Characterization of URI1 as a substrate of MK2

KHADIJA DABEER (2019BLZ8319)

ABSTRACT

Unconventional prefoldin RPB5 interactor 1 (URI1) is a conserved molecular scaffold involved in transcriptional regulation, protein stability, and cellular stress responses. Despite its importance, the upstream signaling pathways that control URI1 and the effects of its post translational modifications are not well understood. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2 or MK2) is a crucial component of the p38 MAPK pathway, playing a significant role in cellular reactions to stress and inflammation. This PhD work characterized URI1 as a novel substrate of MK2 and investigated the functional significance of this modification.

URI1 was originally identified as a potential substrate of MK2 in a large-scale phospho-proteomic screen. In the present work, we have used pharmacological and genetic manipulation of the p38/MK2 pathway, coupled with antibodies specific for the "L-x-R-x-x-pS" phospho-motif, to establish that serine 439 in mURI1 is a stress-induced, MK2-dependent phosphorylation site. Further work could show that S439 phosphorylation-dependent band-shift of endogenous URI1 is dependent of p38/MK2 signaling across stimuli and cell lines.

To elucidate the cellular functions of URI1, cell culture models deficient in URI1 were developed utilising RNA interference-based methodologies. These models facilitated the investigation of URI1-dependent signaling and cellular processes under both basal and stimulated conditions. Stable URI1-deficient cell lines were used to investigate the role of URI1 and URI1-MK2 signaling in the regulation of cell proliferation and UV-irradiation stress. The loss-of-function model developed will be useful for further investigations into the function of URI1 in stress-responsive pathways and its role in maintaining cellular homeostasis.

Further studies could verify URI1 as a suppressor of TNFα-induced NFκB-dependent transcription. Interestingly, URI1-S439A mutant failed to suppress TNFα-induced NFκB activity, indicating a role for MK2-mediated URI1 phosphorylation in fine-tuning NFκB signaling. Similar effects were observed when NFκB reporter was activated with the TNF-receptor associate adapter kinase RIPK1, another characterized substrate of MK2. This establishes a complex role for MK2 in regulating the pro-survival NFκB signaling downstream to TNFα.

Finally, to explore the functional significance of the MK2-URI1-IKK/NFκB signaling in survival signaling, we analyzed openly available tumour gene expression datasets for URI1, MK2/3 and IKKα/β expression. Analyses of tumour transcriptomic data reveal evidence of the involvement of MK2/3-URI1 axis with favourable prognosis in kidney cancer, with combined gene signatures showing enhanced predictive value.

Collectively, this study identifies URI1 as a novel substrate of MK2 and establishes MK2-dependent phosphorylation as a potential checkpoint for cell fate in inflammation and cancer. These findings provide new insights into the integration of stress signaling with URI1-mediated cellular pathways and lay the groundwork for future investigations into the role of this axis in inflammation and disease.

सार

अनकन्वेंशनल प्रीफोल्डिन RPB5 इंटरैक्टर 1 (URI1) एक संरक्षित आणविक संरचना है जो ट्रांसक्रिप्शनल विनियमन, प्रोटीन स्थिरता और कोशिकीय तनाव प्रतिक्रियाओं में शामिल है। इसके महत्व के बावजूद, URI1 को नियंत्रित करने वाले अपस्ट्रीम सिग्नलिंग मार्ग और इसके पोस्ट-ट्रांसलेशनल संशोधनों के प्रभाव अच्छी तरह से समझ में नहीं आए हैं। माइटोजेन-एक्टिवेटेड प्रोटीन काइनेज-एक्टिवेटेड प्रोटीन काइनेज 2 (MAPKAPK2 या MK2) p38 MAPK मार्ग का एक महत्वपूर्ण घटक है, जो तनाव और सूजन के प्रति कोशिकीय प्रतिक्रियाओं में महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है। इस पीएचडी शोध कार्य में URI1 को MK2 के एक नए सबस्ट्रेट के रूप में पहचाना गया और इस संशोधन के कार्यात्मक महत्व की जांच की गई।

