stress oxydatif et une aggrégation de protéines endommagées, combinés à une diminution de

l'activité protéolytique. Cette diminution pourrait être causée par un blocage du protéasome par les agrégats, ou encore par un changement dans la composition du protéasome et par conséquent dans son activité⁸⁵.

D'autres maladies associées à une baisse de l'activité du protéasome incluent la maladie de Parkinson (causé par des mutations de l'E3 ligase parkin et de la déubiquitylase UCH-L1, ou d'une baisse générale du niveau de protéasome ou de facteurs associés)^{86,87} et la maladie de Paget (mutation de VCP, impliquée entre autres dans la dégradation ERAD-dépendante des protéines)⁸⁸. De plus, l'injection d'inhibiteurs du protéasome dans des souris peut causer des phénotypes semblables à la maladie de Parkinson⁸⁹. Toutefois, il n'est pas certain si le blocage du protéasome est une cause ou une conséquence de ces maladies.

Bref, le protéasome est crucial au bon fonctionnement cellulaire et une perturbation de son activité est associée à divers troubles affectant l'organisme entier. L'importance du dosage de l'activité protéolytique pourrait expliquer la grande quantité de joueurs impliqués dans sa régulation. Dans cette optique, l'émergence et surtout le maintien d'un deuxième type de protéasome ne devraient pas être dus au hasard et on peut s'attendre à ce que les activités complémentaires du PC et de l'IP apportent un avantage évolutif aux vertébrés. Avant de discuter plus en détails de l'IP, nous allons d'abord nous attarder au fonctionnement général du système ubiquitine-protéasome.

1.2.2 Ciblage pour la dégradation

1.2.2.1 Ubiquitylation des protéines

Le ciblage des protéines pour la dégradation par le protéasome implique une cascade de réactions enzymatiques permettant l'attachement de l'ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés très conservé à travers les espèces, sur une protéine cible (voir figure 1.6). Cette cascade inclut l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine par l'enzyme E1, sa conjugaison à l'enzyme E2, puis son transfert à partir de E2 vers un résidu lysine de la protéine cible, par l'entremise de l'enzyme E3 (aussi appelée ubiquitine ligase)⁹⁰. Une succession de cycles de cette cascade résulte en l'attachement d'une chaîne poly-ubiquitine sur la protéine. La variété d'enzymes impliquées dans le processus change considérablement au long de la cascade : alors qu'une seule enzyme E1 est connue, une vingtaine d'enzymes E2 ont été répertoriées et on estime à quelques centaines la diversité des E3 ligases⁹¹. Considérant que ces dernières ainsi que les

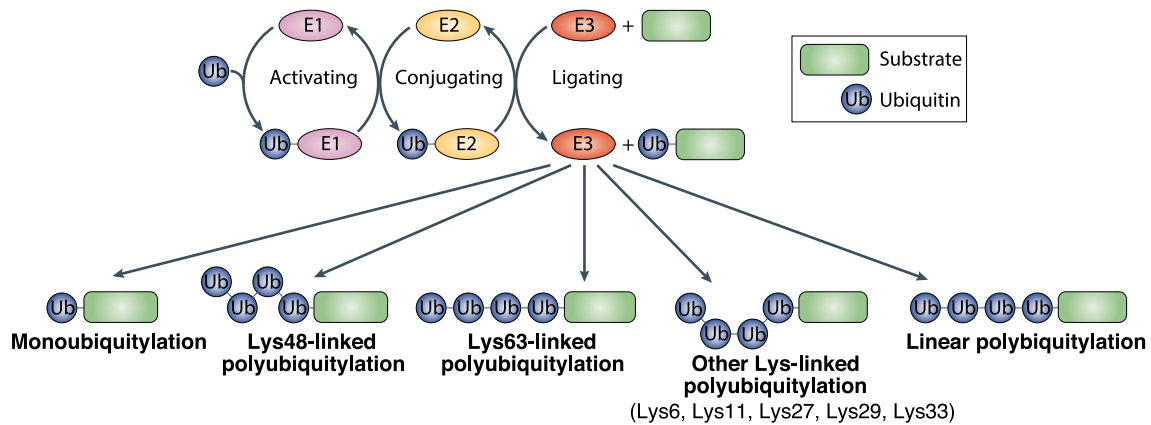


Figure 1.6 Ubiquitylation des protéines. Cette cascade enzymatique inclue l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine par l'enzyme E1, sa conjugaison à l'enzyme E2, puis son transfert à partir de E2 vers un résidu lysine de la protéine cible, par l'entremise de l'enzyme E3 (aussi appelée ubiquitine ligase). De multiples cycles de cette cascade résultent en l'attachement d'une chaîne poly-ubiquitine sur le substrat. Différentes chaînes, selon la longueur et le type d'attachement des molécules d'ubiquitine, vont déterminer du destin de la protéine cible. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular cell biology (Dikic TP *et al*⁹³), copyright (2009).

diverses combinaisons E2-E3 possibles sont responsables de la spécificité du ciblage, cette importante diversité d'enzymes E3 n'est pas si surprenante. Deux familles englobent les E3 ligases selon leur mode de fonctionnement : 1) celles à domaine HECT (homologue au domaine COOH-terminal de E6-AP), qui impliquent un transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 à l'E3 avant d'être transférée sur la protéine cible et 2) les E3 à domaine RING (*Really Interesting New Gene*), un type de domaine doigt de zinc, qui agissent comme protéines d'échafaudage et permettent un transfert direct de l'ubiquitine de E2 vers la protéine cible, sans intermédiaire sur l'enzyme E3 elle-même⁶⁹. Dans les deux cas, la réaction dirigée par la E3 ligase implique deux étapes : d'abord l'interaction avec la protéine cible via un degron, une courte séquence signal pouvant aussi être modifiée post-traductionnellement (par exemple par phosphorylation⁹⁰ ou oxydation⁹²), puis le transfert par lien covalent de l'ubiquitine au substrat⁹¹. Enfin, un quatrième type d'enzyme nommé E4 favoriserait l'élongation des chaînes d'ubiquitine⁶⁹. Ces E4 contiennent une forme alternative de domaine RING appelé boîte U et sont parfois considérées comme faisant partie des E3 ligases, avec une spécificité envers la chaîne poly-ubiquitine plutôt qu'envers la protéine cible⁶⁹.

1.2.2.2 Conséquences liées à l'ubiquitylation : différents signaux, différents destins

L'ubiquitylation d'une protéine ne mène pas nécessairement à sa dégradation : différents types de chaînes vont provoquer différentes réponses. L'attachement de la première molécule

sur le substrat s'effectue soit sur une lysine située dans un degron interne de la protéine cible ou sur son résidu N-terminal. Les sept résidus lysine de cette première ubiquitine peuvent ensuite servir de point d'attache pour la liaison de la molécule subséquente. Plusieurs types de chaîne peuvent donc être formés en variant à la fois le point d'attache sur l'ubiquitine (l'une des sept lysines) et le nombre de molécules composant la chaîne (voir figure 1.6).

Typiquement, une protéine ciblée pour la dégradation protéasome-dépendante est liée par une chaîne d'au minimum quatre ubiquitines échafaudées sur le résidu Lys48^{90,94}. L'ubiquitylation de certains protéines, par exemples les membres de la famille de facteurs de transcription NF- κ B chez les mammifères et la levure, peut aussi engendrer un clivage partiel des substrats, libérer la portion active des molécules et permettre sa translocation dans le noyau⁹⁵. La mono-ubiquitylation ou l'attachement de courtes chaînes d'ubiquitine via la Lys63 a été associée à la réparation de dommages à l'ADN durant le cycle cellulaire⁹⁶, la réponse au stress⁹⁷, la fonction ribosomale⁹⁸, l'activation de la signalisation via I κ B α ⁹⁹ et peut mener à l'internalisation par endocytose de protéines ancrées dans la membrane plasmique¹⁰⁰. Dans le cas des molécules du CMH I, un attachement de la chaîne sur des résidus Cys, Ser et Thr de la queue N-terminale peut aussi provoquer leur internalisation pour dégradation par la voie lysosomale^{101,102}. Bien que leur fonction biologique soit moins bien caractérisée pour le moment, les modifications sur les cinq autres lysines de l'ubiquitine, Lys6, Lys11 (associé à ERAD), Lys27, Lys29 et Lys33 pourraient aussi cibler les protéines pour la dégradation^{69,103}. Enfin, la mono-ubiquitylation des histones permet un réarrangement de la chromatine (H2B et H2A généralement associés à une ouverture et une fermeture respectivement) alors que leur poly-ubiquitylation est impliquée dans la réparation de l'ADN (histones H2A, H3, H4)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Enfin, des molécules analogues à l'ubiquitine (UBLs), quoique moins bien caractérisées, peuvent aussi jouer un rôle dans le ciblage des protéines pour la dégradation. Les UBLs NEDD8 et SUMO sont activées de manière semblable à l'ubiquitine par des E1 et E2 distinctes, bien que l'existence de E3 ligases spécifiques reste encore à déterminer⁶⁹. MDM2 et I κ B α sont des exemples de protéines dont la sumoylation prévient, par compétition, la déstabilisation et la dégradation ubiquitine-dépendante^{107,108}.

1.2.2.3 Déubiquitylation et régulation des pools d'ubiquitine

Le génome humain contiendrait 79 différentes enzymes déubiquitylases (DUBs), classées en cinq différents groupes selon leur structure : UCHs (hydrolases C-terminale d'ubiquitine),

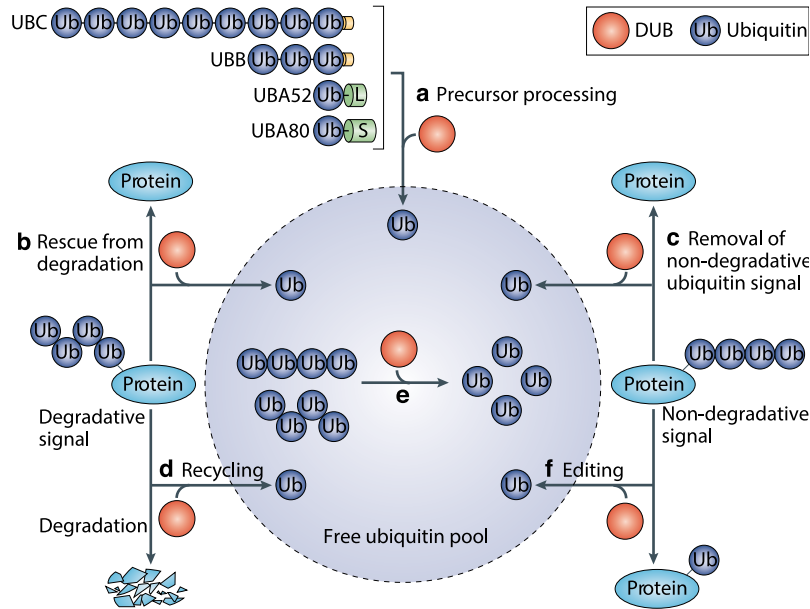


Figure 1.7 Fonctions générales des DUBs. Les molécules d'ubiquitine sont encodées par quatre gènes transcrits et traduits soit en tant que série d'ubiquitines ou fusionnées à l'extrémité de sous-unités ribosomales (L et S). L'enzyme déubiquitylase (DUB) génère l'ubiquitine libre *de novo* à partir de ces molécules fusionnées (a). Les DUBs peuvent aussi renverser le signal de dégradation (b), ou de signalisation (c), recycler l'ubiquitine libérée par la dégradation du substrat (d), désassembler les chaînes ainsi libérées en molécules libres (e) et éditer le signal poly-ubiquitine sur les substrats (f). Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular cell biology (Komander D *et al*¹⁰⁹), copyright (2009).

USPs (protéases spécifiques à l'ubiquitine), OTUs (protéases de tumeur ovarienne) et MJDs (domaines Machado-Josephin), des protéases à cystéine, ainsi que les JAMMs (métalloenzymes JAB1/MPN/MOV34), des métalloprotéases au zinc (incluant PSMD14, une sous-unité de l'unité régulatrice 19S, voir section 1.2.3)^{109,110}. Les DUBs accomplissent trois fonctions : 1) produire de l'ubiquitine libre, puisque l'ubiquitine est transcrite *de novo* sous forme de chaîne à partir de plusieurs gènes en tandem, 2) retirer l'ubiquitine des substrats, permettant une réversibilité des signaux et 3) éditer le signal en taillant la chaîne poly-ubiquitine¹⁰⁹ (voir figure 1.7). La spécificité des différentes DUBs tient en compte plusieurs facteurs, notamment le type de chaîne (liaisons par Lys63, Lys48, etc.), le lieu de clivage (endo- ou exo-clivage), l'absence de substrat (pour le recyclage en ubiquitine libre), l'identité du substrat et le nombre de molécules dans la chaîne (mono vs poly)¹⁰⁹.

Le pool cellulaire d'ubiquitine est constitué d'une petite fraction d'ubiquitine libre et d'une majeure partie associée sous forme de monomères ou de polymères aux substrats. La quantité limitée d'ubiquitine libre rend nécessaire l'action constante des DUBs pour maintenir le pool disponible à la modification post-traductionnelle des protéines¹¹¹. Lorsqu'une quantité

accrue d'ubiquitine est nécessaire pour cibler les protéines, par exemple durant un stress protéotoxique, la synthèse de nouvelles molécules d'ubiquitine ne suffit pas à la tâche et une redistribution des pools aura lieu au détriment de l'ubiquitine nucléaire (notamment à partir des histones H2A et H2B)¹¹².

1.2.3 Constituants du protéasome

1.2.3.1 Protéasome 20S

Le protéasome est constitué de deux grandes unités : le cœur catalytique, aussi appelé 20S, et les particules régulatrices, dont l'ensemble forme le complexe protéasomal 26S très conservé chez les eucaryotes¹¹³ (voir figure 1.8). Le cœur 20S contient 14 différentes sous-unités, chacune présente en double exemplaire et disposées de façon à former un baril d'environ 700 kDa composé de 4 anneaux superposés¹¹⁴. Les anneaux internes, constitués des sous-unités β 1–7, incluent les trois sous-unités catalytiques responsables de l'activité protéolytique : β 1, β 2 et β 5. Celles-ci, dont les sites actifs font face à la partie interne du 20S, forment la chambre protéolytique du protéasome. Les deux anneaux externes, composés des sous-unités α 1-7, forment un portail jouxtant la chambre catalytique¹¹⁴. Bien que les séquences des différentes sous-unités α soient similaires, leur extrémité N-terminale démontre une plus grande hétérogénéité et l'interaction de celles-ci permet de refermer le complexe¹¹⁵.

L'activité carboxypeptidase du protéasome provoque un clivage en fragments de longueurs variables et non une dégradation complète des protéines⁵². Les trois sous-unités catalytiques ont chacune une activité hydrolytique de type thréonine protéase qui lui est propre. En effet, les sous-unités β 1, β 2 et β 5 ont une préférence pour le clivage en C-terminal de résidus acides (clivage de type caspase, ou hydrolyse peptidylglutamique), basiques (de type trypsine) ou hydrophobes (de type chymotrypsine) respectivement, permettant ultimement au protéasome de cliver à peu près n'importe lequel des 20 acides aminés¹¹⁶.

1.2.3.2 Particules régulatrices

L'unité 20S à elle seule peut dégrader certaines protéines mal conformées ou non-ubiquitylées en situation de stress oxydatif^{117,118}. Toutefois, afin de pouvoir dégrader des protéines poly-ubiquitylées, le cœur protéolytique 20S doit être lié aux extrémités par une ou

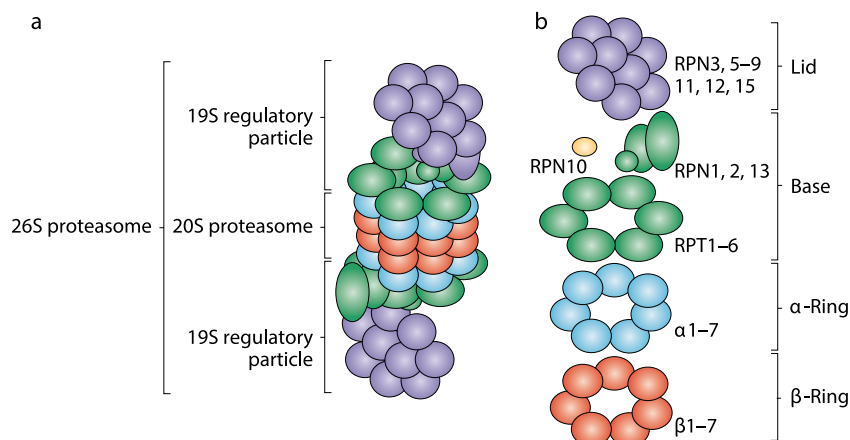


Figure 1.8 Composition du protéasome 26S. a) Le protéasome 26S est constitué du cœur catalytique 20S et d'une ou deux unités régulatrices (ici des particules 19S). **b)** Le cœur 20S est formé de 28 unités disposées en deux anneaux α et deux anneaux β (comprenant les sous-unités catalytique $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) superposés. L'unité régulatrice 19S est à son tour formée d'une base constituée de six unités ATPases et trois unités non-ATPases et d'un couvercle formé de neuf unités non-ATPases. RPN10 sert d'attache entre la base et le couvercle. Alors que le couvercle permet la déubiquitylation des substrats, la base dénature et entraîne ceux-ci vers la chambre protéolytique. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular cell biology (Murata S *et al*¹¹⁵), copyright (2009).

deux unités régulatrices dont la plus répandue est la particule 19S (PA700)¹¹⁵. Celle-ci est à son tour divisée en deux unités, la base et le couvercle (voir figure 1.8). La base comprend six unités ATPases (particules régulatrices triple-A, RPT1-6) et trois non-ATPases (particules régulatrices non-ATPases, RPN1, 2 et 13, avec RPN10 servant d'attache entre la base et le couvercle), qui interagissent avec les anneaux α du cœur 20S et permettent la dénaturation du substrat et sa translocation vers la chambre protéolytique¹¹⁹⁻¹²¹. Neuf autres sous-unités non-ATPases (RPN3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 et 15) forment le couvercle de l'unité 19S et sont nécessaires à la déubiquitylation des substrats^{121,122}. La présence de la particule 19S augmente considérablement l'activité protéolytique du 20S en permettant l'ouverture du portail formé par les extrémités N-terminales des sous-unités α ^{123,124}.

Le protéasome 20S peut faire partie de protéasomes hybrides en liant simultanément, à ses deux extrémités, une unité 19S et une forme alternative de particule régulatrice, l'activateur de protéasome PA28 (11S ou REG)^{125,126}. PA28 peut aussi se retrouver dans des complexes homogènes PA28-20S-PA28¹²⁶. PA28 n'a pas d'activité ATPase et ne peut déubiquityler ou dénaturer des protéines, mais son association augmenterait l'activité catalytique du protéasome 20S^{127,128}. Il est possible, par exemple, que le 19S reconnaisse les substrats et permette leur entrée dans le cœur 20S et que PA28 serve à l'autre extrémité de stimulateur de l'activité catalytique. PA28 pourrait aussi influencer les préférences catalytiques du protéasome¹²⁹. Trois variantes de PA28 sont connues : PA28 α et PA28 β (deux variantes IFN γ -inductibles

présentes dans plusieurs organes mais particulièrement dans les tissus immunitaires) et PA28 γ (présent de façon constitutive). Celles-ci s'assemblent en homoheptamères $\alpha 7$, $\gamma 7$ ou encore en hétéroheptamères $\alpha 3\beta 7$ ^{129,130}. PA28 α et PA28 β , présents seulement chez les vertébrés à mâchoire, pourraient résulter d'une réplique de leur homologue PA28 γ , plus ancien^{131,132}. Les trois variantes diffèrent aussi par leur localisation intracellulaire. Alors que les unités PA28 α et PA28 β sont principalement présentes dans le cytosol, PA28 γ est particulièrement nucléaire¹³².

Le rôle de PA28 n'est pas complètement démystifié. Des évidences suggèrent qu'il serait impliqué dans la présentation antigénique : sa présence est nécessaire pour la présentation de certains épitopes et les cellules PA28 $\alpha\beta^{-/-}$ ont des niveaux plus faibles de CMHI^{133,134}. Cependant, la présence de PA28 γ chez des invertébrés comme *C. elegans*, exempts de système immunitaire adaptatif¹³¹, ainsi que la détection de PA28 γ et (plus faiblement) de PA28 α dans le cerveau, un site immuno-privilegié¹³⁵, suggèrent un rôle indépendant de la présentation antigénique. L'absence de PA28 n'a par ailleurs pas d'effets dramatiques sur la réponse T CD8⁺ dirigée contre une diversité de peptides provenant du virus de l'influenza^{134,136}. De surcroît, l'interaction de PA28 γ avec le tandem p53-MDM2¹³⁷ ou de PA28 α et γ avec MEKK3¹³⁸ suggèrent que certaines conformations du régulateur pourraient affecter d'autres processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou la réponse au stress.

En résumé, la diversité des molécules comprises dans le système ubiquitine-protéasome assure à la cellule un système de dégradation des protéines extrêmement bien régulé et permet de spécifier la nature des substrats à cliver selon l'état cellulaire. L'importance de ce système ne fait aucun doute : presque tous les gènes des unités 20S et 19S sont essentiels chez la levure¹³⁹. De toute évidence, les vertébrés ont raffiné encore davantage ce système par une spécialisation de certaines unités, notamment avec l'apparition de PA28 α , PA28 β ainsi que des sous-unités catalytiques de l'IP (voir section suivante).

1.3 Immunoprotéasome

Dans ce dernier volet du premier chapitre, nous porterons une attention particulière à la plasticité des sous-unités catalytiques du protéasome 20S. Nous nous attarderons donc à la dynamique de l'IP et du PC en terme d'expression, d'assemblage et de localisation, avant de faire état des connaissances sur la fonction de l'IP. Nous terminerons avec un rappel des objectifs qui seront développés dans les chapitres suivants de cette thèse.

1.3.1 Conservation et diversité du protéasome 20S

Le système ubiquitine / protéasome est probablement l'un des plus conservés chez les eucaryotes, comme le témoigne la structure hautement similaire des protéasomes chez la levure et le bovin^{69,113}. En fait, le protéasome est présent dans les trois grands domaines du vivant. Chez les archéobactéries comme *T. acidophilum*, par opposition aux cellules eucaryotes, le protéasome comporte des sous-unités α et β en même nombre mais identiques, sans aucune particule régulatrices (les sous-unités α pourraient jouer ce rôle)¹⁴⁰. Par conséquent, au niveau du cœur protéolytique, l'évolution a vu apparaître un remplacement ou une spécialisation des sous-unités ancestrales plutôt qu'une addition de nouvelles unités¹⁴⁰. En effet, les sous-unités catalytiques du PC pourraient provenir d'une triple réplication d'une seule sous-unité β bactérienne¹³².

En plus du PC, les vertébrés à mâchoire expriment un deuxième type de protéasome, l'IP, qui se distingue par ses sous-unités catalytiques¹³². Les deux sous-unités LMP (polypeptide de petite masse moléculaire) -2 et LMP7, remplaçant β 1 et β 5 respectivement, sont inducible par l'IFN γ et encodés dans le locus CMH, une région du chromosome 6 humain (17 chez la souris) riche en gènes associés à la réponse immunitaire¹⁴². Une troisième sous-unité inducible par l'IFN γ , la sous-unité du complexe endopeptidase multicatalytique 1 (MECL1, sur le chromosome 16 humain, 8 murin), remplace la sous-unité β 2^{143,144}. La divergence entre β 5 et LMP7 a été estimée à 597 ± 9 (E.S.) millions d'années, soit avant la divergence entre les vertébrés à mâchoire (gnathostoma) et sans mâchoire (agnatha), elle estimée à environ 461 ± 8 (E.S.) millions d'années¹⁴⁰. L'IP pourrait donc être exprimé dans l'ensemble des vertébrés. Les séquences des sous-unités humaines de l'IP LMP2, MECL1 et LMP7 et leurs homologues du PC sont identiques à 59,2%, 57,7% et 68,6% (46,0%, 46,0% et 57,6% par rapport aux sous-unités de la levure)¹¹³. En effet, les sous-unités de l'IP proviendraient d'une duplication de leurs homologues constitutifs, possiblement par une duplication ancestrale du locus CMH¹³². Le remplacement des sous-unités β 1, β 2 et β 5 par LMP2, MECL1 et LMP7 entraîne une augmentation des activités protéolytiques de type chymotrypsine et trypsine et une diminution de l'activité de type caspase¹³², en accord avec la structure modélisée de l'IP comparativement au PC¹¹³.

Plus récemment, une troisième forme de protéasome 20S a été découverte dans le thymus et par conséquent appelée « thymoprotéasome »¹⁴⁵. Le thymoprotéasome est un protéasome mixte composé de LMP2-MECL1- β 5t, la dernière unité étant exclusivement exprimée dans les cellules épithéliales corticales du thymus, lieu de sélection positive des lymphocytes T¹⁴⁵.

Ce type de protéasome aurait une activité chymotrypsine diminuée par rapport aux autres protéasomes, activité habituellement jugée comme importante pour la production de peptides ayant une bonne affinité pour le CMH I. En effet, le modèle actuellement accepté veut que le thymoprotéasome produise spécifiquement des peptides de faible affinité pour le CMH I, une condition privilégiée pour la sélection positive des lymphocytes T dans le thymus^{145,146}.

Enfin, l'incorporation de différents isoformes de la sous-unité $\alpha 4$ (PSMA8) et l'expression d'une nouvelle unité régulatrice appelée PA200 (seule ou en protéasome hybride avec l'unité 19S), trouvés principalement dans les testicules, a été observée chez les mammifères et chez la drosophile. Cet autre type de protéasome tissu-spécifique, appelé « spermatoprotéasome »^{93,147}, aurait un rôle particulier à jouer dans la dégradation des histones durant la réparation des dommages à l'ADN et dans la spermatogenèse. Cependant, l'effet moléculaire ou mécanistique que pourrait avoir l'incorporation de ces unités non catalytiques reste encore à élucider. Étant donné le sujet central de cette thèse – l'IP – nous nous concentrerons seulement sur les protéasomes 20S formés des sous-unités catalytiques de l'IP et du PC.

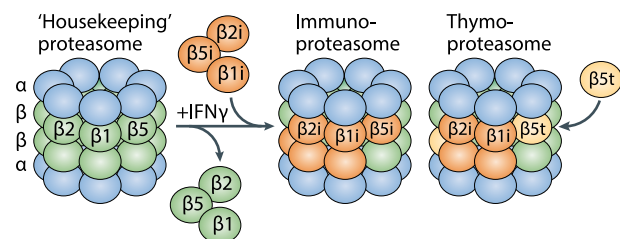


Figure 1.9 Types de protéasome 20S chez les vertébrés. Les trois sous-unités catalytiques du PC, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$, sont remplacées par les trois sous-unités IFN γ -inductibles LMP2 ($\beta 1i$), MECL1 ($\beta 2i$) et LMP7 ($\beta 5i$) pour former l'IP. Un troisième type de protéasome spécifique aux cellules épithéliales corticales du thymus (« thymoprotéasome ») est composé des sous-unités catalytiques LMP2, MECL1 et $\beta 5t$. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews in Immunology (Klein L *et al* ¹⁴¹), copyright (2009).

1.3.2 Dynamique du protéasome

1.3.2.1 Expression et régulation du PC et de l'IP

Comme mentionné précédemment, les sous-unités catalytiques de l'IP sont exprimées seulement chez les vertébrés. Plus précisément, l'IP est retrouvé constitutivement dans les cellules immunitaires comme les cellules dendritiques ou les lymphocytes et a été détecté dans certains organes comme la rate, le thymus, l'intestin et, de façon moins importante, dans le foie, le poumon et le colon^{148,149}. L'expression et l'incorporation des sous-unités de l'IP peuvent aussi être induites par stimulation, par exemple dans les cellules dendritiques traitées au LPS¹⁵⁰, dans les cellules non-immunitaires en présence de cytokines^{132,151} ou durant un stress cellulaire comme un choc thermique¹⁵². Toutefois, peu d'équipes ont tenté d'identifier clairement les molécules

impliquées dans la régulation de l'expression de l'IP.

Chez la levure, presque tous les promoteurs des gènes codant pour les sous-unités du 20S et du 19S contiennent un élément PACE (élément en *cis* activant le promoteur) reconnu par le facteur de transcription Rpn4¹⁵³. Une boucle rétroactive permet aussi à ce dernier de devenir une cible du protéasome. Un mécanisme semblable existe chez les cellules de mammifères : en période de stress oxydatif, le facteur de transcription TCF11 (une forme longue du facteur NRF1) se déplace du réticulum endoplasmique au noyau, où il lie les éléments de réponse antioxydants (ARE) des gènes codants pour les sous-unités du PC et active leur transcription¹⁵⁴. En absence de stress, TCF11 devient un substrat du protéasome par la voie de dégradation ERAD¹⁵⁴. Or, certaines évidences (outre leur profil d'expression distinct) démontrent que le PC et l'IP pourraient être régulés par différents facteurs. Par exemple, un blocage de l'activité du protéasome avec des inhibiteurs comme la lactacystine et MG132 résulte en une surexpression rétroactive des transcrits codant pour les sous-unités du PC mais pas ceux de l'IP¹⁵⁵. De plus, bien que les deux types de protéasome soient induits durant un stress oxydatif, LMP2 et LMP7 ne contiennent pas d'élément ARE et le knockdown de NRF2, un autre facteur important dans la régulation du PC dans ce contexte, a peu d'effet sur l'expression de ces sous-unités de l'IP¹⁵⁶. Le transactivateur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CIITA), entre autre responsable de la surexpression des gènes associés au locus du CMH en présence d'IFN γ , pourrait être un régulateur de l'IP. Toutefois, l'expression d'IP dans des lignées cellulaires déficientes en CIITA suggère que d'autres facteurs sont impliqués¹⁵⁷. Par ailleurs, il a été récemment démontré que l'expression basale de *Lmp2*, *Mecl1* et *Lmp7* peut être contrôlée par PU.1, un régulateur important de la différenciation des cellules hématopoïétiques (et notamment des cellules dendritiques)^{158,159}. D'autres facteurs comme IRF1 et STAT1 contrôleraient aussi l'expression de l'IP en présence d'IFN γ ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Bref, d'autres investigations sont nécessaires afin de mieux définir l'ensemble des facteurs contrôlant de façon non-redondante l'expression du PC et de l'IP.

L'abondance et l'activité du protéasome est aussi régulée post-transcriptionnellement. Chez la levure, l'inhibition du protéasome par la dissociation du 20S et de l'unité régulatrice 19S est nécessaire pour maintenir la viabilité en phase stationnaire¹⁶⁴. D'autre part, la caspase 3 serait responsable de la dégradation de certaines sous-unités du 20S et du 19S durant l'apoptose chez les cellules de drosophile et de mammifères¹⁶⁵. Enfin, certaines sous-unités comme $\alpha 3$, $\alpha 7$ et des unités ATPases du 19S peuvent être modifiées post-traductionnellement par phosphorylation ou *O*-glycosylation chez la drosophile et les mammifères. La raison de ces modifications post-traductionnelles n'est pas totalement claire mais elles pourraient permettre de réguler l'activité

protéolytique ou aider à l'assemblage des sous-unités^{166,167}. Ces observations démontrent que la régulation de la production, de l'abondance et de l'activité du protéasome est finement ajustée selon le contexte cellulaire. Comme pour les régulateurs transcriptionnels, il reste à déterminer si le PC et l'IP sont modifiés post-traductionnellement de façon similaire ou distincte pour parfaire leurs fonctions cellulaires respectives.

1.3.2.2 Assemblage des sous-unités et types de protéasome 20S

L'assemblage du protéasome nécessite l'aide des chaperonnes PAC (chaperonne d'assemblage du protéasome)-1-4 et passe par plusieurs stades intermédiaires, chacun avec une demi-vie considérablement plus courte que le complexe mature (5h vs 40h)¹⁶⁸ (voir figure 1.10). L'hétérodimère PAC1-PAC2 est présent dès la première étape, soit l'assemblage des anneaux α , et prévient leur agrégation¹⁶⁹. PAC3-PAC4 coopère aussi à l'assemblage des sous-unités α bien qu'il soit détaché du complexe avant la formation de demi-protéasomes¹⁷⁰. Les anneaux α assemblés servent ensuite d'échafaudage pour la formation des anneaux β . Contrairement aux sous-unités α , les unités β (à l'exception de $\beta 3$ et $\beta 4$) sont traduites sous forme de précurseurs contenant une pro-séquence qui facilite le recrutement et l'assemblage des sous-unités¹⁷¹. Les premières sous-unités β à être incorporées sont $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ (complexe 13S), suivies d'une deuxième phase incorporant successivement $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 1$ pour former le demi-protéasome (figure 1.10). L'inclusion de $\beta 7$ permet de dimériser deux demi-protéasome pour former le complexe final^{168,172}. Les pro-séquences des sous-unités β sont finalement autoclivées *in trans* par les unités catalytiques, finalisant le processus de maturation par l'activation du complexe¹⁷¹. PAC1-PAC2, qui ne sont plus nécessaires, sont alors dégradées par le protéasome activé^{169,173,174}.

La dynamique d'incorporation des sous-unités de l'IP est quelque peu différente de celle du PC. Alors que MECL1 et LMP7 sont, comme leurs homologues $\beta 2$ et $\beta 5$, incorporés respectivement dans la première et la deuxième phase intermédiaire, LMP2 est à l'opposé de son alter ego inclut dans la première phase¹⁶⁸. Bien que la stimulation à l'IFN γ stimule l'expression des sous-unités de l'IP, elle n'entraîne pas nécessairement une sous-expression des sous-unités constitutives. Il est suggéré que l'assemblage préférentiel des constituants de l'IP soit plutôt dû à leur plus grande affinité pour le complexe en construction¹⁷⁵. En effet, l'assemblage des demi-protéasomes puis leur dimérisation se fait avec l'assistance de la chaperone POMP (protéine de maturation du protéasome, aussi appelée protéasembline ou UMP1, protéolyse dépendante de l'ubiquitine 1)^{173,174}. POMP, surexprimé en présence d'IFN γ , favoriserait l'assemblage d'IP grâce à son affinité pour LMP7¹⁷⁶, contribuant à la production d'IPs au détriment de PCs¹¹⁵. De plus,

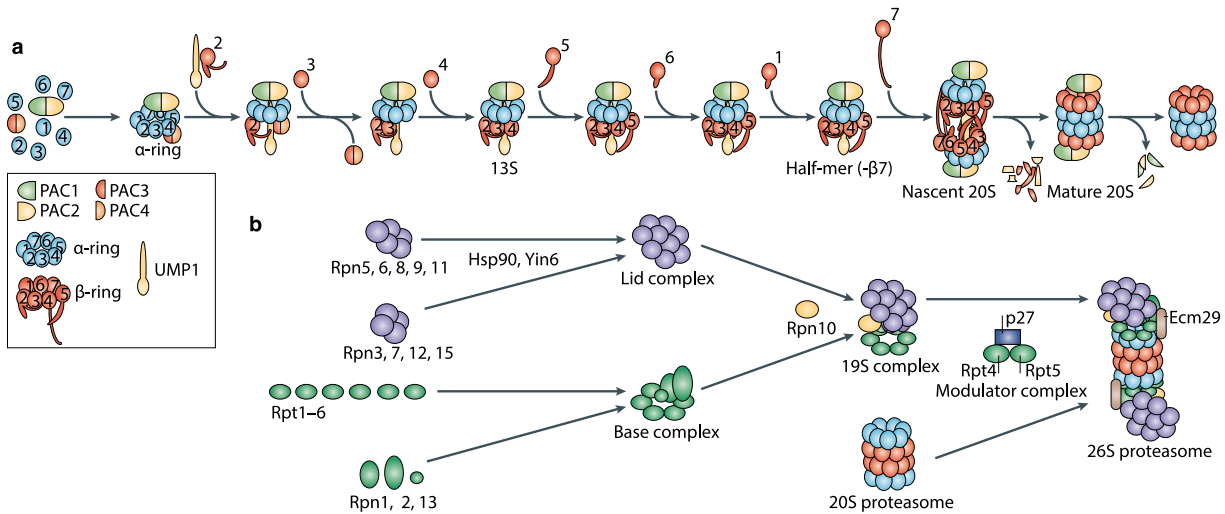


Figure 1.10 Assemblage du protéasome. a) Le protéasome 20S est assemblé avec l'assistance de différentes chaperonnes. La présence de PAC1-PAC2 permet l'assemblage des anneaux α et évite leur agrégation. Les anneaux α servent ensuite de base à l'association des sous-unités β . $\beta 2$ est d'abord incorporée avec la chaperonne UMP1 (POMP). Suivent les sous-unités $\beta 3$ et $\beta 4$ qui, avec le relâchement de PAC3-PAC4 forment l'étape intermédiaire 13S. $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 1$ sont ensuite ajoutées pour former le demi-protéasome (sans $\beta 7$). Enfin, l'incorporation de $\beta 7$ permet la dimérisation de ces complexes, la maturation finale par autoclavage des pro-séquences et la dégradation des chaperonnes PAC1-PAC2 et UMP1. **b)** L'assemblage de l'unité régulatrice 19S est moins bien définie mais il a été suggéré que la base et le couvercle sont assemblés de façon indépendante. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular cell biology (Murata S *et al*¹¹⁵), copyright (2009).

les sous-unités de l'IP sont incluses de façon interdépendantes : alors que LMP2 est incorporé davantage (mais pas exclusivement) en présence de MECL1, MECL1 et LMP7 sont inclus préférentiellement en présence de LMP2^{177,178}. La présence de LMP7 serait aussi nécessaire au clivage des pro-séquences de LMP2 et MECL1¹⁷⁸. Cette interdépendance dans l'incorporation et la maturation des sous-unités favorise la production d'IPs ou de PCs homogènes. Néanmoins, LMP7 peut s'incorporer en présence de $\beta 1$ et/ou de $\beta 2$ et des protéasomes mixtes IP/CP ont été répertoriés, notamment sous les formes LMP2- $\beta 2$ -LMP7 et $\beta 1$ - $\beta 2$ -LMP7¹⁷⁹.

1.3.2.3 Localisation intracellulaire

De façon générale, le PC est distribué à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Dans le cytosol, son profil est généralisé mais souvent associé à la surface externe du réticulum endoplasmique, du golgi ou aux structures du cytosquelette comme les microtubules¹⁸⁰⁻¹⁸². L'association du PC avec le réticulum endoplasmique et le golgi pourrait faciliter la dégradation de protéines par le processus ERAD⁶². Dans le noyau, son patron est relativement homogène

ou associé à la matrice nucléaire, mais absent des nucléoles et de l'hétérochromatine^{183,184}. Le profil de l'IP est quelque peu différent : les sous-unités LMP2 et LMP7 sont généralement peu présentes dans le noyau et, dans le cytosol, situées à proximité du réticulum endoplasmique^{182,183}. Ceci pourrait favoriser la voie de présentation antigénique en rapprochant l'IP et le transporteur TAP (voir section 1.1.4), bien que l'hypothèse n'ait pas été formellement prouvée¹⁵.

La localisation du protéasome est cependant dynamique et les sous-unités diffusent rapidement dans la cellule¹⁸⁵. La localisation et spécialement la quantité de protéasome dans le cytosol versus le noyau sont aussi dépendantes du type cellulaire^{186,187}, du stade de développement¹⁸⁷, des conditions environnementales¹⁸⁸ et du cycle cellulaire^{180,181}. Une équipe a suivi le cheminement d'une protéine chimérique LMP2 couplée à son extrémité C-terminale à la GFP (protéine fluorescence verte) dans une lignée cellulaire de fibrosarcome. Ce système leur a permis de démontrer que LMP2 est entraînée par transport actif unidirectionnel du cytosol vers le noyau¹⁸⁵, probablement grâce à une séquence signal telle que décrite pour les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 7$ ^{189,190}. Chez la levure, un transport actif par l'intermédiaire du transporteur karyophérine $\alpha\beta$ permet aussi aux protéasomes immatures (stades précurseurs de formation) d'être introduits dans le noyau, où la maturation peut être complétée¹⁹¹. Suite à la désintégration du noyau durant la mitose, les complexes peuvent être redistribués dans la cellule¹⁸⁵. À l'opposé, on ne connaît pas de mécanisme par lequel le protéasome serait dirigé par transport actif du noyau vers le cytoplasme.

Certains agrésomes, constitués d'une accumulation de protéasomes et de protéines ubiquitylées, peuvent aussi se former dans le cytosol en situation de stress. De telles structures ont été observées par exemple en inhibant le protéasome, situation menant à l'accumulation de protéines ciblées pour la dégradation¹⁹². Cette accumulation transitoire pourrait prévenir les dommages cellulaires menant à l'apoptose¹⁹³. Des formations similaires, les structures de type PML (oncoprotéine de la leucémie promyélocytaire), sont aussi détectables dans le noyau et le traitement à l'IFN γ induirait l'accumulation d'IP et de PA28 dans ces structures¹⁹⁴. La dynamique de localisation du PC et de l'IP dans différentes conditions suggère qu'ils se localisent aux endroits où leur activité protéolytique est nécessaire. Ces données, couplées à la différence de profil entre ces deux types de protéasome non seulement dans différents tissus mais aussi au sein d'une même cellule, suggèrent également que l'IP et le PC pourraient accomplir des fonctions cellulaires non redondantes.

1.3.3 Fonctions connues ou suggérées de l'immunoprotéasome et objectif général

Deux raisons ont poussé la plupart des chercheurs à croire que le rôle principal de l'IP est de produire des peptides pour la voie de présentation antigénique de classe I. D'abord, l'IP a été découvert au moment où l'on attribuait au protéasome un rôle central comme producteur de peptides de classe I⁵³. Ensuite, deux des trois gènes codant pour les sous-unités catalytiques de l'IP font partie du locus CMH, une région riche en gènes associés à la réponse immunitaire et notamment à la présentation antigénique¹⁴². Des essais *in vitro* et *in vivo* ont par la suite permis de confirmer l'implication de l'IP dans la production de peptides de classe I^{15,195-197}. Or les résultats de ces essais, souvent contradictoires, sur des modèles peptidiques et quelques protéines sources n'ont pas permis de définir de façon globale l'impact de l'IP sur l'ensemble du répertoire de peptides associés aux CMH I, ou « immunopeptidome ».

Parallèlement, d'autres études ont démontré que l'absence de certaines sous-unités de l'IP affecte la fonction et le comportement de cellules immunitaire de façon CMH I-indépendante. Par exemple, des souris *Mecl1*^{-/-} ont un plus grand ratio de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺, dû à une diminution du nombre de T CD8⁺^{198,199}. L'abondance de CMH I à la surface des cellules n'est cependant pas affectée dans ces souris, ce qui exclue une sélection différente des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes du thymus. Ce ratio est aussi maintenu lorsque les cellules T sont transplantées dans une souris WT, confirmant l'effet intrinsèque aux lymphocytes¹⁹⁸. De plus, les lymphocytes T *Lmp7*^{-/-}*Mecl1*^{-/-} prolifèrent plus rapidement et ont un plus faible taux d'apoptose que les cellules WT lorsque stimulées par les activateurs PMA (phorbol myristate acetate)/ionomycine²⁰⁰. Une autre équipe a observé chez des souris *Lmp2*^{-/-} une diminution du nombre de lymphocytes B et une augmentation de leur taux d'apoptose²⁰¹ et, enfin, l'absence ou l'inhibition de différentes sous-unités de l'IP mène à une réduction de la sécrétion de cytokines par différents types cellulaires^{201,202}.

Or, l'activité du PC régule de nombreux processus cellulaires non-immunitaires (voir section 1.2.1) et il est envisageable que l'IP, de par sa nature très semblable, ait un effet tout aussi vaste. D'ailleurs, l'expression des sous-unités de l'IP a été détectée dans des lentilles oculaires de souris traités à l'IFN γ ²⁰³ et dans la rétine de souris âgées (15-20 mois)²⁰⁴, des tissus pourtant immuno-privilegiés, c'est-à-dire où la réponse immunitaire est réprimée. De plus, il a été observé que les cellules souches embryonnaires humaines sont riches en IP par rapport aux cellules somatiques différenciées : dans cette étude, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'IP a même permis de relever la pluripotence cellulaire^{205,206}. D'autres études ont également

attribué une fonction à l'IP dans la différenciation des myoblastes²⁰⁷ et dans la régulation de la masse musculaire cardiaque²⁰⁸. Néanmoins, dans la plupart des cas, les processus cellulaires dans lesquels l'IP pourrait jouer un rôle ne sont pas abordés expérimentalement.

Ces études suggèrent donc que l'IP a un rôle important à jouer dans l'organisme mais soulèvent plusieurs questions : quel est l'importance globale de l'IP dans l'immunité adaptative et principalement dans la présentation antigénique de classe I ? De quelle nature est son implication dans des processus immunitaires et/ou non-immunitaires indépendants de la présentation antigénique ? L'objectif principal de cette thèse est donc d'étudier l'impact cellulaire de l'IP, plus précisément dans les cellules dendritiques, reconnues pour exprimer constitutivement à la fois l'IP et le PC. À travers les deux chapitres suivants, nous répondrons à ces deux questions en explorant d'abord son impact sur l'ensemble du répertoire de peptides présentés sur les CMH I, puis sur un processus cellulaire indépendant mais connu pour être bien régulé par le PC, la transcription. Ce dernier rôle inédit de l'IP sur l'expression génique ouvre la voie à un impact potentiel extrêmement large de l'IP, qui pourrait expliquer les phénotypes IP-dépendants observés à la fois dans les cellules immunitaires et non-immunitaires.

1.4 Références bibliographiques

1. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
2. Bailey, M., Christoforidou, Z. & Lewis, M. Evolution of immune systems: specificity and autoreactivity. *Autoimmun.Rev.* **12**, 643-647 (2013).
3. Gellert, M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev.Biochem.* **71**, 101-132 (2002).
4. Alder, M.N., *et al.* Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science* **310**, 1970-1973 (2005).
5. Nagawa, F., *et al.* Antigen-receptor genes of the agnathan lamprey are assembled by a process involving copy choice. *Nat.Immunol.* **8**, 206-213 (2007).
6. Litman, G.W., Rast, J.P. & Fugmann, S.D. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* **10**, 543-553 (2010).
7. Rogozin, I.B., *et al.* Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat.Immunol.* **8**, 647-656 (2007).
8. Tarlinton, D. B-cell memory: are subsets necessary? *Nat Rev Immunol* **6**, 785-790 (2006).
9. Bevan, M.J. Understand memory, design better vaccines. *Nat Immunol* **12**, 463-465 (2011).
10. Kurosaki, T., Shinohara, H. & Baba, Y. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol* **28**, 21-55 (2010).
11. Delves, P.J. & Roitt, I.M. The immune system. Second of two parts. *The New England journal of medicine* **343**, 108-117 (2000).
12. Calame, K.L., Lin, K.I. & Tunyaplin, C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annual review of immunology* **21**, 205-230 (2003).

13. Jefferis, R., Lund, J. & Pound, J.D. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunological reviews* **163**, 59-76 (1998).
14. Tangye, S.G., Ferguson, A., Avery, D.T., Ma, C.S. & Hodgkin, P.D. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol* **169**, 4298-4306 (2002).
15. Kloetzel, P.M. Antigen processing by the proteasome. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 179-187 (2001).
16. Kabelitz, D., Wesch, D. & Hinz, T. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin.Immunopathol.* **21**, 55-75 (1999).
17. Starr, T.K., Jameson, S.C. & Hogquist, K.A. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* **21**, 139-176 (2003).
18. Barry, M. & Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 401-409 (2002).
19. Reinhardt, R.L., Kang, S.J., Liang, H.E. & Locksley, R.M. T helper cell effector fates--who, how and where? *Curr.Opin.Immunol.* **18**, 271-277 (2006).
20. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 523-532 (2008).
21. Sousa, R.e. Dendritic cells in a mature age. *Nat.Rev.Immunol.* **6**, 476-483 (2006).
22. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **5**, 987-995 (2004).
23. Barton, G.M. & Kagan, J.C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat.Rev.Immunol.* **9**, 535-542 (2009).
24. Lauw, F.N., Caffrey, D.R. & Golenbock, D.T. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* **26**, 509-511 (2005).
25. Lee, S.M., *et al.* Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3793-3798 (2014).

26. Regan, T., *et al.* Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol* **191**, 6084-6092 (2013).
27. Guan, Y., *et al.* Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* **184**, 5094-5103 (2010).
28. Sporri, R. & Sousa, R.e. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat.Immunol.* **6**, 163-170 (2005).
29. Heath, W.R. & Villadangos, J.A. No driving without a license. *Nat.Immunol.* **6**, 125-126 (2005).
30. Steinman, R.M. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat.Med.* **13**, 1155-1159 (2007).
31. Hochweller, K., *et al.* Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 5931-5936 (2010).
32. Kirberg, J., Berns, A. & von, B.H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J.Exp. Med.* **186**, 1269-1275 (1997).
33. Van, V.Q., *et al.* Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J.* **25**, 5560-5568 (2006).
34. Geissmann, F., *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).
35. Teft, W.A., Kirchhof, M.G. & Madrenas, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual review of immunology* **24**, 65-97 (2006).
36. Proietto, A.I., *et al.* Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 19869-19874 (2008).
37. Kapsenberg, M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev.Immunol.* **3**, 984-993 (2003).

38. Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W. & Hansbro, P.M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* **123**, 326-338 (2008).
39. Liu, K., *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* **324**, 392-397 (2009).
40. Shortman, K. & Heath, W.R. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunological reviews* **234**, 18-31 (2010).
41. Iyoda, T., *et al.* The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J.Exp.Med.* **195**, 1289-1302 (2002).
42. Dudziak, D., *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**, 107-111 (2007).
43. Ardavin, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* **3**, 582-590 (2003).
44. Reizis, B. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Current opinion in immunology* **22**, 206-211 (2010).
45. Tezuka, H., *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929-933 (2007).
46. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. **19**, 59-70 (2003).
47. Segura, E. & Villadangos, J.A. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin.Immunol.* **21**, 105-110 (2009).
48. Romani, N., Clausen, B.E. & Stoitzner, P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol.Rev.* **234**, 120-141 (2010).
49. Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., Naik, S.H. & Kershaw, M.H. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J.Immunol.* **179**, 7577-7584 (2007).

50. Mester, G., Hoffmann, V. & Stevanovic, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol.Life Sci.* **68**, 1521-1532 (2011).
51. Vyas, J.M., Van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat.Rev.Immunol.* **8**, 607-618 (2008).
52. Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 952-961 (2003).
53. Rock, K.L., *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761-771 (1994).
54. Howarth, M., Williams, A., Tolstrup, A.B. & Elliott, T. Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 11737-11742 (2004).
55. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* **1**, 126-134 (2001).
56. Schubert, U., *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774 (2000).
57. Reits, E., *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity.* **18**, 97-108 (2003).
58. Yeager, M., Carrington, M. & Hughes, A.L. Class I and class II MHC bind self peptide sets that are strikingly different in their evolutionary characteristics. *Immunogenetics* **51**, 8-15 (2000).
59. Lippolis, J.D., *et al.* Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets. *J.Immunol.* **169**, 5089-5097 (2002).
60. O'Brien, C., Flower, D.R. & Feighery, C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome.Res.* **4**, 6 (2008).

61. Tel, J., *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* **121**, 459-467 (2013).
62. Werner, E.D., Brodsky, J.L. & McCracken, A.A. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 13797-13801 (1996).
63. Guermonprez, P., *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402 (2003).
64. Houde, M., *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
65. Spencer, C.T., *et al.* Sculpting MHC class II-restricted self and non-self peptidome by the class I Ag-processing machinery and its impact on Th-cell responses. *Eur.J.Immunol.* **43**, 1162-1172 (2013).
66. Schmid, D. & Munz, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*. **27**, 11-21 (2007).
67. Wakim, L.M. & Bevan, M.J. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature* **471**, 629-632 (2011).
68. Hilt, W. & Wolf, D.H. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 96-102 (1996).
69. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428 (2002).
70. Adams, J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat.Rev.Cancer* **4**, 349-360 (2004).
71. Hideshima, T., *et al.* The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* **61**, 3071-3076 (2001).
72. Guzman, M.L., *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 16220-16225 (2002).

73. Hideshima, T., *et al.* Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* **101**, 1530-1534 (2003).
74. Sunwoo, J.B., *et al.* Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.* **7**, 1419-1428 (2001).
75. Read, M.A., *et al.* The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity.* **2**, 493-506 (1995).
76. Nefedova, Y., Landowski, T.H. & Dalton, W.S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* **17**, 1175-1182 (2003).
77. Richardson, P.G., *et al.* A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N.Engl.J.Med.* **348**, 2609-2617 (2003).
78. Shah, I.M., Lees, K.R., Pien, C.P. & Elliott, P.J. Early clinical experience with the novel proteasome inhibitor PS-519. *British journal of clinical pharmacology* **54**, 269-276 (2002).
79. Pangalos, M.N., Jacobsen, S.J. & Reinhart, P.H. Disease modifying strategies for the treatment of Alzheimer's disease targeted at modulating levels of the beta-amyloid peptide. *Biochem.Soc.Trans.* **33**, 553-558 (2005).
80. Wellington, C.L., *et al.* Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J.Biol.Chem.* **273**, 9158-9167 (1998).
81. Seo, H., Sonntag, K.C. & Isacson, O. Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann.Neurol.* **56**, 319-328 (2004).
82. Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death.Differ.* **12 Suppl 2**, 1542-1552 (2005).
83. Kristiansen, M., *et al.* Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol.Cell* **26**, 175-188 (2007).

84. Goldberg, A.L. On prions, proteasomes, and mad cows. *N.Engl.J.Med.* **357**, 1150-1152 (2007).
85. Breusing, N. & Grune, T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol.Chem.* **389**, 203-209 (2008).
86. Shimura, H., *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat.Genet.* **25**, 302-305 (2000).
87. McNaught, K.S. & Olanow, C.W. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* **53 Suppl 3**, S73-S84 (2003).
88. Watts, G.D., *et al.* Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat.Genet.* **36**, 377-381 (2004).
89. McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L. & Olanow, C.W. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* **56**, 149-162 (2004).
90. Weissman, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 169-178 (2001).
91. Pickart, C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu.Rev.Biochem.* **70**, 503-533 (2001).
92. Hon, W.C., *et al.* Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* **417**, 975-978 (2002).
93. Dikic, I., Wakatsuki, S. & Walters, K.J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 659-671 (2009).
94. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C.M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94-102 (2000).
95. Hoppe, T., *et al.* Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-586 (2000).

96. Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. & Finley, D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1265-1273 (1995).
97. Arnason, T. & Ellison, M.J. Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol. Cell Biol.* **14**, 7876-7883 (1994).
98. Spence, J., *et al.* Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**, 67-76 (2000).
99. Deng, L., *et al.* Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361 (2000).
100. Hicke, L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol.* **9**, 107-112 (1999).
101. Wang, X., *et al.* Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J. Cell Biol.* **177**, 613-624 (2007).
102. Cadwell, K. & Coscoy, L. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**, 127-130 (2005).
103. Xu, P., *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-145 (2009).
104. Zhou, W., Wang, X. & Rosenfeld, M.G. Histone H2A ubiquitination in transcriptional regulation and DNA damage repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 12-15 (2009).
105. Geng, F., Wenzel, S. & Tansey, W.P. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 177-201 (2012).
106. Wang, H., *et al.* Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* **22**, 383-394 (2006).
107. Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. & Ronai, Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* **101**, 753-762 (2000).

108. Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. & Hay, R.T. SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol.Cell* **2**, 233-239 (1998).
109. Komander, D., Clague, M.J. & Urbe, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **10**, 550-563 (2009).
110. Katz, E.J., Isasa, M. & Crosas, B. A new map to understand deubiquitination. *Biochem. Soc.Trans.* **38**, 21-28 (2010).
111. Groothuis, T.A., Dantuma, N.P., Neefjes, J. & Salomons, F.A. Ubiquitin crosstalk connecting cellular processes. *Cell Div.* **1**, 21 (2006).
112. Dantuma, N.P., Groothuis, T.A., Salomons, F.A. & Neefjes, J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J.Cell Biol.* **173**, 19-26 (2006).
113. Unno, M., *et al.* The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure.* **10**, 609-618 (2002).
114. Groll, M., *et al.* Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471 (1997).
115. Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **10**, 104-115 (2009).
116. Arendt, C.S. & Hochstrasser, M. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **94**, 7156-7161 (1997).
117. Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J. & Davies, K.J. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J.Biol.Chem.* **278**, 311-318 (2003).
118. Orłowski, M. & Wilk, S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **415**, 1-5 (2003).
119. Braun, B.C., *et al.* The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat.Cell Biol.* **1**, 221-226 (1999).

120. Kohler, A., *et al.* The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol.Cell* **7**, 1143-1152 (2001).
121. Glickman, M.H., *et al.* A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623 (1998).
122. Holzl, H., *et al.* The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J.Cell Biol.* **150**, 119-130 (2000).
123. Bech-Otschir, D., *et al.* Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **16**, 219-225 (2009).
124. Groll, M., *et al.* A gated channel into the proteasome core particle. *Nat.Struct.Biol.* **7**, 1062-1067 (2000).
125. Hendil, K.B., Khan, S. & Tanaka, K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem.J.* **332 (Pt 3)**, 749-754 (1998).
126. Tanahashi, N., *et al.* Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J.Biol.Chem.* **275**, 14336-14345 (2000).
127. Ma, C.P., Slaughter, C.A. & DeMartino, G.N. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J.Biol.Chem.* **267**, 10515-10523 (1992).
128. Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J.Biol.Chem.* **267**, 22369-22377 (1992).
129. Realini, C., *et al.* Characterization of recombinant REGalpha, REGbeta, and REGgamma proteasome activators. *J.Biol.Chem.* **272**, 25483-25492 (1997).
130. Zhang, Z., *et al.* Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers. *Biochemistry* **38**, 5651-5658 (1999).

131. Kandil, E., Kohda, K., Ishibashi, T., Tanaka, K. & Kasahara, M. PA28 subunits of the mouse proteasome: primary structures and chromosomal localization of the genes. *Immunogenetics* **46**, 337-344 (1997).
132. Tanaka, K. & Kasahara, M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol.Rev.* **163**, 161-176 (1998).
133. Preckel, T., *et al.* Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science* **286**, 2162-2165 (1999).
134. Murata, S., *et al.* Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J.* **20**, 5898-5907 (2001).
135. Rechsteiner, M. & Hill, C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* **15**, 27-33 (2005).
136. de Graaf, N., *et al.* PA28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of MHC class I-binding peptides in vivo. *Eur.J.Immunol.* **41**, 926-935 (2011).
137. Zhang, Z. & Zhang, R. Proteasome activator PA28 gamma regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *EMBO J.* **27**, 852-864 (2008).
138. Hagemann, C., Patel, R. & Blank, J.L. MEKK3 interacts with the PA28 gamma regulatory subunit of the proteasome. *Biochem.J.* **373**, 71-79 (2003).
139. Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. & Seemuller, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380 (1998).
140. Hughes, A.L. Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics* **46**, 82-92 (1997).
141. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat.Rev.Immunol.* **9**, 833-844 (2009).
142. Horton, R., *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat.Rev.Genet.* **5**, 889-899 (2004).

143. Groettrup, M., *et al.* A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur.J.Immunol.* **26**, 863-869 (1996).
144. Hisamatsu, H., *et al.* Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J.Exp.Med.* **183**, 1807-1816 (1996).
145. Murata, S., *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349-1353 (2007).
146. Ziegler, A., Muller, C.A., Bockmann, R.A. & Uchanska-Ziegler, B. Low-affinity peptides and T-cell selection. *Trends Immunol.* **30**, 53-60 (2009).
147. Qian, M.X., *et al.* Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell* **153**, 1012-1024 (2013).
148. Kuckelkorn, U., *et al.* Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J.Exp.Med.* **195**, 983-990 (2002).
149. Pelletier, S., *et al.* Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry. *Mol.Biosyst.* **6**, 1450-1453 (2010).
150. Macagno, A., *et al.* Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur.J.Immunol.* **29**, 4037-4042 (1999).
151. Khan, S., *et al.* Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J.Immunol.* **167**, 6859-6868 (2001).
152. Callahan, M.K., Wohlfert, E.A., Menoret, A. & Srivastava, P.K. Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. *J.Immunol.* **177**, 8393-8399 (2006).
153. Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I. & Feldmann, H. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27-34 (1999).
154. Steffen, J., Seeger, M., Koch, A. & Kruger, E. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol.Cell* **40**, 147-158 (2010).

155. Meiners, S., *et al.* Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J.Biol.Chem.* **278**, 21517-21525 (2003).
156. Pickering, A.M., Linder, R.A., Zhang, H., Forman, H.J. & Davies, K.J. Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alpha regulator are required for adaptation to oxidative stress. *J Biol Chem* **287**, 10021-10031 (2012).
157. Londhe, P., Zhu, B., Abraham, J., Keller, C. & Davie, J. CIITA is silenced by epigenetic mechanisms that prevent the recruitment of transactivating factors in rhabdomyosarcoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **131**, E437-448 (2012).
158. Carotta, S., Wu, L. & Nutt, S.L. Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response. *Immunological reviews* **238**, 63-75 (2010).
159. Yang, X.W., *et al.* Coordinated regulation of the immunoproteasome subunits by PML/RARalpha and PU.1 in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* (2013).
160. Namiki, S., *et al.* IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS letters* **579**, 2781-2787 (2005).
161. Foss, G.S. & Prydz, H. Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *J Biol Chem* **274**, 35196-35202 (1999).
162. Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S., Jr. & Monaco, J.J. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J Immunol* **169**, 3046-3052 (2002).
163. Marques, L., Brucet, M., Lloberas, J. & Celada, A. STAT1 regulates lipopolysaccharide- and TNF-alpha-dependent expression of transporter associated with antigen processing 1 and low molecular mass polypeptide 2 genes in macrophages by distinct mechanisms. *J Immunol* **173**, 1103-1110 (2004).
164. Bajorek, M., Finley, D. & Glickman, M.H. Proteasome disassembly and downregulation is correlated with viability during stationary phase. *Curr.Biol.* **13**, 1140-1144 (2003).

165. Adrain, C., Creagh, E.M., Cullen, S.P. & Martin, S.J. Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in *Drosophila* and man. *J.Biol. Chem.* **279**, 36923-36930 (2004).
166. Mason, G.G., Murray, R.Z., Pappin, D. & Rivett, A.J. Phosphorylation of ATPase subunits of the 26S proteasome. *FEBS Lett.* **430**, 269-274 (1998).
167. Sumegi, M., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradzsky, K.F. & Udvardy, A. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **312**, 1284-1289 (2003).
168. Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B. & Monaco, J.J. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J.* **16**, 5363-5375 (1997).
169. Hirano, Y., *et al.* A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* **437**, 1381-1385 (2005).
170. Hirano, Y., *et al.* Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Mol.Cell* **24**, 977-984 (2006).
171. Schmidtke, G., *et al.* Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.* **15**, 6887-6898 (1996).
172. Hirano, Y., *et al.* Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* **27**, 2204-2213 (2008).
173. Burri, L., *et al.* Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 10348-10353 (2000).
174. Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. & Dohmen, R.J. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**, 489-499 (1998).
175. Schmidt, M. & Kloetzel, P.M. Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *FASEB J.* **11**, 1235-1243 (1997).

176. Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M. & Kruger, E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A* **102**, 9241-9246 (2005).
177. Kuckelkorn, U., *et al.* Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur.J.Immunol.* **25**, 2605-2611 (1995).
178. Griffin, T.A., *et al.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J.Exp.Med.* **187**, 97-104 (1998).
179. De, M., *et al.* Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. *J.Biol.Chem.* **278**, 6153-6159 (2003).
180. Amsterdam, A., Pitzer, F. & Baumeister, W. Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 99-103 (1993).
181. Palmer, A., Mason, G.G., Paramio, J.M., Knecht, E. & Rivett, A.J. Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur.J.Cell Biol.* **64**, 163-175 (1994).
182. Palmer, A., *et al.* Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem.J.* **316 (Pt 2)**, 401-407 (1996).
183. Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B. & Rivett, A.J. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem.J.* **352 Pt 3**, 611-615 (2000).
184. De Conto, F., *et al.* In mouse myoblasts nuclear prosomes are associated with the nuclear matrix and accumulate preferentially in the perinucleolar areas. *J.Cell Sci.* **113 (Pt 13)**, 2399-2407 (2000).
185. Reits, E.A., Benham, A.M., Plougastel, B., Neefjes, J. & Trowsdale, J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* **16**, 6087-6094 (1997).
186. Rivett, A.J., Palmer, A. & Knecht, E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J.Histochem.Cytochem.* **40**, 1165-1172 (1992).

187. Wojcik, C. & DeMartino, G.N. Intracellular localization of proteasomes. *Int.J.Biochem. Cell Biol.* **35**, 579-589 (2003).
188. Machiels, B.M., Henfling, M.E., Broers, J.L., Hendil, K.B. & Ramaekers, F.C. Changes in immunocytochemical detectability of proteasome epitopes depending on cell growth and fixation conditions of lung cancer cell lines. *Eur.J.Cell Biol.* **66**, 282-292 (1995).
189. Tanaka, K., *et al.* Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett.* **271**, 41-46 (1990).
190. Wang, H.R., Kania, M., Baumeister, W. & Nederlof, P.M. Import of human and *Thermoplasma* 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. *Eur.J.Cell Biol.* **73**, 105-113 (1997).
191. Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.M. & Enenkel, C. 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J.Mol.Biol.* **317**, 401-413 (2002).
192. Bence, N.F., Sampat, R.M. & Kopito, R.R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**, 1552-1555 (2001).
193. Kopito, R.R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524-530 (2000).
194. Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J. & DeMartino, G.N. Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J.Cell Sci.* **114**, 29-36 (2001).
195. Kloetzel, P.M. & Osendorp, F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* **16**, 76-81 (2004).
196. Toes, R.E., *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J.Exp.Med.* **194**, 1-12 (2001).
197. Sijts, A., *et al.* The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol.Immunol.* **39**, 165-169 (2002).

198. Zaiss, D.M., de, G.N. & Sijts, A.J. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect.Immun.* **76**, 1207-1213 (2008).
199. Basler, M., Moebius, J., Elenich, L., Groettrup, M. & Monaco, J.J. An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J.Immunol.* **176**, 6665-6672 (2006).
200. Caudill, C.M., *et al.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J.Immunol.* **176**, 4075-4082 (2006).
201. Hensley, S.E., *et al.* Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J.Immunol.* **184**, 4115-4122 (2010).
202. Muchamuel, T., *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* **15**, 781-787 (2009).
203. Singh, S., Awasthi, N., Ekwuagu, C.E. & Wagner, B.J. Immunoproteasome expression in a nonimmune tissue, the ocular lens. *Arch.Biochem.Biophys.* **405**, 147-153 (2002).
204. Hussong, S.A., Kapphahn, R.J., Phillips, S.L., Maldonado, M. & Ferrington, D.A. Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *J.Neurochem.* **113**, 1481-1490 (2010).
205. Atkinson, S.P., *et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1373-1384 (2012).
206. Vilchez, D., *et al.* Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature* **489**, 304-308 (2012).
207. Cui, Z., Hwang, S.M. & Gomes, A.V. Identification of the Immunoproteasome as a Novel Regulator of Skeletal Muscle Differentiation. *Mol.Cell Biol.* (2013).
208. Zu, L., *et al.* Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating cardiac muscle mass in diabetic mice. *J.Mol.Cell Cardiol.* **49**, 5-15 (2010).

CHAPITRE 2

ARTICLE

Deletion of Immunoproteasome Subunits Imprints on the Transcriptome and Has a Broad Impact on Peptides Presented by Major Histocompatibility Complex I molecules

Référence de publication :

Mol Cell Proteomics. 2010 Sep;9(9): 2034-47

2 Deletion of Immunoproteasome Subunits Imprints on the Transcriptome and Has a Broad Impact on Peptides Presented by Major Histocompatibility Complex I molecules

Running title: The Role of Immunoproteasomes

Danielle de Verteuil^{‡§¶}, Tara L. Muratore-Schroeder^{‡¶}, Diana P. Granados^{‡§},
Marie-Hélène Fortier^{‡¶}, Marie-Pierre Hardy^{‡§}, Alexandre Bramoullé^{‡¶}, Étienne Caron^{‡§}, Krystel
Vincent^{‡§}, Sylvie Mader[‡], Sébastien Lemieux[‡], Pierre Thibault^{‡¶}
& Claude Perreault^{‡§}

From the [‡]Institute for Research in Immunology and Cancer, [§]Department of Medicine, and
[¶]Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. [¶]These authors
contributed equally to this work.

2.1 Présentation de l'article

Le principal rôle connu de l'IP est de produire des peptides pour lier spécifiquement le CMH I. Des études comparant la production de peptides en présence ou en absence d'IP ont été faites *in vitro* et ont démontré que l'IP et le PC produisent certains peptides de façon identique mais aussi d'autres peptides de façon distincte^{1, 2}. Cependant, l'impossibilité de prévenir de multiples clivages successifs de la même protéine et l'absence de contexte cellulaire (notamment de TAP, ERAAP, CMH I et autres peptidases et de leurs actions ou affinités respectives) rendent la comparaison avec la situation *in vivo* difficile, surtout lorsqu'il s'agit de prédire l'effet potentiel de l'IP sur l'immunopeptidome. Des études *in vivo* sur un nombre restreint de peptides modèles, particulièrement des peptides viraux ou tumoraux, démontrent aussi une absence de consensus quant à l'avantage de la présence d'IP pour produire ces épitopes et ne fournissent pas de réponse quant à son effet sur l'ensemble du répertoire de peptides liant le CMH I³⁻⁹.

Le premier objectif de cette thèse était donc de déterminer l'impact global de l'IP sur l'immunopeptidome de cellules primaires. Nous avons récolté les peptides présentés à la surface de cellules de type sauvage (WT) et déficientes en deux des trois sous-unités de l'IP (dKO). Étant donné que le clivage par le protéasome dépend de la nature du résidu à cliver mais aussi des séquences environnantes sur la protéine source¹⁰, nous avons également comparé les régions flanquant les peptides récoltés pour tenter de déterminer les préférences de clivage en présence et en absence d'IP *in vivo*.

Dans le cadre de ce chapitre et du suivant, la cellule dendritique a été choisie comme modèle pour deux raisons particulières : 1) son expression constitutive d'IP et 2) sa fonction principale comme cellule présentatrice d'antigène. À des fins pratiques, étant donné la diversité de fonction des sous-types de cellules dendritiques (voir section 1.1.3) et leur expression minoritaire dans les différents tissus¹¹, celles-ci ont été produites *ex vivo* à partir de la moelle osseuse de souris, permettant d'obtenir une population cellulaire relativement homogène et en grande quantité. La stimulation avec du GM-CSF et la maturation avec du LPS a permis de produire une population à environ 80% de cellules CD11c⁺CD8⁻CD11b⁺ (voir figure 2.1), un profil similaire aux cDCs myéloïdes.

2.2 Contribution des co-auteurs

J'ai contribué de façon majeure à la planification et à l'exécution des expériences, à l'interprétation des résultats, aux analyses bioinformatiques et à la rédaction de l'article. J'ai participé à la planification et à l'exécution de toutes les expériences à l'exception de la partie impliquant la spectrométrie de masse (exécutée par Tara L. Muratore-Schroeder, aussi co-première auteure, ainsi que Marie-Hélène Fortier) et des immunisations de souris (exécutées par Marie-Pierre Hardy), sous la supervision des Drs Claude Perreault et Pierre Thibault. J'ai aussi écrit l'article avec la collaboration de Tara L. Muratore-Schroeder, Diana P. Granados et Claude Perreault. Les autres co-auteurs ont eu une contribution significative à certaines portions seulement des expériences ou des analyses.

Ma contribution dans les différentes figures et tableaux de l'article :

- Figure 2.1 75%
- Figure 2.2 60%
- Figure 2.3 40%
- Figure 2.4 60%
- Figure 2.5 80%
- Figure 2.S1 0%
- Tableau 2.1 50%
- Tableau 2.S1 40%
- Tableau 2.S2 100%
- Tableau 2.S3 100%
- Tableau 2.S4 40%

2.3 Abbreviations

The abbreviations used are: β 2m, β 2-microglobulin; CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl ester; DC, dendritic cell; dKO, *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* double-knockout mice; IP, immunoproteasome; MHC, major histocompatibility complex; Lmp, low molecular weight protein; nanoLC-MS/MS, nano-LC combined with tandem MS; Mecl, multicatalytic endopeptidase complex-like; MIP, MHC I-associated peptide; SCX, strong cation exchange; WT, wild-type

2.4 Summary

Proteasome-mediated proteolysis plays a crucial role in many basic cellular processes. In addition to constitutive proteasomes (CP), which are found in all eukaryotes, jawed vertebrates also express immunoproteasomes (IP). Evidence suggests that the key role of IPs may hinge on their impact on the repertoire of peptides associated to major histocompatibility complex (MHC) I molecules. Using a label-free quantitative proteomics approach, we identified 417 peptides presented by MHC I molecules on primary mouse dendritic cells (DCs). By comparing MHC I-associated peptides (MIPs) eluted from primary DCs and thymocytes, we found that the MIP repertoire concealed a cell type-specific signature correlating with cell function. Notably, mass spectrometry analyses of DCs expressing or not IP subunits MECL1 and LMP7 showed that IPs substantially increase the abundance and diversity of MIPs. Bioinformatic analyses provided evidence that proteasomes harboring LMP7 and MECL1 have specific cleavage preferences and recognize unstructured protein regions. Moreover, while differences in MIP repertoire cannot be attributed to potential effects of IPs on gene transcription, IP subunits deficiency altered mRNA levels of a set of genes controlling DC function. Regulated genes segregated in clusters that were enriched in chromosomes 4 and 8. Our peptidomic studies performed on untransfected primary cells provide a detailed account of the MHC I-associated immune self. This work uncovers the dramatic impact of IP subunits MECL1 and LMP7 on the MIP repertoire and their non-redundant influence on expression of immune-related genes.

2.5 Introduction

Proteasomes are the main proteases responsible for protein degradation and the production of MHC I ligands¹²⁻¹⁵. Proteasomes are much more ancient than MHC molecules. While proteasomes are found in all eukaryotes, the MHC appeared only in jawed vertebrates. Proteasomal degradation regulates many basic cellular processes such as cell cycle and division, differentiation and development, response to stress and extracellular effectors, modulation of cell surface receptors, DNA repair, transcriptional regulation and biogenesis of organelles^{16, 17}. The 20S proteolytic core of the proteasome is hollow and provides an enclosed cavity open at both ends in which proteins are degraded¹⁸. The eukaryotic 20S particle is composed of 14 different subunits organized in a barrel-shaped complex with the stoichiometry $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$. Three subunits of the two inner β -rings (β_1 , β_2 , and β_5) participate directly in peptide bond cleavage.

