



Étude de l'extension N-terminale de la kinase mitotique MPS1

Thèse

Guillaume Combes

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Guillaume Combes, 2017

Étude de l'extension N-terminale de la kinase mitotique MPS1

Thèse

Guillaume Combes

Sous la direction de :

Sabine Elowe, directrice de recherche

RÉSUMÉ

Une des premières caractéristiques reconnues dans les cellules cancéreuses fut l'observation d'aberrations chromosomiques au cours de la division cellulaire. Parmi ces aberrations, on retrouve l'aneuploïdie, une mutation génétique définie par un nombre de chromosomes anormal de la cellule. Première cause associée aux fausses couches et au retard mental, l'aneuploïdie participe également à la progression tumorale. Plusieurs mécanismes sont mis en place par la cellule pour parer à ces aberrations chromosomiques.

Le « spindle assembly checkpoint » (SAC) fait partie de ces mécanismes qui assurent la ségrégation précise des chromosomes au cours de la mitose. La kinase à double spécificité MPS1 codée par le gène TTK est une composante critique du SAC. La régulation de l'activité et de la localisation de MPS1 reste encore incomprise dans son ensemble.

La localisation de MPS1 aux kinétochores (KT, structure des centromères permettant la mise en place du SAC) nécessite une région d'environ 50 acides aminés appelée NTE (N-Terminal Extension) qui ne possède pas de domaine fonctionnel clairement défini. Des données récentes ont montré que la région N-Terminale de MPS1 est impliquée dans la régulation de son activité. L'objectif principal de ces travaux est de comprendre dans quelle mesure la région NTE participe à la régulation de l'activité kinase et à la localisation de MPS1. Mettant en place une approche basée sur l'hypothèse que la conservation de la structure à travers l'évolution peut correspondre à une fonction, nous avons mis en évidence que la région NTE de MPS1 contribue à sa localisation et son activation par 2 modules indépendants.

Nous avons démontré que les résidus 19-29 sont absolument requis pour la localisation de MPS1 déterminant ainsi plus précisément une région responsable de sa localisation. Cette région est également nécessaire pour diminuer l'interaction entre MPS1 et sa protéine partenaire ARHGEF17/TEM4 qui

participe à son recrutement au KT, régulant de ce fait la localisation de MPS1. Le second module concerne les résidus 40-49 et c'est en particulier la phosphorylation de cette région qui contribue à l'activation de la kinase, vraisemblablement par la relâche d'un mécanisme d'auto-inhibition de la kinase. Ce mécanisme, participant à la régulation de l'activité kinase de MPS1, semble se produire successivement avec la dimérisation, puis la phosphorylation initiale de la région NTE et est enfin suivie de la trans-autophosphorylation de la boucle d'activation du domaine kinase.

L'importance de la région NTE dans l'accomplissement des fonctions de MPS1 au cours de la mitose a été démontrée ainsi que la nécessité de ces deux régions particulières de la NTE requises indépendamment pour le fonctionnement optimal et le maintien de la robustesse du SAC.

Ainsi, cette thèse apporte des informations supplémentaires et indispensables à la compréhension des mécanismes régulant l'activité kinase et la localisation au kinétochore de MPS1 par l'intermédiaire de sa région NTE.

ABSTRACT

One of the first recognized characteristics in cancer cells was the observation of chromosomal aberrations during cell division. Among these aberrations, there is aneuploidy, a genetic abnormality defined by having an incorrect number of chromosomes in the cell. As the leading cause of miscarriages and mental retardation, aneuploidy also contributes to tumor progression. Several mechanisms are established by the cell to counter these chromosomal aberrations.

The "spindle assembly control point" (SAC) is one of these mechanisms which ensures accurate segregation of chromosomes during mitosis. The dual specificity kinase MPS1 coded by the TTK gene is a critical component of the SAC. The regulation of the activity and the localization of MPS1 is still not wholly understood.

The localization of MPS1 to the kinetochores (KT, structure of the centromeres allowing SAC organization) requires a region of approximately 50 amino acids called NTE (N-Terminal Extension) which does not exhibit a known functional domain. Recent data have demonstrated that the N-Terminal region of MPS1 is involved in the regulation of its activity. The main objective of this project is to understand to what extent the NTE region participates in the regulation of the kinase activity and the localization of MPS1. Using a structure-based approach, we have demonstrated that the NTE region of MPS1 contributes to its localization and activation by 2 independent modules.

We demonstrated that residues 19-29 are absolutely required for the localization of MPS1, thus defining more accurately the region responsible for its localization. This region is also necessary to decrease the interaction between MPS1 and its partner protein ARHGEF17/TEM4, which participates in its recruitment to the KT thereby regulating the localization of MPS1. The second module concerns the residues 40-49, especially the phosphorylation of this

region which contributes to the activation of the kinase, presumably by the release of a mechanism of auto-inhibition of the kinase. This mechanism, which participates in the regulation of the MPS1 kinase activity, appears to occur successively with dimerization then the initial phosphorylation of the NTE region and finally followed by trans-autophosphorylation of the activation loop of the kinase domain.

The importance of the NTE region in performing the functions of MPS1 during mitosis has been demonstrated as well as the need for these two particular regions of the NTE which are independently required for optimal functioning and maintaining the robustness of the SAC.

Thus, this thesis provides additional and indispensable information for understanding the mechanisms regulating the kinase activity and the kinetochore localization of MPS1 via its NTE region.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS	xv
AVANT-PROPOS	xvii
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	2
1. Généralités sur le cycle cellulaire	2
1.1. L'interphase et son contrôle	3
1.1.1. La phase G1 et sa régulation	3
1.1.2. La phase S	5
1.1.3. La phase G2 et sa régulation	6
1.2. La phase mitotique : Mitose et Cytodiérèse	7
2. Spindle Assembly Checkpoint (SAC)	10
2.1. Formation et structure des kinétochores	10
2.1.1. Kinétochore interne	11
2.1.2. Kinétochore externe	12
2.1.2.1. Complexe NDC80	13
2.1.2.2. Complexe KNL1	14
2.1.2.3. Complexe MIS12	16
2.2. Régulation de l'attachement KT-MT	16
2.3. Mise en place du SAC et formation du MCC	18
2.3.1. Cascade signalétique du SAC	19
2.3.2. Assemblage du MCC	20
2.4. Désactivation du SAC	23
2.4.1. Délocalisation et phosphorégulation des protéines du SAC	23
2.4.2. Désassemblage du MCC	25
3. MPS1 (Monopolar spindle 1)	27
3.1. Découverte de MPS1 et orthologues	27
3.2. MPS1 au cours du cycle cellulaire : fonctions	28
3.2.1. Fonctions des orthologues de MPS1	28
3.2.2. Fonction de MPS1 chez l'homme	30
3.2.2.1. En interphase	30
3.2.2.2. En phase mitotique	32
3.3. Structure de MPS1	37
3.3.1. Régions et domaines de MPS1	37
3.3.2. Domaine kinase de MPS1	39
3.3.3. Dimérisation de MPS1	41

3.4. Localisation de MPS1 aux KT	42
3.5. Régulation de l'activité	46
3.5.1. Expression, désactivation et dégradation.....	46
3.5.2. Régulation de l'activité : auto- et transphosphorylation.....	48
4. Une étroite relation entre MPS1 et PLK1	51
4.1. Rôle de PLK1 dans la régulation du SAC	51
4.1.1. Sites de phosphorylation sur MPS1 : sites PLK1 ou sites d'autophosphorylation, similarité dans les cibles.	51
4.1.2. Similarités dans les motifs consensus	52
4.1.3. Sites de phosphorylation sur MPS1 : on partage	53
4.1.4. Coopération pour un SAC efficace	54
4.1.5. Et si MPS1 n'était pas là.....	55
4.2. PLK1 régule l'activité et la localisation de MPS1, et inversement.	55
4.2.1. Différences entre les organismes.....	55
4.2.2. PLK1 contrôle le taux de renouvellement de MPS1 au KT.....	57
4.2.3. PLK1 peut phosphoryler et activer directement MPS1.....	58
4.2.4. D'autres coopérations PLK1-MPS1 ?.....	58
5. SAC, MPS1 et cancer.....	62
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	67
CHAPITRE 2.....	69
Distinct autoinhibitory elements within the MPS1 kinase N-terminal Extension regulate catalytic activity and kinetochore docking.....	70
Avant-propos.....	71
Résumé en français	72
Abstract	73
Introduction	74
Results	77
Discussion.....	98
Material and methods	106
Bibliography	113
Supplemental data	117
CHAPITRE 3.....	129
Conclusions générales et perspectives de recherches.....	130
Conclusions générales.....	130
Perspectives de recherche	133
RÉFÉRENCES	139
ANNEXES.....	154
PLAYING POLO DURING MITOSIS: PLK1 TAKES THE LEAD.....	154

LISTE DES TABLES ET TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales Cyclines et CDKs du cycle cellulaire.	5
Tableau 2 : Recherches et essais cliniques concernant MPS1 dans plusieurs types de cancers humains.....	65
Table 1 : Construction of plasmids	127

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 : Représentation schématique des 4 phases du cycle cellulaire.....	3
Figure 1.2 : Représentation schématique de la phase mitotique.....	8
Figure 1.3 : Structure du kinétochore.....	12
Figure 1.4 : Représentation du réseau KMN.....	13
Figure 1.5 : Structure du complexe NDC80.....	14
Figure 1.6 : Structure et fonction de KNL1.....	16
Figure 1.7 : Différents types d'attachement des chromosomes.....	17
Figure 1.8 : Mise en place du SAC.....	19
Figure 1.9 : Domaines de BUBR1.....	21
Figure 1.10 : Formation du MCC.....	22
Figure 1.11 : Inactivation du SAC par PP1 et PP2A-B56.....	24
Figure 1.12 : Phosphorylation en cascade de MPS1.....	34
Figure 1.13 : Fonctions de MPS1 au cours du cycle cellulaire.....	37
Figure 1.14 : Structure de MPS1 : régions et domaines.....	38
Figure 1.15 : Structure du domaine kinase de MPS1.....	40
Figure 1.16 : Modèles hypothétiques d'autophosphorylation de MPS1.....	42
Figure 1.17 : Modèles de d'inhibition de la signalisation de MPS1 par l'intermédiaire des MT aux niveau des KT :.....	46
Figure 1.18 : Comparaison des motifs consensus de MPS1 et PLK1.....	53
Figure 1.19 : MPS1 et PLK1 coopèrent.....	61

Chapitre 2

Figure 2.1: MPS1- Δ NTE exhibits attenuated activity and kinetochore localization.....	79
Figure 2.2: MPS1 clustering in the NTE supports its kinase activity.....	82
Figure 2.3: Dissection of the NTE reveals independent motifs regulating kinase activity and kinetochore binding.....	85
Figure 2.4 : Residue 40-49 autoinhibit NTE-mediated kinase activation.....	89
Figure 2.5: MPS1- Δ 19-29 is a major determinant of NTE localization to kinetochores.....	91
Figure 2.6 : MPS1 residues 19-29 inhibit kinetochore docking through increased affinity to TEM4.....	93
Figure 2.7 : Effects of MPS1 N-terminal mutants on SAC signaling and chromosome congression MPS1.....	96
Figure 2.8 : MPS1 regulation hypothetical model.....	105
Figure S1: Verification of MPS1 siRNA.....	117
Figure S2: MPS1 NTE contributes to kinase activity.....	118
Figure S3: Increased local concentration and transactivation contribute to MPS1 activation.....	120
Figure S4: MPS1-3A mutant exhibits robust kinase activity.....	121
Figure S5 : Characterization of the anti-pT33 MPS1 antibody.....	122
Figure S6: Trans-autophosphorylation in the MPS1 NTE.....	123
Figure S7 : Characterization of the MPS1 stable cell lines.....	124
Figure S8 : GST-CH domain of HEC1 binds to MPS1 but not to TEM4.....	125

Figure S9: Live cell imaging of HeLa T-Rex cells 126

Chapitre 3

Figure 3.1: Sites de sumoylation potentiels de MPS1 135

Figure 3.2: Alignement du motifs STP potentiel de MPS1 137

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	A cide D ésoxyribo N ucléique
APC/C	A naphase P romoting C omplex or C yclosome
APE	A lanine (A) – P roline (P) – A cide glutamique (E)
ARHGEF17	R ho g uanine nucleotide e xchange f actor 17
ATM	A taxia- T elangiectasia M utated
ATP	A denosine T ri P hosphate
ATR	A taxia- T elangiectasia R elated
BLM	B Loo M syndrome protein
BTR	B LM- T opoIII- R MI1- R MI2
BUB1	B udding U ninhibited by B enzimidazoles 1
BUB3	B udding U ninhibited by B enzimidazoles 3
BUBR1	B UB1- R elated kinase 1
BUGZ	B UB3 interacting G LEBS and Z inc finger domain
c-ABL	A Be L son tyrosine kinase
CCAN	C onstitutive C entromere A ssociated N etwork
CCT	C haperonin C ontaining T CP-1
CDC20	C ell D ivision C ycle 20
CDC25 A/C	C ell D ivision C ycle 25 A/C
CDK	C yclin D ependant K inase
CDRD	C entre for D rug R esearch and D evelopment
CENP	C EN t romere P rotein
CH	C alponin H omology
CHK1	C heckpoint protein K inase 1
CHK2	C heckpoint protein K inase 2
CLD	C entrosome L ocalization D omain
CPAP	C entrosomal P 4.1- a ssociated p rotein
CPC	C hromosomal P assenger C omplex
CREST	C alcinosis, R eynaud's syndrome, E sophaegal, dysmotility, S clerodactyly, T elangiectasia
CRM1	C h R omosomal M aintenance 1
D-box	D estruction b ox
DFG	A cide aspartique (D) – P hénylalanine (F) – G lycine (G)
DSN1	D osage S uppressor of N NF1 1
E2F	E 2 promoter binding F actor
ESK	E C S TY K inase
FRAP	F luorescence R ecovery A ter P hotobleaching
GLEBS	G LE2- B inding- S equence
H2B	H istone H 2 B
HEC1	H ighly E xpressed in C ancer 1
HORMA	H op1p- R ev7p- M ad2
HRD	H istidine (H) – A rginine (R) – A cide aspartique (D)

HSD	Histidine (H) – Sérine (S) – Acide aspartique (D)
HSP70	H eat S hock P rotein 70
INCENP	I Nner C ENTromere P rotein
IRK	I nternal R egion for K inetocho r e localization
KARD	K inetocho r e A ttach m ent R egulatory D omain
KD	K inase D ead
KEN	Lysine (K) – Acide aspartique (E) – Asparagine (N)
KI	Lysine (K) – Isoleucine (I)
KMN	K NL1- M IS12- N DC80
KNL1	K inetocho r e N ul L protein 1
KT	K ine T ocho r e
MAD1	M itotic A rrest D eficient 1
MAD2	M itotic A rrest D eficient 2
O-MAD2	O pen- MAD2
C-MAD2	C losed- MAD2
MBP	M yel i n B asic P rotein
MCC	M itotic C heckpoint C omplex
MDM2	M urine D ouble M inute 2
MELT	Méthionine (M) – Glutamate (E) – Leucine (L) – Thréonine (T)
MIM	MAD2 - I nteracting M otif
MIP1	MPS1 I nteracting P rotein- 1
miR-21	m icro R NA 21
MIS12	M inichromosome I n S tability 12
MPH1	MPS1 P ombe H omolog 1
MPS1	M ono P olar S pindle 1
MR	M iddle R egion
MT	M icro t ubule
MTA	M icro t ubule- T argeting A gents
MYT1	M Yelin T ranscription factor 1
NDC80	N uclear D ivision C ycle 80
NNF1	N ecessary for N uclear F unction 1
NSL1	NNF1 S ynthetic L ethal 1
NTE	N - T erminal E xtension
NUF2	N Uclear F ilament-containing protein 2
OAZ	O rnithine decarboxylase A nti Z yme
p21	protein 21 également connue comme p21^{CID} ou p21^{Waf1}
p53	tumor protein p53
PBD	P olo B ox D omain
PCM	P eri C entriolar M aterial
Phase G0	G zero / resting phase
Phase G1	G ap 1 phase
Phase G2	G ap 2 phase
Phase M	M itotic phase

Phase S	Synthesis phase
PLK1	Polo-Like Kinase 1
pNES	putative Nuclear Export Sequence
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPE	Proline (P) – Proline (P) – Acide glutamique (E)
PRP4	Pre-messenger RNA processing 4
RB	RetinoBlastoma
RMI 1	RecQ-Mediated genome Instability 1
RMI 2	RecQ-Mediated genome Instability 2
RPE-1	Retinal Pigmented Epithelial-1
RVSF	Arginine (R) – Valine (V) – Sérine (S) – Phénylalanine (F)
RWD	RING finger - WD repeat containing proteins - DEAD -like helicases
RZZ	Rod-Zwilch-Zw10
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SILAC	Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture
SILK	Sérine (S) – Isoleucine (I) – Leucine (L) – Lysine (K)
SiRNA	Small interfering RNA
SMAD2/3	Mot-valise formé de: SMA (S mall body size) et MAD (M others A gainst D ecapentaplegic) 2/3
SPB	Spindle Pole Body
SPC24	Spindle Pole Component 24
SPC25	Spindle Pole Component 25
SPC105	Spindle Pole Component 105
STP	Sérine (S) – Thréonine (T) – Proline (P)
SUMO-1	Small Ubiquitin-like Modifier 1
SUMO-2	Small Ubiquitin-like Modifier 2
TAL	ZK-Thiazolidinone
TEM4	Tumor Endothelial Marker 4
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TPR	Tetratricopeptide Repeat
TRIP13	Thyroid hormone Receptor Interactor Protein 13
TTK	Tyrosine Threonine Kinase (nom alternatif de MPS1)
UFD2	Ubiquitin Fusion Degradation 2
VDAC3	Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 3
WD40	tryptophan-aspartic acid dipeptide repeat
WEE1	WEE1 -like protein kinase
ZWINT	ZW10 I nteracting kinetochore protein

REMERCIEMENTS

C'est par ces quelques mots que j'ai l'occasion de remercier ceux qui ont contribué à l'accomplissement de cette thèse de doctorat et à ma réussite dans cette longue aventure.