URI1 को मूल रूप से एक बड़े पैमाने पर फॉस्फो-प्रोटीओमिक स्क्रीनिंग में MK2 के संभावित सबस्ट्रेट के रूप में पहचाना गया था। वर्तमान अध्ययन में, हमने p38/MK2 मार्ग के औषधीय और आनुवंशिक हेरफेर का उपयोग किया है, जो "L-x-R-x-x-pS" फॉस्फो-मोटिफ से जुड़ा है, ताकि mURI1 में सेरीन 439 अवशेष को तनाव-प्रेरित, MK2-निर्भर फॉस्फोरिलेशन स्थल के रूप में स्थापित किया जा सके। आगे के अध्ययन से यह पता चल सकता है कि अंतर्जात URI1 का S439 फॉस्फोरिलेशन-निर्भर बैंड-शिफ्ट विभिन्न उद्दीपनों और कोशिका लाइनों में p38/MK2 सिग्नलिंग पर निर्भर करता है।

URI1 के कोशिकीय कार्यों को स्पष्ट करने के लिए, RNA हस्तक्षेप-आधारित पद्धतियों का उपयोग करके URI1 की कमी वाले कोशिका संवर्धन मॉडल विकसित किए गए। इन मॉडलों ने आधारभूत और उत्तेजित दोनों स्थितियों में URI1-निर्भर सिग्नलिंग और कोशिकीय प्रक्रियाओं की जांच को सुगम बनाया। स्थिर URI1-कमी वाली कोशिका लाइनों का उपयोग कोशिका प्रसार और UV-विकिरण तनाव के नियमन में URI1 और URI1-MK2 सिग्नलिंग की भूमिका की जांच करने के लिए किया गया। विकसित लॉस-ऑफ-फंक्शन मॉडल तनाव-प्रतिक्रियाशील मार्गों में URI1 के कार्य और कोशिकीय समस्थिति बनाए रखने में इसकी भूमिका की आगे की जांच के लिए उपयोगी होगा।

आगे के अध्ययनों से TNFα-प्रेरित NFκB-निर्भर प्रतिलेखन के दमनकर्ता के रूप में URI1 की पुष्टि हो सकती है। दिलचस्प बात यह है कि URI1-S439A उत्परिवर्ती TNFα-प्रेरित NFκB गतिविधि को दबाने में विफल रहा, जो NFκB सिग्नलिंग को ठीक करने में MK2-मध्यस्थ URI1 फॉस्फोरिलेशन की भूमिका को दर्शाता है। इसी तरह के प्रभाव तब देखे गए जब NFκB रिपोर्टर को TNF-रिसेप्टर एसोसिएट एडेप्टर काइनेज RIPK1, जो MK2 का एक अन्य ज्ञात सबस्ट्रेट है, के साथ सक्रिय किया गया। यह TNFα के अनुप्रवाह में जीवन-समर्थक NFκB सिग्नलिंग को विनियमित करने में MK2 की एक जटिल भूमिका स्थापित करता है।

अंत में, जीवन रक्षा संकेतन में MK2-URI1-IKK/NFκB संकेतन के कार्यात्मक महत्व का पता लगाने के लिए, हमने URI1, MK2/3 और IKKα/β अभिव्यक्ति के लिए सार्वजनिक रूप से उपलब्ध ट्यूमर जीन अभिव्यक्ति डेटासेट का विश्लेषण किया। ट्यूमर ट्रांसक्रिप्टोमिक डेटा के विश्लेषण से गुर्दे के कैंसर में अनुकूल पूर्वानुमान के साथ MK2/3-URI1 अक्ष की भागीदारी के प्रमाण मिलते हैं, जिसमें संयुक्त जीन हस्ताक्षर बेहतर पूर्वानुमानित मूल्य दर्शाते हैं।

सामूहिक रूप से, यह अध्ययन URI1 को MK2 के एक नए सबस्ट्रेट के रूप में पहचानता है और सूजन और कैंसर में कोशिका भाग्य के लिए एक महत्वपूर्ण चेकपॉइंट के रूप में MK2-निर्भर फॉस्फोरिलेशन को स्थापित करता है। ये निष्कर्ष तनाव संकेतन के URI1-मध्यस्थता वाले सेलुलर मार्गों के एकीकरण में नई अंतर्दृष्टि प्रदान करते हैं और सूजन और रोग में इस अक्ष की भूमिका की भविष्य की जांच के लिए आधार तैयार करते हैं।