While all eukaryotes express the above described constitutive proteasome (CP), gnathostomes (jawed vertebrates) also express another form of proteasome, the immunoproteasome (IP). In IPs, the three catalytic β -subunits expressed in CPs are replaced by three IFN- γ -inducible homologues (immunosubunits): low molecular weight protein (LMP)-2 (or β_1i) for β_1 , multicatalytic endopeptidase complex-like (MECL)-1 (or β_2i) for β_2 , and LMP7 (or β_5i) for β_5 . In gnathostomes, most cells express only CPs under steady state conditions and harbor IPs when exposed to IFN- γ ¹⁹. In contrast, DCs constitutively express both CPs and IPs. IPs represents half of the proteasome population in immature DCs, and LPS-triggered DC maturation slightly increases the IP:CP ratio²⁰. Hence, in all circumstances, that is, in the absence or presence of infection, DCs express both CPs and IPs²⁰. IPs are closely linked to the adaptive immune system, being present in all gnathostomes but absent in invertebrates. Phylogenetic analyses revealed that proteasome immunosubunits evolved faster than their constitutive counterparts^{21, 22}. This finding points to a functional differentiation between IPs and CPs. However, the ultimate role of IPs, that is, their ecologically relevant and evolutionarily selected function, remains elusive.

It has been assumed that the key role of IPs may hinge on their impact on the repertoire of peptides associated to MHC I molecules. Indeed, cell surface levels of MHC-I molecules are reduced in spleen cells from *Lmp7*^{-/-} and *Lmp7*^{-/-}*Mecl1*^{-/-} mice²³. Furthermore, studies of selected epitopes revealed that some MHC I-associated peptides can be generated only by CPs, some only by IPs and others by both types of proteasomes^{18, 24-29}. *In vitro* proteasome digestion experiments suggest that compared to CPs, IPs have greater efflux and cleavage rates, and generate more N-extended versions of MHC I epitopes^{30, 31}. In addition, immunosubunits alter proteasome

structure and cleavage site preferences^{18, 32}. Nevertheless, the aforementioned studies cannot predict the overall impact of IPs on the MHC I peptide (MIP) repertoire *in vivo*, mainly for three reasons. First, *in vitro* proteasomal digestion may not reproduce *in vivo* conditions, where most MIPs derive from rapidly degraded proteins that translocate into the endoplasmic reticulum a few seconds after cleavage by proteasomes^{33, 34}. Second, MIP presentation is orchestrated by several steps downstream of proteasomal digestion so that only a small fraction of peptides generated by proteasomes are presented by MHC I molecules³⁵⁻³⁷. Finally, previous studies did not take into account potential differences in transcription regulation by CPs and IPs. While CPs clearly regulate transcriptional activation³⁸⁻⁴¹, the potential impact of IPs on transcription remains unexplored. Conceivably, IPs and CPs might differentially regulate MHC I presentation of a given peptide not only by affecting degradation of the peptide's source protein but also by modulating transcription of the gene encoding that peptide. In this perspective, the goal of our work was to obtain a direct and global evaluation of the impact of IPs on the repertoire of MIPs. To this end, we used a recently described label-free quantitative approach to analyze the MIP repertoire of DCs expressing or not IP subunits MECL1 and LMP7⁴². Also, we analyzed the gene expression profile of those two DC populations using microarrays.

2.6 Experimental procedures

Mice

Mice were on a C57BL/6 background and maintained in a specific pathogen free environment. WT and $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$)^{-/-} mice were obtained from The Jackson Laboratory. *Lmp7*^{-/-}*Mecl1*^{-/-} (dKO) mice were generously provided by Dr T.A. Griffin from the Medicine College of the University of Cincinnati.

Preparation of Bone Marrow-Derived DCs

DCs were generated from WT, dKO and $\beta 2m$ ^{-/-} mice bone marrow as previously described^{43,44}. Bone marrow cells were extracted from tibia and femur of 7-9 week old male mice and plated in 10 cm non-tissue culture-treated petri dishes (BD Falcon) at 3×10^6 cells per plate, in 10 mL of complete RPMI medium (0.048 mM β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 10 % fetal bovine serum, 2 mM penicillin-streptavidin) supplemented with 10 ng/mL granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF, Invitrogen). At days 3 and 6 of culture, 10 mL of cRPMI with 10 ng/mL GM-CSF and 5 mL of cRPMI with 20 ng/mL GM-CSF, respectively, were added. To further induce DC maturation, 1 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich) was added at day 8; 24 hrs prior to harvesting the non-adherent cells.

Flow Cytometry

Antibodies used were purchased from BD Pharmingen unless stated otherwise. For DC phenotyping, cells were harvested and stained with PE-Cy7-conjugated or FITC-conjugated anti-CD11c (HL3), APC-conjugated anti-CD86 (PO3; BioLegend), PE-conjugated anti-IA^b (AF6-120.1), APCCy7-conjugated anti-CD11b (AF6-120.1) and PE-Cy5-conjugated anti-CD8 α (53-6.7). For MHC I labeling, cells were stained with pure anti-H2D^b (B22-249.R1; Cedarlane), pure anti-H2K^b (Y3; ATCC), and biotin-conjugated anti-Qa2 (1-1-2) and anti-Qa1b (6A8.6F10.1A6) followed with APC-conjugated streptavidin. H2K^b and H2D^b antibodies were coupled with Alexa 647 fluorochrome using the Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Molecular Probes). Cells were incubated with mouse Fc Block CD16/CD32 (BD Pharmingen, 2.4G2) before staining. Dead cells were excluded based on propidium iodide staining. Analyses were done on a BD LSR II flow cytometer using FACSDiva (BD Bioscience) and FCS v.3.0 (De Novo Software) softwares.

Immunoblot Analyses

Mature DCs were harvested and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail (*Complete*; Roche), 1 mM Na_3VO_4 pH 9 and 5 mM NaF. Samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the following antibodies: anti- β 1, anti- β 5, anti-LMP2, anti-LMP7 and anti- α 5 from Abcam, anti- β 2 and anti-MECL1 from Biomol International, anti-calnexin and anti- β -actin (AC-15) from Sigma-Aldrich and anti-H2K^b/H2D^b (2G5) from Affinity BioReagents. Following incubation with anti-mouse (BD Bioscience) or anti-rabbit (Cell Signaling) HRP-conjugated secondary antibodies, chemiluminescent signal was detected using the GE Healthcare Detection Kit and a LAS-3000 imaging system (Fujifilm). Band intensities were quantified using the Multi Gauge V3-0 (Fujifilm) software.

Peptide Extraction and MS Analyses

Three biological replicates (5×10^8 DCs per replicate) were prepared from a total of 28 WT mice, 28 dKO mice and 47 $\beta 2m^{-/-}$ mice. MIPs were analyzed as previously reported⁴² with minor modifications. MIPs obtained following acid elution⁴⁵ were separated using an off-line 1100 series binary LC system (Agilent technologies) to remove contaminating species. Peptides were loaded on a homemade SCX column (0.3 mm internal diameter x 45mm length) packed with SCX bulk material (Polysulfoethyl ATM, PolyLC). Peptides were fractionated with a gradient of 0-25% B in 33mins, 25-60% B in 35mins (Solvent A = 5mM ammonium formate, 15% acetonitrile, pH3; Solvent B = 2M ammonium formate, 15% acetonitrile, pH3). MIPs were collected in 5 consecutive fractions and brought to dryness using a speedvac. MIP fractions were resuspended in 2% aqueous acetonitrile (0.2% formic acid) and analyzed by nanoLC-MS/MS on a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)⁴². Full mass spectra were acquired with the Orbitrap analyzer operated at a resolving power of 60,000 (at m/z 400) and collision-activated dissociation tandem mass spectra were acquired in data-dependent mode with the quadrupole linear ion trap analyzer. Mass calibration used either an internal lock mass [protonated $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$; m/z 445.12057] or external calibration using Calmix (caffeine, MRFA and ultramark) and typically provided mass accuracy within 5 ppm for all nanoLC-MS/MS experiments.

MS/MS Sequencing and Peptide Clustering

Data were analyzed using Xcalibur software and peak lists were generated using Mascot distiller (version 2.1.1, Matrix Science). Database searches were performed against an International Protein Index mouse database (version 3.23 containing 51,536 sequences and 24,497,860 residues) using Mascot (version 2.2, Matrix Science) with a mass precursor tolerance of ± 0.05 Da and a fragment tolerance of ± 0.5 Da. Searches were performed without enzyme specificity and a variable modification of oxidized Met. All search results were filtered using an MHC motif filter based on the predicted mouse MHC I allele motifs. Raw data files were converted to peptide maps comprising m/z values, charge state, retention time and intensity for all detected ions above a threshold of 15,000 counts using in-house software (Mass Sense)⁴². Peptide maps were aligned and clustered together to profile the abundance of Mascot identified peptides using hierarchical clustering with criteria based on m/z and time tolerance (± 0.01 m/z and ± 1.5 min). This resulted in a list of non-redundant peptide clusters for all replicates of all samples to be compared. MIPs were further inspected for mass accuracy and MS/MS spectra were validated manually. The Sidekick resource (<http://www.bioinfo.irc.ca/sidekick/Main>) was used to identify MIP source proteins. The InnateDB resource⁴⁶ was used to identify significantly enriched KEGG pathways associated to peptide source genes from DCs and thymocytes. The list of MIPs reported in the present work has been provided to The Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://beta.immuneepitope.org/>)⁴⁷.

Cytotoxicity Assays

In vitro carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-based cytotoxicity assays were performed as previously described with minor modifications⁴². CFSE-based assays are more sensitive than classic ⁵¹Cr-release cytotoxicity assays⁴⁸⁻⁵⁰. Briefly, 10⁶ WT and dKO DCs were injected i.v. into mice from both genotypes on day 0 and 7. On day 14, splenocytes from the four immunized mice (WT mice injected with WT or dKO DCs, dKO mice injected with WT or dKO DCs) were used as effector cells in cytotoxicity assays⁵⁰. Target cells were concanavalin A treated WT and dKO splenocytes. The percentage of specific lysis was measured as follows: [(number of remaining CFSE⁺ cells after incubation of target cells alone – number of remaining CFSE⁺ cells after incubation with effector cells) / number of CFSE⁺ cells after incubation of target cells alone] x 100.

Bioinformatic Analysis of Cleavage Motifs

All (417) peptides extracted from DCs were used in studies of amino acid usage in MIPs. In analyses of flanking regions, we eliminated peptides that can originate from multiple source proteins with different N- or C-terminal flanking sequences. Peptides used for further analyses of flanking regions (376 for upstream regions, 369 for downstream regions) were ranked according to their WT/dKO fold difference in abundance as determined by MS analyses. We next generated an Euclidean distance matrix to compare amino acid usage at each position. We thereby compared amino acid usage by MIPs located at the left vs. the right of each ranked peptide. A bootstrap procedure (100,000 iterations) was performed to evaluate whether the distance measured was significant ($p < 0.05$ was considered significant). The analysis was performed for each position of the MHC peptides as well as for 10 residues upstream of the peptide N-terminus and downstream of the C-terminus. For positions that gave a p -value < 0.001 , we used the Kolmogorov-Smirnov statistical test to determine which specific amino acids were over- or under-represented in WT as opposed to dKO DCs. The R software was used to visualize amino acid distributions (<http://www.R-project.org>), and the program SEG to determine unstructured regions in source proteins (window size = 12, low complexity = 2.5, high complexity = 2.8)⁵¹. The number of MIPs from unstructured regions in presence or in absence of IP was measured using a Chi-squared test (with p -value < 0.05).

Microarrays and Genomic Analyses

Total RNA was extracted from WT and dKO DCs with TRIzol RNA reagent (Invitrogen) as instructed by the manufacturer. Samples were purified using DNase (QIAGEN) and the RNeasy Mini kit (QIAGEN), and the overall quality was analyzed with an Agilent 2100 Bioanalyzer. Purified RNA (10 μ g/sample) was hybridized on MM8 385K NimbleGen chips at the Genomics core facility of the Institute for Research for Immunology and Cancer according to the manufacturer's instruction. Arrays were scanned using a GenePix4000B scanner (Axon Instruments, Molecular Devices Corp.) at 5 μ m resolution. Data were extracted and normalized using the NimbleScan 2.4 extraction software (NimbleGen Systems, Inc.). Further microarray analyses were done using GeneSpring GX 7.3.1. The complete microarray datasets have been deposited in ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-TABM-750. Two-sided Student t -test was used to compare transcript abundance in WT vs. dKO DCs. Spearman's rank correlation was used to evaluate the relation between MIP abundance and source mRNA expression. The Gene set organization/visualization module of the Web-Based

Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt)⁵² was used to represent the chromosomal localization of the differentially expressed genes, and the gene enrichment on specific chromosomes was measured using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resource⁵³.

2.7 Results

2.7.1 Experimental design of peptidomic studies

To evaluate the impact of IPs on the MIP repertoire, we elected to study DCs because they are quintessential antigen-presenting cells and constitutively express IPs. Using a recently described label-free quantitative proteomics method⁴², we analyzed MIPs eluted from mature wild-type (WT) and double knockout (dKO) DCs (Fig. 2.1A). WT DCs express both CPs and IPs (alike mature DCs under physiological *in vivo* conditions²⁰) whereas dKO DCs do not express the IP-subunits LMP7 and MECL1 (Fig. 2.1D). IP subunits are cooperatively incorporated into proteasomes, thereby curtailing the formation of mixed proteasomes containing IP and CP subunits⁵⁴. In line with this result, we noted a 50% decrease in the amount of LMP2 protein in dKO cells, suggesting that LMP2 is unstable in the absence of the two other immunosubunits (Fig. 2.1D). As a negative control we analyzed DCs derived from β 2-microglobulin (β 2m)-deficient mice. Since β 2m is essential for formation of stable peptide-MHC I complexes, cells lacking β 2m are MHC I-deficient. DCs generated from WT, dKO and β 2m-deficient mice shared a mature (CD11c⁺CD86⁺IA^{b+}) myeloid (CD8 α CD11b⁺) phenotype (Fig. 2.1B,C).

Peptides eluted from DCs were fractionated by off-line LC using a strong cation exchange (SCX) column, then analyzed by nano-LC combined with tandem MS (nanoLC-MS/MS). Peptide maps were generated from each analysis to define the coordinates (*m/z*, retention time, ion abundance) of identified ions. The corresponding peptide maps were then clustered across conditions and replicate analyses to identify unique peptide ions and profile their changes in abundance. Subtraction of “contaminant peptides” eluted from β 2m-deficient cells allowed specific identification of genuine MIPs (Fig. 2.1A)⁴². MS/MS spectra were manually verified for all MIPs. The *smm*, SYFPEITHI (H2D^b and H2K^b) and Rankpep (Qa2) softwares were used to associate peptide sequences with specific MHC I allelic products⁴². This resulted in the identification of 417 unique MIPs (derived from 389 source proteins) in WT DCs (supplemental Table 2.S1).

2.7.2 The MIP repertoire of DCs conceals a unique signature

We reported previously that MIPs eluted from thymocytes derived preferentially from transcripts whose abundance was higher in the thymus than in other tissues⁴². This suggested that the MIP repertoire might conceal a cell type-specific signature. To directly test this concept,

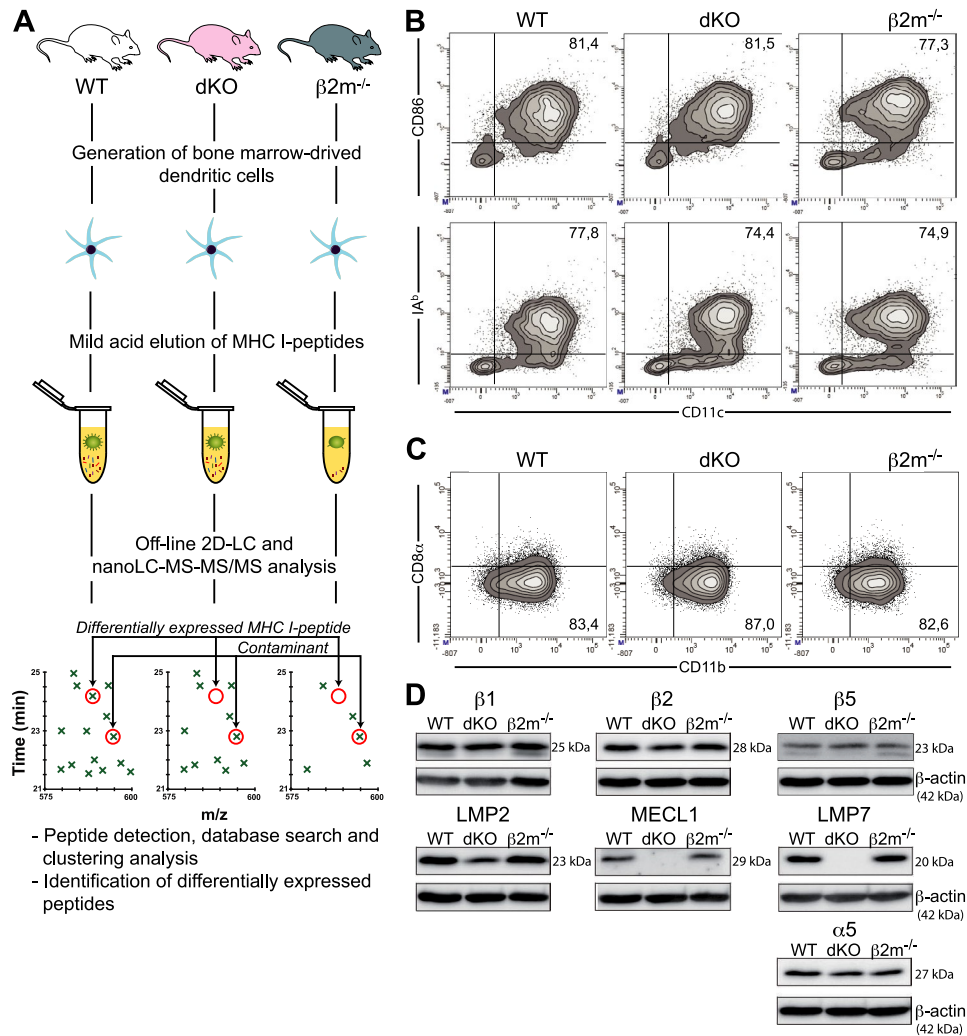


Figure 2.1 Design of peptidomic studies and characterization of DC populations. (A) Experimental design for isolation and identification of DC MIPs. DCs were generated from the bone marrow of WT, *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* (dKO) and $\beta 2m^{-/-}$ mice. MIPs were eluted in a mild acid buffer, separated by off-line HPLC, and collected fractions were analyzed by nanoLC-MS-MS/MS. Heat maps displaying *m/z*, retention time and abundance were generated and analysis of $\beta 2m^{-/-}$ negative controls allowed us to discriminate MIPs from contaminants. Three biological replicates were analyzed for each group. (B) Flow cytometry analysis of bone marrow derived DCs. (C) Expression of CD11b and CD8 α on DCs (gated on CD11c⁺ cells). (D) Immunoblot analysis of proteasomes subunits in total DC lysates. Data are representative of three (C) or four (B, D) independent experiments.

we compared the MIP repertoire of DCs (reported herein) to that of thymocytes⁴² derived from the same strain of mice (WT, C57BL/6). We identified more peptides in DCs than in thymocytes (417 vs. 189; Fig. 2.2A). This discrepancy can be attributed, at least in part, to the fact that MHC I molecules are much more abundant on DCs than thymocytes (Fig. 2.2B). In both cell types we found more peptides associated to MHC Ia (H2K^b, H2D^b) than to MHC Ib (Qa1, Qa2) allelic products (Fig. 2.2C). Of note, the proportion of peptides with a Qa2-binding motif was greater

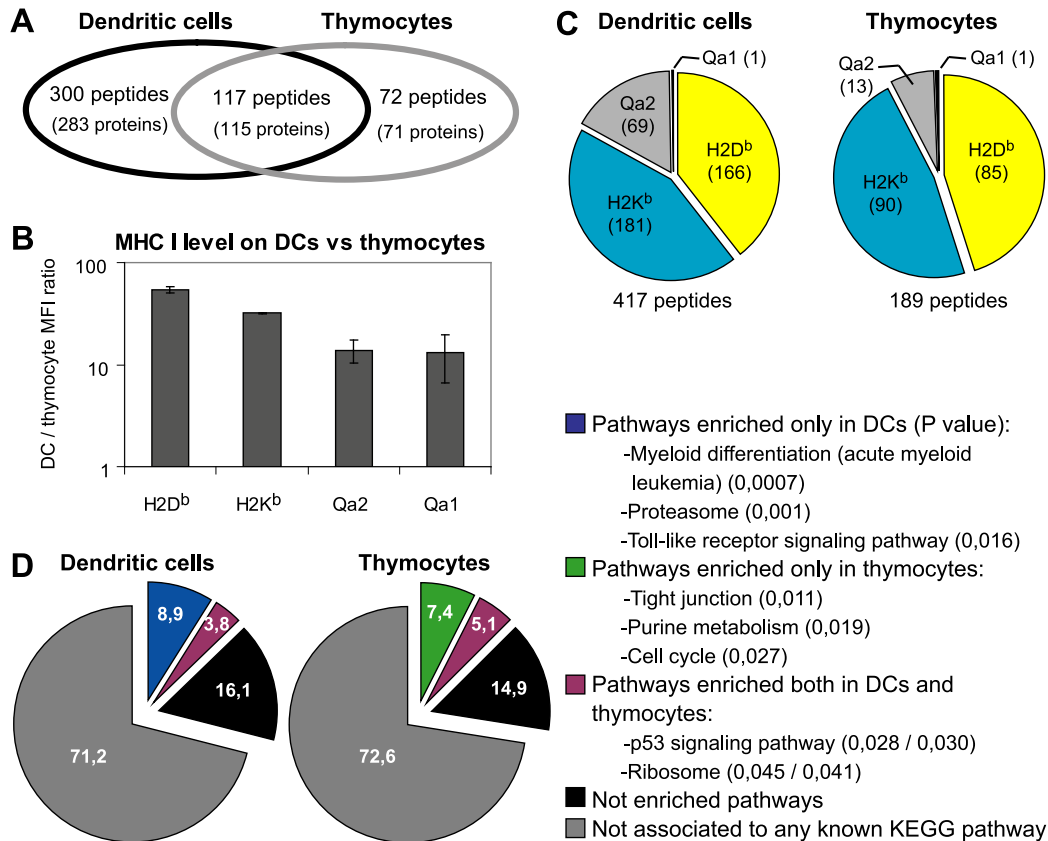


Figure 2.2 The MIP repertoire conceals a cell-type specific signature. (A) Venn diagram representation of the relation between MIPs (and their source proteins) eluted from C57BL/6 thymocytes and DCs. (B) Cell surface expression of MHC I allelic products was evaluated by flow cytometry. Histogram shows the DC/thymocyte mean fluorescence intensity ratio for H2D^b ($p = 6 \times 10^{-5}$; Student *t*-test), H2K^b ($p = 6 \times 10^{-7}$), Qa1 ($p = 7 \times 10^{-6}$) and Qa2 ($p = 3 \times 10^{-2}$) (mean \pm SD of triplicate experiments). (C) Proportion of peptides associated to different MHC I allelic products in DCs and thymocytes. (D) Pie charts represent the relations between peptide source genes (389 for DCs, 186 for thymocytes) and KEGG pathways. Examples of pathways enriched in the gene datasets are depicted (with *p*-value for enrichment in parentheses).

in DCs than in thymocytes ($p < 0.01$; Chi-square test). However, the key finding was that 72 out of 189 peptides eluted from thymocytes were not detected in DC eluates, even though we recovered less peptides from thymocytes (189) than from DCs (417) (Fig. 2.2A). This means that about 60% of MIPs present at the surface of thymocytes are also present on DCs while 40% are thymocyte specific. Out of 417 peptides recovered from DCs, 117 were shared with thymocytes whereas 300 were DC-specific.

To further evaluate whether the MIP repertoire might reflect cell type-specific intracellular signaling events we used the InnateDB resource⁴⁶ to analyze pathways catalogued in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database. We specifically evaluated whether specific KEGG pathways were overrepresented in the group of genes encoding peptides eluted

from DCs and/or thymocytes (Fig. 2.2D). In each dataset (DCs and thymocytes), about 28% of peptide source genes were linked to specific KEGG pathways. Notably, 45% of pathway-connected genes (12.5% of the whole dataset) were associated with pathways significantly overrepresented in the DC and/or thymocyte gene dataset. Many MIP source genes were connected to pathways overrepresented in both DCs and thymocytes (e.g., p53 signaling and ribosome biogenesis). Of special interest, peptide source genes belonging to specific pathways were enriched uniquely in DCs or thymocytes. Many of these pathways reflected the function and differentiation of DCs and thymocytes. For instance, the MIP repertoire of DCs was enriched in peptides whose source genes are involved in myeloid differentiation, proteasome function and Toll-like receptor signaling. Besides, peptide source genes involved in tight junction, purine metabolism and cell cycle were overrepresented in the thymocyte MIP repertoire. For DC and thymocyte gene datasets, a complete list of overrepresented pathways and their constituent genes can be found in supplemental Table 2.S2. Together, these results show that the MIP repertoire conceals a cell type-specific signature that reflects singular functional properties.

2.7.3 IPs increase the abundance and diversity of MIPs at the surface of DCs

To evaluate the impact of IPs on the MIP repertoire, we compared MIPs eluted from WT and dKO DCs by MS analysis as depicted in Fig. 2.1A. In accordance with previous studies⁴², we found that 95% of peptide ions showed a variation of less than ± 3 -fold in abundance across biological replicates ($n = 3$). Therefore, we considered that peptides were differentially presented by MHC I molecules when the fold difference in abundance between WT and dKO DCs was greater than 3. Of the 417 peptides eluted from WT DCs, 212 were expressed at similar levels (within 3-fold) in dKO DCs (Fig. 2.3A). Remarkably, 199 peptides were overexpressed in WT relative to dKO DCs. Among those 199 peptides, 60 were detected exclusively in WT DCs. Only 6 peptides were slightly overexpressed (3 to 5-fold) in dKO relative to WT DCs and none were unique to dKO DCs. Peptides with the largest fold differences in abundance are listed in Table 2.1, and the full list of peptides is available in supplemental Table 2.S1. In accordance with our data on MIP abundance, flow cytometry analyses revealed that, as previously demonstrated on WT vs. dKO spleen lymphocytes²³, expression of cell surface H2D^b and H2K^b was higher by approximately 2.1-fold on WT than dKO DCs (Fig. 2.3B). However, protein immunoblot analyses on whole cell lysates showed that total cellular amounts of H2D^b and H2K^b heavy chains were similar in both types of DCs (Fig. 2.3C), suggesting that the lower level of surface expressed MHC I on dKO DCs was due to a limited peptide supply, and not to an altered level

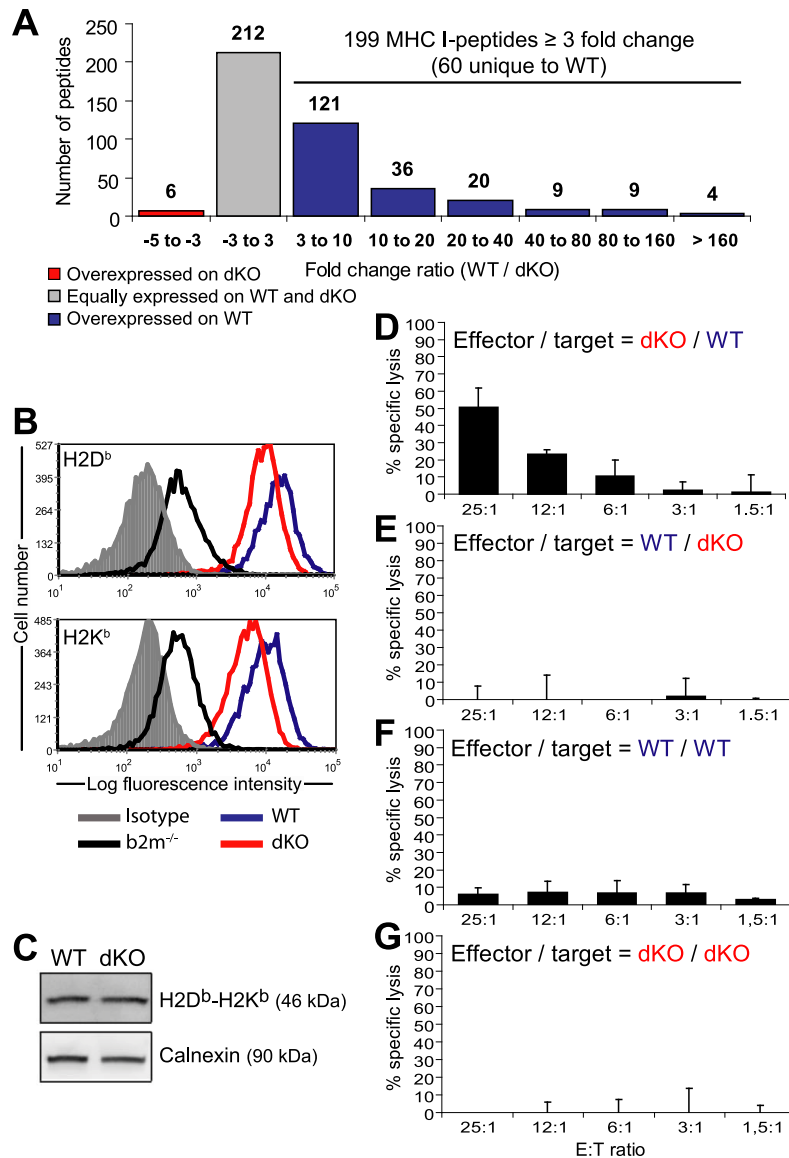


Figure 2.3 IPs increase the abundance and diversity of MIPs. (A) Histogram representing the relative abundance in WT and dKO DCs of the 417 peptides identified by MS analyses. (B) WT DCs expressed higher cell surface levels of H2D^b ($p = 0.04$, Student t -test) and H2K^b ($p = 0.02$) than dKO DCs. (C) Immunoblot analysis of H2D^b and H2K^b heavy chains in whole DC lysates. Calnexin was used as a loading control. Data are representative of three independent experiments. (D-G) Cytotoxic activity of splenocytes from dKO mice primed against WT DCs (D), from WT mice primed against dKO DCs (E), from WT mice primed against WT DCs (F) and from dKO mice primed against dKO DCs (G) (mean and SD for three mice per group).

of MHC I molecules available.

Following immunization with WT DCs, dKO mice generated WT-specific cytotoxic T cells (Fig. 2.3D,G). However, WT mice did not generate cytotoxic effectors against dKO cells (Fig. 2.3E,F). That unidirectional immunogenicity supports our peptidomic analyses showing that numerous peptides were uniquely detected on WT DCs while no peptides were found only on dKO DCs (Fig. 2.3A). Furthermore, it is consistent with the previous demonstration that WT splenocytes were immunogenic for *Lmp7*^{-/-} mice, but not vice versa⁵⁵. It must be noted however, that dKO DCs may not be optimal antigen presenting cells. Indeed, when dKO and WT DCs were coated with exogenous SIINFEKL and injected in mice bearing K^b/SIINFEKL-specific T cells, dKO DCs proved to be immunogenic but less so than WT DCs (supplemental Fig. 2.S1).

Collectively, these results show that the presence of IPs has a major impact on the global MIP repertoire, by increasing both the abundance and the diversity of MIPs.

2.7.4 IPs have specific cleavage preferences

Proteasomal cleavage generates the final C-terminus of MIPs while their N-terminus can be further trimmed by aminopeptidases in the cytosol and the endoplasmic reticulum^{33, 36}. Proteasomal cleavage can be influenced by approximately 5-7 residues flanking the cleavage site on either side^{55, 56}. To determine whether the MIP repertoire generated in the presence or absence of IPs might reveal discrete cleavage preferences, we analyzed the amino acid composition of MIPs and their flanking residues. The 417 peptides extracted from DCs were used in studies of amino acid frequencies in MIPs. In analyses of flanking regions, we eliminated peptides that can originate from multiple source proteins with different N- or C-terminal flanking sequences. Remaining peptides were ranked according to their WT/dKO fold difference in abundance as determined by MS analyses. Peptides with high WT/dKO ratios are IP-dependent. We next generated a Euclidean distance matrix to compare amino acid usage at each position. Each ranked peptide was used consecutively as a reference. We thereby compared amino acid usage by MIPs having higher vs. lower WT/dKO ratios than the reference peptide. A bootstrap procedure (100,000 iterations) was performed to evaluate whether the distance measured was significant. The analysis was performed for each position of the MHC peptides as well as for 10 residues upstream of the peptide N-terminus and downstream of the C-terminus.

We detected no bias in amino acid frequencies at various positions of the MIPs per se (data not shown). However, we found highly significant deviations of amino acid frequencies at two peptide flanking positions: N-5 upstream of the N-terminus and C+2 downstream of the C-terminus of MIPs (Fig. 2.4A,B; $p < 0.001$). We performed a detailed analysis of amino acid frequencies at positions N-5 and C+2 using the Kolmogorov-Smirnov test. At position N-5, peptides overexpressed in WT cells showed decreased frequencies of glycine (G) and asparagine (N) residues (Fig. 2.4C). It is not clear how cytosolic and ER aminopeptidases processing MIP precursors choose their substrates^{57, 58}. Further work is therefore needed to decipher the significance of the amino acid bias at position N-5. For peptides with high WT/dKO ratios, deviation at position C+2 was particularly dramatic and was characterized by an increase usage of proline (P) and polar residues [lysine (K) and glutamine (Q)], with a decreased frequencies of asparagine (N) and hydrophobic residues [leucine (L) and isoleucine (I)] (Fig.

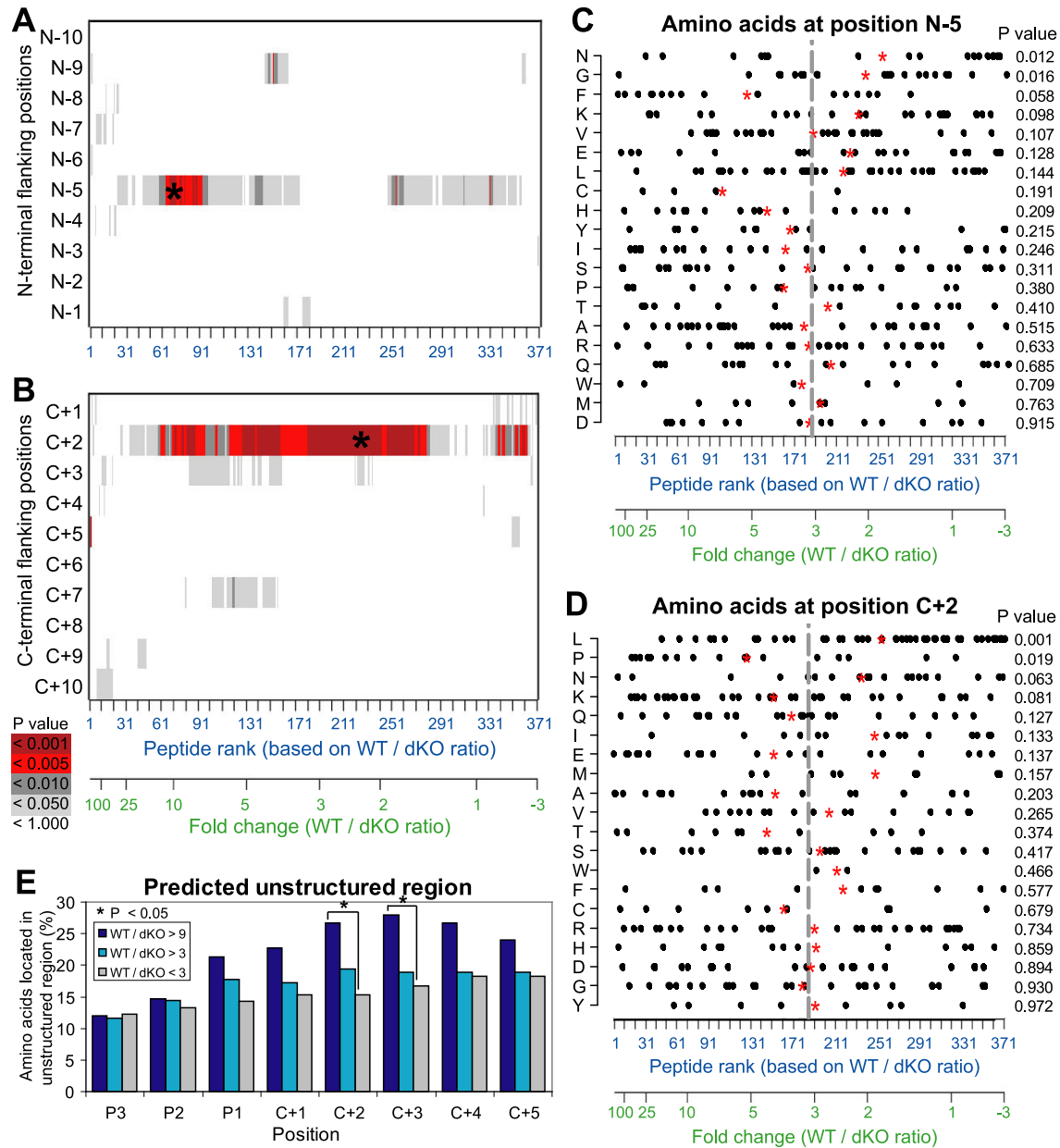


Figure 2.4 IPs have specific cleavage preferences. (A,B) Screen of N-terminus (A) and C-terminus (B) MIP flanking regions for identification of amino acid preferences in presence or in absence of IPs. Peptides were ranked according to their fold change (WT/dKO intensity ratio). A bootstrap procedure was used to detect significant differences between amino acids flanking peptides overexpressed or not in WT DCs. Color code shows p-values computed for each amino acid position, with the strongest p-values indicated by a star. (C,D) Distribution of amino acid frequencies at positions N-5 and C+2. Each dot corresponds to one MIP. Red stars represent the mean rank of peptides bearing a specific amino acid residue, and can be compared to the mean rank of the entire peptide dataset (gray line). Relative enrichment of all 20 amino acids as a function of peptides' WT/dKO ratio was estimated with the Kolmogorov-Smirnov statistical test. (E) Amino acid residues located in protein regions predicted to be unstructured by the SEG algorithm. Peptides were classified in three groups (colored bars) as a function of their abundance in WT and dKO DCs (WT/dKO). Proportions were compared using the Chi-square test ($p = 0.029$ and 0.037 for positions C+2 and C+3, respectively).

2.4D). Asparagine and hydrophobic residues are enriched in α -helices and β -sheets whereas proline and polar residues are enriched in unstructured protein regions which represent 20-30% of the mammalian proteome^{59, 60}. The program SEG, which computes sequence complexity, has been used successfully to predict unstructured regions (i.e., lacking secondary and tertiary structures)⁵¹. Using SEG, we found that amino acids C-terminal of IP-dependent peptides (high WT/dKO ratio) derived more frequently from unstructured protein regions than amino acids C-terminal of IP-independent peptides (Fig. 2.4E). The IP bias toward unstructured protein domains was specific for amino acid residues next to the MIP C-terminus (e.g., C+2), and was not detected for the MIP themselves nor for residues upstream of their N-terminus (data not shown). We conclude that IPs display specific cleavage preferences and propose that the presence of IPs leads to enhanced MHC I presentation of peptide sequences adjoining the unstructured proteome.

2.7.5 IPs have a non-redundant impact on the transcriptome of DCs

Aside from their role in protein degradation, CPs also regulate transcription³⁸⁻⁴¹. Whether IPs may regulate transcription differently than CPs is unknown. Thus, we could not assume *a priori* that peptide overexpression in IP-expressing DCs was due solely to enhanced degradation of peptide source proteins by IPs. Theoretically, IPs might also mold the MIP repertoire by differential regulation of peptide source genes. To test this assumption, we compared the transcriptome of WT and dKO DCs using NimbleGen MM8 385K microarrays. We found that 226 transcripts, representing 171 genes and corresponding to 0.5 % of the transcriptome, were differentially expressed between WT and dKO DCs (Fig. 2.5A; Supplemental Tables 2.S3 and 2.S4). There was no correlation between transcript and MIP abundance (Fig. 2.5B). We therefore conclude that differential expression of MIPs in WT vs. dKO DCs cannot be ascribed to differential transcription of peptide source genes. Nevertheless, a selected set of transcripts was differentially expressed in the presence or absence of IPs. The loci encoding those transcripts were not randomly distributed in the genome. Somewhat unexpectedly, they were clustered in discrete regions located primarily in chromosomes 4, 8, 9 and 17 and practically absent in chromosomes 3, 10, 13, 14, 16, 19 and X. The gene clusters were particularly enriched in chromosome 4 and 8 ($p = 10^{-12}$ and 10^{-8} , respectively; Fig. 2.5C).

To evaluate whether differentially expressed genes might be relevant to DC function, we focused on transcripts for which functional annotation data was available (50% of differentially expressed transcripts; Fig. 2.5D). Specifically, we excluded transcripts for which no biological

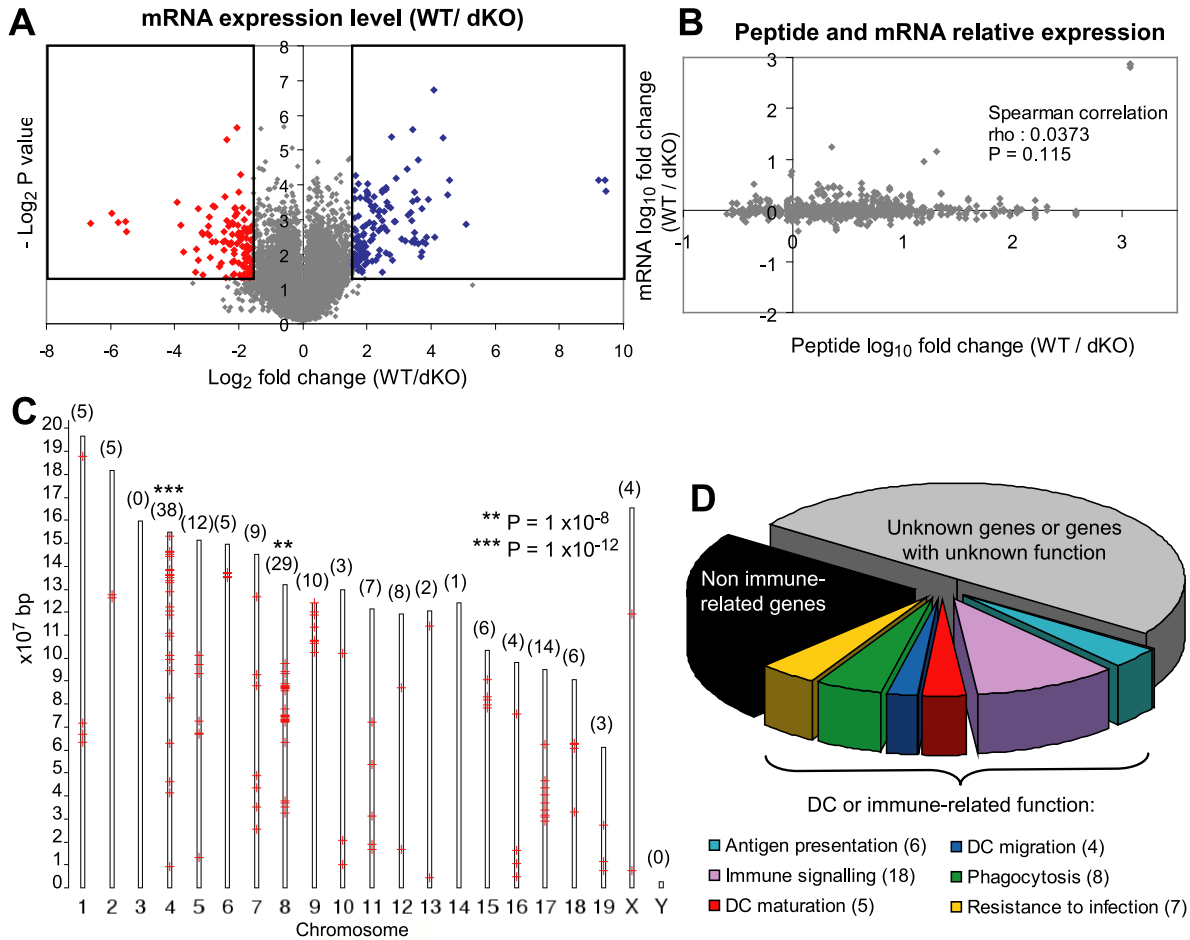


Figure 2.5 IPs imprint on the transcriptome. (A) Volcano plot representation of the relative expression of 42,569 transcripts in WT and in dKO DCs. Boxes show transcripts significantly over-expressed in WT (blue) and in dKO (red) DCs across three replicates ($p < 0.05$; two-sided t -test). (B) Spearman correlation between the relative cell surface expression of MIPs (WT/dKO intensity ratio) and the expression of their source transcripts. (C) Chromosomal distribution of differentially expressed genes (red crosses). The number of genes localized on each chromosome is shown in parentheses. Significance of enrichment on chromosomes was measured with a modified Fisher's exact test using DAVID Bioinformatics Resources. (D) Functional classification of differentially expressed genes obtained by a systematic literature review. The number of genes included in each category is shown in parentheses.

data were available, or when the sole available evidence was inferred from electronic annotation that was not assigned by a curator (ND and IEA GO codes) (Fig. 2.5D). Remarkably, 56 % of functionally annotated genes had a demonstrated or putative role in DC function or immune signaling (Fig. 2.5D). Those 48 genes were aggregated into 6 functional categories: resistance to infection, antigen presentation, phagocytosis, immune signaling, DC maturation and DC migration. A complete annotated list of genes belonging to these categories is available in supplemental Table 2.S3. We conclude that IPs have a non-redundant impact on expression of a selected set of genes that regulate different aspects of DC function.

Table 2.1. Top most overexpressed MIPs in WT relative to dKO DCs

No.	m/z	Charge	Mascot score	MHC I allele	Peptide sequence	Gene ID	Gene symbol	Gene Name	WT / dKO ratio
1	520,22	2	66	H2D ^b	GGVVNMYHM	16913	<i>Psmb8</i>	Proteasome subunit, beta type 8 (LMP7)	≥ 1181,3
2	460,25	2	40	H2K ^b	ATRSFPQL	11750	<i>Anxa7</i>	Annexin A7	≥ 380,8
3	624,83	2	44	H2D ^b	HAIRNSFQYL	170749	<i>Mttr4</i>	Myotubularin related protein 4	≥ 207,3
4	472,28	2	55	H2K ^b	TIHIFHSL	14050	<i>Eya3</i>	Eyes absent 3 homolog (Dm)	160,5
5	497,27	2	43	H2K ^b	VVYIYHSL	67014	<i>Mina</i>	Myc induced nuclear antigen	≥ 159,3
6	467,28	2	47	H2K ^b	SALRFLNL	71728	<i>Stk11ip</i>	Ser / Thr kinase 11 interacting protein	120,8
7	479,28	2	39	H2K ^b	KNVLFSL	19084	<i>Prkar1a</i>	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha	≥ 109,8
8	524,27	2	65	H2D ^b	RQILNADAM	66185	<i>1110037F02Rik</i>	RIKEN cDNA 1110037F02 gene	≥ 96,8
9	496,78	2	42	H2D ^b	SGLLNMTKI	216445	<i>Arhgap9</i>	Rho GTPase activating protein 9	≥ 93,9
10	525,26	2	29	H2K ^b	HVYYFAHL	74558	<i>Gvin1</i>	GTPase, very large interferon inducible 1	≥ 93,4
11	510,80	2	56	H2K ^b	VITNFSARI	68505	<i>1110014N23Rik</i>	RIKEN cDNA 1110014N23 gene	≥ 83,3
12	507,26	2	49	H2K ^b	STLIYRNM	75660	<i>Lin37</i>	Lin-37 homolog (C. elegans)	≥ 82,1
13	597,28	2	27	H2D ^b	SAIHNFYDNI	68652	<i>Map3k7ip2</i>	MAPKKK 7 interacting protein 2	≥ 80,5
14	523,75	2	34	H2D ^b	SQVYNDAHI	66923	<i>Pbrm1</i>	Polybromo 1	≥ 76,9
15	537,27	2	40	H2K ^b	LVYQFKEM	56501	<i>Elf4</i>	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	≥ 76,2
16	461,76	2	62	H2D ^b	GAVQNIHL	74125	<i>Armc8</i>	Armadillo repeat containing 8	68,5
17	496,28	2	32	H2K ^b	ISLEFRNL	14137	<i>Fdft1</i>	Farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	68,1
18	506,30	2	43	H2K ^b	KSYLFQLL	12566	<i>Cdk2</i>	Cyclin-dependent kinase 2	≥ 66,4
19	447,74	2	53	H2D ^b	GGIQNVGHI	23918	<i>Impdh2</i>	Inosine 5'-phosphate dehydrogenase 2	54,8
20	493,24	2	41	H2K ^b	SNYRFEGF	319955	<i>Ercc6</i>	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	≥ 46,4
21	479,75	2	37	Qa2	GLMTTVHAI	640374	<i>LOC640374</i>	Similar to GAPDH	42,0
22	645,34	2	33	H2D ^b	AQYGNILKHM	69482	<i>Nup35</i>	Nucleoporin 35	≥ 40,3
23	486,78	2	48	H2D ^b	KAPLNIAVM	667214	<i>RP23-269N23.3</i>	Similar to immunity-related GTPase family, cinema 1	39,8
24	510,81	2	54	H2D ^b	YGLLNVTKI	75415	<i>Arhgap12</i>	Rho GTPase activating protein 12	≥ 37,6
25	501,27	2	42	H2D ^b	SALANYIHL	58245	<i>Gpr180</i>	G protein-coupled receptor 180	≥ 37,4

MIPs that were not detected on dKO cells were attributed the intensity value 15,000, which represents the threshold for limit of detection. Ratios with the symbol \geq indicate peptides for which the exact fold change could not be measured because they were detected only in WT DCs. See supplemental Table 2.S1 for a complete list of MIPs detected on DCs.

2.8 Discussion

By using a label-free quantitative proteomics approach, we gained valuable insights into the impact of IPs on the molecular composition of the immune self. Our peptidomic studies allowed us to generate a most comprehensive biochemical definition of the MIP repertoire. Since we achieved this using untransfected primary DCs, our data provide a broad and faithful representation of the MHC I-restricted immune self. The present work yielded three major observations. First, the MIP repertoire conceals a cell type-specific signature. Though the MIP repertoire of DCs and thymocytes partially overlap, no less than 40% of their MIPs were cell type-specific. The large proportion of cell type-specific MIPs observed herein argues against the notion that MIPs derive primarily from ubiquitously expressed proteins^{61, 62}. Interestingly, MIPs unique to DCs or thymocytes reflected cell function and differentiation. The DCs that we studied were antigen-processing cells with a myeloid phenotype whose maturation was induced by LPS (a TLR-4 ligand). Quite remarkably, the MIP repertoire of those DCs was enriched in peptides encoded by genes regulating proteasome function, myeloid differentiation and TLR signaling. Thymocytes have a high proliferation index and undergo a myriad of sequential interactions with sub-populations of stromal cells during their 3-week journey in the thymus. Their MIP source genes were biased toward cell cycle regulation, purine metabolism and tight junction formation. The notion that a substantial proportion of MIPs are cell type-specific leads us to infer that, at the organismal level, the composition of the MHC I-restricted immune self is highly complex. The cell types studied herein (DCs and thymocytes) are rather closely related in the cell lineage tree, since they both derive from hematopoietic stem cells. In the future, it will be interesting to compare the MIP repertoire of DCs to that of non-hematopoietic cells.

What does the presence of IPs change in the MIP repertoire of DCs? Our proteomics analyses of MIPs from WT and dKO DCs demonstrate that IPs dramatically increase the abundance and diversity of MIPs. In agreement with that, WT DCs were immunogenic for dKO mice, but not vice versa. Our study being based on comparison of WT and dKO DCs, it was aimed specifically at discovering the non-redundant roles of IPs, and not the non-redundant roles of CPs. If anything, our results might slightly underestimate the impact of IPs on the MIP repertoire because, in addition to CPs, DCs from dKO mice may harbor a few mixed proteasomes containing LMP2 admixed with CP $\beta 2$ and $\beta 5$ catalytic subunits. It must be realized, however, that eliminating all vestiges of IP activity is not a trivial task. Since the *Lmp2* and the *Lmp7* genes are closely linked, it is practically impossible to generate triple KO mutants by breeding (*Lmp7*^{-/-}*Mecl1*^{-/-}) dKO mice with *Lmp2*^{-/-} mice. A plausible alternative would be to treat dKO cells with a pharmacologic LMP2 inhibitor⁶³. However, this strategy would also be fraught

with a caveat: pharmacological inhibitors block the proteolytic activity of IP subunits but not other conformational effects that individual IP subunits have on IP function. Indeed, evidence suggests that incorporation of immunosubunits results in structural changes of the whole 20S IP complexes and thereby influences their biologic properties. For example, a model HBV epitope is not generated in LMP7-deficient cells but can be generated in the presence of a catalytically inactive LMP7 subunit (in which Thr1 is mutated to Ala)^{18, 64}. Thus, the generation of epitopes like that one would not be blocked by pharmacological inhibitors. Our observation that IPs increase MIP abundance fits well with *in vitro* proteasome digestion experiments suggesting IPs have greater efflux and cleavage rates than CPs^{30, 31} and with the decreased cell surface levels of MHC I molecules on *Lmp7^{-/-}* and *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* splenocytes²³. For reasons presented in the Introduction, it was not possible to extrapolate from previous *in vitro* proteasome digestion experiments the overall impact of IPs on the diversity of the MIP repertoire generated *in vivo*. Our work now provides a direct and global evaluation of the impact of IPs on MIP diversity. Out of 417 peptides eluted from DCs, 199 were overexpressed in WT relative to dKO DCs and 60 were detected exclusively in WT DCs. Thus, about 14% of MIPs (60 out of 417) were totally IP-dependent.

Our results also suggest that IPs possess distinct cleavage properties that impinge on the MIP of primary DCs. The most salient difference between IP-dependent and -independent peptides was found at position C+2. For IP-dependent peptides, deviation at C+2 was characterized by an increased usage of proline and polar residues with decreased frequencies of asparagine and hydrophobic residues. The most significant difference was the decreased frequency of leucine residues at C+2 in IP-dependent relative to IP-independent peptides. That observation is remarkably coherent with the seminal work conducted by Toes *et al.* who digested yeast enolase-1 *in vitro* with CPs or IPs, analyzed fractionated peptide fragments by MS, and found that leucine at C+2 was disfavored by IPs⁵⁵. Furthermore, our bioinformatic analyses predict that IPs have a bias toward unstructured protein regions and lead to enhanced MHC I presentation of MIPs adjoining the unstructured proteome. The lack of secondary and tertiary structure confers several properties such as increased interaction surface area, conformational flexibility and accessible posttranslational modification sites⁵⁹. Consequently, largely unstructured proteins are especially prone to make promiscuous molecular interactions and their overexpression is particularly dangerous for a cell as it frequently leads to cell death or neoplastic transformation^{59, 65}. The MIP repertoire allows presentation of only a tiny fraction of the proteome to CD8 T cells^{33, 66}. Therefore, the bias of IPs toward unstructured protein regions could be of considerable relevance, for example in cancer immunosurveillance.

Integration of our peptidomic data with global profiling of the DC transcriptome revealed that differential expression of MIPs in WT vs. dKO DCs cannot be ascribed to differential transcription of peptide source genes. However, we found that IPs have a non-redundant impact on expression of a selected set of transcripts. Of note, IPs may affect expression of numerous other genes redundantly with CPs, but our study design was poised to selectively identify genes differentially regulated by IPs and CPs. Recent evidence suggests that the role of IPs is not limited to processing peptides for MHC presentation⁶⁷. For instance, MECL1 is a T-cell-intrinsic factor regulating homeostatic expansion, T cells from dKO mice hyperproliferate in response to polyclonal mitogens, and selective inhibition of LMP7 blocks cytokine production by activated monocytes and T cells^{23, 68, 69}. The present work suggests that these pleiotropic effects of IPs may be mediated by a non-redundant effect of IPs on gene expression. Differential expression of immune genes could explain why dKO DCs pulsed with optimal levels of exogenous SIINFEKL peptide are less immunogenic than WT DCs (supplemental Fig. 2.S1). Further work is needed to discover how IPs may regulate gene expression. Nevertheless, it is interesting to note that genes on which IPs had a non-redundant effect were clustered in the genome (Fig. 2.5C). Gene order in eukaryotes is not random. In all well-studied genomes, genes of similar and/or coordinated expression tend to be linked in clusters that can extend up to many megabases⁷⁰. Gene clustering often results from the sharing of regulatory elements⁷¹. In line with this, proteasome 20S core particles regulate transcriptional activation by controlling the localization, abundances and activity of transcriptional activators and repressors through proteolytic degradation³⁸⁻⁴¹. We therefore propose that the non-redundant effect of IPs on gene expression may result from proteolysis of transcriptional modulators or their regulators. The overarching conclusion of our work is that IP subunits MECL1 and LMP7 have more than one non-redundant role. They have a dramatic impact on the MIP repertoire and a heretofore unrecognized impact on expression of immune-related genes. Both of these effects are probably of great importance in adaptive immune responses and may be instrumental in the remarkable conservation of IPs in gnathostomes.

2.9 Acknowledgements

The authors thank Dr T.A. Griffin for providing the *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* mice, Jean-Philippe Laverdure for help with bioinformatic analyses and Martin Giroux for thoughtful suggestions. We are grateful to the staff of the following core facilities at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) for their outstanding support: Animal facility, Bioinformatics, Flow cytometry, Genomics, and Proteomics.

2.10 Footnotes

*This work was supported by Terry Fox New Frontiers Program in Cancer Immunotherapy (grant# 018005) and the Canadian Cancer Society Research Institute (grant # 019475). DdV and DPG are supported by training grants from the CIHR. MHF was supported by a studentship from the FRSQ. CP and PT hold Canada Research Chairs in Immunobiology, and Proteomics and Bioanalytical Spectrometry, respectively. SM holds the CIBC Breast Cancer Research Chair at Université de Montréal. IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the FRSQ.

2.11 Supplementary material

2.11.1 Supplemental figure

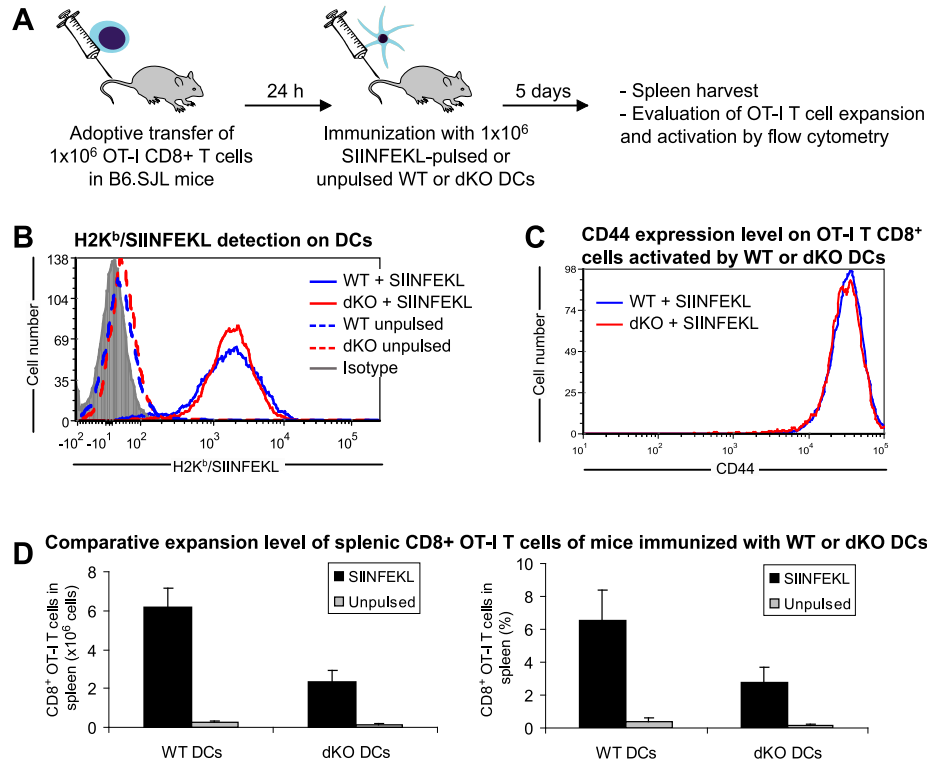


Figure 2.S1 dKO DCs are able to activate T cells but are less efficient than WT DCs. (A) Experimental model. (B) WT and dKO DCs pulsed with SIINFEKL express similar levels of H2K^b/SIINFEKL at cell surface. Mature WT and dKO DCs were either left untouched or stripped with mild acid buffer, pulsed with 2 mM of SIINFEKL peptide for 1h at 26°C followed by a 3h incubation at 37°C. SIINFEKL cell-surface level was compared by flow cytometry using the 25-D1.16 antibody (Porgador A et al, Immunity 1997, 6:715-26). Showing one representative experiment. (C) dKO DCs are able to activate CD8⁺ OT-I T cells. CD8⁺ OT-I T cells from mice primed with SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs express similar levels of CD44. Showing one representative experiment. (D) dKO DCs activate OT-I T cells less efficiently than WT DCs. Mice primed with SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs were evaluated for their abundance of splenic CD8⁺ OT-I T cells (mean +/- SD of triplicate experiments).

2.11.2 Supplemental tables

Table 2.S1. Total list of MHC I-peptides detected on DCs

Available at: <http://www.mcponline.org/content/9/9/2034/suppl/DC1>

Table 2.S2. Pathways enriched in MIP source genes from DCs and thymocytes

	Pathway Name	ID	Genes in sample	Genes in InnateDB	P value	Gene Symbols
Pathways enriched in DC peptide source genes	Acute myeloid leukemia – Myeloid differentiation	671	7	57	0,0007	<i>Frap1, Jup, Mapk1, Mapk3, Ppard, Stat3, Stat5a</i>
	Proteasome	630	6	45	0,0011	<i>Psmb8, Psmb9, Psmc11, Psmc12, Psmc2, Psmc6</i>
	Adherens junction	741	6	74	0,0132	<i>Actn4, Ctnnb1, Iqgap1, Mapk1, Mapk3, Ptpn6</i>
	Long-term depression ^a	775	6	75	0,0141	<i>Itpr1, Lyn, Mapk1, Mapk3, Nos2, Ppp2r1b</i>
	Toll-like receptor signaling pathway	699	7	99	0,0156	<i>Map3k7ip2, Mapk1, Mapk3, Myd88, Stat1, Tlr7, Tlr9</i>
	Nicotinate and nicotinamide metabolism	615	3	24	0,0245	<i>Nampt, Nt5c3, Pnp1</i>
	Pentose phosphate pathway	611	3	24	0,0245	<i>Aldoa, Prps1, Prps2</i>
	Small cell lung cancer	747	6	86	0,0259	<i>Cdk2, Cdkn1b, Lamc1, Nos2, Ptgs2, Traf1</i>
	Fatty acid elongation in mitochondria	668	2	10	0,0273	<i>Hsd17b10, Ppt2</i>
	P53 signaling pathway ^a	666	5	65	0,0283	<i>Bid, Ccng2, Cdk2, Chek1, Pmaip1</i>
	Type II diabetes mellitus	641	4	45	0,0304	<i>Frap1, Mapk1, Mapk3, Prkcd</i>
	Prostate cancer	773	6	90	0,0315	<i>Cdk2, Cdkn1b, Ctnnb1, Frap1, Mapk1, Mapk3</i>
	Thyroid cancer	704	3	28	0,0368	<i>Ctnnb1, Mapk1, Mapk3</i>
	Pancreatic cancer	795	5	72	0,0414	<i>Arhgef6, Mapk1, Mapk3, Stat1, Stat3</i>
	Glycosphingolipid biosynthesis - globoseries	760	2	13	0,0449	<i>Gla, St3gal1</i>
	Prion disease	789	2	13	0,0449	<i>Lamc1, Nfe2l2</i>
	Ribosome ^a	756	5	74	0,0457	<i>Rpl18, Rpl28, Rpl4, Rpl7, Rps15a</i>

Pathways enriched in thymocyte peptide source genes	Tight junction	607	5	129	0,0127	<i>Ash1l, Myh9, Mylc2b, Ppp2r1a, Ppp2r1b</i>
	Purine metabolism	771	5	149	0,0223	<i>Impdh2, Pde2a, Pnp1, Polr2b, Rrm1</i>
	Cell cycle	717	4	110	0,0310	<i>Ccnd3, Cdkn1b, Chek1, Pcna</i>
	P53 signaling pathway ^a	666	3	65	0,0331	<i>Ccnd3, Ccng1, Chek1</i>
	Renal cell carcinoma	620	3	70	0,0399	<i>Cul2, Epas1, Mapk1</i>
	Pancreatic cancer	795	3	72	0,0428	<i>Arhgef6, Mapk1, Stat3</i>
	Ribosome ^a	756	3	74	0,0459	<i>Rps15, Rps15a, Rps7</i>
	Long-term depression ^a	775	3	75	0,0474	<i>Mapk1, Ppp2r1a, Ppp2r1b</i>

The InnateDB resource was used to identify enriched KEGG pathways associated to genes coding for MIPs eluted from DCs and thymocytes⁴⁶. Only significantly enriched pathways are shown ($P < 0.05$). ^a Enriched pathways shared between DC and thymocyte datasets.

Table 2.S3. DC- or immune-related function of genes differentially expressed in WT vs. dKO DCs

Classification	Gene ID	Gene Symbol	DC or immune related function	WT/dKO ratio	P value	References
Resistance to infection	140780	<i>Bmp2k</i>	Level inversely correlated with mouse susceptibility to T cruzi.	20,64	0,0000	⁷²
	21672	<i>Prdx2</i>	Up-regulated in activated CD8 ⁺ T cells during HIV infection.	11,11	0,0002	^{73, 74}
	12774	<i>Ccr5</i>	Facilitated infection by HIV.	10,71	0,0003	^{75, 76}
	80287	<i>Apobec3</i>	Level inversely correlated with susceptibility to HIV. Edits viral RNA, mutates DNA.	5,59	0,0001	^{77, 78}
	12345	<i>Capzb</i>	CapG ^{-/-} mice are more susceptible to Listeria monocytogenes.	4,09	0,0100	⁷⁹
	18406	<i>Orm2</i>	Binds antiretroviral protease inhibitors and was found increased in HIV patients.	-6,59	0,0045	⁸⁰
	56066	<i>Cxcl11</i>	Inversely correlated with mouse susceptibility to T cruzi. T cell a chemoattractant.	-10,89	0,0683	^{72, 81}

Antigen presentation	16913	<i>Psmb8</i>	Immunoproteasome catalytic subunit (LMP7).	594,77	0,0001	82
	12260	<i>C1qb</i>	Enhances antigen presentation to CD8 ⁺ T cells and phagocytosis by DCs.	13,20	0,0087	83-86
	13032	<i>Ctsc</i>	Activates granzymes A and B, cathepsin family involved in MHC II presentation	10,66	0,0000	87, 88
	330812	<i>Rnf150</i>	Part of E3 ubiquitin ligases family, which was found to affect MHC II traffic in DCs.	9,15	0,0042	89
	258832	<i>Olf1109</i>	Part of a cluster of genes in the MHC I region; potential reciprocal influence.	5,82	0,0006	90
	258503	<i>Olf198</i>	Part of a cluster of genes in the MHC I region; potential reciprocal influence.	3,66	0,0029	90
Phagocytosis	245049	<i>Myrip</i>	Interacts with myosin VIIA, which is involved in DC endocytosis.	8,44	0,0036	91
	11745	<i>Anxa3</i>	Ca ²⁺ and phospholipid-binding protein involved in membrane fusion, aggregation and transport of different vesicles in DCs	7,56	0,0001	92
	20346	<i>Sema3a</i>	Suppressed T cell proliferation by inhibiting actin cytoskeleton reorganization.	4,80	0,0147	93-95
	18784	<i>Pla2g5</i>	Regulated phagocytosis and contributed to innate response against <i>C albicans</i> .	-2,60	0,0003	96
	21968	<i>Tom1</i>	Binds polyubiquitin chains and recruits clathrin to endosomes.	-2,68	0,0031	97, 98
	67733	<i>Itgb3bp</i>	Binds integrin b3, which is involved in apoptotic body engulfment and exosome endocytosis by DCs.	-3,57	0,0101	99, 100
	11828	<i>Aqp3</i>	Water channel; volume control mechanism during macropinocytosis in DCs.	-4,02	0,0181	101
	381823	<i>Apold1</i>	Link between programmed cell death of host cells (via apoptosis or autophagic death) and immunity to pathogens.	-13,24	0,0085	102
Immune signaling	320713	<i>Mysm1</i>	Histone 2H de-ubiquitinase that contains Myb-like domains.	10,31	0,0006	103
	27967	<i>Cherp</i>	Involved in Ca ²⁺ mobilization, NFAT activation and cell proliferation (Jurkat Tcells)	6,72	0,0005	104
	231474	<i>Paqr3</i>	Adiponectin receptor inhibiting proinflammatory TNF α and inducing anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-1Ra).	5,86	0,0016	105, 106
	17691	<i>Snf1lk</i>	Prevents persistent CREB/TORC1-dependent transcription and is involved in c-Jun activation via MEF2/HDAC4 attenuation.	5,14	0,0008	107
	22223	<i>Uchl1</i>	Attenuates TNF α -induced NF- κ B activity and increases I κ B-alpha (vascular cells).	4,69	0,0002	108, 109
	494504	<i>Apcdd1</i>	Target of the Wnt/b-catenin pathway.	4,55	0,0028	110
	211228	<i>Lrrc25</i>	Contains PI3K-interaction and ITAM motifs; possibly a novel type of pattern-recognition receptor involved in the activation of immune cells.	3,35	0,0163	111
	17268	<i>Meis1</i>	Up-regulated by NUP98-HOXA9, and c-Myb is one of its strong targets.	2,57	0,0003	112, 113
	17863	<i>Myb</i>	Activates transcription via CREB binding protein, and p38MAPK delta controls its degradation in response to stress.	-2,24	0,0000	114, 115
	11555	<i>Adrb2</i>	Binding to its agonists inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes.	-2,69	0,0005	116
	16163	<i>Il13</i>	Up-regulates Fc γ R2, a negative regulator of immune response, on DCs.	-3,04	0,0039	117
	19715	<i>Rex2</i>	Is a Rac GEF connecting GPCRs, through Gbg and PI3k, to Rac activation.	-3,57	0,0018	118

	72049	<i>Tnfrsf13c</i>	B cell activating molecule produced by DCs and modulated by AIRE.	-3,76	0,0030	¹¹⁹
	21809	<i>Tgfb3</i>	Induces tolerance in DCs.	-4,44	0,0157	¹²⁰
	20187	<i>Ryk</i>	Wnt receptor; Wnt modulates DC maturation.	-4,51	0,0014	¹²¹
	12326	<i>Camk4</i>	Ca ²⁺ -dependent signaling cascade comprising CaMK4-CREB-Bcl-2 involved in a DC survival signal implicating TLR4.	-4,57	0,0027	¹²²
	20347	<i>Sema3b</i>	Inhibits the PI3k/Akt pathway through neuropilin-1 (lung and breast cancer cells).	-5,02	0,0050	¹²³
	14268	<i>Fnl</i>	Implicated in liver stroma-mediated activation of NK cells via TLR3 signaling.	-9,67	0,0005	¹²⁴
DC Maturation	23792	<i>Adam23</i>	Family members up-regulated during DC maturation.	4,23	0,0012	^{125, 126}
	107477	<i>Guca1b</i>	Family member YC-1 inhibits LPS-induced co-stimulatory molecular expression of DCs by inhibiting Akt activation, I κ B α degradation and NF κ B translocation.	3,48	0,0080	¹²⁷
	16847	<i>Lepr</i>	Receptor of leptin, which activates DCs, induces functional and morphological changes and promotes their survival.	-4,11	0,0735	^{128, 129}
	22359	<i>Vldlr</i>	Oxidized low-density lipoprotein that induces differentiation of monocytes into DCs.	-4,36	0,0656	^{130, 131}
	16564	<i>Kif21a</i>	Kinesin family member; kinesin-2 was found up-regulated during DC maturation.	-6,03	0,0235	¹³²
DC Migration	72054	<i>Cyp4f18</i>	Induced by LPS in DCs, and inactivates leukotriene B4 (LTB4), a receptor that promotes DC migration.	3,43	0,0046	^{133, 134}
	20856	<i>Stc2</i>	Stc1 modulates leukocyte and macrophages migration.	-3,05	0,0016	¹³⁵
	15199	<i>Hebp1</i>	FL2 (Hepb1-derived peptide) chemoattracts DCs, inhibits LPS-induced maturation.	-8,67	0,0028	¹³⁶
	171167	<i>Fut10</i>	Fucosyltransferases mediates emigration of iDCs into inflammation sites.	-8,68	0,0390	¹³⁷

WT/dKO ratio represents the relative intensity detected from WT hybridized samples compared to dKO samples. Negative values represent dKO/WT ratio.