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury, Dr Faure, Dr Charron et Dr Archambault d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et de faire le déplacement pour ma soutenance de thèse.

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Sabine Elowe qui, suite à quelques échanges de courriels et une conversation Skype, m'a accordée sa confiance et m'a permis de venir à Québec pour réaliser cette nouvelle expérience humaine et scientifique. Durant toutes ces années passées dans le laboratoire, sa disponibilité, ses conseils et son soutien m'ont permis de réussir et de terminer ce doctorat. Cela m'a aidé à me façonner en tant que scientifique, mais également en tant qu'être humain. J'ai énormément appris d'un point de vue scientifique sur mon sujet et la biologie en général, mais aussi la prise de décisions, l'avancée et la conduite d'un projet. Sabine m'a également appris la rigueur scientifique avec l'importance des contrôles dans toutes les expériences et l'analyse des résultats avec un regard critique. Un grand merci et toute ma gratitude pour cette expérience.

Mon acclimatation dans le laboratoire fut grandement facilitée par la disponibilité et les conseils des membres du laboratoire Audrey et Philippe présents à mon arrivée. Philippe a été, depuis mon premier jour au Québec et dans le laboratoire, d'un grand soutien en répondant à mes nombreuses questions et en m'aidant dans mes expériences. Danielle fut également toujours disponible pour discuter et me conseiller durant ces deux années qu'elle a passée dans le laboratoire. Je remercie également Michelle, Adeel, Luciano et Ibrahim pour leur participation et leur aide à la réussite de mon doctorat que ce soit par des discussions, des conseils, des petits et gros services ! Un gros merci à Luc,

qui a été à mes côtés sur le projet de MPS1 pendant plus de 8 mois et qui fut d'une très grande aide.

Avec le temps, les collègues de travail sont devenus des amis. Je voudrais une fois de plus remercier Adeel, Luciano, Luc, Martial et Alexis pour tous les moments et les soirées passées en dehors du lab. J'ai également eu la chance de rencontrer plein de gens super, d'avoir noué un bon nombre d'amitiés pendant ma thèse. Je tiens à tous vous remercier et en particulier Jana qui a été ma coloc à mon arrivée au Québec et m'a aidé à m'installer et m'a fait faire de belles rencontres. Un grand merci à John, PM, Yann, Paul, Jeff, Mike, Etienne et toute la gang pour ces inoubliables soirées, BBQ, games de volley et fin de semaine qui m'auront fait découvrir et apprécier la culture et la vie québécoise. Je remercie également les amis venus me visiter de France : Julien, Julie et Romain.

De façon plus intime, j'aimerais remercier ma famille : mes parents Jean-Luc et Christine et mon frère Yann. Sans eux rien n'aurait été possible, c'est grâce à vous que je suis ici aujourd'hui. Je n'oublie pas non plus mes beaux-parents Victor et Araceli qui sont d'un grand soutien depuis que je les ai rencontrés. Merci !

Finalement, je voudrais remercier celle avec qui tout débuta au détour d'une salle de culture cellulaire et avec qui depuis maintenant plus de 4 ans je partage ma vie : Karla. Elle aura été d'un soutien sans faille depuis le premier jour et m'a aidé tout au long de mon doctorat en écoutant mes présentations, relisant et corrigeant mes écrits, et m'encourageant lorsque le moral était en baisse. Infiniment Merci !!!

Une fois de plus, un grand merci à tous d'avoir rendu cela possible.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est déposée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval pour l'obtention du diplôme de Philosophas Doctor es Sciences (Ph.D.). Généralement, cette thèse porte sur l'étude de la protéine kinase mitotique Monopolar spindle-1 (MPS1) et sur les mécanismes de régulation de son activité et de sa localisation aux KT (Kinetochores) par sa région N-Terminale.

Le premier chapitre de la thèse constitue une introduction générale rédigée en français décrivant tout d'abord le cycle cellulaire et le point de contrôle de la mitose (Spindle Assembly Checkpoint, SAC). Puis, la description de la protéine MPS1 elle-même continue en détaillant ses fonctions, sa régulation et sa relation nouvellement mise en évidence avec une autre protéine kinase, PLK1. Enfin, une brève présentation des études et avancées impliquant MPS1 dans le contexte du cancer sera faite.

Le second chapitre de cette thèse détaillera les travaux de recherche que j'ai réalisé pour cette thèse au cours des années de mon doctorat dans le laboratoire du Dr Elowe. Ce chapitre est écrit en anglais sous la forme d'un article scientifique intitulé : Distinct autoinhibitory elements within the MPS1 kinase N-terminal Extension regulate catalytic activity and kinetochore docking. Il sera soumis dans un journal scientifique spécialisé dans le domaine sous peu.

Je suis le premier auteur de cet article, j'ai effectué et complété la majeure partie des expériences. Luc Murakami, un ancien étudiant Coop du laboratoire, Ibrahim Alharbi et Luciano Gama Braga, étudiants au doctorat dans le laboratoire ont participé à la réalisation de certaines expériences. Philippe Thébault, ancien professionnel de recherche a également pris part aux expériences et fut d'une grande aide. J'ai participé au design des expériences et j'ai écrit le manuscrit de l'article sous la supervision du Dr Elowe.

Le troisième chapitre de cette thèse sert de conclusion, il résume les principaux résultats obtenus, démontre leur pertinence et leur nouveauté. La discussion propose également l'exploration de voies futures susceptibles de contribuer à l'avancement des connaissances dans l'étude de la fonction et de la régulation de MPS1 dans le point de contrôle de la mitose.

En annexe, j'ai inséré un article de synthèse intitulé « Playing Polo during mitosis: PLK1 takes the lead » publié dans la revue scientifique *Oncogene* par notre laboratoire et pour lequel je suis premier auteur. J'ai principalement écrit les sections traitant de MPS1 et j'ai participé à la conception et la réalisation de plusieurs figures dans cet article.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Généralités sur le cycle cellulaire

Pour qu'un organisme multicellulaire puisse se développer et réparer ses tissus endommagés, il a besoin de remplacer et multiplier les cellules qui le composent. La cellule va se reproduire en divisant son contenu et donner deux cellules identiques en suivant une séquence d'évènements finement régulés que l'on appelle le cycle cellulaire [1]. Le cycle cellulaire est divisé en 2 grands évènements : l'interphase qui regroupe plusieurs phases appelées G1, S et G2 et la phase mitotique composée de la mitose et la cytotélerèse (**Figure 1.1**).

Pendant la première phase que l'on appelle G1 ou « Gap 1 phase » et qui va servir d'intervalle à la suite de la division précédente, la cellule se développe et se prépare pour la réplication de l'ADN (Acide désoxyribonucléique). Lorsque la cellule entre dans cette étape de réplication, cela marque le début de la phase de synthèse, S (pour synthesis en anglais), qui consiste à la duplication de l'ensemble du matériel génétique de la cellule. Ensuite, la cellule possède un temps additionnel pour se préparer à la suite de la division. On appelle cette phase G2 ou « Gap 2 phase » qui va permettre à la cellule de continuer à se développer et de se préparer pour l'étape cruciale du cycle cellulaire, la phase mitotique ou M-phase qui correspond à la l'étape de division cellulaire à proprement parler.

La mitose va assurer la distribution égale du matériel génétique de la cellule entre les deux cellules filles nouvellement formées. Le bon déroulement du cycle cellulaire dépend de la régulation stricte et précise du système de contrôle du cycle cellulaire qui dirige la bonne progression dans le temps et le bon ordre. Le cycle cellulaire est strictement régulé par des variations dans l'activité et l'expression de plusieurs Cyclines et CDKs (Cyclin Dependant Kinases) [2] (**Tableau 1**). Le cycle cellulaire peut être modulé à des endroits stratégiques grâce au placement de points de contrôle qui affectent le système Cycline-CDK. Il existe trois points de contrôle majeurs, le G1/S, le G2/M et le

SAC, qui vérifient si une étape a été complétée avec succès avant que l'entrée dans la phase suivante soit permise [3, 4].

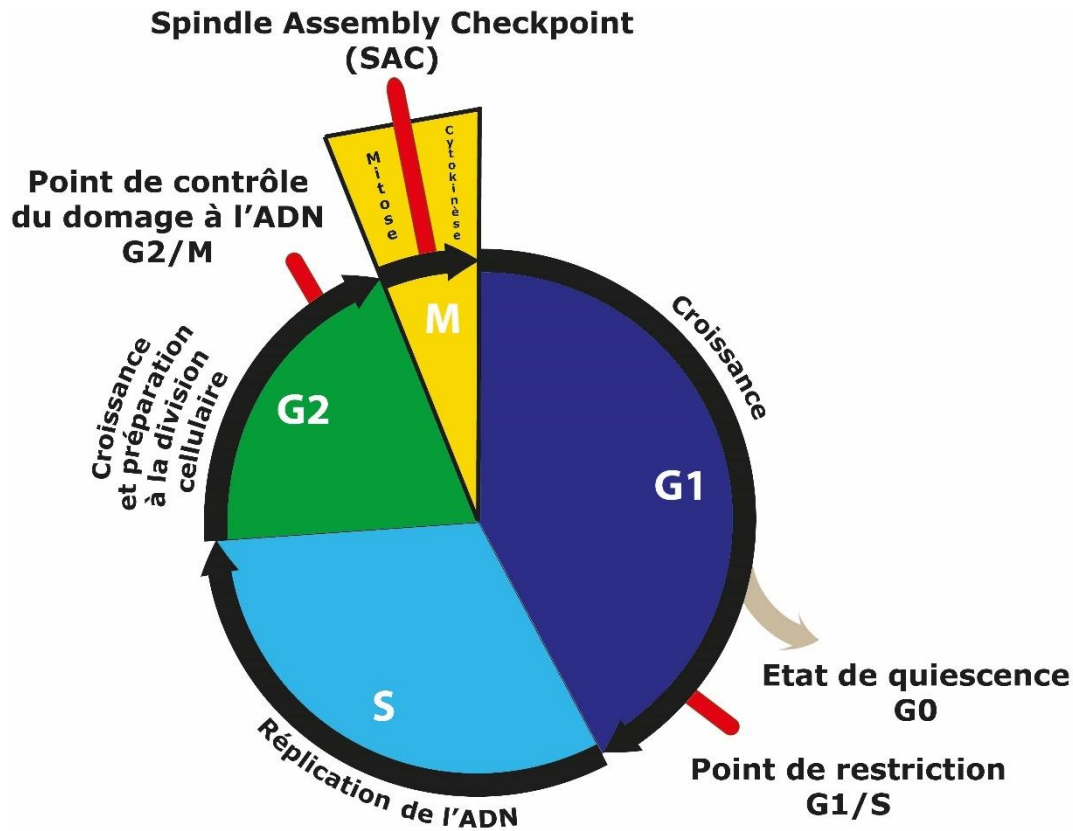


Figure 1.1 : Représentation schématique des 4 phases du cycle cellulaire. Les phases G1, S et G2 composent l'interphase. La mitose et la cytotéièrese composent la phase mitotique. Le cycle cellulaire est régulé par 3 points de contrôle, G1/S, G2/M et le SAC.

1.1. L'interphase et son contrôle

1.1.1. La phase G1 et sa régulation

Les phases G1 et G2 fournissent à la cellule un temps supplémentaire pour lui permettre de continuer sa croissance, qui en général nécessite plus de temps pour la duplication et la ségrégation des chromosomes. Ces deux phases intermédiaires servent de transitions importantes dans la progression vers l'étape suivante du cycle cellulaire et peuvent être contrôlées par une multitude

de signaux intracellulaires et extracellulaires. La phase G1 est une période de régulation très importante car c'est à ce moment que la cellule va soit continuer sa division, soit sortir du cycle cellulaire et entrer dans un état de quiescence. En effet, la présence de conditions de croissance défavorables et des signaux inhibiteurs provenant d'autres cellules va déclencher un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pour un certain temps ou alors pousser la cellule dans un état de quiescence prolongé réversible que l'on appelle G0 (G zéro). Une cellule en phase G1 ou G0 qui reçoit des signaux favorables à la division va progresser jusqu'à un point de passage irréversible en fin de G1 que l'on appelle le point de restriction (chez les mammifères) ou Start (chez les levures). Une fois ce point passé, la cellule est engagée dans la réplication de l'ADN en phase S. En début de G1, la cellule possède le complexe Cycline D / CDK4 [5]. Ce complexe va phosphoryler la protéine RB (RetinoBlastoma) [6] qui est une protéine de séquestration du facteur de transcription du gène de la Cycline E, E2F (E2 promoter binding factor) et qui sera libéré suite à cette phosphorylation. Une fois libéré, en début de G1, la transcription de la Cycline E démarre. Le complexe Cycline E / CDK2 va se former et cibler également la protéine RB par phosphorylation en augmentant encore sa propre amplification. E2F va aussi stimuler la transcription du gène de la Cycline A nécessaire pour la phase S.

En cas de problème de lésion de l'ADN, un mécanisme de régulation va entrer en jeu et la cellule n'effectuera pas la transition G1/S tant que le problème persiste. En effet, de nouvelles voies entrent en jeu impliquant des protéines kinases se liant à l'ADN tels que les kinases ATM et ATR (Ataxia-Télangiectasia Mutated et Related), et les kinases CHK1 et CHK2 (CHeckpoint protein Kinase 1 et 2). Quand ces voies sont activées, elles vont aboutir, d'une part, à l'inactivation de CDC25A (Cell Division Cycle 25A), une protéine phosphatase qui enlève des phosphates inhibiteurs des CDKs ce qui permet leur activation. Donc, les complexes Cycline D / CDK4 et Cycline E / CDK2 ne seront pas activés. D'autre part, ces kinases vont cibler p53 (tumor protein p53), une protéine régulatrice majeure. p53 va induire l'expression de p21, qui est une protéine inhibitrice de CDKs et qui va se lier aux complexes Cycline D / CDK4 et Cycline

E / CDK2 et bloquer l'entrée dans le cycle cellulaire. p53 va aussi induire la transcription de plusieurs enzymes de réparation de l'ADN [4, 7, 8].

Complexes Cyclin CDK	Cycline	Cdk partenaire
G1- Cdk	cyline D	Cdk 4, Cdk 6
G1/S- Cdk	cyline E	Cdk 2
S- Cdk	cyline A	Cdk 2, Cdk 1
M- Cdk	cyline B	Cdk 1

Tableau 1 : Les principales Cyclines et CDKs du cycle cellulaire.

1.1.2. La phase S

La phase S ou phase de synthèse est la phase de réplication de l'ADN au cours de laquelle les chromosomes sont dupliqués. Ce procédé commence au niveau de sites spécifiques de l'ADN appelés « origines de réplication » répartis en grand nombre le long des chromosomes. Au niveau de ces sites, des protéines vont ouvrir la double hélice d'ADN et l'exposer aux enzymes qui vont pouvoir initier la synthèse de l'ADN. La duplication des chromosomes va nécessiter également l'augmentation de la synthèse de protéines telles que les histones qui vont permettre la condensation de l'ADN sous forme de chromosomes. Enfin, pendant cette phase, les complexes des anneaux de cohésine se déposent le long des chromosomes nouvellement dupliqués pour permettre une liaison serrée. On appellera désormais les chromosomes dupliqués les chromatides sœurs [9].

En coordination avec le cycle cellulaire, à la transition de la phase G1/S et au cours de la phase S, les centrosomes, organelles permettant la formation du

fuseau mitotique sont dupliquées [10]. La duplication des centrosomes se termine en fin de phase S. Le centrosome est le principal centre d'organisation des MT dans les cellules des mammifères. Son noyau est composé d'une paire de centrioles perpendiculairement situées l'une à l'autre, qui « baignent » dans une matrice dense de protéines, connue sous le nom de matériel péracentriolaire (PCM : pericentriolar material). Les centrioles sont un complexe cylindrique formé de 9 triplets de MT. Le centrosome est formé lorsque les centrioles s'assemblent et que le PCM se forme autour de celles-ci. Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation de la duplication des centrosomes ainsi que dans la régulation de leur amplification. On retrouve la Cycline E, CDK2, CDK4 tout comme le facteur de transcription E2F [11]. D'autres protéines comme les Nek (Nima-related kinases), et plus particulièrement Nek2, Nek6, Nek7 et Nek9, sont impliquées dans la division des centrosomes et permettent ainsi la progression du cycle cellulaire [12]. La famille des PLK participe à plusieurs niveaux dans la duplication des centrosomes. PLK4 est connue comme étant une protéine kinase clé responsable de l'initiation de la duplication des centrioles [13-15]. La phosphorylation de PLK2 est critique pour le rôle de CPAP (centrosomal P4.1-associated protein) dans la formation du pro-centriole et son élongation [16]. Enfin on peut signaler le rôle de PLK1 dans la maturation des centrosomes en G2 en phosphorylant et recrutant de nombreuses protéines du PCM [17].

1.1.3. La phase G2 et sa régulation

Suite à la réplication de l'ADN en phase S, la cellule entre en phase G2, une seconde phase intermédiaire qui est plus courte que la phase G1 et qui va permettre à la cellule de se préparer à son entrée en mitose. Au cours de cette seconde phase, la croissance de la cellule continue et la synthèse de protéines se poursuit. Le volume du noyau augmente, les différents ARN continuent d'être synthétisés et des activités métaboliques essentielles pour la division cellulaire se produisent. L'ensemble des composantes cellulaires est dupliqué pour les deux futures cellules filles. Le complexe Cycline A / CDK1 est toujours requis pour l'avancement du cycle en G2 et va être impliqué dans l'activation du

complexe Cycline B / CDK1 [18, 19]. En effet, la synthèse de la Cycline B se passe en phase S et G2 et au moment où elle atteint un certain niveau, il y aura suffisamment de CDK1 actif pour déclencher une boucle d'activation rapide qui va causer un pic d'activité de CDK1 et permettre l'entrée en mitose [20]. Dans le cas où la réplication de l'ADN n'est pas terminée ou qu'il y a des dommages à l'ADN, les voies impliquant les kinases ATR/ATM et CHK1/CHK2 seront activées et vont phosphoryler CDC25C entre autres, ce qui aura pour effet de le séquestrer dans le cytoplasme par l'action des protéines de la famille 14-3-3 [21]. Cette famille de protéines régulatrices est connue pour sa capacité à se lier à de nombreuses protéines signalétiques. Suite à la phosphorylation de CDC25C, un site de liaison pour la liaison des protéines de la famille 14-3-3 est créé et permet une interaction entre CDC25C et une protéine 14-3-3, ce qui va donc permettre de séparer CDC25C de son substrat CDK1. Les kinases WEE1 (WEE1-like protein kinase) et MYT1 (MYelin Transcription factor 1) vont inactiver CDK1 en le phosphorylant et p53 va de nouveau intervenir en activant la transcription de p21 bloquant l'activité des complexes Cycline B / CDK1. Tous ces mécanismes vont empêcher l'entrée en mitose jusqu'à la fin de la réplication et la réparation de l'ADN [22].

1.2. La phase mitotique : Mitose et Cytodiérèse

En mitose, les paires de chromosomes précédemment dupliqués vont être également distribués entre les deux cellules filles nouvellement formées. La mitose est définie par plusieurs phases (**Figure 1.2**). La première appelée la prophase, est marquée par une rapide activation du complexe Cycline B / CDK1. Les centrosomes également dupliqués vont se séparer et le fuseau mitotique va commencer à se former. Enfin, les chromatides sœurs vont se condenser pour passer sous forme de chromosomes [23]. La cohésine mise en place en phase S autour des chromatides sœurs va être enlevée des bras de chromosomes et conservée au niveau des centromères jusqu'en anaphase [24]. La prophase est suivie par la prométaphase qui démarre lorsque brusquement l'enveloppe nucléaire se désagrège [25]. Les MT du fuseau s'assemblent et se désassemblent

rapidement à la recherche des KT sur les chromatides sœurs, qui sont leurs sites de liaison.

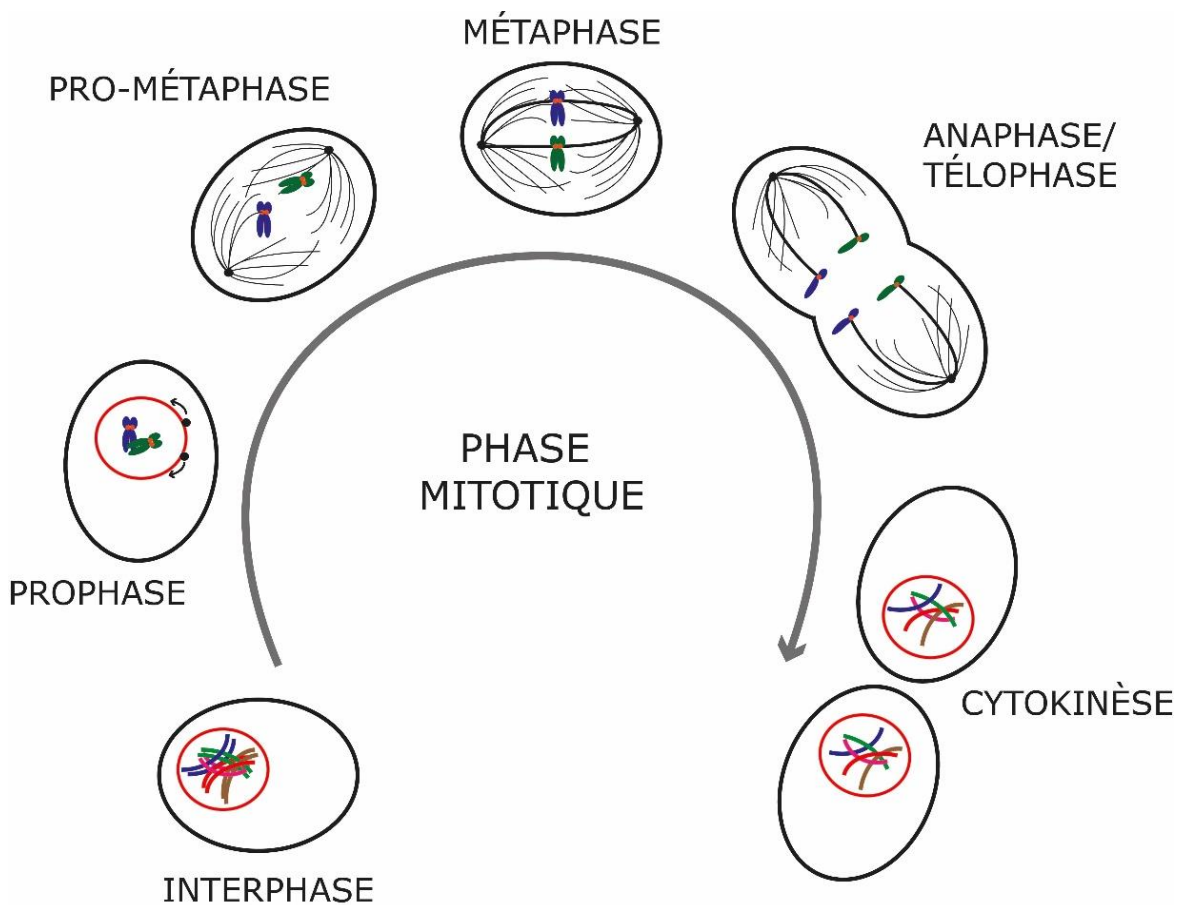


Figure 1.2 : Représentation schématique de la phase mitotique.

Prophase : la chromatine se compacte et prend la forme de chromosomes. **Prométaphase** : l'enveloppe nucléaire est détruite permettant l'attachement des microtubules du fuseau au niveau des kinétochores. **Métaphase** : les chromosomes sont attachés correctement aux deux pôles de la cellule et alignés au niveau de la plaque équatoriale à égale distance des pôles. **Anaphase** : Les chromatides sœurs se séparent et sont tractés aux deux pôles opposés de la cellule. **Télophase** : la membrane nucléaire se reforme donnant naissance à deux noyaux. **Cytodiérèse** : le contenu cellulaire est divisé entre les deux cellules filles nouvellement formées.

La métaphase se passe lorsqu'une fois correctement attachées par les MT aux deux pôles opposés de la cellule, les chromatides sœurs vont s'aligner au niveau de la plaque équatoriale en attendant que le signal du SAC soit terminé afin de passer à l'étape suivante. En effet, le SAC va permettre de ralentir le

cycle cellulaire en attendant que toutes les paires de chromosomes soient correctement attachées aux deux pôles opposés de la cellule et alignées [26, 27].

La séparation brutale des deux chromatides sœurs vers les deux pôles opposés de la cellule va marquer la transition métaphase-anaphase [28]. Cette séparation est causée par une dégradation des anneaux de cohésine qui maintenaient chaque paire de chromosomes au niveau des centromères et aussi à cause d'une dégradation de la Cycline B. Ceci va permettre la sortie de l'état de mitose et permettre un nouveau cycle de division cellulaire. En télophase, les deux ensembles de chromosomes filles arrivent au niveau des pôles et commencent à se décondenser. Une nouvelle enveloppe nucléaire commence à se reformer autour de chaque ensemble de chromosomes et marque la fin de la mitose [29]. Enfin, la cytotélorèse, la deuxième étape de la phase mitotique, termine le cycle cellulaire. Elle correspond à la division du cytoplasme de la cellule entre les deux cellules filles. Un anneau contractile composé de filaments d'actine et de myosine se forme et en se contractant va pincer la cellule créant deux cellules filles identiques en tous points [30].

2. Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

Le SAC est le point de contrôle que la cellule met en place pour assurer la bonne ségrégation des chromosomes entre les deux futures cellules formées. C'est un mécanisme senseur de l'attachement entre les KT et les MT du fuseau mitotique qui va émettre un signal provenant des KT non attachées. Ce système est extrêmement sensible car un seul KT mal attaché ou non attaché va activer le signal et bloquer le cycle cellulaire en attendant que l'interaction soit correctement faite [31]. La cascade signalétique menant à l'activation du SAC se met en place au niveau des KT. Dans un premier temps, l'organisation de cette structure complexe sera décrite (2.1), puis la régulation des attachements KT-MT sera brièvement évoquée (2.2). La signalisation menant à la mise en place du SAC (2.3) et les mécanismes déclenchant sa désactivation (2.4) seront détaillés pour clore cette section.

2.1. Formation et structure des kinétochores

Les KT ne sont pas de simples sites d'attachement des MT, ce sont des mécano-senseurs qui vont contrôler la stabilité de l'attachement des MT et favoriser la bi-orientation des chromatides sœurs [32]. Ils contiennent des protéines motrices telles que CENP-E (CENTromere Protein E) et la dynéine qui vont s'associer aux MT et vont aider à générer des forces pour le déplacement des chromosomes sur le fuseau. L'ultrastructure des KT a été décrite grâce à des études par microscopie électronique qui ont permis de montrer une structure tri-laminaire d'environ 250nm de large et de 80nm de profondeur. Il y a environ 100 protéines au niveau du KT qui ont été identifiées chez l'Humain [33]. Un KT est organisé sur plusieurs niveaux : le KT interne est la partie la plus proche de la chromatine. Il va servir de base à la structure du KT et sera formé par l'assemblage de nombreuses protéines centromériques (CENP). Ensuite, plus à l'extérieur on retrouve au niveau du KT externe, les protéines du réseau KMN (complexe KNL1, complexe MIS12 et complexe NDC80) qui vont permettre l'interaction des KT avec les MT [34, 35]. À l'extérieur, il y a la corona fibreuse qui est formée en majorité de protéines qui vont se positionner temporairement

pour la mise en place du SAC. Le nombre de MT qui va venir s'attacher aux KT chez l'humain varie entre 15 et 30 [36].

2.1.1. Kinétochore interne

Le KT est un assemblage multiple de sous unités protéiques qui s'assemblent au niveau d'un locus spécialisé de la chromatine que l'on appelle centromère. Les centromères humains consistent en un grand nombre de répétitions en tandem de 171 paires de bases que l'on appelle des répétitions satellite alpha (α -satellite repeats) et s'étendent sur des domaines de 0.2 à 4 Millions de paires de bases [37]. Ces répétitions sont compactées par des nucléosomes spécialisés contenant le variant spécifique d'une Histone H3, CENP-A (Centromere protein-A) [38, 39]. CENP-A définit le site de formation du KT [40, 41]. Il est requis pour le recrutement de tous les autres composants du KT [42, 43] et est suffisant pour promouvoir l'assemblage du KT quand on le cible artificiellement sur un autre site [44].

L'identification des protéines présentes aux KT a débuté avec l'aide de sérums de patients atteints du syndrome CREST (Calcinosis, Reynaud's syndrome, Esophageal, dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia), désormais appelé sclérodémie systémique limitée et dont les personnes atteintes produisent des anticorps détectant les centromères dans les cellules [45]. De nombreuses protéines CENP ont été identifiées par la suite et sont désignées sous le nom de CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) (**Figure 1.3**). Ces protéines localisent dans la région du KT la plus proche de la chromatine. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les relations de dépendance entre les différentes CENP et leur recrutement, ce qui a montré une subdivision des CENP en 6 groupes distincts (**Figure 1.3**) : le complexe CENP-LN [46, 47], le complexe CENP-HIKM [47, 48], le complexe CENP-OPQRU [49], les complexes CENP-TW et CENP-SX et la protéine CENP-C [49, 50].

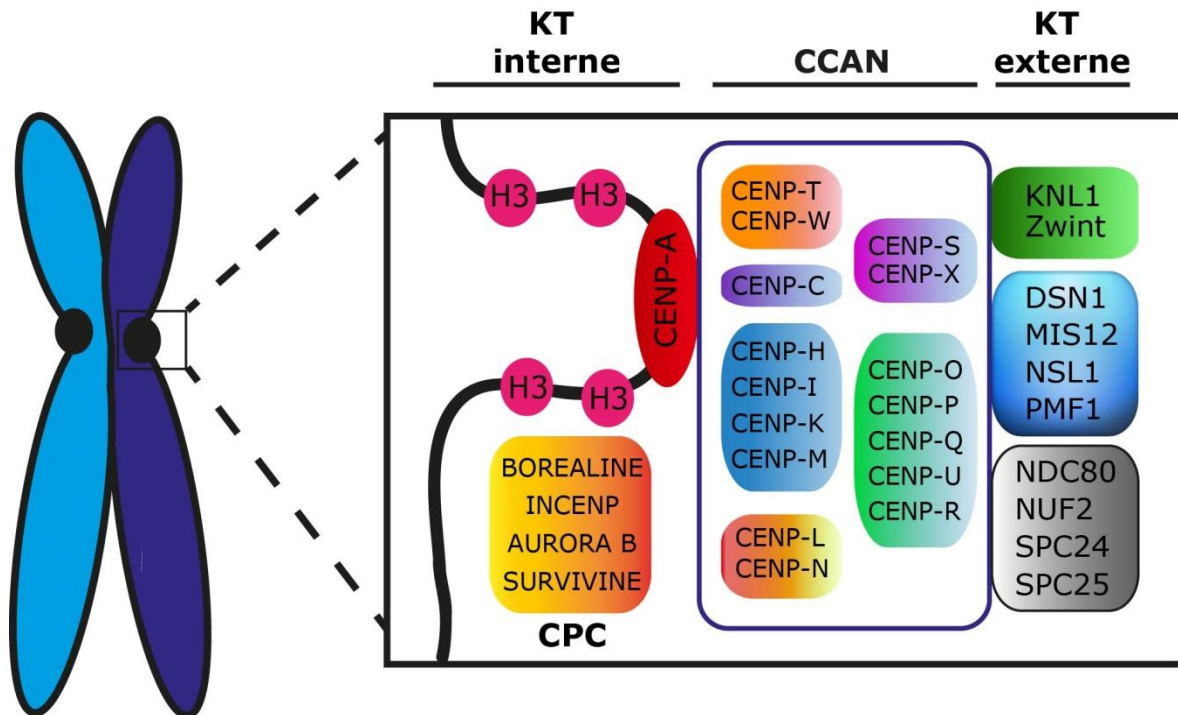


Figure 1.3 : Structure du kinétochore

Représentation schématique de l'organisation d'un KT. Le KT interne est composé du variant d'histone CENP-A, qui sert de base à la formation du KT. On retrouve au niveau des centromères et du KT interne, le complexe passager (CPC) qui participe à la correction des erreurs d'attachement. Plus à l'extérieur, on retrouve le CCAN constitué de nombreuses protéines CENP qui font le lien avec le KT externe qui lui est constitué du réseau KMN. Figure inspirée par [51].

2.1.2. Kinétochore externe

Le KT externe va former l'interaction avec les MT du fuseau. Il est responsable de la transduction de la force générée par la dépolymérisation des MT pour déplacer les chromosomes. Le cœur du KT externe est composé d'un assemblage de 10 sous-unités connu sous le nom de KMN (**Figure 1.3 et 1.4**). Ce réseau s'assemble au niveau des KT en prophase [35] et disparaît en télophase [32]. Les complexes NDC80 (Nuclear Division Cycle [52]) et KNL1 (Kinétochore Null 1) possèdent tous les deux une activité de liaison aux MT [35, 53-55] alors que complexe MIS12 (Minichromosome InStability 12) va quant à lui servir à coordonner la liaison des deux autres complexes au MT [56].

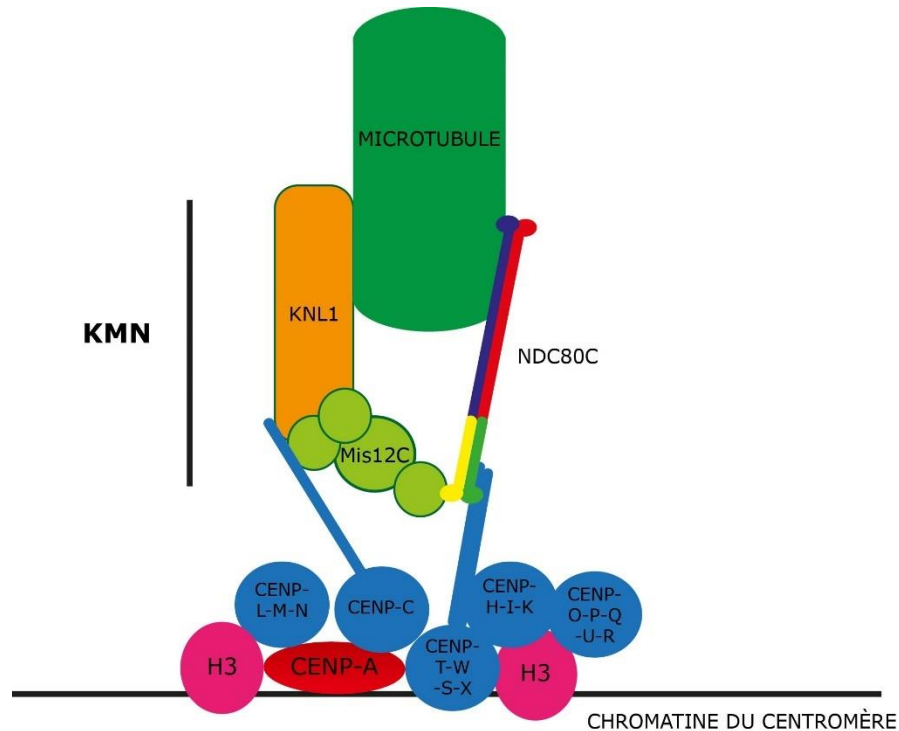


Figure 1.4 : Représentation du réseau KMN

Le réseau KMN est composé des complexes KNL1, MIS12 et NDC80. Le KMN interagit avec le CCAN au niveau de CENP-C et de CENP-T qui se lie directement au complexe MIS12 et NDC80 respectivement. Figure inspirée par [57].