Table 2.S4. Complete list of genes differentially expressed in WT vs. dKO DCs

No.	Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	WT/dKO ratio	P value
1	16913	<i>Psmb8</i>	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	594,77	0,0001
2	382045	<i>Gpr114</i>	G protein-coupled receptor 114	-62,43	0,0007
3	68616	<i>Gdpd3</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	-54,75	0,0012
4	112422	<i>2610305D13Rik</i>	RIKEN cDNA 2610305D13 gene	-45,12	0,0022
5	668581	<i>EG668581</i>	predicted gene, EG668581	38,96	0,0771
6	19944	<i>Rpl29</i>	ribosomal protein L29	33,92	0,0013
7	50768	<i>Dlc1</i>	deleted in liver cancer 1	23,74	0,0001
8	109361	<i>D730005E14Rik</i>	RIKEN cDNA D730005E14 gene	22,88	0,0002
9	140780	<i>Bmp2k</i>	BMP2 inducible kinase	20,64	0,0000
10	22351	<i>Vill</i>	villin-like	17,35	0,0033
11	67878	<i>Tmem33</i>	transmembrane protein 33	16,98	0,0000
12	232441	<i>Rerg</i>	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor	-15,19	0,0003
13	546368	<i>Gm5945</i>	predicted gene 5945	14,08	0,0048
14	667597	<i>BC023105</i>	cDNA sequence BC023105	-13,88	0,0015
15	381823	<i>Apold1</i>	apolipoprotein L domain containing 1	-13,24	0,0085
16	12260	<i>C1qb</i>	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	13,20	0,0087
17	57425	<i>U90926</i>	cDNA sequence U90926	12,92	0,0115
18	73061	<i>3110007F17Rik</i>	RIKEN cDNA 3110007F17 gene	12,12	0,0049
19	56043	<i>Akr1e1</i>	aldo-keto reductase family 1, member E1	11,89	0,0003
20	382265	<i>Gm5167</i>	predicted gene 5167	11,18	0,0048
21	21672	<i>Prdx2</i>	peroxiredoxin 2	11,11	0,0002
22	56066	<i>Cxcl11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-10,89	0,0683
23	12774	<i>Ccr5</i>	chemokine (C-C motif) receptor 5	10,71	0,0003
24	13032	<i>Ctsc</i>	cathepsin C	10,66	0,0000
25	320713	<i>Mysm1</i>	myb-like, SWIRM and MPN domains 1	10,31	0,0006
26	14768	<i>Lancl1</i>	LanC (bacterial lantibiotic synthetase component C)-like 1	-9,90	0,0072
27	56219	<i>Extl1</i>	exostoses (multiple)-like 1	9,75	0,0008
28	14268	<i>Fnl</i>	fibronectin 1	-9,67	0,0005
29	236069	<i>Gm13238</i>	predicted gene 13238	9,60	0,0000

30	330812	<i>Rnf150</i>	ring finger protein 150	9,15	0,0042
31	171167	<i>Fut10</i>	fucosyltransferase 10	-8,68	0,0390
32	15199	<i>Hebp1</i>	heme binding protein 1	-8,67	0,0028
33	245049	<i>Myrip</i>	myosin VIIA and Rab interacting protein	8,44	0,0036
34	70359	<i>Gtpbp3</i>	GTP binding protein 3	-7,83	0,0025
35	230806	<i>Aim1l</i>	absent in melanoma 1-like	-7,78	0,0016
36	11745	<i>Anxa3</i>	annexin A3	7,56	0,0001
37	626665	<i>LOC626665</i>	similar to zinc finger protein 665	-7,51	0,0028
38	433762	<i>LOC433762</i>	hypothetical gene LOC433762	7,38	0,0012
39	74134	<i>Cyp2s1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily s, polypeptide 1	-7,36	0,0121
40	668462	<i>EG668462</i>	predicted gene, EG668462	6,89	0,0153
41	433791	<i>Gm13251</i>	predicted gene 13251	6,75	0,0000
42	58238	<i>A830059I20Rik</i>	family with sequence similarity 181, member B	-6,72	0,0004
43	27967	<i>Cherp</i>	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	6,72	0,0005
44	18406	<i>Orm2</i>	orosomuroid 2	-6,59	0,0045
45	668280	<i>EG668280</i>	predicted gene, EG668280	6,49	0,0100
46	83486	<i>Rbm5</i>	RNA binding motif protein 5	6,23	0,0004
47	20148	<i>Dhrs3</i>	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	6,21	0,0021
48	230848	<i>Zbtb40</i>	zinc finger and BTB domain containing 40	6,05	0,0001
49	16564	<i>Kif21a</i>	kinesin family member 21A	-6,03	0,0235
50	231474	<i>Paqr3</i>	progesterin and adipoQ receptor family member III	5,86	0,0016
51	258832	<i>Olf1r109</i>	olfactory receptor 109	5,82	0,0006
52	433790	<i>Gm13241</i>	predicted gene 13241	5,63	0,0010
53	666026	<i>EG666026</i>	predicted gene, EG666026	5,59	0,0323
54	80287	<i>Apobec3</i>	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3	5,59	0,0001
55	70673	<i>Prdm16</i>	PR domain containing 16	5,58	0,0002
56	233115	<i>Dpy19l3</i>	dpy-19-like 3 (C. elegans)	-5,56	0,0043
57	226791	<i>Lyplal1</i>	lysophospholipase-like 1	-5,51	0,0076
58	72386	<i>2610035D17Rik</i>	RIKEN cDNA 2610035D17 gene	5,48	0,0018
59	231510	<i>Agpat9</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9	-5,40	0,0002
60	269211	<i>BC035947</i>	cDNA sequence BC035947	-5,31	0,0479
61	71583	<i>9130008F23Rik</i>	RIKEN cDNA 9130008F23 gene	5,27	0,0005

62	545248	<i>EG545248</i>	predicted gene, EG545248	5,20	0,0110
63	13860	<i>Eps8</i>	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	5,17	0,0006
64	76508	<i>2210015D19Rik</i>	RIKEN cDNA 2210015D19 gene	-5,16	0,0000
65	17691	<i>Sik1</i>	salt inducible kinase 1	5,14	0,0008
66	381549	<i>Zfp69</i>	zinc finger protein 69	-5,13	0,0010
67	20347	<i>Sema3b</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	-5,02	0,0050
68	67621	<i>Bend5</i>	BEN domain containing 5	-4,91	0,0503
69	20346	<i>Sema3a</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	4,80	0,0147
70	667337	<i>LOC667337</i>	hypothetical LOC667337	4,74	0,0004
71	22223	<i>Uchl1</i>	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	4,69	0,0002
72	276829	<i>Smtnl2</i>	smoothelin-like 2	-4,68	0,0046
73	69392	<i>1700024P12Rik</i>	RIKEN cDNA 1700024P12 gene	4,66	0,0013
74	668645	<i>Gm9282</i>	predicted gene 9282	-4,62	0,0013
75	68681	<i>1110030E23Rik</i>	RIKEN cDNA 1110030E23 gene	4,58	0,0006
76	12326	<i>Camk4</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	-4,57	0,0027
77	494504	<i>Apcdd1</i>	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	4,55	0,0028
78	638940	<i>EG638940</i>	predicted gene, EG638940	4,55	0,0017
79	382686	<i>LOC382686</i>	RIKEN cDNA 3110053B16 gene	-4,55	0,0397
80	97130	<i>C77080</i>	expressed sequence C77080	4,51	0,0037
81	20187	<i>Ryk</i>	receptor-like tyrosine kinase	-4,51	0,0014
82	14245	<i>Lpin1</i>	lipin 1	-4,45	0,0076
83	21809	<i>Tgfb3</i>	transforming growth factor, beta 3	-4,44	0,0157
84	78923	<i>Chsy3</i>	chondroitin sulfate synthase 3	-4,43	0,0377
85	22359	<i>Vldlr</i>	very low density lipoprotein receptor	-4,36	0,0656
86	104271	<i>Tex15</i>	testis expressed gene 15	-4,34	0,0005
87	244416	<i>Ppp1r3b</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	-4,33	0,0008
88	23792	<i>Adam23</i>	a disintegrin and metallopeptidase domain 23	4,23	0,0012
89	73656	<i>Ms4a6c</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C	4,21	0,0003
90	67276	<i>Eri1</i>	exoribonuclease 1	-4,17	0,0007
91	12331	<i>Cap1</i>	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	-4,14	0,0000

92	16847	<i>Lepr</i>	leptin receptor	-4,11	0,0735
93	12345	<i>Capzb</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	4,09	0,0100
94	77634	<i>Snapc3</i>	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3	4,06	0,0002
95	26458	<i>Slc27a2</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	-4,05	0,0028
96	110877	<i>Slc18a1</i>	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1	4,03	0,0002
97	11828	<i>Aqp3</i>	aquaporin 3	-4,02	0,0181
98	195522	<i>Zfp691</i>	zinc finger protein 691	-4,02	0,0024
99	71665	<i>Fucal</i>	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	3,94	0,0002
100	666532	<i>Gm13139</i>	predicted gene 13139	3,93	0,0002
101	215772	<i>9130014G24Rik</i>	RIKEN cDNA 9130014G24 gene	3,90	0,0015
102	104383	<i>Rcor2</i>	REST corepressor 2	-3,85	0,0038
103	78816	<i>Gmip</i>	Gem-interacting protein	-3,84	0,0026
104	239559	<i>A4galt</i>	alpha 1,4-galactosyltransferase	-3,83	0,0001
105	26382	<i>Fgd2</i>	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 2	3,81	0,0123
106	72049	<i>Tnfrsf13c</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13c	-3,76	0,0030
107	665081	<i>EG665081</i>	predicted gene, EG665081	3,76	0,0046
108	625719	<i>EG625719</i>	predicted gene, EG625719	3,75	0,0026
109	228576	<i>Mall</i>	mal, T-cell differentiation protein-like	-3,72	0,0060
110	234353	<i>Psd3</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	3,68	0,0017
111	72701	<i>Zfp618</i>	zinc fingerprotein 618	-3,67	0,0024
112	258503	<i>Olfir98</i>	olfactory receptor 98	3,66	0,0029
113	15572	<i>Elavl4</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)	-3,60	0,0228
114	17965	<i>Nbl1</i>	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	-3,59	0,0207
115	244556	<i>Zfp791</i>	zinc finger protein 791	-3,58	0,0010
116	19715	<i>Rex2</i>	reduced expression 2	-3,57	0,0018
117	67733	<i>Itgb3bp</i>	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	-3,57	0,0101
118	70713	<i>Gpr137c</i>	G protein-coupled receptor 137C	-3,52	0,1119
119	383940	<i>LOC383940</i>	similar to reduced expression 2	-3,50	0,0130
120	74374	<i>Clec16a</i>	C-type lectin domain family 16, member A	-3,49	0,0089
121	102093	<i>Phkb</i>	phosphorylase kinase beta	3,48	0,0002
122	107477	<i>Guca1b</i>	guanylate cyclase activator 1B	3,48	0,0080
123	72054	<i>Cyp4f18</i>	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 18	3,43	0,0046

124	231287	<i>Atp10d</i>	ATPase, class V, type 10D	-3,39	0,0034
125	259277	<i>Klk8</i>	kallikrein related-peptidase 8	-3,37	0,0162
126	230972	<i>Arhgef16</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 16	-3,37	0,0745
127	211228	<i>Lrrc25</i>	leucine rich repeat containing 25	3,35	0,0163
128	13730	<i>Emp1</i>	epithelial membrane protein 1	-3,35	0,0024
129	381853	<i>Gipr</i>	gastric inhibitory polypeptide receptor	-3,34	0,0054
130	622205	<i>EG622205</i>	predicted gene, EG622205	3,34	0,0008
131	76499	<i>Clasp2</i>	CLIP associating protein 2	-3,33	0,0019
132	667103	<i>Gm13570</i>	predicted gene 13570	3,31	0,0030
133	21784	<i>Tff1</i>	trefoil factor 1	3,29	0,0001
134	19652	<i>Rbm3</i>	RNA binding motif protein 3	-3,28	0,0079
135	55948	<i>Sfn</i>	stratifin	3,21	0,0060
136	12286	<i>Cacna1a</i>	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	-3,21	0,0006
137	228576	<i>Mall</i>	mal, T-cell differentiation protein-like	-3,20	0,0121
138	71306	<i>Mfap3l</i>	microfibrillar-associated protein 3-like	3,20	0,0040
139	244579	<i>Tox3</i>	TOX high mobility group box family member 3	-3,18	0,0139
140	224796	<i>Clic5</i>	chloride intracellular channel 5	3,15	0,0037
141	67742	<i>Samsn1</i>	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals, 1	3,13	0,0001
142	67451	<i>Pkp2</i>	plakophilin 2	-3,13	0,0137
143	100038586	<i>Gm10330</i>	predicted gene 10330	3,10	0,0002
144	69590	<i>Gpx8</i>	glutathione peroxidase 8 (putative)	-3,09	0,0021
145	70005	<i>1700029I01Rik</i>	RIKEN cDNA 1700029I01 gene	3,06	0,0001
146	20856	<i>Stc2</i>	stanniocalcin 2	-3,05	0,0016
147	16163	<i>Il13</i>	interleukin 13	-3,04	0,0039
148	72297	<i>B3gnt3</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	3,04	0,0009
149	13640	<i>Efna5</i>	ephrin A5	-3,02	0,0069
150	19041	<i>Ppl</i>	periplakin	-2,99	0,0046
151	319701	<i>Fbxo48</i>	F-box protein 48	-2,99	0,0040
152	625355	<i>EG625355</i>	predicted gene, EG625355	2,98	0,0094
153	102060	<i>Gadd45gip1</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	-2,92	0,0002
154	67405	<i>Nts</i>	neurotensin	-2,89	0,0033
155	13009	<i>Csrp3</i>	cysteine and glycine-rich protein 3	-2,89	0,0001

156	72309	<i>Tmem158</i>	transmembrane protein 158	-2,85	0,0095
157	21916	<i>Tmod1</i>	tropomodulin 1	-2,85	0,0012
158	106529	<i>Tecr</i>	trans-2,3-enoyl-CoA reductase	-2,84	0,0023
159	230767	<i>Iqcc</i>	IQ motif containing C	-2,84	0,0037
160	19651	<i>Rbl2</i>	retinoblastoma-like 2	-2,76	0,0005
161	72281	<i>Sh2d4a</i>	SH2 domain containing 4A	2,74	0,0007
162	11555	<i>Adrb2</i>	adrenergic receptor, beta 2	-2,69	0,0005
163	234366	<i>Gatad2a</i>	GATA zinc finger domain containing 2A	2,69	0,0004
164	21968	<i>Tom1</i>	target of myb1 homolog (chicken)	-2,68	0,0031
165	18784	<i>Pla2g5</i>	phospholipase A2, group V	-2,60	0,0003
166	666266	<i>Gm8013</i>	predicted gene 8013	2,59	0,0003
167	17268	<i>Meis1</i>	Meis homeobox 1	2,57	0,0003
168	59092	<i>Pcbp4</i>	poly(rC) binding protein 4	2,56	0,0045
169	72709	<i>C1qtnf6</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	-2,49	0,0000
170	65973	<i>Asph</i>	aspartate-beta-hydroxylase	-2,47	0,0004
171	17863	<i>Myb</i>	myeloblastosis oncogene	-2,24	0,0000

WT/dKO ratio represents the relative intensity detected from WT hybridized samples compared to dKO samples (mean of three replicates). Negative values represent dKO/WT ratio.

2.12 Bibliography

1. Toes,R.E. et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12 (2001).
2. Kesmir,C., van,N., V, de Boer,R.J., & Hogeweg,P. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics* 55, 437-449 (2003).
3. Van den Eynde,B.J. & Morel,S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 147-153 (2001).
4. Deol,P., Zaiss,D.M., Monaco,J.J., & Sijts,A.J. Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J. Immunol.* 178, 7557-7562 (2007).
5. Chen,W., Norbury,C.C., Cho,Y., Yewdell,J.W., & Bennink,J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193, 1319-1326 (2001).
6. Basler,M., Youhnovski,N., Van Den Broek,M., Przybylski,M., & Groettrup,M. Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Immunol.* 173, 3925-3934 (2004).
7. Pang,K.C. et al. Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8+ T cell responses. *J. Immunol.* 177, 7680-7688 (2006).
8. Robek,M.D., Garcia,M.L., Boyd,B.S., & Chisari,F.V. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. *J. Virol.* 81, 483-491 (2007).
9. Strehl,B. et al. Immunoproteasomes are essential for clearance of *Listeria monocytogenes* in nonlymphoid tissues but not for induction of bacteria-specific CD8+ T cells. *J. Immunol.* 177, 6238-6244 (2006).

10. Del, V.M., Schlicht, H.J., Ruppert, T., Reddehase, M.J., & Koszinowski, U.H. Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145-1153 (1991).
11. Lutz, M.B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* 223, 77-92 (1999).
12. Rock, K.L. et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771 (1994).
13. Wherry, E.J. et al. Re-evaluating the generation of a "proteasome-independent" MHC class I-restricted CD8 T cell epitope. *J. Immunol.* 176, 2249-2261 (2006).
14. Loureiro, J. & Ploegh, H.L. Antigen presentation and the ubiquitin-proteasome system in host-pathogen interactions. *Adv. Immunol.* 92, 225-305 (2006).
15. Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S.R., Serwold, T., & Kunisawa, J. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev.* 207, 31-41 (2005).
16. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82, 373-428 (2002).
17. Deshaies, R.J. & Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399-434 (2009).
18. Kloetzel, P.M. Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179-187 (2001).
19. Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M., & Kruger, E. IFN-g-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 9241-9246 (2005).

20. Macagno,A., Kuehn,L., de Giuli,R., & Groettrup,M. Pronounced up-regulation of the PA28a/b proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 31, 3271-3280 (2001).
21. Hughes,A.L. Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics* 46, 82-92 (1997).
22. Kesmir,C., van Noort,V., de Boer,R.J., & Hogeweg,P. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics* 55, 437-449 (2003).
23. Zaiss,D.M., de Graaf,N., & Sijts,A.J. The proteasome immunosubunit MECL-1 is a T cell intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect. Immun.*(2007).
24. Sewell,A.K. et al. IFN-g exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Immunol.* 162, 7075-7079 (1999).
25. Morel,S. et al. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity* 12, 107-117 (2000).
26. Chen,W., Norbury,C.C., Cho,Y., Yewdell,J.W., & Bennink,J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8⁺ T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193, 1319-1326 (2001).
27. Chapiro,J. et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J. Immunol.* 176, 1053-1061 (2006).
28. Deol,P., Zaiss,D.M.W., Monaco,J.J., & Sijts,A.J.A.M. Rates of processing determine the immunogenicity of immunoproteasome-generated epitopes. *J. Immunol.* 178, 7557-7562 (2007).

29. Dannull, J. et al. Immunoproteasome down-modulation enhances the ability of dendritic cells to stimulate anti-tumor immunity. *Blood* 110, 4341-4350 (2007).
30. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., & Goldberg, A.L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20, 2357-2366 (2001).
31. Mishto, M. et al. Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-ab and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *J. Mol. Biol.* 377, 1607-1617 (2008).
32. Toes, R.E. et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp. Med.* 194, 1-12 (2001).
33. Yewdell, J.W., Reits, E., & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Rev. Immunol.* 3, 952-961 (2003).
34. Eisenlohr, L.C., Huang, L., & Golovina, T.N. Rethinking peptide supply to MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 403-410 (2007).
35. York, I.A. et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18, 429-440 (2003).
36. Hammer, G.E., Kanaseki, T., & Shastri, N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity.* 26, 397-406 (2007).
37. Wearsch, P.A. & Cresswell, P. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat. Immunol.* 8, 873-881 (2007).
38. Lipford, J.R. & Deshaies, R.J. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol* 5, 845-850 (2003).

39. Lipford, J.R., Smith, G.T., Chi, Y., & Deshaies, R.J. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature* 438, 113-116 (2005).
40. Collins, G.A. & Tansey, W.P. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 197-202 (2006).
41. Bhaumik, S.R. & Malik, S. Diverse regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by the proteasome complex. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43, 419-433 (2008).
42. Fortier, M.H. et al. The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J. Exp. Med.* 205, 595-610 (2008).
43. Wells, J.W., Darling, D., Farzaneh, F., & Galea-Lauri, J. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scand. J. Immunol.* 61, 251-259 (2005).
44. Son, Y.I. et al. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J. Immunol. Methods* 262, 145-157 (2002).
45. Brochu, S., Baron, C., Hetu, F., Roy, D.C., & Perreault, C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J. Immunol.* 155, 5104-5114 (1995).
46. Lynn, D.J. et al. InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. *Mol. Syst. Biol.* 4, 218 (2008).
47. Peters, B. & Sette, A. Integrating epitope data into the emerging web of biomedical knowledge resources. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 485-490 (2007).
48. Barchet, W. et al. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8⁺ T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30, 1356-1363 (2000).

49. Lecoeur,H., Fevrier,M., Garcia,S., Riviere,Y., & Gougeon,M.L. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 253, 177-187 (2001).
50. Jedema,I., van der Werff,N.M., Barge,R.M., Willemze,R., & Falkenburg,J.H. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood* 103, 2677-2682 (2004).
51. Ferron,F., Longhi,S., Canard,B., & Karlin,D. A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins* 65, 1-14 (2006).
52. Zhang,B., Kirov,S., & Snoddy,J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 33, W741-W748 (2005).
53. Huang,D.W., Sherman,B.T., & Lempicki,R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44-57 (2009).
54. Groettrup,M., Standera,S., Stohwasser,R., & Kloetzel,P.M. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8970-8975 (1997).
55. Toes,R.E. et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12 (2001).
56. Schatz,M.M. et al. Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J. Immunol.* 180, 3210-3217 (2008).
57. Reits,E. et al. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* 20, 495-506 (2004).
58. Hammer,G.E., Gonzalez,F., Champsaur,M., Cado,D., & Shastri,N. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7, 103-112 (2006).

59. Gsponer,J., Futschik,M.E., Teichmann,S.A., & Babu,M.M. Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* 322, 1365-1368 (2008).
60. Gsponer,J. & Madan,B.M. The rules of disorder or why disorder rules. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 99, 94-103 (2009).
61. Hughes,A.L. & Hughes,M.K. Self peptides bound by HLA class I molecules are derived from highly conserved regions of a set of evolutionarily conserved proteins. *Immunogenetics* 41, 257-262 (1995).
62. Engelhard,V., Brickner,A., & Zarlign,A. Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol. Immunol.* 39, 127 (2002).
63. Ho,Y.K., Bargagna-Mohan,P., Wehenkel,M., Mohan,R., & Kim,K.B. LMP2-specific inhibitors: chemical genetic tools for proteasome biology. *Chem. Biol.* 14, 419-430 (2007).
64. Gileadi,U. et al. Generation of an immunodominant CTL epitope is affected by proteasome subunit composition and stability of the antigenic protein. *J. Immunol.* 163, 6045-6052 (1999).
65. Vavouri,T., Semple,J.I., Garcia-Verdugo,R., & Lehner,B. Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* 138, 198-208 (2009).
66. Caron,É., Charbonneau,R., Huppé,G., Brochu,S., & Perreault,C. The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome. *Int. Immunol.* 17, 1583-1596 (2005).
67. Groettrup,M., Kirk,C.J., & Basler,M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat. Rev. Immunol.* 10, 73-78 (2010).
68. Caudill,C.M. et al. T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J. Immunol.* 176, 4075-4082 (2006).

69. Muchamuel,T. et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* 15, 781-787 (2009).
70. Hurst,L.D., Pal,C., & Lercher,M.J. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat. Rev. Genet.* 5, 299-310 (2004).
71. Sproul,D., Gilbert,N., & Bickmore,W.A. The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat. Rev. Genet.* 6, 775-781 (2005).
72. Graefe,S.E. et al. Genes from Chagas susceptibility loci that are differentially expressed in *T. cruzi*-resistant mice are candidates accounting for impaired immunity. *PLoS. ONE.* 1, e57 (2006).
73. Geiben-Lynn,R. et al. HIV-1 antiviral activity of recombinant natural killer cell enhancing factors, NKEF-A and NKEF-B, members of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 278, 1569-1574 (2003).
74. Shau,H. et al. Endogenous natural killer enhancing factor-B increases cellular resistance to oxidative stresses. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 497-507 (1997).
75. Kuipers,H.F. et al. CC chemokine receptor 5 gene promoter activation by the cyclic AMP response element binding transcription factor. *Blood* 112, 1610-1619 (2008).
76. Kedzierska,K., Crowe,S.M., Turville,S., & Cunningham,A.L. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev. Med. Virol.* 13, 39-56 (2003).
77. Peng,G. et al. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* 110, 393-400 (2007).
78. Pido-Lopez,J. et al. Stimulation of cell surface CCR5 and CD40 molecules by their ligands or by HSP70 up-regulates APOBEC3G expression in CD4(+) T cells and dendritic cells. *J. Immunol.* 178, 1671-1679 (2007).

79. Parikh,S.S. et al. CapG(-/-) mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG(+/+) mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 71, 6582-6590 (2003).
80. Colombo,S. et al. Orosomucoid (alpha1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 307-318 (2006).
81. Petkovic,V., Moghini,C., Paoletti,S., Ugucioni,M., & Gerber,B. I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. *J. Leukoc. Biol.* 76, 701-708 (2004).
82. Yang,Z. et al. Cardiovascular Inflammation and Lesion Cell Apoptosis. A Novel Connection via the Interferon-Inducible Immunoproteasome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*(2009).
83. van Montfoort, N. et al. A novel role of complement factor C1q in augmenting the presentation of antigen captured in immune complexes to CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 178, 7581-7586 (2007).
84. Lu,J.H. et al. The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol. Immunol.* 5, 9-21 (2008).
85. Baruah,P. et al. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood* 113, 3485-3493 (2009).
86. Chen,Y., Park,Y.B., Patel,E., & Silverman,G.J. IgM antibodies to apoptosis-associated determinants recruit C1q and enhance dendritic cell phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* 182, 6031-6043 (2009).
87. Pham,C.T. & Ley,T.J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8627-8632 (1999).
88. Nakagawa,T.Y. & Rudensky,A.Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172, 121-129 (1999).

89. De Gassart, A. et al. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3491-3496 (2008).
90. Amadou, C. et al. Co-duplication of olfactory receptor and MHC class I genes in the mouse major histocompatibility complex. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3025-3040 (2003).
91. Holt, J.P., Bottomly, K., & Mooseker, M.S. Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 756-766 (2007).
92. Larsson, M. et al. Role of annexins in endocytosis of antigens in immature human dendritic cells. *Immunology* 92, 501-511 (1997).
93. Lepelletier, Y. et al. Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur. J. Immunol.* 36, 1782-1793 (2006).
94. Lepelletier, Y. et al. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 5545-5550 (2007).
95. Moretti, S. et al. Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* 111, 2290-2299 (2008).
96. Balestrieri, B. et al. Group V secretory phospholipase A2 modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J. Immunol.* 182, 4891-4898 (2009).
97. Katoh, Y., Imakagura, H., Futatsumori, M., & Nakayama, K. Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 143-149 (2006).
98. Yamakami, M., Yoshimori, T., & Yokosawa, H. Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J. Biol. Chem.* 278, 52865-52872 (2003).

99. Poggi,A., Carosio,R., Rubartelli,A., & Zocchi,M.R. Beta(3)-mediated engulfment of apoptotic tumor cells by dendritic cells is dependent on CAMKII: inhibition by HIV-1 Tat. *J. Leukoc. Biol.* 71, 531-537 (2002).
100. Morelli,A.E. et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104, 3257-3266 (2004).
101. de Baey, A. & Lanzavecchia,A. The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J. Exp. Med.* 191, 743-748 (2000).
102. Smith,E.E. & Malik,H.S. The apolipoprotein L family of programmed cell death and immunity genes rapidly evolved in primates at discrete sites of host-pathogen interactions. *Genome Res.* 19, 850-858 (2009).
103. Zhu,P. et al. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 27, 609-621 (2007).
104. O'Rourke,F.A., LaPlante,J.M., & Feinstein,M.B. Antisense-mediated loss of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP; ERROT213-21) impairs Ca²⁺ mobilization, nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and cell proliferation in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem. J.* 373, 133-143 (2003).
105. Wolf,A.M., Wolf,D., Rumpold,H., Enrich,B., & Tilg,H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 630-635 (2004).
106. Garitaonandia,I., Smith,J.L., Kupchak,B.R., & Lyons,T.J. Adiponectin identified as an agonist for PAQR3/RKTG using a yeast-based assay system. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 29, 67-73 (2009).
107. Li,S., Zhang,C., Takemori,H., Zhou,Y., & Xiong,Z.Q. TORC1 regulates activity-dependent CREB-target gene transcription and dendritic growth of developing cortical neurons. *J. Neurosci.* 29, 2334-2343 (2009).

108. Takami,Y. et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF-kappaB activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2184-2190 (2007).
109. Schall,T.J., Bacon,K., Toy,K.J., & Goeddel,D.V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671 (1990).
110. Takahashi,M. et al. Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 5651-5656 (2002).
111. Rissoan,M.C. et al. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100, 3295-3303 (2002).
112. Hess,J.L. et al. c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* 108, 297-304 (2006).
113. Goh,S.L. et al. Transcriptional activation by MEIS1A in response to PKA signalling requires the TORC family of CREB co-activators. *J. Biol. Chem.*(2009).
114. Pani,E. & Ferrari,S. p38MAPK delta controls c-Myb degradation in response to stress. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 388-394 (2008).
115. Sano,Y. & Ishii,S. Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *J. Biol. Chem.* 276, 3674-3682 (2001).
116. Mizuno,K. et al. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes. *Immunol. Lett.* 101, 168-172 (2005).
117. Radstake,T.R. et al. Dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis lack the interleukin 13 mediated increase of Fc gamma RII expression, which has clear functional consequences. *Ann. Rheum. Dis.* 64, 1737-1743 (2005).

118. Hernandez-Negrete,I. et al. P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *J. Biol. Chem.* 282, 23708-23715 (2007).
119. Lindh,E. et al. AIRE regulates T-cell-independent B-cell responses through BAFF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 18466-18471 (2008).
120. Belladonna,M.L. et al. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J. Immunol.* 181, 5194-5198 (2008).
121. Staal,F.J., Luis,T.C., & Tiemessen,M.M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 581-593 (2008).
122. Illario,M. et al. Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood* 111, 723-731 (2008).
123. Castro-Rivera,E., Ran,S., Brekken,R.A., & Minna,J.D. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 8295-8303 (2008).
124. Xia,S. et al. Liver stroma enhances activation of TLR3-triggered NK cells through fibronectin. *Mol. Immunol.* 45, 2831-2838 (2008).
125. Richens,J. et al. The detection of ADAM8 protein on cells of the human immune system and the demonstration of its expression on peripheral blood B cells, dendritic cells and monocyte subsets. *Immunobiology* 212, 29-38 (2007).
126. Fritsche,J. et al. Molecular cloning and characterization of a human metalloprotease disintegrin--a novel marker for dendritic cell differentiation. *Blood* 96, 732-739 (2000).
127. Tsai,I.F. et al. Modulation of human monocyte-derived dendritic cells maturation by a soluble guanylate cyclase activator, YC-1, in a cyclic nucleotide independent manner. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1299-1310 (2007).

128. Mattioli,B. et al. Leptin as an immunological adjuvant: enhanced migratory and CD8+ T cell stimulatory capacity of human dendritic cells exposed to leptin. *FASEB J.* 22, 2012-2022 (2008).
129. Mattioli,B., Giordani,L., Quaranta,M.G., & Viora,M. Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *FEBS Lett.* 583, 1102-1106 (2009).
130. Shen,L.H. et al. Oxidized low-density lipoprotein induces differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells. *Atherosclerosis* 199, 257-264 (2008).
131. Perrin-Cocon,L. et al. Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte. *J. Immunol.* 167, 3785-3791 (2001).
132. Dietz,A.B., Bulur,P.A., Knutson,G.J., Matasic,R., & Vuk-Pavlovic,S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 731-738 (2000).
133. Christmas,P. et al. Cytochrome P-450 4F18 is the leukotriene B4 omega-1/omega-2 hydroxylase in mouse polymorphonuclear leukocytes: identification as the functional orthologue of human polymorphonuclear leukocyte CYP4F3A in the down-regulation of responses to LTB4. *J. Biol. Chem.* 281, 7189-7196 (2006).
134. Del Prete, A. et al. Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood* 109, 626-631 (2007).
135. Chakraborty,A. et al. Stanniocalcin-1 regulates endothelial gene expression and modulates transendothelial migration of leukocytes. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 292, F895-F904 (2007).
136. Gao,J.L. et al. F2L, a peptide derived from heme-binding protein, chemoattracts mouse neutrophils by specifically activating Fpr2, the low-affinity N-formylpeptide receptor. *J. Immunol.* 178, 1450-1456 (2007).

137. Pendl,G.G. et al. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 99, 946-956 (2002).

CHAPITRE 3

ARTICLE

*Immunoproteasomes Shape the Transcriptome and Regulate the
Function of Dendritic Cells*

Référence de publication :

Manuscrit en préparation

3 Immunoproteasomes Shape the Transcriptome and Regulate the Function of Dendritic Cells

Danielle de Verteuil,^{1,2} Alexandre Rouette,^{1,2} Marie-Pierre Hardy,¹ Stéphanie Lavallée,¹ Assya Trofimov,¹ Étienne Gaucher,¹ and Claude Perreault¹

¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²These authors contributed equally to this work

3.1 Présentation de l'article

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que la présence de l'IP augmente à la fois le nombre et la diversité des peptides sur les CMH I à la surface cellulaire. La différence d'abondance entre les peptides ne corrélait pas avec une différence d'abondance de leur ARNm source. Sachant que le PC est un important régulateur de la transcription, nous avons ainsi pu éliminer un biais indirect par lequel la diversité des peptides proviendrait d'un mécanisme jusqu'alors insoupçonné de l'IP sur ce même processus. Or, même si aucune corrélation n'a été démontrée entre l'immunopeptidome et le transcriptome, nous avons observé par micropuces à ARNm une variation de l'abondance d'un nombre non négligeable de transcrits en absence d'IP. Les gènes affectés étaient enrichis significativement sur certaines portions chromosomiques et partageaient des fonctions associées aux cellules dendritiques, deux observations suggérant une possible co-régulation de ces gènes.

Ces résultats inédits représentent la première observation concrète d'un effet de l'IP sur le transcriptome. Comme le PC régule la transcription à plusieurs niveaux, il ne nous a pas échappé que l'IP, de par sa nature très similaire, puisse avoir de tels effets. L'activité catalytique du PC permet entre autres de dégrader l'ARN polymérase II pour promouvoir l'élongation et permettre des cycles successifs d'initiation de la transcription¹. L'activité protéolytique régule aussi la localisation, l'activité, la stabilité et l'échange des facteurs de transcription^{1,2}. De plus, l'ubiquitylation des histones H2A et H2B marque généralement la fermeture et l'ouverture de la chromatine, respectivement^{3,4}. L'ubiquitylation de la polymérase et des histones pourrait d'ailleurs servir au recrutement local du protéasome puisque parallèlement, il a été démontré que celui-ci peut lier directement l'ADN^{1,5,6}. Enfin, la dégradation ou l'accumulation de protéines poly-ubiquitylées dans la cellule peut faire varier l'abondance de l'ubiquitine nucléaire et notamment les niveaux d'ubiquitylation des histones⁷ (voir section 1.2.2.3).

Dans le présent chapitre, nous explorons donc pour la première fois ce rôle de l'IP sur la régulation du transcriptome en nous attachant particulièrement à son impact non-redondant par rapport au PC.

3.2 Contribution des co-auteurs

En tant que co-premiers auteurs de l'article, Alexandre Rouette et moi-même avons tous deux contribué de façon majeure mais distincte à la planification, l'exécution des expériences et l'analyse des résultats (à l'exception des essais d'immunisations qui ont été exécutés et analysés par Marie-Pierre Hardy) et à l'écriture du manuscrit, sous la supervision du Dr Claude Perreault. Les autres co-auteurs ont eu une contribution significative à certaines portions de l'article seulement.

Ma contribution dans les différentes figures et tableaux de l'article :

- Figure 3.1	100%	- Tableau 3.S1	5%
- Figure 3.2	25%	- Tableau 3.S2	0%
- Figure 3.3	100%	- Tableau 3.S3	0%
- Figure 3.4	100%	- Tableau 3.S4	0%
- Figure 3.5	50%	- Tableau 3.S5	0%
- Figure 3.6	10%	- Tableau 3.S6	100%
- Figure 3.7	25%	- Tableau 3.S7	100%
- Figure 3.S1	20%		
- Figure 3.S2	100%		
- Figure 3.S3	25%		
- Figure 3.S4	0%		

3.3 Summary

By regulating protein degradation, constitutive proteasomes (CPs) control practically all cellular functions. In addition to CPs, vertebrates express immunoproteasomes (IPs). The sole non-redundant role ascribed to IPs is their enhanced ability to generate antigenic peptides. We report that IPs modulate the expression of 8,104 genes in maturing dendritic cells (DCs) via regulation of signaling pathways such as IRFs, STATs and NF- κ B. IPs regulate the transcription of many mRNAs and maturation of a few of them. Moreover, even when engineered to present optimal amounts of antigenic peptide, IP-deficient DCs were inefficient for *in vivo* T-cell priming. Our study shows that the role of IPs is not limited to antigen processing and reveals a major non-redundant role for IPs in transcription regulation. The dramatic effect of IPs on the transcriptional landscape could explain the various immune and non-immune phenotypes observed in vertebrates with IP-deficiency or -mutations.

3.4 Highlights

- IPs modulate the expression of 8,104 genes in maturing dendritic cells (DCs)
- IPs regulate the transcription of many genes and maturation of a few mRNAs
- IPs have pervasive effects via regulation of pathways such as IRFs, STATs and NF-kB
- IP-deficient DCs are inefficient for *in vivo* priming of naïve and memory T cells

3.5 Introduction

In all eukaryotes, proteolysis of a variety of cellular proteins by constitutive proteasomes (CPs) plays an important role in many basic cellular processes including regulation of cell cycle and division, differentiation and development, morphogenesis and response to stress⁸. Vertebrates also express another type of proteasome, immunoproteasomes (IPs), in which the three catalytic β -subunits expressed in CPs are replaced by interferon- γ -inducible homologues: LMP2 (aka β 1i, *Psmb9*) for β 1 (*Psmb6*), MECL1 (aka β 2i, *Psmb10*) for β 2 (*Psmb7*), and LMP7 (aka β 5i, *Psmb8*) for β 5 (*Psmb5*)⁹. The sole non-redundant role ascribed to IPs is their enhanced ability to generate MHC I-associated peptides (MIPs)¹⁰. Indeed, mass spectrometry analyses of MIPs eluted from wild-type and IP-deficient mice have demonstrated that IPs increase the abundance and diversity of MIPs^{11,12}. The distinct conformation of Met45 in LMP7 relative to β 5, leading to different sized S1 pockets¹³ is probably responsible for the distinct cleavage preferences of CPs and IPs^{11,14}.

As regulators of protein degradation, proteasomes regulate practically all cellular functions^{8,15}. It is therefore logical to assume that IPs could have pleiotropic and far reaching effects on cell function^{16,17}. In line with this, deletion or inhibition of IP subunits can affect several immune cell functions independently of MIP processing: T-cell proliferation, B-cell survival and cytokine production¹⁸⁻²⁰. Moreover, the expression of IPs in numerous non-immune cells from non-inflamed tissues suggests that the roles of IPs are not limited to the immune system. Thus, IPs have been implicated in adipocyte differentiation²¹, maintenance of pluripotency of embryonic stem cells²², response to injury in the retina and brain²³ and neoplastic transformation (Table 3.S1 available online). However, the mechanisms responsible for the various phenotypes observed in vertebrates with IP-deficiency or -mutations remain elusive.

The proteolytic subunits of CPs are known to regulate gene expression, typically via cleavage of transcriptional regulators^{24,25}. Since CPs and IPs display distinct substrate preferences^{11,13}, we hypothesized that they might have non-redundant effect on gene expression. This assumption was supported by preliminary gene expression microarray experiments showing that several transcripts are differentially expressed in wild-type (WT) and IP-deficient dendritic cells (DCs)¹¹. The goal of our work was therefore to evaluate the global impact of IPs on gene expression, discover its underlying mechanisms and evaluate its *in vivo* relevance.

WT DCs constitutively express equal amounts of CPs and IPs. We observed that *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* (dKO) mice contain normal amounts of proteasomes: the absence of IPs is compensated by a commensurate increase in the CP content. Based on multidimensional profiling

of WT and dKO DCs, we report that IPs regulate the expression of more than 8,000 transcripts in maturing DCs. The broad impact of IPs on gene expression is cell-autonomous, mediated mainly at the transcriptional level, and involves major signaling pathways including IRFs, NF- κ B and STATs. Furthermore, when both types of DCs were engineered to present similar levels of a model epitope, we found that IP-deficient DCs were less effective than WT DCs in priming T cells *in vivo*. We conclude that IPs have pervasive effects on gene transcription and thereby regulate fundamental cellular processes in DCs.

3.6 Results

3.6.1 The effect of IPs on gene expression is cell-autonomous and differentiation stage-dependent

In previous microarray experiments, we identified 226 transcripts that were differentially expressed in WT vs. dKO DCs¹¹. We first wanted to evaluate whether differential gene expression was cell-autonomous or dependent on cell extrinsic factors such as cytokine secretion^{18,26}. We therefore cultured bone marrow cells from CD45.2 WT and CD45.1 dKO mice either in the same or in separate Petri dishes, and assessed the abundance of differentially expressed transcripts. Of note, transcripts levels were similar in CD45.2 and CD45.1 WT DCs (data not shown). After differentiation for 8-days in the presence of granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) and an overnight maturation with lipopolysaccharide (LPS), we found that gene expression differences in WT and dKO DCs were not caused by varying culture conditions: DCs kept the same expression profile whether they were cultured separately or together (Figure 3.1A). Thus, transcriptomic changes provoked by the absence of IP-subunits are cell-autonomous.

We next asked whether differential gene expression was unique to mature DCs. We therefore analyzed bone marrow precursors on day 0, as well as immature and mature DCs harvested on culture day 8 and 9, respectively. RT-qPCR analyses revealed two major

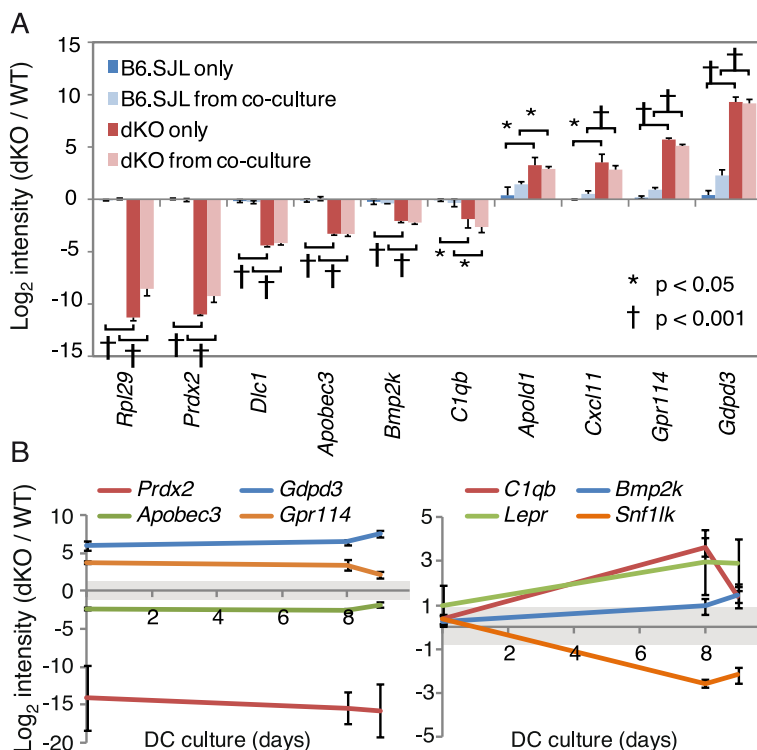


Figure 3.1 Gene Expression Changes Are Cell-Autonomous. (A) RT-qPCR experiments were performed on WT and dKO DCs cultured either together or in separate Petri dishes. After overnight stimulation with LPS, cells were harvested and sorted according to their CD45.1 (WT) or CD45.2 (dKO) phenotype. (B) WT and dKO cells were harvested on day 0 (bone marrow cells), day 8 (immature DCs) and day 9 (LPS-matured DCs) of culture and lysed for RNA extraction and RT-qPCR experiments. Left: genes differentially expressed in both bone marrow cells and DCs. Right: genes differentially expressed in immature and/or mature DCs only. Data are represented as mean \pm SD of 3 experimental replicates.

differential expression patterns between WT and dKO cells (Figure 3.1B). A first group of genes was already differentially expressed in bone marrow precursors, and remained as such throughout DC differentiation and maturation (Figure 3.1B left, all genes differed significantly at all timepoints). The second group consisted of genes that were affected only in mature DCs (*Bmp2k*, $p < 0.05$ at $t = 9$ days) or in both immature and mature DCs (*Clqb* and *Snf1lk* with $p < 0.05$ at days 8-9) (Figure 3.1B, right). These results show that transcriptomic variations induced by IPs can be differentiation stage-dependent.

3.6.2 Relationship between proteasome subunits and differential gene expression

IP subunits are cooperatively incorporated into nascent proteasomes, and the inclusion of catalytic subunit LMP2 is facilitated by the incorporation of LMP7 and MECL1^{27,28}. Accordingly, we detected only low levels of LMP2/ β 2/ β 5 mixed proteasomes in dKO DCs (Figure 3.S1A). Hence, dKO DCs contained mainly CPs. To evaluate the relative impact of LMP7 and MECL1 on gene expression, we conducted RT-qPCR experiments on DCs isolated from WT, *Lmp7*^{-/-}, *Mecl1*^{-/-} and dKO mice (Figure 3.2A). For 11 out of 13 genes tested, loss of either LMP7 or MECL1 alone had no impact on mRNA abundance. Thus, for the vast majority of genes the absence of both LMP7 and MECL1 was required to affect gene expression.

To probe the linkage between proteasomal degradation and variations in mRNA abundance, we used epoxomicin, a potent and selective inhibitor of both CPs and IPs. Pre-treatment with epoxomicin for 2h before LPS-stimulation eliminated differential expression of *Bmp2k*, *Cxcl11* and *Apobec3* in WT vs. dKO DCs (Figures 3.2B and 3.S1B). However, *Dlc1* and *Gdpd3* expression was unaffected by proteasome inhibition in both cell types (Figure 3.2C), even when epoxomicin treatment time was increased up to 16h (Figure 3.S1C). Of note, proteasome inhibition can negatively affect transcription via endoplasmic reticulum (ER) stress induction²⁹. However, this did not influence transcript levels in our experimental conditions: mRNA level of *Bip*, a marker of ER stress³⁰, was not increased in epoxomicin-treated compared to control DCs (Figure 3.S1D). We therefore conclude that differential expression of some but not all genes is tightly linked to proteasomal degradation.

Since WT DCs contain both CPs and IPs, we investigated whether gene expression discrepancies might be related to lower amounts of proteasomes in dKO DCs, or to particular nucleo-cytoplasmic distributions of IPs and CPs. Quantitation of proteasome levels using non-

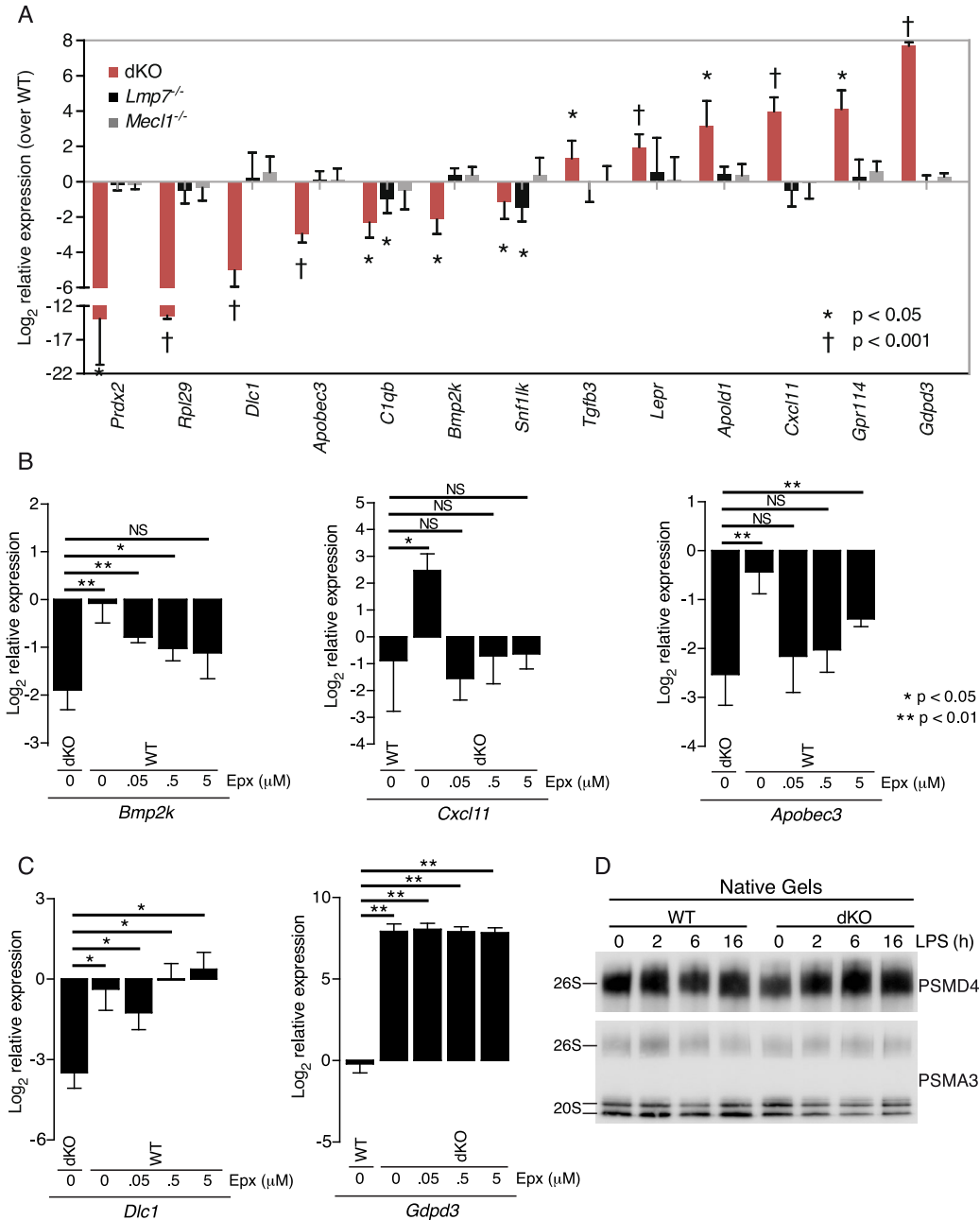


Figure 3.2 Relationship Between Proteasomes and Differential Gene Expression. (A) RT-qPCR experiments were performed on WT, *Lmp7*^{-/-}, *Mecl1*^{-/-} and dKO DCs treated for 16h with LPS. Data are represented as mean +/- SD of 3-7 experimental replicates. (B-C) RT-qPCR experiments were performed on WT and dKO DCs pre-treated for 2 hours with the graded concentrations of epoxomicin, then stimulated for 6h with LPS. Data were normalized on *Gapdh* and are represented as mean +/- SD of 3 experimental replicates. Epx=epoxomicin. See also Figure 3.S1. (D) Native gel electrophoresis followed by immunoblotting with anti-PSMA3 (20S subunit) or -PSMD4 (19S subunit) antibodies was performed on equal amounts of lysates from WT and dKO DCs stimulated with LPS for the indicated time. Representative image of 3 experimental replicates.

denaturing gel analysis of PSMA3, a 20S core subunit present in both IPs and CPs, and PSMD4, a 19S regulatory subunit, showed that WT and dKO DCs contained similar amounts of 20S and 26S proteasomes (Figure 3.2D). Furthermore, probing active proteasomes by fluorescence microscopy, using a catalytic inhibitor coupled to a fluorochrome, revealed that CPs and IPs presented similar distribution profiles and that proteasomes were predominantly localized in the cytosol in both WT and dKO DCs (Figure 3.S1E). Therefore, differences in gene expression between WT and dKO DCs cannot be ascribed to differences in the total abundance or localization of proteasomes.

3.6.3 IPs do not affect mRNA stability and have a minimal influence on mRNA maturation

The abundance of mature mRNAs is determined by the rate of mRNA synthesis, splicing and decay. We first analyzed mRNA stability because mRNA endonucleases and associated factors³¹ as well as mRNA decay factors binding to 3'UTR regions³² are regulated by ubiquitylation and proteasomal degradation. Furthermore, exonuclease LSM1 was shown to interact with proteasome catalytic subunits $\beta 5$ and LMP7 in yeast two-hybrid experiments³³. To determine if IPs and CPs had differential effects on mRNA stability, we therefore compared the stability of transcripts overexpressed in WT (Figure 3.3A) or in dKO (Figure 3.3B) DCs following treatment with actinomycin D. This gene set included transcripts whose half-life was short (< 5 h), intermediate (5-10 h) or long (> 10 h). Since half-lives were similar between WT and dKO DCs we conclude that IPs have no impact on mRNA stability.

Proteasome-dependent proteolysis regulates the abundance of serine-arginine-rich splicing factors, which play an important role in several mRNA regulation events, notably in determining splice site selection and in spliceosome assembly³⁴. Proteasomes also control the abundance of several nuclear factors, including splicing regulator S35 and spliceosomal components³⁵. In order to assess whether IPs and CPs had a differential effect on mRNA maturation, we compared by RT-qPCR the level of both spliced (mature) and unspliced (unprocessed) transcripts derived from differentially expressed genes (Figure 3.3C). To discriminate mature and unprocessed mRNAs, primer pairs spanning exon-exon junctions, or primer pairs within introns or spanning exon-intron junctions, were designed³⁶. For two target genes, *Rpl29* and *Hebp1*, IP-deficiency respectively decreased or increased mature mRNA abundance but had no impact on the unprocessed transcripts (Figure 3.3C, right). However,

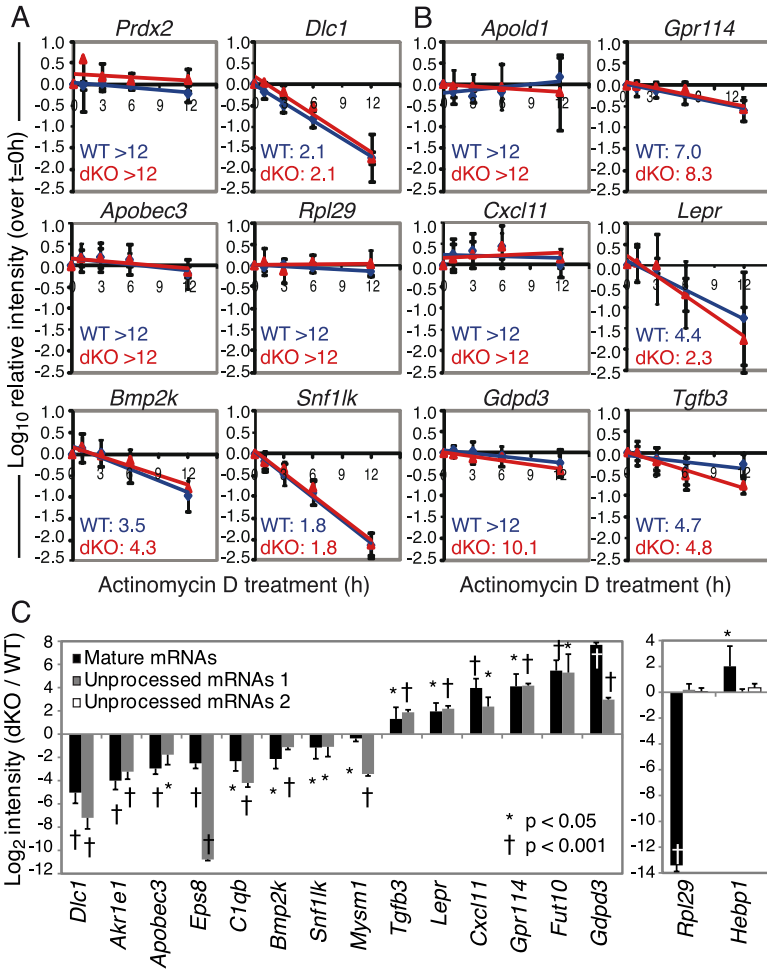


Figure 3.3 IPs Globally Do Not Affect mRNA Stability or Maturation. (A) Graphs showing the abundance of transcripts following actinomycin D treatment. Mean mRNA half-life (indicated in each graph) was calculated in WT (blue) and dKO (red) DCs for transcripts previously shown to be overexpressed in WT compared to dKO DCs. Data are represented as mean +/- SD of 3-7 experimental replicates. (B) Same as (A), for genes that were previously showed to be downregulated in WT compared to dKO DCs. (C) RT-qPCR experiments were performed on DNase-treated RNA samples from WT and dKO DCs with primers designed to target exon-exon junctions (mature mRNAs) or primers either spanning exon-intron junctions or within introns (unprocessed mRNAs). Data are represented as mean +/- SD of 3-7 experimental replicates (one-sided Student statistical test).

for 14 out of 16 transcripts (87%), absence of IP-subunits resulted in parallel upregulation or downregulation of both mature and unprocessed mRNAs (Figure 3.3C, left). Overall, these results strongly suggest that differences in transcripts abundance between WT and dKO DCs i) do not involve variations in mRNA stability, ii) result from differential interactions with the pre-mRNA splicing and maturation machinery in a few cases (~13%), and iii) and must therefore be regulated at the level of mRNA synthesis in most cases (~87%).

3.6.4 IPs have a broad impact on the transcriptional program of maturing DCs

In order to get more insights as to the overall impact of IPs on the transcriptional program and the biology of DCs, RNA-seq analyses were performed at different timepoints of LPS-induced DC maturation (untreated or treated with LPS for 1h, 2h or 6h). LPS, a component of

Gram-negative bacteria and ligand of Toll-like receptor 4 (TLR4), promotes the transcription of thousands of genes in a very reproducible and robust manner^{37,38}. As expected, LPS-induced maturation had a dramatic impact on the transcriptome of DCs: treatment for 6h led to differential expression of 9,845 genes (4,809 upregulated and 5,036 downregulated relative to untreated DCs) in WT DCs and 10,011 genes (4,857 upregulated and 5,154 downregulated) for dKO DCs (Figure 3.S2A). By comparing the transcriptome of WT and dKO DCs at each timepoint, we found a total of 8,104 differentially expressed genes (DEGs) with a significant adjusted p-value < 0.1 (Benjamini-Hochberg algorithm, Figure 3.4A). Out of these 8,104 DEGs, 19% (1,570) were affected at all stages of maturation (i.e. at all timepoints), 38% (3,107) were altered at only one specific timepoint, and 43% were affected at 2-3 timepoints. In addition, 91.5% of all DEGs between WT and dKO (7,419 out of 8,104) were affected by LPS treatment. Strikingly, 64.7% of all the genes affected by LPS in WT cells were significantly altered in the absence of IPs (7,419 out of the 11,455 DEGs affected after 1h, 2h or 6h of LPS, Figures 3.S2A and 3.4A). In other words, 64.7% of genes responsive to LPS treatment were differentially expressed in WT and dKO DCs. We conclude that i) the impact of IPs on the transcriptome is highly dependent on the maturation state of the DCs, and that ii) a great proportion of genes modulated by LPS are also regulated by IPs.

Of note, whereas an impressive number of genes were differentially expressed at each timepoint between WT and dKO, many changes were modest: for 75-79% of DEGs the difference in transcript abundance was ≤ 2 -fold (2425, 3306, 3805 and 4221 DEGs at 0, 1, 2 and 6h, respectively, Figure 3.4B). Also, the observed effect was bidirectional: IP-disruption did not lead to a global decrease or increase in mRNA abundance at any timepoint, but rather to both up- and down-regulation of transcripts in dKO compared to WT cells (see also Figure 3.S2B). Finally, IPs had a greater impact on mature DCs than on immature DCs (Figure 3.4A and 3.4B).

Given the complexity of gene expression variations we stratified our analyses by focusing on groups of genes that had similar kinetics of differential expression over time. The total 8,104 DEGs were unbiasedly separated into different groups, using the k-means clustering algorithm, as a function of their dKO/WT fold change at each timepoint (Figure 3.4C, see also Figure 3.S2C and Supplementary Methods for the determination of the number of clusters). We found 15 different kinetic patterns containing from 205 to 1278 genes. From those, 9 clusters contained genes with a positive \log_2 dKO/WT ratio at one or several timepoints following LPS treatment (clusters 1-9). Conversely, 6 clusters were rather downregulated in dKO following DC activation (clusters 10-15). Different groups of DEGs were detected at early (1h LPS, clusters 4 and 12), intermediate (2h LPS, clusters 3 and 11) or late timepoints (6h LPS, clusters 1 and 10),

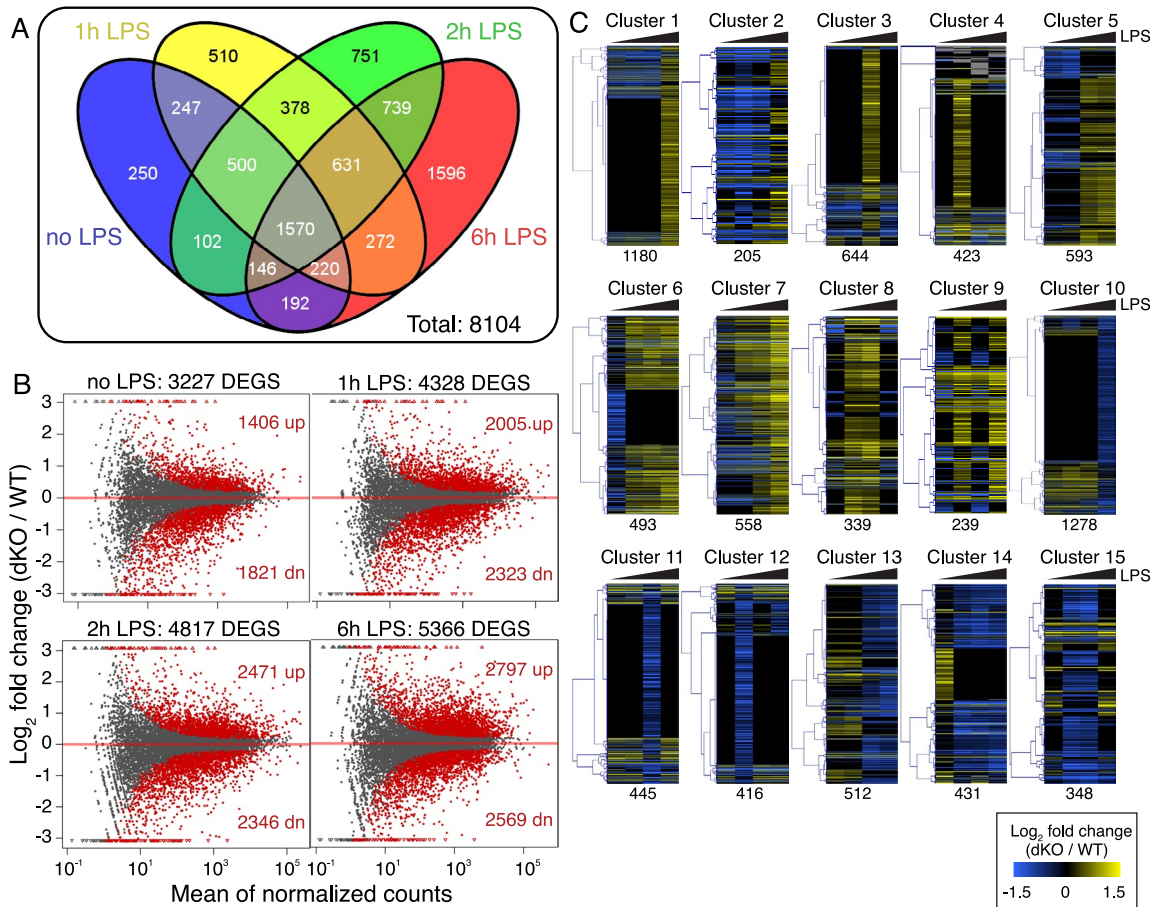


Figure 3.4 IPs Have a Broad Impact on the Transcriptional Program of Maturing DCs. (A) Venn diagram showing the 8104 DEGs (adjusted p-value < 0.1) in RNA-sequencing experiments. (B) Differential expression of genes between WT and dKO DCs which were untreated or treated with LPS for 1h, 2h or 6h. Red dots represent DEGs with a significant adjusted p-value (p < 0.1, Benjamini-Hochberg algorithm). (C) All 8,104 DEGs were clustered in 15 different groups as a function of their expression pattern using k-means clustering. Each heatmap represents one cluster with color-coded fold changes at each timepoint of LPS treatment (no LPS, 1h, 2h and 6h of LPS), with the number of genes included written underneath. See also Figure 3.S2.

and others were modulated at more than one timepoint. The complexity of the transcriptional cascade regulated by IPs and the emergence of discrete gene clusters at various timepoints suggest that IPs may control transcription through distinct mechanisms at different stages of DC maturation. We surmised that such broad transcriptomic variations could result from two non-mutually exclusive mechanisms: variations in histone ubiquitylation and proteolysis of transcription factors.

3.6.5 Variations in histone monoubiquitylation cannot explain the impact of IPs on the transcriptome

The amount of free ubiquitin in cells is very small. Therefore, upon activation of the ubiquitin-proteasome system, the ubiquitin supply is largely obtained from ubiquitylated histones⁷. Monoubiquitylated-H2A (ubH2A) and -H2B (ubH2B) are associated with transcriptional repression and activation, respectively²⁵. Hence, we speculated that widespread changes in the pool of ubiquitylated histones might explain the broad impact of IPs on the transcriptome.

We first monitored by immunoblotting the impact of IP-deficiency on the levels of ubiquitylated proteins in DCs. Using antibodies directed against unconjugated ubiquitin (Figure 3.S3B) or tetra-ubiquitin chains (Figure 3.S3A), we found no changes in total levels of ubiquitylated proteins in WT vs. dKO DCs, at any stage of DC maturation. Moreover, using monoubiquitylation-specific anti-histone antibodies, we observed no difference in ubH2A levels between WT and dKO (Figure 3.5A). However, in the absence of LPS, we observed

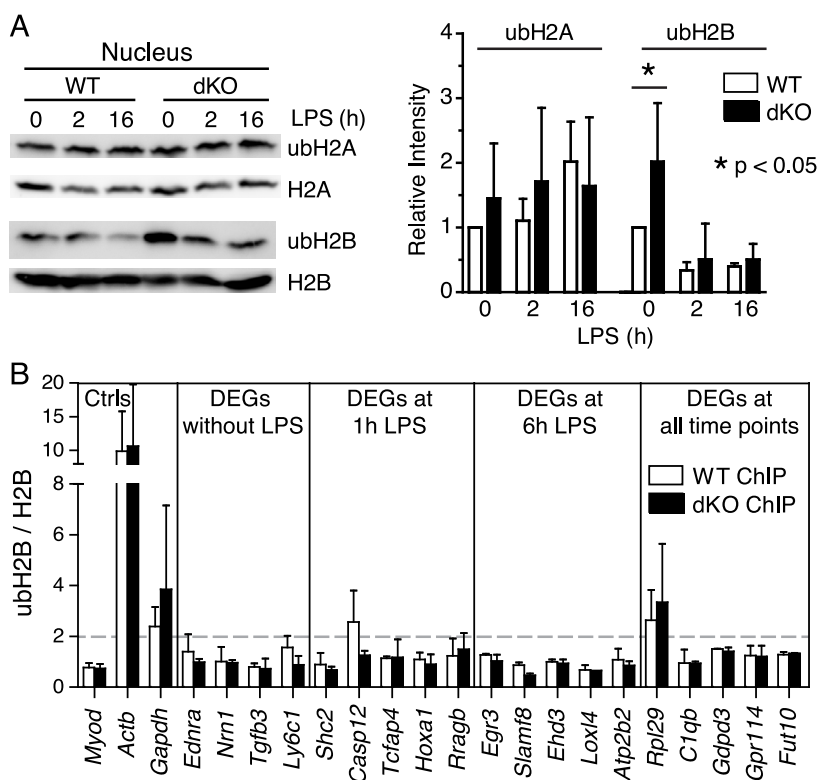


Figure 3.5 The Broad Gene Expression Changes Cannot be Explained by Variations in Histone Monoubiquitylation.

(A) Nuclear extracts were prepared from WT and dKO DCs treated with the indicated concentration of LPS and immunoblotted with antibodies against total or monoubiquitylated histones H2A or H2B. Data are represented as mean \pm SD of 5 experimental replicates. (B) Chromatin immunoprecipitations were performed using an anti-monoubiquityl H2B antibody in WT and dKO immature (LPS-unstimulated) DCs. Presence of ubH2B was monitored using real-time PCR with primers targeting genes found differentially expressed i) exclusively without LPS, ii)

only after 1h or only after 6h of LPS treatment, or iii) genes that were differentially expressed at all timepoints (0h, 1h, 2h and 6h of LPS treatment). A parallel reaction was performed with anti-H2B for normalization. Data are represented as mean \pm SD of 2 experimental replicates. A two-sided paired Student statistical test was used. See also Figure 3.S3.

that dKO DCs contained more ubH2B than WT DCs. This discrepancy disappeared following LPS treatment. To explore the potential significance of differential H2B ubiquitylation in our model, chromatin was immunoprecipitated from immature WT and dKO DCs with an H2B- or ubH2B-specific antibody. This was followed by qPCR amplification of genes differentially expressed only in unstimulated WT vs. dKO DCs. In addition, since levels of ubH2B in unstimulated DCs could influence mRNA synthesis occurring at later timepoints, we performed qPCR amplifications of two other gene sets: i) genes differentially expressed exclusively after 1h or 6h of LPS treatment, or ii) genes differentially expressed at all timepoints. While ubH2B was enriched in coding regions of highly expressed *Actb* and *Gapdh*, but not *Myod* (where no transcripts were detectable), no differences in ubH2B enrichment between WT and dKO were observed in coding regions of all DEGs tested (Figures 3.5B and 3.S3C). In line with this, while unstimulated *Lmp7*^{-/-} DCs contained increased amounts of ubH2B (Figure 3.S3D), they did not show changes in gene expression compared to WT DCs (Figure 3.2A). We conclude that deletion of LMP7 was sufficient to increase levels of ubH2B, but this increase was not responsible for discrepancies in the transcriptomic profile of WT vs. dKO DCs.

3.6.6 STAT, IRF and NF- κ B signaling pathways are perturbed in IP-deficient DCs

Using the Upstream Regulator prediction tool from the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software, we sought to identify putative regulators of transcription that would be specifically targeted by IPs. We analyzed DEGs partitioned into clusters having similar kinetics of expression (see Figure 3.4C) for two reasons: i) k-means clustering distributes all genes into different clusters, thus eliminating possible gene overlaps between groups, and ii) k-means clusters genes with similar kinetics of differential expression and such genes are expected to be regulated by shared transcriptional regulators. For each cluster, a heatmap of predicted activity was generated including every transcriptional regulator that had a z-score ≥ 2 (activity predicted to be increased in dKO) or ≤ -2 (activity predicted to be decreased in dKO), as well as a significant enrichment ($p \leq 0.05$), for at least one of the timepoints (Figure 3.6A and Table 3.S2). We found a strong correlation ($R > 0.5$) between the predicted activity of 17 regulators and their mRNA abundance (19% of unique regulators, Table 3.S3). This suggests that the activity of up to 81% regulators was modulated at the post-transcriptional levels, consistent with the idea that IPs vs. CPs differentially regulated their proteolysis.

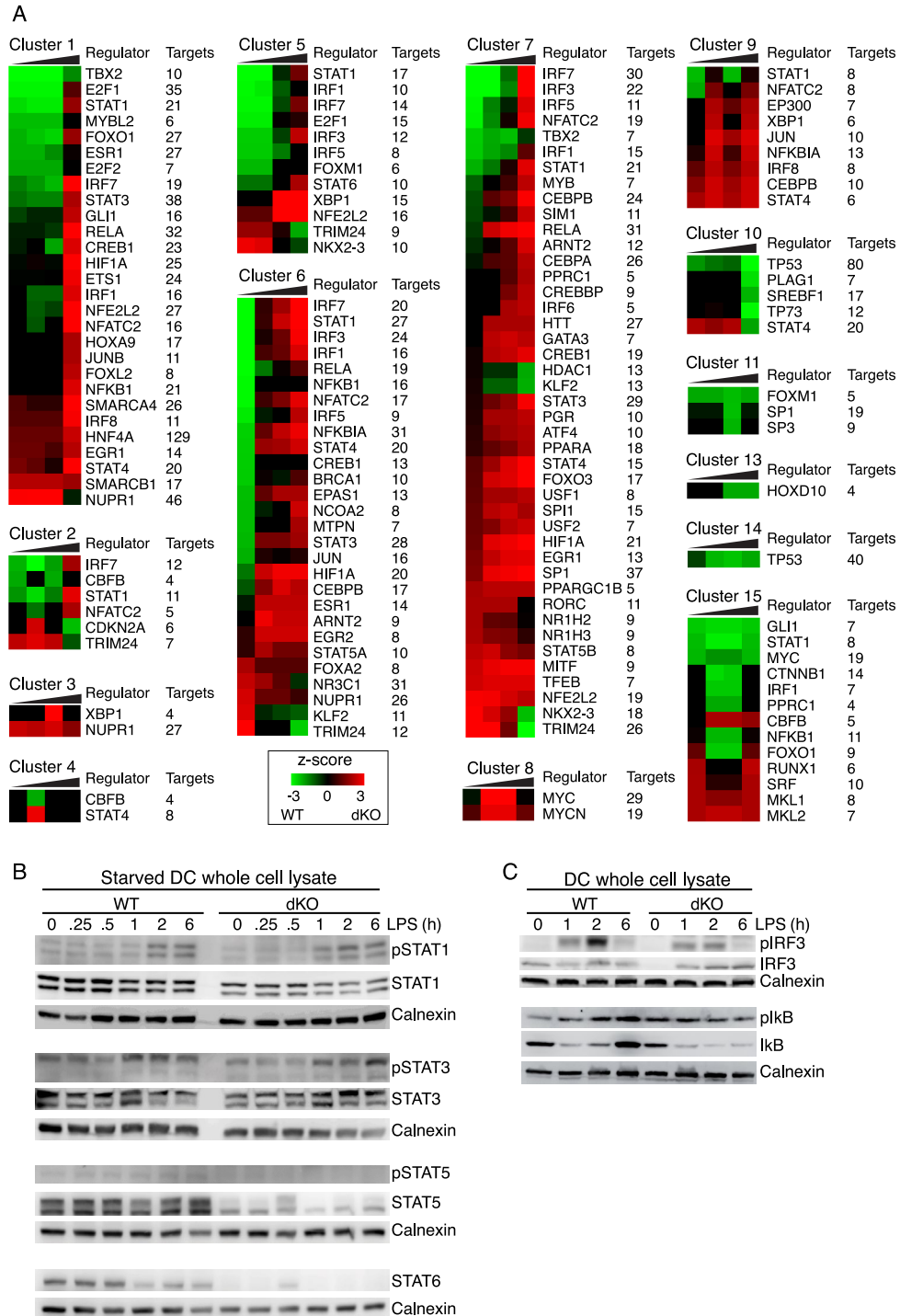


Figure 3.6 STAT, IRF and NF- κ B Pathways Are Perturbed in IP-Deficient DCs. (A) For each cluster, IPA software was used to identify regulators of transcription significantly enriched ($p < 0.05$ with Fisher algorithm) and activated in dKO ($z\text{-score} \geq 2$) or activated in WT ($z\text{-score} \leq -2$) for at least one time-point of LPS stimulation. Heatmaps represent the predicted activation state and number of target genes of significantly enriched regulator for each timepoint of LPS stimulation. No regulator was found to be significantly enriched in cluster 12. (B-C) Immunoblot analysis of whole cell lysates from 3h-starved (B) or unstarved (C) DCs stimulated with LPS. See also Figure 3.S4 and Table 3.S2.