2.1.2.1. Complexe NDC80

Le complexe NDC80 est un complexe hétérotetramérique de 57nm de long qui est constitué de deux hétérodimères [58]. Le premier hétérodimère est composé par les protéines HEC1 (Highly Expressed in Cancer [59]) et NUF2 (NUclear Filament-containing protein 2 [60]). Le second hétérodimère est composé par les protéines SPC24 et SPC25 (Spindle Pole Component 24 et 25 [61]). Ces deux dimères sont maintenus ensemble par des domaines en superhélice se chevauchant et situés en C-Terminale de HEC1/NUF2 et en N-Terminale de SPC24/SPC25 [33, 62, 63] (**Figure 1.5**). Le C-Terminale de SPC24/SPC25 interagit à la fois avec CENP-T [64] et NSL1 (NNF1 synthetic lethal 1) et DSN1 (Dosage Suppressor of NNF1 1) du complexe MIS12 chez l'humain (**Figure 1.4**).

Le complexe NDC80 est nécessaire à la localisation aux KT de plusieurs kinases essentielles au SAC dont MPS1 (Monopolar Spindle-1) et les protéines MAD1 et MAD2 (Mitosis Arrest Deficiency 1 et 2) [65, 66]. L'étude de la structure du complexe NDC80 a permis de mettre en évidence la région de liaison aux MT. Elle consiste en une paire de domaines CH (Calponin Homology) dans les sous-unités NUF2 et HEC1 [62, 63, 67]. En plus de son domaine CH, la protéine HEC1 possède une région d'environ 80 résidus fortement basiques et structurellement désordonnée située en N-Terminale. Cette région est également impliquée dans l'interaction MT-NDC80 in vivo et in vitro [53, 62, 63, 68-70]. Il a été également montré que la région N-terminale de HEC1 régule la liaison aux MT. En effet, la kinase Aurora B, un régulateur de l'interaction MT-KT, phosphoryle jusqu'à 9 sites dans cette région [35, 53, 62, 71]. Cette phosphorylation neutralise la charge positive de cette région, diminuant ainsi fortement l'affinité de liaison pour les MT in vitro [62, 63, 68, 70] et augmente l'affinité de HEC1 avec MPS1 [72].

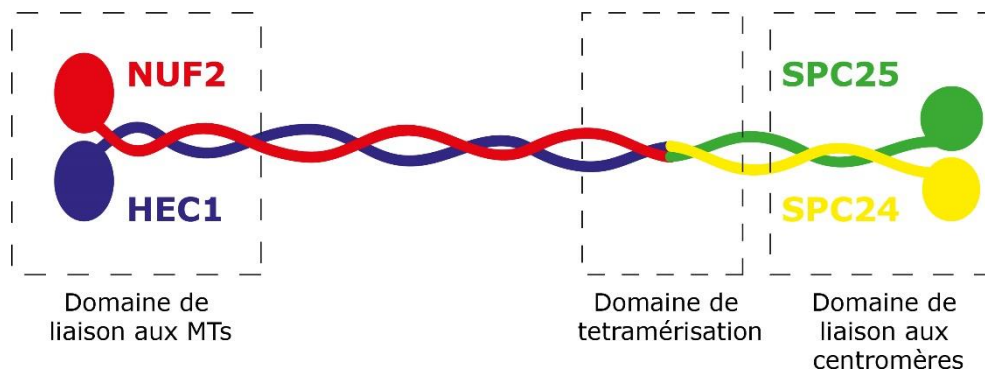


Figure 1.5 : Structure du complexe NDC80.

Le complexe NDC80 est composé de 4 sous-unités. SPC24 et SPC25 qui interagissent directement avec le centromère par l'intermédiaire de CENP-T. HEC1 et NUF2 font la liaison avec les MT.

2.1.2.2. Complexe KNL1

Le complexe KNL1 (**Figure 1.6**) est un hétérodimère entre la protéine KNL1 et la protéine ZWINT (ZW10 interacting kinetochore protein) [73]. Protéine la plus grande du KMN avec une taille de 300 kDa, KNL1 fonctionne comme une plateforme de signalisation qui contribue à la formation de l'attachement KT-MT

[32, 74]. KNL1 est requise pour une ségrégation précise des chromosomes pendant la mitose et participe également à l'activation et à la désactivation du SAC. Le recrutement de KNL1 aux KT passe par le complexe MIS12 et une interaction avec sa sous-unité NSL1 [75]. C'est un motif d'environ 20 résidus en C-Terminal de NSL1 participant à l'interaction avec la région C-Terminale de KNL1. La région C-terminale de KNL1 est principalement désordonnée. C'est une région comprenant un domaine en superhélice suivie de plusieurs domaines RWD en tandem (RING finger - WD repeat containing proteins - DEAD-like helicases, domaine de 100 acides aminés qui participe dans les interactions protéiques). Le domaine RWD participe à l'interaction avec le complexe MIS12. La protéine ZWINT est partenaire de KNL1, elle interagit avec la région en superhélice de la partie C-Terminale de KNL1 [73]. ZWINT est une petite protéine de 277 acides aminés qui participe au recrutement du complexe RZZ (Rod-Zwilch-ZW10) [76, 77], complexe qui à son tour recrute la protéine adaptatrice Spindly. Spindly permet d'attacher le complexe moteur Dynéine-Dynactine à des protéines du point de contrôle [78]. Le complexe ainsi formé participe entre autres à l'attachement KT-MT et au mouvement des chromosomes en prométaphase. ZWINT est aussi connu pour être un substrat de la kinase Aurora B et sa phosphorylation par celle-ci semble être responsable du recrutement des complexes RZZ et Dynéine-Dynactine au KT [79, 80]. KNL1 possède de nombreux sites de liaison de protéines dans sa région N-terminale. Des motifs SILK (Sérine-Isoleucine-Leucine-Lysine) et RVSF (Arginine-Valine-Sérine-Phénylalanine) retrouvés à l'extrémité N-Terminale de KNL1 vont permettre l'interaction avec PP1 (Protein Phosphatase 1) [81, 82] qui agit en opposition à Aurora B et sert de médiateur dans l'inactivation du SAC [83]. Deux motifs hélicoïdaux, les motifs KI 1 et 2 (Lysine-Isoleucine), d'une dizaine d'acides aminés de long, ont été identifiés également dans la région N-Terminale et sont impliqués dans l'interaction avec le domaine TPR (Tetratricopeptide Repeat) des kinases du SAC, BUB1 et BUBR1 [84] (Budding uninhibited by benzimidazoles 1 et BUB1-related kinase 1). Enfin, de nombreux motifs MELT (Méthionine-Glutamate-Leucine-Thréonine) ont été identifiés et agissent, une fois phosphorylés sur le résidu thréonine par la kinase MPS1 comme sites de

recrutement du complexe hétérotétramérique BUB1-BUB3-BUBR1-BUB3 (Budding uninhibited by benzimidazoles 3) qui est essentiel pour la cascade signalétique du SAC [85-90].

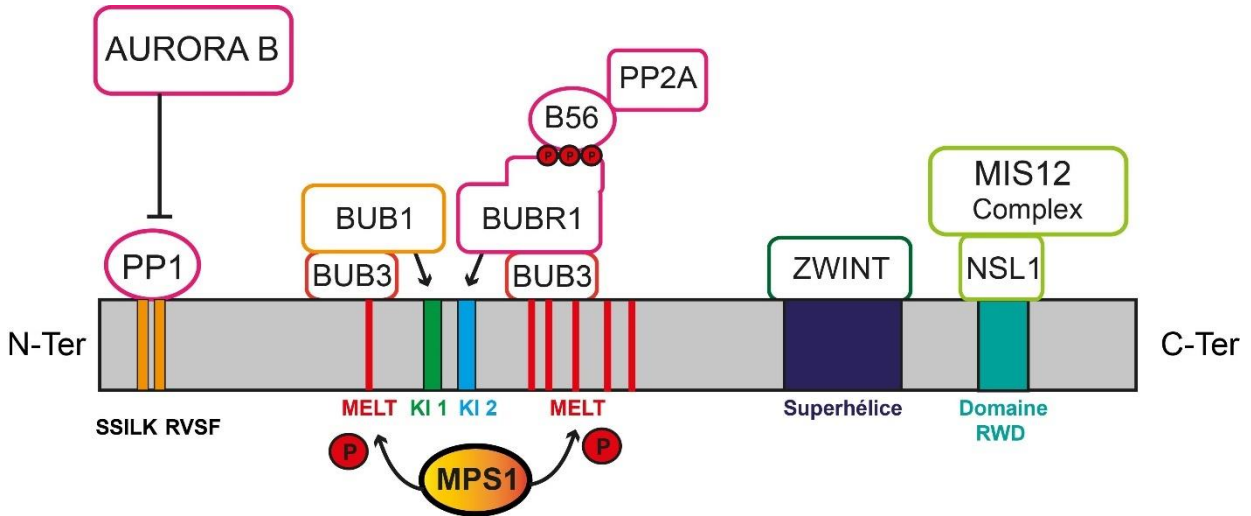


Figure 1.6 : Structure et fonction de KNL1

Représentation schématique des différents domaines et motifs de la protéine KNL1 décrits plus en détail dans la section « 2.1.2.2. Complexe KNL1 ». Figure inspirée par [91, 92].

2.1.2.3. Complexe MIS12

Le complexe MIS12 sert de plateforme d'interaction qui participe à la formation et l'assemblage du réseau KMN. Ceci est possible grâce à ses sites de liaison pour à la fois le complexe NDC80 et le complexe KNL1. Il permet également une connexion entre le KT externe et le KT interne par l'intermédiaire d'interactions avec CENP-C et CENP-T. Ce complexe de 22nm de longueur est formé de 4 sous-unités attachées les unes à la suite des autres, NNF1 (Necessary for Nuclear Function 1), MIS12, DSN1 et NSL1 de l'intérieur vers l'extérieur du KT [93].

2.2. Régulation de l'attachement KT-MT

La ségrégation fidèle des chromosomes est assurée par un attachement bi-orienté (amphitélisque) des chromosomes au fuseau par l'attachement terminal des MT au KT (**Figure 1.7**) [94]. La bi-orientation est complétée

lorsque chaque KT de chaque chromatide sœur est relié et orienté par les MT vers un pôle de la cellule. La capture des MT par les KT est un évènement asynchrone et stochastique [95, 96]. Il apparait donc normal que les attachements ne soient pas tous correctement bi-orientés en prométaphase. Certains sont des états intermédiaires comme les attachements monotéliques (où seulement un KT est lié avec les MT du fuseau) ou les attachements latéraux (où les KT sont attachés sur le côté d'un MT) et vont éventuellement mener à la formation d'un attachement bi-orienté au commencement de l'anaphase. Les attachements latéraux sont essentiels pour l'alignement du fuseau à l'équateur [97]. Cependant, des erreurs d'attachement peuvent se produire comme les attachements mérotéliques (un même KT est lié aux deux pôles) et les attachements syntéliques (un MT attache les deux KT d'une paire de chromatides sœurs). Dans ces cas-là, le CPC (Chromosomal Passenger Complex) [98] va promouvoir la bi-orientation en déstabilisant spécifiquement les mauvais attachements et donnant ainsi aux chromosomes de nouvelles opportunités de se ré-attacher correctement.

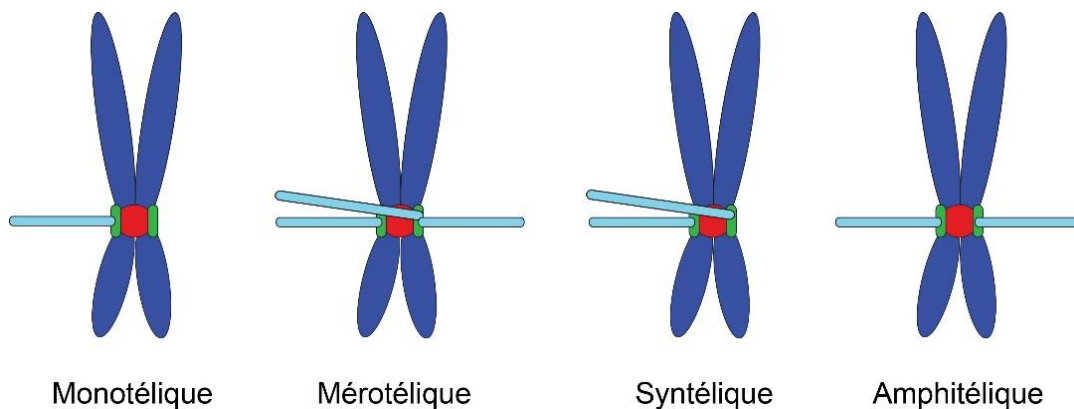


Figure 1.7 : Différents types d'attachement des chromosomes

Représentation schématique des attachements des kinétochores aux microtubules : corrects (amphitélique) et incorrects (monotélique, syntélique and mérotélique).

Le CPC est constitué de 4 sous-unités, Aurora B, INCENP (Inner centromere protein), Boréaline et Survivine [99]. Aurora B est une des principales kinases impliquées dans ce mécanisme de correction [100, 101]. La

phosphorylation par Aurora B va directement inhiber l'activité de plusieurs composants de l'interface KT-MT dont le complexe NDC80 [35, 53] et le complexe Ska1 [102, 103]. La phosphorylation d'Aurora B va également activer le CPC [104]. Le CPC va spécifiquement cibler les attachements incorrects sans affecter les attachements bi-orientés. Une fois correctement attachés aux deux pôles opposés de la cellule, les KT bi-orientés sont sous tension. Il semble alors que la phosphorylation par Aurora B de ses substrats au KT externe est sensible à la tension. En effet, cette phosphorylation diminue au niveau des KT bi-orientés [56, 105]. Ceci serait dû, en partie, à la séparation d'Aurora B de ses substrats, car les protéines du CPC localisent au niveau de la région du centromère interne entre les deux KT [106, 107].

2.3. Mise en place du SAC et formation du MCC

En plus de son rôle dans l'attachement des MT, le KT joue un rôle essentiel dans la communication du statut d'attachement des MT au SAC qui va retarder la sortie de la mitose jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement attachés et bi-orientés. Les premières expériences réalisées dans les années 1990 dans les cellules PtK2 (*Potorous tridactylus*) ont montré qu'à l'origine de la mise en place du point de contrôle, il y avait des KT non attachés qui retardaient ainsi la progression en anaphase [108]. L'ablation de l'attachement d'un kinétochore bi-orienté avec un laser a montré qu'un seul KT non-attaché était suffisant pour empêcher le passage en anaphase pendant plusieurs heures [31]. L'objectif du SAC est donc de gagner du temps en maintenant la mitose et la cohésion des chromatides sœurs pour que le fuseau ait le temps d'attacher correctement tous les chromosomes. Pour cela, le SAC va produire un signal inhibiteur d'une ligase ubiquitine E3 (APC/C, Anaphase Promoting Complex / Cyclosome) qui va spécifiquement dégrader la Sécurine causant la séparation des chromatides sœurs et la Cycline B menant ainsi à la sortie de la mitose [109].

2.3.1. Cascade signalétique du SAC

La cascade signalétique du SAC va commencer avec l'action de la kinase Aurora B qui va phosphoryler plusieurs de ses substrats au niveau de KT non-attachés et va favoriser le recrutement de la protéine kinase MPS1 au niveau des KT [110]. MPS1 va alors à son tour phosphoryler les motifs MELT de KNL1 qui vont servir de plateforme de recrutement pour d'autres protéines du SAC [85-90] (**Figure 1.8A**).

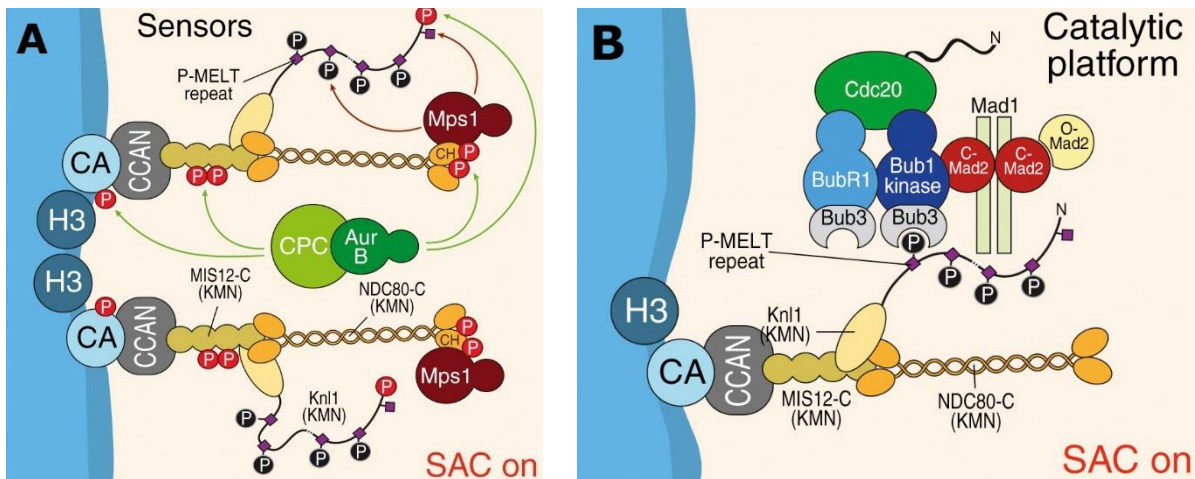


Figure 1.8 : Mise en place du SAC

(A) Aurora B phosphoryle plusieurs de ses substrats au niveau du KT non-attaché et va promouvoir le recrutement de MPS1 au KT qui va à son tour pouvoir phosphoryler les motifs MELT de KNL1. (B) BUB3 va reconnaître les motifs MELT phosphorylé par MPS1, BUB3 va recruter son partenaire BUB1 au KT. Ce premier complexe va recruter le complexe BUB3:BUBR1 et participer au recrutement de CDC20 et du complexe MAD1:C-MAD2. Le complexe MAD1:C-MAD2 va accélérer la conversion O-MAD2 en C-MAD2 favorisant la formation du MCC. Figure provenant de [111].