A total of 155 regulators were identified (in 14 of the 15 clusters), of which 88 were non-redundant: 53 were predicted to be active (i.e. to target DEGs) in a single cluster and 35 were predicted to be active in ≥ 2 clusters. Moreover, among the 88 unique regulators, many were related to innate immune responses (29 regulators, $p=4.5 \times 10^{-22}$) (Table 3.S4). These included Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) (113 targets in 7 clusters), Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) (95 targets in 5 clusters), IRF1 (64 targets in 5 clusters), Nuclear Factor of Activated T cells c2 (NFATC2) (65 targets in 5 clusters), STAT4 (89 targets in 6 clusters) and Tripartite motif-containing 24 (TRIM24) (54 targets in 4 clusters). Protein-protein interaction analysis using STRING (<http://string-db.org/>) also showed that members of the IRF and STAT families formed nodes of strong connectivity within regulator-rich clusters 1, 6 and 7 (Figure 3.S4A), placing them as likely master regulators differentially affected by CPs and IPs in DCs.

To validate IPA-based predictions concerning the activity of IRFs, STATs and NF- κ B pathways, we analyzed the expression of I κ B α , IRF3 and STATs by immunoblotting on cell lysates (Figures 3.6B-C and 3.S4B). RELA (p65), the transcriptional activator of the canonical NF- κ B pathway and a key component of LPS-induced inflammatory response, showed increased predicted activity in mature dKO DCs (6h) for clusters 1 and 7 (p-values from 10^{-4} to 10^{-10}). In line with this, protein levels of I κ B α , the pathway inhibitor, were decreased at 2-6 h in dKO DCs ($p=0.012$ and $p=0.0396$, respectively), which coincided with an increased ratio of pI κ B α /total I κ B α at 0h ($p=0.0101$). In accordance with IPA predictions, IRF3 levels were markedly reduced in immature dKO DCs. Furthermore, protein levels of STAT1, STAT5 and STAT6 were decreased in dKO at all timepoints, and STAT3 protein levels were slightly decreased in dKO DCs at 0h, 15min and 1h. For STAT3, STAT5 and IRF3, ratios of activated (phosphorylated) over total protein abundance were similar in WT and dKO DCs, suggesting that IPs regulated protein abundance but not phosphorylation efficiency. No changes in mRNA abundance between WT and dKO could explain the differences in protein levels, except for STAT1 (see Table 3.S3). These data support the concept that differential protein abundance of IRF3 and STATs in WT and dKO DCs is regulated via differential proteasomal degradation. Together, IPA analyses and immunoblotting experiments strongly suggest that, at least in DCs, IPs have a non-redundant effect on key signaling pathways including STATs, IRFs and NF- κ B.

3.6.7 IP-deficiency affects key DC genes and functions

As a complement to our analyses of signaling pathways, we sought to identify specific genes and biological processes that were most affected by IPs. We found that ten of the top DEGs (≥ 10 -fold difference between WT and dKO, with an RPKM > 0.1 in at least one condition) in immature DCs and 6h LPS-matured DCs, were involved in DC function (Figure 3.7A). The six transcripts overexpressed in WT DCs have a positive effect on DC function. Two (CD300E and TLR11) induce pro-inflammatory cytokine production (IL-12 and TNF- α) from stimulated DCs^{39,40}. Three are involved in pathogen recognition and engulfment: CD207 (Langerin), binder of carbohydrates at the surface of viral envelopes⁴¹, TLR11 which binds to parasites⁴⁰ and SIGLECH, involved in endocytosis and antigen uptake⁴². EPCAM promotes DC migration from the epidermis to lymph nodes and regulates cell-cell interactions⁴³. Finally, GPR77 contributes to DC maturation and response to chemoattractants⁴⁴.

By contrast, the top dKO-overexpressed genes are associated with negative regulation of the immune response. MASP2 interferes with the immune response by attenuating DC maturation and pro-inflammatory cytokine production⁴⁵. GDPD3 is a putative negative regulator of DC migration⁴⁶. CXCR7, when bound to CXCL11, inhibits migration of DCs in response to CXCL4⁴⁷.

To obtain a broader perspective of the processes affected by IP-deficiency at different timepoints, we performed gene ontology (GO-) term enrichment analyses for each of the 15 gene clusters displayed in Figure 3.4C (Figure 3.7B and Table 3.S5). Two main points can be made from these analyses. First, GO-terms enriched in WT vs. dKO DCs included housekeeping functions (cell cycle, transcription and translation, protein transport and ubiquitylation) and general immune roles (immune and inflammatory response). Second, perhaps the most salient finding was that the differentiation programs of dKO and WT DCs did not progress simultaneously. In complex systems, timing is crucial. We were therefore struck by the fact that GO-term enrichment was exquisitely time-dependent. Thus, genes related to cell cycle regulation were enriched early in WT DCs and late in dKO DCs. Furthermore, the kinetics of genes associated to immune-related biological processes was particularly complex (Table 3.S6): i) a subset was overexpressed at all timepoints in dKO compared to WT DCs (e.g. *Ccl4*, *Il6*, *Cxcl1*), ii) in another subset, transcripts upregulation was more prolonged in dKO DCs (e.g. *Cxcl10*), iii) a third group showed delayed response in dKO DCs (e.g. *Ccl5*), iv) a fourth subset remained overexpressed in WT DCs at all timepoints (e.g. *Ccl22*, *Ccr7* and *Tnfsf4*). Collectively, top differentially expressed genes and GO-term enrichment analyses strongly support the idea

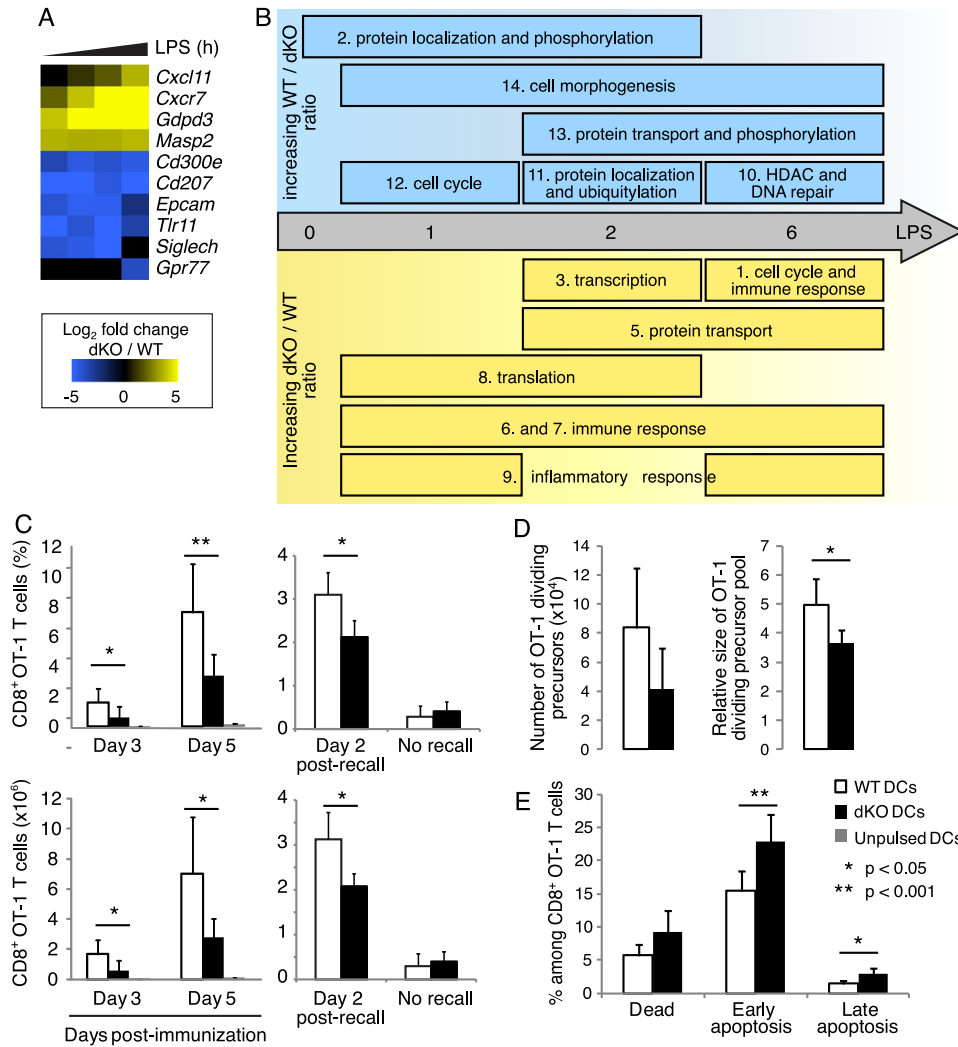


Figure 3.7 Presence of IPs Is Important to Maintain DC Functional Integrity. (A) Top differentially expressed genes (> 10-fold) in immature (untreated) and mature (6h LPS-treated) DCs that were reported to play a role in DC function. (B) InnateDB was used to identify biological processes significantly enriched ($p < 0.05$ with Benjamini-Hochberg algorithm) in genes associated to each k-means cluster (see Figure 3.4C). Boxes represent clusters with a particular kinetic of differential expression between WT and dKO (cluster identification numbers are showed in each box). The size of a box is representative of the time frame for differential expression (timeline shown as a gray arrow). Biological processes indicated had the highest p-value, or were the most representative, among significantly enriched GO-terms for each cluster. Clusters 4 and 15 were not represented either because no biological process was found significantly enriched, or because no pattern was found within enriched terms. See also Table 3.S5 for complete list of terms enriched in each cluster (biological processes). (C) CFSE-labeled OT-1 T cells were injected into WT mice that were immunized with SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs. Spleens were harvested 3 or 5 days post-immunization, or 2 days after a second immunization on day 30, and absolute numbers of OT-1 T cells and percentages from total T cell population were calculated. Data are represented as mean \pm SD of 4 to 13 experimental replicates. (D) The absolute and relative size of OT-1 T-cell populations that responded to SIINFEKL-pulsed DCs were calculated from CFSE-labeling profiles on day 3. Data are represented as mean \pm SD of 6 experimental replicates. (E) Proportion of dead and apoptotic OT-1 T cells on day 3 after priming with WT or dKO DCs. Data are represented as mean \pm SD of 7 experimental replicates.

that IPs have profound and pleiotropic effects on DC maturation and function.

3.6.8 dKO DCs are functionally deficient *in vivo*

We next wished to compare the function of WT and dKO DCs presenting similar cell surface density of the model epitope, SIINFEKL. Under these conditions, any discrepancies between the two types of DCs could not be ascribed to differences in epitope processing or presentation. Our study design took into account the fact that WT and dKO DCs pulsed with SIINFEKL express similar levels of H2K^b/SIINFEKL at the cell surface, and that dKO DCs are not immunogenic for WT mice¹¹. One million OT-1 CD8 T cells, which specifically recognize H2K^b/SIINFEKL, were labeled with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) and injected into WT mice on day -1. On day 0, mice were immunized with SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs and their spleen cells were analyzed on day 3 or 5. We found that OT-1 T cells expanded more extensively following priming with WT than with dKO DCs (Figure 3.7C). The differential expansion of OT-1 T cells could be explained by two factors. First, the CFSE content of OT-1 T cells on day 3 revealed that the frequency of responding T cells was greater following immunization with WT than dKO DCs (Figure 3.7D). Second, the proportion of apoptotic T cells was greater when SIINFEKL was presented by dKO than WT DCs (Figure 3.7E). Interestingly, the decreased capacity of dKO DCs to prime T cells was maintained when mice were challenged with a second DC immunization at day 30 (Figure 3.7C). Hence, WT DCs are more effective than dKO DCs for priming both naïve and memory CD8 T cells, even when both DC populations are engineered to present similar epitope density.

3.7 Discussion

The dominant paradigm holds that the ultimate non-redundant role of IPs vs. CPs is to generate a highly diverse MIP repertoire. By ultimate role, we mean the ecologically relevant and evolutionarily selected function of IPs in vertebrate biology⁴⁸. The present work shows that non-redundant roles of IPs go well beyond MIP generation. We report that IPs regulate the expression of more than 8,000 transcripts in DCs. Of note, IPs may affect expression additional genes redundantly with CPs, but our study design was poised to selectively identify genes differentially regulated by IPs and CPs.

The impact of IPs was cell-autonomous and required deletion of both *Mecl1* and *Lmp7* subunits. Consistent with the fact that incorporation of LMP2 in proteasomes is impaired in the absence of MECL1 and LMP7, we found only low amounts of LMP2-containing “mixed proteasomes” (LMP2/ β 2/ β 5) in dKO DCs (Figure 3.S1A), which can be found in some but not all cell types^{28,49}. Hence, dKO mice used herein were practically deficient for the three IP catalytic subunits. That we observed gene expression changes in dKO DCs but not in cells deficient only for MECL1 or LMP7 could be explained by two alternatives: i) the loss of redundant function between IP subunits, or ii) the loss of different functions that synergistically affect gene expression.

In various cell types, including DCs, about 80% of the observed variance in mRNA levels is shaped by transcription rates rather than different half-lives or post-transcriptional regulation^{50,51}. Accordingly, our data strongly suggest that IPs shape the transcriptome mainly via regulation of transcription factors and not by affecting mRNA stability. Nonetheless, expression of a few transcripts reflected an impact of IPs on splicing and/or related pre-mRNA processing events (Figure 3.3). Thus, IPs promoted the maturation of *Rpl29* mRNA and impaired that of *Hebp1* transcripts. It is well recognized that CPs control the activity of most transcription factors²⁵. However, the breadth of non-redundant effects of IPs on the transcriptome was somewhat unanticipated. Treatment of WT and dKO DCs with epoxomicin, a selective proteasome inhibitor, swiftly abolished differences in the abundance of *Bmp2k*, *Cxcl11* and *Apobec3* transcripts (Figure 3.2B). This shows that some transcriptional differences between WT and dKO were tightly linked to the activity of the proteasome; these cases probably involved proteolysis of short-lived transcription factors or their regulators. Contrarily, differential abundance of *Dlc1* and *Gdpd3* was not tightly linked to proteasomal activity (Figure 3.2C), probably because it was regulated by proteolysis of transcription factors with longer half-life, which would be missed within the time frame of our proteasome-inhibition experiment (2 to 16h of pre-treatment with

epoxomicin plus 6h of LPS).

Clustering of the genes according to their kinetics of differential expression showed that the imprint of IPs on gene expression was extensive, dynamic and affected all stages of DC maturation (Figure 3.4). Nonetheless, the number of IP-regulated genes was greater in mature than in unstimulated DCs. Thus, as much as 64.5% of genes induced or repressed by LPS treatment were regulated by IPs. With over 8,000 DEGs, the effects of IPs were obviously complex, but IPA analysis suggests that a major proportion of DEGs were regulated by 88 unique transcription regulators, many of which were related to the STAT, IRF and NF- κ B pathways (Figure 3.6). Immunoblotting confirmed the variable abundance of regulators' protein levels in WT and dKO. Analyses of biological process enrichment suggested that both inflammatory and anti-viral response genes were regulated by IPs. Out of the 209 genes listed as components of "inflammatory response" in the InnateDB database, 56 (27%) were found in four different clusters (clusters 1, 6, 7, 9), and a similar proportion of 24/83 genes (29%) from the biological process "response to virus" were included in two different clusters (clusters 6 and 7) (Table 3.S6). Out of the 56 inflammatory response genes, 29 showed a more important induction in dKO than in WT cells (for example *Ccl4*, *Tnf*, *Cxcl11* and *Nos2*, Table 3.S2), whereas 18 were induced mostly in WT cells (such as *Ccl22*, *Ccr7* and *Serpina9*). For genes associated to viral response, upregulation was in general lower or delayed in dKO compared to WT cells (19 of the 24 DEGs, including *Ifit3*, *Ifitm3*, *Dhx58* and *Bst2*). Moreover, following LPS treatment, genes enabling DCs to prime T cells were more robustly induced in WT than dKO DCs (e.g., *Il23a* and *Icam1*). Thus, upon LPS treatment, dKO DCs acquire a more inflammatory profile while WT DCs seem to be better geared to fight infection. This would dovetail well with the fact that i) *PSMB8* mutations causing a loss-of-function of LMP7 are associated with auto-immune and inflammatory syndromes in humans²⁰, and that ii) IP-deficient mice have weaker T-cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus¹². However, speculations based on the transcriptomic profile of DCs must be made cautiously because IP-related phenotypes observed *in vivo* are undoubtedly influenced by pleiotropic effects of IPs on many cell types²⁶.

Previous studies have shown that IP-deficient DCs were inefficient for priming of CD8 T-cell responses¹². Heretofore, the role of IPs in MIP processing has been held solely responsible for the impaired ability of IP-deficient DCs to prime T cells. We show herein that, even when engineered to present the same epitope density as WT DCs, dKO DCs remained defective antigen-presenting cells (Figure 3.7). Relative to WT DCs, these showed two defects: they primed limited number of naïve and memory T cells, and these primed T cells were unduly susceptible to apoptosis. Further work will be necessary to uncover the mechanistic underpinnings of these

defects. Nonetheless, they clearly show that the functional role of IPs in DCs goes well beyond MIP production.

The imprint of IPs on the transcriptome of DCs was not limited to immune genes. Indeed, IPs regulated genes involved in numerous fundamental processes including transcription, translation, protein economy and cell cycle regulation (Figure 3.7). In various models, IPs have been associated to maintenance of stemness²², cell differentiation²¹, response to injury⁵² and neoplastic transformation (Table 3.S1). We therefore speculate that, if found in other cell types, the dramatic effect of IPs on the transcriptional landscape could explain the various immune and non-immune phenotypes observed in vertebrates with IP deficiency or mutations^{19,53}.

3.8 Experimental procedures

Mice and DC culture

Mice on a C57BL/6 or B6.SJL background were housed at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) animal facility. *Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}* (dKO) and *Mecl1^{-/-}* mice were generously provided by Dr T.A. Griffin from the Medicine College of the University of Cincinnati, and *Lmp7^{-/-}* mice by Dr H.J. Fehling from the Institute of immunology, University Clinics Ulm. OT-1 on a *Rag2^{-/-}* background mice were purchased from Taconic Farms. DCs were generated from the bone marrow of 8-12 week old mice as previously described¹¹.

RNA-sequencing

RNA was extracted from 4 experimental replicates of WT and dKO DCs treated for 0h, 1h, 2h or 6h with LPS. Transcriptome libraries were generated using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) following the manufacturer's protocols. Paired-end (2 x 100 bp) sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 sequencer running TruSeq SBS v3 chemistry as previously described⁵⁴.

Differential gene expression analyses

Differential gene expression was determined using R v3.0.1 software (<http://www.r-project.org/>) with the DESeq package⁵⁵. Differences between means were considered significant when the p-values adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure were lower than 0.1. The list of all 8104 genes that showed significant differential expression between WT and dKO at any timepoint were analysed with MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>) for clustering analyses of their kinetic of differential expression. Gene-ontology overrepresentation analyses were performed with InnateDB (<http://www.innatedb.com>)⁵⁶ and transcription factor prediction analyses were performed with the Upstream Regulator prediction tool from the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (<http://www.ingenuity.com>).

ACCESSION NUMBERS

RNA-seq data presented in this article have been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) database and are accessible through GEO Series accession number GSE52616.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, four figures and seven tables.

3.9 Acknowledgements

The Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) is supported in part by the Canada Foundation for Innovation and the Fonds de Recherche Québec Santé (FRQS). This work was supported by grant MOP 42384 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). D.d.V. and A.R. were supported by doctoral research awards from the FRQS and the CIHR, respectively. E.G. was supported by a studentship from the Défi Persévérance-Famille Gosselin Fund. C.P. holds a Canada Research Chair in Immunobiology. We are grateful to the staff of the following IRIC core facilities for their assistance: animal care, flow cytometry, genomics and bioinformatics, and to Sébastien Lemieux, Jean-Philippe Laverdure, Joël Ryan and Hassan Khanafer for useful suggestions.

3.10 Supplementary material

3.10.1 Supplemental figures

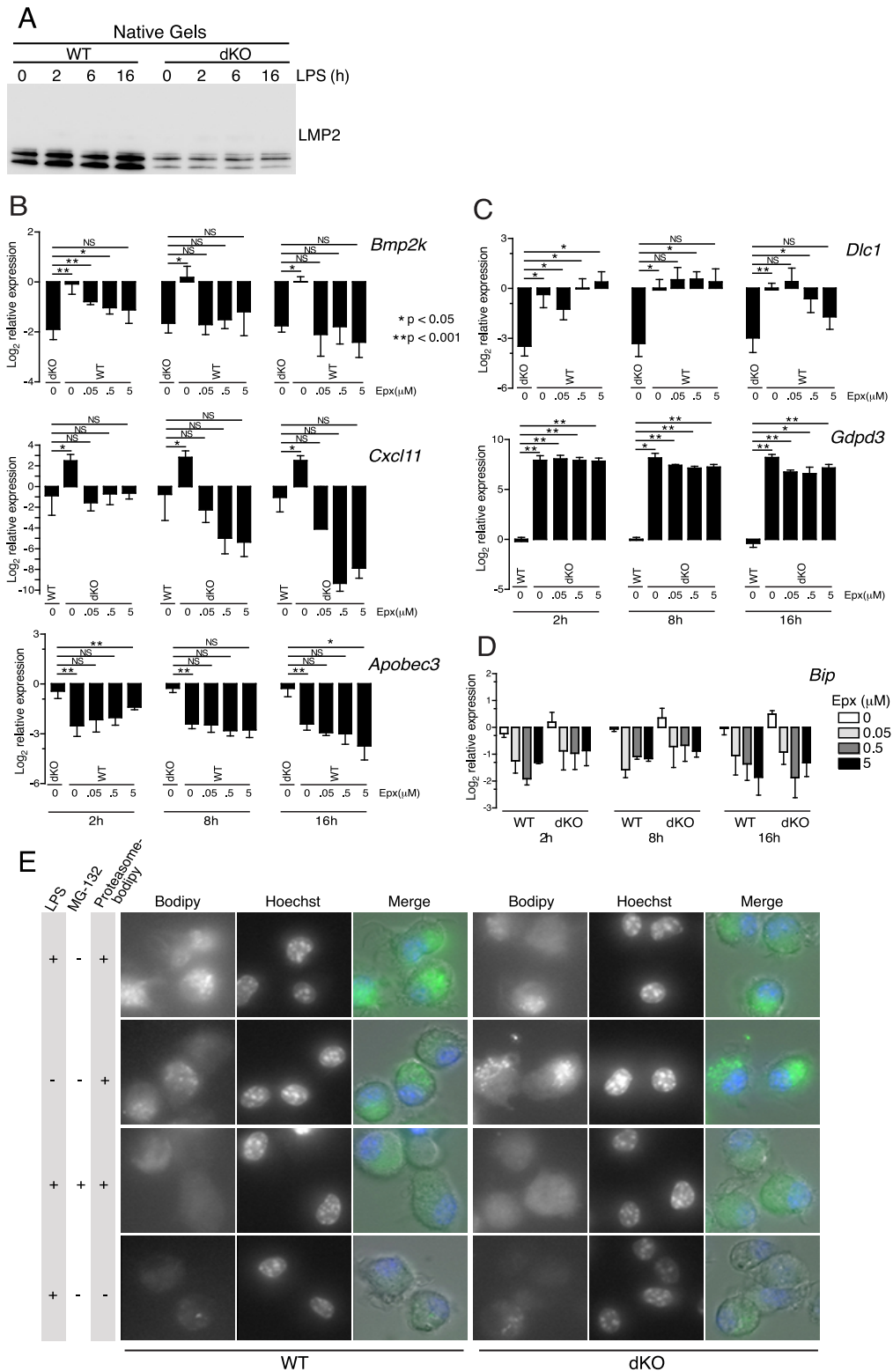


Figure 3.S1, related to Figure 3.2. (A) LMP2 levels are decreased in proteasomes from dKO DCs. Native gel electrophoresis followed by immunoblot with anti-LMP2 antibody was performed on lysates from WT and dKO DCs stimulated with LPS for the indicated time. (B-D) A subset of genes shows tight linkage between proteasomal activity and differential gene expression. RT-qPCR experiments were performed on WT and dKO DCs pre-treated for 2, 8 or 16 hours with the indicated concentration of epoxomicin, then stimulated for 6 hours with LPS. Data were normalized on *Gapdh* and are represented as mean \pm SD of 3 experimental replicates. P-value was calculated using two-tailed unpaired T-test. (E) Proteasomes localize similarly in WT and dKO DCs. WT and dKO DCs were left untreated or were incubated overnight with LPS. Proteasomes were stained (or left untreated as negative control) using a proteasome-specific inhibitor coupled to a fluorogenic molecule (Proteasome-bodipy), with or without pre-incubation with the proteasome inhibitor MG-132 as a negative control. Nuclei were stained with Hoeschst before monitoring fluorescence by live microscopy. Images are representative of 3 independent experiments.

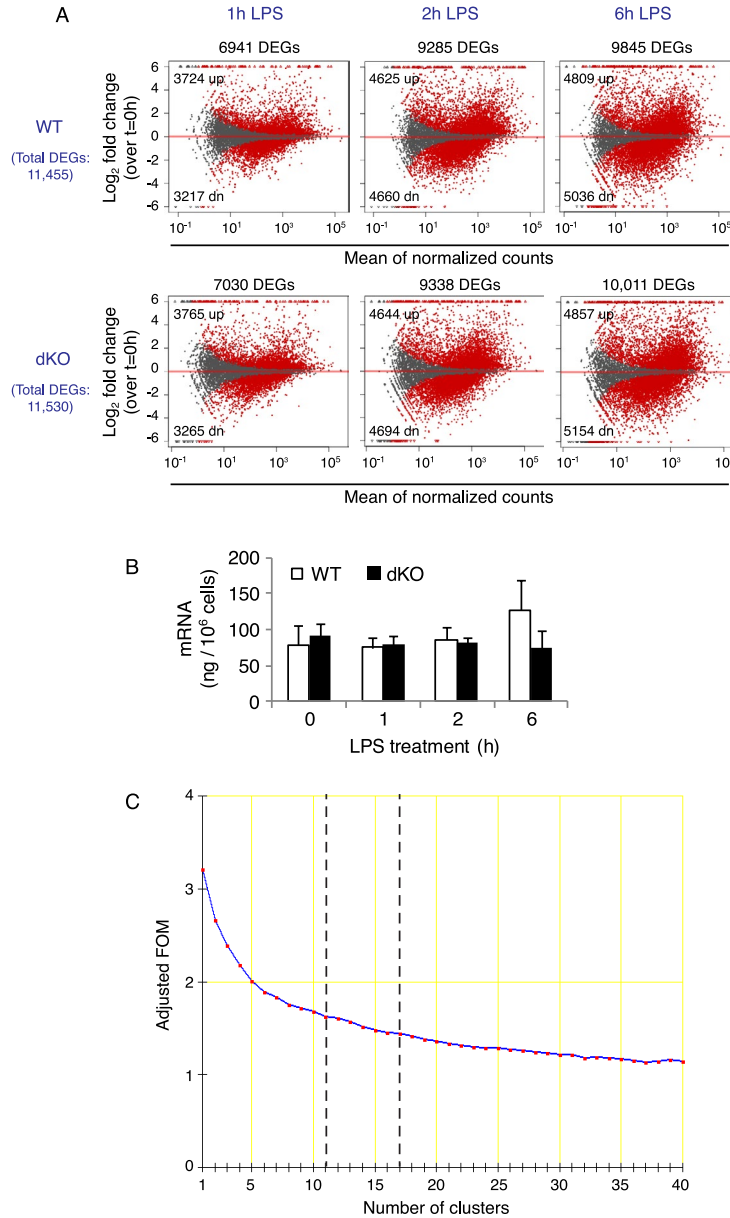


Figure 3.S2, related to Figure 3.4. (A) Differential expression of genes upon LPS treatment. Comparisons were made in both WT and dKO DCs between untreated cells and cells treated for either 1h, 2h or 6h of LPS. Data are represented as \log_2 fold-change as a function of their mean expression in treated and untreated conditions. Red dots represent genes differentially expressed with a significant adjusted p-value ($p < 0.1$, Benjamini-Hochberg algorithm). (B) IPs do not affect significantly total mRNA abundance. mRNA was purified using magnetic beads coupled to poly-A chains from total RNA samples of WT and dKO DCs treated for 0h, 1h, 2h or 6h with LPS. Purified mRNA samples were quantified using a NanoDrop. Data are represented as mean \pm SD of 4 experimental replicates. (C) Determining the optimal number of k-means clusters. A figure of merit (FOM) value was calculated from our dataset of 8,104 differentially expressed genes (DEGs) to estimate the predictive power of the k-means clustering algorithm. FOM values were calculated for 1 to 40 clusters using MeV. An optimal range was reached between 11 and 17 clusters. Within this range, we found that at least 15 clusters were necessary to separate genes in homogenous clusters and that adding more clusters did not add significant improvement to the quality of these clusters.

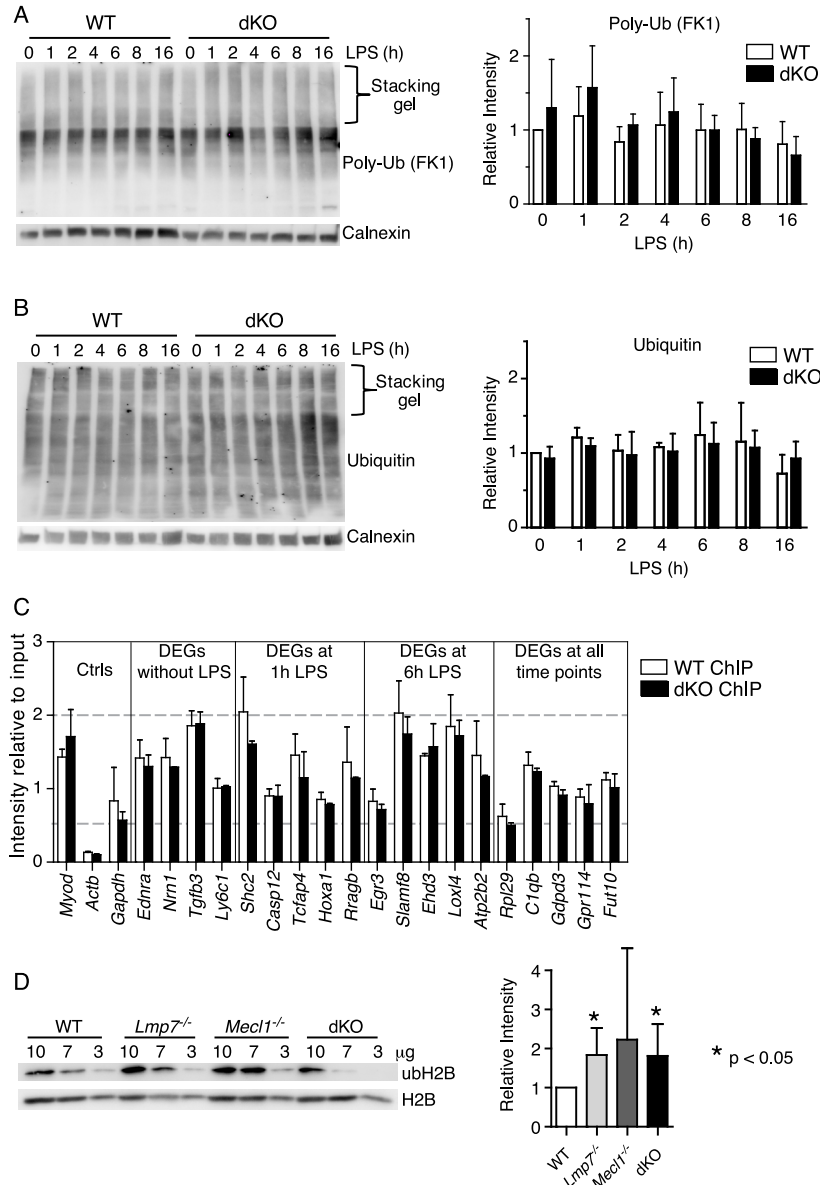
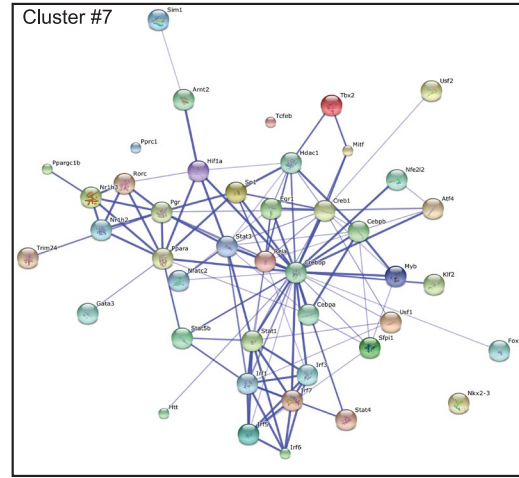
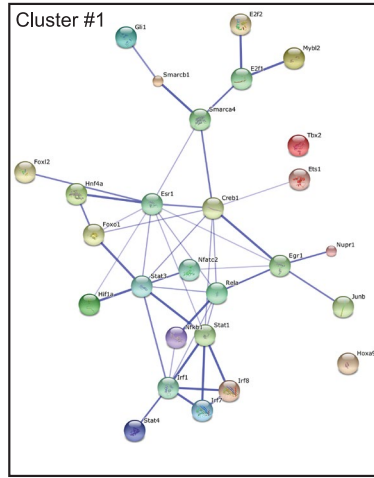
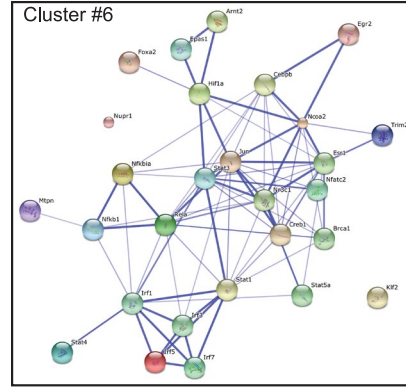
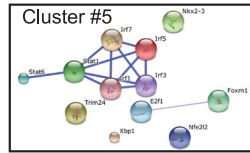
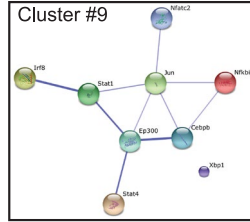
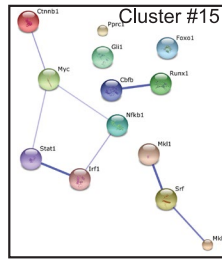


Figure 3.S3, related to Figure 3.5. (A-B) Levels of ubiquitylated proteins are similar between WT & dKO DCs. Whole cell extracts were prepared from WT and dKO DCs treated with LPS for the indicated time and immunoblotted with antibodies against (A) poly-ubiquitin or (B) ubiquitin. Calnexin was used as a loading control. Data are represented as mean \pm SD of 4 experimental replicates. (C) Abundance of total histone H2B is similar between WT and dKO DCs at sites of differential expression. Chromatin immunoprecipitations were performed using an anti-H2B antibody in WT and dKO immature DCs (without LPS treatment). Presence of H2B was monitored by RT-qPCR with primers targeting genes found differentially expressed strictly without LPS, after 1h or after 6h of LPS treatment, or genes that were differentially expressed at all timepoints (0h, 1h, 2h and 6h of LPS treatment). Data are represented as mean \pm SD of 2 experimental replicates. (D) Increased ubH2B levels in dKO is due to the absence of *Lmp7*. Histone from H_2SO_4 -treated nuclear extracts were prepared from untreated WT and dKO DCs and immunoblotted with antibodies against ubH2B. Total H2B was used as a loading control. Data are represented as mean \pm SD of 7 experimental replicates. A two-sided paired Student statistical test was used.

A

Less than 2 interactions
Clusters 2, 3, 4, 8, 10, 11



B

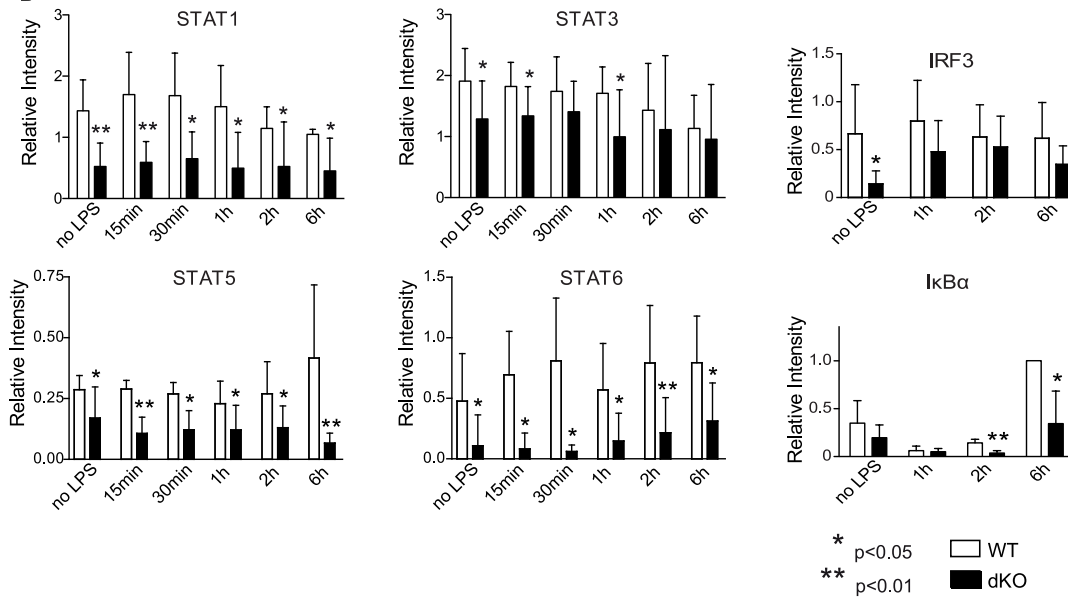


Figure 3.S4, related to Figure 3.6. (A) The STRING database (<http://string-db.org/>) was used to generate a network of protein–protein interactions and functional associations involving identified predicted regulators from each cluster. (B) Quantifications of immunoblots shown in Figure 6B–C. Data are represented as mean \pm SD of at least 4 experimental replicates (one-sided Student statistical test).

3.10.2 Supplemental tables

Table 3.S1. Immunoproteasome subunits are differentially expressed in various cancer types

Differentially expressed IP-subunits			Cancer type	References
LMP2	LMP7	MECL1		
X	n/a	n/a	Prostate, breast, colorectal, hematological, lung, gynecological	57
X	X	X	hematological, melanoma, breast	58
X	=	n/a	lung, liver, colorectal, hematological	59
=	X	n/a	head and neck	60
X	X	n/a	head and neck	61
X	X	=	head and neck	62
X	n/a	n/a	head and neck	63
=	X	n/a	colorectal	64
X	X	n/a	colorectal	65
X	X	X	colorectal	66
X	n/a	X	colorectal	67
X	n/a	n/a	colorectal, liver	68
X	X	n/a	melanoma	69
X	X	X	melanoma	70
X	=	X	melanoma	71
X	X	n/a	melanoma	72
X	=	n/a	melanoma	73
X	X	X	melanoma	74
n/a	X	n/a	gynecological	75
X	X	n/a	gynecological	76
=	X	=	gynecological	77
X	n/a	n/a	gynecological	78
X	n/a	n/a	gynecological	79
X	X	n/a	gynecological	80
=	X	n/a	hematological	81
X	X	n/a	hematological	82
X	X	n/a	renal	83
X	X	X	renal	84
X	X	n/a	renal	85
X	n/a	n/a	renal	86
X	n/a	n/a	renal	87
X	n/a	n/a	lung	87
X	X	X	neurological	88

Legend: X, differentially expressed; =, no difference; n/a, information non-available

Table 3.S2. List of regulators predicted by Ingenuity Pathway Analysis for each differentially expressed gene cluster

Cluster	Regulator	no LPS		1h LPS		2h LPS		6h LPS		Number of predicted targets	Predicted targets
		Z-score	p-value	Z-score	p-value	Z-score	p-value	Z-score	p-value		
#1	NUPR1	2,98	6,42E-03	3,13	2,99E-03	3,30	3,07E-03	-0,35	2,83E-03	46	ACSS1, ADM, ATAD5, AURKA, BLM, C1orf112, CACNA2D2, CCNB2, CENPI, CHUK, CXCL3, ERMP1, FAM114A1, FAM162A, GAB2, GABBR1, HIVEP3, IL13RA1, ISCA1, KANK2, KIAA0196, KIF11, KIF23, KIFC1, LBR, LRP8, MXD1, NAA40, NEIL3, NR1D1, PEA15, PLEKHM3, POLA2, PRELID2, RAB38, RBMS1, RNF122, SPAG5, SPC25, SRGAP2, TMEM194A, TMPO, TRIB3, UPP1, ZC3HAV1, ZMYM3
#1	SMARCB1	2,14	1,29E-02	2,14	1,30E-02	2,14	1,31E-02	1,84	1,27E-02	17	ACTR2, CCND1, CDK1, CENPE, DACHI, DAPK1, DHFR, ERBB2, FCGR1A, IFNB1, KIF11, KIF23, MCM5, MDM2, POLA1, POSTN, PRKAB2
#1	E2F2	-2,00	1,42E-02	-2,00	1,44E-02	-2,00	1,46E-02	0,00	1,40E-02	7	CCND1, CDC45, CDK1, DHFR, MCM5, POLA1, RBL1
#1	ESR1	-2,10	4,32E-03	-2,10	4,32E-03	-1,68	4,20E-03	0,13	4,20E-03	27	ADA, CA2, CCND1, CXCL3, ERBB2, GUCY1A3, HPGDS, ICOSLG, LTF, MDM2, NCOA1, NFYB, NR1D1, PDGF5, POLA1, POR, PRKCD, PTX3, SERPINB9, SGK1, SMAD3, STC2, TGM2, TNFAIP3, TNPO1, VAV3, WNT11
#1	FOXO1	-2,11	1,47E-04	-2,33	1,47E-04	-2,51	1,42E-04	1,79	1,42E-04	27	CA2, CCNB2, CCND1, CDK1, CENPE, CFLAR, CTSE, DAPK1, DEPDC1, GCK, HAL, IL17RA, JUNB, KIF11, LAMP2, MCM5, NEK2, NPY, PSMB6, RBL2, RELA, SCD, SGK1, SPC25, TNFSF10, TRAF6, TRIB3
#1	MYBL2	-2,24	7,45E-03	-2,24	7,45E-03	-2,24	7,22E-03	0,00	7,22E-03	6	CCNB2, CCND1, CDC25B, CDK1, ITGB1, TOP2A
#1	STAT1	-2,61	2,72E-02	-2,79	2,72E-02	-2,79	2,67E-02	1,76	2,67E-02	21	ARG1, AXL, BATF2, CASP1, CCND1, CFB, FCGR1A, Gbp2, Gbp6 (includes others), IFNB1, IL12A, LY6E, MDM2, PSMB9, PSME1, Serpina3g (includes others), SMAD3, SOAT1, TAPBPL, TLR3, TNFSF10

#1	E2F1	-2,90	2,07E-03	-2,90	2,07E-03	-2,90	2,00E-03	1,00	2,00E-03	35	ALG5, APAF1, ATM, AURKA, AURKB, CA2, CALR, CASP7, CCNB2, CCND1, CDC45, CDK1, CFLAR, DDX11, DDX39B, DHFR, DUSP10, FGFR1, HNRNPK, HSP90B1, KIF23, MCL1, MCM5, MDM2, NCL, POLA1, POLA2, Prim1, PSMB9, RAD54L, RB1, RBL1, SMARCA5, SRPR, TOP2A
#1	TBX2	-3,00	5,48E-04	-3,00	5,48E-04	-3,00	5,25E-04	-1,63	5,25E-04	10	ASF1B, AURKA, AURKB, CDK1, CKAP2, LIG1, MCM5, NCPAD2, RBL1, TRIB3
#1	IRF7	-1,48	5,56E-06	-1,78	5,56E-06	-2,18	5,38E-06	3,76	5,38E-06	19	DNAJA1, FCGR1A, GBP4, IFNB1, IL12A, ISG20, ITGAM, MCL1, PSMB9, PSME1, RIPK2, TDRD7, TMBIM6, TMPO, TNFSF10, TNFSF13B, TRIM21, UBA7, ZC3HAV1
#1	STAT4	1,43	1,76E-02	1,14	1,76E-02	0,35	1,73E-02	4,32	1,73E-02	20	ACSS1, ACVRL1, Ctl2a/Ctl2b, CXCL3, DNAJB6, ERFF1, FURIN, GADD45G, GBE1, HEXB, ISG20, LAMTOR3, MTHFS, PCGF5, PER1, PGP, R3HDM1, SH3GLB1, SMURF2, STC2
#1	NFATC2	0,00	4,37E-03	-1,00	4,37E-03	0,00	4,26E-03	3,56	4,26E-03	16	ATM, CFLAR, CXCL3, EGR3, GBP4, IFNB1, IL12A, ISG20, LDHA, LMO4, MDM2, PTPN1, SH3BP5, TLR3, TSC22D1, USP25
#1	HIF1A	-0,10	1,05E-02	0,17	1,05E-02	-0,10	1,04E-02	3,49	1,06E-02	25	ADAM17, ADM, ADORA2B, AURKA, BIRC2, CARS, CD164, EGLN3, ERBB2, FAM162A, FAM53C, FURIN, GAPDH, GBE1, GCK, ITGA2B, LDHA, MAFF, MCL1, MITF, MUC1, RELA, SSBP1, STC2, TRIM21
#1	NFE2L2	0,00	1,37E-02	-1,09	1,37E-02	-0,76	1,36E-02	3,11	1,39E-02	27	ARHGEF3, CLPTM1L, CXCL3, DDX39B, FKBP5, FTH1, GABBR1, GADD45G, GBE1, GCLC, HSP90AB1, HSP90B1, IFNB1, LGALS8, LY6E, MAFF, P2RX4, PDIA4, PSMA4, PSMB6, PTPN1, PTPRO, SERINC3, SLC1A4, SLC6A9, STIP1, UGT1A6
#1	SMARCA4	0,96	2,84E-02	0,54	2,84E-02	0,54	2,83E-02	3,07	2,85E-02	26	ABHD2, ACTN4, CCND1, DHFR, DYNC1H1, EFNB1, GADD45G, GAPDH, GCLC, HEXB, HHIP, ITGB1, KCNJ2, KDM6B, KIT, MUC1, MXD1, NRP2, PMEL, PPAP2B, RBL1, ROCK1, SERPINE2, SMARCA4, ST6GALNAC4, TNFSF10
#1	RELA	-0,36	7,85E-03	-0,36	7,85E-03	-0,65	7,80E-03	3,04	7,91E-03	32	ACTN4, BIRC2, BTG2, CCND1, CFB, CXCL3, CYBB, EHF, ERAP1, ERBB2, EWSR1, FCGRT, HLA-B, IFNB1, IL12A, JUNB, KIT, MDM2, MUC1, PECAM1, PI4KA, PSMB9, PTPN6, PTX3, RELA, SERPINE2, STIM1, TANK, TGM2, TNFAIP3, Tnfrsf22/Tnfrsf23, XIAP

#1	IRF8	1,00	2,18E-02	1,00	2,18E-02	1,00	2,13E-02	2,92	2,22E-02	11	CFB, CYBB, IFNB1, IL12A, IL17RA, ITGAM, JAK1, Map4k4, MDM2, MSR1, TLR3
#1	ETS1	-0,04	4,87E-02	-0,04	4,87E-02	0,02	4,90E-02	2,84	4,87E-02	24	ANPEP, CASP1, CCND1, CDH5, CHUK, ERBB2, HGF, HPSE, HS2ST1, IKZF2, IL12A, ITGA2B, JAK1, JUNB, Klra4 (includes others), MCL1, MDM2, MGAT5, MMP13, MSR1, NPR1, SLAMF6, SYVN1, ZEB2
#1	IRF1	0,00	1,31E-04	-1,17	1,31E-04	-1,17	1,31E-04	2,60	1,31E-04	16	CASP1, CASP7, CCND1, CFB, CYBB, ERAP1, Gbp2, IFNB1, IL12A, IL17RA, IL18BP, Map4k4, PSMB9, PSME1, TLR3, TNFSF10
#1	CREB1	-0,32	2,33E-04	0,00	2,33E-04	-1,95	2,33E-04	2,60	2,33E-04	23	ADM, ARC, BTG2, CARS, CCND1, CPD, CPT1A, CYP51A1, ERRF11, JUNB, LDHA, LGALS8, MCL1, MMP13, PDGFRA, PER1, RB1, SCD, SEC63, SLC19A1, SPTY2D1, TOM1, UPP1
#1	NFKB1	0,00	1,30E-02	0,00	1,30E-02	0,00	1,30E-02	2,60	1,30E-02	21	BLK, BTG2, CCND1, CFB, CXCL3, CYBB, EHF, FCGRT, ICOSLG, IFNB1, IL12A, MDM2, MSR1, PTPN6, PTX3, RELA, STIM1, TANK, TNFAIP3, TNFSF10, XIAP

#1	HNF4A	1,21	3,58E-02	1,21	3,58E-02	1,21	3,58E-02	2,36	3,58E-02	129	ACTR3, AGTPBP1, ANPEP, ARL1, ATAD5, ATG3, ATP10A, ATP6V1H, AZI2, C2, C21orf59, C2orf43, CACNA2D2, CAPZA2, CCND1, CCNH, CDC45, CDK1, CDK12, CLDND1, COMMD9, COPB1, CPT1A, CSK, CTDSPL2, CWC15, CXCL3, CYP51A1, DACH1, DCAF11, DCAF8, DDX39B, DHDDS, DUSP19, DUSP3, EHD3, EPCAM, EPHA2, EWSR1, F7, FAM46A, FAM53C, FEM1C, FURIN, G3BP2, GADD45G, GAPDH, GATA6, GBE1, GINS3, GOT1, GPLD1, GUSB, HADHB, HAL, HBS1L, HLA-B, HLA-F, HMOX2, HSP90B1, HSPH1, ISOC1, JUNB, KHDRBS1, KIAA0196, LATS1, LIPT1, LRRC8C, MDM2, METAP2, MRPL27, MTHFS, NAGA, NBAS, NCAPD2, NDUFS1, NDUFS3, NR1D1, NUF2, P2RY14, PDE11A, PHKB, PMEL, PNP, PPME1, PPP1R12B, PPP6C, PRELID2, PRKAB2, PRPF4, R3HDM1, RBL1, RBL2, RBM28, RBM41, RDH11, ROCK1, SCD, SCFD1, SGK1, SLC31A1, SLC35A5, SLC39A1, SLC39A9, SLC44A1, SMARCA5, SRPR, SSBP1, STIM1, TAOK3, TAPBP1, TAX1BP1, TMBIM6, TMEM140, TMEM30A, TMEM87A, TOM1, TOR2A, TPX2, TRAF6, TRAI, TRIP11, TROVE2, TTC37, UGT1A6, UTP3, VPS29, WNT11, XPO1
#1	GLI1	-0,79	2,50E-02	-0,42	2,50E-02	-0,42	2,50E-02	2,25	2,50E-02	16	ARC, CCND1, CNIH4, DEGS1, EGR3, EZR, FUCA2, GATA6, HHIP, PDGFRA, RNASEL, SH3GLB1, TNFSF13B, TOM1, TSC22D1, USP7
#1	FOXL2	0,00	1,49E-02	0,00	1,49E-02	0,00	1,49E-02	2,18	1,49E-02	8	CPM, CXCL3, EN2, GPRC5B, IFNB1, IL12A, MAFF, TNFAIP3
#1	EGR1	1,28	3,83E-03	1,28	3,83E-03	0,88	3,83E-03	2,15	3,83E-03	14	ARC, CASP7, CCND1, CXCL3, HPSE, ITGAM, JUNB, JUND, MAOB, MMP14, MXD1, PTPN1, RB1, SGK1
#1	STAT3	-1,32	4,38E-03	-1,55	4,38E-03	-1,55	4,38E-03	2,03	4,38E-03	38	ADM, ARG1, CASP1, CASP7, CCND1, CDH5, CDK1, CFB, CFLAR, CXCR2, EGR3, FCGR1A, GADD45G, Gbp2, H2-Q8, HGF, HLA-B, IFNB1, IKZF2, ISG20, ITGAM, JUNB, MCL1, MIF, MMP13, MUC1, NPY, PDIA4, PECAM1, PEX1, PSMB9, PTPN6, SERPINB9, SERPINE2, SGK1, STC2, TLR3, TNFSF10

#1	HOXA9	0,00	2,45E-04	0,00	2,45E-04	0,00	2,45E-04	2,00	2,45E-04	17	CD34, CELF1, CLTC, CYBB, FCGRT, FXR1, FZD5, HMGN2, JUNB, KIF20B, NRG1, PRKD3, PRRC2C, RAP1B, RDX, SERPINB9, TSC22D1
#1	JUNB	0,00	4,06E-03	0,00	4,06E-03	0,00	4,06E-03	2,00	4,06E-03	11	CCND1, CXCL3, FTH1, IKZF2, IL1RL1, LIPE, MMP13, PPP2R2A, ROCK1, SGK1, VAMP8
#2	TRIM24	2,24	5,73E-03	2,65	5,73E-03	2,24	5,73E-03	-1,00	5,73E-03	7	DDX60, JAK2, MOV10, PLAC8, SOCS1, TAP1, TRAFD1
#2	CBFB	-2,00	3,40E-02	0,00	3,40E-02	-2,00	3,40E-02	0,00	3,40E-02	4	GIMAP1-GIMAP5, IKZF4, KLK3, PDE3B
#2	IRF7	-2,12	2,48E-03	-3,30	2,48E-03	-1,89	2,48E-03	1,93	2,48E-03	12	ATF4, CASP4, CD40, IL15RA, JAK2, PLAC8, PSME2, S100A8, SOCS1, TAP1, TPST1, TRIM5
#2	CDKN2A	0,00	9,36E-04	2,45	9,61E-04	0,00	9,12E-04	-2,24	9,61E-04	6	EED, FAM111A, JAK2, RFC3, SUZ12, TFDPI
#2	STAT1	-1,76	1,03E-03	-2,58	1,05E-03	-1,48	1,02E-03	2,70	1,05E-03	11	CASP4, CD14, CD274, CD40, CREM, IL15RA, JAK2, PSME2, SOCS1, TAP1, TRAFD1
#2	NFATC2	0,00	4,92E-02	-1,34	4,92E-02	0,00	4,92E-02	2,00	4,81E-02	5	CD40, SLCO3A1, SOCS1, STAT5A, TCF4
#3	NUPR1	2,36	1,82E-04	2,18	1,82E-04	2,50	1,82E-04	1,61	1,74E-04	27	ADAM22, C9orf91, CCNA2, CENPC1, DDIT3, DSN1, ERCC6L, ETV6, EXO1, FCHSD2, FOXO3, FZD8, GADD45A, KLF6, LRRC16A, MAFG, RAD51, RANBP6, RELB, RPA1, SIK1, STIL, TMEM158, TOLLIP, USP36, XBP1, ZNF296
#3	XBP1	0,00	3,07E-03	0,00	3,07E-03	3,50	3,07E-03	0,00	2,99E-03	14	BET1, BET1L, CAT, COG3, CRK, DDIT3, DNAJB9, FKBP14, MGAT2, ORMDL3, POU2AF1, TRAM1, TXNDC5, YIPF5
#4	STAT4	0,00	8,84E-05	2,80	8,84E-05	0,00	8,84E-05	0,00	8,49E-05	8	ARHGAP15, CAPN5, CCR5, HCFC2, LRP1, MYC, STK32C, TSPAN5
#4	CBFB	0,00	3,64E-02	-2,00	3,64E-02	0,00	3,64E-02	0,00	3,54E-02	4	CCR5, KLK3, LGMN, LTB4R
#5	NKX2-3	2,83	5,91E-04	2,65	5,91E-04	0,00	5,91E-04	-0,82	5,72E-04	10	ANGPTL4, CSRNP1, EIF2AK2, HLA-B, IL7R, PARP9, PLA1A, RPL23, SP110, STAT1
#5	STAT1	-3,45	1,89E-04	-3,32	1,89E-04	-0,48	1,89E-04	1,35	1,84E-04	17	CD86, CIITA, CSF3R, DPP4, EIF2AK2, HERC6, Ifi204 (includes others), IFI35, IL12RB2, IRF7, IRF9, KLRC4-KLRK1/KLRK1, Sifn1, SLFN5, SP110, STAT1, TLR4
#5	IRF1	-2,95	1,02E-02	-2,77	1,02E-02	-1,09	1,02E-02	0,00	1,00E-02	10	BRIP1, CIITA, EIF2AK2, IFI35, IL12RB2, IRF7, IRF9, OAS1, OAS2, STAT1
#5	IRF7	-2,91	1,60E-04	-2,91	1,60E-04	-0,85	1,60E-04	1,41	1,53E-04	14	ADAR, CD80, Ifi204 (includes others), IFI35, IRF7, IRF9, OAS1, OAS2, Oas2, Sifn1, STAT1, TLR4, Trim30a/Trim30d, USP8

#5	E2F1	-2,81	3,45E-02	-2,81	3,45E-02	0,07	3,45E-02	0,44	3,35E-02	15	CCNE2, CHEK1, DBF4, EIF2AK2, FBXO5, GRAP, JMY, MYBL2, NCOA3, RAB1A, RPA2, SLC3A2, SMC4, TYMS, UGDH
#5	IRF3	-2,42	2,75E-02	-2,42	2,75E-02	-0,76	2,75E-02	2,24	2,69E-02	12	CD86, Ifi204 (includes others), IRF7, OAS1, OAS2, Oasl2, Slfn1, STAT1, TIMP3, TLR4, Trim30a/Trim30d, USP8
#5	IRF5	-2,39	1,04E-03	-2,39	1,04E-03	-1,46	1,04E-03	0,00	1,01E-03	8	CXCR4, IRF7, OAS1, OAS2, Oasl2, SP110, STAT1, USP8
#5	FOXMI	-2,18	1,34E-06	-2,18	1,37E-06	0,00	1,28E-06	0,00	1,37E-06	6	BUB1B, CCNE2, CCNF, CENPB, PLK4, PRC1
#5	XBP1	0,00	1,17E-05	0,00	1,22E-05	3,72	1,07E-05	3,72	1,22E-05	15	FKBP11, GOLGA4, GORASP2, HM13, HSPA13, KDELR2, LMAN1, RUNX2, SEC23A, SEC24D, SERP1, SRP68, SSR1, SSR3, USO1
#5	NFE2L2	1,09	3,85E-05	1,09	4,00E-05	3,21	3,57E-05	3,21	4,00E-05	16	CBR1, EIF4G2, ENTPD5, HM13, HSP90AA1, MORF4L2, MSMO1, NCKAP1, NFE2L2, NFE2L3, RARS, SEC23A, UBQLN2, UGDH, USO1, Xlr3c (includes others)
#5	STAT6	-1,34	1,75E-04	-1,34	1,78E-04	0,00	1,68E-04	2,00	1,78E-04	10	Cd24a, CST7, EGR2, GNA15, HMGCR, Ifi204 (includes others), MYO6, NCOA3, PROS1, Trim30a/Trim30d
#5	TRIM24	1,77	1,73E-02	1,77	1,76E-02	0,39	1,69E-02	-2,00	1,76E-02	9	HERC6, IFI35, IFNGR1, IRF7, IRF9, OAS1, PRPS2, STAT1, TRIM6-TRIM34
#6	TRIM24	3,30	1,94E-14	0,00	2,04E-14	0,00	1,75E-14	-2,43	2,04E-14	12	GBP4, IFIH1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3, IRGM, ISG15, Ly6a (includes others), Ms4a4b (includes others), OASL, SAMHD1, STAT2
#6	NR3C1	2,30	2,22E-12	1,86	2,34E-12	1,09	1,23E-11	-0,55	2,34E-12	31	APOL3/APOL4, BARD1, BCL6, CCL2, CCL5, CD70, CXCL9, FCER1G, GADD45B, GEM, IFIH1, IFIT1B, IFIT2, IL1B, ISG15, Mx1/Mx2, NFKB1, NFKBIB, NR3C1, OASL, PPP3R1, PRPH, PSEN1, RAF1, RNF11, SERTAD2, SMAD1, TNFRSF1B, TNFRSF8, TNFSF14, TNFSF4
#6	NUPR1	2,50	3,39E-10	1,21	3,53E-10	1,21	3,13E-10	0,69	3,53E-10	26	ABHD15, ADRB2, ALDOC, EME1, EREG, GINS1, GK, GPR56, HK2, HNRNPM, IFIT2, KDM3A, KIFC1, MKI67, MSH6, NFIL3, P4HA2, PCYOX1, PTPRJ, RAB20, RAB32, SAMHD1, SAT1, SERTAD2, SLC16A10, SLC2A1
#6	KLF2	2,59	2,04E-09	-0,43	2,15E-09	-0,79	1,82E-09	-1,10	2,15E-09	11	ACE, ASS1, CCL2, DLL1, IL1B, PGF, PLOD2, PTPRJ, SLC2A1, TGFB2, TNFRSF8
#6	FOXA2	2,00	9,09E-09	1,00	9,55E-09	1,00	8,22E-09	1,00	9,55E-09	8	ABCA3, CCL22, HK2, IL33, Lyz1/Lyz2, NR4A2, TCF7, TF

#6	IRF3	-3,71	1,13E-08	0,34	1,17E-08	1,27	1,06E-08	2,94	1,17E-08	24	ADAM9, CCL2, CCL5, CCRL2, CLIC4, CXCL9, FST, GBP5, Ifi204 (includes others), IFIH1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3, IRGM, ISG15, MMP9, Ms4a4b (includes others), Mx1/Mx2, NR3C1, OASL, RSAD2, SAP30, STAT2, TREX1
#6	STAT1	-3,79	3,89E-08	0,66	4,04E-08	2,36	3,61E-08	3,36	4,04E-08	27	CCL2, CCL5, CCR6, CCRL2, CH25H, CXCL9, FAS, FCER1G, GBP5, Ifi204 (includes others), IFIT1B, IFIT2, IL12B, IL1B, IL31RA, IRGM, ISG15, KCTD12, MMP9, Mx1/Mx2, Neurl3, OASL, RSAD2, SAMHD1, SLFN13, Slfn2, STAT2
#6	IRF7	-4,03	4,33E-08	0,61	4,47E-08	1,88	4,06E-08	3,65	4,47E-08	20	CCL5, CCRL2, CXCL9, GBP4, GBP5, Ifi204 (includes others), IFIH1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3, IRGM, ISG15, Ms4a4b (includes others), MX1, Mx1/Mx2, OASL, RSAD2, SAP30, STAT2, TREX1
#6	NFKBIA	-2,46	6,57E-06	1,17	6,69E-06	2,26	6,33E-06	2,81	6,69E-06	31	BCL2A1, CCL2, CCL5, CCL7, CH25H, CP, EREG, FAS, GADD45B, HK2, Ifi204 (includes others), IFIT1B, IL1B, ISG15, KLF5, MMP9, MR1, NFKB1, NFKBIB, PCDH7, PLAT, SAT1, SDC4, SERPINB2, SLC12A2, Slfn2, TGFB2, TIMP2, TNFRSF1B, TNFSF14, WBP5
#6	STAT3	-2,18	7,20E-06	1,40	7,32E-06	1,40	6,96E-06	1,88	7,32E-06	28	BCL6, CCL2, CCL5, CXCL9, DLL1, EME1, FAS, FCER1G, HK2, Ifi204 (includes others), IFIH1, IFIT1B, IFIT3, IL12B, IL1B, ISG15, Lyz1/Lyz2, MMP9, MX1, NFKB1, NR4A2, OASL, OMP, PLA2G4A, PML, SLFN13, Slfn2, TNFRSF1B
#6	NFATC2	-2,95	1,12E-05	0,75	1,15E-05	1,48	1,06E-05	2,71	1,15E-05	17	ACPP, DAB2, DGKA, FAS, GBP4, IFIT1B, IFIT2, IFIT3, ISG15, JARID2, Mx1/Mx2, OASL, PLAT, PML, PPP3R1, RSAD2, STAT2
#6	STAT4	-2,43	2,26E-05	1,80	2,31E-05	1,92	2,15E-05	2,46	2,31E-05	20	ALDOC, CCL2, CCNI, CXCL9, FCER1G, IFIH1, IFIT1B, IFIT2, ISG15, MAPK8IP3, Ms4a4b (includes others), Mx1/Mx2, P4HA2, PLOD2, SAT1, SELENBP1, TCF7, TGFB3, VAMP4, VDAC1
#6	IRF1	-3,31	7,88E-05	0,84	8,12E-05	1,20	7,42E-05	2,57	8,12E-05	16	CCL2, CCL5, CTSS, IFIH1, IFIT2, IFIT3, IL12B, IL1B, ISG15, MMP9, MX1, PCDH7, PML, RSAD2, STAT2, TAPBP
#6	IRF5	-2,77	3,93E-04	-0,31	3,98E-04	0,00	3,82E-04	2,19	3,98E-04	9	CCL5, IFIH1, IFIT2, IFIT3, IL12B, ISG15, OASL, RSAD2, STAT2

#6	NCOA2	-2,22	6,86E-04	-0,37	6,98E-04	0,00	6,62E-04	2,40	6,98E-04	8	CCL5, CXCL9, FST, IFIT1B, IFIT2, ISG15, Mx1/Mx2, OASL
#6	NFKB1	-2,95	1,91E-03	0,00	1,95E-03	0,00	1,83E-03	0,00	1,95E-03	16	BCL2A1, CCL2, CCL22, CCL5, CXCL9, FAS, IFIT1B, IL12B, IL1B, ISG15, LTA, MMP9, Mx1/Mx2, NFKB1, NFKBIB, SDC4
#6	EPAS1	-2,24	7,83E-03	1,13	8,00E-03	1,98	7,51E-03	1,98	8,00E-03	13	ALDOC, CAV1, GADD45B, KDM3A, MIF, NFIL3, PGF, PLOD2, SLC11A2, SLC2A1, TGFB3, TNFSF15, UGP2
#6	RELA	-3,10	3,75E-02	-1,41	3,79E-02	0,15	3,66E-02	1,04	3,79E-02	19	BCL2A1, CAV1, CCL2, CCL22, CCL5, CXCL9, FAS, IFIT1B, IL12B, IL1B, ISG15, LTA, MMP9, Mx1/Mx2, NFKB1, NFKBIB, SDC4, TAPBP, Tnfrsf22/Tnfrsf23
#6	MTPN	-2,22	7,10E-03	0,00	7,19E-03	0,00	6,91E-03	1,97	7,19E-03	7	CP, MIF, MTPN, NFKB1, PLAT, TGFB2, TGFB3
#6	BRCA1	-2,41	6,18E-06	0,15	6,39E-06	-0,25	5,77E-06	0,92	6,39E-06	10	CCL5, DGKA, FAS, GADD45B, IFIT2, IFIT3, Ly6a (includes others), MX1, SAT1, SFN
#6	CREB1	-2,42	2,18E-02	0,00	2,21E-02	0,00	2,10E-02	0,00	2,21E-02	13	ADORA2A, ATP6V0B, CH25H, GADD45B, IL1B, KLF5, MNS1, NFIL3, NR4A2, PENK, PER2, PSEN1, TF
#6	JUN	-2,09	4,77E-04	0,39	4,86E-04	0,10	4,60E-04	0,42	4,86E-04	16	ARTN, BCL2A1, CAV1, CCL2, CDK5R1, EREG, FAS, Ifi204 (includes others), IL12B, IL1B, MMP9, NTS, PENK, Plagl1, PRDX1, SERPINB2
#6	ARNT2	0,00	4,83E-04	2,83	4,95E-04	2,33	4,58E-04	2,33	4,95E-04	9	CMKLR1, DLL1, FCGR2A, Ifi204 (includes others), MTPN, PGK1, SELENBP1, SLC2A1, TYROBP
#6	EGR2	0,56	2,84E-04	2,43	2,84E-04	2,43	2,55E-04	2,43	5,01E-04	8	ASS1, EPHA4, IL1B, MR1, SLC12A2, SMAD1, TGFB3, TNFRSF8
#6	HIF1A	-1,39	6,90E-06	2,37	6,90E-06	2,87	6,90E-06	2,87	6,90E-06	20	ALDOC, CAV1, CD70, EREG, GADD45B, HK2, IL1B, KDM3A, MIF, MMP9, NPM1, P4HA2, PGF, PGK1, PLOD2, RAB20, SDC4, SLC25A37, SLC2A1, TGFB3
#6	ESR1	-0,29	1,62E-09	2,24	1,62E-09	2,24	1,62E-09	2,24	1,62E-09	14	ABCA3, ACE, CAV1, CCL2, EREG, FAS, FST, IL1B, KCTD6, MKI67, MMP9, MTA3, NFKB1, TGFB3
#6	STAT5A	0,56	1,44E-04	2,00	1,41E-04	1,34	1,38E-04	1,34	1,41E-04	10	BCL2A1, BCL6, CD70, FAS, FCER1G, LTA, NR4A2, SLC2A1, TNFSF4, UGP2
#6	CEBPB	-1,01	4,34E-03	1,52	4,30E-03	2,60	4,25E-03	2,16	4,30E-03	17	BCL2A1, CCL2, CCL5, CCL7, CP, DAB2, DYNLT1, EFN2, FAS, HDC, IL12B, IL1B, SAT1, SERPINB2, TF, TMEM176A, XDH

#7	TRIM24	4,45	3,74E-02	3,01	3,73E-02	1,35	3,71E-02	-3,63	3,73E-02	26	BST2, CMPK2, CSRPI, CXCL10, DHX58, EMB, Epsti1, FAM26F, IFI27L2, IFI44, Ifi47, IFIT3, Igtp, Iigp1, IRF1, Irgm2, LGALS3BP, NMI, OAS1, RTP4, SAMD9L, SPP1, Tgtp1/Tgtp2, TLR2, USP18, VEGFA
#7	NFE2L2	2,93	2,98E-02	2,89	2,95E-02	2,50	4,68E-02	2,20	2,95E-02	19	ANG, BNIP3, CCL13, CXCL10, EPHX1, F10, GPX3, GSTM5, HMOX1, HSPA9, KLK3, MT1E, PDIA6, PIP5K1C, PTGS2, SOD2, TCN2, TGFB1, VEGFA
#7	SP1	1,51	3,81E-05	2,76	3,75E-05	2,87	3,69E-05	3,19	3,75E-05	37	ABCA1, AKAP12, APOE, ATF3, ATP2A2, BNIP3L, CCL13, CD28, CEBPB, CXCL10, F10, F3, FPR2, HIF1A, HMOX1, HSPA5, IGF1, IRF1, JAM2, LDHC, LDLR, LIPA, LTB, MET, MT1E, PDK1, PLAU, PTGS2, SOD2, SPP1, SRC, TEAD1, TGFB1, TGFB2, TLR2, TNFRSF4, VEGFA
#7	MITF	2,38	1,20E-02	2,75	1,20E-02	2,91	1,19E-02	2,91	1,20E-02	9	APOE, ATP6V1B2, BEST1, CLCN7, GM2A, HIF1A, KAZN, MET, RHOQ
#7	HIF1A	1,27	1,33E-02	2,66	1,32E-02	2,83	1,31E-02	3,12	1,32E-02	21	AKAP12, APOE, ATP2A2, BHLHE41, BNIP3, BNIP3L, CCR7, CYR61, EDN1, ERO1L, HIF1A, HMOX1, HSPA5, MET, P4HA1, PDK1, PFKL, PTGS2, TGFB1, TLR2, VEGFA
#7	TFEB	2,44	1,22E-04	2,64	1,20E-04	2,64	1,18E-04	2,64	1,20E-04	7	CLCN7, CTSB, GLA, GNS, HEXA, LAMP1, VEGFA
#7	NKX2-3	3,74	5,78E-03	2,51	5,75E-03	1,76	5,71E-03	-2,24	5,75E-03	18	CD68, CMPK2, DHX58, EDN1, EXOC6, HELZ2, MYD88, NT5C3A, PARP14, PIM3, PNPT1, PTGS2, RTP4, SAMD9L, UBE2L6, USP18, XAF1, ZNFX1
#7	FOXO3	1,08	7,72E-04	2,45	7,63E-04	2,64	7,54E-04	3,02	7,63E-04	17	ATP6V0D2, BNIP3, BNIP3L, CTSL2, CXCL10, CYR61, GSTM5, GTF2I, IER3, IGF1, LCN2, MT1E, MT1H, NAMPT, PLAU, PRDX5, SOD2
#7	STAT5B	2,22	7,68E-03	2,43	7,60E-03	1,65	7,52E-03	1,40	7,60E-03	8	ATP2A2, HEXA, IGF1, IRF1, LTB, TLR2, TNFRSF4, TRAF1
#7	RELA	-0,67	2,88E-03	2,37	2,85E-03	2,85	2,82E-03	3,64	2,85E-03	31	APOE, ATP6AP2, BNIP3L, CCL13, CCR7, CEBPB, CTSB, CXCL10, CXCL11, EDN1, F3, HMOX1, IER3, IGF1, IL1RN, IRF1, LTB, LYN, MYB, NAMPT, NFKB2, NMI, PLAU, PTGES, PTGS2, SOD2, TGFB1, TLR2, TNFRSF4, TRAF1, VEGFA
#7	EGR1	1,46	1,04E-02	2,27	1,03E-02	2,66	1,02E-02	2,70	1,03E-02	13	ATF3, ATP2A2, CCL13, F3, HMOX1, LDLR, MYB, PF4, PTGES, SOD2, TGFB1, TGFB2, VEGFA

#7	GATA3	0,00	ND	2,21	4,99E-02	2,43	4,94E-02	2,21	4,99E-02	7	AGPAT5, BHLHE41, CSF1R, LTB, S100A9, SGPPI, STAT4
#7	PPARGC1B	1,96	6,93E-03	2,19	6,84E-03	2,19	6,76E-03	2,19	6,84E-03	5	ABCA1, C3, ERO1L, MCM4, VEGFA
#7	SPI1	1,21	3,51E-04	2,17	3,45E-04	2,39	3,40E-04	1,95	3,45E-04	15	C1QC, CCR7, CD68, CD72, CSF1R, IL18, IL1RN, IRAK3, KLK3, MYB, PCNA, PTGS2, PTPRC, SPP1, TLR2
#7	CREB1	0,21	6,94E-03	2,13	6,90E-03	2,33	6,85E-03	2,71	6,90E-03	19	ABCA1, ANGPTL2, APOE, ATF3, CD68, CEBPB, CYR61, DUSP14, EDN1, HMOX1, HSPA5, LDLR, NPC2, PCNA, PIM3, PTGS2, SLC16A1, SOD2, VEGFA
#7	RORC	2,00	9,63E-05	2,00	9,49E-05	2,00	9,35E-05	0,00	9,49E-05	11	CD28, HIF1A, LCN2, MT1E, MT1H, REL, S100A9, SLC16A7, SLC41A2, VEGFA, VLDLR
#7	HTT	0,00	1,98E-03	2,00	1,96E-03	2,00	1,95E-03	2,00	1,96E-03	27	ABCA1, ACAT2, AKAP12, ATF3, ATP2A2, B3GNT2, CIR, CANX, CAST, CD9, CEBPB, CLOCK, CSF1R, GPX3, HIF1A, HSPA5, HSPA9, Ifi204 (includes others), LDLR, MPEG1, MT1E, PCNA, PLOD3, RNF34, SEPP1, SOD2, SPP1
#7	TBX2	-2,43	2,87E-03	-2,00	2,83E-03	-2,24	2,80E-03	-0,64	2,83E-03	7	ATF3, BUB1, CCNL1, E2F8, HELLS, MAD2L1, MCM4
#7	IRF7	-4,76	2,60E-03	-3,12	2,57E-03	-1,27	2,54E-03	4,34	2,57E-03	30	CD69, CMPK2, CXCL10, DAXX, DHX58, FAM26F, FZD1, HELZ2, Ifi204 (includes others), IFI44, Ifi47, IFIT3, IFITM2, Igtp, IRF1, Irgm2, LILRA5, NAMPT, NMI, NT5C3A, OAS1, PARP14, PELI1, RTP4, SAMD9L, TRAF1, UBE2L6, USP18, XAF1, ZBP1
#7	IRF3	-4,48	4,18E-03	-3,23	4,05E-03	-1,58	3,92E-03	3,49	4,05E-03	22	CD69, CMPK2, CXCL10, DAXX, DHX58, FAM26F, HELZ2, Ifi204 (includes others), IFI44, Ifi47, IFIT3, IFITM2, Igtp, Irgm2, NT5C3A, OAS1, PARP14, PNP, SAMD9L, UBE2L6, USP18, ZBP1
#7	IRF5	-2,93	2,05E-02	-1,54	2,03E-02	-0,39	2,02E-02	2,60	2,03E-02	11	CMPK2, CXCL10, CXCL11, DHX58, IFI44, IFIT3, IFITM2, NAMPT, NT5C3A, OAS1, UBE2L6
#7	NFATC2	-2,88	7,74E-03	-1,63	7,70E-03	0,26	7,66E-03	2,86	7,70E-03	19	ABCA1, CMPK2, CXCL10, DAXX, E2F5, EDN1, HELZ2, IFIT3, Iigp1, IL18, IRF1, Irgm2, NMI, PELI1, PTGS2, REL, RILPL1, SRC, TGFB1
#7	IRF1	-2,40	2,20E-02	-1,98	2,18E-02	-1,61	2,17E-02	1,10	2,18E-02	15	C1R, CXCL10, FPR2, IFIT3, IL18, IRF1, LTB, MYB, OAS1, ODC1, PCNA, PF4, PTGS2, SOCS7, TGFB1

#7	STAT1	-2,10	4,71E-05	-1,42	4,61E-05	0,37	4,52E-05	2,66	4,61E-05	21	APOE, C3, CCL13, CCR7, CMPK2, CXCL10, CXCL11, FAM26F, Gbp6 (includes others), HIF1A, Ifi204 (includes others), Ifi47, IGF1, Igtf, IRF1, Irg1, PF4, PTGS2, SLFN13, Tgtp1/Tgtp2, USP18
#7	NR1H2	2,00	7,93E-03	1,16	7,86E-03	1,08	7,79E-03	0,09	7,86E-03	9	ABCA1, APOE, C3, CCL13, CXCL10, IL1RN, LDLR, PTGS2, VEGFA
#7	NR1H3	2,03	1,60E-02	1,54	1,59E-02	1,45	1,58E-02	0,53	1,59E-02	9	ABCA1, APOE, CCL13, CXCL10, IL1RN, INSIG2, LDLR, PTGS2, VEGFA
#7	STAT4	1,04	9,59E-20	1,84	9,59E-20	2,61	9,13E-20	3,57	9,59E-20	15	BSG, C3, CXCL10, ERO1L, GCNT2, IER3, IL18R1, IRF1, MT1E, PDK1, RNF130, SMPDL3A, TPD52, VEGFA, VLDLR
#7	USF2	1,22	2,85E-03	1,53	2,85E-03	2,17	2,79E-03	2,39	2,85E-03	7	ABCA1, FMRI, HMOX1, LGALS3BP, P4HA1, SPP1, TGFB1
#7	IRF6	0,00	1,24E-09	0,00	1,24E-09	2,00	1,17E-09	2,22	1,24E-09	5	FPR2, PLAUI, PTGES, PTGS2, SOD2
#7	CEBPB	-0,90	1,41E-02	1,04	1,41E-02	1,45	1,39E-02	2,97	1,41E-02	24	ALDH1A2, C3, CCL13, CEBPB, CLEC4E, CSF1R, FABP4, FZD1, IER3, IFITM2, IGF1, IL1RN, LAMC1, LCN2, LDLR, ODC1, PCNA, PTGES, PTGS2, SPP1, SQRDL, TGFB1, VCAN, VLDLR
#7	STAT3	0,36	1,74E-05	1,26	1,74E-05	1,74	1,69E-05	2,92	1,74E-05	29	BST2, CD9, CEBPB, CTSB, CXCL10, HIF1A, HMOX1, HTR2A, Ifi204 (includes others), IFI44, IFIT3, IL18R1, IL1RN, IRF1, KLK3, MT1E, MYB, MYD88, NAMPT, OAS1, PLAUI, PTGS2, RALGDS, SLAMF1, SLFN13, SOD2, TGFB1, VEGFA, XAF1
#7	ARNT2	-0,51	4,90E-06	0,10	4,90E-06	1,07	4,84E-06	2,54	4,90E-06	12	ANG, APOE, BST1, ELL2, GPX3, H2-K2/H2-Q9, Ifi204 (includes others), Iigp1, KLK3, LAMA2, Sp100, VEGFA
#7	SIM1	-0,85	6,59E-06	-0,21	6,59E-06	0,79	6,42E-06	2,35	6,59E-06	11	ANG, APOE, BST1, ELL2, GPX3, H2-K2/H2-Q9, Ifi204 (includes others), Iigp1, KLK3, LAMA2, Sp100
#7	MYB	-1,13	2,70E-08	0,00	2,70E-08	0,76	2,63E-08	2,22	2,70E-08	7	HSPA5, IGF1, KITLG, MYB, PCNA, PTGS2, SPP1
#7	PGR	0,40	4,48E-02	1,94	4,48E-02	1,94	4,43E-02	2,22	4,48E-02	10	CEBPB, F3, GAL, HIF1A, IER3, Irg1, NPC1, PCNA, PTGS2, VCAN
#7	CREBBP	0,00	1,74E-10	0,00	1,74E-10	1,41	1,65E-10	2,18	1,74E-10	9	CAMK2D, CXCL10, CYR61, FABP4, IRF1, LDLR, PCNA, PTGS2, TLR2
#7	USF1	1,12	9,30E-05	1,94	9,30E-05	1,94	9,12E-05	2,17	9,30E-05	8	ABCA1, AKAP12, FMRI, MT1E, P4HA1, PTGS2, SPP1, TGFB1

#7	CEBPA	-0,26	1,12E-02	0,91	1,12E-02	1,06	1,11E-02	2,11	1,12E-02	26	AKAP12, C3, CEBPB, CSF1R, EPHX1, FABP4, FZD1, GAL, HMOX1, HSPA5, IER3, IGF1, IL1RN, LCN2, MALT1, PCNA, PLIN2, PTGS2, PTPRC, S100A9, SECTM1, SMPDL3A, SOD2, SPP1, VCAN, VLDLR
#7	ATF4	0,52	4,08E-03	1,66	4,08E-03	1,91	4,04E-03	2,09	4,08E-03	10	ATF3, CEBPB, DDIT4, EDN1, ERO1L, GYS1, HSPA5, PMP22, PTGS2, VEGFA
#7	PPARA	0,57	1,18E-05	1,15	1,18E-05	1,44	1,16E-05	2,00	1,18E-05	18	ABCA1, APOE, CIQB, C1R, C3, CCL13, CEBPB, EDN1, FABP4, HIF1A, HLA-E, HMOX1, IFITM2, INSIG2, MAD2L1, PCNA, PLIN2, VEGFA
#7	PPRC1	0,00	8,69E-06	0,00	8,69E-06	1,00	8,45E-06	2,00	8,69E-06	5	DDIT4, LCN2, NAMPT, PTGS2, TM6SF1
#7	HDAC1	0,22	1,15E-03	-0,56	1,15E-03	-0,56	1,13E-03	-2,00	1,15E-03	13	AKAP12, CSF1R, FABP4, KLK3, LCN2, MT1E, MT1H, NES, PLAU, PTGS2, RRM2, SPP1, TGFB2
#7	KLF2	0,29	2,11E-02	-1,15	2,11E-02	-1,15	2,06E-02	-2,07	2,11E-02	13	CCL13, CCR7, CD93, ECM1, EDN1, F3, FABP4, HIF1A, KITLG, LGALS9, PTGS2, TFPI, TGFB1
#8	MYC	-0,20	2,94E-03	3,66	2,94E-03	3,66	2,91E-03	0,08	2,94E-03	29	ATAD3A/ATAD3B, B4GALT7, BCL2A1, BOP1, Ccl6, CSRP2, DBI, E2F2, Gm5451, GPI, ID1, ID2, ID3, KLF4, LDHB, LIMS1, METAP1, PNO1, RPL10, RPL19, RPL22, RPL32, RPL6, RPL7A, RPS13, RPS16, RPS18, Rps20, RPS7
#8	MYCN	0,95	7,93E-18	2,74	7,93E-18	2,74	7,51E-18	1,23	7,93E-18	19	CDK9, CHPF2, E2F2, FAU, FRMD6, ID2, RPL10, RPL13A, RPL18, RPL19, RPL22, RPL6, RPS13, RPS15, RPS16, RPS3, RPS3A, RPS7, TUBB
#9	STAT1	-2,20	2,96E-11	0,35	2,96E-11	-2,19	2,85E-11	0,35	2,96E-11	8	CASP3, CDKN1A, FGL2, FOS, IFIT1, IL6, NOS2, RUNX1
#9	NFATC2	-2,00	3,41E-07	1,41	3,41E-07	0,00	3,34E-07	1,41	3,41E-07	8	CASP3, CDKN1A, CITED2, FGL2, HDAC1, ITPR1, NFKBIZ, TNF
#9	JUN	0,00	2,85E-09	2,60	2,85E-09	1,87	2,76E-09	2,60	2,85E-09	10	C3AR1, CDKN1A, FOS, IL6, LIF, NFKBIZ, NOS2, Pmaip1, Svit, TNF
#9	STAT4	1,99	1,83E-06	2,43	1,83E-06	1,99	1,78E-06	2,43	1,83E-06	6	CXCL2, INTS12, PYGL, RAMP1, SELENBP1, TNF
#9	CEBPB	1,57	7,22E-07	2,42	7,22E-07	1,86	7,00E-07	2,42	7,22E-07	10	ALOX5AP, CCL4, CDKN1A, CXCL2, FOS, IL6, NFKBIZ, NOS2, TNF, TNFRSF1A
#9	NFKBIA	0,39	3,28E-05	2,38	3,28E-05	0,77	3,23E-05	2,38	3,28E-05	13	C21orf33, CCRN4L, CDKN1A, CXCL2, CYBA, FOS, GRN, IL6, ITPR1, LIF, NOS2, PLD3, TNF

#9	IRF8	1,13	1,59E-04	2,18	1,59E-04	1,48	1,57E-04	2,18	1,59E-04	8	ASAH1, CASP3, CDKN1A, IL6, LIF, NOS2, Pmaip1, TNF
#9	XBP1	0,00	3,26E-04	2,17	3,26E-04	0,00	3,19E-04	2,17	3,26E-04	6	CXCL2, DDOST, FKBP2, IL6, NOS2, TNF
#9	EP300	0,00	6,45E-04	2,03	6,45E-04	1,15	6,38E-04	2,03	6,45E-04	7	CDKN1A, IL6, ITGB2, KLK3, MEF2C, NOS2, TNF
#10	STAT4	2,05	5,00E-05	1,69	5,00E-05	2,05	4,95E-05	-1,94	5,00E-05	20	ACADL, ACP6, ADSS, ANGPTL6, ATP7A, BAD, BCL3, DAP, DDAH2, GTF2E2, LRRFIP1, LTBP3, MAGED1, MATK, RNF128, RRAGD, SELPLG, TIMP1, TLE6, ZNF524
#10	SREBF1	0,00	1,39E-06	0,00	1,39E-06	0,00	1,34E-06	-2,12	1,39E-06	17	ABCD2, ACLY, CAPZB, EHHADH, GSR, IDH1, IRS2, MLYCD, PMVK, PTGIR, RPLP0, Scd2, STAR, SUCLG1, TM7SF2, TP53, UCP2
#10	PLAG1	0,00	6,43E-08	0,00	6,43E-08	0,00	6,17E-08	-2,65	6,43E-08	7	CLTB, CRIP2, LSP1, PLEC, PTP4A3, ROM1, TNNT3
#10	TP73	0,00	6,63E-03	0,19	6,63E-03	0,00	6,53E-03	-2,95	6,63E-03	12	AEN, COX411, ERCC2, ERCC5, FDXR, HAGH, IL4R, MGMT, PDGFB, PRKDC, PSRC1, TP53
#10	TP53	-1,78	1,89E-02	-1,37	1,89E-02	-1,19	1,86E-02	-3,76	1,89E-02	80	ACAA2, ACLY, ACOT11, AEN, AKT1, ALDH9A1, ALOX5, ANLN, ANXA3, BCAS3, BCL3, CAPI, CASP6, CD247, CDC7, CDKN2A, CHST12, CKB, CKS1B, CNN2, CRIP2, CTIF, DDB2, DHCR24, DLGAP5, DNASE1, DUSP1, EIF2AK3, ELF4, ERCC5, FDXR, FEN1, FUCA1, GART, GLIPR1, GSN, GSR, H2AFX, HADH, HRAS, IDH1, ILK, KIF24, LSP1, MAP4K1, MAPK4, MGMT, MMP2, MSH2, MVP, MYO1C, NDRG2, NFE2, PADI2, PBK, PCBP4, PDGFB, PDLIM1, PFN1, PHLDA3, POLE2, PQLC3, PRDX2, PRKCA, PSRC1, PTP4A3, PTPN12, RAD50, RPS6KA1, RPS6KB1, S100A4, SEC61B, SERPINB6, SHC1, SOD1, SUCLG1, TP53, Tpm4, VIM, ZFP36L1
#11	SP1	-0,28	2,94E-03	-0,28	2,94E-03	-2,25	2,91E-03	-0,28	2,94E-03	19	Abcb1b, ANKH, BCL2, BIRC5, CAMP, CHRNA5, CIRBP, ELANE, F2R, IL1A, IL21R, ITGAD, LPL, PPARD, PTGS1, RECQL4, SERPINE1, SLC4A2, TGM1
#11	FOXM1	-1,99	3,28E-03	-1,99	3,28E-03	-2,23	3,23E-03	-1,99	3,28E-03	5	BIRC5, Ccnb1/Gm5593, CDC20, MAPK8, PLK1
#11	SP3	0,00	4,60E-02	0,00	4,60E-02	-2,13	4,55E-02	0,00	4,60E-02	9	BIRC5, F2R, IL1A, IRF3, ITGAD, LPL, PTGS1, SERPINE1, TGM1
#13	HOXD10	0,00	5,21E-04	0,00	5,21E-04	-2,00	5,14E-04	-2,00	5,21E-04	4	ICAM1, LSM6, NCSI, RHOB

#14	TP53	-0,76	2,09E-06	-2,16	2,09E-06	-2,32	2,02E-06	-2,00	2,09E-06	40	ACAT1, ADRBK2, ALDH4A1, ARHGAP1, ARHGEF2, ASL, BCL2L1, CA9, CARHSP1, CD82, CEP55, CHD3, DNMI1, DOK1, DUSP2, ESPL1, FHL2, HLA-B, HSPA1A/HSPA1B, ICAMI, IGF1R, IRF5, LIMA1, MAP3K8, MIR17HG, MYH9, OSGIN1, PDGFA, PDIA5, PDRG1, PPFIBP1, PRKAR2A, RGS16, RHOB, ST14, STMN1, TAGLN2, Tpm1, TSPO, VDR
#15	MKL1	2,00	2,94E-04	1,63	2,94E-04	1,63	2,89E-04	2,00	2,94E-04	8	CD177, EPX, HLA-B, IFITM1, MAPK13, PRG3, PRSS57, TPM2
#15	MKL2	2,00	1,28E-02	2,24	1,28E-02	2,24	1,26E-02	2,00	1,28E-02	7	CD177, EPX, HLA-B, IFITM1, MAPK13, PRG3, PRSS57
#15	SRF	2,00	5,50E-03	0,49	5,50E-03	0,49	5,46E-03	2,00	5,50E-03	10	CD177, DUSP5, EPX, IL2, MAPK13, NCOA7, PDLIM7, PRG3, PRSS57, TPM2
#15	MYC	-2,17	5,20E-05	-1,72	5,20E-05	-1,72	5,10E-05	-2,17	5,20E-05	19	ACTN1, BRCA1, CCND2, CCNE1, CCNG2, CDH1, COL15A1, FBXO32, GFPT1, HLA-B, INHBA, ITGAL, MCM6, MTBP, PFKFB3, RBBP7, SP3, THY1, VCAM1
#15	STAT1	-2,21	3,82E-05	-2,80	3,82E-05	-2,80	3,74E-05	-2,21	3,82E-05	8	ALOX15, APOBEC3B, CCND2, CCNE1, IFITM1, IL1R1, IL2, SMAD7
#15	GLI1	-2,38	3,27E-02	-2,57	3,00E-02	-2,57	2,70E-02	-2,38	2,83E-02	7	ASPM, CCND2, CDH1, IL1R2, IL2RA, JAG2, LMNA
#15	CBFB	0,00	3,48E-02	2,00	3,30E-02	2,00	3,09E-02	1,73	3,18E-02	5	IL2RA, ITGAL, RUNX3, SOCS5, TGFBRI
#15	PPRC1	0,00	3,16E-05	-2,00	3,16E-05	-2,00	3,05E-05	0,00	3,16E-05	4	CLDN1, DUSP5, GDF15, ST6GALNAC3
#15	NFKB1	0,15	3,95E-03	-2,16	3,95E-03	-2,16	3,87E-03	0,15	3,95E-03	11	AHRR, CASR, CCND2, CSF1, CX3CL1, HLA-DMB, IFNA16, IL13, IL2, IL2RA, VCAM1
#15	IRF1	0,00	2,99E-08	-2,39	2,99E-08	-2,39	2,81E-08	0,00	2,99E-08	7	CXCL16, IFITM1, IFNA16, IL12RB1, PLA2G16, STAT3, VCAM1
#15	FOXO1	1,18	1,16E-02	-2,39	1,16E-02	-2,39	1,13E-02	1,11	1,16E-02	9	ASPM, BID, CCNG2, FBXO32, FDPS, KIF18A, RAB7A, RICTOR, VCAM1
#15	CTNNB1	0,00	1,22E-05	-2,59	1,22E-05	-2,40	1,16E-05	0,00	1,22E-05	14	AKAP13, BHLHE40, CCND2, CDH1, FOXC1, IFITM1, IL13, IL1R1, ITGAL, LMNA, MLLT6, SMAD6, SMAD7, VCAM1
#15	RUNX1	1,98	9,55E-03	0,00	9,55E-03	0,00	9,34E-03	2,22	9,55E-03	6	CSF1, EP300, IL2, ITGAL, ST3GAL5, STAT3

A z-score is calculated on the basis of dKO/WT expression ratio of the predicted target genes. Thus, a regulator with a positive or negative z-score is predicted to be more active in dKO or in WT, respectively. Only regulators with a z-score < -2 or > 2 and a p-value < 0.05 are shown.

Table 3.S3. Correlation between mRNA expression and z-score values for each predicted regulator

Predicted regulator	Cluster	Log ₂ fold change				Z-score				Correlation coefficient (R)
		no LPS	1h	2h	6h	no LPS	1h	2h	6h	
ARNT2	7	1,82	1,64	1,25	1,37	-0,51	0,10	1,07	2,54	-0,6502
	6	1,82	1,64	1,25	1,37	0,00	2,83	2,33	2,33	
ATF4	7	0,22	0,00	0,40	0,46	0,52	1,66	1,91	2,09	0,3961
BRCA1	6	-0,94	-1,04	-1,07	-0,97	-2,41	0,15	-0,25	0,92	-0,4425
CDKN2A	2	3,18	2,44	2,34	1,45	0,00	2,45	0,00	-2,24	0,5461
CEBPB	6	0,00	0,69	0,94	1,31	-1,01	1,52	2,60	2,16	0,7959
	7	0,00	0,69	0,94	1,31	-0,90	1,04	1,45	2,97	
	9	0,00	0,69	0,94	1,31	1,57	2,42	1,86	2,42	
CREB1	1	0,00	-0,42	0,00	0,00	-0,32	0,00	-1,95	2,60	-0,0957
	7	0,00	-0,42	0,00	0,00	0,21	2,13	2,33	2,71	
	6	0,00	-0,42	0,00	0,00	-2,42	0,00	0,00	0,00	
CTNNB1	15	0,61	0,63	0,51	0,58	0,00	-2,59	-2,40	0,00	0,2215
E2F2	1	-0,79	-0,51	-0,39	-0,88	-2,00	-2,00	-2,00	0,00	-0,6768
EGR2	6	0,00	0,00	0,90	0,53	0,56	2,43	2,43	2,43	0,5422
EP300	9	0,23	0,00	0,00	0,20	0,00	2,03	1,15	2,03	-0,4462
ESR1	1	0,29	0,00	0,00	0,42	-2,10	-2,10	-1,68	0,13	0,0646
	6	0,29	0,00	0,00	0,42	-0,29	2,24	2,24	2,24	
FOXM1	5	-0,61	-0,61	-0,63	-0,64	-2,18	-2,18	0,00	0,00	-0,5637
	11	-0,61	-0,61	-0,63	-0,64	-1,99	-1,99	-2,23	-1,99	
FOXO3	7	0,38	0,41	0,86	0,28	1,08	2,45	2,64	3,02	0,1426
GATA3	7	0,00	-2,75	0,00	0,00	0,00	2,21	2,43	2,21	-0,2903
GLI1	15	0,00	-2,12	-0,89	0,00	-2,38	-2,57	-2,57	-2,38	0,1836
	1	0,00	-2,12	-0,89	0,00	-0,79	-0,42	-0,42	2,25	
HDAC1	7	-1,41	-1,23	-1,42	-1,04	0,22	-0,56	-0,56	-2,00	-0,8825
HIF1A	7	0,63	0,79	0,85	1,35	1,27	2,66	2,83	3,12	0,6706
	6	0,63	0,79	0,85	1,35	-1,39	2,37	2,87	2,87	
	1	0,63	0,79	0,85	1,35	-0,10	0,17	-0,10	3,49	
HTT	7	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	2,00	2,00	2,00	0,3333
IRF1	1	0,00	0,00	0,25	0,48	0,00	-1,17	-1,17	2,60	0,6419
	7	0,00	0,00	0,25	0,48	-2,40	-1,98	-1,61	1,10	
	5	0,00	0,00	0,25	0,48	-2,95	-2,77	-1,09	0,00	
	15	0,00	0,00	0,25	0,48	0,00	-2,39	-2,39	0,00	
	6	0,00	0,00	0,25	0,48	-3,31	0,84	1,20	2,57	
IRF3	7	0,00	0,00	-0,27	0,00	-4,48	-3,23	-1,58	3,49	-0,0753
	5	0,00	0,00	-0,27	0,00	-2,42	-2,42	-0,76	2,24	
	6	0,00	0,00	-0,27	0,00	-3,71	0,34	1,27	2,94	

IRF5	7	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,93	-1,54	-0,39	2,60	-0,3485
	5	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,39	-2,39	-1,46	0,00	
	6	0,00	-0,47	-0,44	-0,28	-2,77	-0,31	0,00	2,19	
IRF6	7	-1,85	-1,85	-4,42	-1,84	0,00	0,00	2,00	2,22	-0,5137
IRF7	1	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-1,48	-1,78	-2,18	3,76	0,6777
	5	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-2,91	-2,91	-0,85	1,41	
	6	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-4,03	0,61	1,88	3,65	
	7	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-4,76	-3,12	-1,27	4,34	
	2	-1,94	-0,99	0,00	0,00	-2,12	-3,30	-1,89	1,93	
IRF8	1	-0,50	-0,88	-0,57	-0,49	1,00	1,00	1,00	2,92	0,1112
	9	-0,50	-0,88	-0,57	-0,49	1,13	2,18	1,48	2,18	
JUN	9	0,40	1,37	1,81	0,57	0,00	2,60	1,87	2,60	0,3587
	6	0,40	1,37	1,81	0,57	-2,09	0,39	0,10	0,42	
JUNB	1	0,00	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00	2,00	1,0000
KLF2	7	0,46	-0,32	0,00	0,00	0,29	-1,15	-1,15	-2,07	0,6722
	6	0,46	-0,32	0,00	0,00	2,59	-0,43	-0,79	-1,10	
MITF	7	0,51	0,59	0,42	0,86	2,38	2,75	2,91	2,91	0,3188
MKL1	15	0,00	-0,65	-0,96	-0,44	2,00	1,63	1,63	2,00	0,8407
MTPN	6	0,00	0,23	0,36	0,22	-2,22	0,00	0,00	1,97	0,6232
MYB	7	-1,82	-1,30	-0,86	0,00	-1,13	0,00	0,76	2,22	0,9982
MYBL2	1	-0,90	-1,23	-0,62	-0,66	-2,24	-2,24	-2,24	0,00	0,4585
MYC	15	0,00	0,41	0,00	0,00	-2,17	-1,72	-1,72	-2,17	0,2623
	8	0,00	0,41	0,00	0,00	-0,20	3,66	3,66	0,08	
NCOA2	6	0,00	-0,26	-0,42	-0,44	-2,22	-0,37	0,00	2,40	-0,8777
NFATC2	6	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,95	0,75	1,48	2,71	-0,6969
	1	0,00	0,00	-0,66	-0,73	0,00	-1,00	0,00	3,56	
	2	0,00	0,00	-0,66	-0,73	0,00	-1,34	0,00	2,00	
	7	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,88	-1,63	0,26	2,86	
	9	0,00	0,00	-0,66	-0,73	-2,00	1,41	0,00	1,41	
NFE2L2	5	0,40	0,50	0,64	0,56	1,09	1,09	3,21	3,21	0,1864
	7	0,40	0,50	0,64	0,56	2,93	2,89	2,50	2,20	
	1	0,40	0,50	0,64	0,56	0,00	-1,09	-0,76	3,11	
NFKB1	15	-0,31	0,00	0,00	0,00	0,15	-2,16	-2,16	0,15	0,2364
	1	-0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,60	
	6	-0,31	0,00	0,00	0,00	-2,95	0,00	0,00	0,00	
NR1H3	7	-1,27	-1,65	-1,15	-0,91	2,03	1,54	1,45	0,53	-0,6197
NR3C1	6	0,22	0,53	0,61	0,55	2,30	1,86	1,09	-0,55	-0,6066
NUPR1	6	0,00	0,70	0,42	0,00	2,50	1,21	1,21	0,69	0,2624
	3	0,00	0,70	0,42	0,00	2,36	2,18	2,50	1,61	
	1	0,00	0,70	0,42	0,00	2,98	3,13	3,30	-0,35	
PLAG1	10	0,00	-0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-2,65	-0,3333
PPARGC1B	7	0,00	0,92	1,02	0,00	1,96	2,19	2,19	2,19	0,5758

PPRC1	7	0,00	0,00	0,44	-0,49	0,00	0,00	1,00	2,00	-0,4276
	15	0,00	0,00	0,44	-0,49	0,00	-2,00	-2,00	0,00	
RELA	1	0,00	0,00	0,00	0,32	-0,36	-0,36	-0,65	3,04	0,5945
	7	0,00	0,00	0,00	0,32	-0,67	2,37	2,85	3,64	
	6	0,00	0,00	0,00	0,32	-3,10	-1,41	0,15	1,04	
RUNX1	15	0,00	0,34	0,00	0,43	1,98	0,00	0,00	2,22	0,1792
SMARCA4	1	0,00	0,00	0,00	0,23	0,96	0,54	0,54	3,07	0,9865
SP1	11	0,00	0,00	0,25	0,00	-0,28	-0,28	-2,25	-0,28	-0,1862
	7	0,00	0,00	0,25	0,00	1,51	2,76	2,87	3,19	
SP3	11	0,24	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	-2,13	0,00	0,5770
STAT1	2	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-1,76	-2,58	-1,48	2,70	0,6534
	7	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,10	-1,42	0,37	2,66	
	5	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-3,45	-3,32	-0,48	1,35	
	6	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-3,79	0,66	2,36	3,36	
	15	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,21	-2,80	-2,80	-2,21	
	1	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,61	-2,79	-2,79	1,76	
	9	-0,90	-0,93	-0,34	0,00	-2,20	0,35	-2,19	0,35	
STAT3	7	0,00	-0,25	-0,28	0,23	0,36	1,26	1,74	2,92	0,3217
	6	0,00	-0,25	-0,28	0,23	-2,18	1,40	1,40	1,88	
	1	0,00	-0,25	-0,28	0,23	-1,32	-1,55	-1,55	2,03	
STAT4	10	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	2,05	1,69	2,05	-1,94	0,1941
	1	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,43	1,14	0,35	4,32	
	9	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,99	2,43	1,99	2,43	
	7	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	1,04	1,84	2,61	3,57	
	4	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	0,00	2,80	0,00	0,00	
	6	-1,63	-1,42	-1,18	-0,72	-2,43	1,80	1,92	2,46	
STAT5A	6	-0,45	-0,85	-0,48	-0,25	0,56	2,00	1,34	1,34	-0,6021
STAT5B	7	0,00	0,00	-0,29	0,00	2,22	2,43	1,65	1,40	0,3834
TRIM24	7	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	4,45	3,01	1,35	-3,63	0,8105
	2	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	2,24	2,65	2,24	-1,00	
	5	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	1,77	1,77	0,39	-2,00	
	6	-0,55	-0,53	-0,85	-1,02	3,30	0,00	0,00	-2,43	
USF1	7	0,00	0,00	-0,32	0,00	1,12	1,94	1,94	2,17	-0,2138
USF2	7	0,23	0,38	0,34	0,32	1,22	1,53	2,17	2,39	0,4016
XBP1	9	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	2,17	0,00	2,17	0,1291
	5	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	0,00	3,72	3,72	
	3	0,00	0,00	0,21	-0,18	0,00	0,00	3,50	0,00	

For regulators present in more than one cluster, a correlation was performed between the log2 ratio of expression and all combinations of z-score values found in the different clusters.

Table 3.S4. GO-term enrichment analysis of regulators identified by Ingenuity Pathway Analysis

GO term [biological process]	Number of regulators	Number of genes in InnateDB	Ratio	GO term p-value	GO term p-value (corrected)	Regulators gene symbols
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	62	690	9%	1,6622E-73	1,0580E-70	<i>Arnt2, Atf4, Brca1, Chfb, Cebpa, Cebpb, Creb1, Crebbp, E2f1, Egr1, Egr2, Ep300, Epas1, Esr1, Ets1, Foxa2, Foxl2, Foxm1, Foxo1, Foxo3, Gli1, Hif1a, Hnf4a, Hoxd10, Irf1, Irf7, Jun, Klf2, Mitf, Mkl1, Mkl2, Myb, Myc, Mycn, Ncoa2, Nfatc2, Nfe2l2, Nfkb1, Nfkbia, Nkx2-3, Nr1h2, Nr1h3, Ppara, Ppargc1b, Rela, Runx1, Sfp1, Smarca4, Smarcb1, Sp1, Srebf1, Srf, Stat1, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6, Tfeb, Trp73, Usf1, Usf2,</i>
regulation of transcription, DNA-dependent	72	1750	4%	4,2138E-64	1,7881E-61	<i>Arnt2, Atf4, Cdkn2a, Cebpa, Cebpb, Creb1, Crebbp, Cttnb1, E2f1, E2f2, Egr1, Egr2, Ep300, Epas1, Esr1, Ets1, Foxa2, Foxl2, Foxm1, Foxo1, Foxo3, Gata3, Hif1a, Hnf4a, Hoxa9, Hoxd10, Irf3, Irf5, Irf6, Irf7, Irf8, Jun, Junb, Mitf, Myb, Mybl2, Myc, Mycn, Ncoa2, Nfatc2, Nfe2l2, Nfkb1, Nkx2-3, Nr1h2, Nr1h3, Nr3c1, Pgr, Plag1, Ppara, Pprc1, Rela, Rorc, Runx1, Sfp1, Sim1, Smarca4, Sp1, Sp3, Srebf1, Srf, Stat1, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6, Tbx2, Tfeb, Trp53, Trp73, Usf1, Xbp1,</i>
positive regulation of transcription, DNA-dependent	52	514	10%	2,0875E-62	5,3147E-60	<i>Arnt2, Atf4, Cdkn2a, Cebpa, Cebpb, Creb1, Crebbp, E2f1, Egr1, Egr2, Ep300, Ets1, Foxa2, Foxm1, Foxo1, Foxo3, Gli1, Hif1a, Hnf4a, Irf1, Irf6, Irf7, Irf8, Jun, Klf2, Mitf, Mkl1, Mkl2, Myb, Myc, Mycn, Nfatc2, Nfe2l2, Nfkb1, Nfkbia, Nr1h3, Ppara, Ppargc1b, Rela, Runx1, Sfp1, Sp1, Sp3, Srebf1, Srf, Stat1, Stat3, Tfeb, Trim24, Trp73, Usf1, Usf2,</i>
transcription, DNA-dependent	40	1364	3%	2,1499E-25	2,2806E-23	<i>Arnt2, Atf4, Cebpa, Cttnb1, E2f1, E2f2, Ep300, Hdac1, Hoxa9, Hoxd10, Irf1, Irf3, Irf5, Irf6, Irf8, Jun, Klf2, Mkl1, Myb, Mybl2, Myc, Ncoa2, Nfatc2, Nfe2l2, Nfkb1, Nkx2-3, Nr3c1, Plag1, Pprc1, Sim1, Smarca4, Smarcb1, Srebf1, Stat1, Stat6, Tbx2, Tfeb, Trim24, Trp53, Trp73,</i>
innate immune response	29	596	5%	4,9801E-24	4,5283E-22	<i>Atf4, Cdkn2a, Cebpa, Cebpb, Creb1, E2f1, Foxa2, Foxo3, Hif1a, Irf1, Irf3, Irf5, Irf7, Irf8, Nfatc2, Nfe2l2, Nfkb1, Nfkbia, Nr1h3, Nr3c1, Ppargc1b, Rela, Srebf1, Stat1, Stat3, Stat4, Stat6, Trp73, Xbp1,</i>
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	27	534	5%	9,0491E-23	7,1997E-21	<i>Cebpa, Crebbp, Cttnb1, E2f1, Egr1, Ep300, Foxa2, Foxl2, Foxm1, Foxo1, Foxo3, Gata3, Hdac1, Irf3, Myb, Myc, Ncoa2, Nfkb1, Nr1h2, Nr1h3, Ppara, Smarca4, Srebf1, Stat6, Tbx2, Trp53, Trp73,</i>
transcription from RNA polymerase II promoter	14	119	12%	3,3701E-17	2,1451E-15	<i>Egr1, Egr2, Ets1, Foxm1, Jun, Junb, Myc, Nr3c1, Srf, Stat3, Stat5a, Stat5b, Usf1, Xbp1,</i>
negative regulation of transcription, DNA-dependent	20	433	5%	3,8040E-16	2,1054E-14	<i>Cdkn2a, Cebpa, Cebpb, E2f1, Foxl2, Foxm1, Hdac1, Irf1, Jun, Myb, Ncoa2, Nfkb1, Nr1h2, Nr1h3, Ppargc1b, Rela, Sfp1, Sp3, Tbx2, Trim24,</i>
liver development	12	93	13%	2,2487E-15	1,1450E-13	<i>Cebpa, Cttnb1, Ep300, Foxm1, Jun, Mkl2, Rela, Runx1, Smarca4, Sp1, Sp3, Stat5b,</i>
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	14	221	6%	2,1173E-13	1,0367E-11	<i>Atf4, Cebpa, Cttnb1, Ets1, Foxa2, Foxo1, Gata3, Hnf4a, Nr1h2, Sfp1, Sp1, Stat5a, Stat5b, Usf2,</i>

in utero embryonic development	14	240	6%	6,5474E-13	3,0870E-11	<i>Arnt2, Cttnb1, Foxa2, Gata3, Junb, Klj2, Mkl2, Myb, Runx1, Smarca4, Sp1, Sp3, Srf, Trp53,</i>
embryonic placenta development	7	26	27%	7,5208E-12	3,0884E-10	<i>Cebpa, Cebpb, Epas1, Hif1a, Sp1, Sp3, Tfeb,</i>
lung development	10	106	9%	1,3372E-11	5,3196E-10	<i>Cebpa, Ep300, Epas1, Foxa2, Gli1, Mycn, Nr3c1, Sp1, Sp3, Srebf1,</i>
regulation of gene expression	10	116	9%	3,3163E-11	1,2793E-09	<i>Cdkn2a, Cttnb1, Foxa2, Hif1a, Irf1, Mitf, Mkl2, Myb, Myc, Ppara,</i>
steroid hormone mediated signaling pathway	8	54	15%	3,9848E-11	1,4493E-09	<i>Esr1, Hnf4a, Nr1h2, Nr1h3, Nr3c1, Pgr, Ppara, Rorc,</i>
regulation of cell proliferation	10	131	8%	1,1174E-10	3,9514E-09	<i>Cebpa, Foxm1, Foxo1, Foxo3, Hif1a, Mitf, Nfkb1a, Nkx2-3, Nr3c1, Stat6,</i>
cytokine-mediated signaling pathway	8	69	12%	3,0516E-10	1,0499E-08	<i>Cebpa, Rela, Stat1, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6,</i>
definitive hemopoiesis	5	12	42%	6,7983E-10	2,1636E-08	<i>Cbfb, Hoxa9, Runx1, Sp1, Sp3,</i>
lipid homeostasis	5	13	38%	1,1013E-09	3,3379E-08	<i>Hnf4a, Nr1h2, Nr1h3, Usf1, Usf2,</i>
positive regulation of cell proliferation	13	349	4%	1,2084E-09	3,5775E-08	<i>Arnt2, Cttnb1, Ets1, Foxm1, Gli1, Hdac1, Jun, Myc, Mycn, Rela, Stat5a, Stat5b, Tbx2,</i>
negative regulation of apoptotic process	14	426	3%	1,3322E-09	3,8542E-08	<i>Arnt2, Cebpb, Foxo1, Hdac1, Hif1a, Htt, Jun, Mitf, Mkl1, Nfkb1, Rela, Stat5a, Stat5b, Trp73,</i>
intracellular receptor mediated signaling pathway	5	20	25%	1,2980E-08	3,4424E-07	<i>Esr1, Nr1h2, Nr1h3, Ppara, Stat3,</i>
response to drug	12	358	3%	1,7829E-08	4,5394E-07	<i>Creb1, Egr1, Ep300, Gata3, Hnf4a, Jun, Junb, Nfatc2, Rela, Srebf1, Stat3, Xbp1,</i>
positive regulation by host of viral transcription	4	9	44%	2,8737E-08	7,1730E-07	<i>Ep300, Jun, Smarcb1, Sp1,</i>
positive regulation of fatty acid biosynthetic process	4	10	40%	4,7750E-08	1,1469E-06	<i>Hnf4a, Nr1h2, Nr1h3, Srebf1,</i>
JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway	3	3	100%	6,0399E-08	1,3980E-06	<i>Stat3, Stat5a, Stat5b,</i>

positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter by glucose	3	3	100%	6,0399E-08	1,3980E-06	<i>Foxa2, Usf1, Usf2,</i>
response to cAMP	6	54	11%	7,2849E-08	1,6560E-06	<i>Hnf4a, Jun, Junb, Ppargc1b, Rela, Srebf1,</i>
response to bacterium	5	29	17%	9,6666E-08	2,1217E-06	<i>Irf3, Irf8, Nfkb1, Rela, Stat1,</i>
response to hypoxia	9	204	4%	1,2069E-07	2,6040E-06	<i>Arnt2, Ep300, Epas1, Ets1, Hif1a, Ppara, Srf, Stat5b, Usf1,</i>
negative regulation of cell proliferation	10	283	4%	1,8382E-07	3,8360E-06	<i>Cebpa, Ctnnb1, Gata3, Hnf4a, Irf6, Jun, Smarcb1, Srf, Trim24, Trp53,</i>
response to insulin stimulus	6	65	9%	2,2500E-07	4,5464E-06	<i>Egr1, Egr2, Foxa2, Nr3c1, Ppara, Rela,</i>
negative regulation of cholesterol storage	3	4	75%	2,4090E-07	4,6464E-06	<i>Nr1h2, Nr1h3, Ppara,</i>
induction of apoptosis	8	164	5%	2,9351E-07	5,5766E-06	<i>Cdkn2a, Cebpb, Ets1, Foxl2, Foxo3, Irf1, Sfp1, Trp53,</i>
trophectodermal cell differentiation	4	15	27%	3,0570E-07	5,7229E-06	<i>Junb, Sp1, Sp3, Srf,</i>
response to cytokine stimulus	6	83	7%	9,7114E-07	1,6935E-05	<i>Jun, Junb, Rela, Srf, Stat3, Stat6,</i>
JAK-STAT cascade	4	20	20%	1,0687E-06	1,8385E-05	<i>Stat1, Stat3, Stat5a, Stat5b,</i>
lactation	5	47	11%	1,1804E-06	2,0036E-05	<i>Creb1, Hif1a, Stat5a, Stat5b, Usf2,</i>
protein acetylation	3	6	50%	1,1976E-06	2,0060E-05	<i>Irf1, Irf7, Nupr1,</i>
signal transduction	14	745	2%	1,3315E-06	2,2012E-05	<i>Arnt2, Epas1, Gata3, Gli1, Hif1a, Ncoa2, Nfkb1, Sim1, Stat1, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6,</i>
regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	5	50	10%	1,6153E-06	2,6029E-05	<i>Foxa2, Foxl2, Foxm1, Foxo1, Foxo3,</i>
myeloid cell differentiation	4	23	17%	1,9356E-06	3,0420E-05	<i>Cbfb, Cebpa, Irf8, Runx1,</i>
proximal/distal pattern formation	4	24	17%	2,3157E-06	3,5094E-05	<i>Ctnnb1, Gli1, Hoxa9, Hoxd10,</i>
release of cytochrome c from mitochondria	4	24	17%	2,3157E-06	3,5094E-05	<i>Jun, Myc, Trp53, Trp73,</i>
Peyer's patch development	3	8	38%	3,3340E-06	4,8229E-05	<i>Nkx2-3, Stat5a, Stat5b,</i>

embryonic process involved in female pregnancy	3	8	38%	3,3340E-06	4,8229E-05	<i>Junb, Sp1, Sp3,</i>
apoptotic process	11	485	2%	3,4374E-06	4,9166E-05	<i>Cdkn2a, Cttnb1, E2f1, E2f2, Ep300, Foxo1, Foxo3, Htt, Nfkb1, Trp53, Trp73,</i>
positive regulation of gene expression	7	169	4%	4,9845E-06	6,9728E-05	<i>Cttnb1, E2f1, Egr1, Nfatc2, Nr1h2, Plagl1, Trim24,</i>
regulation of apoptotic process	7	169	4%	4,9845E-06	6,9728E-05	<i>Creb1, Esr1, Hif1a, Mitf, Myc, Trim24, Trp73,</i>
positive regulation of cellular protein metabolic process	3	9	33%	4,9866E-06	6,7532E-05	<i>Nfkb1a, Nr1h2, Nr1h3,</i>
positive regulation of natural killer cell differentiation	3	9	33%	4,9866E-06	6,7532E-05	<i>Irf1, Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of triglyceride biosynthetic process	3	9	33%	4,9866E-06	6,7532E-05	<i>Nr1h2, Nr1h3, Srebf1,</i>
cell aging	4	29	14%	5,0982E-06	6,8316E-05	<i>Cdkn2a, Htt, Tbx2, Trp53,</i>
response to lipopolysaccharide	7	172	4%	5,5965E-06	7,4212E-05	<i>Cebpb, Irf3, Jun, Nfkb1a, Rela, Stat1, Stat5b,</i>
mammary gland development	4	30	13%	5,8648E-06	7,6967E-05	<i>Creb1, Hoxa9, Pgr, Stat5a,</i>
female pregnancy	5	66	8%	6,4820E-06	8,4200E-05	<i>Ets1, Irf1, Junb, Stat5a, Stat5b,</i>
T cell differentiation in thymus	4	32	13%	7,6491E-06	9,8357E-05	<i>Gata3, Rorc, Stat5a, Stat5b,</i>
cellular response to interleukin-1	4	33	12%	8,6778E-06	1,0830E-04	<i>Irf1, Klf2, Nfkb1, Rela,</i>
response to progesterone stimulus	4	33	12%	8,6778E-06	1,0830E-04	<i>Junb, Nr1h3, Rela, Srebf1,</i>
positive regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	5	71	7%	9,2975E-06	1,1491E-04	<i>Cdkn2a, Ep300, Esr1, Smarcb1, Srf,</i>

DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in transcription of p21 class mediator	3	11	27%	9,7389E-06	1,1587E-04	<i>Foxm1, Trp53, Trp73,</i>
macrophage differentiation	3	11	27%	9,7389E-06	1,1587E-04	<i>Cebpa, Nkx2-3, Sfp1,</i>
positive regulation of cholesterol efflux	3	11	27%	9,7389E-06	1,1587E-04	<i>Nfkbia, Nr1h2, Nr1h3,</i>
erythrocyte differentiation	4	35	11%	1,1037E-05	1,3009E-04	<i>Epas1, Gata3, Sfp1, Sp3,</i>
natural killer cell differentiation	3	12	25%	1,2948E-05	1,5122E-04	<i>Sp3, Stat5a, Stat5b,</i>
response to gamma radiation	4	37	11%	1,3837E-05	1,6014E-04	<i>Gata3, Myc, Trp53, Trp73,</i>
development of secondary female sexual characteristics	2	2	100%	1,5572E-05	1,7088E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
mucosal-associated lymphoid tissue development	2	2	100%	1,5572E-05	1,7088E-04	<i>Nkx2-3, Rorc,</i>
negative regulation of pinocytosis	2	2	100%	1,5572E-05	1,7088E-04	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>
regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	2	2	100%	1,5572E-05	1,7088E-04	<i>Irf1, Irf7,</i>
regulation of steroid metabolic process	2	2	100%	1,5572E-05	1,7088E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
negative regulation of gene expression	5	80	6%	1,6693E-05	1,8162E-04	<i>Esr1, Gata3, Nr1h2, Pgr, Plag1,</i>
positive regulation of fibroblast proliferation	4	39	10%	1,7129E-05	1,8479E-04	<i>E2f1, Esr1, Jun, Myc,</i>
response to glucose stimulus	5	81	6%	1,7736E-05	1,8973E-04	<i>Egr1, Ep300, Hif1a, Hnf4a, Srebfl,</i>
cell cycle arrest	5	84	6%	2,1171E-05	2,2459E-04	<i>Cdkn2a, Irf1, Irf6, Trp53, Trp73,</i>
cell differentiation	9	385	2%	2,2285E-05	2,3445E-04	<i>Cebpa, Epas1, Gli1, Hif1a, Hnf4a, Mitf, Rorc, Sim1, Smarcb1,</i>

pattern specification process	5	88	6%	2,6534E-05	2,7686E-04	<i>Foxa2, Foxl2, Foxm1, Foxo1, Foxo3,</i>
response to organic cyclic compound	6	150	4%	2,9756E-05	3,0547E-04	<i>Cttnb1, Ep300, Jun, Junb, Rela, Stat3,</i>
response to exogenous dsRNA	3	16	19%	3,2582E-05	3,3181E-04	<i>Irf3, Nfkbia, Stat1,</i>
positive regulation of neuron apoptotic process	4	47	9%	3,6257E-05	3,6631E-04	<i>Atf4, Egr1, Jun, Nr3c1,</i>
response to peptide hormone stimulus	5	94	5%	3,6490E-05	3,6576E-04	<i>Junb, Srebfl, Stat3, Stat5a, Stat5b,</i>
embryonic camera-type eye morphogenesis	3	17	18%	3,9450E-05	3,8336E-04	<i>Sp1, Sp3, Tbx2,</i>
positive regulation of erythrocyte differentiation	3	17	18%	3,9450E-05	3,8336E-04	<i>Ets1, Foxo3, Hif1a,</i>
chromatin remodeling	4	50	8%	4,6391E-05	4,4071E-04	<i>Myb, Myc, Smarca4, Smarcb1,</i>
insulin receptor signaling pathway	4	50	8%	4,6391E-05	4,4071E-04	<i>Foxo1, Foxo3, Nr1h3, Srebfl,</i>
N-terminal peptidyl-lysine acetylation	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Crebbp, Ep300,</i>
creatine metabolic process	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
development of secondary male sexual characteristics	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
glial cell fate determination	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Cttnb1, Smarca4,</i>
interferon-gamma-mediated signaling pathway	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Irf1, Stat1,</i>
negative regulation of lipid transport	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>
positive regulation of cholesterol homeostasis	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Hnf4a, Nr1h3,</i>
positive regulation of cholesterol transport	2	3	67%	4,6594E-05	4,1190E-04	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>

positive regulation of interferon-beta production	3	18	17%	4,7204E-05	4,1442E-04	<i>Irf1, Irf3, Irf7,</i>
embryonic hemopoiesis	3	19	16%	5,5894E-05	4,8403E-04	<i>Gata3, Hif1a, Runx1,</i>
lymph node development	3	19	16%	5,5894E-05	4,8403E-04	<i>Nfkb1, Nkx2-3, Rorc,</i>
response to estradiol stimulus	5	105	5%	6,2033E-05	5,3357E-04	<i>Arnt2, Esr1, Ets1, Stat3, Stat5b,</i>
response to ethanol	5	110	5%	7,7415E-05	6,5699E-04	<i>Egr1, Ep300, Stat3, Stat5a, Stat5b,</i>
allantoin metabolic process	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
blastocyst hatching	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Smarca4, Smarcb1,</i>
cellular response to dsRNA	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Irf1, Irf3,</i>
creatinine metabolic process	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
isoleucine metabolic process	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 signaling pathway	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Nfkb1a, Rela,</i>
positive regulation of histone H3-K9 methylation	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Brcal, Myb,</i>
positive regulation of lymphocyte differentiation	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
regulation of adaptive immune response	2	4	50%	9,2947E-05	7,3951E-04	<i>Irf1, Irf7,</i>
response to mechanical stimulus	4	60	7%	9,5304E-05	7,5355E-04	<i>Ets1, Jun, Junb, Rela,</i>
heart development	6	185	3%	9,5593E-05	7,5117E-04	<i>Cttnb1, Ep300, Mkl2, Ppara, Smarca4, Srf,</i>

intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	3	23	13%	1,0099E-04	7,8870E-04	<i>Ep300, Nupr1, Trp73,</i>
vasculogenesis	4	64	6%	1,2269E-04	9,5232E-04	<i>Cttnb1, Foxm1, Junb, Smarca4,</i>
gastrulation	3	26	12%	1,4699E-04	1,1272E-03	<i>Htt, Srf, Trp53,</i>
antral ovarian follicle growth	2	5	40%	1,5451E-04	1,1370E-03	<i>Esr1, Foxo3,</i>
citrate metabolic process	2	5	40%	1,5451E-04	1,1370E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
negative regulation of stress-activated MAPK cascade	2	5	40%	1,5451E-04	1,1370E-03	<i>Foxm1, Foxo1,</i>
type I interferon biosynthetic process	2	5	40%	1,5451E-04	1,1370E-03	<i>Irf3, Irf7,</i>
valine metabolic process	2	5	40%	1,5451E-04	1,1370E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
central nervous system development	4	69	6%	1,6443E-04	1,2030E-03	<i>Arnt2, Htt, Runx1, Trp53,</i>
lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	3	27	11%	1,6489E-04	1,1926E-03	<i>Irf3, Nfkb1a, Stat1,</i>
cellular response to insulin stimulus	4	70	6%	1,7387E-04	1,2505E-03	<i>Egr1, Hif1a, Srebf1, Usf1,</i>
positive regulation of multicellular organism growth	3	30	10%	2,2691E-04	1,6228E-03	<i>Creb1, Stat5a, Stat5b,</i>
enucleate erythrocyte differentiation	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Sp1, Sp3,</i>
epidermal cell differentiation	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Gli1, Hdac1,</i>
epithelial cell maturation	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Pgr, Xbp1,</i>
gland morphogenesis	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Nkx2-3, Plag1,</i>

negative regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Cdkn2a, Gata3,</i>
positive regulation of cell size	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Ep300, Trp73,</i>
positive regulation of gamma-delta T cell differentiation	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of gluconeogenesis	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Foxo1, Hnf4a,</i>
positive regulation of protein metabolic process	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Klf2, Mtpn,</i>
positive regulation of receptor biosynthetic process	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Hif1a, Nr1h3,</i>
positive regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Irf3, Irf7,</i>
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to oxidative stress	2	6	33%	2,3117E-04	1,5407E-03	<i>Epas1, Hif1a,</i>
acute-phase response	3	31	10%	2,5050E-04	1,6353E-03	<i>Cebpa, Stat3, Stat5b,</i>
pituitary gland development	3	31	10%	2,5050E-04	1,6353E-03	<i>Creb1, Ets1, Gli1,</i>
tissue development	3	31	10%	2,5050E-04	1,6353E-03	<i>Foxm1, Foxo1, Foxo3,</i>
glucose homeostasis	4	77	5%	2,5126E-04	1,6236E-03	<i>Foxo3, Hif1a, Hnf4a, Stat3,</i>
ossification	4	77	5%	2,5126E-04	1,6236E-03	<i>Chfb, Ppargc1b, Sp1, Sp3,</i>
T cell differentiation	3	32	9%	2,7563E-04	1,7456E-03	<i>Egr1, Gata3, Sp3,</i>
cellular response to hormone stimulus	3	32	9%	2,7563E-04	1,7456E-03	<i>Junb, Stat3, Stat5b,</i>
response to radiation	3	32	9%	2,7563E-04	1,7456E-03	<i>Jun, Myc, Nr3c1,</i>
aging	5	145	3%	2,8268E-04	1,7814E-03	<i>Cdkn2a, Jun, Nr3c1, Rela, Srebf1,</i>

cellular process	3	33	9%	3,0232E-04	1,8592E-03	<i>Cttnb1, Jun, Junb,</i>
negative regulation of cell cycle	3	33	9%	3,0232E-04	1,8592E-03	<i>Cdkn2a, Ets1, Nupr1,</i>
positive regulation of mesenchymal cell proliferation	3	33	9%	3,0232E-04	1,8592E-03	<i>Cttnb1, Myc, Mycn,</i>
regulation of cell adhesion	3	33	9%	3,0232E-04	1,8592E-03	<i>Srf, Stat5a, Stat5b,</i>
regulation of multicellular organism growth	3	33	9%	3,0232E-04	1,8592E-03	<i>Stat3, Stat5a, Stat5b,</i>
cellular lipid metabolic process	2	7	29%	3,2280E-04	1,9383E-03	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>
megakaryocyte differentiation	2	7	29%	3,2280E-04	1,9383E-03	<i>Sp1, Sp3,</i>
positive regulation of transcription from RNA polymerase III promoter	2	7	29%	3,2280E-04	1,9383E-03	<i>Cebpa, Foxa2,</i>
taurine metabolic process	2	7	29%	3,2280E-04	1,9383E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
response to DNA damage stimulus	5	150	3%	3,3052E-04	1,9753E-03	<i>Foxo1, Myc, Nfatc2, Trp53, Trp73,</i>
cellular response to organic substance	3	35	9%	3,6059E-04	2,1450E-03	<i>Egr1, Egr2, Stat4,</i>
B cell differentiation	3	36	8%	3,9225E-04	2,3117E-03	<i>Myb, Nkx2-3, Sp3,</i>
learning or memory	3	37	8%	4,2564E-04	2,4855E-03	<i>Egr1, Egr2, Htt,</i>
lymphocyte differentiation	2	8	25%	4,2929E-04	2,4506E-03	<i>Cbfb, Sfp1,</i>
negative regulation of erythrocyte differentiation	2	8	25%	4,2929E-04	2,4506E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of interleukin-12 biosynthetic process	2	8	25%	4,2929E-04	2,4506E-03	<i>Irf1, Rela,</i>
regulation of epithelial cell differentiation	2	8	25%	4,2929E-04	2,4506E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>

succinate metabolic process	2	8	25%	4,2929E-04	2,4506E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
response to organic substance	4	90	4%	4,5619E-04	2,5925E-03	<i>Creb1, Jun, Rela, Stat3,</i>
neuron development	3	38	8%	4,6080E-04	2,6071E-03	<i>Htt, Runx1, Trp73,</i>
regulation of cell cycle	4	91	4%	4,7573E-04	2,6797E-03	<i>E2f1, E2f2, Jun, Junb,</i>
cell maturation	3	40	8%	5,3659E-04	2,9829E-03	<i>Chfb, Cebpa, Epas1,</i>
endocrine pancreas development	3	40	8%	5,3659E-04	2,9829E-03	<i>Foxa2, Foxo1, Hnf4a,</i>
outflow tract morphogenesis	3	40	8%	5,3659E-04	2,9829E-03	<i>Hif1a, Jun, Tbx2,</i>
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Foxo3, Trp53,</i>
granulocyte differentiation	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Sfpi1, Sp3,</i>
luteinization	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of histone H3-K4 methylation	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Bracl, Myb,</i>
positive regulation of histone deacetylation	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Srebf1, Trp53,</i>
positive regulation of interferon-alpha production	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Irf3, Irf7,</i>
positive regulation of lipoprotein lipase activity	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>
regulation of fatty acid metabolic process	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Ppara, Srebf1,</i>
regulation of innate immune response	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Irf1, Irf7,</i>
response to laminar fluid shear stress	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Ets1, Klf2,</i>
response to muramyl dipeptide	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Nfkbia, Rela,</i>

urea cycle	2	9	22%	5,5052E-04	2,8959E-03	<i>Cebpa, Htt,</i>
cell growth	3	41	7%	5,7730E-04	2,9996E-03	<i>Esr1, Mtpn, Nupr1,</i>
embryonic skeletal system development	3	41	7%	5,7730E-04	2,9996E-03	<i>Hoxa9, Sp1, Sp3,</i>
mitochondrion organization	3	41	7%	5,7730E-04	2,9996E-03	<i>Cebpa, Epas1, Htt,</i>
cellular response to tumor necrosis factor	3	42	7%	6,1993E-04	3,2080E-03	<i>Irf1, Klf2, Rela,</i>
negative regulation of neuron apoptotic process	4	98	4%	6,2957E-04	3,2447E-03	<i>Hif1a, Htt, Jun, Trp73,</i>
cellular response to estrogen stimulus	2	10	20%	6,8637E-04	3,4265E-03	<i>Esr1, Trim24,</i>
mammary gland epithelial cell proliferation	2	10	20%	6,8637E-04	3,4265E-03	<i>Cebpb, Stat6,</i>
mitotic cell cycle G1/S transition DNA damage checkpoint	2	10	20%	6,8637E-04	3,4265E-03	<i>Trp53, Trp73,</i>
ovulation from ovarian follicle	2	10	20%	6,8637E-04	3,4265E-03	<i>Foxo3, Pgr,</i>
oxaloacetate metabolic process	2	10	20%	6,8637E-04	3,4265E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
neuron differentiation	4	101	4%	7,0521E-04	3,5067E-03	<i>Cebpb, Gata3, Hdac1, Runx1,</i>
mammary gland epithelial cell differentiation	2	11	18%	8,3673E-04	4,0347E-03	<i>Cebpb, Irf6,</i>
positive regulation of B cell differentiation	2	11	18%	8,3673E-04	4,0347E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of oligodendrocyte differentiation	2	11	18%	8,3673E-04	4,0347E-03	<i>Hdac1, Trp73,</i>
rRNA transcription	2	11	18%	8,3673E-04	4,0347E-03	<i>Cdkn2a, Trp53,</i>
embryonic digit morphogenesis	3	48	6%	9,1811E-04	4,4104E-03	<i>Hdac1, Mycn, Tbx2,</i>

positive regulation of cellular component movement	2	12	17%	1,0015E-03	4,7044E-03	<i>Ets1, Stat5b,</i>
positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	2	12	17%	1,0015E-03	4,7044E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
dorsal/ventral pattern formation	3	50	6%	1,0345E-03	4,8238E-03	<i>Ctnnb1, Foxa2, Gli1,</i>
fat cell differentiation	3	50	6%	1,0345E-03	4,8238E-03	<i>Cebpa, Cebpb, Egr2,</i>
hippocampus development	3	52	6%	1,1598E-03	5,3687E-03	<i>Hdac1, Srf, Trp73,</i>
determination of adult lifespan	2	13	15%	1,1805E-03	5,4450E-03	<i>Htt, Trp53,</i>
embryo development	4	117	3%	1,2204E-03	5,6084E-03	<i>Foxm1, Foxo1, Foxo3, Htt,</i>
negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	3	53	6%	1,2259E-03	5,5933E-03	<i>Esr1, Foxa2, Hnf4a,</i>
protein complex assembly	3	53	6%	1,2259E-03	5,5933E-03	<i>Mitf, Nupr1, Trp53,</i>
anterior/posterior pattern specification	4	119	3%	1,2993E-03	5,9072E-03	<i>Foxa2, Hoxa9, Hoxd10, Htt,</i>
cell fate determination	2	14	14%	1,3737E-03	6,1576E-03	<i>Ctnnb1, Gata3,</i>
monocyte differentiation	2	14	14%	1,3737E-03	6,1576E-03	<i>Jun, Sp3,</i>
muscle cell homeostasis	2	14	14%	1,3737E-03	6,1576E-03	<i>Hif1a, Srf,</i>
triglyceride homeostasis	2	14	14%	1,3737E-03	6,1576E-03	<i>Hnf4a, Nr1h3,</i>
cardiac muscle tissue development	2	15	13%	1,5810E-03	6,9640E-03	<i>Mkl2, Tbx2,</i>
negative regulation of proteolysis	2	15	13%	1,5810E-03	6,9640E-03	<i>Nr1h2, Nr1h3,</i>
positive regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity	2	15	13%	1,5810E-03	6,9640E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
sex differentiation	2	15	13%	1,5810E-03	6,9640E-03	<i>Hnf4a, Stat5b,</i>

cellular response to mechanical stimulus	3	58	5%	1,5918E-03	6,9633E-03	<i>Egr1, Irf1, Nfkb1,</i>
osteoblast differentiation	3	58	5%	1,5918E-03	6,9633E-03	<i>Cbfb, Gli1, Junb,</i>
circadian rhythm	3	59	5%	1,6723E-03	7,2904E-03	<i>Egr1, Jun, Nr3c1,</i>
positive regulation of apoptotic process	5	219	2%	1,8095E-03	7,8350E-03	<i>Foxl2, Jun, Myc, Nupr1, Trp73,</i>
fatty acid metabolic process	3	61	5%	1,8408E-03	7,9435E-03	<i>Ppara, Stat5a, Stat5b,</i>
2-oxoglutarate metabolic process	2	17	12%	2,0372E-03	8,6736E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
T cell homeostasis	2	17	12%	2,0372E-03	8,6736E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
anatomical structure morphogenesis	2	17	12%	2,0372E-03	8,6736E-03	<i>Foxa2, Htt,</i>
apoptotic DNA fragmentation	2	17	12%	2,0372E-03	8,6736E-03	<i>Foxl2, Myc,</i>
glucose metabolic process	3	64	5%	2,1129E-03	8,9357E-03	<i>Myc, Ppara, Usf1,</i>
transforming growth factor beta receptor signaling pathway	3	64	5%	2,1129E-03	8,9357E-03	<i>Creb1, Jun, Trp53,</i>
lipid storage	2	18	11%	2,2860E-03	9,4790E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
positive regulation of activated T cell proliferation	2	18	11%	2,2860E-03	9,4790E-03	<i>Stat5a, Stat5b,</i>
protein import into nucleus, translocation	2	18	11%	2,2860E-03	9,4790E-03	<i>Nfkbia, Trp53,</i>
signal transduction involved in regulation of gene expression	2	18	11%	2,2860E-03	9,4790E-03	<i>Foxa2, Hnf4a,</i>
smooth muscle cell differentiation	2	18	11%	2,2860E-03	9,4790E-03	<i>Mkl1, Mkl2,</i>

List of all GO-terms (biological processes) enriched using InnateDB for the 88 non-redundant regulators identified by Ingenuity Pathway Analysis.