Une fois phosphorylés, ces motifs vont servir de sites d'amarrage pour BUB3 [112]. BUB3 va emmener avec elle la kinase BUB1 avec qui elle forme un complexe. BUB3 qui forme aussi un complexe avec BUBR1 ne va pas recruter BUBR1 au niveau de KNL1 selon le même mécanisme. En effet, le complexe BUB3:BUBR1 a besoin de la présence de BUB3:BUB1 au niveau de KNL1 pour pouvoir localiser correctement [113, 114] (**Figure 1.8B**). Cependant, une autre protéine, BUGZ (BUB3 interacting GLEBS and Zinc finger domain), a récemment été identifiée comme étant partenaire de BUB3. BUGZ est une protéine

chaperonne qui promeut l'interaction KT-MT, l'alignement chromosomique ainsi que la progression mitotique. De plus, elle participe à la fonction de BUB1 au KT [115]. Proche des motifs MELT, KNL1 possède une paire de motifs KI 1 et 2 qui interagissent avec le TPR des protéines BUB1 et BUBR1 respectivement [84, 116]. BUB1 va participer au recrutement de CDC20 (Cell Division Cycle 20) et du complexe MAD1:C-MAD2 [117, 118]. MPS1 va aussi participer à la formation du MCC (Mitotic Checkpoint Complex) en recrutant O-MAD2 (Open-MAD2) au niveau des KT [119]. MPS1 va également phosphoryler BUB1 et MAD1 contribuant ainsi d'une autre manière à l'activation du SAC [120]. MPS1 et BUB1 sont nécessaires pour le recrutement de BUBR1 aux KT non-attachés et participent donc à la formation du MCC [118, 121]. En effet, même si toutes les kinases du SAC sont nécessaires pour une signalisation efficace, seulement un petit groupe est directement impliqué dans l'inhibition de l'APC/C-CDC20. Une description plus détaillée sera faite des protéines BUBR1, MAD2 et BUB3 qui forment le MCC.

2.3.2. Assemblage du MCC

Le SAC possède plusieurs « intensités » de force, dépendant de la sévérité de ce qui l'a déclenché. On parle d'un système qui fonctionne comme un rhéostat et non comme un interrupteur [122]. La différence de force va refléter le nombre d'attachements problématiques et donc influencer sur le taux d'assemblage du MCC [123]. Le MCC est continuellement assemblé et désassemblé et le système doit s'adapter pour que ce taux soit toujours suffisant pour maintenir un arrêt en mitose même en réponse à un seul KT non-attaché [108].

Le MCC consiste en l'assemblage de 3 protéines du SAC; MAD2, BUBR1 et BUB3 avec la protéine CDC20. Si on s'intéresse plus en détail à la structure de ce complexe et de ses composants, BUBR1 est la plus grande protéine du complexe. En partant de la région N-Terminale, elle possède un domaine hélice-boucle-hélice (HLH, Helix-Loop-Helix) qui comprend un motif KEN box 1 et participe à la liaison avec la protéine CDC20 [124]. Ensuite, on retrouve un domaine TPR, un motif D-box (Destruction box) et un motif KEN box 2 qui

participe à la liaison de la seconde molécule de CDC20 [125, 126]. On retrouve aussi un domaine GLEBS (Gle2-binding-sequence) ou BUB3-binding Domain qui se lie à la protéine BUB3 [112, 127]. À la suite du GLEBS, on retrouve une extension sous forme de boucle hélicoïdale qui est importante pour la dimérisation avec BUB1 et la localisation au KT [127]. Puis, on a un domaine KARD (Kinetochores Attachment Regulatory Domain) qui interagit de manière phospho-dépendante avec PP2A (Protein Phosphatase 2A) [128-130] et un domaine kinase non fonctionnel en C-Terminal [131] (**Figure 1.9**).

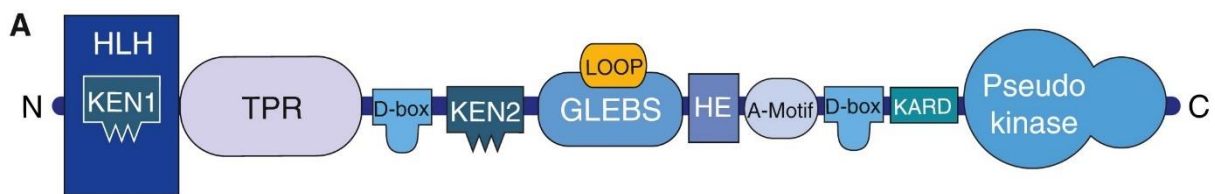


Figure 1.9 : Domaines de BUBR1

Représentation schématique des domaines et motifs de BUBR1, leurs fonctions sont détaillées dans la section « **2.3.2. Assemblage du MCC** ». Figure provenant de [111].

BUB3 est une protéine entièrement constituée d'un bêta-propeller à 7 pales en WD40 (Tryptophan (W) - aspartic acid (D) dipeptide repeat) qui va interagir avec les domaines GLEBS de BUB1 et BUBR1 [132]. BUB3 aura un rôle différent quand elle sera liée à BUB1 ou BUBR1 comme on l'a vu précédemment. Avec BUB1, elle aura un rôle d'adaptateur dans la signalisation en reconnaissant les MELT phosphorylés [127], tandis qu'avec BUBR1 elle sera nécessaire pour l'interaction avec BUB3:BUB1 [133]. La protéine CDC20 est aussi organisée en bêta-propeller, mais possède également deux extensions en N- et C-Terminal. Cette protéine possède deux fonctions. En effet, elle sert d'activateur de l'anaphase, où elle active l'APC/C en lui présentant des substrats pour effectuer la liaison de l'ubiquitine et donc leur dégradation. Aussi, elle aura la fonction opposée lorsqu'elle sera incluse dans le MCC et deviendra alors une protéine inhibitrice de l'anaphase. Enfin, le dernier composant du MCC, MAD2 est une protéine à domaine HORMA (nommé d'après les protéines Hop1p, Rev7p and MAD2) qui possède deux états topologiques bien distincts [134, 135]. MAD2 possède une conformation dite ouverte qui est inactive, O-MAD2 et une

conformation fermée, C-MAD2 (Closed-MAD2) qui est active et qui va pouvoir se lier à un partenaire tel que MAD1 (récepteur de MAD2) ou à CDC20 [135]. Ce changement de structure a lieu suite à l'enroulement d'un élément mobile de MAD2 (appelé « Safety belt ») autour du motif MIM (MAD2 interaction Motif) de MAD1 ou de CDC20 permettant cette transition de conformation ouverte à fermée [136, 137].

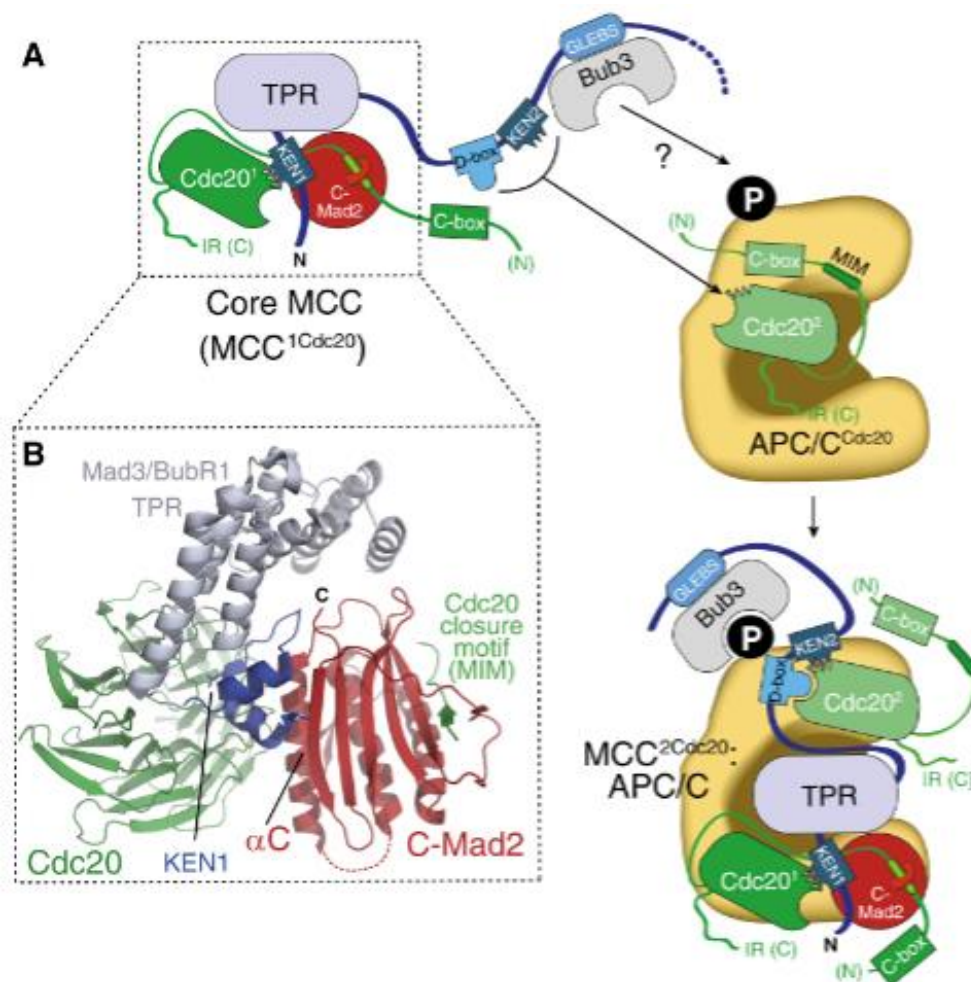


Figure 1.10 : Formation du MCC

(A) La figure du haut représente un schéma du MCC avec une molécule de CDC20, MCC¹CDC20. En bleu, la protéine BUBR1 va interagir avec CDC20 et C-MAD2 avec l'aide de sa KEN box1 et de son domaine TPR. C-MAD2 utilise sa « Safety belt » pour interagir avec CDC20. L'interaction du cœur du MCC est coopérative avec des contacts entre chacun de ses composants. La figure de droite représente le cas hypothétique où le MCC va se lier à une autre molécule de CDC20 elle-même lié à l'APC/C. On parle de MCC²CDC20 dans ce cas-là. (B) Structure cristalline du cœur du MCC chez *S.pombe* (PDB ID 4AEZ) [138]. Figure provenant de [111].

À l'origine, la structure proposée pour le MCC ne possédait qu'une copie de chaque protéine : MAD2, BUBR1, BUB3 et CDC20 [139]. En réalité, c'est plus complexe que cela. L'étude de la structure cristalline du complexe dans *S.pombe* a permis de faire un grand pas dans la compréhension du complexe [138] (**Figure 1.10.B**). Cette étude a montré un mécanisme de coopération entre les trois sous-unités BUBR1, MAD2 et CDC20 formant le cœur du complexe que l'on appelle le MCC^{1CDC20}, car il ne possède qu'une molécule de CDC20. En effet, une deuxième molécule de CDC20 sera incorporée au complexe mais avec un mécanisme différent [125]. Une hypothèse suggère que le MCC^{1CDC20} va se lier à l'autre CDC20 quand elle sera liée à l'APC/C pour l'inhiber. On parle alors de MCC^{2CDC20}, qui fournira un mécanisme d'inhibition rapide. Cette hypothèse reste toutefois encore à démontrer (**Figure 1.10.A**).

Très récemment, une étude de l'assemblage du MCC a permis de montrer que les sous unités MAD2, BUBR1 et CDC20 forment un complexe ternaire stable qui s'assemble spontanément [140]. L'étude a également permis d'identifier une forme phosphorylée du complexe MAD1-C-MAD2 qui sert de catalyseur de la liaison C-MAD2-CDC20 et que ce complexe MAD1-C-MAD2 est phosphorylé majoritairement par MPS1 et que BUB1 participe modestement à cette activation.

2.4. Désactivation du SAC

2.4.1. Délocalisation et phosphorégulation des protéines du SAC

Plusieurs protéines du SAC comme MPS1, MAD1, MAD2, BUBR1, BUB3 et BUB1 localisent de façon dynamique aux KT non-attachés et se dissocient complètement après que les MT soient liés aux KT. Un premier mécanisme faisant intervenir les complexes Dynéine-Dynactine va permettre d'enlever les complexes MAD1-MAD2 liés aux KT et de les emmener jusqu'aux pôles du fuseau le long des MT liés aux KT [141]. Mais celui-ci n'est pas suffisant pour arrêter le SAC, un mécanisme secondaire serait nécessaire [142, 143]. La délocalisation

des protéines suite à l'attachement des MT nécessite l'inversion des modifications post-traductionnelles qui ont permis leur recrutement, les phosphorylations en particulier [144]. Des données récentes ont apporté une nouvelle vision sur la délocalisation de MPS1. Comme on l'a vu précédemment, MPS1 est l'initiateur du SAC, donc de la formation du MCC et se délocalise une fois la liaison KT-MT effectuée [145]. Deux publications récentes de Ji et al. et Hiruma et al. [72, 146] ont montré une compétition directe entre la kinase MPS1 et les MT pour la liaison des KT démontrant un mécanisme direct du SAC pour la détection de l'attachement.

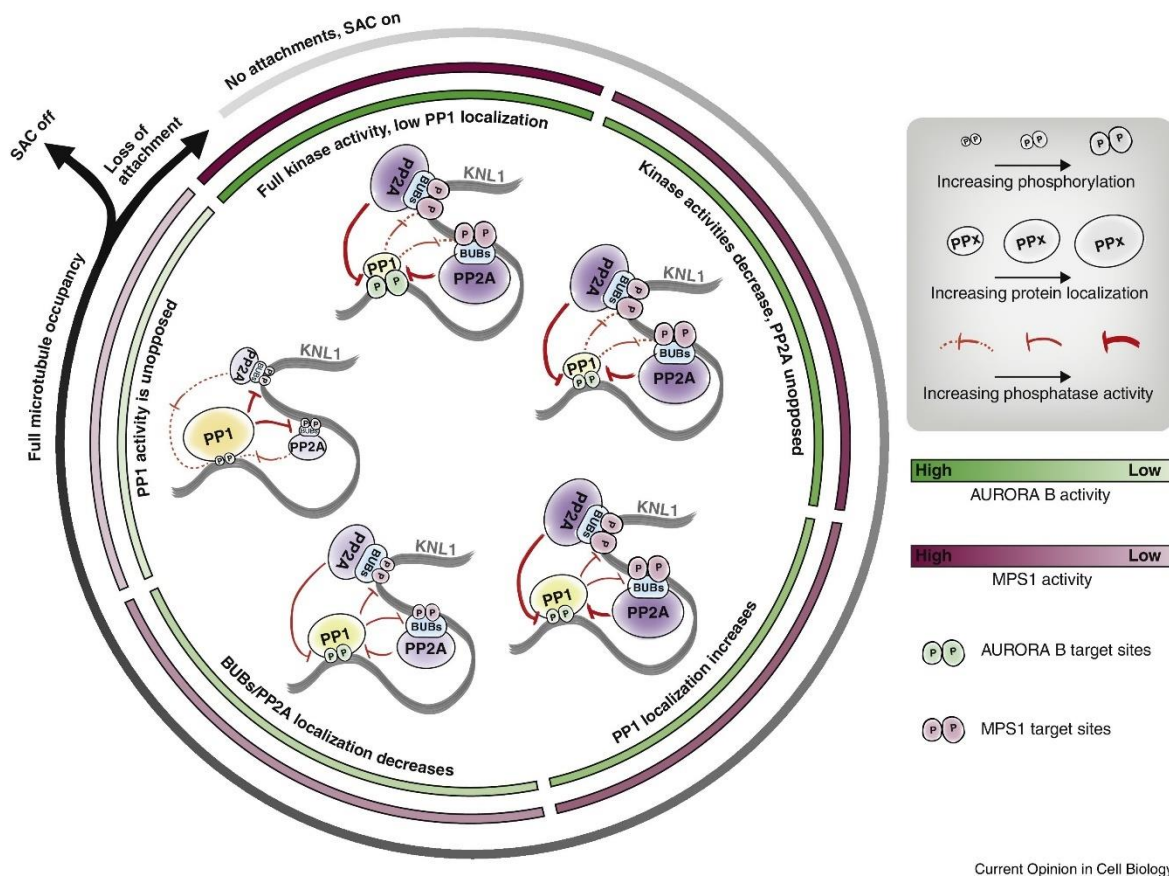


Figure 1.11 : Inactivation du SAC par PP1 et PP2A-B56

Lorsque les KT ne sont pas attachés, les kinases sont pleinement actives et les MELT sont phosphorylés par MPS1 recrutant indirectement BUBR1/PP2A et les motifs SILK/RVSF sont aussi phosphorylés par Aurora B, diminuant la liaison de PP1. Lorsque l'attachement KT-MT se met en place, les phosphorylations par MPS1 et Aurora B diminue causant un recrutement accru de PP1 et une baisse du recrutement de PP2A-B56. La déphosphorylation par PP1 augmente jusqu'à un attachement des MT. À cause de la boucle de rétroaction, en cas de perte d'attachement MT-KT, on aura une perte de PP1 et une réactivation du SAC. Figure provenant de [147].

L'inversion des phosphorylations est un mécanisme essentiel au niveau de KNL1 suite à l'attachement bout à bout des MT aux KT. Cet évènement va impliquer deux des principales phosphatases des cellules eucaryotes, PP1 et PP2A qui sont retrouvées aux KT pour arrêter la production de MCC [82, 148, 149]. Tel que mentionné précédemment, PP1 va se lier au réseau KMN directement sur KNL1 par l'intermédiaire des motifs SILK et RVSF qui sont régulés par la phosphorylation de Aurora B (**Figure 1.6**) [81]. PP2A-B56 est présente aux KT par l'intermédiaire de la pseudo-kinase BUBR1 [130]. Elle est aussi importante pour la localisation de PP1, probablement en déphosphorylant les motifs SILK/RVSF de KNL1 [149]. Un modèle de régulation de PP2A/PP1 pour l'arrêt du SAC a été proposé par Etemad et Kops [147]. Dans ce modèle, PP2A va promouvoir la localisation de PP1 ce qui à son tour va inhiber la localisation de PP2A en déphosphorylant les MELT de KNL1 qui recrutent BUB3/BUB1/BUBR1 et donc PP2A. Cette boucle de rétroaction va offrir une certaine réactivité au SAC. En effet, lorsque les KT ne sont pas attachés, PP2A-B56 est recrutée puis dès que l'activité des kinases du SAC va diminuer, en cas d'attachement des MT, PP1 sera de plus en plus recrutée et pourra alors amplifier l'extinction du SAC en déphosphorylant les MELTs. Ceci va accentuer la baisse de localisation des BUBs et de PP2A pour mettre fin à la signalisation du SAC (**Figure 1.11**). En cas de perte d'attachement, le système recommencera avec une réactivation des kinases et un recrutement de PP2A-B56 et une perte de PP1. Ensemble, ces mécanismes vont s'assurer que les KT avec un attachement correct ne vont plus émettre de signal.

2.4.2. Désassemblage du MCC

Le second mécanisme utilisé par la cellule pour terminer le SAC consiste au désassemblage du MCC. La protéine partenaire de MAD2, p31^{comet} [150] va imiter la structure de la conformation active de MAD2 (C-MAD2) [151] lui permettant de se lier au MCC provoquant ainsi la déstabilisation du complexe. Cette interaction va aussi apporter un changement de conformation de CDC20 qui va favoriser sa phosphorylation par CDK1 et sa dissociation de BUBR1 [152]. De plus, la protéine p31^{comet} et l'action conjointe de la protéine ATPase TRIP13

(Thyroid Receptor Interacting Protein 13)[153, 154] vont permettre la conversion de la forme active de MAD2 en forme inactive favorisant le désassemblage du complexe CDC20-C-MAD2 [153, 155, 156] . Très récemment, la protéine chaperonne CCT (Chaperonin Containing TCP-1), protéine connue pour participer au repliement des protéines, a été montrée comme participant à la promotion du désassemblage du MCC [157]. Ces études ont montré qu'elle se liait et pouvait désassembler plus facilement les sous-complexes du MCC qui étaient dépourvus de MAD2. Donc, avec l'action combinée de l'ATPase TRIP13, le MCC peut être complètement désassemblé [157]. Ensemble, ces mécanismes s'assurent que l'anaphase s'enchaîne sans délai après que le dernier KT non attaché ait formé un attachement stable.

La prochaine section (3) sera entièrement consacrée à l'étude de la protéine kinase MPS1 qui est au cœur des travaux de cette thèse. Après un bref historique (3.1), les fonctions de MPS1 au cours du cycle cellulaire seront abordées (3.2). La structure de la protéine (3.3), les mécanismes derrière sa localisation aux KT (3.4) et la régulation de son activité (3.5) seront précisés.

3. MPS1 (Monopolar spindle 1)

3.1. Découverte de MPS1 et orthologues

MPS1 (Monopolar spindle 1) a été pour la première fois identifiée chez la levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*, au début des années 1990 [158]. Lors de cette étude chez la levure, une sélection de mutants montrant la formation d'un fuseau monopolaire a été faite. Ces mutants montrent qu'une désorganisation du fuseau mène à un défaut dans la duplication du SPB (Spindle Pole Body). Le SPB est l'équivalent du centrosome chez les vertébrés, qui sert de centre organisateur des MT et participe à l'organisation du fuseau mitotique. Le gène de MPS1 a été identifié dans le chromosome IV à la suite de cette sélection de mutants. La première caractérisation de ce mutant a montré une organisation aberrante du fuseau accompagnée par des défauts dans la ségrégation des chromosomes menant à la polyploidie [158]. Une caractérisation plus poussée de MPS1 [159] a permis de montrer que MPS1 est une protéine kinase à double spécificité, c'est-à-dire qu'elle est capable de phosphoryler des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Le rôle essentiel de MPS1p dans la signalisation du SAC a été démontré par la suite [160, 161]. MPS1 phosphoryle majoritairement des résidus thréonine et sérine. La phosphorylation des résidus tyrosine par Mps1 est peu connue, sa démonstration a été faite in vitro depuis plusieurs années [162, 163] et très récemment in vivo sur la protéine MAD1 [120].

Rapidement après la découverte de MPS1 dans *S. cerevisiae*, plusieurs homologues de MPS1 ont été identifiés chez les vertébrés: hMPS1 chez l'humain (également appelée TTK, Tyrosine Threonine Kinase) [164] [165] et mMPS1p (également appelée ESK, EC STY kinase) chez la souris [166]. Les gènes de la kinase MPS1 sont retrouvés chez la plupart des eucaryotes. Des orthologues sont trouvés chez les champignons, d'autres vertébrés comme le poisson-zèbre (*Danio rerio*) [167], les invertébrés, comme chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) [168] et également chez les plantes incluant des lignées anciennes de lycophytes (*Selaginella moellendorffii*), de diatomées

(*Phaeodactylum tricornutum*), et des algues (*Chlamydomonas*). Jusqu'à aujourd'hui la présence d'un orthologue de MPS1 n'a pu être confirmée chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*) [169]. Cependant, chez le nématode pathogénique (*Globodera rostochiensis*) et d'autres vers plats et vers ronds sa présence a pu être identifiée.

L'identification l'orthologue de MPS1 chez *Xenopus laevis*, nécessita plusieurs années après la découverte de MPS1p et hMPS1 [170]. Cette identification aura permis d'attribuer à MPS1 le rôle que l'on connaît et étudie le plus actuellement, son rôle au niveau du SAC chez les vertébrés.

3.2. MPS1 au cours du cycle cellulaire : fonctions

3.2.1. Fonctions des orthologues de MPS1

Pour avoir une meilleure compréhension du fonctionnement d'une protéine, il est toujours intéressant d'étudier le gain, le maintien ou la perte de certaines fonctions au cours de l'évolution dans les différentes espèces.

MPH1 (MPS1p-like Pombe Homolog) a été isolée chez la levure à fission, *Schizosaccharomyces pombe*, et est essentielle pour l'activation du SAC en réponse à un défaut du fuseau. De plus, il a été montré que la protéine MPH1 fonctionne en amont de MAD2 et sa surexpression, comme celle de MAD2, mène à un arrêt en métaphase [171]. MPH1 partage des similarités de séquence avec *S. cerevisiae* MPS1p et la démonstration d'un lien fonctionnel entre les deux a été faite. Leur seule différence vient du fait que MPH1 n'a pas de rôle au niveau de la duplication du « spindle pole body ». Chez la levure, MPS1 participe à la régulation et la mise en place du SAC mais également chez d'autres espèces comme chez *Drosophila melanogaster* et *Xenopus Laevis* [170, 172]. Au cours de l'évolution, la fonction principale de MPS1 a été conservée, mais les mécanismes diffèrent un peu selon les espèces.

En effet, MPS1 permet la localisation et le recrutement au KT des protéines MAD1 et MAD2 chez *Drosophila* [173] et *Xenopus* [170] tout comme chez l'humain. Cependant, le mécanisme de recrutement des BUBs chez *Drosophila* n'a pas été conservé. En effet, MPS1 n'est pas nécessaire pour le recrutement des BUBs chez *Drosophila* puisque les motifs MELT de SPC105 (Spindle Pole Component 105, appelée KNL1 chez l'humain, dont la phosphorylation est nécessaire pour le recrutement des BUBs chez l'humain) ne sont pas fonctionnels; ils ressemblent aux MELT mais ne possèdent pas la thréonine phosphorylable [174-176]. Toujours chez *Drosophila*, MPS1 participe à la ségrégation des chromosomes. Il a été démontré que MPS1 inhibe la séparation des chromatides sœurs d'une manière indépendante du SAC [173]. MPS1 possède une fonction dans un mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire à la suite de l'hypoxie de la cellule [168]. MPS1 dimérise comme chez l'humain et son activité n'est pas requise pour effectuer cette dimérisation [173]. Pour atteindre son plein potentiel, MPS1 doit être hyperphosphorylée chez *Drosophila*. Cet état est la conséquence de l'action de la protéine kinase Polo (l'orthologue de PLK1) [176] contrairement à l'humain où cette activation est due à l'autophosphorylation de la protéine.

La première implication de MPS1 au niveau du SAC et sa localisation au niveau des KT a été décrite chez *Xenopus* [170]. En cas de KT non-attachés, Aurora B/INCENP participe à la mise en place du SAC en induisant la localisation aux KT de MPS1, BUB1, BUB3 et CENP-E. Il permet par la suite le recrutement du complexe MAD1/MAD2, ce qui correspond dans l'ensemble au mécanisme démontré plus tard chez l'homme [177]. Enfin, peu d'études ont été faites chez le poisson-zèbre qui est principalement un modèle utilisé pour la régénération et le développement où MPS1 (également appelé Nightcap) est essentiel pour la prolifération rapide et de cellules pendant la régénération de tissus [167, 178, 179].

3.2.2. Fonction de MPS1 chez l'homme

3.2.2.1. En interphase

Maintenant nous allons voir plus en détail les différentes fonctions rapportées de MPS1 au cours du cycle cellulaire (**Figure 1.13**). MPS1 a été identifiée comme participant dans plusieurs voies de signalisation et dans des fonctions très éloignées du SAC. En effet, la protéine MPS1 peut être activée par un dommage à l'ADN. Elle va par la suite phosphoryler CHK2 en T68 [180] [181], ce qui mène à son activation et à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. Inversement, MPS1 peut être à son tour phosphorylée sur sa thréonine 288 et stabilisée par CHK2 suite à un dommage à l'ADN [182]. L'étude de cette voie de signalisation a également montrée une implication de MPS1 avec la protéine p53 où MPS1 phosphoryle la région N-Terminale de p53 sur la thréonine 18 [183]. Cette phosphorylation perturbe l'interaction entre p53 et MDM2 (Murine Double Minute 2) ce qui conduit à la stabilisation et l'activation de p53.

MPS1 participe également à la réparation des lésions oxydatives de l'ADN et à la survie cellulaire à travers l'axe MDM2-H2B. MPS1 va phosphoryler MDM2 en réponse à un stress oxydatif, qui va ensuite promouvoir l'ubiquitination de H2B (Histone H2B) et la décompaction de la chromatine. Ces événements vont faciliter la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN et la signalisation ATR-CHK1 [184].

MPS1 est impliquée dans la régulation et la phosphorylation d'une autre protéine de la réponse au stress génotoxique, c-ABL (Abelson tyrosine kinase). Des études ont montré que MPS1 phosphoryle c-ABL sur sa thréonine 735 et que cette modification post-traductionnelle améliore son association avec la protéine 14-3-3 ainsi que sa séquestration cytoplasmique [185]. Il a été proposé que MPS1 phosphoryle c-ABL en conditions normales et de stress oxydatif.

Comme mentionné dans le paragraphe « 1.3.1 Découverte de MPS1 et orthologues », le gène de MPS1 a été découvert par une mutation menant à un

défaut de duplication du SPB chez la levure. Les études de ce premier rôle ont permis de mettre en évidence l'importance de MPS1 dans cette voie et ont montré que MPS1 était capable de phosphoryler de nombreux composants du SPB, incluant certaines protéines conservées à travers l'évolution avec par exemple la Centrine (CDC31) [186] et un composant de la γ -tubuline (SPC98) [187]. Chez la levure, MPS1 localise au niveau du SPB et chez l'humain on retrouve MPS1 au niveau du centrosome [188-191]. Néanmoins, l'importance de MPS1 dans la fonction de duplication du centrosome chez l'humain reste assez controversée [192]. La réponse à cette question n'est toujours pas définitive, des preuves ont été apportées pour étayer les arguments des deux camps. D'un côté, il a été montré que MPS1 phosphoryle plusieurs substrats aux centrosomes comme la Mortaline [193] et la Centrine 2 [194, 195]. La Mortaline est une protéine faisant partie de la famille des chaperonnes HSP70 (Heat Shock Protein 70) avec de nombreuses et diverses activités dans la cellule comprenant entre autres la réponse au stress, la carcinogénèse, la régénération de l'énergie et est aussi impliquée dans les maladies neurodégénératives [196]. La Mortaline participe à la régulation de la duplication des centrosomes et sa localisation aux centrosomes est dépendante de MPS1, tout comme une accélération de la duplication du centrosome dépendante de MPS1 est dépendante de la présence de la Mortaline dans un état super-activé par la phosphorylation de MPS1 [193]. La Centrine 2 est une protéine qui joue un rôle fondamental dans la fonction et la structure du centre organisateur des microtubules (MTOC, Microtubules Organizing Center). La phosphorylation de la Centrine 2 est nécessaire pour sa capacité à stimuler l'assemblage des centrioles [194].

Des centrosomes supplémentaires sont retrouvés dans plusieurs types de tumeurs et leur apparition peut produire des fuseaux mitotiques anormaux et de l'aneuploïdie. La fonction de MPS1 dans la duplication du centrosome a été démontrée comme étant régulée par la dégradation de MPS1 médiée par le protéasome [189, 197, 198]. Le signal de dégradation de MPS1 va spécifiquement réguler la sous-population centrosomale de MPS1 [198], empêchant ainsi plusieurs séries de duplication du centrosome. L'OAZ (Ornithine

decarboxylase AntiZyme), un intermédiaire de la dégradation dépendant de l'ubiquitine et suppresseur de tumeurs, participe aussi à la modulation du nombre de centrosomes [199]. La régulation de l'accumulation centrosomale de MPS1 dépend de l'OAZ tout comme la fonction de MPS1 dans le procédé de duplication du centrosome. La dégradation de MPS1 étant régulée par un suppresseur de tumeurs, un lien peut être suggéré entre le défaut dans la dégradation de MPS1 et les problèmes de centrosomes dans les tumeurs [200].

D'autre part, en contradiction avec ces rôles de MPS1 dans la duplication des centrosomes, plusieurs études de MPS1 au niveau des centrosomes utilisant soit la suppression de MPS1 [121, 201, 202] ou l'inhibition de son activité avec l'aide de molécules inhibitrices [119, 203-205] suggèrent que MPS1 n'est pas essentielle pour cette fonction alors qu'une perturbation de la mitose a été observée dans l'ensemble de ces études. De plus, si on regarde la fonction de MPS1 au centrosome à travers l'évolution, on voit que dans certains organismes, elle n'est pas conservée. MPH1, l'orthologue de MPS1 chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, n'est pas requise pour la duplication du SPB [206] tout comme celui de *Drosophila melanogaster* n'est pas requis pour la duplication du centrosome [207]. On peut aussi mentionner le cas de *Caenorhabditis elegans* qui ne possède pas d'orthologue de MPS1 et est quand même capable d'effectuer la duplication du centrosome. Que MPS1 soit essentielle ou pas pour la duplication du centrosome [192], il reste néanmoins encore de nombreuses questions à élucider pour mieux caractériser l'implication de MPS1 au centrosome.

3.2.2.2. En phase mitotique

Fonction principale : la mise en place du SAC

En phase mitotique, plusieurs fonctions ont été attribuées à MPS1. La plus importante est son rôle indispensable dans la mise en place du SAC. Étant l'une des premières protéines recrutées aux KT non-attachés, MPS1 est le maître du point de contrôle. En s'associant avec la protéine HEC1 et plus particulièrement

son domaine CH [72, 146, 208-211], MPS1 se localise aux KT en début de mitose. Cette accumulation va permettre à la protéine de s'autoactiver par autophosphorylation. Aurora B, une kinase essentielle de la mitose qui participe à la correction des erreurs d'attachement des chromosomes avec le CPC [212, 213], va participer à la localisation et à la régulation de l'activité de MPS1 et favoriser son action en prophase [110]. Dans un mécanisme de rétrocontrôle, MPS1 va aussi favoriser l'activité et la localisation de Aurora B [214, 215]. MPS1 va également phosphoryler la Boréoline, une des sous-unités du CPC, pour contrôler l'action de Aurora B [214] ce qui aura un impact dans la correction des erreurs d'attachement des KT aux MT et dans l'alignement des chromosomes. MPS1 participera aussi indirectement à cette correction de l'attachement en permettant la localisation des protéines BUB1 et BUBR1 au KT [216].

Récemment, une fonction de MPS1 dans la mise en place du SAC a été découverte. Tel que mentionné précédemment, MPS1 va phosphoryler les motifs MELT de KNL1 [112] pour permettre le recrutement des deux complexes BUB3-BUB1 et BUB3-BUBR1 au KT. Par la suite, d'autres composants du MCC seront recrutés au KT comme MAD1/2 et CDC20 [217-221]. MPS1 participe aussi à la liaison au KT du complexe RZZ, à l'activation de MAD2 par son changement de conformation et la stabilité du MCC [222].

Une étude récente offre de nouvelles réponses sur la signalétique de MPS1 pour la mise en place du SAC [120]. Chez la levure, MPS1 phosphoryle BUB1 pour lui permettre de se lier à la protéine MAD1 [223], cette interaction est indispensable pour le SAC. Cette étude a mis en évidence la conservation de cette fonction dans les cellules humaines. Elle a également permis de démontrer que CDK1 phosphoryle en premier BUB1 sur la sérine 459, ce qui permet à MPS1 de phosphoryler à son tour la thréonine 461 de BUB1 [120].