Table 3.S5. List of biological processes significantly enriched within differentially expressed gene clusters

Cluster	GO term [biological process]	Number of genes	Number of genes in InnateDB	Ratio	GO term p-value	GO term p-value (corrected)	Gene Symbols
#1	innate immune response	72	592	12%	2,5E-11	1,7E-08	<i>Axl, Bcl10, Birc2, Clqa, Clrl, C2, Casp1, Casp7, Cd180, Cd300lf, Chuk, Cltc, Cnot4, Cxcl2, Daglb, Dok3, Dusp10, Elf1, Erbb2ip, Fcgr1, Fer, Gata6, Gbp2, Hsp90b1, Ifnb1, Il12a, Il18rap, Il1rl1, Ip6k1, Isg20, Itgam, Lrrfp2, Map3k5, Masp2, Msr1, Mucl, Nfatc4, Nhrp3, Ntn1, P2rx7, P2ry14, Pacsin1, Prkcd, Ptx3, Pura, Rad23a, Rb1, Rela, Rhdj2, Ripk2, Rnasel, Serpinb9, Siglec1, Siglech, Stim1, Tank, Tax1bp1, Tbk1, Thbs1, Tirap, Tlr12, Tlr3, Tlr7, Tmed7, Tnfaip3, Traf6, Trib3, Trim21, Trim56, Xiap, Zc3hav1, Zfpml,</i>
#1	protein phosphorylation	69	607	11%	1,2E-09	6,3E-07	<i>Acvr1l, Akt2, Akt3, Alpk1, Atm, Aurka, Aurkb, Axl, Blk, Camk1d, Cend1, Ccnh, Cdc25b, Cdk1, Cdk12, Cdk14, Chuk, Csk, Dapk1, Dmpk, Eph2, Erbb2, Fer, Fes, Fgfr1, Fyn, Glyctk, Jak1, Kit, Lats1, Maml1, Map2k1, Map3k5, Map4k4, Mapk9, Mastl, Mkl, More3, Nek2, Npr1, P2rx7, Pak1, Pdgfra, Prkacb, Prkcd, Prckq, Prkd3, Prkx, Ptk2b, Ptk6, Ripk2, Rnasel, Rock1, Rps6ka2, Ryk, Sgk1, Sgk3, Silk, Taok3, Tbk1, Tlk2, Trib3, Trio, Trpm6, Ttk, Uhmk1, Ulk3, Vrk1, Wnt11,</i>
#1	cell division	40	274	15%	4,4E-09	1,8E-06	<i>Anape5, Ankle2, Aurka, Birc6, Ccdc99, Ccnb2, Cend1, Cd2ap, Cdc25b, Cdk1, Cdk14, Ensa, Ist1, Kif11, Kif20b, Kntc1, Lats1, Mastl, Mcm5, Mtap4, Ncapd2, Ncaph, Nek2, Nuf2, Pex1, Ppp2r2d, Rb1, Rgs14, Rnf8, Seh11, Sgol2, Spag5, Spc24, Spc25, Stag2, Sycp2, Tpx2, Vps4b, Vrk1, Zw10,</i>
#1	carbohydrate metabolic process	27	179	15%	7,3E-07	2,0E-04	<i>Amdhd2, B4galt4, B4galt6, Fuca2, Galc, Gba, Gbe1, Gck, Gusb, Hexb, Hhip, Hk1, Hk3, Hpse, Ldha, Mgat4a, Naga, Parg, Pgp, Ugt1a1, Ugt1a10, Ugt1a2, Ugt1a5, Ugt1a6a, Ugt1a6b, Ugt1a7c, Ugt1a9,</i>
#1	mitosis	28	202	14%	2,6E-06	6,1E-04	<i>Anape5, Ankle2, Aurka, Birc6, Ccnb2, Cd2ap, Cdc25b, Cdk1, Cltc, Ensa, Kif20b, Kntc1, Lats1, Map2k1, Mastl, Ncapd2, Nuf2, Ppp2r2d, Rgs14, Rnf8, Spc24, Spc25, Stag2, Tpx2, Tyh1, Vcpipl, Vrk1, Zw10,</i>
#1	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	20	117	17%	2,8E-06	6,3E-04	<i>Atp2c1, Bcl10, Birc2, Cant1, Casp1, Chuk, Plekhg5, Rela, Rhoc, Ripk2, Tbk1, Tfg, Tgm2, Tirap, Tlr3, Tnfsf10, Traf6, Trim13, Zc3hav1, Zdhhc17,</i>
#1	negative regulation of apoptotic process	46	426	11%	3,0E-06	6,1E-04	<i>Ada, Akt2, Apbb2, Arhgap10, Atm, Axl, Bfar, Birc2, Birc6, Btg2, Cdk1, Cln3, Dapk1, Egr3, Erbb2, Fgfr1, Figl1, Gata6, Gclc, Hgf, Hsp90b1, Htt, Mccl1, Mdm2, Mitf, Mt3, Nckap1l, Pea15a, Phip, Por, Psm10, Ptk2b, Rela, Serpinb9, Sgk3, Sh3glb1, Sirt1, Smad3, Syvnl, Tax1bp1, Thbs1, Tmbim6, Tnfaip3, Tsc22d1, Wnt11, Xiap,</i>
#1	microtubule-based movement	16	87	18%	1,0E-05	1,9E-03	<i>Actr10, Cenpe, Dnahc2, Dnahc6, Dync1h1, Dync1i2, Kif11, Kif13a, Kif14, Kif1a, Kif1c, Kif20b, Kif23, Kif5b, Kifc5b, Tubal1b,</i>

#1	signal transduction	67	745	9%	1,2E-05	2,1E-03	<i>Acvr11, Akt3, Apbb1ip, Arap2, Arhgap10, Arhgap12, Arhgap21, Atp2c1, Baiap2, Cant1, Cd34, Cxcr2, Dapk1, Depdc1a, Erbb2, Fer, Grb10, Hhip, Icosl, Il18rap, Il1r11, Iqgap2, Iqgap3, Mlt4, Ncoa1, P2rx4, Pacsin1, Pde11a, Pde2a, Pde4b, Pde7b, Per1, Plcd3, Plxna1, Ppap2a, Ppp2r2a, Ppp2r2d, Ppp2r5e, Rab19, Rab21, Rab38, Rab44, Rala, Rap1a, Rap1b, Rassf8, Rerg, Rgs14, Rhoc, Rock1, Sav1, Sh3glb1, Snx27, Srgap2, Srgap3, Syde2, Tagap, Tfg, Tirap, Tlr12, Tlr3, Tlr7, Traf6, Traip, Trim13, Wnt11, Zdhhc17,</i>
#1	response to drug	39	358	11%	1,3E-05	2,3E-03	<i>Adam17, Arg1, Blmh, Calr, Casp1, Cend1, Cdk1, Chuk, Cpt1a, Erbb2, Fyn, Gata6, Ggh, Itgb1, Junb, Lipe, Maob, Mapk9, Mdm2, Neckap11, P2rx7, Por, Ppat, Prkcd, Ptk2b, Rad54l, Rela, Rhoc, Rpn2, Slc6a4, Slc8a1, Snx27, Taf1, Tgjf1, Thbs1, Top2a, Ugt1a1, Vav3, Xpo1,</i>
#1	metabolic process	50	522	10%	3,1E-05	4,5E-03	<i>Acad11, Accs1, Agpat6, Agpat9, Aldh1b1, Aldh1l2, Atp10a, Atp11b, Atp13a2, Atp13a3, Atp2c1, Bckdhb, Cad, Carm1, Cdyl, Cpm, Dhrs9, Dip2c, Ehd3c, Enpp4, Ermp1, Eya3, Galns, Hadhb, Hsd17b12, Isoc1, Lipe, Mettl6, Mmp13, Mmp14, Mmp8, Nadk, Nmr11, Pcca, Pde2a, Pdxp, Pgp, Pld4, Ppat, Rdh11, Slc27a1, Tpt1, Ugt1a1, Ugt1a10, Ugt1a2, Ugt1a5, Ugt1a6a, Ugt1a6b, Ugt1a7c, Ugt1a9,</i>
#1	positive regulation of chemokine production	6	14	43%	4,3E-05	5,5E-03	<i>Adam17, Adora2b, Mapk9, Ripk2, Tlr3, Tlr7,</i>
#1	lipid glycosylation	8	27	30%	5,1E-05	6,1E-03	<i>Ugt1a1, Ugt1a10, Ugt1a2, Ugt1a5, Ugt1a6a, Ugt1a6b, Ugt1a7c, Ugt1a9,</i>
#1	osteoclast differentiation	7	21	33%	6,5E-05	6,6E-03	<i>Cd300lf, Chuk, Epha2, Junb, Mitf, Ostml, Traf6,</i>
#1	protein complex assembly	11	53	21%	7,9E-05	7,5E-03	<i>Cdk1, Mdm2, Mitf, Neckap11, Pak1, Stx4a, Traf6, Vamp8, Whamm, Zfp148, Zw10,</i>
#1	histone mRNA catabolic process	5	10	50%	7,9E-05	7,2E-03	<i>Atm, Dep2, Exosc10, Papd4, Xrn1,</i>
#1	vesicle transport along microtubule	5	10	50%	7,9E-05	7,2E-03	<i>Cln3, Htt, Kif5b, Map2k1, Ndell1,</i>
#1	protein autophosphorylation	20	147	14%	8,7E-05	7,7E-03	<i>Atm, Cdk12, Csk, Erbb2, Fer, Fes, Fgfr1, Fyn, Kit, Nek2, Pak1, Pdgfra, Prkcd, Prkx, Ptk6, Slk, Taok3, Uhmkl, Ulk3, Vrk1,</i>
#1	response to DNA damage stimulus	20	150	13%	1,2E-04	9,2E-03	<i>Atad5, Atm, Blm, Btg2, Cend1, Kin, Mastl, Parg, Rad23a, Rad54l, Rnf8, Sgk1, Sirt1, Spdya, Taok3, Tlk2, Top2a, Usp28, Vav3, Wac,</i>
#1	actin cytoskeleton reorganization	9	38	24%	1,2E-04	9,2E-03	<i>Atp2c1, Dmpk, Fer, Kit, Pak1, Parvb, Plek, Ptpn1, Rala,</i>
#1	protein dephosphorylation	18	128	14%	1,3E-04	9,3E-03	<i>Cdc25b, Dusp10, Dusp19, Dusp28, Dusp3, Eya3, Mtm1, Pdxp, Ppap2a, Ppm1b, Ppp2r2a, Ppp6c, Ptp4a2, Ptpn1, Ptpn23, Ptpn6, Ptpnf, Ptpro,</i>
#1	pathogenesis	3	3	100%	1,4E-04	1,0E-02	<i>Carm1, Mecp2, Pcca,</i>
#1	regulation of lipid kinase activity	3	3	100%	1,4E-04	1,0E-02	<i>Rb1, Rbl1, Rbl2,</i>
#1	integrin-mediated signaling pathway	12	66	18%	1,5E-04	1,0E-02	<i>Adam17, Adamts14, Gab2, Itga2b, Itga4, Itgam, Itgb1, Itgb3, Plek, Ptk2b, Vav1, Vav3,</i>

#1	response to hypoxia	24	204	12%	1,9E-04	1,3E-02	<i>Actn4, Ada, Adam17, Adm, Atm, Casp1, Egl3, Hmox2, Hsp90b1, Iptr2, Mecp2, Mmp13, Mmp14, Mt3, Pak1, Prkcd, Prkcq, Ptk2b, Rhoc, Ryr1, Scfd1, Slc6a4, Slc8a1, Smad3,</i>
#1	cell surface receptor signaling pathway	18	133	14%	2,1E-04	1,4E-02	<i>Btla, Cxcr2, Cysl1r1, Emr4, Erbb2, Fcgr1, Fyn, Fzd5, Gpr114, Itpkb, Khdrb1, Lag3, Npr1, P2rx7, Ptk2b, Spn, Tirap, Unc50,</i>
#1	positive regulation of apoptotic process	25	219	11%	2,2E-04	1,4E-02	<i>Apbb2, Atm, Dapk1, Fam162a, Gata6, Gpld1, Itgb1, Map3k5, Mapk9, Ncoa1, Net1, Nfatc4, Notch2, P2rx7, Prkcd, Rest, Ripk2, Rps6ka2, Sav1, Sirt1, Tlr3, Tnfrsf10, Top2a, Tsc22d1, Wnt11,</i>
#1	protein localization to kinetochore	4	7	57%	2,3E-04	1,5E-02	<i>Aurkb, Ccdc99, Cdk1, Zw10,</i>
#1	response to organic substance	14	90	16%	2,4E-04	1,5E-02	<i>Adm, Btg2, Calr, Car2, Ccnd1, Chuk, Dusp10, Fads1, Mapk9, P2rx7, Pak1, Rela, Slc6a4, Ugt1a1,</i>
#1	protein autoubiquitination	8	33	24%	2,4E-04	1,5E-02	<i>Cnot4, Rchy1, Rnf115, Rnf8, Traf6, Trim13, Trim21, Trim37,</i>
#1	response to mechanical stimulus	11	60	18%	2,5E-04	1,5E-02	<i>Btg2, Junb, Jund, Mapk9, Mmp13, Mmp14, P2rx7, Prkcd, Ptk2b, Rela, Rhoc,</i>
#1	regulation of cell cycle	14	91	15%	2,7E-04	1,6E-02	<i>Adarb1, Atm, Birc2, Ccnb2, Ccnd1, Ccnh, Fignl1, Gadd45g, Itgb1, Junb, Mastl, Rb1, Rbl1, Rbl2,</i>
#1	neuromuscular junction development	7	27	26%	3,8E-04	2,1E-02	<i>Afg3l2, Cacna2d2, Dok7, Erbb2, Pak1, Snta1, Unc13b,</i>
#1	cell cycle arrest	13	84	15%	4,1E-04	2,2E-02	<i>Apbb2, Atm, Calr, Cgrrf1, Dst, Il12a, Map2k1, Notch2, Rb1, Skil, Smad3, Thbs1, Uhmk1,</i>
#1	chromatin assembly or disassembly	4	8	50%	4,4E-04	2,3E-02	<i>Actl6b, Asf1b, Chd1, Smarca5,</i>
#1	positive regulation of neuron projection development	10	55	18%	5,1E-04	2,5E-02	<i>Camk1d, Fes, Fgfr1, Fyn, Itgb1, Ptk2b, Ptk6, Scarf1, Serpine2, Twf2,</i>
#1	cellular response to drug	8	38	21%	6,7E-04	3,1E-02	<i>Cad, Gpld1, Mt3, Pde2a, Pde4b, Ppat, Rest, Tlr3,</i>
#1	leukocyte cell-cell adhesion	6	22	27%	7,4E-04	3,4E-02	<i>Ezr, Itga4, Itgam, Itgb1, Msn, Rock1,</i>
#1	intracellular signal transduction	27	266	10%	8,2E-04	3,5E-02	<i>Arhgef11, Arhgef3, Asb13, Cnih4, Csk, Depdc1a, Dgkh, Dgkz, Gab2, Gucyl1a3, Net1, Npr1, Pea15a, Plcd3, Plek, Plekhm3, Prkcd, Prkcq, Prkd3, Ptpn6, Rock1, Sh3bp5, Tlk2, Twf2, Unc13b, Vav1, Vav3,</i>
#1	positive regulation of cell migration	15	113	13%	8,3E-04	3,5E-02	<i>Adam17, Akt2, Fer, Furin, Itgb1, Itgb3, Map2k1, Mmp14, Pdgfra, Ptk2b, Rhoc, Sema4d, Smad3, Thbs1, Wnt11,</i>
#1	protein transport	41	468	9%	9,5E-04	4,0E-02	<i>Actn4, Afipb, Arf4, Arl1, Arrb1, Atg3, Birc6, Cenpf, D1Ert622e, Mtm1, Rab19, Rab21, Rab38, Rab3ip, Rab44, Rala, Ramp3, Ranbp2, Rap1a, Rap1b, Rerg, Rhdhf2, Rhoc, Scfd1, Sec16b, Sec63, Seh1l, Slc15a3, Snf8, Snx27, Stxbp1, Tmed1, Tmed5, Tram2, Unc50, Vps13a, Vps29, Vps37a, Vps4b, Vps54, Zw10,</i>

#1	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	6	23	26%	9,6E-04	4,0E-02	<i>Azi2, Bcl10, Ripk2, Tank, Tirap, Traf6,</i>
#1	ceramide biosynthetic process	5	16	31%	1,1E-03	4,3E-02	<i>Agk, Degs2, Gba, P2rx7, Sptlc2,</i>
#1	negative regulation of NF-kappaB transcription factor activity	9	51	18%	1,2E-03	4,8E-02	<i>Arrb1, Nlrp3, Psm10, Sirt1, Tax1bp1, Tnfrsf25, Trim21, Trim37, Usp7,</i>
#1	receptor internalization	6	24	25%	1,2E-03	4,8E-02	<i>Adm, Cltc, Cxcr2, Grb2, Mmp13, Ramp3,</i>
#1	negative regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	4	10	40%	1,2E-03	4,8E-02	<i>Errfi1, Prkcd, Ptpn6, Sema4d,</i>
#1	response to amine stimulus	4	10	40%	1,2E-03	4,8E-02	<i>Arg1, Cad, Cdk1, Mapk9,</i>
#1	DNA replication, synthesis of RNA primer	3	5	60%	1,3E-03	4,8E-02	<i>Helb, Pola1, Prim1,</i>
#1	intestinal epithelial cell differentiation	3	5	60%	1,3E-03	4,8E-02	<i>Gata6, Ptk6, Sav1,</i>
#1	membrane to membrane docking	3	5	60%	1,3E-03	4,8E-02	<i>Ezr, Msn, Rock1,</i>
#1	negative regulation of necrotic cell death	3	5	60%	1,3E-03	4,8E-02	<i>Cd34, Fth1, Mt3,</i>
#1	retrograde axon cargo transport	3	5	60%	1,3E-03	4,8E-02	<i>Dst, Mgarp, Ndel1,</i>
#1	response to toxin	12	84	14%	1,4E-03	5,0E-02	<i>Blmh, Casp1, Cdk1, Chuk, Cnp, Gata6, Maob, Mapk9, Mdm2, Scfd1, Slc6a4, Trpm6,</i>
#2	protein localization to nucleus	4	27	15%	1,0E-04	3,2E-02	<i>Hhex, Syne2, Tmem188, Tor1aip1,</i>
#2	peptidyl-tyrosine phosphorylation	5	57	9%	1,8E-04	4,3E-02	<i>Abl2, Clk4, Flt4, Jak2, Stat5a,</i>
#3	transcription, DNA-dependent	72	1364	5%	9,2E-08	3,9E-05	<i>A930001N09Rik, Arid3a, Ash1l, Batf, Bbx, Bclaf1, Brwd1, Chaf1a, Chaf1b, Cir1, Cnbp, Creb3l2, Creb3l4, Crebzf, Dnajc2, E2f6, E4f1, Elf2, Ets6, Gtf3c4, Hnrpd1, Hsf1, Htatsf1, Irf2bp1, Kdm4a, Klf16, Klf6, Limd1, Maf1, Mafg, Mak, Mcts2, Mnt, Morf4l1, Mterfd1, Mynn, Mysm1, Nfx1, Nrfl, Pbx2, Pcgf6, Phf3, Phf8, Phf2, Pou2af1, Rbm15b, Rcor3, Relb, Rlim, Smad2, Ss18, Sub1, Taf5l, Tcea3, Thap11, Thoc1, Uhrf1, Wasl, Zbtb42, Zbtb43, Zbtb44, Zbtb7a, Zfp161, Zfp174, Zfp191, Zfp27, Zfp326, Zfp652, Zkscan1, Zkscan14, Zmym2, Zxdc,</i>
#4	None						

#5	protein transport	30	468	6%	7,35E-06	3,36E-03	<i>2610002M06Rik, Abcb9, Aktip, Arfgap2, Arl8a, Arl8b, Chmp2b, Chmp3, Gopc, Hook1, Kdelr2, Lin7c, Lman1, Nras, Pdc6ip, Pkac, Rab1, Rab10, Rab18, Rab5a, Rhoa, Rnd2, Senp2, Serp1, Sil1, Snap29, Snx10, Snx25, Vps26a, Vps37b,</i>
#6	innate immune response	47	592	8%	7,53E-15	1,83E-11	<i>Al607873, Ace, Ace2, Adrb2, Akirin2, Cav1, Ccr6, Cdc42, Clec4a2, Ctss, Cxcl9, Eif4e, Fcna, Fstl1, Hck, Ifih1, Ifit1, Ifit2, Il12b, Il1b, Il33, Irgm1, Isg15, Lst1, Mapkapk2, Mif, Mmp9, Mx2, Naip2, Neu1, Nfil3, Nfkb1, Nr3c1, Oas1c, Oas1l, Pla2g4a, Pml, Ppp3r1, Ripk3, Rsad2, Samhd1, Sdc4, Serpinb2, Tlr8, Tlr9, Tnfsf4, Trim25,</i>
#6	immune response	22	222	10%	2,35E-09	2,85E-06	<i>Ccl12, Ccl22, Ccl5, Ccl7, Cd70, Cxcl9, H2-M2, H2-T10, H2-T22, Il1b, Lst1, Lta, March1, Mr1, Oas1c, Oas1l, Tgfb3, Tlr9, Tnfrsf1b, Tnfsf14, Tnfsf15, Tnfsf4,</i>
#6	inflammatory response	19	209	9%	1,16E-07	7,04E-05	<i>Ccl12, Ccl22, Ccl5, Ccl7, Ccr12, Cxcl9, Ggt5, Hck, Il1b, Lta, Mapkapk2, Mif, Ms4a2, Naip2, Smad1, Tlr8, Tlr9, Tnfrsf1b, Tnfsf4,</i>
#6	response to virus	12	83	14%	1,77E-07	8,62E-05	<i>Ace2, Ccl5, Dclk1, Ifih1, Ifit1, Ifit2, Mx2, Oas1l, Rsad2, Tlr8, Tlr9, Tnfsf4,</i>
#6	response to hypoxia	18	204	9%	3,89E-07	1,58E-04	<i>Ace, Aldoc, Cav1, Fas, Il1b, Lta, Mmp9, Nppc, Nr4a2, Pgf, Plat, Plod2, Pml, Raf1, Slc11a2, Tgfb2, Tgfb3, Tgfb3,</i>
#6	negative regulation of cell proliferation	21	283	7%	7,69E-07	2,67E-04	<i>I190002H23Rik, Adora2a, Bcl6, Cav1, E2f7, Ereg, Fgfr3, Il1b, Jarid2, Npm1, Nppc, Pml, Ptpnj, Raf1, Scin, Sfn, Slfn2, Smad1, Tgfb2, Tgfb3, Timp2,</i>
#6	defense response to virus	13	123	11%	2,18E-06	6,63E-04	<i>Cxcl9, Ifih1, Ifit1, Il12b, Isg15, Mx2, Oas1l, Pml, Rsad2, Samhd1, Tlr8, Tlr9, Trim25,</i>
#6	positive regulation of protein kinase activity	8	49	16%	8,07E-06	1,78E-03	<i>I190002H23Rik, Als2, Cdk5r1, Ereg, Npm1, Nrg1, Sdc4, Tom1l1,</i>
#6	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage response	5	18	28%	2,86E-05	5,34E-03	<i>Chek2, Msh6, Pml, Sfn, Topors,</i>
#6	coenzyme A biosynthetic process	4	10	40%	3,78E-05	6,56E-03	<i>Dcald, Pank1, Pank4, Uck2,</i>
#6	cellular response to interferon-beta	5	19	26%	3,81E-05	6,17E-03	<i>Gbp3, Ifi203, Ifi205, Ifit1, Trex1,</i>
#6	MAPK cascade	8	62	13%	4,76E-05	6,80E-03	<i>Cav1, Ccl5, Fgfr3, Il1b, Map2k4, Nrg1, Raf1, Smad1,</i>
#6	positive regulation of apoptotic process	15	219	7%	7,27E-05	9,29E-03	<i>Ace, Adrb2, Bard1, Bcl6, Fas, Fgfr3, Ifit2, Il1b, Lta, Mmp9, Pla2g4a, Pou4f1, Scin, Tgfb3, Tnfrsf8,</i>
#6	protein localization	8	67	12%	8,37E-05	1,02E-02	<i>Als2, Bcl6, Cav1, Hap1, Imp2l, Lrba, Mapk8ip3, Npm1,</i>
#6	positive regulation of interleukin-6 production	6	35	17%	8,46E-05	9,79E-03	<i>Akirin2, Fcer1g, Il1b, Il33, Tlr9, Tnfsf4,</i>
#6	signal transduction	32	745	4%	1,38E-04	1,39E-02	<i>Arhgap17, Cdc42, Fas, Fcer1g, Fcna, Fnbp1l, Gem, Kcnp3, Lrba, Ms4a2, Nfkb1, Nfkbib, Omp, Per2, Pilra, Plcb3, Plxnb3, Rab12, Rab20, Rab32, Rab33b, Rab8b, Raf1, Rap2a, Rasa4, Rasip1, Rgl2, Srgap1, Siat2, Tlr8, Tlr9, Vapa,</i>
#6	cell growth	6	41	15%	2,11E-04	1,89E-02	<i>Mmp9, Mtpn, Npm1, Tgfb2, Tgfb3, Tgfb3,</i>

#6	wound healing	8	78	10%	2,46E-04	2,06E-02	<i>Adrb2, Elk3, Il1b, Plat, Serpinb2, Smad1, Tgfb2, Tgfb3,</i>
#6	positive regulation of fever generation	3	7	43%	3,11E-04	2,36E-02	<i>Ccl5, Il1b, Pla2g4a,</i>
#6	cell death	6	45	13%	3,55E-04	2,54E-02	<i>Als2, Pnpla8, Rraga, Tgfb2, Tnfrsf1b, Vapa,</i>
#6	negative regulation of viral genome replication	4	17	24%	3,81E-04	2,57E-02	<i>Ccl5, Mx2, Oasl1, Rsad2,</i>
#6	positive regulation of interleukin-10 production	4	17	24%	3,81E-04	2,57E-02	<i>Fcer1g, Il12b, Tlr9, Tnfsf4,</i>
#6	response to organic nitrogen	6	46	13%	4,01E-04	2,63E-02	<i>Aldoc, Il1b, Mgst1, Pla2g4a, Smad1, Tgfb2,</i>
#6	dendrite regeneration	2	2	100%	4,48E-04	2,66E-02	<i>Fas, Matn2,</i>
#6	habenula development	2	2	100%	4,48E-04	2,66E-02	<i>Nr4a2, Pou4f1,</i>
#6	positive regulation of macrophage fusion	2	2	100%	4,48E-04	2,66E-02	<i>Adam9, Dcstamp,</i>
#6	regulation of cell proliferation	10	131	8%	4,89E-04	2,83E-02	<i>Bcl6, Fas, Jarid2, Mif, Nr3c1, Pla2g4a, Ptger2, Sat1, Tcf7, Topors,</i>
#6	cellular response to interferon-alpha	3	8	38%	4,89E-04	2,70E-02	<i>I830012O16Rik, Ifit1, Ifit2,</i>
#6	glial cell migration	3	8	38%	4,89E-04	2,70E-02	<i>Epha4, Matn2, Tgfb2,</i>
#6	positive chemotaxis	4	19	21%	6,00E-04	3,24E-02	<i>Ccl5, Mif, Ptpnj, Vegfb,</i>
#6	positive regulation of cell adhesion	5	33	15%	6,09E-04	3,22E-02	<i>Ccl5, Dab2, Il12b, Nrg1, Ptpnj,</i>
#6	SMAD protein import into nucleus	3	9	33%	7,23E-04	3,44E-02	<i>Pml, Tgfb2, Tgfb3,</i>
#6	positive regulation of macrophage chemotaxis	3	9	33%	7,23E-04	3,44E-02	<i>Ccl5, Cmkrl1, Ptpnj,</i>
#6	regulation of Rho GTPase activity	3	9	33%	7,23E-04	3,44E-02	<i>Bcl6, Epha4, Rasip1,</i>
#6	ribosomal large subunit biogenesis	3	9	33%	7,23E-04	3,44E-02	<i>Npm1, Rpl5, Rpl7,</i>
#6	positive regulation of defense response to virus by host	3	10	30%	1,02E-03	4,75E-02	<i>Ccl5, Il12b, Pml,</i>
#6	neurogenesis	5	37	14%	1,04E-03	4,69E-02	<i>Lhx2, Omp, Prdm8, Psen1, Tcf7,</i>

#6	response to gamma radiation	5	37	14%	1,04E-03	4,69E-02	<i>Cav1, Ccl7, Chek2, Il1b, Pml,</i>
#6	aging	10	145	7%	1,08E-03	4,75E-02	<i>Ace, Aldoc, Ccl5, Fas, Il1b, Nr3c1, Pla2g4a, Tgfb2, Tgfb3, Timp2,</i>
#6	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	4	22	18%	1,08E-03	4,67E-02	<i>1190002H23Rik, Dab2, Tgfb2, Tgfb3,</i>
#6	response to lipopolysaccharide	11	172	6%	1,15E-03	4,88E-02	<i>Ace, Akirin2, Fas, Il1b, Lta, Mapkapk2, Mgst1, Mmp9, Pla2g4a, Ptger2, Tnfrsf1b,</i>
#6	homeostatic process	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Mpv17, Smad1,</i>
#6	menstrual cycle phase	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Tgfb2, Tgfb3,</i>
#6	neutrophil activation involved in immune response	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Fcer1g, Tyrobp,</i>
#6	positive regulation of cellular biosynthetic process	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Ccl5, Npm1,</i>
#6	positive regulation of type I hypersensitivity	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Fcer1g, Fcgr3,</i>
#6	positive regulation of type III hypersensitivity	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Fcer1g, Fcgr3,</i>
#6	regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	2	3	67%	1,33E-03	4,88E-02	<i>Npm1, Setd8,</i>
#6	positive regulation of cell proliferation	17	349	5%	1,36E-03	4,92E-02	<i>Adrb2, Akirin2, Ereg, Fgfr3, Hck, Hilpda, Il31ra, Klf5, Lta, Marcks11, Mta3, Npm1, Pgf, Pla2g4a, Rasip1, Rps4x, Tgfb2,</i>
#6	central nervous system projection neuron axonogenesis	3	11	27%	1,38E-03	4,84E-02	<i>Dclk1, Nr4a2, Prdm8,</i>
#6	ovulation	3	11	27%	1,38E-03	4,84E-02	<i>Ereg, Il1b, Immp2l,</i>
#6	cellular response to mechanical stimulus	6	58	10%	1,40E-03	4,86E-02	<i>Fas, Map2k4, Nfkb1, Tlr8, Tnfrsf8, Tnfsf14,</i>
#7	innate immune response	61	592	10%	2,13E-21	5,69E-18	<i>Abca1, Aim2, Bst2, C1qb, C1qc, C1ra, Ccl2, Cebpb, Clec4d, Clec4e, Clec4n, Csf1r, Ctsb, Cxcl10, Cxcl11, Ddx58, Dhx58, Edn1, Fzd1, Gbp7, Hif1a, Hmox1, Ifi3, Ifnar1, Igf1, Igtp, Iigp1, Il18, Il18r1, Irak2, Irak3, Irf1, Ktll, Lcn2, Lgals9, Lrrk2, Malt1, Map3k7, March5, Myd88, Nampt, Nod1, Nrip1, Oas1g, Oas3, Pcdcl1, Pik3ap1, Polr3g, Ptch1, Ptges, Pyhin1, S100a9, Spp1, Stat4, Syk, Ticam2, Tlr11, Tlr2, Trib2, Vldlr, Zbp1,</i>

#7	inflammatory response	25	209	12%	7,62E-11	6,79E-08	<i>Afap112, Aim2, C3, Ccl2, Ccr7, Csf1r, Cxcl10, Cxcl11, Ecm1, Gal, Il18, Lat, Lipa, Myd88, Pdpn, Ptgs2, Pxx, Rps6ka4, Sema7a, Spp1, Tgfb1, Ticam2, Tlr11, Tlr2, Tnfrsf4,</i>
#7	response to virus	13	83	16%	1,16E-07	5,18E-05	<i>Bst2, Clu, Ddx58, Dhx58, Ifi2712a, Ifit3, Ifitm3, Irak3, Lcn2, Myd88, Npc2, Oas3, Odc1,</i>
#7	signal transduction	41	745	6%	1,54E-06	5,14E-04	<i>Acvr1b, Agap1, Akap12, Angptl2, Arhgap24, Braf, Bst2, Clock, Cxcl10, Ecm1, Gab1, Gna13, Gnaq, Grasp, Hif1a, Il18r1, Irak2, Irak3, Kras, Lyn, Map3k7, Myd88, Nfkb2, Pdpn, Plxna2, Plxnb2, Ppp2r5a, Pich1, Rab6a, Ralgds, Rgl1, Rhoq, Rhot1, Rrbp1, Stat4, Ticam2, Tlr11, Tlr2, Tnfrsf21, Traf1, Vopp1,</i>
#7	cellular response to interferon-beta	6	19	32%	4,48E-06	1,09E-03	<i>Aim2, Ifit3, Igtf, Iigp1, Pnpt1, Pyhin1,</i>
#7	response to lipopolysaccharide	16	172	9%	5,84E-06	1,30E-03	<i>Abcc5, Ccl2, Ccr7, Cebpb, Cxcl10, Edn1, F3, Irak3, Irg1, Myd88, Peli1, Ptgs, Ptgs2, Rps6ka3, S100a9, Sod2,</i>
#7	negative regulation of apoptotic process	27	426	6%	8,24E-06	1,69E-03	<i>Apoe, Bnip3l, Braf, Ccl2, Cebpb, Cln8, Clu, Cyr61, Dffa, Hells, Hif1a, Hmox1, Hspa5, Ifit3, Igf1, Il1rn, Kitl, Mad21l, Map3k7, Nes, Pim3, Pnp, Ppt1, Prdx5, Sod2, Spp1, Vegfa,</i>
#7	protein phosphorylation	34	607	6%	8,43E-06	1,61E-03	<i>Acvr1b, App, Braf, Bub1, Camk2d, Cdk20, Cdkl2, Csf1r, Fnip2, Hipk1, Hus1, Irak2, Irak3, Irf1, Lrrk2, Lyn, Map2k6, Map3k2, Map3k7, Map4k3, Mapk6, Mast2, Met, Nek7, Pim3, Pxx, Rps6ka3, Rps6ka4, Src, Stat4, Syk, Tgfb1, Tgfr2, Trib2,</i>
#7	immune response	18	222	8%	1,07E-05	1,78E-03	<i>C1qc, Ccl2, Ccr7, Cd28, Clec4e, Cxcl10, Cxcl11, H2-Eb2, H2-T23, Il18, Lat, Ltb, Myd88, Oas1g, Oas3, Pf4, Tlr2, Tnfsf8,</i>
#7	defense response to virus	13	123	11%	1,10E-05	1,73E-03	<i>Bnip3, Bnip3l, Bst2, Cxcl10, Dhx58, Ifit3, Ifitm3, Ifnar1, Irf1, Oas3, Polr3g, Ptpcr, Zbp1,</i>
#7	negative regulation of cytokine-mediated signaling pathway	4	8	50%	2,35E-05	3,31E-03	<i>Ecm1, Il1rn, Irak3, Ptpcr,</i>
#7	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	10	80	13%	2,65E-05	3,54E-03	<i>Aim2, Clu, Irak2, Irak3, Kras, Malt1, Myd88, Nod1, Tlr2, Traf1,</i>
#7	negative regulation of peptidase activity	4	9	44%	4,15E-05	5,28E-03	<i>Cast, Cstb, Ecm1, Tspi,</i>
#7	autophagy	8	55	15%	5,65E-05	6,04E-03	<i>Atg4c, Ctsb, Dram1, Lamp1, Lrrk2, Npc1, S100a9, Wip1,</i>
#7	response to organic cyclic compound	13	150	9%	8,99E-05	8,58E-03	<i>Cd83, Ctsb, Ctstl, Ephx1, Il1rn, Lyn, Met, Nampt, Plin2, Ptgs, Ptgs2, Tgfb1, Tgfr2,</i>
#7	brown fat cell differentiation	6	31	19%	9,45E-05	8,42E-03	<i>Bnip3, Cebpb, Erol1, Fabp4, Lrg1, Ptgs2,</i>
#7	negative regulation of growth	4	11	36%	1,05E-04	9,01E-03	<i>Hif1a, Mt1, Mt2, Pnpt1,</i>
#7	cell death	7	45	16%	1,06E-04	8,62E-03	<i>Atp6ap1, Bnip3, Cln8, Clu, Hmox1, Htr2a, Tgfb1,</i>

#7	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	7	45	16%	1,06E-04	8,62E-03	<i>Edn1, Hmox1, Igf1, Myd88, Nampt, Ptgs2, Tgfbr2,</i>
#7	cholesterol metabolic process	8	60	13%	1,07E-04	8,37E-03	<i>Abca1, Apoe, App, Cln8, Insig2, Ldlr, Npc2, Vldlr,</i>
#7	activation of MAPK activity	8	61	13%	1,20E-04	8,67E-03	<i>Gab1, Lpar3, Lrrk2, Map2k6, Map3k7, Met, Ptprc, Syk,</i>
#7	cell adhesion	20	320	6%	1,45E-04	9,70E-03	<i>App, Cd47, Cd84, Cd9, Cyr61, Debld2, Emb, Emilin2, Kitl, Lama2, Lamc1, Lgals3bp, Pdpn, Perp, Pip5k1c, Pkp4, Sdc3, Spp1, Src, Vcan,</i>
#7	apoptotic process	26	485	5%	1,94E-04	1,20E-02	<i>Aim2, Bnip3, Bnip3l, Dffa, Dram1, Hipk1, Irak2, Irak3, Kras, Lcn2, Malt1, Map2k6, Map3k7, Niacr1, Pcdl1, Perp, Pim3, Rhot1, Rnf130, Rnf34, Sgpl1, Sgpp1, Sod2, Tgfbr2, Traf1, Xaf1,</i>
#7	aging	12	145	8%	2,56E-04	1,49E-02	<i>Apoe, Atp6ap1, Canx, Ccl2, Ctsc, F3, Htr2a, Ifi2712a, Ldlr, Sod2, Tgfb1, Tgfbr2,</i>
#7	angiogenesis	14	189	7%	2,59E-04	1,47E-02	<i>Ang, Arhgap24, Ccl2, Ecm1, Gna13, Hif1a, Hmox1, Il18, Map3k7, Mmp19, Plau, Ptgs2, Syk, Vegfa,</i>
#7	cytokine-mediated signaling pathway	8	69	12%	2,87E-04	1,60E-02	<i>Ccl2, Csf1r, Iigp1, Irak3, Kras, Myd88, Pfa, Stat4,</i>
#7	regulation of apoptotic process	13	169	8%	2,95E-04	1,61E-02	<i>Bnip3l, Cstb, Hif1a, Ier3, Irak2, Irak3, Lcn2, Lyn, Malt1, Nod1, Ptprc, Tnfrsf4, Traf1,</i>
#7	response to oxidative stress	10	107	9%	3,13E-04	1,67E-02	<i>Apoe, App, Clu, Gab1, Hmox1, Lcn2, Lrrk2, Prdx5, Ptgs2, Sod2,</i>
#7	positive regulation of mitosis	5	25	20%	3,14E-04	1,64E-02	<i>Cd28, Edn1, Igf1, Met, Nusap1,</i>
#7	response to hyperoxia	5	26	19%	3,81E-04	1,92E-02	<i>Bnip3, Il18, Pdpn, Plau, Sod2,</i>
#7	chemotaxis	8	72	11%	3,85E-04	1,91E-02	<i>Ccr7, Cmtm3, Cxcl10, Cxcl11, Cyr61, Fpr1, Fpr2, Ptp5k1c,</i>
#7	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	5	27	19%	4,58E-04	2,23E-02	<i>Ccl2, Il18, Irak2, Lyn, Myd88,</i>
#7	autophagic cell death	3	7	43%	4,83E-04	2,26E-02	<i>Bnip3, Ctstl, Lamp1,</i>
#7	regulation of cell shape	9	94	10%	5,18E-04	2,39E-02	<i>Ccl2, Csf1r, Fam40b, Gna13, Palm2, Pdpn, Plxnb2, Rhoq, Vegfa,</i>
#7	lysosome organization	5	28	18%	5,46E-04	2,47E-02	<i>Abca1, Cln8, Hexa, Hook2, Ppt1,</i>
#7	negative regulation of intracellular protein kinase cascade	2	2	100%	6,05E-04	2,70E-02	<i>Ddit4, Lyn,</i>
#7	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	10	117	9%	6,38E-04	2,75E-02	<i>Bst2, Clec4n, Ecm1, Hmox1, Malt1, Map3k7, Myd88, Nod1, Peli1, Rel,</i>

#7	response to bacterium	5	29	17%	6,47E-04	2,74E-02	<i>Ccl2, Cd47, Lcn2, Tlr11, Tlr2,</i>
#7	negative regulation of cell proliferation	17	283	6%	6,99E-04	2,92E-02	<i>Aldh1a2, Cd9, Gal, Hmox1, Ifit3, Ifitm3, Igf1, Kras, Lyn, Pmp22, Ptch1, Ptges, Ptg2, Slfn3, Sod2, Tgfb1, Tgfb2,</i>
#7	negative regulation of neuron apoptotic process	9	98	9%	7,03E-04	2,89E-02	<i>Apoe, Braf, Hif1a, Hmox1, Itsn1, Kras, Mt1, Ppt1, Sod2,</i>
#7	positive regulation of cardiac muscle hypertrophy	3	8	38%	7,58E-04	2,98E-02	<i>Camk2d, Edn1, Igf1,</i>
#7	positive regulation of interleukin-12 biosynthetic process	3	8	38%	7,58E-04	2,98E-02	<i>Irf1, Ltb, Rel,</i>
#7	response to peptidoglycan	3	8	38%	7,58E-04	2,98E-02	<i>Irak3, Myd88, Tlr2,</i>
#7	receptor-mediated endocytosis	5	30	17%	7,61E-04	2,95E-02	<i>Apoe, Hip1r, Ppt1, Tgfb2, Vldlr,</i>
#7	induction of apoptosis	12	164	7%	7,80E-04	2,98E-02	<i>Acvr1b, Apoe, App, Bnip3, Bnip3l, Cebpb, Dffa, Irf1, Nod1, Perp, S100a9, Tgfb1,</i>
#7	MAPK cascade	7	62	11%	8,05E-04	3,03E-02	<i>Ccl2, Il18, Lrrk2, Map2k6, Map3k7, Mapk6, Tgfb1,</i>
#7	cellular response to peptide hormone stimulus	4	18	22%	8,45E-04	3,09E-02	<i>Fzd1, Il18, Irf1, Met,</i>
#7	lipid storage	4	18	22%	8,45E-04	3,09E-02	<i>Gm2a, Hexa, Nrip1, Plin2,</i>
#7	positive regulation of tumor necrosis factor production	5	33	15%	1,19E-03	4,25E-02	<i>Ccr7, Il18, Myd88, Nod1, Tlr2,</i>
#7	cell proliferation	12	173	7%	1,24E-03	4,31E-02	<i>Appl2, Bub1, Csf1r, Ddit4, E2f8, Ifnar2, Lipa, Pdpn, Pdxk, Stat4, Tgfb1, Vegfa,</i>
#7	nitric oxide mediated signal transduction	3	10	30%	1,57E-03	4,98E-02	<i>Apoe, Mt1, Mt2,</i>
#7	positive regulation of interleukin-2 production	3	10	30%	1,57E-03	4,98E-02	<i>Cd83, Malt1, Map3k7,</i>
#7	Cdc42 protein signal transduction	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Abca1, Apoe,</i>
#7	age-dependent response to oxidative stress	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Cln8, Sod2,</i>
#7	cellular macromolecule catabolic process	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Cln8, Ppt1,</i>

#7	detoxification of copper ion	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Mt1, Mt2,</i>
#7	ganglioside catabolic process	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Gm2a, Hexa,</i>
#7	mitochondrial protein catabolic process	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Bnip3, Bnip3l,</i>
#7	negative regulation of protein homooligomerization	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Clu, Src,</i>
#7	platelet dense granule organization	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Abca1, Dtnbp1,</i>
#7	positive regulation of mitochondrial fission	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Bnip3, March5,</i>
#7	response to sterol depletion	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Insig2, Lyn,</i>
#7	tolerance induction to self antigen	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>Lyn, Tgfb1,</i>
#7	very-low-density lipoprotein particle clearance	2	3	67%	1,79E-03	4,82E-02	<i>ApoE, Vldlr,</i>
#7	cholesterol efflux	4	22	18%	1,87E-03	4,99E-02	<i>Abca1, ApoE, Npc1, Npc2,</i>
#8	translation	22	246	9%	9,45E-12	4,53E-09	<i>Gm5428, Kxd1, Rpl10a, Rpl10l, Rpl13a, Rpl18, Rpl19, Rpl22, Rpl32, Rpl36, Rpl6, Rpl9, Rps15, Rps16, Rps18, Rps20, Rps21, Rps27a, Rps28, Rps3, Rps3a, Rps7,</i>
#8	ribosomal small subunit biogenesis	5	14	36%	1,04E-06	2,50E-04	<i>Rps15, Rps16, Rps21, Rps28, Rps7,</i>
#8	negative regulation of transcription, DNA-dependent	18	433	4%	5,75E-05	1,03E-02	<i>Dnmt3l, Eid2, Foxf2, Hmgb2, Id1, Id2, Id3, Jun, Klf4, Mdfic, Mxd4, Ovol2, Ppargc1b, Prdm16, Sirt2, Yaf2, Zfp12, Zfp703,</i>
#8	hypothalamus gonadotrophin-releasing hormone neuron development	2	2	100%	2,04E-04	2,93E-02	<i>Ubb, Ubc,</i>
#8	cellular response to estrogen stimulus	3	10	30%	3,22E-04	4,22E-02	<i>Crhbp, Naip1, Naip6,</i>
#9	inflammatory response	11	209	5%	1,52E-05	2,16E-02	<i>Ccl4, Cxcl1, Cyba, Il6, Naip6, Ndst1, Nfkbiz, Nos2, Tlr6, Tnf, Tnfrsf1a,</i>
#9	negative regulation of gene expression	7	80	9%	2,26E-05	1,61E-02	<i>Cdkn1a, Cited2, Mef2c, Nos2, Tnf, Tnfrsf1a, Zfp281,</i>

#10	histone deacetylation	8	20	40%	6,21E-06	3,90E-03	<i>Hdac10, Hdac4, Hdac6, Hdac7, Hdac9, Hopx, Mta2, Phb,</i>
#10	DNA repair	28	232	12%	9,90E-05	2,49E-02	<i>Eepd1, Ercc2, Ercc4, Ercc5, Ercc6, Fen1, Fzr1, Gtf2h2, H2afx, Lonp1, Mbd4, Mdc1, Mgmt, Msh2, Mum1, Nabp2, Nhej1, Polh, Polm, Polq, Prmt6, Psmc5, Rad50, Rps27l, Ruvbl1, Topbp1, Ube2w, Upfl,</i>
#10	positive regulation of GTPase activity	11	53	21%	1,33E-04	2,51E-02	<i>Arhgap6, Arhgap9, Axin2, Bin1, Gipc1, Gnb2l1, Ralgapa1, Rgs10, Rgs19, Rgs2, Tiam2,</i>
#10	rRNA processing	14	84	17%	2,08E-04	3,27E-02	<i>Cdkn2a, Ddx51, Ddx56, Exosc1, Exosc2, Exosc5, Ftsj2, Ftsj3, Imp4, Krr1, Nop2, Pes1, Rpl14, Utp15,</i>
#10	tricarboxylic acid cycle	7	24	29%	2,43E-04	3,53E-02	<i>Aco1, Idh1, Mdh1, Ogdhl, Sdhb, Suclg1, Suclg2,</i>
#10	response to DNA damage stimulus	20	150	13%	2,53E-04	3,53E-02	<i>2610002J02Rik, Ash2l, Bcl3, Bmyc, Casp9, Ercc6, H2afx, Mbd4, Mgmt, Mlh3, Mre11a, Msh2, Nabp2, Nek1, Nuak1, Rad50, Rps27l, Stk11, Topbp1, Trp53,</i>
#10	fatty acid beta-oxidation	8	32	25%	2,85E-04	3,71E-02	<i>Abcd1, Abcd2, Acaa2, Crot, Echs1, Ehhadh, Hadh, Slc25a17,</i>
#10	oxidation-reduction process	51	554	9%	3,03E-04	3,82E-02	<i>1110018J18Rik, 1110031I02Rik, Acadl, Aldh3b1, Aldh6a1, Aldh9a1, Alox5, BC026585, Blvra, Blvrb, Coq7, Dcxr, Dhcr24, Dus2l, Eglnt2, Ehhadh, Fdxx, Fmo5, Gcdh, Gfer, Gmpr2, Gsr, H6pd, Haa0, Hadh, Idh1, Ivd, Kdm1b, L2hgdh, Loxl4, Mdh1, Mecr, Mto1, Ndor1, Ogdhl, Oxnad1, Pcyox1l, Pdha1, Pgd, Ppox, Prdx2, Ptgis, Pycr1, Pycr2, Pycr1, Retsat, Rsad1, Sdhb, Sod1, Spr, Srxn1,</i>
#11	regulation of protein localization	6	39	15%	9,02E-05	3,46E-02	<i>Bora, Mapk8, Myo5b, Ralgapb, Slc26a4, Tbc1d1,</i>
#11	protein ubiquitination	15	256	6%	1,33E-04	4,24E-02	<i>Btrc, Cdc20, Cish, Dtx4, Fbxo7, Kctd13, Nub1, Plk1, Rffl, Rfwd2, Rnf135, Rnf19b, Traf7, Wdsub1, Zer1,</i>
#12	TOR signaling cascade	4	9	44%	1,19E-05	4,93E-03	<i>Ccdc88a, Gata3, Rhebl1, Rps6,</i>
#12	cell division	16	274	6%	3,83E-05	9,10E-03	<i>Casc5, Cdc25c, Cdk2, Cenph, Gnai3, Mis12, Ndc80, Nedd1, Nup43, Pard6b, Prkce, Rad21, Ska2, Spata30, Tsg101, Ube2c,</i>
#12	regulation of transcription involved in G1/S phase of mitotic cell cycle	3	5	60%	5,55E-05	1,15E-02	<i>Bach1, Hinfp, Npat,</i>
#12	mitosis	13	202	6%	7,64E-05	1,41E-02	<i>Casc5, Cdc25c, Cdk2, Cenph, Mis12, Ndc80, Nedd1, Nup43, Rad21, Ska2, Spata30, Tubb4b, Ube2c,</i>
#12	cell cycle	14	236	6%	9,81E-05	1,48E-02	<i>App1, Casp8ap2, Cdk2, Crocc, Esco1, Gnai3, Gsg2, Lzts1, Mis12, Pard6b, Prkce, Rab11fip4, Stard13, Ttk1,</i>
#12	regulation of transcription, DNA-dependent	53	1750	3%	1,15E-04	1,60E-02	<i>Ar, Bach1, Bzw1, Casp8ap2, Cnot6, Creb1, Foxj3, Foxq1, Gata3, Gm13247, Gm14420, Gtf2a1, Hdac11, Hinfp, Hoxa1, Irf8, Jdp2, Klfl10, Klfl12, Mybl1, Nfe211, Nr1d2, Phf19, Pknx1, Plagl1, Pnrc2, Ppp1r8, Rqcd1, Satb1, Scml4, Srebf2, Suv420h1, Tardbp, Tceb1, Zbtb1, Zbtb24, Zbtb9, Zfp160, Zfp251, Zfp334, Zfp35, Zfp410, Zfp46, Zfp472, Zfp473, Zfp518b, Zfp563, Zfp605, Zfp62, Zfp719, Zfp780b, Zfp827, Zkscan3,</i>
#12	chromosome segregation	7	63	11%	1,31E-04	1,67E-02	<i>Casc5, Cenph, Mis12, Ndc80, Nup43, Rad21, Ska2,</i>

#12	transcription, DNA-dependent	43	1364	3%	2,30E-04	2,72E-02	<i>Ar, Arid1a, Bzwl1, Cand1, Casp8ap2, Cnot6, Gtf3c5, Hdac11, Hexim2, Hinfp, Hoxa1, Ilf2, Irf8, Jdp2, Kdm5a, Klfl10, Klfl12, Mxd3, Mybl1, Npat, Phf19, Plag1, Pnrc2, Polr3h, Ppp1r8, Rqcd1, Satb1, Scml4, Srebf2, Suv420h1, Tardbp, Tceb1, Trp53inp2, Zbtb1, Zbtb24, Zbtb9, Zfp35, Zfp410, Zfp46, Zfp518b, Zfp62, Zfp827, Zkscan3,</i>
#12	endosome organization	4	21	19%	4,76E-04	4,94E-02	<i>Arfgef2, Fam109a, Plekhf1, Rab22a,</i>
#13	protein transport	28	468	6%	1,51E-06	1,05E-03	<i>Agap2, Ap1b1, Ap1g2, Ap3d1, Cog5, Cox18, Diras2, Fam125b, Gle1, Mef2d, Mras, Nup107, Nup85, Pgap2, Rab3a, Rab5b, Rab6b, Rab8a, Rabep2, Rac2, Rhog, Rras2, Scamp1, Sfi2d2, Snx15, Tmed4, Vps51, Vps53,</i>
#13	protein phosphorylation	31	607	5%	1,07E-05	4,49E-03	<i>Adrbk1, B230120H23Rik, Camkk1, Cdc42bpg, Cdk5, Csnk1g1, Dapk2, Grk5, Grk6, Ikbke, Insr, Ip6k3, Ksr1, Limk1, Limk2, Lmtk2, Mapk3, Mast4, Mknk2, Nek8, Pak6, Pdgfrb, Pink1, Plk3, Polr2e, Prkar2b, Prkcb, Rps6kc1, Srms, Trim24, Tyro3,</i>
#13	nucleocytoplasmic transport	10	104	10%	8,88E-05	1,55E-02	<i>Aaas, Cdk5, Mras, Rab3a, Rab5b, Rab6b, Rab8a, Rac2, Rhog, Rras2,</i>
#13	signal transduction	33	745	4%	9,42E-05	1,52E-02	<i>Agap2, Arnt2, Ccnd3, Diras2, Fadd, Fnbp1, Grk6, Hivep2, Litaf, Lrdd, Mapk3, Mras, Mtss1, Myo10, Pdgfrb, Plcg1, Plxna3, Plxnd1, Prkar2b, Rab3a, Rab5b, Rab6b, Rab8a, Rac2, Radil, Rasa3, Rassf3, Rhog, Rras2, Sh3bp1, Slc35b2, Tiam1, Tmed4,</i>
#13	semaphorin-plexin signaling pathway	4	14	29%	1,84E-04	2,27E-02	<i>Nrp1, Plxna3, Plxnd1, Sema4a,</i>
#13	intracellular protein transport	17	290	6%	2,19E-04	2,41E-02	<i>Ap1b1, Ap1g2, Ap3d1, Ap3m2, Apba1, Cdk5, Fchol, Ggal, Mras, Rab3a, Rab5b, Rab6b, Rab8a, Rac2, Rhog, Rras2, Ston1,</i>
#13	positive regulation of catecholamine secretion	2	2	100%	4,70E-04	4,47E-02	<i>Adrbk1, Pink1,</i>
#14	cell morphogenesis	9	73	12%	8,37E-06	7,16E-03	<i>Arhgef2, Gp1ba, Hspa1a, Hspa1b, Hspa1l, Klf2, Mtap7, Ssh1, Vdr,</i>
#14	positive regulation of interleukin-4 biosynthetic process	3	4	75%	2,53E-05	1,08E-02	<i>Cd1d1, Cd1d2, Irf4,</i>
#14	focal adhesion assembly	4	15	27%	1,38E-04	3,92E-02	<i>Dlc1, Itgav, Pdpk1, Pxn,</i>
#15	ossification	8	77	10%	2,08E-05	9,00E-03	<i>Alox15, Casr, Csf1, Foxc1, Ifitm1, Pdlim7, Sp3, Tnfrsf11a,</i>
#15	phosphatidylinositol phosphorylation	5	27	19%	4,63E-05	1,34E-02	<i>Inpp1, Inpp5b, Inpp5k, Pik3r1, Synj1,</i>
#15	negative regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	3	6	50%	6,55E-05	1,42E-02	<i>Eng, Smad6, Smad7,</i>
#15	negative regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	3	8	38%	1,79E-04	2,82E-02	<i>Inpp5k, Smad7, Spred1,</i>

#15	cortical cytoskeleton organization	2	2	100%	2,26E-04	2,45E-02	<i>Actn1, Synpo,</i>
#15	regulation of T cell homeostatic proliferation	2	2	100%	2,26E-04	2,45E-02	<i>Il2, Il2ra,</i>
#15	artery morphogenesis	4	21	19%	2,47E-04	2,52E-02	<i>Eng, Foxc1, Smad7, Tgfbr1,</i>
#15	positive regulation of T cell proliferation	5	43	12%	4,53E-04	4,36E-02	<i>Il2, Il2ra, Itgal, Pcdcl1lg2, Vcam1,</i>
#15	positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	4	25	16%	4,98E-04	4,54E-02	<i>Bmpr2, Eng, Inhba, Tgfbr1,</i>
#15	DNA replication initiation	3	11	27%	5,11E-04	4,42E-02	<i>Ccne1, Mcm2, Mcm6,</i>
#15	cytokine-mediated signaling pathway	6	69	9%	6,03E-04	4,97E-02	<i>Csf2rb, Csf2rb2, Cx3cl1, Il1r1, Socs5, Stat3,</i>
#15	natural killer cell activation involved in immune response	2	3	67%	6,72E-04	4,31E-02	<i>Ifna1, Ifna4,</i>
#15	negative regulation of defense response to virus	2	3	67%	6,72E-04	4,31E-02	<i>Il2ra, Itch,</i>
#15	negative regulation of retroviral genome replication	2	3	67%	6,72E-04	4,31E-02	<i>Apobec3, Inpp5k,</i>
#15	protein poly-ADP-ribosylation	2	3	67%	6,72E-04	4,31E-02	<i>Parp10, Tnks,</i>
#15	phosphatidylinositol dephosphorylation	3	12	25%	6,74E-04	4,17E-02	<i>Inpp5b, Inpp5k, Synj1,</i>

GO-term enrichment analysis was performed with the lists of differentially expressed genes from each cluster, using InnateDB. Only “Biological Process” terms with corrected p-value < 0.05 are shown.

Table 3.S6. List of genes differentially expressed between WT and dKO and associated to the inflammatory and/or antiviral responses

GO-terms	dKO kinetic	Gene	no LPS				1h LPS				2h LPS				6h LPS			
			dKO mean RPKM	WT mean RPKM	log ₂ (dKO/WT)	adj p-value	dKO mean RPKM	WT mean RPKM	log ₂ (dKO/WT)	adj p-value	dKO mean RPKM	WT mean RPKM	log ₂ (dKO/WT)	adj p-value	dKO mean RPKM	WT mean RPKM	log ₂ (dKO/WT)	adj p-value
Inflammatory response	dKO < WT	<i>Afap112</i>	0,0	0,4	-4,33	0,00	0,0	0,3	-3,20	0,00	0,1	0,6	-2,85	0,00	0,1	0,4	-1,86	0,00
	dKO > WT	<i>Aim2</i>	17,3	18,4	NA	NA	28,6	26,2	0,26	0,01	55,6	48,4	0,33	0,00	48,1	36,1	0,58	0,00
	dKO > WT	<i>C3</i>	365,9	231,6	0,75	0,00	308,8	181,9	0,88	0,00	451,0	265,6	0,89	0,00	728,7	352,7	1,20	0,00
	dKO < WT	<i>Ccl12</i>	0,5	2,6	-2,24	0,00	29,0	64,4	-1,03	0,00	30,7	63,4	-0,91	0,00	5,3	11,7	-0,99	0,00
	Delayed	<i>Ccl2</i>	13,7	19,9	-0,46	0,01	635,0	588,8	NA	NA	700,8	656,9	NA	NA	241,6	164,2	0,72	0,00
	dKO < WT	<i>Ccl22</i>	406,1	971,5	-1,17	0,00	1860,5	3254,6	-0,69	0,00	3697,5	6133,9	-0,60	0,00	10453,4	18098,0	-0,64	0,00
	dKO > WT	<i>Ccl4</i>	33,4	28,3	0,33	0,00	5300,0	3880,5	0,57	0,00	8359,6	6929,9	0,40	0,00	1217,9	951,5	0,51	0,00
	Delayed	<i>Ccl5</i>	220,9	581,7	-1,31	0,00	1225,4	1612,9	-0,26	0,00	3904,6	4030,3	NA	NA	14227,8	12766,8	0,31	0,00
	Delayed	<i>Ccl7</i>	1,1	3,0	-1,33	0,00	56,4	79,7	NA	NA	103,5	103,0	NA	NA	37,4	25,8	0,69	0,00
	dKO < WT	<i>Ccr7</i>	107,9	253,9	-1,15	0,00	315,1	641,5	-0,91	0,00	263,0	450,0	-0,64	0,00	907,9	1333,8	-0,40	0,03
	dKO > WT	<i>Cerl2</i>	6,9	6,5	NA	NA	773,0	386,2	1,13	0,00	354,0	147,2	1,40	0,00	218,6	69,0	1,82	0,00
	dKO > WT	<i>Csflr</i>	354,6	291,4	0,37	0,00	256,8	187,9	0,57	0,00	162,0	114,0	0,64	0,00	37,9	20,5	1,04	0,00
	dKO > WT	<i>Cxcl1</i>	1,5	0,9	1,00	0,00	949,5	477,6	1,10	0,00	571,8	322,2	0,95	0,00	118,1	62,8	1,06	0,00
	Sustained	<i>Cxcl10</i>	2,5	5,5	-1,03	0,00	1307,1	1164,0	NA	NA	3886,5	3298,2	0,37	0,01	3177,6	1691,4	1,07	0,00
	dKO > WT	<i>Cxcl11</i>	0,2	0,1	NA	NA	11,0	5,7	1,04	0,00	85,7	26,6	1,79	0,00	329,1	30,5	3,56	0,00
	dKO < WT	<i>Cxcl9</i>	0,0	0,1	-2,50	0,00	0,9	1,8	-0,89	0,01	13,2	13,5	NA	NA	12,8	14,1	NA	NA
	dKO > WT	<i>Cyba</i>	718,9	716,7	NA	NA	616,8	554,1	0,28	0,00	559,7	550,5	NA	NA	443,6	404,9	0,29	0,00
	dKO > WT	<i>Ecm1</i>	34,4	22,5	0,70	0,00	30,0	18,1	0,85	0,00	27,3	16,7	0,84	0,00	19,6	11,1	0,97	0,00
	dKO < WT	<i>Gal</i>	10,7	21,6	-0,93	0,00	11,2	20,1	-0,73	0,00	9,3	15,9	-0,66	0,00	7,4	8,4	NA	NA
	dKO < WT	<i>Ggt5</i>	1,5	2,2	-0,42	0,02	1,3	1,4	NA	NA	0,6	0,8	NA	NA	0,2	0,2	NA	NA
	dKO < WT	<i>Hck</i>	46,7	60,5	-0,28	0,01	41,4	51,2	NA	NA	67,5	72,3	NA	NA	82,9	86,0	NA	NA
	dKO < WT	<i>Il18</i>	4,8	12,3	-1,24	0,00	4,9	10,2	-0,95	0,00	4,9	10,6	-0,98	0,00	15,7	21,0	-0,27	0,04
	dKO < WT	<i>Il1b</i>	47,0	76,0	-0,63	0,00	4925,8	4702,3	NA	NA	3675,0	4199,4	NA	NA	1787,2	1789,9	NA	NA
	dKO > WT	<i>Il6</i>	1,6	1,7	NA	NA	1069,5	885,4	0,40	0,00	1548,2	1443,1	0,24	0,03	1061,9	754,2	0,64	0,00
dKO > WT	<i>Lat</i>	1,1	0,6	0,86	0,01	1,3	0,6	1,21	0,00	1,2	0,6	1,12	0,00	1,4	0,6	1,49	0,00	

dKO > WT	<i>Lipa</i>	140,7	122,8	0,28	0,00	103,3	81,7	0,46	0,00	91,1	69,9	0,51	0,00	44,7	25,9	0,94	0,00
dKO < WT	<i>Lta</i>	1,7	6,5	-1,81	0,00	28,8	39,7	NA	NA	59,4	63,0	NA	NA	39,7	39,4	NA	NA
dKO > WT	<i>Mapkapk2</i>	80,6	84,7	NA	NA	265,9	223,4	0,37	0,00	409,9	338,9	0,41	0,00	183,6	154,2	0,41	0,00
dKO > WT	<i>Mif</i>	247,9	235,1	NA	NA	249,3	207,6	0,39	0,00	224,0	197,5	0,31	0,00	187,2	149,2	0,48	0,00
dKO < WT	<i>Ms4a2</i>	0,0	0,3	-2,54	0,01	0,2	0,6	NA	NA	0,1	0,4	NA	NA	0,2	0,5	NA	NA
dKO > WT	<i>Naip2</i>	28,0	27,6	NA	NA	24,3	19,4	0,45	0,00	28,1	17,8	0,79	0,00	31,1	23,9	0,54	0,00
dKO > WT	<i>Naip6</i>	7,8	7,9	NA	NA	7,0	5,4	0,45	0,00	4,4	3,6	0,42	0,00	6,2	6,1	NA	NA
dKO > WT	<i>Ndst1</i>	5,6	4,9	NA	NA	3,2	2,5	0,47	0,01	1,1	1,0	NA	NA	1,2	1,0	0,51	0,01
dKO > WT	<i>Nfkbiz</i>	2,9	3,4	NA	NA	643,7	592,1	0,24	0,00	298,9	304,2	NA	NA	87,9	83,7	0,23	0,01
dKO > WT	<i>Nos2</i>	7,4	5,4	NA	NA	9,8	6,3	0,75	0,02	49,9	40,0	NA	NA	637,4	358,2	0,99	0,00
Sustained	<i>Pdpr</i>	19,0	37,7	-0,89	0,00	26,9	45,7	-0,64	0,00	39,8	56,0	-0,35	0,00	32,6	22,5	0,70	0,00
Delayed	<i>Ptgs2</i>	0,6	1,2	-0,90	0,00	279,9	276,3	NA	NA	284,3	317,3	NA	NA	466,5	297,4	0,80	0,00
dKO > WT	<i>Pxk</i>	13,3	14,3	NA	NA	11,0	10,1	0,24	0,02	6,3	5,6	0,29	0,01	14,3	10,9	0,55	0,00
dKO > WT	<i>Rps6ka4</i>	31,5	33,3	NA	NA	24,2	25,7	NA	NA	24,0	22,1	0,26	0,01	32,1	26,1	0,46	0,00
dKO < WT	<i>Sema7a</i>	8,4	24,9	-1,47	0,00	39,0	106,1	-1,33	0,00	36,4	103,1	-1,37	0,00	77,9	192,8	-1,15	0,00
dKO < WT	<i>Serpib9</i>	5,7	15,9	-1,39	0,00	19,4	60,3	-1,52	0,00	33,7	103,9	-1,49	0,00	76,3	159,2	-0,91	0,00
dKO > WT	<i>Smad1</i>	5,5	5,3	NA	NA	8,2	5,7	0,63	0,00	13,9	9,7	0,64	0,00	6,5	4,5	0,70	0,00
dKO > WT	<i>Spp1</i>	641,8	657,0	NA	NA	1380,3	1271,1	0,24	0,02	1631,7	1484,9	0,27	0,01	950,8	718,3	0,56	0,00
dKO > WT	<i>Tgfb1</i>	191,8	173,3	0,23	0,01	223,1	198,6	0,29	0,00	186,0	169,1	0,27	0,00	63,7	54,7	0,38	0,00
dKO > WT	<i>Ticam2</i>	29,9	23,7	0,43	0,00	10,9	8,1	0,55	0,00	7,6	4,9	0,75	0,00	32,0	16,0	1,15	0,00
dKO < WT	<i>Tlr11</i>	0,1	3,6	-5,04	0,00	0,1	1,0	-4,10	0,00	0,0	0,4	-Inf	0,00	0,0	0,3	-3,30	0,00
dKO < WT	<i>Tlr12</i>	0,3	0,7	-1,34	0,01	0,1	0,3	-2,08	0,00	0,0	0,1	-2,63	0,00	0,0	0,1	NA	NA
dKO > WT	<i>Tlr6</i>	4,4	3,7	NA	NA	3,4	2,5	0,59	0,00	3,2	3,0	NA	NA	7,9	5,1	0,80	0,00
dKO > WT	<i>Tnf</i>	18,0	22,4	NA	NA	5994,7	5032,2	0,37	0,00	3540,9	3380,5	NA	NA	797,7	572,7	0,64	0,00
dKO > WT	<i>Tnfrsf1a</i>	63,7	63,3	NA	NA	58,0	53,5	0,23	0,01	75,5	74,3	NA	NA	61,1	51,6	0,40	0,00
Delayed	<i>Tnfrsf1b</i>	125,8	167,2	-0,32	0,00	267,7	222,4	0,39	0,00	368,7	298,9	0,43	0,00	355,5	254,2	0,64	0,00
dKO < WT	<i>Tnfrsf4</i>	1,3	5,1	-1,81	0,00	0,8	3,2	-1,85	0,00	0,6	2,0	-1,58	0,00	1,5	3,0	-0,96	0,00

Response to virus	dKO > WT	<i>Ace2</i>	0,0	0,1	-3,68	0,00	0,0	0,1	NA	NA	0,0	0,1	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA
	Delayed	<i>Bst2</i>	92,6	186,4	-0,92	0,00	91,9	160,5	-0,68	0,00	161,0	218,3	-0,29	0,00	605,7	536,0	0,34	0,00
	dKO < WT	<i>Clu</i>	11,4	30,4	-1,33	0,00	18,0	40,8	-1,06	0,00	24,2	50,1	-0,91	0,00	91,8	107,0	NA	NA
	dKO < WT	<i>Delk1</i>	0,0	0,0	-2,56	0,02	0,0	0,0	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA	0,0	0,0	NA	NA
	Delayed	<i>Ddx58</i>	10,6	16,3	-0,54	0,00	7,3	12,0	-0,59	0,00	59,3	68,1	NA	NA	118,9	92,1	0,52	0,00
	dKO < WT	<i>Dhx58</i>	8,8	18,7	-1,00	0,00	6,8	13,2	-0,81	0,00	33,1	46,5	-0,34	0,00	130,6	146,1	NA	NA
	dKO < WT	<i>Ifi2712a</i>	140,5	281,6	-0,90	0,00	117,8	203,0	-0,65	0,00	173,2	269,2	-0,49	0,00	386,3	446,5	NA	NA
	Delayed	<i>Iflh1</i>	6,5	9,8	-0,51	0,00	129,8	114,9	0,30	0,03	463,8	364,5	0,48	0,00	198,7	144,2	0,62	0,00
	Delayed	<i>Ifit1</i>	1,2	4,9	-1,96	0,00	142,6	122,4	NA	NA	808,6	823,6	NA	NA	650,2	372,9	0,96	0,00
	Delayed	<i>Ifit2</i>	1,6	5,6	-1,74	0,00	51,9	61,5	NA	NA	477,2	541,3	NA	NA	976,3	542,3	1,00	0,00
	Delayed	<i>Ifit3</i>	0,7	3,9	-2,51	0,00	4,4	10,4	-1,12	0,00	58,3	133,2	-1,05	0,00	232,5	185,7	0,48	0,02
	Delayed	<i>Ifitm3</i>	61,3	86,7	-0,41	0,00	74,4	92,1	NA	NA	208,8	237,0	NA	NA	643,1	562,8	0,35	0,00
	dKO > WT	<i>Irak3</i>	14,2	12,9	NA	NA	17,1	14,0	0,42	0,00	20,9	18,7	0,30	0,03	26,1	14,7	0,98	0,00
	dKO < WT	<i>Len2</i>	9,8	21,8	-1,07	0,00	49,4	88,7	-0,71	0,00	104,8	154,8	-0,43	0,00	225,4	240,1	NA	NA
	Delayed	<i>Mx2</i>	1,4	3,5	-1,21	0,00	41,0	34,2	0,38	0,00	135,7	142,5	NA	NA	106,6	81,9	0,53	0,00
dKO > WT	<i>Npc2</i>	284,3	282,8	NA	NA	263,1	240,7	0,25	0,00	305,5	277,6	0,27	0,00	463,5	375,4	0,46	0,00	
dKO < WT	<i>Oas3</i>	7,0	25,7	-1,80	0,00	4,5	16,0	-1,72	0,00	23,8	43,9	-0,75	0,00	142,2	167,5	NA	NA	
Delayed	<i>Oasl1</i>	0,4	1,8	-2,19	0,00	26,0	37,8	-0,43	0,01	371,6	410,2	NA	NA	416,7	365,1	0,35	0,03	
dKO < WT	<i>Odc1</i>	8,4	23,8	-1,42	0,00	12,6	24,4	-0,77	0,00	15,1	22,2	-0,41	0,00	7,1	8,8	NA	NA	
dKO > WT	<i>Rsad2</i>	2,1	4,6	-1,03	0,00	310,8	152,3	1,15	0,00	2410,9	1511,0	0,81	0,00	2069,9	932,4	1,31	0,00	
Delayed	<i>Myd88</i>	50,2	65,6	-0,30	0,00	36,8	50,2	-0,32	0,00	73,7	87,8	NA	NA	102,9	92,7	0,31	0,00	
Both	dKO > WT	<i>Tlr8</i>	18,9	13,3	0,60	0,00	9,3	4,8	1,10	0,00	5,3	2,5	1,23	0,00	8,0	3,9	1,20	0,00
	Delayed	<i>Tlr9</i>	7,3	13,3	-0,77	0,00	5,6	7,0	NA	NA	9,8	12,6	NA	NA	15,9	12,4	0,51	0,00
	dKO < WT	<i>Tnfsf4</i>	6,4	19,7	-1,54	0,00	122,1	217,2	-0,71	0,00	227,6	365,8	-0,55	0,00	103,4	223,1	-0,96	0,00

Log₂ ratios (dKO/WT) and adjusted p-values were calculated using the DESeq package from the R software (see Material and Methods for further details). The value «NA» was given for timepoints at which no significant difference was found between WT and dKO. Predominant trends for gene expression kinetics in dKO compared to WT cells are indicated (dKO > WT, higher RPKMs detected in dKO; dKO < WT, higher RPKMs in WT; Delayed, increased expression upon LPS stimulation is delayed in dKO, or dKO/WT log₂ ratio is negative at early time points and positive at later time points; Sustained, expression levels are decreased in WT but relatively maintained in dKO at late timepoints of LPS stimulation). See also Table 3.S6 for the complete list of GO-terms enriched among the differentially expressed genes.

Table 3.S7. Primers used for qPCR experiments

						Experiments		
Gene name	Approx. region (if within intron or spanning an intron-exon junction)	UPL Probe	Primer LEFT	Primer RIGHT	Standard qPCR	Unprocessed mRNA	ChIP-qPCR	
<i>Actb</i>	<i>Actb</i> 5'UTR	4	agtgtaggcggagcttgc	ggccgcattattaccataaaag			X	
<i>Akr1e1</i>		2	tcctacagtgggcttgg	gttgatagccaacttaactgcatc	X			
<i>Akr1e1</i>	<i>Akr1e1</i> ex2	2	tcttgtgtttgttatttccag	cccaggttgatagccaactta		X		
<i>Apobec3</i>		27	taccagctggagcagttcaa	ctgcatgctgtttgccttt	X			
<i>Apobec3</i>	<i>Apobec3</i> ex1	25	gcaaatgctattcaccgatca	ccaggaagagactgcagtgaa		X		
<i>Apold1</i>		41	tcaggctctccttccateat	acaagcaccaatgcatgac	X			
<i>Atp2b2</i>	<i>Atp2b2</i> int1	50	gcctctgtccacaggttta	ttgccaaaaatctgttcc			X	
<i>Bip</i>		105	ctgaggcgtatttggaaag	cagcatcttgggtgcttgc	X			
<i>Bmp2k</i>		2	ccgtcccttcatttctcac	ttggagaatgttccgtcgtt	X			
<i>Bmp2k</i>	<i>Bmp2k</i> ex1	16	gtcacccctggaggagtcg	cttcacaccggagccact		X		
<i>Clqb</i>		56	gctctgggctctgggaat	tcttcacagctcagcctca	X			
<i>Clqb</i>	<i>Clqb</i> ex2	20	tctcttttctcttgattctgttc	ggtcccttctctccaaac		X	X	
<i>Casp12</i>	<i>Casp12</i> ex2	42	caaaggttggccaaggac	acattcttctccaccaggtcat			X	
<i>Cxcl11</i>		76	gctgctgagatgaacaggaa	ccctgttgaacataaggaagc	X			
<i>Cxcl11</i>	<i>Cxcl11</i> ex2	67	gctgcgacaaagtgaagtg	acaaaagcaccataaccattg		X		
<i>Dlc1</i>		102	cggacacatgatcctaaca	atactggggaaaccagtca	X			
<i>Dlc1</i>	<i>Dlc1</i> ex6	81	cggcttcagctggttaagaga	acctcaggagcgtgatg		X		
<i>Ednra</i>	<i>Ednra</i> int3	99	gggcatcaccgtcttgaa	aaagagtaaggaaagtgccaca			X	
<i>Egr3</i>	<i>Egr3</i> ex2	16	agacgtggaggccatgtatc	gagtagagatgccgcagtt			X	
<i>Ehd3</i>	<i>Ehd3</i> int1	62	cgtgactccactactccttc	ctcatgcttggaaatctctg			X	
<i>Eps8</i>		95	cgggacagccagagataca	agagctcatcctgaacctcttc	X			
<i>Eps8</i>	<i>Eps8</i> ex9	85	cgtttctgagcttctaaaagga	agccctctgtctgcttgg		X		
<i>Fut10</i>		81	acaggacctccagcatcat	cgaggcaaaggttaagctgtc	X			
<i>Fut10</i>	<i>Fut10</i> ex2	81	acaggacctccagcatcat	gaggaagggaacccaactc		X	X	
<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i> ex3	94	tgaagggtctatggtatgt	tccactcatggcagggtaa			X	
<i>Gdpd3</i>		105	aagagatgcagggtctgtaa	ccagaacgatgccatatac	X			
<i>Gdpd3</i>	<i>Gdpd3</i> ex7	66	ggctgcagagaaaagctcag	taacccatggcagagaaaag		X	X	
<i>Gpr114</i>		2	gacagcagtgaggacgtgac	ccgtgtggatccatgtcc	X			
<i>Gpr114</i>	<i>Gpr114</i> ex1	71	gcccttttctctactgtgc	cccatgactgtcacctacc		X	X	
<i>Hebp1</i>		38	gggcatcactgtctattccac	gggtgcatgagcaacata	X			
<i>Hebp1</i>	<i>Hebp1</i> ex3	32	cctgagatttacgccctctg	atgccgactcctgaagcat		X		
<i>Hebp1</i>	<i>Hebp1</i> ex2	80	gttctactccccgtgtctc	ccttcacaggctcttctctc		X		
<i>Hoxa1</i>	<i>Hoxa1</i> ex1	77	tctggaaacctctgactcc	ctgtgccccagcataac			X	

<i>Lepr</i>		104	gttccaaacccaagaattg	gacttcaaagagtgtccgttctc	X	
<i>Lepr</i>	<i>Lepr_ex2</i>	56	tgatggctgttttctctgtctt	tgccaggttaagtgcagctat		X
<i>Loxl4</i>	<i>Loxl4_ex3</i>	26	aaacctcctcgcagct	cgctgtaccgtactccaca		X
<i>Ly6c1</i>	<i>Ly6c1_int2</i>	56	tgctcctatggagctggcta	accaagagccaccattgttc		X
<i>Myod1</i>	<i>Myod1_3'end</i>	71	tcacagcgaaggccactt	gccactcaaggatcagctct		X
<i>Mysm1</i>		12	cgctcaggtgcagctatgg	tgatgctgtactttcatcatttcc	X	
<i>Mysm1</i>	<i>Mysm1_ex5</i>	17	gctgtttgaacaaggactggta	atggattatgtacaatgacaaacagat		X
<i>No gene</i>	<i>No gene chr 6</i>	18	gttcctgccctggaact	tcccatagcaacctcaaca		X
<i>Nrn1</i>	<i>Nrn1_ex2</i>	108	tctcctccacagcttacct	gcccttaagactgcatcaca		X
<i>Prdx2</i>		12	ggactctcagttcaccacct	atattcagggggcccaag	X	
<i>Rpl29</i>		70	tccgatgacatccgtgacta	ccatttctgtgccatttgc	X	
<i>Rpl29</i>	<i>Rpl29_5'UTR</i>	4	cgatgacatccgtgactacag	aatctgatgccccatagc		X
<i>Rpl29</i>	<i>Rpl29_int3</i>	1	gatgacagtggtcataaactatcc	ttacaagaggccctaccctgt	X	X
<i>Rragb</i>	<i>Rragb_int2</i>	78	gaagaggaatggctccctt	ggacaaagtaaggaaaacgttag		X
<i>Shc2</i>	<i>Shc2_ex3</i>	92	atcaatcggctccatgagg	acaaccacaccaccttct		X
<i>Slamf8</i>	<i>Slamf8_ex2</i>	1	ggccgagtcagctatatga	cgctgtctccaggtttag		X
<i>Snf1lk</i>		74	gacggagagcgtctgatacc	ggtcctcgcattttctc	X	
<i>Snf1lk</i>	<i>Snf1lk_ex10</i>	89	tcaaccctcctgtaagtcca	agggcacatttcaagtgtc		X
<i>Tcfap4</i>	<i>Tcfap4_ex2</i>	68	tggagagaagctcagcaagg	cctgtgagagtacaacctct		X
<i>Tgfb3</i>		89	cgagtggctgtgaggaga	gctgaaaggtgtgacatgga	X	
<i>Tgfb3</i>	<i>Tgfb3_ex2</i>	20	gcacagagcagagaattgagc	ggaagaggaactggcaccta		X
<i>Tgfb3</i>	<i>Tgfb3_int2</i>	82	actccgtccagccttagat	gctcatccggtcgaagtac		X

3.10.3 Extended experimental procedures

Preparation of bone marrow-derived DCs

DCs were generated from mice bone marrow as previously described^{89,90}. Bone marrow cells were extracted from tibia and femur of 8-12 week old male mice and plated in 10 cm non-tissue culture-treated petri dishes (BD Bioscience) at 3×10^6 cells per plate, in 10 mL of complete RPMI medium (0.048 mM β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 10 % fetal bovine serum, 2 mM penicillin-streptavidin) supplemented with 10 ng/mL granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF, Invitrogen). At days 3 and 6 of culture, 10 mL of cRPMI with 10 ng/mL GM-CSF and 5 mL of cRPMI with 20 ng/mL GM-CSF, respectively, were added. To further induce DC maturation, 1 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich) was added at day 9 for 1h, 2h, 6h or, if not specified, at day 8 for an overnight incubation (16h). For analysis of STAT phosphorylation, day 9 DCs were harvested, centrifuged, resuspended in serum-free media and cultured for 3h prior to LPS treatment.