Cette phosphorylation par CDK1 est absolument nécessaire pour permettre celle de MPS1. En effet, l'addition de cette phosphorylation en position -2 du site de phosphorylation MPS1 sur BUB1 va amener une charge négative,

ce qui aura pour effet de créer une région correspondant au motif consensus de phosphorylation de MPS1 (décrit aux points 3.5.2 et 4.1.2). Cette région doublement phosphorylée va pouvoir se lier et recruter le complexe MAD1/MAD2. En plus de cette découverte, l'étude a permis de montrer que MPS1 pouvait également phosphoryler MAD1 sur la thréonine 716 [120].

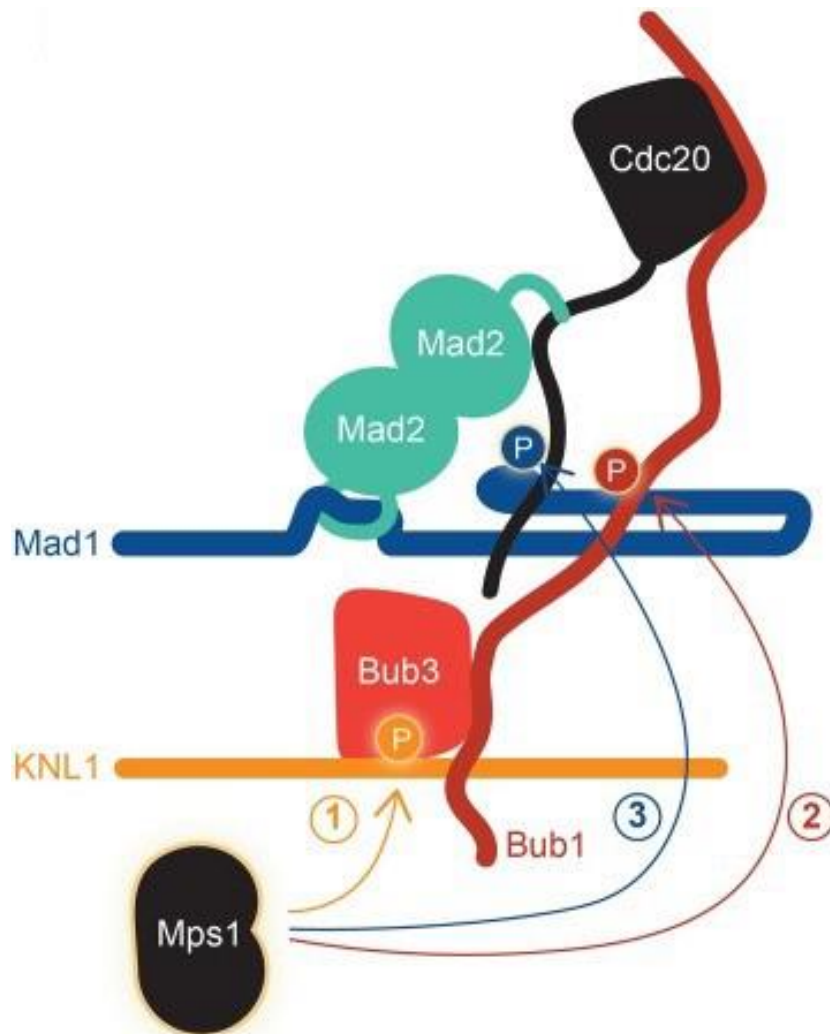


Figure 1.12 : Phosphorylation en cascade de MPS1

MPS1 va phosphoryler en cascade 3 protéines différentes pour permettre la mise en place du SAC. Elle va phosphoryler les motifs MELT de KNL1 pour permettre le recrutement du complexe BUB3-BUB1 sur KNL1. Ensuite, après la phosphorylation de CDK1 sur BUB1, MPS1 peut phosphoryler BUB1 ce qui permet le recrutement du complexe MAD1/MAD2. MPS1 phosphoryle alors MAD1 et permet l'interaction de MAD1 avec CDC20. Figure provenant de [224].

Ji et al. ont montré que cette région permet une interaction avec CDC20 et proposent que cette phosphorylation de MAD1 par MPS1 favorise son interaction avec CDC20 et participe avec MAD2 à la formation du MCC, mais cette hypothèse doit encore être confirmée [120]. Pour résumer, ils ont montré que MPS1 phosphoryle en cascade plusieurs protéines du SAC pour permettre sa mise en place et son efficacité (**Figure 1.12**). Pour supporter cette hypothèse, une publication récente [140] montre que MPS1 participe à la formation du MCC en tant que catalyseur de la réaction de conversion de la protéine MAD2 de sa forme ouverte à sa forme fermée pour permettre l'assemblage du MCC. En effet, il a été mis en évidence plusieurs sites de phosphorylation de MPS1 sur MAD1 dans son domaine RWD qui participe à cette catalyse. Parmi ces sites de phosphorylation se trouve la phosphorylation de la thréonine 716 précédemment mise en évidence par Ji et al. [120].

Autres fonctions en phase M

En plus de son rôle essentiel dans la mise en place du SAC, MPS1 a été impliquée dans le maintien et la stabilité du génome par sa relation avec le complexe BTR (BLM-TopoIII-RMI1-RMI2) [225, 226]. La protéine BLM (Bloom syndrome protein) est une hélicase RecQ qui fait partie du complexe BTR qui est essentiel pour le maintien de la stabilité du génome [227, 228]. Les hélicases interagissent avec de nombreuses protéines impliquées dans la réplication, la réparation, la recombinaison de l'ADN et la réponse aux dommages à l'ADN. BLM est associée au syndrome de Bloom qui est une maladie génétique qui prédispose les individus au cancer [229, 230]. En mitose, le complexe BTR est modifié post-traductionnellement dès que le SAC est activé, mais le but de cette modification reste inconnu.

Une première modification a été identifiée sur la protéine BLM au niveau de la sérine 144 [225]. Cette phosphorylation est dépendante de MPS1 et la mutation de ce site montre un défaut du maintien de l'arrêt mitotique après activation du SAC et présente des défauts dans le nombre de chromosomes [225]. Deux autres protéines qui interagissent avec BLM, RMI1 et RMI2 (RecQ-

mediated genome instability 1 et 2) sont également phosphorylées suite à l'activation du SAC et tout comme BLM sont dépendantes de la phosphorylation par MPS1 [226]. Un mutant de la sérine 112 de RMI2 a également montré un défaut du maintien de l'arrêt mitotique après activation du SAC et une forte instabilité génomique caractérisée par la formation de micronoyaux, de noyaux multiples et des problèmes de ségrégation des chromosomes [226]. La phosphorylation du complexe BTR par MPS1 est ainsi essentielle pour le maintien et la stabilité du génome.

D'autres voies de signalisation cellulaire, comme la voie de signalisation TGF- β (Transforming Growth Factor beta), seraient modulées par l'action de MPS1 en mitose. En effet, MPS1 peut phosphoryler les protéines SMAD2 et SMAD3 [231] ou SMAD3 [232, 233] *in vivo* et ce, indépendamment du récepteur de type 1 de TGF- β . L'hypothèse d'une modulation de miR-21 (microRNA 21 fréquemment surexprimé dans les tumeurs solides) par MPS1 dans la voie de signalisation de TGF- β /SMADs a été émise. Cependant la signification de la phosphorylation mitotique de SMAD et l'implication de MPS1 demeurent obscures.

Enfin, un lien direct entre MPS1 et la cytodierèse a été mis en évidence par la découverte d'une nouvelle protéine partenaire et substrat de MPS1, MIP1 (MPS1 Interacting Protein 1) qui fait partie du cytosquelette d'actine [234]. MIP1 interagit et est phosphorylée par MPS1 *in vivo*. Sa localisation est dynamique au cours du cycle cellulaire, on la retrouve dans le cytosquelette d'actine en interphase, au fuseau mitotique en début de mitose et au niveau du sillon de division pendant la cytodierèse. MIP1 participe au bon positionnement du fuseau mitotique au début de l'anaphase et donc assure une ségrégation appropriée du génome pendant la division de la cellule [234].

En conclusion de cette section traitant des fonctions diverses et variées de MPS1 au cours du cycle cellulaire, la **figure 1.13** récapitule les principales fonctions attribuées à MPS1 au cours cycle cellulaire.

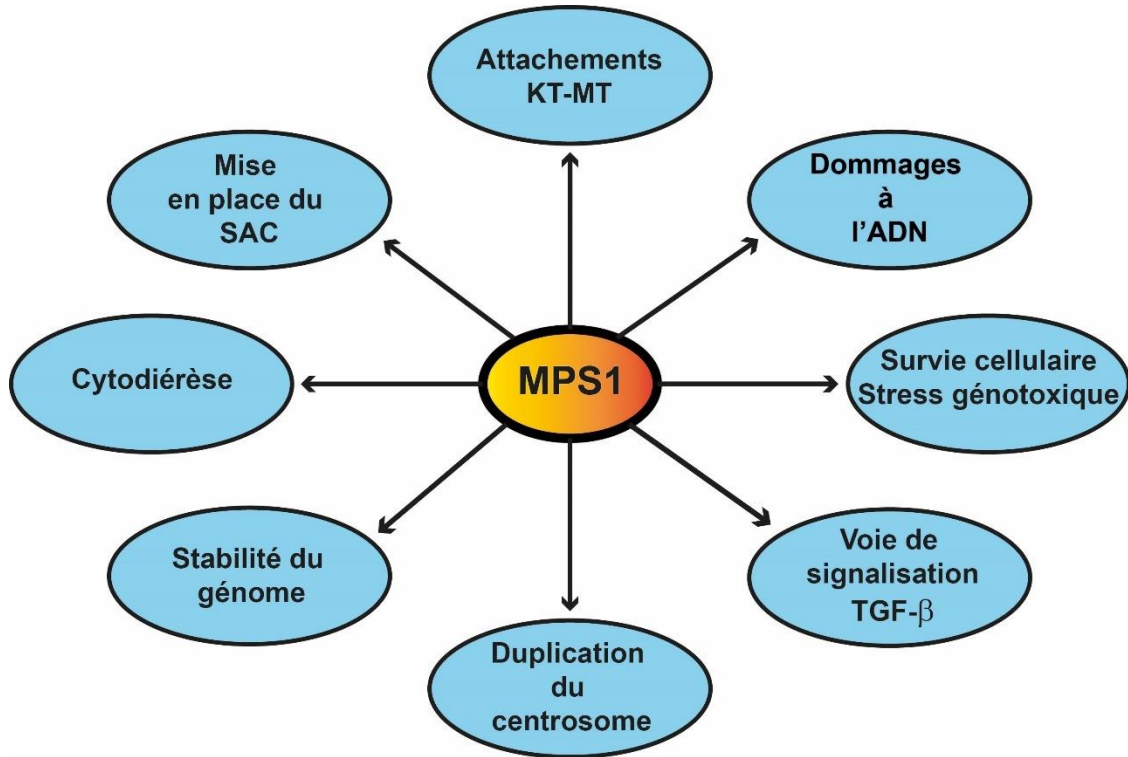


Figure 1.13 : Fonctions de MPS1 au cours du cycle cellulaire

Ce schéma résume les différentes fonctions qui ont été attribuées à MPS1 au cours du cycle cellulaire.

3.3. Structure de MPS1

3.3.1. Régions et domaines de MPS1

« TTK protein kinase » est le nom officiel du gène qui code pour hMPS1. Ce gène se situe sur le chromosome 6 au locus 6q14.1. MPS1 est une protéine kinase de 857 acides aminés et d'un poids moléculaire de 97 kD [164]. La protéine MPS1 possède dans sa région C-Terminale un domaine kinase très bien conservé dont nous discuterons plus en détail dans la prochaine sous-section. Plusieurs autres régions et domaines d'intérêt ont été identifiés dans la structure de MPS1 (**Figure 1.14**). Un domaine TPR (TetraTricopeptide Repeat) [235] en N-Terminal (acide aminés 60-192) est important pour l'activation et la fonction de MPS1 et possède également un rôle dans la dimérisation et la concentration locale de MPS1 au KT [236]. Le domaine TPR consiste en une répétition de motifs de 34 acides aminés formant des motifs d'hélice- α tour hélice- α qui sont

retrouvés dans de nombreuses protéines ayant des fonctions et des origines dans l'évolution différente [237]. La structure du TPR de MPS1 révèle une grande similarité avec les motifs TPR des protéines kinases BUB1 et BUBR1, ce qui supporte la notion de relation phylogénétique entre ces kinases et MPS1 [238].

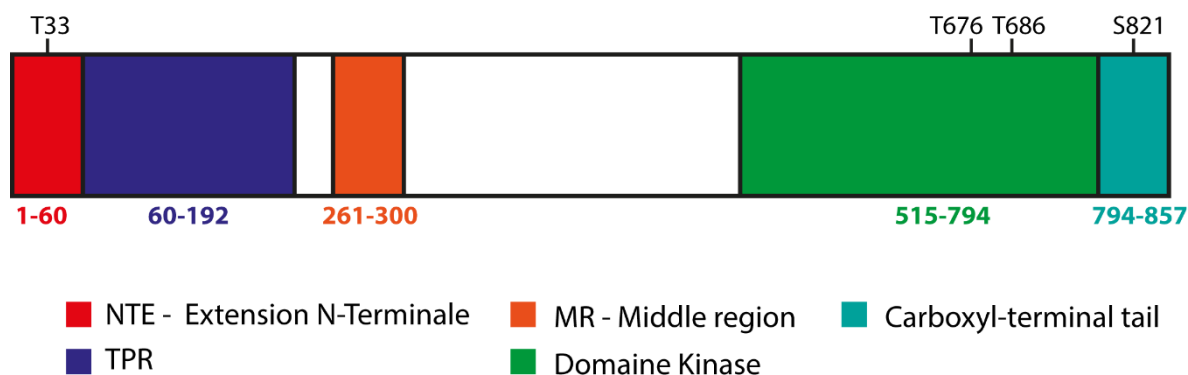


Figure 1.14 : Structure de MPS1 : régions et domaines

Ce schéma représente la structure de MPS1. Les régions et domaines d'intérêt sont décrits dans la section 3.3.1. Les nombres en dessous de chaque région correspondent au numéro des acides aminés les délimitant. Les 4 sites (T33, T676, T686 et S821) indiquent l'emplacement des sites de phosphorylation qui ont été étudiés dans le chapitre 2 avec l'aide d'anticorps phosphospécifiques.

Aucun autre motif structural de MPS1 n'a été identifié, mais plusieurs régions ont été étudiées. La région Carboxyl-terminale de MPS1 est une région de 63 acides aminés (794-857) non structurés qui joue un rôle essentiel dans le recrutement de substrat de MPS1 et dans l'activation de la kinase [239]. Plus récemment, une région qui a été nommée « Middle Region » ou « Internal Region for Kinetochore localization » a été mise en évidence dans la partie centrale de la protéine proche du domaine TPR en 261-300 [72, 210]. Cette région participe de façon minoritaire à l'attachement de MPS1 au niveau du complexe NDC80 au KT. Enfin, la région NTE (N-Terminale extension) [211, 238], située à l'extrémité N-Terminale de la protéine (1-60) est essentielle pour la localisation de MPS1 aux KT et participe aussi à la régulation de l'activité et à la dimérisation de MPS1. Elle fera l'objet d'une discussion plus approfondie au cours du chapitre 2 de cette thèse.

3.3.2. Domaine kinase de MPS1

Le domaine kinase de MPS1 présente une conformation typique des protéines kinase avec une architecture bilobée. La structure cristalline du domaine kinase de MPS1 a été réalisée par plusieurs groupes [162, 203, 205, 240, 241]. Le lobe N-Terminale de MPS1 (acides aminés 516 à 602), de taille inférieure au lobe C-Terminale, est composé de 5 feuillets β standard ($\beta 1$ – $\beta 5$) et d'une hélice α longue de 20 acides aminés (αC). MPS1 possède un feuillet β ($\beta 0$) supplémentaire en N-terminal du petit lobe. Le grand lobe C-terminal (acides aminés 606 à 794) possède également une conformation classique et est principalement constitué d'hélices α , 7 au total (αD - αI), de 2 feuillets β ($\beta 6$ et $\beta 7$) proches du petit lobe, de la boucle catalytique et de la boucle d'activation. Les deux lobes sont reliés par une courte séquence (Hinge, aa 603 à 605) située à l'arrière de la poche du site catalytique qui sert de charnière.

MPS1 n'est pas très différente du modèle général d'activation des protéines kinase [240]. Tout d'abord, on retrouve les éléments importants du lobe N-terminal avec la présence de la boucle glycine (G-loop, GxGxxG pour le motif général) qui est impliquée dans la localisation de l'ATP (Adenosine triphosphate) dans la poche. Cette liaison de l'ATP nécessite des résidus lysine et acide glutamique qui sont absolument requis pour la liaison des phosphates α et β de l'ATP et pour le positionnement de l'ATP respectivement. On retrouve ces résidus dans le domaine kinase de MPS1 en K553 et E571 (**Figure 1.15**). La plupart des protéines kinase possèdent un segment d'activation pour leur activation et MPS1 n'est pas différente de ce point de vue-là. Dans le lobe C-Terminale, on retrouve le segment d'activation, compris entre les motifs DFG....p(S/T/Y)....APE (ici MPS1 possède un motif PPE) et précédé par la boucle catalytique. Dans la boucle catalytique (HRD en général) HSD pour MPS1, le résidu acide aspartique (D646) est impliqué dans le transfert du phosphate pour le substrat. Le segment d'activation de MPS1 possède un résidu acide aspartique en 664 qui va coordonner l'ion magnésium pour l'hydrolyse de l'ATP. Très fréquemment, le segment d'activation possède des sites de phosphorylation qui après phosphorylation vont conduire à des changements de conformation de la boucle,

ce qui permettra la liaison au substrat et le positionnement de l'acide aspartique de la boucle catalytique. MPS1 possède plusieurs sites de phosphorylation dans ce segment d'activation, dont T676 et T686 qui sont essentiels pour l'activation de la kinase [163]. L'utilisation d'anticorps phosphospécifiques de ces deux sites est faite dans le chapitre 2 afin d'étudier l'état d'activation de la protéine.