For co-culture experiment of B6.SJL WT and C57BL/6 bone marrow-derived DCs, sorting was performed on mature DCs (treated overnight with LPS). Cells were harvested and treated for 20 min with Fc Block CD16/CD32 (2.4G2; BD Bioscience) before staining with PEcy7-conjugated anti-CD11c (HL3; BD Bioscience), APC-conjugated anti-CD86 (PO3; BioLegend), APCCy7-conjugated anti-CD45.1 (A20; BD Bioscience) and FITC-conjugated anti-CD45.2 (104; BD Bioscience). Cells were sorted for CD11c⁺CD86⁺CD45.1⁺ (WT) or CD11c⁺CD86⁺CD45.2⁺ (dKO) profiles on a FACSAria Cell Sorter (BD Bioscience) available by the Institute for Research in Immunology and Cancer's flow cytometry core facility.

For transcript stability assays, mature DCs were treated for 1h, 3h, 6h or 12h with 5 μ g/mL actinomycin D (Sigma-Aldrich) or left untreated prior harvest, extensive washes and RNA extraction.

Adoptive transfer and immunization

CD8⁺ T cells from female OT-1 (CD45.2⁺) mice were CFSE labeled (Molecular Probes) as previously described⁹¹. Briefly, splenocytes were suspended at a concentration of 5×10^7 cells/ml in PBS. After warming to 37°C, CFSE was added at a concentration of 5 μ M for 10 minutes, followed by addition of ice-cold RPMI/FBS10% and cell recovery by centrifugation. 10^6 cells were subsequently injected i.v. into the tail vein of female B6.SJL (CD45.1⁺) mice. 24h later,

recipients were immunized by i.v. injection of 1×10^6 male WT or dKO mature DCs (treated O/N with LPS) pulsed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (2 μ M)⁹². 3 and 5 days following immunization, spleens were harvested and T cell response was analyzed by flow cytometry. Alternatively, a second immunization with WT or dKO DCs was performed at day 30, and spleens were harvested on day 32.

For Annexin V staining, harvested splenocytes were incubated with 5 μ l of Alexa Fluor 350 annexin V (Life technologies) in 100 μ l of annexin binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂) for 15 min at room temperature. After 10 minutes, 1.25 μ g/ml 7-AAD was added. OT-1 T cells were identified using PE-Cy7-conjugated anti-CD8a (53-6.7, BD Bioscience) and PE-conjugated anti-CD45.2 (104, BD Bioscience). Analyses were done on a BD LSR II flow cytometer using FACSDiva (BD Bioscience) and FCS v.3.0 (De Novo Software) softwares.

Calculating the frequency of responding OT-1 T cells

Division peaks (as determined by CFSE-intensity) were labeled from 0 to n . Since a single T cell dividing n times will generate 2^n daughter cells, if the total number of T cells which have divided three times ($n = 3$) is eight, then exactly one “precursor” (or responding T cells) had to divide three times to generate these eight cells ($2^3 = 8$). Making use of this mathematical relationship and of the experimentally determined number of events under each CFSE fluorescence peak, the absolute or the relative frequency of OT-1 precursors that responded to SIINFEKL-pulsed WT or dKO DCs could be calculated as previously described^{93,94}. Briefly, the sum of the extrapolated responding precursors for division cycles from 1 to n allowed us to determine the relative or the absolute size of the precursor sample pool which responded.

Catalytic activity of the proteasome

Proteasome-Glo™ used to measure the catalytic activities of the proteasome was purchased from Promega and assays were performed according to the manufacturer’s instructions. Briefly, 10^4 DCs treated (2 or 16h) or not with 1 μ g/mL LPS were added in 96-well plate (Costar) with the Proteasome-Glo™ Cell-Based reagent (Suc-LLVY-aminoluciferin, Z-LRR-aminoluciferin and Z-nLPnLDaminoluciferin for chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like activities, respectively). Luminescence intensity was measured using LUMIstar OPTIMA, from BMG

Labtech.

Chromatin Immunoprecipitation

Immature DCs (no LPS treatment) were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min, followed by 5 min with 1.25 M glycine to quench the reaction. Crosslinked samples were harvested, washed thoroughly with ice-cold PBS and snap-frozen as 30×10^6 cells aliquots until needed. Thawed samples were resuspended with cell lysis buffer (5mM Pipes pH 8, 85mM KCl, 0.5% NP40 with protease inhibitors). After 10 min of incubation on ice, samples were pelleted and resuspended with nuclei lysis buffer (50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 1% SDS) for another 10 min. Sonication was performed with a Bioruptor water sonicator (diagenode) at 4°C (20 times 30s ON/OFF at setup high). Efficiency of sonication was controlled on agarose gels. Samples were centrifuged, supernatant transferred into a new tube and 1/20 of samples kept as inputs. The remaining of the samples was diluted two times with ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton-X100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris pH 8, 167mM NaCl). Primary antibodies, either anti-H2B (abcam) or anti-ubH2B (Millipore), were added for an overnight incubation at 4°C. PBS/BSA-washed magnetic Dynabeads Protein G (Life Technologies) was added for additional 4h incubation. Samples were centrifuged, resuspended in dialysis buffer (2mM EDTA, 50mM Tris pH 8, 0.2% sarkosyl), and washed twice with dialysis buffer and 4 times with wash buffer (100mM Tris pH 9, 500 mM LiCl, 1% NP40, 1% sodium-deoxycholate). Samples were eluted from beads with freshly prepared elution buffer (1% SDS, 50mM NaHCO_3) for 10 min at 65°C followed by 15 min at room temperature under medium vortexing. After centrifugation at full speed, elution steps were repeated once again and pooled samples were supplemented with 0.2M NaCl. At this step, input samples were thawed, completed with elution buffer and 0.2M NaCl, and both ChIP-samples and inputs were reverse-crosslinked by an overnight incubation at 65°C. Samples were precipitated with ice-cold ethanol, resuspended in TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA), supplemented with 1 mg/mL RNase A for 30 min at 37°C and then with proteinase K buffer (5X: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM EDTA, 1.25% SDS) and 20mg/mL proteinase K for 2h at 45°C. Chromatin was purified using Qiaquick PCR cleanup kit (Qiagen), and qPCR experiments were performed. Primer sequences for qPCR are available in Table 3.S7.

Correlation between mRNA \log_2 ratio and predicted activity

A correlation coefficient calculation was performed between the \log_2 ratio of mRNA

differential expression and z-score of predicted activity of each regulator for the 4 time points of LPS treatment. For regulators present in more than one cluster, a correlation coefficient was calculated between the \log_2 ratio of expression and all combinations of z-score values found in the different clusters. A strong correlation was defined as ≥ 0.5 .

Functional analyses of differentially expressed genes

DEGs from cluster 1 to 15 were tabulated and uploaded into the IPA software (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>) along with their ratio of mRNA expression between WT and dKO at each time point. An upstream regulator analysis was performed from which we extracted the most drastically affected transcriptional regulators. Filters were placed to exclude indirect relationships and include only molecules described as “transcription regulator”. The right-tailed Fisher’s exact test was used to estimate the probability that association between a set of molecules and a regulator might be due to random chance ($p\text{-value} \leq 0.05$). The IPA’s z-score algorithm was used to predict the direction of change for a given regulator [increase ($z\text{-score} \geq 2$) or decrease ($z\text{-score} \leq -2$)] depending on the dKO/WT ratio of expression of its target genes within a cluster, for each time point (no LPS, 1h, 2h and 6h LPS). For each cluster, a heatmap was generated with the z-score values of any given regulator that had a $p\text{-value} \leq 0.05$ and a $z\text{-score} \geq 2$ or ≤ -2 at one of the time points.

A gene ontology over-representation analysis (ORA) was performed with InnateDB^{56,95} and lists of biological processes were extracted. The hypergeometric test was used to estimate the probability that association between a set of molecules and a biological process might be due to random chance. Significance was achieved when the adjusted p-values for multiple testing (Benjamini-Hochberg algorithm) was lower than 0.05.

Differential gene expression analyses

Differential gene expression was determined using R v3.0.1 software (<http://www.r-project.org/>) with the DESeq package⁵⁵. Comparisons were made between WT and dKO conditions at each time point of LPS treatment or between untreated and LPS-treated cells for WT and dKO independently. Significance was achieved when the adjusted p-values (adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure) was lower than 0.1. An independent filtering step, that removed about 40% of genes from the lowest quantile for overall sum of counts

for all conditions, was included to increase detection power by the multiple testing algorithm. Genes that were removed through filtering were found not to achieve statistical significance (data not shown), thus this step reduced the severity of the multiple testing adjustment without deliberately removing important differentially expressed genes.

The list of all 8,104 genes that showed significant differential expression between WT and dKO at any time point were analysed with MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>) for clustering analyses of their kinetic of differential expression. A figure of merit (FOM) for k-means clustering was calculated for a range between 1 to 40 clusters with our dataset. Graphical representation of these results (Figure 3.S2C) shows the predictive power of the k-means algorithm when using a varying number of clusters. We determined an optimal range between 11 and 17 clusters. K-means clustering was performed (Pearson correlation algorithm with a maximum of 50 iterations) for these numbers of clusters successively and each cluster was represented as a hierarchical tree (Pearson correlation with average linkage clustering, data not shown). We found that 15 clusters were necessary to adequately separate all groups of genes with similar kinetics, and that adding more clusters did not improve significantly clustering quality.

Immunoblot analyses

DCs were harvested and lysed in RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail (*Complete*; Roche), 1mM Na₃VO₄ pH9 and 5mM NaF. Samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the following antibodies: anti-H2A, anti-H2B and TRIM24 from Abcam, anti-calnexin and anti-β-actin (AC-15) from Sigma-Aldrich, anti-ubH2A, IRF3, pIRF3, STATs and pSTATs, RELA, RELB, NF-kB1 and NF-kB2 from Cell Signaling, anti-ubH2B from Millipore and IRF7 from SantaCruz. Following incubation with anti-mouse (BD Bioscience) or anti-rabbit (Cell Signaling) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies, chemiluminescent signal was detected using the GE Healthcare Detection Kit and a LAS-3000 imaging system (Fujifilm, GE Healthcare). Band intensities were quantified using the Multi Gauge V3-0 (Fujifilm) software. For detection of ubiquitylated proteins, cells were lysed in 20mM TRIS-HCl, pH7.5, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 10μM MG-132 (Calbiochem), 10mM NEM (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (*Complete*; Roche), as described in (Ebstein et al., 2013). Immunoblot was performed with anti-Ubiquitin from Santa Cruz and with anti-poly-Ub (FK1 clone) from Enzo Life Sciences.

Native gel immunoblotting

Native gel immunoblotting was performed as per ⁹⁶, with minor modifications. DCs were treated (1, 2, 6h) or not with 1 ug/mL LPS, collected in Blue-Native lysis buffer (20mM Bis-tris, 500mM ϵ -aminocaproic acid, 20mM NaCl, 2mM EDTA pH 8.0, 10% Glycerol, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM NaF, 0.5 mM Na_3VO_4 supplemented with Roche *Complete* protease inhibitor cocktail) and then lysed on ice for 15 minutes. Lysate was centrifuged at 13,000g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was dialyzed through a dialysis membrane (14 kD molecular weight cut-off) overnight at 4°C. Thirty micrograms of dialyzed proteins were supplemented with 0.05% of NativePAGE™ G-250 sample additive, then run on a 3-12% NativePAGE™ Bis-Tris gel (Life Technologies) in NativePAGE™ running buffer (Life Technologies) at 4 °C for 15 min at 100 V and then increased to 180 V for 4 hours. Cathode buffer was supplemented with 0.02% (for the first 15 minutes of run) or 0.002% (for the last 4 hours of run) of Coomassie G-250. For immunoblot with anti-LMP2, gels were briefly boiled in SDS-PAGE Laemmli 1x buffer. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF), blocked in 5% non-fat dry milk/TBS and immunoblot analysis was performed with anti-PSMA3 (Cell Signaling), anti-PSMD4 (Cell Signaling) or anti-LMP2 (abcam).

Microscopy

DCs were treated or not overnight with 1 ug/mL LPS to induce maturation. As negative control, one Petri dish was further supplemented with 10 ug/mL MG-132 (Calbiochem) for 2h. Cells were then harvested, washed with fresh media and plated onto 35 mm glass bottom dishes (MatTek) with RPMI 1640 media without phenol red (Life Technologies), supplemented with 25mM HEPES (Life Technologies). Cells were incubated for 2h with 200mM proteasome-bodipy fluorescent probe (generously provided by Dr Huib Ovaa from the Netherlands Cancer Institute), or without compound for the unstained control. After washes, cells were stained for 45min with Hoechst, further washed and visualized at 60X with a Delta Vision/Olympus 1X71 inverted fluorescence microscope with controlled temperature (37°C) and CO_2 .

mRNA purification

RNA samples prepared for RNA-sequencing experiments were further purified to isolate mRNA using Dynabeads Oligo (dT)₂₅ (Life Technologies) as instructed by the manufacturer. Samples were quantified using a NanoDrop spectrophotometer.

RNA-sequencing

RNA was extracted from 4 experimental replicates of WT and dKO DCs treated for 0h, 1h, 2h or 6h with LPS, for a total of 32 samples. Total RNA was isolated from 5x10⁶ cells per sample with TRIzol™ RNA reagent (Life Technologies) as recommended by the manufacturer. RNA extracted samples were treated with DNase I and purified using RNeasy Mini kit (QIAGEN). Sample quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer RNA Nano chips (Agilent Technologies). Transcriptome libraries were generated from 4 ug total RNA using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) following the manufacturer's protocols.

Paired-end (2 x 100 bp) sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 sequencer running TruSeq SBS v3 chemistry at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) genomics platform. Cluster density was targeted at around 600-800k clusters/mm². 16 transcriptomes were sequenced per lane (2 lanes total). Detail of the Illumina sequencing technologies can be found at <http://www.illumina.com/applications/sequencing.ilmn>. Sequence data was mapped to the mouse reference genome (mm9) using the Casava 1.8.1 and the Eland v2e mapping softwares (Illumina) by IRIC's bioinformatics platform. Reads were filtered for quality (Q30) and known contaminants. Reads that mapped two or more locations were not included in further analyses. Resulting mapped reads amounted to an average coverage of 29X of the annotated mouse transcriptome.

Cytoplasmic/Nuclear Fractionation

DCs were treated (1, 2, 6h) or not with 1 ug/mL LPS, collected in hypotonic lysis buffer (10mM HEPES pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 10 mM NaF, 2.5 mM Na₃VO₄, 10mM β-glycerophosphate, supplemented with Roche *Complete* protease inhibitor cocktail) and then swelled on ice for 15 minutes. Following addition of 0.625% of NP-40, samples were vortexed, centrifuged at full speed for 1 min and supernatant was kept

at -80°C (cytoplasmic fraction). Nuclei were resuspended in lysis buffer (20mM HEPES pH 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 10 mM NaF, 2.5 mM Na₃VO₄, 10mM β-glycerophosphate, supplemented with Roche *Complete* protease inhibitor cocktail), sonicated for 10 seconds, centrifuged at full speed for 5 minutes and supernatant was kept at -80°C (nuclear fraction).

RT-qPCR

Total RNA was extracted from cells with TRIzol RNA reagent (Life Technologies) as instructed by the manufacturer. For mRNA maturation assays, samples were further purified using DNase I (QIAGEN). Retro-transcription was performed as described by the manufacturer, and qPCRs were performed using the Taqman technology with the ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) available at the Institute for Research in Immunology and Cancer's genomic core facility. Results were analysed with the SDS 2.2.2 software (Applied Biosystems). Primers' sequences are available in Table 3.S7. A two-sided Student T-test was used for statistical analyses unless stated otherwise.

3.11 Bibliography

1. Collins, G.A. & Tansey, W.P. The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr.Opin. Genet.Dev.* **16**, 197-202 (2006).
2. Muratani, M. & Tansey, W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 192-201 (2003).
3. Minsky, N., *et al.* Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat.Cell Biol.* **10**, 483-488 (2008).
4. Higashi, M., Inoue, S. & Ito, T. Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation. *Exp Cell Res* **316**, 2707-2712 (2010).
5. Gillette, T.G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S.A. & Kodadek, T. Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **101**, 5904-5909 (2004).
6. Morris, M.C., *et al.* Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* **423**, 1009-1013 (2003).
7. Dantuma, N.P., Groothuis, T.A., Salomons, F.A. & Neefjes, J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J.Cell Biol.* **173**, 19-26 (2006).
8. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428 (2002).
9. Kloetzel, P.M. Antigen processing by the proteasome. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 179-187 (2001).
10. de Verteuil, D., Granados, D.P., Thibault, P. & Perreault, C. Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides. *Autoimmunity reviews* **11**, 627-635 (2012).
11. de Verteuil, D., *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol.Cell Proteomics.* **9**, 2034-2047 (2010).

12. Kincaid, E.Z., *et al.* Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat.Immunol.* **13**, 129-135 (2012).
13. Huber, M.L., Haynes, L., Parker, C. & Iversen, P. Interdisciplinary critique of sipuleucel-T as immunotherapy in castration-resistant prostate cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **104**, 273-279 (2012).
14. Toes, R.E., *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J.Exp.Med.* **194**, 1-12 (2001).
15. Princiotta, M.F., *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity.* **18**, 343-354 (2003).
16. van Deventer, S. & Neefjes, J. The immunoproteasome cleans up after inflammation. *Cell* **142**, 517-518 (2010).
17. Spaapen, R.M. & Neefjes, J. Immuno-waste exposure and further management. *Nat Immunol* **13**, 109-111 (2012).
18. Hensley, S.E., *et al.* Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J.Immunol.* **184**, 4115-4122 (2010).
19. Groettrup, M., Kirk, C.J. & Basler, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat.Rev.Immunol.* **10**, 73-78 (2010).
20. Basler, M., Kirk, C.J. & Groettrup, M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current opinion in immunology* **25**, 74-80 (2013).
21. Kitamura, A., *et al.* A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J.Clin.Invest* **121**, 4150-4160 (2011).
22. Atkinson, S.P., *et al.* A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **30**, 1373-1384 (2012).
23. Ferrington, D.A., *et al.* Immunoproteasome responds to injury in the retina and brain. *Journal of neurochemistry* **106**, 158-169 (2008).
24. Lipford, J.R., Smith, G.T., Chi, Y. & Deshaies, R.J. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature* **438**, 113-116 (2005).

25. Geng, F., Wenzel, S. & Tansey, W.P. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu. Rev.Biochem.* **81**, 177-201 (2012).
26. Muchamuel, T., *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat.Med.* **15**, 781-787 (2009).
27. Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R. & Kloetzel, P.M. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* **94**, 8970-8975 (1997).
28. Guillaume, B., *et al.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 18599-18604 (2010).
29. Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology* **18**, 716-731 (2007).
30. Granados, D.P., *et al.* MHC I-associated peptides preferentially derive from transcripts bearing miRNA recognition elements. *Blood* **119**, e181-e191 (2012).
31. Krishnan, N., *et al.* The prolyl isomerase Pin1 targets stem-loop binding protein (SLBP) to dissociate the SLBP-histone mRNA complex linking histone mRNA decay with SLBP ubiquitination. *Mol Cell Biol* **32**, 4306-4322 (2012).
32. Li, M.L., Defren, J. & Brewer, G. Hsp27 and F-box protein beta-TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1. *Molecular and cellular biology* **33**, 2315-2326 (2013).
33. Lehner, B. & Sanderson, C.M. A protein interaction framework for human mRNA degradation. *Genome research* **14**, 1315-1323 (2004).
34. Breig, O. & Baklouti, F. Proteasome-Mediated Proteolysis of SRSF5 Splicing Factor Intriguingly Co-occurs with SRSF5 mRNA Upregulation during Late Erythroid Differentiation. *PLoS One* **8**, e59137 (2013).
35. Bieler, S., *et al.* Low Dose Proteasome Inhibition Affects Alternative Splicing. *Journal of proteome research* **11**, 3947-3954 (2012).

36. Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C. & Mathis, D. Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* **140**, 123-135 (2010).
37. Amit, I., *et al.* Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science* **326**, 257-263 (2009).
38. Garber, M., *et al.* A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* **47**, 810-822 (2012).
39. Brckalo, T., *et al.* Functional analysis of the CD300e receptor in human monocytes and myeloid dendritic cells. *European journal of immunology* **40**, 722-732 (2010).
40. Yarovinski, F., *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**, 1626-1629 (2005).
41. Stoizner, P. & Romani, N. Langerin, the "Catcher in the Rye": An important receptor for pathogens on Langerhans cells. *European journal of immunology* **41**, 2526-2529 (2011).
42. Blasius AL, C.M. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends in immunology* **27**, 255-260 (2006).
43. Gaiser, M.R., *et al.* Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E889-E897 (2012).
44. Ohno, M., *et al.* A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Molecular immunology* **37**, 407-412 (2000).
45. Wang, M., *et al.* Mannan-binding lectin regulates dendritic cell maturation and cytokine production induced by lipopolysaccharide. *BMC immunology* **12**, 1 (2011).
46. Eisenbarth, S.C., *et al.* NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* **484**, 510-513 (2012).
47. Struyf, S., *et al.* Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3. *Blood* **117**, 480-488 (2011).

48. Casanova, J.L. & Abel, L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nature reviews. Immunology* **4**, 55-66 (2004).
49. Caudill, C.M., *et al.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J.Immunol.* **176**, 4075-4082 (2006).
50. Rabani, M., *et al.* Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nature biotechnology* **29**, 436-442 (2011).
51. Tippmann, S.C., *et al.* Chromatin measurements reveal contributions of synthesis and decay to steady-state mRNA levels. *Mol.Syst.Biol.* **8**, 593 (2012).
52. Hussong, S.A., Kapphahn, R.J., Phillips, S.L., Maldonado, M. & Ferrington, D.A. Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *J.Neurochem.* **113**, 1481-1490 (2010).
53. Ebstein, F., Kloetzel, P.M., Kruger, E. & Seifert, U. Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **69**, 2543-2558 (2012).
54. St-Pierre, C., *et al.* Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Scientific reports* **3**, 1860 (2013).
55. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010).
56. Breuer, K., *et al.* InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic Acids Res.* **41**, D1228-D1233 (2013).
57. Wehenkel, M., *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP2 induces apoptosis in PC-3 cells and suppresses tumour growth in nude mice. *Br.J.Cancer* **107**, 53-62 (2012).
58. Johnsen, A., France, J., Sy, M.S. & Harding, C.V. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res.* **58**, 3660-3667 (1998).

59. Singal, D.P., Ye, M., Ni, J. & Snider, D.P. Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines. *Immunol.Lett.* **50**, 149-154 (1996).
60. Muller, M., *et al.* The prognostic impact of human leukocyte antigen (HLA) class I antigen abnormalities in salivary gland cancer. A clinicopathological study of 288 cases. *Histopathology* **62**, 847-859 (2013).
61. Zheng, F., Hasim, A., Anwer, J., Niyaz, M. & Sheyhidin, I. LMP gene promoter hypermethylation is a mechanism for its down regulation in Kazakâ€™s esophageal squamous cell carcinomas. *Mol Biol Rep* **40**, 2069-2075 (2013).
62. Meissner, M., *et al.* Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* **11**, 2552-2560 (2005).
63. Ogino, T., *et al.* HLA Class I Antigen Down-regulation in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Lesions as a Poor Prognostic Marker. *Cancer Res* **66**, 9281-9289 (2006).
64. Fellerhoff, B., *et al.* The LMP7-K allele of the immunoproteasome exhibits reduced transcript stability and predicts high risk of colon cancer. *Cancer Res.* **71**, 7145-7154 (2011).
65. Atkins, D., *et al.* Down-Regulation of HLA Class I Antigen Processing Molecules: An Immune Escape Mechanism of Renal Cell Carcinoma? *The Journal of Urology* **171**, 885-889 (2004).
66. Jorissen, R.N., *et al.* Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 7642-7651 (2009).
67. Miyagi, T., *et al.* Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **18**, 32-40 (2003).
68. Lukasiak, S., *et al.* Proinflammatory cytokines cause FAT10 upregulation in cancers of liver and colon. *Oncogene* **27**, 6068-6074 (2008).

69. Dissemond, J., *et al.* Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res.* **13**, 371-377 (2003).
70. Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T. & Huber, C. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res.* **61**, 1095-1099 (2001).
71. Krishnakumar, S., *et al.* Major histocompatibility antigens and antigen-processing molecules in uveal melanoma. *Clin.Cancer Res.* **9**, 4159-4164 (2003).
72. Meidenbauer, N., *et al.* High frequency of functionally active Melan-a-specific T cells in a patient with progressive immunoproteasome-deficient melanoma. *Cancer Res.* **64**, 6319-6326 (2004).
73. Kageshita, T., Hirai, S., Ono, T., Hicklin, D.J. & Ferrone, S. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am.J.Pathol.* **154**, 745-754 (1999).
74. Anichini, A., *et al.* Association of Antigen-Processing Machinery and HLA Antigen Phenotype of Melanoma Cells with Survival in American Joint Committee on Cancer Stage III and IV Melanoma Patients. *Cancer Res* **66**, 6405-6411 (2006).
75. Leffers, N., *et al.* Down-regulation of proteasomal subunit MB1 is an independent predictor of improved survival in ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.* **113**, 256-263 (2009).
76. Hasim, A., *et al.* Post-Transcriptional and Epigenetic Regulation of Antigen Processing Machinery (APM) Components and HLA-I in Cervical Cancers from Uighur Women. *PLoS ONE* **7**(2012).
77. Mehta, A.M., Jordanova, E.S., Kenter, G.G., Ferrone, S. & Fleuren, G.J. Association of antigen processing machinery and HLA class I defects with clinicopathological outcome in cervical carcinoma. *Cancer Immunol.Immunother.* **57**, 197-206 (2008).
78. Hayashi, T., *et al.* Mice-lacking LMP2, immuno-proteasome subunit, as an animal model of spontaneous uterine leiomyosarcoma. *Protein Cell* **1**, 711-717 (2010).
79. Hayashi, T., *et al.* Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci.Rep.* **1**, 180 (2011).

80. Spirina, L.V., *et al.* Proteasome activity and their subunit composition in endometrial cancer tissue: correlations with clinical morphological parameters. *Bull.Exp.Biol.Med.* **153**, 501-504 (2012).
81. Hoves, S., *et al.* In situ analysis of the antigen-processing machinery in acute myeloid leukaemic blasts by tissue microarray. *Leukemia* **23**, 877-885 (2009).
82. Skov, V., *et al.* Whole blood transcriptional profiling reveals significant down-regulation of human leukocyte antigen class I and II genes in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Leuk.Lymphoma* **54**, 2269-2273 (2013).
83. Seliger, B., *et al.* Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin.Cancer Res.* **9**, 1721-1727 (2003).
84. Murakami, Y., Kanda, K., Yokota, K., Kanayama, H. & Kagawa, S. Prognostic significance of immuno-proteasome subunit expression in patients with renal-cell carcinoma: a preliminary study. *Mol.Urol.* **5**, 113-119 (2001).
85. Dovhey, S.E., Ghosh, N.S. & Wright, K.L. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res.* **60**, 5789-5796 (2000).
86. Zheng, G., Chaux, A., Sharma, R., Netto, G. & Caturegli, P. LMP2, a novel immunohistochemical marker to distinguish renal oncocytoma from the eosinophilic variant of chromophobe renal cell carcinoma. *Exp.Mol.Pathol.* **94**, 29-32 (2013).
87. Gao, W., *et al.* Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **64**, 399-408 (2010).
88. Raffaghello, L., *et al.* Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene* **24**, 4634-4644 (2005).
89. Wells, J.W., Darling, D., Farzaneh, F. & Galea-Lauri, J. Influence of interleukin-4 on the phenotype and function of bone marrow-derived murine dendritic cells generated under serum-free conditions. *Scandinavian journal of immunology* **61**, 251-259 (2005).

90. Son, Y.I., *et al.* A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *Journal of immunological methods* **262**, 145-157 (2002).
91. Meunier, M.C., Baron, C. & Perreault, C. Two host factors regulate persistence of H7-specific T cells injected in tumor-bearing mice. *PLoS One* **4**, e4116 (2009).
92. Leignadier, J., *et al.* Memory T-lymphocyte survival does not require T-cell receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20440-20445 (2008).
93. Gudmundsdottir, H., Wells, A.D. & Turka, L.A. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *Journal of immunology* **162**, 5212-5223 (1999).
94. Blais, M.E., *et al.* Why T cells of thymic versus extrathymic origin are functionally different. *J Immunol* **180**, 2299-2312 (2008).
95. Lynn, D.J., *et al.* InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. *Mol.Syst.Biol.* **4**, 218 (2008).
96. Fiala, G.J., Schamel, W.W. & Blumenthal, B. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J.Vis.Exp.* (2011).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4. Discussion

L'objectif de cette thèse était de caractériser certains rôles cellulaires de l'IP afin de mieux comprendre son impact dans l'organisme. Dans les chapitres 2 et 3, nous avons démontré que l'IP est un régulateur important des processus de présentation antigénique de classe I et de transcription, respectivement, chez les cellules dendritiques. Dans le présent chapitre, nous discuterons des principaux résultats obtenus et de l'apport ces découvertes à notre compréhension du rôle de l'IP dans ces processus particuliers. Nous relèverons également d'autres processus pour lesquels, à la lumière de nos résultats et de récentes observations dans la littérature, l'IP pourrait avoir un impact. En soulevant des effets non-redondants de l'IP et du PC, l'une des premières questions qui nous viennent à l'esprit est : comment, ou par quel mécanisme, ces deux types de protéasome parviennent-ils à différer dans leurs fonctions ? Nous discuterons donc des manières par lesquels ceux-ci pourraient choisir différemment leurs substrats. Les phénotypes associés aux différentes sous-unités catalytiques de l'IP, observés au cours de nos travaux et par d'autres groupes, seront aussi relevés afin de mieux comprendre l'avantage fonctionnel que pourrait allouer la grande plasticité du système ubiquitine-protéasome. Enfin, nous tenterons de voir comment nos résultats s'associent avec les phénotypes que peut procurer l'IP dans des troubles immunitaires, avant de terminer avec la conclusion de cette thèse.

4.1 Rôles cellulaires de l'IP

Nos approches expérimentales nous ont permis de répondre à l'objectif principal de cette thèse qui était d'élucider certains des mécanismes moléculaires de l'IP. Nos expériences ont été faites en comparant des cellules WT à des cellules knockout pour deux des trois sous-unités de l'IP (*Lmp7* et *Mecl1*, dKO) et non à une absence totale d'IP. Néanmoins, la quantité considérablement réduite de LMP2 incorporée aux complexes 20S chez les cellules dKO (figure 3.S1A) nous laisse croire que nos observations sont la conséquence d'une absence presque complète d'IP plutôt que de la présence de protéasomes mixtes LMP2- β 2- β 5. De plus, une étude ultérieure à la nôtre démontre que l'absence des trois sous-unités catalytiques de l'IP procure un phénotype de présentation antigénique semblable au nôtre¹, suggérant que la présence résiduelle de LMP2 dans nos cellules dKO n'a pas d'effet majeur, du moins sur ce processus. Dans cette section, les résultats obtenus sur les processus de présentation antigénique et de transcription seront d'abord revisités avec une emphase sur les résultats novateurs et qui, à mon avis, ajoutent à notre compréhension actuelle sur la fonction globale de l'IP.

4.1.1 Présentation antigénique de classe I

Dans le chapitre 2 de cette thèse, nous avons utilisé une approche protéomique à grande échelle pour étudier l'immunopeptidome de cellules dendritiques de type sauvage (WT). En éluant les peptides associés aux CMH I, nous avons pu évaluer de manière non-biaisée, sans marquage ou transfections, l'ensemble des peptides du soi présentés sur des cellules primaires. L'utilisation du contrôle négatif, soit des cellules provenant de souris $\beta 2m^{-/-}$ (knockouts pour la chaîne légère du CMH I et par conséquent ayant une quantité considérablement réduite de CMH I à la surface cellulaire), nous a permis de retirer de l'analyse les peptides dits contaminants, c'est-à-dire qui ne sont pas associés à un CMH I. Une première comparaison de nos résultats avec l'immunopeptidome de thymocytes² (figure 2.2) nous a démontré la nature cellule-dépendante du répertoire peptidique, suggérant que l'immunopeptidome est plastique et peut être façonné par son environnement cellulaire. Cette hypothèse a été étudiée plus en profondeur dans d'autres travaux de notre laboratoire et par d'autres groupes dont les résultats sont discutés dans l'Annexe I. Notamment, de récentes études démontrent que l'immunopeptidome varie de façon dynamique suivant des perturbations extracellulaires (infections virales, conditions métaboliques) et intracellulaires (transformation néoplasique, stress cellulaire), qui chacune peut affecter la synthèse ou la dégradation des protéines, deux processus à la base de la biogenèse de

l'immunopeptidome. Corolairement, nos résultats du chapitre 2 démontrent que l'IP, au cœur même du processus de dégradation des protéines, participe substantiellement à cette plasticité de l'immunopeptidome. En effet, en comparant le répertoire de peptides présentés sur les CMH I de cellules dendritiques WT et dKO, nous avons découvert que l'IP agit globalement à deux niveaux en augmentant 1) l'abondance des peptides à la surface cellulaire et 2) leur diversité en terme de protéines sources.

4.1.1.1 *L'IP augmente le nombre et la diversité des peptides sur les CMH I*

Nos résultats de spectrométrie de masse démontrent que 199 peptides, parmi les 417 détectés au total, sont plus abondants ou uniquement retrouvés sur les cellules WT alors que 212 peptides ont une abondance semblable sur les cellules WT et dKO. L'augmentation du nombre de peptides dans les cellules WT corrèle avec un modèle informatique, élaboré à partir d'expériences de dégradation *in vitro*, suggérant que le flux des substrats et leur taux de dégradation sont plus élevés en présence d'IP que de PC³. Les auteurs attribuent ces capacités accrues à la conformation spécifique et à une entrée plus large de la chambre catalytique de l'IP. L'augmentation de la diversité peptidique en présence d'IP a été confirmée par des essais d'immunisation *in vivo*, où des cellules dendritiques WT ont été injectées dans des souris dKO et vice versa (figure 2.3). Seules les souris dKO ont généré une réponse immunitaire contre les cellules dendritiques WT reçues. Par conséquent, les lymphocytes T WT n'ont pas reconnu les peptides présents sur les cellules dKO comme étant du « non-soi ». En effet, nos résultats de protéomique ont démontré que 6 peptides sont plus abondants à la surface des cellules dKO. Or, ces peptides sont aussi retrouvés sur les cellules WT, quoique de façon moins abondante. À l'opposé, 60 peptides ont été détectés uniquement en présence d'IP.

Ces résultats soulèvent une question intéressante à savoir si l'augmentation du nombre et de la diversité des peptides est due à un gain de fonction procuré par l'IP, ou à un effet additif de la présence des deux types de protéasome. Il est possible que les 212 peptides communs aux cellules WT et dKO soient générés par le PC et que les 139 peptides plus abondants (mais non exclusifs) sur les cellules WT sont produits préférentiellement par l'IP. Toutefois, l'absence de modèle murin contenant de l'IP mais exempt de PC nous empêche de comparer l'effet unique de l'IP à l'effet attribuable spécifiquement au PC. Néanmoins, nous avons une fois pour toutes confirmé l'importance de l'IP sur la production de l'ensemble des peptides du soi présentés par les cellules présentatrices d'antigènes par excellence, les cellules dendritiques. Cette observation est importante dans le cadre de la réponse immunitaire où les cellules infectées

doivent, pour maintenir l'intégrité de l'organisme, pouvoir présenter aux lymphocytes T des épitopes immunogènes. Or, la compétition est féroce parmi les peptides intracellulaires pour lier un CMH I (voir section 1.1.4.1) et l'élargissement du répertoire de peptides en présence d'IP pourrait augmenter les chances que les épitopes immunogènes soient présentés et reconnus par les CTLs.

Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de comparer l'impact de l'IP dans un autre contexte de réaction immunitaire. Nos cellules dendritiques étaient activées au LPS, situation de simulation d'infection bactérienne. Quelle serait l'importance de l'IP lors d'une infection virale, contexte où la présentation antigénique de classe I est d'autant plus importante ? En effet, les protéines virales sont synthétisées à l'intérieur de la cellule hôte. La présence d'IP devrait donc, selon cette hypothèse, augmenter les chances de présentation de peptides dérivant de protéines virales, favoriser l'activation de la réaction immunitaire et permettre l'élimination du virus. Or, en réalité, le bénéfice procuré par l'IP durant une infection virale est pour le moment nébuleux (discuté dans la section 4.4). Ceci suggère différentes possibilités : 1) l'IP permet de présenter des épitopes provenant de certains virus seulement, 2) l'IP est avantageux mais n'est pas suffisant pour produire des peptides immunogènes, ou 3) l'impact de l'IP sur l'immunopeptidome n'a pas d'influence sur les chances de détection des peptides viraux par le système immunitaire. Ce dernier point, associé au fait que l'IP n'est pas exprimé strictement en situation d'infection virale (voir sections 1.3.2.1 et 1.3.3), soulève d'ailleurs l'hypothèse que le rôle principal de l'IP pourrait se situer ailleurs que dans la présentation antigénique de classe I. Néanmoins, une série d'études peptidomiques à grande échelle telle que décrite dans le chapitre 2 sur différents modèles de cellules infectées par une variété de virus (et/ou autres pathogènes), corrélés à la réponse immunitaire en présence et en absence d'IP, nous permettrait de mieux comprendre le rôle de l'IP sur la présentation antigénique durant une infection.

4.1.1.2 L'IP clive préférentiellement dans des régions protéiques non-structurées

La comparaison de l'ensemble des peptides produits et présentés en présence et en absence de l'IP nous a permis de comparer les préférences de clivage de l'IP et du PC. Le protéasome est une carboxypeptidase et les sous-unités de l'IP et du PC ont des préférences particulières au niveau du résidu clivé (voir section 1.3.1). Nous démontrons ici que la position C+2, jouxtant le peptide sur la protéine source, est aussi importante pour le clivage et qu'un fort sous-enrichissement en leucines mais une préférence en prolines et en résidus polaires est favorisée chez les peptides IP-dépendants. La description récente de la structure

cristallographique de l'IP et du PC démontre d'ailleurs que le remplacement de $\beta 2$ pour MECL1 n'engendre pas de modification majeure du site catalytique, mais que le remplacement de $\beta 5$ pour LMP7 résulte en un élargissement de la poche S1⁴. Ceci permet à l'IP d'accommoder des résidus plus larges comme la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine, cadrant aussi avec une meilleure accommodation pour la proline. En utilisant un algorithme de prédiction des régions non structurées (c'est-à-dire exemptes de structures secondaires comme des hélices α et des feuillets β) dans les protéines sources de peptides, nous avons également observé que la présence prédominante de prolines chez les cellules WT concorde avec une plus grande proportion de régions non-structurées au même endroit (figure 2.4E). Par conséquent, nous avons proposé que l'IP clive préférentiellement des régions non structurées des protéines. Cette caractéristique pourrait avoir des conséquences sur le choix des protéines sources par le PC et par l'IP et est discuté davantage dans la section 4.2.

4.1.2 Transcription

Nous avons observé durant nos travaux que l'absence d'IP dans les cellules affecte aussi l'abondance des ARNm et ce, de façon intrinsèque (figure 3.1A). Cette observation a été confirmée par diverses méthodes : micropuces à ARN (chapitre 2), RT-qPCR (transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase quantitative) et séquençage d'ARN (chapitre 3). Dans l'article présenté au chapitre 3, nous dévoilons la première étude exhaustive de l'effet de l'IP sur l'expression génique.

4.1.2.1 L'IP affecte la stabilité de certains facteurs de transcription

Des essais de RT-qPCR nous ont permis de démontrer que l'absence d'IP n'affecte pas de façon globale la stabilité ou la maturation des transcrits (figure 3.3). Nos résultats suggèrent plutôt que l'IP agit principalement au niveau de la synthèse des ARNm. Étant donné sa nature de protéase, nous avons émis l'hypothèse que l'IP régule la stabilité de facteurs de transcription particuliers. D'ailleurs, nos expériences d'inhibition du protéasome confirment que l'activité protéolytique est nécessaire à la régulation de certains transcrits (figure 3.2B). En accord avec ces données, plusieurs protéines associées aux familles des IRFs, STATs et NF- κ B, importants dans la maturation et la fonction des cellules dendritiques et dans la réponse LPS-dépendante⁵⁻⁸, étaient moins abondantes en absence d'IP à différents stades de maturation cellulaire (figure

3.6B-C). Dans tous les cas (excepté pour STAT1), le niveau d'ARNm codant pour ces protéines n'était pas affecté : cela suggère une régulation post-transcriptionnelle de leur abondance et concorde avec la possibilité que la présence d'IP change la stabilité de ces protéines. Pour clairement démontrer la relation de cause à effet entre la quantité de ces facteurs de transcription et la perturbation du transcriptome, des essais de séquençage d'ARN (ou, à plus petite échelle, de RT-qPCR) devraient être effectués dans des cellules WT, suivant une diminution (avec des shRNA, petits ARNs en épingle à cheveux) ou une augmentation (par transfection) de l'expression des régulateurs candidats.

Dans le cas particulier de STAT1, la présence d'IP augmente à la fois son niveau d'ARNm et de protéine dans les cellules dendritiques naïves ou stimulées brièvement au LPS. Puisque STAT1 régule positivement l'expression d'IP en présence d'IFN γ ⁹, ces deux molécules pourraient constituer une boucle de rétroaction positive dans différents contextes. Étant donné leur abondance réduite chez les cellules dKO, les autres facteurs des familles des IRFs, STATs et NF- κ B testés seraient des cibles du PC plutôt que de l'IP. Cette hypothèse pourrait être validée 1) en utilisant des inhibiteurs du protéasome dans les cellules dendritiques WT et dKO et en comparant l'abondance des facteurs dans ces conditions, ou 2) par des essais de dégradation *in vitro* avec protéasomes purifiés et protéines recombinantes.

L'intrigante question demeure : y a-t-il donc des facteurs de transcription clivés spécifiquement par l'IP ? D'autres facteurs prédits comme étant plus ou moins actifs dans les cellules dKO (figure 3.6A) pourraient être testés pour leur abondance en présence ou en absence d'IP. Cependant, une façon plus exhaustive (et plus complexe) d'élucider cette question serait d'utiliser un inhibiteur du protéasome comme l'epoxomycine et d'isoler puis comparer l'ensemble des protéines ubiquitylées dans les cellules WT et dKO. Parmi les candidats s'accumulant avec le temps, les facteurs de transcription de même que tous les autres facteurs pouvant avoir un effet sur la transcription devraient donc être validés *in vitro* pour comparer leur taux de dégradation par l'IP et le PC.

4.1.2.2 L'IP et le PC affectent de façon non-redondante un nombre considérable de transcrits

Le traitement de cellules dendritiques au LPS entraîne une variation de l'expression de plusieurs milliers de gènes¹⁰. Nous avons observé par séquençage d'ARNm qu'un traitement de 6h affecte l'expression d'environ 10 000 gènes, à la fois chez WT et chez dKO (figure 3.S2A). Étonnamment, 65% des gènes contrôlés par la stimulation au LPS étaient aussi affectés par

l'absence d'IP : l'expression de près de 8000 gènes étaient significativement différente entre les cellules dendritiques WT et dKO à différents temps de maturation (figure 3.4). Malgré le taux de variation modeste de la majorité des gènes affectés (moins de deux fois pour environ 75% des cas), ce nombre impressionnant suggère que l'IP a un rôle à jouer dans la régulation du programme transcriptionnel général des cellules dendritiques et pourrait conséquemment affecter la fonction ou la maturation de ces cellules. Par ailleurs, nous avons observé une réduction de l'efficacité d'activation des cellules T CD8⁺ par les cellules dendritiques déficientes en IP lorsque pulsées avec un peptide modèle (ce qui élimine un effet CMH I-dépendant) (figures 2.S1 et 3.7), déficience qui pourrait, au moins en partie, être attribuable aux changements transcriptionnels provoqués par l'absence d'IP.

Les gènes affectés par l'IP étaient aussi différents selon le stade de maturation des cellules dendritiques. En effet, 3107 gènes (38%) étaient affectés par l'absence d'IP à un seul temps de traitement au LPS et l'ensemble des 8104 gènes différentiellement exprimés pouvaient être distribués en 15 différents groupes ayant une cinétique particulière (figure 3.4C). Qui plus est, nous avons démontré par RT-qPCR que le répertoire de gènes différentiellement exprimés entre WT et dKO varie aussi durant la différenciation des cellules dendritiques (figure 3.1B). Cela porte à croire que l'impact de l'IP sur le transcriptome dépend du contexte et qu'il pourrait être tout autre dans un type cellulaire différent. Notamment, un rôle sur le transcriptome de cellules T ou B pourrait expliquer certains phénotypes décrits dans des souris déficientes en sous-unités de l'IP dans la section 1.3.3. L'impact de l'IP sur le transcriptome aurait donc potentiellement des conséquences importantes durant la réponse immunitaire ou dans n'importe quelle cellule exprimant l'IP. Des études de transcriptome dans d'autres types cellulaires seraient nécessaires afin d'évaluer si le rôle de l'IP sur la transcription peut être généralisé à l'ensemble des cellules exprimant ce type de protéasome.

Enfin, nous avons démontré que l'absence de deux sous-unités de l'IP est nécessaire pour affecter l'expression des gènes testés (figure 3.2A). Il est aussi possible que l'absence d'une seule sous-unité affecte l'expression d'autres gènes que ceux observés par RT-qPCR. D'ailleurs, d'autres groupes ont observé que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de LMP7 (PR957) réduit l'expression de gènes codant pour certaines cytokines dans un modèle murin d'arthrite¹¹ et que les cellules B *Lmp2*^{-/-} traitées au LPS démontrent une dégradation retardée et incomplète d'IκB, l'inhibiteur du facteur de transcription NF-κB¹². Afin de bien saisir l'ampleur du rôle de chacune des sous-unités catalytiques et confirmer si l'absence de plus d'une unité est nécessaire pour affecter la transcription, il serait donc intéressant de comparer l'ensemble du transcriptome de cellules déficientes en LMP7, MECL1 ou LMP2 uniquement à celui des

cellules WT et dKO.

4.1.3 Autres rôles potentiels

Étant donné l'implication du PC dans la régulation de presque tous les processus cellulaires (section 1.2.1), il est difficile de croire que l'impact moléculaire de l'IP soit restreint aux processus de présentation antigénique et de transcription. En effet, l'équipe de Seifert *et al* a récemment démontré que l'IP joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif¹³. Dans des fibroblastes WT, un traitement à l'IFN γ produit une accumulation de protéines oxydées poly-ubiquitylées. Cette accumulation est temporaire, puisque l'IFN γ induit aussi l'expression de l'IP, en présence duquel les accumulations se résorbent après quelques heures. Dans des cellules *Lmp7*^{-/-}, cette résorption n'a pas lieu et l'accumulation de protéines oxydées/ubiquitylées est maintenue. Un effet similaire est observé dans les hépatocytes traités au LPS et dans le cerveau de souris atteintes d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), un modèle murin de sclérose en plaque. D'ailleurs, les souris *Lmp7*^{-/-} où l'EAE est induite présentent un phénotype d'inflammation et de sévérité de la maladie plus élevé que les souris WT ayant eu le même traitement. Par conséquent, un rôle additionnel de l'IP serait la maintenance de l'homéostasie et de la viabilité cellulaires en dégradant rapidement les protéines endommagées par l'oxydation durant l'inflammation (bien que ces résultats aient été contestés dans une publication ultérieure¹⁴). Un tel rôle pourrait d'ailleurs être utile dans les cellules dendritiques qui, lorsque stimulées, présentent aussi de façon transitoire une accumulation d'agrégats de protéines ubiquitylées appelés DALIS (structures agrégées induites de cellules dendritiques)¹⁵. La résorption de tels agrégats pourrait être achevée par la présence constitutive d'IP dans ce type cellulaire.

Parmi les gènes surexprimés chez les cellules dKO dans nos expériences se trouve un candidat particulièrement intéressant : *Apobec3* (enzyme d'édition de l'ARNm apolipoprotéine B, polypeptide catalytique 3), codant pour une déaminase impliquée dans la réponse antivirale. APOBEC3G, notamment, est une cytidine déaminase qui agit en introduisant des hypermutations dans le génome du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et autres rétrovirus endogènes^{16,17}. APOBEC3G utilise un mode d'action similaire à la famille de déaminases induites par activation (AID), entre autres impliquée dans l'édition et la commutation isotypique des BCR^{18,19}. Corrolairement, Hensley *et al* ont démontré que l'absence de LMP2 inhibe la commutation isotypique chez les lymphocytes B suite à une infection virale¹². L'IP serait donc potentiellement impliqué dans la régulation des processus d'édition d'ADN et/ou d'ARN en

contrôlant l'expression d'*ApoBec3* et/ou d'autres facteurs impliqués dans ces processus.

Enfin, deux observations ont été faites dans le chapitre 3 qui mériteraient une plus grande investigation : 1) l'absence d'IP affecte la maturation (ou l'épissage) de certains transcrits (figure 3.3B) et 2) l'absence de LMP7 corrèle avec une augmentation de l'ubiquitylation de l'histone H2B (figure 3.S3D). En lien avec le deuxième point, une déplétion d'ubiquitylation de H2A a été observée parallèlement à la surexpression de LMP7 dans les splénocytes traités à l'IFN γ ¹³. Ces observations suggèrent que l'IP pourrait aussi affecter le processus d'épissage de l'ARNm et la structure de la chromatine, quoique le mécanisme, l'ampleur et l'impact de tels rôles restent encore à définir. Pour avoir une meilleure idée de l'ensemble des processus cellulaires régulés par l'IP et de leur redondance avec le PC, il devient nécessaire de déterminer les cibles communes et spécifiques des deux types de protéasome (section suivante).

4.2 Ciblage des substrats par le PC et l'IP

Nos observations du rôle de l'IP sur la présentation antigénique de classe I et sur la transcription soulèvent de nouvelles questions. Notamment, on peut se demander comment, malgré leur structure hautement similaire, les deux types de protéasome parviennent à accomplir leurs rôles de façon non-redondante. Étant donné que la différence principale entre le PC et l'IP réside en leurs préférences de clivage, on aurait pu s'attendre à ce que leurs protéines cibles soient similaires, mais que le clivage s'opère à des endroits différents de ces mêmes protéines. Or, tel n'était pas (uniquement) le cas : dans notre étude de l'immunopeptidome de cellules WT versus dKO au chapitre 2, nous avons observé que l'absence d'IP diminue non seulement la diversité des séquences de peptides présentés sur les CMH I, mais aussi la diversité des protéines sources de ces mêmes peptides. Par conséquent, les protéines dégradées en présence et en absence d'IP sont différentes. En accord avec cette affirmation, nous avons aussi observé au chapitre 3 une diminution de l'abondance de certains facteurs de transcription (mais pas des ARNm) associés aux familles des STATs, des IRFs et de NF- κ B dans les cellules IP-déficientes. Ces facteurs sont donc vraisemblablement clivés davantage par le PC que par l'IP. Nous pouvons donc supposer que l'IP et le PC accomplissent des fonctions distinctes en ciblant différents substrats, ce qui nous mène à la question suivante : comment ?

L'intrigue de cette question prend source dans la structure même du protéasome : les sous-unités catalytiques, qui font la distinction entre l'IP et le PC, sont situées au centre du cœur catalytique 20S (voir figure 1.9). Elles ne devraient donc pas être en contact direct avec

le substrat avant son entrée dans la chambre catalytique. Selon la littérature actuelle, le rôle de reconnaissance des substrats est plutôt joué par les particules régulatrices 19S dans le cas du protéasome 26S, ou par les sous-unités α dans le cas du protéasome 20S isolé. Comment donc un échange de sous-unités catalytiques peut-il affecter le choix du substrat à dégrader ? L'expression de certaines enzymes d'ubiquitylation concorde avec l'expression de l'IP. Par exemple, une E2 (UBE2L6, de même qu'une vingtaine d'E3 ligases) est induite par l'IFN γ et est en partie responsable de l'accumulation de protéines ubiquitylées observée par Seifert *et al*¹³ (voir section 4.1.3). La présence de cette E2 concordant avec l'induction d'expression de l'IP, elle pourrait donc agir principalement en présence de ce dernier. Cependant, un ciblage différent des substrats selon l'expression contextuelle d'E2 ou E3 ne peut s'appliquer dans une situation où les cellules expriment constitutivement à la fois l'IP et le PC (comme dans les cellules dendritiques). D'autres mécanismes devraient donc expliquer de quelle manière les sous-unités de l'IP et du PC choisissent différemment leurs substrats.

4.2.1 Reconnaissance dépendante de l'activité protéolytique

La première possibilité serait via une reconnaissance « intra-20S », qui impliquerait une distinction de différents degrons, ou séquences associés à la dégradation, par l'IP et par le PC. Cette hypothèse s'associe bien avec notre prédiction que l'IP favorise le clivage de régions protéiques non-structurées (figure 2.4E). D'ailleurs, la présence de régions non-structurées a récemment été suggérée comme étant complémentaire à la chaîne poly-ubiquitine pour permettre la dégradation des protéines par le protéasome^{20,21}. L'expression « non-structurée » est générale et peut inclure à la fois des régions sans structure secondaire de protéines normales et des protéines mal conformées dû à un mauvais repliement ou des mutations. Environ le tiers des protéines contiennent intrinsèquement de larges segments non structurés qui leur permettent d'avoir une grande surface et une flexibilité d'interaction avec les autres protéines, propriétés utiles aux molécules impliquées dans les voies de signalisation²². Les protéines mal conformées, elles, sont généralement plus abondantes dans les cellules stressées et entraînent une promiscuité d'interactions pouvant favoriser la transformation néoplasique^{22,23}.

L'IP pourrait donc cibler davantage les protéines ayant une forte proportion de régions non structurées. Or, si tel est le cas, cela pourrait expliquer pourquoi l'IP gère plus efficacement une surcharge de protéines mal conformées en situation de stress oxydatif¹³ (section 4.1.3). De plus, cette préférence pourrait favoriser la production de peptides immunogènes, dérivant

de régions mutées (et par conséquent contre lesquels les lymphocytes T CD8⁺ ne sont pas tolérants). Bref, une préférence de l'IP pour le clivage dans une région non-structurée amènerait plusieurs avantages, notamment : 1) l'élimination des protéines mutées, mal conformées et ayant potentiellement une structure et une fonction aberrantes, 2) la gestion du stress cellulaire et 3) la production d'une plus grande quantité de peptides/CMH I immunogènes favorisant l'immunosurveillance de cellules anormales. Afin de tester cette hypothèse plus en avant, il serait intéressant de comparer le pourcentage et le nombre absolu de résidus provenant de régions prédites comme étant non-structurées dans les protéines sources des peptides détectés sur les CMH I des cellules WT versus dKO du chapitre 2. Ainsi, nous pourrions voir si les protéines à haute fréquence non-structurées étaient davantage représentées dans l'immunopeptidome de cellules exprimant l'IP. De façon plus concrète, des essais *in vitro* pourraient être effectués pour comparer le taux de dégradation de protéines structurées et mal conformées (ou avec divers pourcentages de régions non-structurées) en présence d'IP et de PC.

Bien que ce mécanisme puisse expliquer une partie des différences de substrats choisis par l'IP et par le PC, il est peu probable que cette explication soit la seule responsable. En effet, une affinité spécifique à la structure mais non à l'identité d'une protéine s'accorderait moins facilement avec son rôle de régulateur transcriptionnel, où le choix des substrats est dépendant du contexte cellulaire.

4.2.2 Reconnaissance indépendante de l'activité protéolytique

D'autres moyens impliqueraient une interaction indépendante de la chambre catalytique. Comment, alors, la reconnaissance pourrait-elle dépendre directement des sous-unités catalytiques de l'IP et du PC et non des sous-unités α ou des particules régulatrices ? La surface externe des sous-unités catalytiques pourraient potentiellement servir de site d'ancrage aux substrats, avec une séquence signal, un peu comme celle qui existe pour le transport nucléaire de certaines sous-unités du protéasome 20S^{24,25}. Ce site externe d'ancrage pourrait interagir avec différentes molécules impliquées dans le ciblage spécifique des protéines pour la dégradation : type d'embranchement de l'ubiquitine, UBLs ou autres modifications post-traductionnelles ainsi que différentes E3 ligases ou combinaisons d'enzymes E2 / E3. Une telle surface de reconnaissance sur la surface externe du cœur 20S pourrait aussi expliquer les différences de localisation entre le PC et l'IP. Par exemple, la présence d'IP autour du réticulum endoplasmique dans certains types cellulaires (section 1.3.2.3) s'expliquerait par une plus grande affinité de ses

sous-unités pour des protéines membranaires locales. Cette hypothèse nécessite davantage de support expérimental et une première stratégie pour élucider la question serait 1) de déterminer l'interactome de l'IP versus du PC par immunoprécipitation des complexes puis spectrométrie de masse, 2) choisir ensuite des interacteurs qui diffèrent entre l'IP et le PC et 3) voir l'effet de mutations ciblant les sous-unités catalytiques, au niveau de la surface interne ou externe par rapport complexe 20S, sur le maintien de l'association entre l'IP ou le PC et les interacteurs potentiels.

4.2.3 Un rôle 20S-indépendant pour les sous-unités catalytiques ?

Au cours de nos travaux, nous avons aussi observé que l'abondance de certains transcrits varie en absence d'IP mais de façon indépendante à l'activité protéolytique (figure 3.2C). Une possibilité expliquant ce résultat serait la longue demi-vie des régulateurs transcriptionnels responsables de l'expression de ces gènes particuliers, au-delà du temps de traitement à l'epoxomycin utilisé. Une autre explication, plus inusitée, serait la possibilité que les sous-unités catalytiques de l'IP et du PC puissent aussi agir indépendamment les unes des autres, hors du complexe 20S. Quelques données supportent pourtant cette possibilité.

D'abord, l'abondance des sous-unités catalytiques ne concorde pas nécessairement avec la quantité totale de protéasome. Par exemple, un groupe a observé une plus grande quantité de LMP2 et de LMP7 que de 20S total dans des fractions microsomales (incluant notamment le réticulum endoplasmique)^{26,27}. Ensuite, la localisation des sous-unités et la localisation des complexes 20S actifs ne se superposent pas entièrement. Cette observation a été faite notamment en comparant le signal d'un inhibiteur spécifique du protéasome couplé à un fluorophore au signal produit par la fusion d'une sous-unité du 20S à une autre molécule fluorescente²⁸. Alors que l'inhibiteur ne révèle que les complexes 20S matures, la protéine fusion peut aussi être décelée en tant qu'unité libre. Les différences de localisation ou d'abondance observés dans les études précédentes pourraient évidemment être provoquées par des effets techniques dus aux méthodes utilisées : purification non pure des compartiments cellulaires, changement de localisation dû au stress produit par l'inhibition du protéasome ou encore altération des propriétés natives de la protéine une fois fusionnée. Il serait donc important de comparer la localisation à la fois des unités libres et en complexe selon la même technique. Une équipe a récemment décrit l'utilisation de l'approche FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster, ou de fluorescence) pour identifier la composition du protéasome²⁹. Dans ce système, deux sous-unités

catalytiques sont ciblées par des inhibiteurs spécifiques à chacune, couplés à deux molécules fluorescentes A et B. Cette méthode, ou une variante utilisant des molécules fusion (comme LMP2-GFP³⁰ et β 7-RFP²⁸), pourrait être utilisée pour comparer la localisation des sous-unités de l'IP ou du PC à une unité présente dans les deux types de protéasome : l'excitation avec un laser de longueur d'onde optimale pour la molécule A permettrait de voir la proportion de sous-unités libres (détection de la longueur d'onde d'émission de la molécule A) et en complexe (diminution de l'émission A et augmentation du signal d'émission de la molécule B)³¹.

Il n'est pas clair quel genre d'activité pourraient accomplir les sous-unités catalytiques libres, sachant que leur activité protéolytique n'est promue qu'une fois incorporées au complexe 20S et leur pro-séquence N-terminale clivée (section 1.3.2.2). Or, chez la levure, la sous-unité SUG1 (RPT6) de l'unité 19S est reconnue pour avoir un rôle indépendant du complexe 26S en tant qu'hélicase de l'ADN³². Le ribosome est un autre exemple de complexe où les sous-unités constitutives peuvent avoir des rôles indépendants : RPL22 et RPL29 sont aussi présent à la surface cellulaire où ils interagissent avec l'héparine sulfate, un constituant de la matrice extracellulaire, dans la régulation de l'adhésion et de la croissance cellulaires^{33,34}. De plus, RPL4, RPS8 et RPS10 sont impliqués dans la régulation de la transcription³⁵. De façon similaire, les unités catalytiques du protéasome pourraient potentiellement agir indépendamment de leur site catalytique pour accomplir des fonctions non-protéolytiques.

4.3 Pourquoi plusieurs types de protéasome ?

Nous avons discuté dans les sections précédentes de la possibilité que l'IP et le PC choisissent leurs substrats de façon spécifique pour accomplir leurs différents rôles cellulaires. Or, aucune sous-unité de l'IP n'est essentielle à la survie d'un organisme et la description récente d'une souris tKO démontre que l'absence totale d'IP n'est pas non plus létale et n'affecte pas la santé générale des souris¹. La raison d'être de l'IP demeure donc énigmatique. Si elles ne sont pas essentielles à la survie, pourquoi depuis leur apparition dans la branche des vertébrés les sous-unités catalytiques de l'IP ont-elles été conservées ? Quel est le réel avantage à la présence de l'IP en plus du PC ? L'absence ou la mutation de certaines sous-unités de l'IP sont tout de même relevées dans des maladies chez la souris et chez l'humain (voir section 4.4). L'IP procure donc réellement un bénéfice à l'organisme. Pourquoi alors ne pas exprimer l'IP constitutivement dans toutes les cellules ?

4.3.1 L'IP : oui, mais pas trop

La formation d'IP est favorisée en présence de la chaperonne POMP (aussi induite par l'IFN γ) et sa demi-vie est considérablement plus courte que celles du PC (27h et 133h respectivement)³⁶. Par conséquent, il a été suggéré que la présence de l'IP durant la réponse immunitaire est rapide et transitoire, ce qui permettrait un retour expéditif à la présence prédominante de PC une fois le rôle de l'IP accompli. Cela suggère qu'une présence prolongée de l'IP dans certaines cellules pourrait être néfaste. D'ailleurs, dans un contexte de maladies inflammatoires, l'inhibition spécifique de l'IP s'avère bénéfique et permet de réduire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (voir section 4.4). Une autre possibilité pour expliquer l'absence constitutive d'IP dans la majorité des cellules serait qu'il ne puisse pas accomplir l'ensemble des tâches cellulaires effectuées par le PC. Ceci semble moins plausible étant donné la présence constitutive et prédominante de l'IP dans certains types cellulaires comme les splénocytes³⁷. L'explication la plus plausible est donc que l'IP procure un effet additionnel au PC dans des contextes particuliers. Afin de tester cette hypothèse et confirmer que l'IP et le PC ne sont pas interchangeables, il serait intéressant de produire une souris où les sous-unités du PC seraient remplacées par celles de l'IP et voir l'effet sur la viabilité de l'organisme et le comportement cellulaire. Cette même expérience pourrait aussi être faite chez la levure, pour la simplicité du système mais aussi, d'un point de vue évolutif, pour voir si les sous-unités de l'IP ont maintenu leur capacité de base en tant que constituants du protéasome, en absence de tout contexte pouvant impliquer le système immunitaire adaptatif.

4.3.2 Rôles non-redondants des différentes sous-unités de l'IP

Plusieurs articles font état de phénotypes attribués à certaines sous-unités particulières de l'IP. En effet, la diminution de la quantité de complexes peptides/CMH I à la surface cellulaire, telle que nous l'avons observée au chapitre 2 (figure 2.3B) est attribuable à l'absence de LMP7 mais non de MECL1^{38,39}. Selon nos observations, l'absence de LMP7 induirait aussi une augmentation du niveau d'ubiquitylation des histones H2B dans les cellules dendritiques immatures (figure 3.S3D, aussi observé chez les cellules dKO dans la figure 3.5A). D'un autre côté, MECL1 et LMP2 (mais pas LMP7) contrôlent de façon intrinsèque l'expansion homéostatique des lymphocytes T et la proportion des cellules T CD8⁺^{12,38,39}. Ces phénotypes sont aussi observés en absence combinée de la sous-unité en question et d'autres sous-unités de l'IP. En effet, les souris knockout pour les trois sous-unités de l'IP simultanément (tKO) présentent

une moins grande proportion de cellules T CD8⁺ (comme les souris *Mecl1*^{-/-} et *Lmp2*^{-/-} 38,39), une diminution de la quantité de CMH I à la surface cellulaire (comme les cellules *Lmp7*^{-/-} 38,39) et, comme nous l'avons observé chez les dKO au chapitre 2, un répertoire de peptides altéré à la surface cellulaire³⁶.

Toutefois, certains phénotypes sont spécifiques à une composition précise de protéasome. Par exemple, l'absence de LMP2 affecte le nombre de cellules T CD4⁺ et de lymphocytes B dans la rate, mais cet effet est perdu lorsque combiné à l'absence de MECL1¹². De plus, les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ dKO, mais non *Lmp7*^{-/-} ou *Mecl1*^{-/-}, prolifèrent plus rapidement et entrent moins en apoptose que les lymphocytes WT en réponse à une stimulation du TCR³⁹. Similairement, nous avons observé au chapitre 3 que l'absence combinée de LMP7 et de MECL1 est nécessaire pour affecter le transcriptome des cellules dendritiques, phénotype non observé chez les souris *Lmp7*^{-/-} et *Mecl1*^{-/-}. À noter que cette dernière observation a été faite strictement sur les gènes différentiellement exprimés entre WT et dKO et qu'il pourrait y avoir une différence d'expression entre WT et les sKO pour d'autres gènes.

Bref, ces observations démontrent que les sous-unités de l'IP ont chacune des effets particuliers et que la composition du protéasome (IP, PC et protéasomes mixtes) influence grandement son rôle dans différentes populations cellulaires. Ces différents phénotypes pourraient provenir des changements structurels ou catalytiques de la chambre protéolytique selon les diverses compositions du protéasome, permettant de cibler différents substrats ou, alternativement, d'une affinité variable des sous-unités catalytiques pour différents interacteurs, comme proposé dans la section 4.2.

4.3.3 Plasticité du système ubiquitine-protéasome

La possibilité de varier le rôle du protéasome en fonction de ses constituants comme proposé dans la section précédente est une idée pratique qui permettrait à la cellule d'ajuster sa réponse selon le contexte environnemental (type cellulaire, niveau d'activation, stimulus externe, etc.). Par exemple, en situation de stress, la présence d'IP permet 1) de mieux gérer l'accumulation rapide de protéines oxydées et agglomérées¹³ (section 4.1.3) et 2) d'activer un programme transcriptionnel particulier pour mener à bien la fonction cellulaire (chapitre 3). Nous avons également observé que l'IP a des propriétés de clivage différentes du PC (chapitre 2) et soulevé la possibilité que l'IP et le PC choisissent différemment leurs substrats (section 4.2). De plus, la localisation du protéasome dépend au moins en partie de ses constituants puisque

dans certains types cellulaires, la localisation de l'IP et du PC peut différer (voir section 1.3.2.3). Il semble donc que la composition des sous-unités catalytiques permette de moduler l'activité protéolytique en variant la fonction, l'activité, les substrats et la localisation du protéasome.

Qui plus est, d'autres unités inductibles par l'IFN γ comme PA28 α et PA28 β pourraient aussi contribuer à la fine régulation de l'activité du protéasome en fournissant le choix d'une panoplie de combinaisons d'unités : PC, IP, protéasomes mixtes et protéasomes hybrides (avec particule 19S et/ou PA28). La présence d'un motif KEKE dans PA28 α favorise les interactions protéine-protéine. Il a été suggéré que ce motif faciliterait le contact du protéasome avec la machinerie de production d'antigènes de classe I, notamment TAP, pour allouer un cheminement direct des peptides du cœur 20S au réticulum endoplasmique^{40,41}. Ceci supporte, encore une fois, l'hypothèse selon laquelle les combinaisons distinctes de protéasome favorisent différents rôles cellulaires.

Combiné à la diversité des enzymes E2 et E3 disponibles de façon contextuelle, le système ubiquitine-protéasome représente donc un outil à la fois malléable et particulièrement bien régulé pour maintenir l'homéostasie et permettre une réponse adéquate aux changements cellulaires.

4.4 Maladies impliquant l'IP

Le maintien de l'IP chez l'ensemble des vertébrés témoigne de l'avantage évolutif procuré par la plasticité du protéasome. Étant donné son expression prédominante dans des cellules et tissus immuns (section 1.3.2.1), l'avantage amené par les différents rôles de l'IP devrait se situer au moins en partie dans le contexte de la réponse immunitaire. Au moins deux programmes de transcription généraux sont activés par le traitement de cellules dendritiques au LPS via le récepteur TLR4 : une réponse inflammatoire et antivirale⁴². L'expression de groupes de gènes associés à ces deux catégories était d'ailleurs perturbée en absence d'IP dans nos expériences de séquençage d'ARNm du chapitre 3. En plus des rôles sur la présentation antigénique, la réponse au stress oxydatif et autres rôles potentiels, l'effet de l'IP sur la transcription pourrait donc avoir des conséquences particulièrement importantes durant la réponse immunitaire. Plusieurs études ont été effectuées par d'autres laboratoires afin de déterminer si la présence de l'IP influence la réponse contre les infections ou les maladies inflammatoires. Or, les résultats se sont avérés plutôt nébuleux.

4.4.1 L'IP et les virus

Dans différents modèles infectieux, l'absence de certaines sous-unités de l'IP diminue la réponse antivirale, comme les virus de la chorioméningite lymphocytaires (LCMV), de l'influenza A (IAV), de l'hépatite B (HBV) ou du cytomégalovirus murin (MCMV)^{12,43-46}. Les deux mécanismes principaux cités pour cette diminution de réponse sont la présence moins importante de précurseurs de cellules T spécifiques aux épitopes particuliers^{43,45,47}, et/ou l'absence d'épitopes particuliers ou un changement de hiérarchie d'immunodominance des épitopes présentés sur les CMH I^{44,45,47}. Dans d'autres cas, aucune différence de réponse n'est décelée comparativement aux souris WT⁴⁸. Or, les études diffèrent entre elles par le type de virus utilisé, la sous-unité de l'IP étudiée de même que par les conditions expérimentales employées. Le rôle intrinsèque de l'IP sur les cellules T semble aussi être contextuel : les cellules T *Lmp2*^{-/-}, *Mecl1*^{-/-} ou *Lmp7*^{-/-} transférées dans des souris WT infectées avec LCMV, mais pas avec IAV, prolifèrent moins et ont un plus grand taux d'apoptose que les lymphocytes T WT⁴⁹. Il est donc difficile de comparer les phénotypes rapportés et de définir l'impact ultime de l'IP dans la réponse antivirale *in vivo*. Qui plus est, les auteurs n'ont pas investigué d'effet peptide/CMH I-indépendant des cellules dendritiques IP-déficientes. Comme nos résultats *in vivo* le démontrent (figure 3.7), les cellules dendritiques dKO activent moins efficacement les lymphocytes T CD8⁺ et nous avons suggéré que le rôle de l'IP sur la transcription en est en partie responsable. Un tel rôle (une perturbation de l'expression de cytokines, par exemple) pourrait donc aussi influencer la réponse antivirale.

Or, l'effet variable de l'IP durant une infection virale pourrait aussi dépendre du mode de fonctionnement du pathogène : plusieurs mécanismes d'évasion ont été développés par les virus pour échapper à la surveillance du système immunitaire⁵⁰. Par exemple, la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) interagit avec le protéasome 20S⁵¹, modifie sa composition⁵² et peut inhiber *in vitro* l'expression de *Lmp2* en bloquant la liaison de IRF1 et STAT1 sur son promoteur⁵³. D'autres virus interfèrent aussi avec la fonction du protéasome, comme l'adénovirus E1A⁵⁴, le virus de l'hépatite B⁵⁵ et le virus T-lymphotrope de type I humain⁵⁶. Bref, le mécanisme de défense utilisé par le pathogène pourrait expliquer la dépendance de l'IP pour éliminer certains mais pas tous les virus. L'importance réelle de la présence de l'IP et son mécanisme durant une infection virale restent donc encore à éclaircir. Afin de bien déterminer son implication, il importe de comparer l'effet de l'absence de chacune des sous-unités et de l'absence complète d'IP dans des conditions expérimentales identiques, en investiguant l'implication de différents types de cellules immunitaires et ce, pour une variété de pathogènes. Une fois ces paramètres étudiés et l'implication de l'IP mieux définie, des essais

moléculaires pourraient être entrepris pour déterminer lequel ou lesquels des rôles cellulaires de l'IP (présentation antigénique, transcription ou autre) sont responsables de son effet.

4.4.2 L'IP et les maladies chroniques

D'un autre côté, l'inhibition ou la délétion de LMP7 s'avère généralement bénéfique dans le cas de maladies inflammatoires. Par exemple, une telle répression corrèle avec une réduction de la production de cytokines et une amélioration de la condition dans des cas d'arthrite rhumatoïde¹¹, d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale¹³ ou de colites humaines et murines⁵⁷. À l'opposé, des mutations dans le gène *Lmp7* sont associées à des cas de patients atteints de maladies autoinflammatoires⁵⁸⁻⁶⁰ et, chez la souris *Lmp7*^{-/-}, des symptômes similaires aux maladies autoimmunes peuvent se développer suivant une irradiation et une transplantation de moelle osseuse⁶¹. L'IP pourrait également être impliqué dans des maladies neurodégénératives : le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de Huntington est enrichi en LMP2⁶² ou à la fois en LMP2 et LMP7⁶³, respectivement. Il semble donc que le dosage d'IP soit important dans l'homéostasie de l'organisme, puisque l'inhibition de certaines sous-unités (ici LMP7) corrèle à la fois avec un meilleur ou un pire pronostic selon le désordre immunitaire en question.

Le mécanisme par lequel l'IP pourrait être impliqué dans ces maladies reste à définir, mais la diminution de cytokines produites par les cellules IP-déficientes dans le cas de maladies inflammatoires pourrait notamment être la conséquence d'une altération du transcriptome. La gestion de l'abondance des cytokines est importante pour contrôler le développement, l'immunorégulation et la fonction effectrice des cellules immunitaires et est donc cruciale dans l'établissement de notre défense immunitaire⁶⁴. La diversité des cytokines produites forme un équilibre complexe dont l'IP pourrait en effet être l'un des orchestrateurs. Les facteurs des familles NF- κ B et IRF, dont l'abondance en protéines était différente entre nos cellules WT et dKO, sont d'ailleurs impliqués dans la régulation de l'expression des cytokines : la dégradation de ces facteurs par le PC est nécessaire pour terminer la réaction immunitaire en temps opportun, sans quoi des pathologies peuvent découler⁶⁵. Le rôle de l'IP sur la transcription, additionné à sa fonction sur la présentation antigénique et ses autres rôles potentiels, pourraient donc faire de l'IP un régulateur important de la réponse immunitaire.

4.4.3 Potentiel bénéfique de l'IP hors du contexte immunitaire

Le facteur NF- κ B n'agit pas uniquement au niveau de la réponse immunitaire mais est aussi impliqué dans le développement du cancer (voir section 1.2.1.1). Or, une étude a démontré que l'inhibition spécifique de l'IP n'a pas d'effet sur l'activité du facteur de transcription NF- κ B dans certaines lignées cancéreuses⁶⁶. Néanmoins, l'expression de l'IP est perturbée dans différents types de cancers (voir tableau 3.S1) et bien que l'impact de l'IP dans la transformation néoplasique n'ait pas encore été défini, il est envisageable que son activité sur le transcriptome puisse y contribuer via la régulation de facteurs additionnels à NF- κ B. De plus, nous avons démontré que l'impact de l'IP sur l'expression génique affecte non seulement les cellules dendritiques mais aussi les précurseurs de moelle osseuse, suggérant que son rôle pourrait s'étendre à d'autres types cellulaires. Les phénotypes provoqués par l'absence d'IP dans les cellules souches, les tissus oculaires et le cœur (voir section 1.3.3) pourraient d'ailleurs être provoqués par des changements transcriptionnels.

En résumé, l'impact de l'IP apparaît donc important non seulement au niveau des cellules immunitaires et non immunitaires mais aussi au niveau de l'organisme : une mauvaise régulation de son expression pourrait affecter la réponse antivirale et le développement de maladies inflammatoires, autoimmunes et potentiellement de cancers. La contribution des différentes sous-unités de l'IP est aussi à déterminer. En effet, la plupart des phénotypes associés à des maladies ont été rapportés pour LMP7 mais peu de données existent pour les autres sous-unités catalytiques de l'IP. Il importe donc de définir si les sous-unités de l'IP jouent un rôle orchestrateur ou accessoire dans ces désordres, sous quelle forme (IP ou protéasomes mixtes) ainsi que le processus pour lequel leur rôle est perturbé, que ce soit la présentation antigénique, la transcription, le stress oxydatifs ou d'autres rôles encore non caractérisés.

4.5 Conclusion

Nos approches expérimentales nous ont permis de répondre à l'objectif principal de cette thèse qui était d'élucider certains rôles cellulaires de l'IP. Nous avons d'abord étudié l'impact global de l'IP sur la présentation antigénique de classe I. Ce faisant, nous avons pu déterminer ses deux contributions principales, soit l'augmentation du nombre et de la diversité des peptides à la surface cellulaire. Les différences de clivage observées entre les cellules WT et dKO pourraient expliquer en partie cette diversité du répertoire peptidique, notamment par l'affinité apparente de l'IP pour les régions protéiques non structurées. Or, nous émettons l'hypothèse que ce mécanisme ne soit pas la seule explication possible et que d'autres moyens de cibler les substrats, par exemple une interaction protéolytique-indépendante avec les sous-unités de l'IP, soient en cause.

Dans un deuxième temps, nous avons dévoilé un nouveau rôle de l'IP, intrinsèque et dépendant du contexte cellulaire, sur la transcription. En éliminant un effet majeur sur la stabilité ou la maturation des transcrits, nous avons pu déterminer que l'IP modifie l'abondance des ARNm en agissant au niveau de leur synthèse. L'impact sur le transcriptome des cellules dendritiques est majeur et semble être dû en partie à une dégradation différente de facteurs de transcription des familles IRF, STAT et NF- κ B plutôt qu'à une modification ubiquitine-dépendante de la structure de la chromatine. Les cellules dendritiques IP-déficientes activent moins efficacement les lymphocytes T CD8⁺ et nous croyons que cette défaillance puisse être causée au moins en partie par des différences transcriptomiques entre les cellules WT et dKO.

Or, l'impact cellulaire de l'IP pourrait être beaucoup plus grand. En plus de la présentation antigénique et de la transcription, nos données et les travaux d'autres groupes suggèrent que l'IP pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation du stress oxydatif, de l'épissage des transcrits, de l'édition de l'ADN et l'ARN et de la structure de la chromatine. À mon avis, la question à répondre est maintenant celle-ci : quelles sont les cibles spécifiques de l'IP et du PC ? La réponse à cette question fondamentale nous aiderait 1) à comprendre par quel mécanisme les deux types de protéasome reconnaissent différemment leurs substrats et 2) nous fournirait de nombreux indices sur les autres processus cellulaires régulés de façon non-redondante par l'IP et le PC. Il serait tout aussi intéressant de s'attarder aux sous-unités catalytiques individuelles, isolées ou en protéasomes mixtes et qui, selon les phénotypes cellulaires dépendants de leur présence, ont assurément une fonction biologique non négligeable. En effet, l'impact procuré par la plasticité de la composition du protéasome pourrait être immense et permettre d'ajuster finement la réponse cellulaire selon le contexte environnemental.

Notamment, cette plasticité pourrait servir durant la réponse immunitaire. Les niveaux d'expression de certaines sous-unités de l'IP sont altérés dans des cas de maladies chroniques et un blocage de son activité semble affecter la réponse face à certains virus. Il importe maintenant de savoir quelle est la contribution réelle des sous-unités de l'IP dans ces contextes : agissent-elles en conséquence à certaines défaillances cellulaires ou sont-elles à l'origine de ces désordres ? Les rôles de l'IP sur la présentation antigénique de classe I, la transcription de même que sur la gestion du stress oxydatif pourraient chacun contribuer au développement de ces désordres. Or, les deux derniers processus ne sont pas restreints aux cellules immunitaires et il importera également, à l'avenir, d'attirer davantage notre attention sur l'impact de l'IP dans des cellules exprimant l'IP hors du contexte immunitaire. Ainsi nous serons plus à même non seulement de définir les différents rôles de l'IP à l'échelle cellulaire, mais aussi de comprendre son importance au niveau de l'organisme.

4.6 Références bibliographiques

1. Kincaid, E.Z., *et al.* Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat.Immunol.* **13**, 129-135 (2012).
2. Fortier, M.H., *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* **205**, 595-610 (2008).
3. Mishto, M., *et al.* Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-alpha-beta and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *Journal of molecular biology* **377**, 1607-1617 (2008).
4. Huber, E.M., *et al.* Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* **148**, 727-738 (2012).
5. Jackson, S.H., Yu, C.R., Mahdi, R.M., Ebong, S. & Egwuagu, C.E. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J.Immunol.* **172**, 2307-2315 (2004).
6. Bell, B.D., *et al.* The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat.Immunol.* **14**, 364-371 (2013).
7. Doyle, S., *et al.* IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity.* **17**, 251-263 (2002).
8. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* **388**, 621-625 (2009).
9. Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S., Jr. & Monaco, J.J. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J Immunol* **169**, 3046-3052 (2002).
10. Garber, M., *et al.* A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol.Cell* **47**, 810-822 (2012).
11. Muchamuel, T., *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat.Med.* **15**, 781-787 (2009).

12. Hensley, S.E., *et al.* Unexpected role for the immunoproteasome subunit LMP2 in antiviral humoral and innate immune responses. *J.Immunol.* **184**, 4115-4122 (2010).
13. Seifert, U., *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613-624 (2010).
14. Nathan, J.A., *et al.* Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins. *Cell* **152**, 1184-1194 (2013).
15. Lelouard, H., *et al.* Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J.Cell Biol.* **164**, 667-675 (2004).
16. Esnault, C., *et al.* APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* **433**, 430-433 (2005).
17. Sawyer, S.L., Emerman, M. & Malik, H.S. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol.* **2**, E275 (2004).
18. Durandy, A. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur.J.Immunol.* **33**, 2069-2073 (2003).
19. Xu, Z., *et al.* Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit Rev.Immunol.* **27**, 367-397 (2007).
20. Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E. & Matouschek, A. An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat.Struct.Mol. Biol.* **11**, 830-837 (2004).
21. Zhao, M., Zhang, N.Y., Zurawel, A., Hansen, K.C. & Liu, C.W. Degradation of some polyubiquitinated proteins requires an intrinsic proteasomal binding element in the substrates. *J.Biol.Chem.* **285**, 4771-4780 (2010).
22. Gsponer, J., Futschik, M.E., Teichmann, S.A. & Babu, M.M. Tight regulation of unstructured proteins: from transcript synthesis to protein degradation. *Science* **322**, 1365-1368 (2008).

23. Vavouri, T., Semple, J.I., Garcia-Verdugo, R. & Lehner, B. Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity. *Cell* **138**, 198-208 (2009).
24. Tanaka, K., *et al.* Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett.* **271**, 41-46 (1990).
25. Wang, H.R., Kania, M., Baumeister, W. & Nederlof, P.M. Import of human and *Thermoplasma* 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. *Eur.J.Cell Biol.* **73**, 105-113 (1997).
26. Palmer, A., *et al.* Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem.J.* **316 (Pt 2)**, 401-407 (1996).
27. Brooks, P., *et al.* Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem.J.* **346 Pt 1**, 155-161 (2000).
28. Berkers, C.R., *et al.* Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol. Pharm.* **4**, 739-748 (2007).
29. Park, J.E., *et al.* A FRET-based approach for identification of proteasome catalytic subunit composition. *Mol.Biosyst.* **10**, 196-200 (2013).
30. Reits, E.A., Benham, A.M., Plougastel, B., Neefjes, J. & Trowsdale, J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *EMBO J.* **16**, 6087-6094 (1997).
31. Truong, K. & Ikura, M. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **11**, 573-578 (2001).
32. Fraser, R.A., Rossignol, M., Heard, D.J., Egly, J.M. & Chambon, P. SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *J.Biol.Chem.* **272**, 7122-7126 (1997).
33. Kirn-Safran, C.B., Dayal, S., Martin-DeLeon, P.A. & Carson, D.D. Cloning, expression, and chromosome mapping of the murine Hip/Rpl29 gene. *Genomics* **68**, 210-219 (2000).
34. Fujita, Y., *et al.* A novel heparin-binding protein, HBp15, is identified as mammalian ribosomal protein L22. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **199**, 706-713 (1994).

35. Brodersen, D.E. & Nissen, P. The social life of ribosomal proteins. *FEBS J.* **272**, 2098-2108 (2005).
36. Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M. & Kruger, E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A* **102**, 9241-9246 (2005).
37. Pelletier, S., *et al.* Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry. *Mol.Biosyst.* **6**, 1450-1453 (2010).
38. Zaiss, D.M., de, G.N. & Sijts, A.J. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect.Immun.* **76**, 1207-1213 (2008).
39. Caudill, C.M., *et al.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J.Immunol.* **176**, 4075-4082 (2006).
40. Realini, C., Rogers, S.W. & Rechsteiner, M. KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.* **348**, 109-113 (1994).
41. Yamano, T., *et al.* Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J.Exp.Med.* **196**, 185-196 (2002).
42. Amit, I., *et al.* Unbiased reconstruction of a mammalian transcriptional network mediating pathogen responses. *Science* **326**, 257-263 (2009).
43. Basler, M., Moebius, J., Elenich, L., Groettrup, M. & Monaco, J.J. An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J.Immunol.* **176**, 6665-6672 (2006).
44. Hutchinson, S., *et al.* A dominant role for the immunoproteasome in CD8+ T cell responses to murine cytomegalovirus. *PLoS One* **6**, e14646 (2011).
45. Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J.Exp.Med.* **193**, 1319-1326 (2001).
46. Robek, M.D., Garcia, M.L., Boyd, B.S. & Chisari, F.V. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. *J.Virol.* **81**, 483-491 (2007).

47. Pang, K.C., *et al.* Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J.Immunol.* **177**, 7680-7688 (2006).
48. Nussbaum, A.K., Rodriguez-Carreno, M.P., Benning, N., Botten, J. & Whitton, J.L. Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8⁺ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J.Immunol.* **175**, 1153-1160 (2005).
49. Moebius, J., van den Broek, M., Groettrup, M. & Basler, M. Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice. *Eur.J.Immunol.* **40**, 3439-3449 (2010).
50. Hansen, T.H. & Bouvier, M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat.Rev.Immunol.* **9**, 503-513 (2009).
51. Apcher, G.S., *et al.* Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Lett.* **553**, 200-204 (2003).
52. Gavioli, R., *et al.* HIV-1 tat protein modulates the generation of cytotoxic T cell epitopes by modifying proteasome composition and enzymatic activity. *J.Immunol.* **173**, 3838-3843 (2004).
53. Remoli, A.L., *et al.* Intracellular HIV-1 Tat protein represses constitutive LMP2 transcription increasing proteasome activity by interfering with the binding of IRF-1 to STAT1. *Biochem.J.* **396**, 371-380 (2006).
54. Chatterjee-Kishore, M., van Den, A.F. & Stark, G.R. Adenovirus E1A down-regulates LMP2 transcription by interfering with the binding of stat1 to IRF1. *J.Biol.Chem.* **275**, 20406-20411 (2000).
55. Fischer, M., Runkel, L. & Schaller, H. HBx protein of hepatitis B virus interacts with the C-terminal portion of a novel human proteasome alpha-subunit. *Virus Genes* **10**, 99-102 (1995).
56. Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F. & Jalinot, P. Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* **381**, 328-331 (1996).

57. Basler, M., Dajee, M., Moll, C., Groettrup, M. & Kirk, C.J. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J.Immunol.* **185**, 634-641 (2010).
58. Arima, K., *et al.* Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **108**, 14914-14919 (2011).
59. Agarwal, A.K., *et al.* PSMB8 encoding the beta5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy, microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **87**, 866-872 (2010).
60. Kitamura, A., *et al.* A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J.Clin.Invest* **121**, 4150-4160 (2011).
61. Zaiss, D.M., Bekker, C.P., Grone, A., Lie, B.A. & Sijts, A.J. Proteasome immunosubunits protect against the development of CD8 T cell-mediated autoimmune diseases. *J.Immunol.* **187**, 2302-2309 (2011).
62. Mishto, M., *et al.* Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol.Aging* **27**, 54-66 (2006).
63. Diaz-Hernandez, M., *et al.* Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J.Neurosci.* **23**, 11653-11661 (2003).
64. O'Shea, J.J., Ma, A. & Lipsky, P. Cytokines and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 37-45 (2002).
65. Kaisho, T. & Tanaka, T. Turning NF-kappaB and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol* **29**, 329-336 (2008).
66. Jang, E.R., *et al.* Revisiting the role of the immunoproteasome in the activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Molecular bioSystems* **8**, 2295-2302 (2012).

ANNEXE I

ARTICLE

Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides

Référence de publication :

Autoimmun Rev. 2012 Jul;11(9) :627-35

AI Origin and plasticity of MHC I-associated self peptides

Danielle de Verteuil^{a,b,1}, Diana Paola Granados^{a,b,1}, Pierre Thibault^{a,c}
and Claude Perreault^{a,b}

^a Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, Canada

^b Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

^c Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

¹Co-first authors with equal contribution

Keywords: Major histocompatibility complex; peptide; CD8 T cells; mass spectrometry; antigen presentation; autoimmunity; tolerance.

AI.1 Contribution des co-auteurs

J'ai participé à la rédaction de deux sections de cet article de revue et j'ai entièrement produit la figure principale de synthèse. Diana P. Granados, co-première auteure, a aussi participé à la rédaction de certaines sections de l'article et a effectué une revue de littérature pour produire les tableaux récapitulatifs. Claude Perreault a rédigé la majorité de l'article, et tous les co-auteurs ont commenté et corrigé l'ensemble du manuscrit.

AI.2 Abstract

Endogenous peptides presented by MHC I molecules represent the essence of self for CD8 T lymphocytes. These MHC I peptides (MIPs) regulate all key events that occur during the lifetime of CD8 T cells. CD8 T cells are selected on self-MIPs, sustained by self-MIPs, and activated in the presence of self-MIPs. Recently, large-scale mass spectrometry studies have revealed that the self-MIP repertoire is more complex and plastic than previously anticipated. The composition of the self-MIP repertoire varies from one cell type to another and can be perturbed by cell–intrinsic and –extrinsic factors including dysregulation of cellular metabolism and infection. The complexity and plasticity of the self-MIP repertoire represent a major challenge for the maintenance of self tolerance and can have pervasive effects on the global functioning of the immune system.

AI.3 Background

Self/non-self discrimination is a fundamental requirement of life. All organisms rely on their capacity of self/nonself discrimination to detect and reject allogeneic cells and microbes. While unicellular eukaryotes primarily employ self/nonself discrimination to avoid self-mating and germline parasitism, multicellular organisms use self/nonself discrimination primarily in immune defense^{1,2}. In a remarkable example of convergent evolution, agnathans and jawed vertebrates have evolved adaptive immune systems based on somatically diversified and clonally expressed Ag receptors^{3,4}. By allowing generation of exceedingly diversified repertoires of Ag receptors, somatic diversification conveys a decisive advantage in recognition of nonself. However somatic diversification comes at a price: some Ag receptors on adaptive lymphocytes happen to be self-reactive⁴. Therefore, while failure to respond to nonself can lead to death from infection, untoward adaptive immune response to self paves the way to autoimmunity. Furthermore, recognition of self has a pervasive influence on the development and function of the immune system because the adaptive lymphocytes of jawed vertebrates are eminently self-referential: they are selected on self-molecules, sustained by self-molecules, and activated in the presence of self-molecules^{5,6}. This raises the fundamental question: what is the molecular definition of self for the adaptive immune system? We will focus herein on the self recognized by CD8 T cells because recent large-scale (-omic) studies have yielded unprecedented insights into its genesis, molecular composition and plasticity⁷⁻³⁰ (Tables AI.1 and AI.2).

Table AI.1. MS-based studies of human MIPs

Cell line/ Tissue	Origin	MHC molecules	Reference
Panc-1	Pancreas	HLA-A02/11, B38/38, Cw12/12	19
MCF-7	Breast cancer	HLA-A02/02, B18/44, Cw05/05	19
PC3	Prostate cancer	HLA-A2, B7	7
UCI-107, UCI-101	Ovarian cancer	HLA-A2, B7	7
MDA-231, MCF-7	Breast cancer	HLA-A2, B7	7
C1R	B cell leukemia	HLA-A2, B7	7
Fresh plasma	Healthy donors and MM, AML and ALL patients	Many	23
HeLa	Cervical cancer	HLA-B27	24
SW-1353, C-20/A4	Chondro- sarcoma and immortalized chondrocytes)	HLA-B27	24

UCI-107	Ovarian cancer	HLA-Cw4	9
MDA-231	Breast cancer	HLA-Cw4	9
K562	Myelogenous leukemia	HLA-B*3501, 3502, 3503, 3504, 3506, 3508	16
Central nervous system	Brain autopsy samples of patients with multiple sclerosis	HLA-A01/02/03/11/25/30/68, B07/08/14/15/18/35/44/51, Cw-03/04/05/07/08	22
MCF-7, MDA-MB-231, and BT-20	Breast cancer	HLA-A*0201	17
MCF10A	Breast mammary gland	HLA-A*0201	17
HIV-infected and uninfected Sup-T1 cells	Lymphoma, T cell	HLA-B*0702	8
721.221	EBV-transformed B lymphoblasts	HLA-B*1801	10
Colon carcinoma	Colon carcinoma	HLA-A01/68, B08/44	11
Colon tissue	Normal colon	HLA-A01/68, B08/44	11
Awellis	EBV-transformed B lymphoblasts	HLA-A*0201/0201, HLA-B*4402/4402	11
UCI-107	Ovarian cancer	HLA-A02	12
SKOV3-A2, OVCAR3	Ovarian cancer	HLA-A2/3/29/68, B7/18/35/58	15
CRL-5865	Human lung adenocarcinoma	HLA-A02, B35/50	26
CRL-5944	Human lung adenocarcinoma	HLA-A2/32, B14/51	26
Normal and neoplastic renal tissue	Surgical biopsies	HLA-A01/02/03, B07/08/50, Cw06/07	21
Influenza A virus-infected and uninfected HeLa cells	Cervical cancer	HLA-A*0201	25
Normal and neoplastic renal tissue	Surgical biopsies	HLA-A02/03/68, B07/18/27/B57	14
TAP1/2-deficient and -sufficient cell lines	EBV-transformed B lymphoblasts	HLA-A02	18
DM331 and SLM2	Melanoma	HLA-A*0201	13
COV413	Ovarian carcinoma	HLA-A*0201	13
B lymphoblasts	EBV-transformed B lymphoblasts	HLA-A*0201	13

MM: multiple myeloma; AML: acute myeloid leukemia; ALL: acute lymphoblastic leukemia; EBV: Epstein-Barr virus

Table AI.2. MS-based studies of mouse MIPs

Cell line/ Tissue	Origin	MHC molecules	Reference
Bone marrow-derived dendritic cells	C57BL/6 mice, <i>Lmp7^{-/-}Mecl1^{-/-}</i> mice	H2K ^b , H2D ^b , Qa1, Qa2	29
Fresh splenocytes	C57BL/6 mice	H2K ^b , H2D ^b	20
Fresh thymocytes	C57BL/6 mice	H2K ^b , H2D ^b , Qa1, Qa2	28
EL4	Thymoma cell line	H2K ^b , H2D ^b , Qa1, Qa2	28,30

AI.4 The nature and role of the immune self recognized by CD8 T cells

The TCR of classic adaptive CD8 T cells recognizes MHC I-associated peptides (MIPs). MHC I genes are polygenic, extremely polymorphic and represent the most conserved MHC genes³¹. In most modern human populations, the majority of MHC I alleles have been acquired by introgression from archaic humans (Neanderthals and Denisovans)³². Under steady state conditions (in the absence of infection), all MIPs derive from endogenous self proteins: these MIPs are referred to as self MIPs or the self MHC I immunopeptidome (SMII)^{33,34}. Upon infection, pathogen derived nonself MIPs become the proverbial needle in the haystack (of self MIPs) against which the immune system must quickly respond. Self MIPs constitute the essence of self for classical adaptive CD8 T cells. The SMII regulates all key events that occur during the lifetime of CD8 T cells: positive and negative selection in the thymus and survival in the periphery³⁵⁻³⁷. The role of the SMII is not limited to orchestration of CD8 T-cell development and homeostasis. Constitutive expression of self MIPs allows CD8 T cells to monitor expression of neo-self MIPs on neoplastic cells and to behave as an extrinsic tumor suppressor system^{38,39}. Furthermore, evidence suggests that self MIPs excreted in body fluids act as chemosensory signals for neurons in the vomeronasal organs and may thereby influence mate selection and social behaviours in several vertebrates⁴⁰⁻⁴².

The MHC complex contains multiple MHC I loci that belong to two major classes: modern classical MHC Ia genes (e.g., HLA-A,-B,-C in humans) and more ancient MHC Ib genes (e.g., HLA-E and -G)⁴³. MHC Ib are oligomorphic, some but not all present MIPs, they are involved in several immune and non-immune processes but are less important in adaptive immunity than MHC Ia genes⁴³. In the present review, we will focus on MHC Ia genes which play a dominant role in adaptive immunity⁴⁴. All MHC Ia allelic products bind MIPs and MHC Ia genes are the most polymorphic genes known⁴⁵. In humans, HLA-B, with its 1,605 alleles,

is the most polymorphic gene of the entire genome (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>). MHC Ia molecules have a peptide binding groove containing in general 6 pockets; the size, shape and electrochemical properties of these pockets determine the peptide-binding motif of each MHC I allelic product⁴⁶. The combination of polygenicity and polymorphism has two important consequences: it ensures that each individual will be able to present a broad range of MIPs and that populations will consist of individuals presenting different MIP repertoires²⁷. Hence, in outbred animals, individuals present different SMII and consequently different T-cell repertoires. As a corollary, susceptibility to a variety of infectious and autoimmune diseases is dictated by the MHC I genotype because it regulates the ability to present and respond to various self and nonself MIPs⁴⁷⁻⁵².

AI.5 A synopsis of MHC I processing – making the most out of misbegotten polypeptides

The general mechanisms of MIP genesis and presentation have been elucidated by extensive studies on microbial Ags and model Ags such as ovalbumin⁵³⁻⁵⁶. The molecular composition of the SMII is intertwined with protein metabolism and is ultimately shaped by two processes: protein translation and degradation^{54,57}. Hence, generation of MHC I-associated peptides ceases abruptly in the presence of molecules that inhibit protein synthesis or proteasome function⁵⁸⁻⁶¹. In brief, MIP genesis begins with polypeptide degradation by the proteasome in the cytosol and nucleus⁵³. Peptides generated by proteasomal digestion are then exposed to several peptidases^{62,63}. These peptides have only a few seconds to bind to the transporter for antigen processing (TAP; an heterodimeric peptide transporter located in the endoplasmic reticulum and Golgi), and thereby escape total digestion⁵⁴. TAP-bound peptides are translocated into the endoplasmic reticulum or the Golgi where they can be further trimmed by aminopeptidases^{55,64}. Peptides of appropriate length (8-11 mers) which are able to bind MHC I allelic products expressed by the cell can then be inserted into MHC I proteins by the MHC I loading complex and exported at the cell surface⁶⁵. Large-scale MS studies have established the major impact of several components of the MHC I processing pathway on the MIP repertoire^{18,66}.

Only a small proportion of peptides derived from proteasomal digestion become MIPs: a cell generates approximately 2 million peptides per second, but only 150 are presented by MHC I molecules at the cell surface⁵⁴. Perhaps the most salient feature of MIPs is that they derive mainly from defective ribosomal products (DRiPs), that is, polypeptides that fail to

achieve native structure owing to imperfections in transcription, translation, post-translational modifications or protein folding^{54,67-70}. Several MIPs have been shown to originate from mRNAs that do not yield native full-length proteins^{71,72}. While the mean half-life of native (well structured and folded) proteins is about 24 h, that of DRiPs is about 10 min. Using DRiPs as a source of MIPs provides a mechanism for monitoring the expression of ~25% of cellular proteins that are targeted to the secretory pathway: cell surface or secreted proteins are degraded by extracellular proteases but their DRiPs are degraded by the proteasome and can therefore be inserted in the SMII. While compelling evidence suggests that DRiPs are the main source of MIPs, two basic questions have yet to be elucidated. First, why are DRiPs more successful than other polypeptides in generating MIPs? Perhaps because MIPs originate preferentially from a subset of ribosomes (immunoribosomes) that would possess specific features such as a high DRiP rate, lack of chaperones or tethering to TAP (which would couple translation to entry in the MHC I processing pathway)⁷³⁻⁷⁵. Second, what is the physical nature of DRiPs? In theory, DRiPs may include miscoded or misfolded proteins, premature translation-termination products, polypeptides produced by non-conventional translation mechanisms or intrinsically disordered proteins⁷⁴. Studies on cells transfected with shRNA or mRNAs carrying premature stop codons have revealed that the nonsense-mediated decay pathway is a source of both DRiPs and MIPs^{72,76}. However, in the absence of large-scale study of “natural” MIPs, the physical nature of self MIPs remains elusive.

AI.6 Different types of proteasomes generate different MIP repertoires

All eukaryotes possess constitutive proteasomes (CPs) whose 20S proteolytic core is hollow and provides an enclosed cavity open at both ends in which proteins are degraded⁷⁷. The 20S particle is composed of 14 different subunits organized in a barrel-shaped complex with the stoichiometry $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$. Three subunits of the two inner β -rings (β_1 , β_2 , and β_5) participate directly in peptide bond cleavage. Jawed vertebrates also express immunoproteasomes (IPs). In IPs, the three catalytic β -subunits expressed in CPs are replaced by three IFN- γ -inducible homologues (immunosubunits): low molecular weight protein (LMP)-2 (or β_{1i}) for β_1 , multicatalytic endopeptidase complex-like (MECL)-1 (or β_{2i}) for β_2 , and LMP7 (or β_{5i}) for β_5 ⁷⁸. Under steady-state conditions, IPs are expressed at high levels in some cell types (e.g., thymocytes and DCs) but in low amounts in other cell types⁷⁹. IFN- γ secretion enhances IP biogenesis in all cell types⁸⁰. The overall impact of IPs on the SMII was assessed by comparing

MIPs present on primary DCs obtained from either wild type (WT) or *Mecl1^{-/-}Lmp7^{-/-}* (dKO) mice²⁹. Out of 417 MIPs eluted from WT DCs, 212 were expressed at similar levels on dKO DCs. However, 199 peptides were overexpressed in WT relative to dKO DCs. Among those 199 peptides, 60 were detected exclusively in WT DCs. Only 6 peptides were slightly overexpressed (3 to 5-fold) in dKO relative to WT DCs and none were unique to dKO DCs. Consistent with these findings, expression of cell surface H2D^b and H2K^b was decreased by 2-fold on dKO relative to WT DCs^{29,81}. Furthermore, following immunization with WT DCs, both dKO and *Lmp7^{-/-}* mice generated WT-specific cytotoxic T cells whereas WT mice did not generate cytotoxic effectors against *Lmp7^{-/-}* or dKO cells^{29,82}. Therefore the presence of IPs has a major impact on the SMII, by increasing both the abundance and the diversity of MIPs. There are however rare exceptions to this rule since IPs have been shown to destruct several tumor-associated Ags that can be produced by CPs⁸³. In particular, CPs are more effective than IPs for generation of spliced MIPs^{84,85}. It should be noted that generation of MIPs is not the sole function of IPs. Indeed, IPs have non-redundant effects on gene expression and protein homeostasis that are probably of considerable biological relevance^{29,86,87}.

The most recently discovered proteasome subunit is being at the origin of a fascinating story. Murata and colleagues found that cortical thymic epithelial cells (TECs) express a unique variety of proteasome, called the thymoproteasome (TP)⁸⁸. The catalytic subunits of TPs are β 1i, β 2i and β 5t. β 5t (encoded by the *Psmb11* gene) is found exclusively in cortical TECs⁸⁸. Cortical TECs from *Psmb11^{-/-}* express normal amounts of MHC I at the cell surface and contain IPs rather than TPs. However, *Psmb11^{-/-}* mice are unable to support positive selection of most polyclonal and TCR-transgenic CD8 T cells⁸⁹. Furthermore, *Psmb11^{-/-}* CD8 T cells are defective in mounting immune responses to allogeneic and viral antigens⁸⁹. Together, these studies provide compelling, though indirect, evidence that cortical TECs express a unique set of MIPs that are essential for positive selection of classic TCR $\alpha\beta$ CD8 T cells. The global impact of TPs on the MIP repertoire of cortical TECs has yet to be evaluated. Nonetheless, *in vitro* activity-based profiling studies suggest that β 5t has a substrate preference distinct from β 5 and β 5i⁹⁰.

AI.7 The SMII is complex and is not a representative excerpt from the proteome

A typical cell expresses about 10⁵ MHC I molecules. What is the breadth and nature of their peptide repertoire? Currently, this question can be answered only by mass spectrometry

(MS) analyses of MIPs. Progress in this field has been heralded by the development of MS instruments whose sensitivity, dynamic range and mass accuracy are orders of magnitude superior to those of analyzers available a decade ago⁹¹⁻⁹³. State-of-the-art MS instruments can sequence low femtomole amounts of peptides and have greatly facilitated high-throughput analyses of MIPs. MS can provide absolute peptide quantitation (i.e., number of peptide copies per cell) by comparing the abundance of endogenous MIPs to known amounts of their corresponding isotopically-labeled counterparts. However, given the considerable complexity of the SMII, this effort has been largely undermined by the sizable peptide synthesis challenges needed for absolute quantitation of SMII components. Most quantitative proteomics analyses have therefore focused on the relative quantification of MIPs in different samples²⁷.

Theoretical estimates suggest that the SMII accommodates only a small portion of the proteome. Thus, a typical cell (human leukocytes for instance) expresses about 18,000 different proteins⁹⁴ with a mean length of 466 amino acids⁹⁵ (containing 458 potential nonamers) and would therefore contain over 8×10^6 distinct nonamers (the mean length of MIPs). Furthermore, by adding peptides generated by translation of alternate reading frames or post-translational modifications^{71,96-103}, the total number of nonamers is probably greater than 10^7 . On the other hand, MS analyses suggest that the number of distinct MIPs present at the cell surface is about 10^4 ^{27,104}. This would mean that the SMII comprises about 0.1% ($10^4/10^7$) of the polypeptide sequences found in the proteome. Does the SMII derive essentially from highly abundant proteins? Milner *et al.* performed MS analyses of MIPs eluted from a tumor cell line transfected with an expression vector coding soluble secreted HLA-A2.1 (lacking a functional transmembrane domain) to evaluate the relationship between protein abundance and the SMII¹². Remarkably, they only found a minimal correlation (about 6%) between the amounts of MIPs and the relative abundance of their source protein: a large proportion of MIPs derived from low abundance proteins, and many highly abundant proteins did not generate MIPs in detectable amounts¹². In order to evaluate the identity and properties of proteins that generate MIPs, Hickman *et al.* sequenced by MS over 200 MIPs derived from a B cell line engineered to secrete soluble HLA-B*1801. This seminal study showed that MIPs derive from a wide variety of proteins coded by genes located on all chromosomes¹⁰. Consistent with subsequent reports, MIP source proteins were distributed in all cell compartments but showed a significant enrichment in intracellular relative to extracellular proteins^{10,28,105}. These and other high-throughput studies provided direct evidence that the SMII is complex^{10,12,14,28-30}. The poor correlation between the proteome and the SMII can be rationalized by the DRiP model¹². Almost all protein species have two half-lives: a longer one for the well-conformed native protein and a short one for DRiPs. While the proteome essentially contains native proteins, MIPs originate mostly from DRiPs^{54,67}. It is

therefore assumed that proteins have different DRiP rates and that self MIPs originate mostly from proteins with high DRiP rates^{106,107}.

AI.8 The SMII conceals a tissue-specific signature

High-throughput MS-based analyses of self MIPs eluted from primary mouse thymocytes revealed that the SMII is molded by the transcriptome. In thymocytes, the percentages of transcripts expressed at high/intermediate/low levels were 9/29/62 for total mRNAs and 42/38/20 for those coding for MIPs²⁸. Hence, even though some low abundance transcripts can generate MIPs, the SMII is biased toward MIPs translated from highly abundant mRNAs. This concept was confirmed in a bioinformatic study of the expression profile of transcripts coding for MIPs listed in the SYFPEITHI database¹⁰⁸: out of the 2.5% most abundant mRNAs expressed in a pool of hematopoietic tissues, 41% encoded MIPs¹⁰⁵. The correlation between mRNA abundance and MIP abundance is consistent with evidence that the rate of translation initiation directly correlates with MIP presentation^{58,61}. As a corollary, since abundance of discrete mRNAs varies among different cell types, different tissues should display different SMII. This assertion was evaluated by comparing the SMII of primary thymocytes and myeloid dendritic cells (DCs) from C57BL/6 mice. Since MHC I molecules are more abundant on DCs than on thymocytes, more MIPs were eluted from DCs than from thymocytes. Nonetheless, the key finding was that over 40% of MIPs were cell type specific²⁹. The MIP repertoire of myeloid DCs was enriched in peptides encoded by genes regulating proteasome function, myeloid differentiation and TLR signaling. In thymocytes, MIP source genes were biased toward cell cycle regulation, purine metabolism and tight junction formation. The fact that a substantial proportion of self MIPs are cell type-specific increases the complexity of the immune self at the organismal level.

AI.9 Neoplastic transformation has a broad impact on the SMII

Neoplastic transformation perturbs the two key processes that mould the SMII: protein translation and proteasomal degradation^{109,110}. With hindsight, MIPs expressed exclusively or at increased levels on tumor cells (tumor-associated MIPs) were therefore bound to exist. Over the last two decades, numerous tumor-associated MIPs have been molecularly defined and many of them were shown to be immunogenic for CD8 T cells^{111,112}. Tumor-associated MIPs

are encoded by a variety of mutated and non mutated genes. A well curated and up-to-date database on human tumor-associated MIPs can be found at <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>. The majority of tumor-associated MIPs were discovered using biased approaches targeting principally oncogenes and other genes overexpressed in cancer cells. Recently, two studies have used unbiased large-scale MS-based strategies to evaluate more globally how neoplastic transformation impinges on the SMII^{14,28}. Though the experimental design of these studies was different, they yielded strikingly concordant results. Weinzierl *et al.* evaluated the relative abundance of MIPs isolated from three human renal cell carcinomas and autologous normal kidney tissue. They sequenced a total of 273 MIPs, of which 45 (16%) were differentially expressed on neoplastic relative to normal kidney tissue: 30 MIPs were more abundant on tumor tissue (including 10 MIPs found only in carcinoma cells) and 15 MIPs were more abundant on normal tissue¹⁴. Fortier *et al.* compared the SMII of normal vs. neoplastic C57BL/6 mouse thymocytes. Out of 196 MIPs, 43 (22%) were differentially expressed: 21 MIPs were more abundant on tumor cells (including 9 tumor-specific MIPs) while 22 were more abundant on normal thymocytes²⁸. Tumor-associated MIPs are of prime interest, mainly for two reasons: they represent potential targets in cancer immunotherapy and they can elicit paraneoplastic autoimmunity^{113,114}. Notably, in both renal carcinoma and thymoma cells, changes in the SMII induced by neoplastic transformation did not correlate closely with changes in the transcriptome^{14,28}. Thus, for 74% of thymoma-associated MIPs, increased peptide abundance did not correlate with increased mRNA levels²⁸. Two conclusions can be drawn from these two studies. First, neoplastic transformation has a broad impact on the SMII as it led to differential expression of about 20% of self MIPs. The breadth of this impact is commensurate with the profound perturbations in protein metabolism that characterize cancer cells³⁸. Second, global changes in the SMII can be detected only by MS-based expression profiling approaches and cannot be inferred from mRNA expression levels. As a corollary, we infer that genesis of tumor-associated MIPs involves mainly posttranscriptional mechanisms that have yet to be characterized.

Cells release low amounts of soluble HLA molecules into the blood. Remarkably, Admon's team recently demonstrated that MS analyses of the SMII bound to plasma soluble HLA molecules allowed identification of tumor-associated MIPs in subjects with leukemia or multiple myeloma²³. MS analyses of the plasmatic SMII may hold considerable potential for diagnosis and monitoring of various illnesses.

AI.10 Viral infection causes presentation of cryptic self MIPs

Alike neoplastic transformation, intracellular pathogens drastically impinge on the synthesis and degradation of host cell proteins^{115,116}. This led Hildebrand's group to test whether viral infection might lead to presentation of neo-self MIPs. To this end, they analyzed HLA-B*0702-bound peptides extracted from a cell line infected or not with HIV-1⁸. MS analyses led to the identification of 15 MIPs unique to or upregulated on HIV-1 infected cells. These MIPs derived from a variety of proteins: chaperones, proteins involved in RNA transcription or translation, and components of the ubiquitin-proteasome system. The abundance of transcripts coding for MIPs unique to or upregulated on infected cells was not significantly increased. Thus, differential MIP presentation was likely due to posttranscriptional mechanisms⁸. More recently, MS-based comparison of HLA-A*0201-transfected HeLa cells infected or not with influenza A virus identified 20 MIPs unique to infected cells²⁵. One salient implication emerges from these studies: infected cells present two classes of neo-MIPs to the immune system, some derive from the pathogen others from the host. The appearance of neo-self MIPs on infected cells raises the possibility that the SMII might conceal a molecular signature of host proteins hijacked by the virus.

AI.11 The SMII conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation

While neoplastic transformation and infection are relatively rare events, cells are constantly subjected to variations in nutrients and growth factors concentrations. Is the molecular composition of the SMII affected by cellular metabolic activity? To investigate this issue, our group used a quantitative high-throughput MS-based approach to study the MIP repertoire of EL4 mouse cells treated or not with the mTOR inhibitor rapamycin. mTOR integrates environmental cues (nutrients and growth factors), and mTOR signaling is regulated in numerous physiological and pathological conditions in all types of cells¹¹⁷⁻¹¹⁹. Treatment with rapamycin for up to 48h led to a progressive increase (≥ 2.5 -fold) in the abundance of 98 MIPs, 6 of which were present only on treated cells³⁰. Analyses of transcripts levels, translational activity (polysomal loading), protein abundance and stability revealed that variations in MIP abundance were regulated at multiple levels inside the cell. Upregulation of MIPs could be ascribed to enhanced transcriptional activity in some cases ($\leq 36\%$) and to co- or post-translational events in most cases ($\geq 64\%$). Importantly, analyses with the STITCH and STRING interaction databases

showed that genes coding for differentially expressed MIPs segregated in 7 main functional modules and were tightly connected to the mTOR interactome. These data show that the SMII is extremely plastic and that it projects at the cell surface a representation of biochemical networks and metabolic events regulated at multiple levels inside the cell. Since perturbation of a single signaling pathway can lead to significant changes in the composition of the SMII, cells can communicate their metabolic status to the adaptive immune system.

AI.12 The immunogenicity of neo-MIPs

It is now clear that several MIPs that are absent on resting healthy cells are present at the surface of transformed, infected or metabolically perturbed cells. But are these neo-MIPs recognized by CD8 T cells? For neo-MIPs that appear on cancer cells, the answer is clearly yes: CD8 T cells specific for tumor-associated neo-MIPs spontaneously expand in tumor-bearing hosts and can expand further following immunization^{112,120,121}. In a few cases, infections have been found to induce autoimmune CD8 T cell responses against self MIPs. Specific examples include

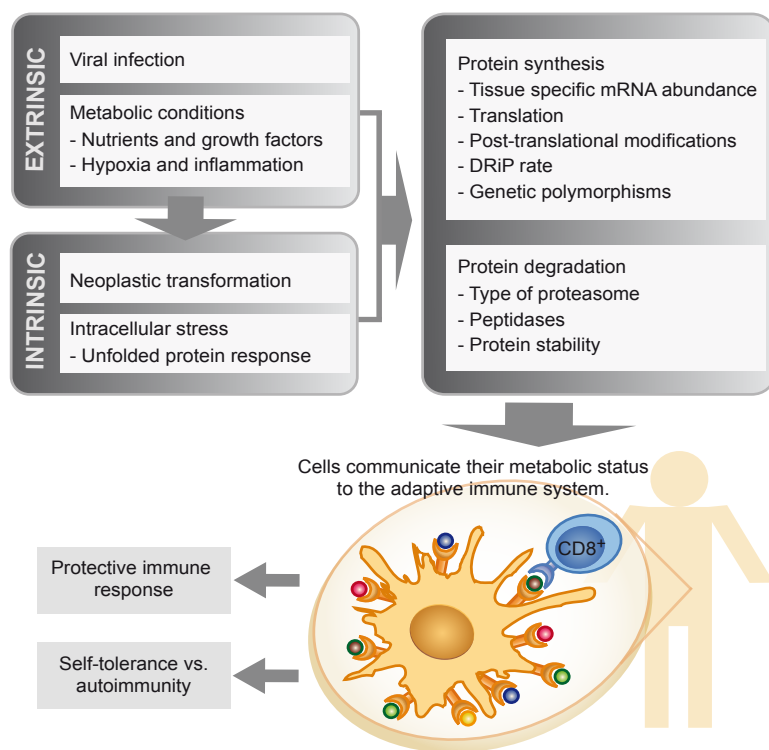


Figure AI.1 Plasticity of the SMII. The SMII is shaped by both intrinsic and extrinsic factors that affect the abundance and the diversity of MIPs.

autoreactivity to MIPs derived from vinculin in HIV-infected subjects and from HSP90 and IFI-6-16 following measles (rubeola)^{122,123}. Finally, when coated on dendritic cells, MIPs upregulated on rapamycin-treated cells were found to elicit CD8 T cell responses in mice, suggesting that metabolic perturbations lead to expression of immunogenic neo-MIPs³⁰.

The biologic relevance of neo-MIPs expressed on tumor cells is compelling. Though contradictory views exist¹²⁴, the dominant paradigm

holds that recognition of tumor-associated MIPs by CD8 T cells prevents the occurrence or progression of a substantial proportion of cancers^{38,39,125}. Furthermore, adoptive immunotherapy targeted to tumor-associated MIPs can mediate durable complete responses in patients with metastatic melanoma and represents a promising treatment for other types of cancer^{114,126}. However, we ignore whether self MIPs presented on infected or metabolically stressed cells can elicit meaningful immune responses. It has been speculated that CD8 T-cell responses against stress-induced self MIPs could be of considerable importance because under real life conditions, the cells that CD8 T lymphocytes must deal with (infected and transformed cells) are stressed^{127,128}. Indeed, infection and transformation increase protein synthesis and thereby cause endoplasmic reticulum stress^{129,130}. This is particularly true for cells submitted to hypoxia, nutrient deprivation or low pH in poorly vascularized tumors and sites of inflammation^{131,132}. A correlation between infection and anti-tumor immunity is supported by epidemiologic evidence that childhood infections (e.g., mumps and measles) lower the risk for certain adult cancers including ovarian cancer and non-Hodgkin's lymphoma¹³³. Also, in patients with acute myeloid leukemia undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation, cytomegalovirus infection reduces the leukemic relapse risk¹³⁴. However, the potential protective value of immune response against neo-MIPs expressed on non-neoplastic stressed cells has yet to be addressed experimentally.

AI.13 The complexity and plasticity of the SMII – A challenge for self tolerance

A key finding emerging from large-scale peptidomic studies is that the SMII is more complex and plastic than previously anticipated (Fig. AI.1). At the organismal level, the composition of SMII varies from one cell type to another. Furthermore, the SMII of a cell can be perturbed by dysregulation of cellular metabolism and infection, hence by both cell–intrinsic and –extrinsic factors. Therefore, events that occur frequently under real life conditions lead to presentation of neo-self MIPs to the immune system³⁰. The complexity and plasticity of the SMII most likely represent a major challenge for the maintenance of self tolerance. They may justify the need for self tolerance to be maintained by multiple dominant and recessive mechanisms involving diverse hematopoietic and non-hematopoietic stromal cells in the thymus and secondary lymphoid organs^{35,135-137}. Despite these sophisticated mechanisms of tolerance, autoimmune diseases represent a major medical burden^{52,138}.

AI.13.1 Neo-self MIPs induced by infection

Environmental factors play a major role in the occurrence of autoimmune disease. In particular, a variety of microbial infections are associated with autoimmune diseases such as type 1 diabetes, multiple sclerosis, rheumatic fever, systemic sclerosis and spondyloarthritis^{52,139,140}. Arguably the most popular hypothesis to explain the association between infection and autoimmunity is molecular mimicry between microbial peptides and self MIPs. Though evidence for a role of molecular mimicry has been gathered for selected cases¹⁴¹, its overall importance in autoimmunity remains difficult to assess. Demonstration that infection leads to presentation of neo-self MIPs^{8,25} raises an alternative explanation: autoreactive T cells could be specific neo-self MIPs presented on infected cells. The latter hypothesis does not require any crossreactivity between microbial peptides and self MIPs. That neo-self MIPs elicit biologically relevant responses would be consistent with the fact that our immune system is not tolerant to all peptides that can be encoded by the genome, but only to self MIPs presented at physiological levels¹⁴². This principle was recently reiterated following the immune rejection of autologous induced pluripotent stem cells¹⁴³. These cells had a perfectly normal genome but were recognized as non-self by autologous CD8 T cells that reacted to undefined neo-self MIPs.

AI.13.2 Neo-self MIPs induced by metabolic disturbances

Growing interest in the field of immunometabolism is being fuelled by the recognition that obesity-induced inflammation promotes a variety of chronic conditions including atherosclerosis¹⁴⁴. Evidence suggests that obesity-induced inflammation is initiated by CD8 T cells: the adipose tissue attracts and activates CD8 T cells that in turn initiate and maintain adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance¹⁴⁵. Excessive amounts of nutrients induce endoplasmic reticulum stress in adipocytes¹⁴⁶. Given that metabolically stressed cells express neo-self MIPs³⁰, it would be interesting to evaluate whether neo-self MIPs on overloaded adipocytes might be specifically recognized by CD8 T cells that initiate obesity-induced inflammation.

AI.14 The MHC class II immunopeptidome

For most autoimmune disorders, MHC genes have by far the strongest single genetic

effect. Autoimmunity is frequently linked primarily to MHC II alleles that are strongly associated with the presence of specific circulating autoantibodies¹⁴⁷. Table AI.3 shows some representative examples of autoantibodies associated with specific *HLA-DR* and *HLA-DQ* alleles. These autoantibodies can be both pathognomonic and pathogenic¹⁴⁸. Disease-associated MHC II alleles presumably present self peptides to CD4 T cells that “help” autoreactive B cells. *HLA-DR* and *HLA-DQ* alleles can also be associated with autoimmune disorders where no antibody marker has been identified¹⁴⁹. These data beg the question: what is the nature of self MHC II-associated peptides recognized by autoreactive CD4 T cells. In comparison to the SMII, characterization of the self MHC II-immunopeptidome represents a greater challenge due to the less-restrictive binding motifs of MHC II alleles and the scarcity of peptide sequencing data¹⁵⁰. High-throughput analysis of MHC II-associated peptides are absolutely required to help improve current prediction algorithms and understand the structure of the MHC II-restricted self¹⁵¹. Systems level analyses of the self MHC II immunopeptidome should also pave the way to a molecular definition of pathogenic MHC II-associated self peptides.

Table AI.3 Representative examples of autoantibodies associated with specific MHC II alleles

MHC II allele	Autoantibody	Disease	Reference
HLA-DRB1*13	F-actin	Autoimmune hepatitis 1, 2	147
HLA-DRB1*03	Antinuclear antibodies (ANA)	Autoimmune hepatitis 1, 2	147
HLA-DRB1*03	Liver cytosol type 1 (LC1)	Autoimmune hepatitis 2	152
HLA-DRB1*07	Liver kidney microsomes type 1 (LKM-1)	Autoimmune hepatitis 2	147,152
HLA-DQB1*0301	Anti-basement membrane zone (anti-BMZ)	Pemphigoid	153
HLA-DRB1*11-DQB1*0301	Anti-topoisomerase I (Topo)	Systemic sclerosis	154
HLA-DRB1*01-DQB1*0501	Anti-centromere (ACA)	Systemic sclerosis	154
HLA-DRB1*0404-DQ8, DR3-DQ2	Anti-21-hydroxylase (21-OH)	Type 1 diabetes	155,156
HLA-DR4, HLA-DQ8	Anti-insulin (IAA)	Type 1 diabetes	155,157
HLA-DRB1 SE ^a , HLA-DRB1*04	Anti-citrullinated α -enolase peptide 1 (CEP-1)	Rheumatoid arthritis	158 159

^aHLA-DRB1 SE: HLA-DRB1 shared epitope

AI.15 Perspective – toward a more comprehensive definition of the immune self

It is noteworthy that the complexity of the SMII is also spelled in words that go beyond a simple germline-encoded 20-amino acids alphabet. The complexity of the SMII is enhanced by three processes: non-conventional translation mechanisms, post-translational modifications and genetic polymorphisms. Thus, cryptic MIPs include peptides that arise from untranslated regions of the mRNA as well as peptides encoded in alternate translational reading frames and from non-AUG start codon initiation on mRNAs^{71,96-98}. Furthermore, peptides can undergo several post-translational modifications such deamidation, phosphorylation, transpeptidation and proteasomal splicing^{13,99-103}. Peptide splicing leads to the production of MIPs made of two noncontiguous fragments of a protein that are linked together after the excision of the intervening segment^{85,160}. Finally, genetic polymorphisms that hinder MIP generation (e.g., gene deletion) or the structure of a MIP (e.g., single nucleotide polymorphisms) can impinge on the SMII¹⁶¹⁻¹⁶³. Accordingly, some MIPs are present in some individuals but absent in other MHC-matched subjects^{163,164}. These polymorphic MIPs are traditionally referred to as minor histocompatibility antigens (MiHAs). While MiHAs are of great biological relevance^{114,165}, the global impact of genomic polymorphisms on the SMII (i.e. the number of MiHA differences between MHC-identical subjects) is totally unknown, with theoretical estimates ranging from ≈ 15 to thousands^{161,162,166}. Importantly, peptide identification by tandem MS is generally based on search algorithms that evaluate matches between observed peptide fragments and a reference proteome. It follows that peptides with post-translational modifications and peptides generated by alternative reading frames, protein splicing or genomic variations are largely missed by current database search algorithms. Furthermore, current binding motif prediction algorithms rely on known peptide sequences, limiting our knowledge of peptides associated to rare alleles and to MHC class II molecules. Thus, unmined MS datasets harbor a whole immunopeptidome universe that awaits to be uncovered by novel analytical approaches including *de novo* MS/MS peptide sequencing and enrichment of peptide bearing discrete post-translational modifications^{167,168}.

AI.16 Take-home messages

- The self-MIP repertoire is complex and is not a representative excerpt from the proteome.
- Different types of proteasomes generate different MIP repertoires.
- The self-MIP repertoire conceals a tissue-specific signature.
- Neoplastic transformation, viral infection and metabolic changes have a broad impact on the MIP repertoire and lead to presentation of cryptic self-MIPs.
- The self-MIP repertoire conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation.
- The complexity and plasticity of the MHC I-restricted self represent a major challenge for the maintenance of self tolerance.

AI.17 Acknowledgements

We are grateful to Étienne Caron for insightful discussions on the genesis of the MIP repertoire. DdV and DPG are supported by studentships from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), respectively. CP and PT are supported by the Canada Research Chairs Program. Work in the authors' lab has been supported by grants from the CIHR (MOP-42384), the FRSQ (#22049) and the Canadian Cancer Society (#019475).

AI.18 Bibliography

1. Khalturin, K. & Bosch, T.C. Self/nonself discrimination at the basis of chordate evolution: limits on molecular conservation. *Curr Opin Immunol* 19, 4-9 (2007).
2. Boehm, T. Quality control in self/nonself discrimination. *Cell* 125, 845-858 (2006).
3. Guo, P., *et al.* Dual nature of the adaptive immune system in lampreys. *Nature* 459, 796-801 (2009).
4. Boehm, T. Design principles of adaptive immune systems. *Nat.Rev.Immunol.* 11, 307-317 (2011).
5. Janeway, C.A., Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7461-7468 (2001).
6. Davis, M.M., *et al.* T cells as a self-referential, sensory organ. *Annu Rev Immunol* 25, 681-695 (2007).
7. Barnea, E., *et al.* Analysis of endogenous peptides bound by soluble MHC class I molecules: a novel approach for identifying tumor-specific antigens. *Eur J Immunol* 32, 213-222 (2002).
8. Hickman, H.D., *et al.* Cutting edge: class I presentation of host peptides following HIV infection. *J Immunol* 171, 22-26 (2003).
9. Buchsbaum, S., *et al.* Large-scale analysis of HLA peptides presented by HLA-Cw4. *Immunogenetics* 55, 172-176 (2003).
10. Hickman, H.D., *et al.* Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J Immunol* 172, 2944-2952 (2004).
11. Lemmel, C., *et al.* Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat Biotechnol* 22, 450-454 (2004).
12. Milner, E., Barnea, E., Beer, I. & Admon, A. The turnover kinetics of major histocompatibility complex peptides of human cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5, 357-365 (2006).

13. Zarlino, A.L., *et al.* Identification of class I MHC-associated phosphopeptides as targets for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14889-14894 (2006).
14. Weinzierl, A.O., *et al.* Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface. *Mol Cell Proteomics* 6, 102-113 (2007).
15. Philip, R., *et al.* Shared immunoproteome for ovarian cancer diagnostics and immunotherapy: potential theranostic approach to cancer. *J Proteome Res* 6, 2509-2517 (2007).
16. Escobar, H., *et al.* Large scale mass spectrometric profiling of peptides eluted from HLA molecules reveals N-terminal-extended peptide motifs. *J Immunol* 181, 4874-4882 (2008).
17. Hawkins, O.E., *et al.* Identification of breast cancer peptide epitopes presented by HLA-A*0201. *J Proteome Res* 7, 1445-1457 (2008).
18. Weinzierl, A.O., *et al.* Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry. *Eur J Immunol* 38, 1503-1510 (2008).
19. Antwi, K., *et al.* Proteomic identification of an MHC-binding peptidome from pancreas and breast cancer cell lines. *Mol Immunol* 46, 2931-2937 (2009).
20. Delgado, J.C., Escobar, H., Crockett, D.K., Reyes-Vargas, E. & Jensen, P.E. Identification of naturally processed ligands in the C57BL/6 mouse using large-scale mass spectrometric peptide sequencing and bioinformatics prediction. *Immunogenetics* 61, 241-246 (2009).
21. Stickel, J.S., *et al.* HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma maintained in metastases. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1407-1417 (2009).
22. Fissolo, N., *et al.* Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics* 8, 2090-2101 (2009).
23. Bassani-Sternberg, M., *et al.* Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18769-18776 (2010).

24. Ben Dror, L., Barnea, E., Beer, I., Mann, M. & Admon, A. The HLA-B*2705 peptidome. *Arthritis Rheum* 62, 420-429 (2010).
25. Wahl, A., Schafer, F., Bardet, W. & Hildebrand, W.H. HLA class I molecules reflect an altered host proteome after influenza virus infection. *Hum Immunol* 71, 14-22 (2010).
26. Shetty, V., *et al.* MHC class I-presented lung cancer-associated tumor antigens identified by immunoproteomics analysis are targets for cancer-specific T cell response. *J Proteomics* 74, 728-743 (2011).
27. Mester, G., Hoffmann, V. & Stevanovic, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol Life Sci* 68, 1521-1532 (2011).
28. Fortier, M.H., *et al.* The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *J Exp Med* 205, 595-610 (2008).
29. de Verteuil, D., *et al.* Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex I molecules. *Mol Cell Proteomics* 9, 2034-2047 (2010).
30. Caron, E., *et al.* The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation. *Mol Syst Biol* 7, 533 (2011).
31. Star, B., *et al.* The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature* 477, 207-210 (2011).
32. Abi-Rached, L., *et al.* The shaping of modern human immune systems by multiregional admixture with archaic humans. *Science* 334, 89-94 (2011).
33. Rammensee, H.G., Falk, K. & Rotzschke, O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11, 213-244 (1993).
34. Istrail, S., *et al.* Comparative immunopeptidomics of humans and their pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 13268-13272 (2004).
35. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833-844 (2009).

36. Sprent, J. & Surh, C.D. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol.* 131, 478-484 (2011).
37. Labrecque, N., Baldwin, T. & Lesage, S. Molecular and genetic parameters defining T-cell clonal selection. *Immunol Cell Biol* 89, 16-26 (2011).
38. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
39. Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570 (2011).
40. Leinders-Zufall, T., *et al.* MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* 306, 1033-1037 (2004).
41. Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Mombaerts, P., Zufall, F. & Boehm, T. Structural requirements for the activation of vomeronasal sensory neurons by MHC peptides. *Nat Neurosci* 12, 1551-1558 (2009).
42. Ortega-Hernandez, O.D., Kivity, S. & Shoenfeld, Y. Olfaction, psychiatric disorders and autoimmunity: is there a common genetic association? *Autoimmunity* 42, 80-88 (2009).
43. Rodgers, J.R. & Cook, R.G. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat Rev.Immunol.* 5, 459-471 (2005).
44. Perreault, C. The origin and role of MHC class I-associated self-peptides. *Prog Mol Biol Transl Sci* 92, 41-60 (2010).
45. Mungall, A.J., *et al.* The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425, 805-811 (2003).
46. Rammensee, H.G., Friede, T. & Stevanoviic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228 (1995).
47. Blackwell, J.M., Jamieson, S.E. & Burgner, D. HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 22, 370-385, Table of Contents (2009).
48. Kosmrlj, A., *et al.* Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection. *Nature* 465, 350-354 (2010).

49. Pereyra, F., *et al.* The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330, 1551-1557 (2010).
50. Noble, J.A., *et al.* HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes* 59, 2972-2979 (2010).
51. Strange, A., *et al.* A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat Genet* 42, 985-990 (2010).
52. Shapira, Y., Agmon-Levin, N. & Shoenfeld, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6, 468-476 (2010).
53. Rock, K.L., York, I.A., Saric, T. & Goldberg, A.L. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 80, 1-70 (2002).
54. Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 952-961 (2003).
55. Hammer, G.E., Kanaseki, T. & Shastri, N. The final touches make perfect the peptide-MHC class I repertoire. *Immunity* 26, 397-406 (2007).
56. Wearsch, P.A. & Cresswell, P. Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat. Immunol.* 8, 873-881 (2007).
57. Granados, D.P., *et al.* ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol* 10, 10 (2009).
58. Qian, S.B., *et al.* Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *J Immunol* 177, 227-233 (2006).
59. Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L. & Rock, K.L. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363, 552-554 (1993).
60. Wherry, E.J., *et al.* Re-evaluating the generation of a “proteasome-independent” MHC class I-restricted CD8 T cell epitope. *J Immunol* 176, 2249-2261 (2006).

61. Apcher, S., Daskalogianni, C., Manoury, B. & Fahraeus, R. Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation. *PLoS Pathog* 6, e1001151 (2010).
62. Parmentier, N., *et al.* Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat Immunol* 11, 449-454 (2010).
63. Shen, X.Z., *et al.* The carboxypeptidase ACE shapes the MHC class I peptide repertoire. *Nat Immunol*. Epub October 2(2011).
64. Ghanem, E., *et al.* The transporter associated with antigen processing (TAP) is active in a post-ER compartment. *J Cell Sci* 123, 4271-4279 (2010).
65. Dong, G., Wearsch, P.A., Peaper, D.R., Cresswell, P. & Reinisch, K.M. Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* 30, 21-32 (2009).
66. Blanchard, N., *et al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J Immunol* 184, 3033-3042 (2010).
67. Yewdell, J.W. & Nicchitta, C.V. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol* 27, 368-373 (2006).
68. Dolan, B.P., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands. *Cell Mol Life Sci* 68, 1481-1489 (2011).
69. Cardinaud, S., Starck, S.R., Chandra, P. & Shastri, N. The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PLoS One* 5, e8692 (2010).
70. Dolan, B.P., *et al.* Distinct pathways generate peptides from defective ribosomal products for CD8+ T cell immunosurveillance. *J Immunol* 186, 2065-2072 (2011).
71. Boon, T. & Van Pel, A. T cell-recognized antigenic peptides derived from the cellular genome are not protein degradation products but can be generated directly by transcription and translation of short subgenic regions. A hypothesis. *Immunogenetics* 29, 75-79 (1989).

72. Apcher, S., *et al.* Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11572-11577 (2011).
73. Lev, A., *et al.* Compartmentalized MHC class I antigen processing enhances immunosurveillance by circumventing the law of mass action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6964-6969 (2010).
74. Dolan, B.P., Knowlton, J.J., David, A., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. RNA polymerase II inhibitors dissociate antigenic peptide generation from normal viral protein synthesis: a role for nuclear translation in defective ribosomal product synthesis? *J Immunol* 185, 6728-6733 (2010).
75. Yewdell, J.W. DRiPs solidify: progress in understanding endogenous MHC class I antigen processing. *Trends Immunol* 32, 548-558 (2011).
76. Gu, W., *et al.* Both treated and untreated tumors are eliminated by short hairpin RNA-based induction of target-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8314-8319 (2009).
77. Kloetzel, P.M. Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 179-187 (2001).
78. Murata, S., Yashiroda, H. & Tanaka, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 104-115 (2009).
79. Pelletier, S., *et al.* Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry. *Mol Biosyst* 6, 1450-1453 (2010).
80. Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M. & Kruger, E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9241-9246 (2005).
81. Zaiss, D.M., de Graaf, N. & Sijts, A.J. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infection and immunity* 76, 1207-1213 (2008).
82. Toes, R.E., *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194, 1-12 (2001).

83. Vigneron, N. & Van den Eynde, B.J. Insights into the processing of MHC class I ligands gained from the study of human tumor epitopes. *Cell Mol Life Sci* 68, 1503-1520 (2011).
84. Dalet, A., Stroobant, V., Vigneron, N. & Van den Eynde, B.J. Differences in the production of spliced antigenic peptides by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Eur J Immunol* 41, 39-46 (2011).
85. Dalet, A., *et al.* An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E323-331 (2011).
86. Seifert, U., *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613-624 (2010).
87. Muchamuel, T., *et al.* A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 15, 781-787 (2009).
88. Murata, S., *et al.* Regulation of CD8⁺ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349-1353 (2007).
89. Nitta, T., *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8⁺ T cells. *Immunity* 32, 29-40 (2010).
90. Florea, B.I., *et al.* Activity-based profiling reveals reactivity of the murine thymoproteasome-specific subunit beta5t. *Chem Biol* 17, 795-801 (2010).
91. Nilsson, T., *et al.* Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time. *Nat Methods* 7, 681-685 (2010).
92. Yates, J.R., Ruse, C.I. & Nakorchevsky, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 11, 49-79 (2009).
93. Depontieu, F.R., *et al.* Identification of tumor-associated, MHC class II-restricted phosphopeptides as targets for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12073-12078 (2009).
94. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54, 15-39 (2009).

95. Princiotta, M.F., *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354 (2003).
96. Schwab, S.R., Li, K.C., Kang, C. & Shastri, N. Constitutive display of cryptic translation products by MHC class I molecules. *Science* 301, 1367-1371 (2003).
97. Schwab, S.R., Shugart, J.A., Horng, T., Malarkannan, S. & Shastri, N. Unanticipated antigens: translation initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol* 2, e366 (2004).
98. Starck, S.R. & Shastri, N. Non-conventional sources of peptides presented by MHC class I. *Cell Mol Life Sci* 68, 1471-1479 (2011).
99. Skipper, J.C., *et al.* An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183, 527-534 (1996).
100. Hanada, K., Yewdell, J.W. & Yang, J.C. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256 (2004).
101. Vigneron, N., *et al.* An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590 (2004).
102. Warren, E.H., *et al.* An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order. *Science* 313, 1444-1447 (2006).
103. Mohammed, F., *et al.* Phosphorylation-dependent interaction between antigenic peptides and MHC class I: a molecular basis for the presentation of transformed self. *Nat Immunol* 9, 1236-1243 (2008).
104. Engelhard, V.H., Brickner, A.G. & Zaring, A.L. Insights into antigen processing gained by direct analysis of the naturally processed class I MHC associated peptide repertoire. *Mol Immunol* 39, 127-137 (2002).
105. Juncker, A.S., *et al.* Systematic characterisation of cellular localisation and expression profiles of proteins containing MHC ligands. *PLoS One* 4, e7448 (2009).
106. Caron, E., Charbonneau, R., Huppe, G., Brochu, S. & Perreault, C. The structure and location of SIMP/STT3B account for its prominent imprint on the MHC I immunopeptidome. *International immunology* 17, 1583-1596 (2005).

107. Yewdell, J.W. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 19, 79-86 (2007).
108. Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A. & Stevanovic, S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219 (1999).
109. Richter, J.D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480 (2005).
110. Nakayama, K.I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-381 (2006).
111. Rosenberg, S.A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10, 281-287 (1999).
112. Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208 (2006).
113. Roberts, W.K., *et al.* Patients with lung cancer and paraneoplastic Hu syndrome harbor HuD-specific type 2 CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 119, 2042-2051 (2009).
114. Vincent, K., Roy, D.C. & Perreault, C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood* 118, 2951-2959 (2011).
115. Isaacson, M.K. & Ploegh, H.L. Ubiquitination, ubiquitin-like modifiers, and deubiquitination in viral infection. *Cell Host Microbe* 5, 559-570 (2009).
116. Ho, B.C., *et al.* Enterovirus-induced miR-141 contributes to shutoff of host protein translation by targeting the translation initiation factor eIF4E. *Cell Host Microbe* 9, 58-69 (2011).
117. Caron, E., *et al.* A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Mol Syst Biol* 6, 453 (2010).
118. Sengupta, S., Peterson, T.R. & Sabatini, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40, 310-322 (2010).

119. Araki, K., *et al.* mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460, 108-112 (2009).
120. Lee, P.P., *et al.* Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5, 677-685 (1999).
121. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. & Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8, 299-308 (2008).
122. di Marzo Veronese, F., *et al.* Autoreactive cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects. *J Exp Med* 183, 2509-2516 (1996).
123. Herberts, C.A., *et al.* Autoreactivity against induced or upregulated abundant self-peptides in HLA-A*0201 following measles virus infection. *Hum Immunol* 64, 44-55 (2003).
124. Uhr, J.W. & Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12396-12400 (2011).
125. Nelson, B.H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 222, 101-116 (2008).
126. Rosenberg, S.A., *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550-4557 (2011).
127. Gleimer, M. & Parham, P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity* 19, 469-477 (2003).
128. Hickman-Miller, H.D. & Hildebrand, W.H. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Immunol* 25, 427-433 (2004).
129. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327 (2005).
130. Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O. & Sonenberg, N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25, 6416-6422 (2006).

131. Bi, M., *et al.* ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J* 24, 3470-3481 (2005).
132. Moenner, M., Pluquet, O., Bouche-careilh, M. & Chevet, E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res* 67, 10631-10634 (2007).
133. Cramer, D.W. & Finn, O.J. Epidemiologic perspective on immune-surveillance in cancer. *Curr Opin Immunol* 23, 265-271 (2011).
134. Elmaagacli, A.H., *et al.* Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118, 1402-1412 (2011).
135. Levings, M.K., Allan, S., d’Hennezel, E. & Piccirillo, C.A. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol* 92, 119-155 (2006).
136. Cohen, J.N., *et al.* Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med* 207, 681-688 (2010).
137. Fletcher, A.L., *et al.* Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* 207, 689-697 (2010).
138. Marrack, P., Kappler, J. & Kotzin, B.L. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7, 899-905 (2001).
139. Benoist, C. & Mathis, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2, 797-801 (2001).
140. Grossman, C., Dovrish, Z., Shoenfeld, Y. & Amital, H. Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? *Autoimmun Rev* 10, 244-247 (2011).
141. Harkiolaki, M., *et al.* T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity* 30, 348-357 (2009).
142. Schild, H., Rotzschke, O., Kalbacher, H. & Rammensee, H.G. Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation. *Science* 247, 1587-1589 (1990).

143. Zhao, T., Zhang, Z.N., Rong, Z. & Xu, Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212-215 (2011).
144. Mathis, D. & Shoelson, S.E. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* 11, 81 (2011).
145. Nishimura, S., *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15, 914-920 (2009).
146. Zhang, K. & Kaufman, R.J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-462 (2008).
147. Oliveira, L.C., *et al.* Autoimmune hepatitis, HLA and extended haplotypes. *Autoimmun Rev* 10, 189-193 (2011).
148. Csorba, T.R., Lyon, A.W. & Hollenberg, M.D. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 47, 51-71 (2010).
149. Sadovnick, A.D. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* (2011).
150. Dengjel, J., *et al.* Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 12, 4163-4170 (2006).
151. Liao, W.W. & Arthur, J.W. Predicting peptide binding to Major Histocompatibility Complex molecules. *Autoimmun Rev* 10, 469-473 (2011).
152. Djilali-Saiah, I., *et al.* HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 45, 844-850 (2006).
153. Zakka, L.R., Reche, P. & Ahmed, A.R. Role of MHC Class II Genes in the pathogenesis of pemphigoid. *Autoimmun Rev* (2011).
154. Dieude, P., Boileau, C. & Allanore, Y. Immunogenetics of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 10, 282-290 (2011).
155. Taplin, C.E. & Barker, J.M. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity* 41, 11-18 (2008).
156. Barker, J.M., *et al.* Autoantibody “subspecificity” in type 1 diabetes: risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care* 28, 850-855 (2005).

157. Ziegler, R., *et al.* Specific association of HLA-DR4 with increased prevalence and level of insulin autoantibodies in first-degree relatives of patients with type I diabetes. *Diabetes* 40, 709-714 (1991).
158. Mahdi, H., *et al.* Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 41, 1319-1324 (2009).
159. Montes, A., *et al.* Particular association of clinical and genetic features with autoimmunity to citrullinated alpha-enolase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 654-661 (2011).
160. Liepe, J., *et al.* The 20S proteasome splicing activity discovered by SpliceMet. *PLoS Comput Biol* 6, e1000830 (2010).
161. Perreault, C., *et al.* Minor histocompatibility antigens. *Blood* 76, 1269-1280 (1990).
162. Roopenian, D., Choi, E.Y. & Brown, A. The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 190, 86-94 (2002).
163. Spierings, E., *et al.* Phenotype frequencies of autosomal minor histocompatibility antigens display significant differences among populations. *PLoS Genet* 3, e103 (2007).
164. Rotzschke, O., Falk, K., Wallny, H.J., Faath, S. & Rammensee, H.G. Characterization of naturally occurring minor histocompatibility peptides including H-4 and H-Y. *Science* 249, 283-287 (1990).
165. Brochu, S., Baron, C., Hetu, F., Roy, D.C. & Perreault, C. Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J Immunol* 155, 5104-5114 (1995).
166. Lindahl, K.F. Minor histocompatibility antigens. *Trends Genet* 7, 219-224 (1991).
167. Courcelles, M., Lemieux, S., Voisin, L., Meloche, S. & Thibault, P. ProteoConnections: a bioinformatics platform to facilitate proteome and phosphoproteome analyses. *Proteomics* 11, 2654-2671 (2011).

168. Admon, A. & Bassani-Sternberg, M. The Human Immuno-peptidome Project, a Suggestion for yet another Postgenome Next Big Thing. *Mol Cell Proteomics* 10, O111 011833 (2011).