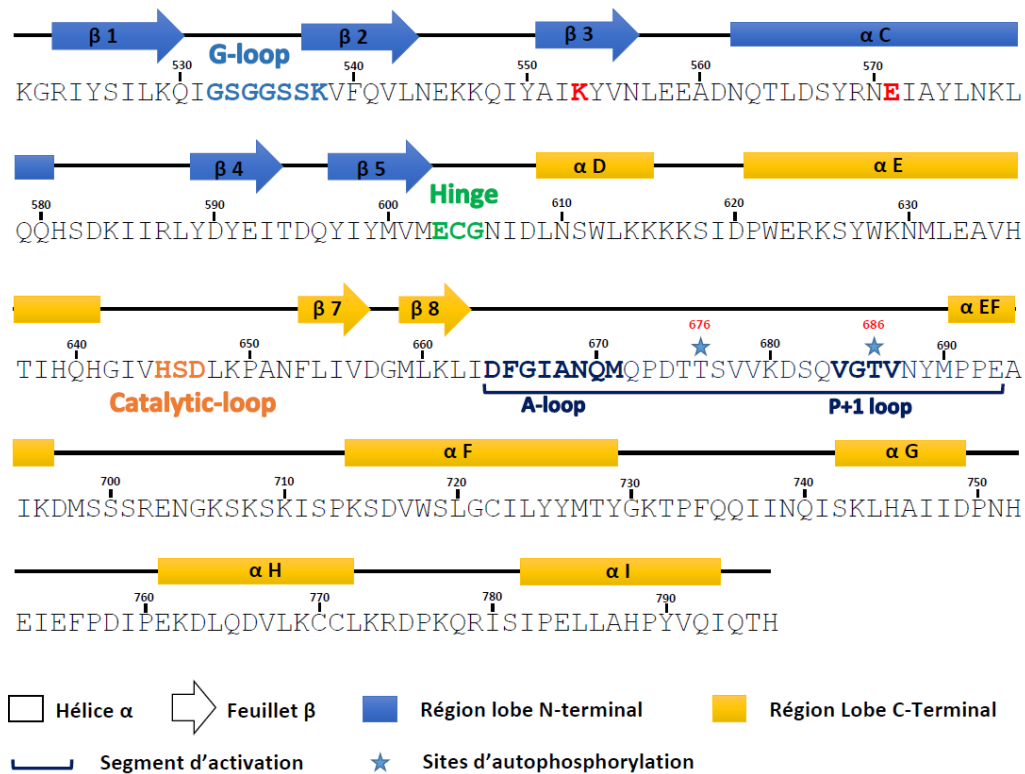


Figure 1.15 : Structure du domaine kinase de MPS1

Ce schéma représente la structure du domaine kinase de MPS1. Les données qui ont permis sa réalisation proviennent de [240] et [242]. Les rectangles et les flèches représentent les hélices α et les feuillets β respectivement. Les régions en bleu correspondent au lobe N-Terminal et les régions en jaune au lobe C-Terminal du domaine kinase de MPS1. Figure inspirée par [240]

Pour l'étude des protéines kinases, une version inactive de la protéine est souvent créée et dans le cas de MPS1, un mutant MPS1 KD (Kinase Dead) a été fait en substituant en alanine le résidu d'acide aspartique en 664 de la boucle catalytique [243]. Ce mutant a été utilisé dans les expériences du chapitre 2.

3.3.3. Dimérisation de MPS1

L'activation et l'autophosphorylation d'une kinase peut avoir lieu par l'intermédiaire de mécanismes intermoléculaires ou intramoléculaires [244]. La régulation de l'activité kinase de MPS1 n'est pas encore complètement élucidée, mais il a été montré que MPS1 est une protéine qui peut s'autoactiver par un mécanisme de phosphorylation en trans. Cela a été démontré la première fois in vitro [163, 240, 245]. Parallèlement, Kang et al. [245] ont montré que la dimérisation artificielle induite de MPS1 était suffisante pour déclencher son activité kinase dans les cellules. Quelques années plus tard, Hewitt et al. [119] ont montré la dimérisation de MPS1 dans les cellules en utilisant des constructions de MPS1 possédant différentes étiquettes pour effectuer des essais de co-immunoprecipitation. Dans la même année, Sun et al. [239] ont étudié la phosphorylation de MPS1 in vitro à l'aide d'expériences de cinétique. Cette étude vient appuyer la notion que MPS1 subit une autophosphorylation intermoléculaire in vitro puisque en augmentant la concentration de MPS1, le taux d'autophosphorylation de MPS1 augmente lui aussi. Au cours de la signalisation du SAC, la localisation et la dimérisation de MPS1 semblent primordiales pour son activité. En effet, une proposition de mécanisme semble concorder avec les résultats observés et implique que la localisation aux KT de MPS1 pourrait augmenter sa concentration locale et donc sa dimérisation. Ceci mènerait à son activation pendant la mitose par l'intermédiaire d'une meilleure autophosphorylation intermoléculaire [145, 245, 246].

La dimérisation des protéines kinases est un mécanisme d'activation et donc d'autophosphorylation assez commun [244]. MPS1 fait partie de ces protéines kinase qui se dimérisent pour être pleinement activées, mais on ne connaît pas le mécanisme exact de cette dimérisation car la structure cristalline du dimère de MPS1 n'a pas encore été élucidée.

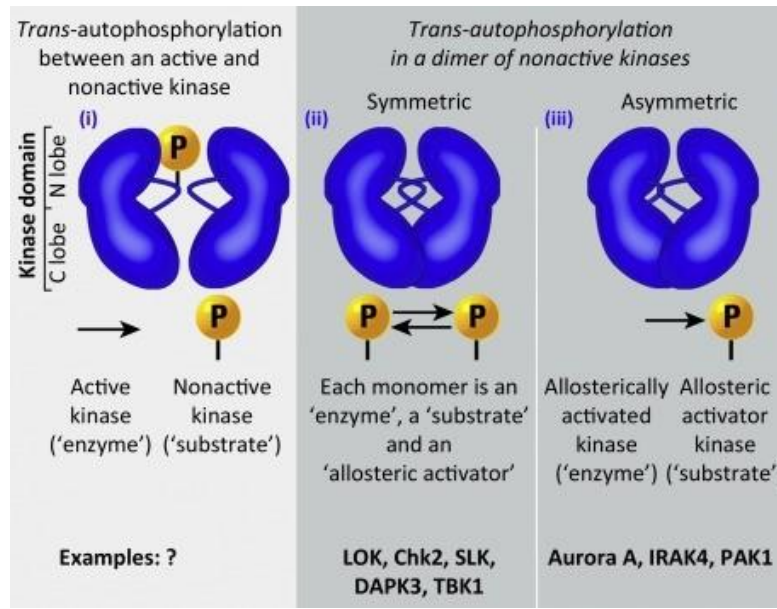


Figure 1.16 : Modèles hypothétiques d'autophosphorylation de MPS1.

Voir le paragraphe suivant pour la description des trois modèles. Figure provenant de [244].

Plusieurs hypothèses de mécanismes d'autophosphorylation sont envisageables pour les kinases qui s'autophosphorylent en trans [244]. Celles-ci pourraient s'appliquer à MPS1 (**Figure 1.16**). Un des modèles représentés dans la figure 1.16 consiste en une autophosphorylation en trans avec une molécule déjà activée qui en dimérisant va activer une seconde molécule non-active. Les deuxièmes et troisièmes modèles montrent une autophosphorylation en trans d'un dimère de kinases non-actives qui peut être faite de façon symétrique dans laquelle chaque monomère joue le rôle d'enzyme, de substrat et d'activateur allostérique ou alors de façon asymétrique dans laquelle un monomère est allostériquement activé et joue le rôle de l'enzyme et l'autre monomère est l'activateur allostérique et joue le rôle de substrat [244].

3.4. Localisation de MPS1 aux KT

La localisation de MPS1 est régulée de façon spatio-temporelle au cours du cycle cellulaire. La distribution de MPS1 sera liée avec les fonctions qu'elle va effectuer pendant le cycle cellulaire. En interphase, MPS1 se retrouve dans le

cytoplasme, au centrosome et au niveau de l'enveloppe nucléaire [247]. Son recrutement au niveau des centrosomes nécessite l'intervention de VDAC3 (Voltage-Dependent Anion-selective Channel protein 3) [191] qui participe à l'assemblage des centrioles. VDAC3 interagit directement avec MPS1 au niveau du domaine TPR (53-176), dans une région appelée CLD (Centrosome Localization Domain). Récemment, des études ont montré que c'est la région 135 à 173 qui participe à cette localisation. Cela correspond à la troisième répétition du TPR et à l'hélice C [190]. Le mécanisme de translocation de MPS1 entre le noyau et le cytoplasme a récemment été mis en évidence [248]. Le processus d'export de MPS1 vers le cytoplasme est bloqué par la Leptomycine B, un inhibiteur de CRM1 (ChRosomal Maintenance 1), qui est une protéine d'export nucléaire [249]. L'interaction de cette protéine avec MPS1 a été démontrée ainsi que l'existence d'une séquence putative d'export nucléaire (pNES, putative Nuclear Export Sequence) dans la région N-Terminale de MPS1 [248]. Le mécanisme inverse, l'import de MPS1 du cytoplasme vers le noyau, nécessaire au moment de la transition de la phase G2 à la phase M, a aussi été mis en évidence [250]. Cette translocation nécessite la présence de deux motifs LXXLL en tandem, également situés dans la région N-Terminale de MPS1.

Pendant la mitose, MPS1 va localiser au niveau des KT de la prophase jusqu'à la métaphase et ensuite va être délocalisée à la transition métaphase/anaphase. En plus des protéines HEC1 et Aurora B, dont nous allons détailler les rôles par la suite, il a été montré que la protéine kinase PRP4 (pre-messenger RNA processing 4) participe à la localisation de MPS1 aux KT [251]. Très récemment, une étude a montré un nouveau rôle en mitose et au niveau du SAC pour la protéine TEM4 (Tumor Endothelial Marker 4, aussi connue sous le nom de ARHGEF17, Rho guanine nucleotide exchange factor 17), identifiée comme une protéine GEF (Guanine Exchange Factor) de la famille des Rho GTPase, elle est connue originellement pour son rôle dans la régulation du cytosquelette en interphase [252]. Indépendamment de son rôle en interphase, TEM4 est requise pour le SAC et localise aux KT où elle participe au recrutement de plusieurs protéines du point de contrôle dont MPS1, ce qui vient expliquer

son rôle dans la mise en place du SAC [253]. Cette protéine interagit directement avec MPS1 en mitose et la recrute aux KT. Ensuite, MPS1 phosphoryle TEM4 pour promouvoir leur dissociation, et dans le modèle proposé dans cette étude, cette dissociation va réguler la quantité de MPS1 présente aux KT. Il serait ainsi intéressant d'étudier ce mécanisme de régulation de MPS1. Un autre mécanisme qui vient s'ajouter est la sumoylation de plusieurs résidus de MPS1 par SUMO-1 et SUMO-2 (Small Ubiquitin-like Modifier 1 et 2) [254]. La sumoylation est connue pour jouer un rôle important dans la progression mitotique [255]. Ces modifications post-traductionnelles de MPS1 participent à la régulation de sa localisation pendant la mitose.

La localisation de MPS1 aux KT est un mécanisme dynamique et MPS1, comme d'autres protéines du SAC, est échangée rapidement et en continu au niveau des KT. Les premières mesures de cette dynamique remontent à 2004 [145] avec la mesure du temps de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : fluorescence recovery after photobleaching) de plusieurs protéines du SAC dont MPS1. MPS1 s'échange très rapidement aux KT avec un temps de demi-vie de l'ordre d'une dizaine de secondes. Plus tard, l'importance de l'activité de MPS1 dans ce mécanisme sera démontrée et définie comme cruciale pour l'arrêt du point de contrôle et la transition rapide de la métaphase/anaphase.

L'association de MPS1 au niveau des KT a fait l'objet de nombreuses études qui ont commencé en 2002 par l'identification de la protéine HEC1 [59], sous-unité du complexe NDC80, comme étant nécessaire au recrutement de MPS1 aux KT [66]. Ensuite, Liu et al. ont mis en évidence l'importance de la région N-Terminale de MPS1 pour ce recrutement [188]. En 2004, ces premiers résultats sont confirmés et affinés en définissant plus précisément la région de MPS1 minimale qui est nécessaire pour le recrutement [65]. Plus récemment, une étude a marqué le début d'une série de plusieurs publications étudiant la régulation du recrutement de MPS1 aux KT. En effet, Nijenhuis et al. montrent que l'extrémité N-Terminale de MPS1 qui inclut la région NTE (N-Terminal

Extension) est responsable de la localisation de MPS1 et que les protéines HEC1 et Aurora B sont impliquées dans la régulation de ce recrutement [211]. Ils montrent aussi que la localisation de MPS1 dépend du domaine CH de la protéine HEC1 et que le domaine TPR de MPS1 sert de médiateur du contrôle de la localisation par la kinase Aurora B. L'activité d'Aurora B permettrait d'enlever un état d'inhibition du TPR de MPS1 sur sa propre localisation. L'interaction directe entre MPS1 et HEC1 a été décrite dans un premier temps chez la levure *S. cerevisiae* [208], puis a été récemment démontrée dans les cellules humaines [72, 146, 210]. L'interaction principale de MPS1 avec le KT se fait au niveau de HEC1, précisément au niveau du domaine CH de la protéine. [72, 146]. Une seconde région de MPS1 a été observée dans l'interaction MPS1-KT [72, 210]. Appelée MR (Middle Region) ou IRK (Internal Region for Kinetochore localization), cette région joue un rôle minoritaire dans l'interaction avec le complexe NDC80 [210]. Ji et al. ont montré que cette région interagit spécifiquement avec la sous-unité NUF2 et que cela permet à MPS1 de phosphoryler son substrat, KNL1 (**Figure 1.17**). Ils montrent aussi que la phosphorylation de la sérine 281 de cette région favorise légèrement l'interaction de cette région avec le complexe NDC80 [72].

En plus de montrer cette nouvelle interaction entre MPS1 et HEC1, ces deux études [72, 146] présentent un nouveau mécanisme impliquant MPS1. Ainsi, les études décrivent un mécanisme de compétition entre les MT et MPS1 qui va permettre à la cellule de détecter les KT non-attachés (**Figure 1.17**). Ce mécanisme vérifie si l'attachement des MT du fuseau est correct et s'ils sont prêts à la division. L'attachement correct des MT va donc enlever les protéines du SAC qui localisent aux KT, mettant fin à la cascade signalétique menant à la formation du MCC et permettant la suite de la division cellulaire [256].

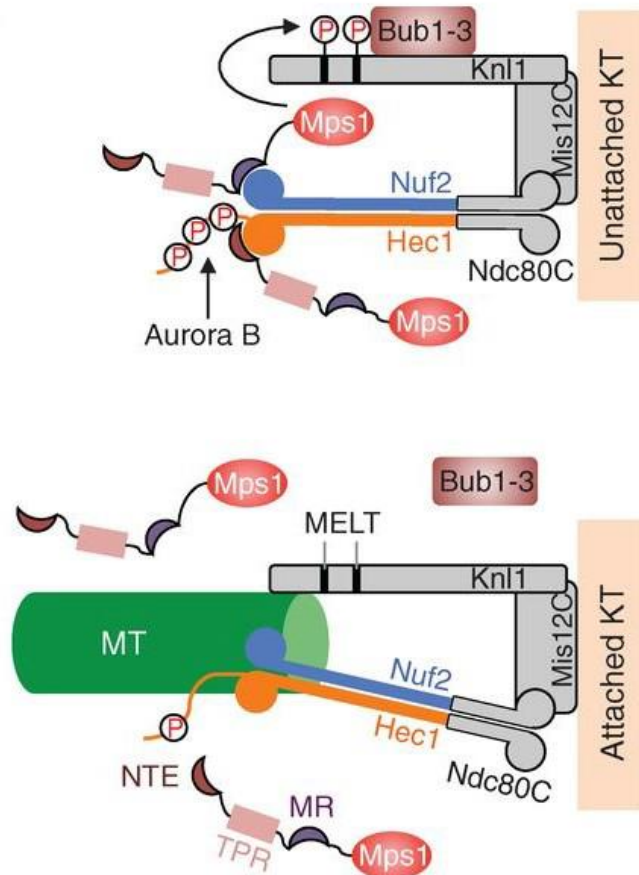


Figure 1.17 : Modèles de d'inhibition de la signalisation de MPS1 par l'intermédiaire des MT aux niveau des KT :

Dans le premier modèle les régions NTE et MR se lient indépendamment aux protéines HEC1 et NUF2. Il pourrait y avoir deux types d'interactions MPS1-NDC80C aux KT : une majeure impliquant MPS1-HEC1 et une mineure impliquant MPS1-NUF2. Dans le second modèle, la liaison des MT au complexe NDC80 va à la fois libérer MPS1 et inhiber sa signalisation. Figure provenant de [72].

3.5. Régulation de l'activité

3.5.1. Expression, désactivation et dégradation

L'expression et l'activité de MPS1 sont dépendantes du cycle cellulaire chez la levure et les cellules de mammifères [65, 239, 257]. Les niveaux totaux et d'activation de MPS1 humaine sont détectables tout au long du cycle cellulaire, mais augmentent fortement à l'approche de la mitose, en G2/M et en mitose [243, 247] . Les niveaux d'ARN messager de MPS1 augmentent fortement en

mitose [165]. La famille des facteurs de transcription E2F est responsable du niveau de la transcription de MPS1 avec en particulier E2F4 qui va se lier sur la région promotrice du gène de MPS1 [258]. Lorsque le SAC est satisfait en fin de métaphase, l'expression, la quantité et l'activité de MPS1 chute fortement et ceci marque la transition métaphase/anaphase. À ce moment-là, MPS1 va être inactivée, principalement par sa dégradation. Chez la levure, MPS1 est ciblée par l'ubiquitine ligase E3 APC^{CDC20} qui cible les motifs de trois D-box que l'on retrouve en N-Terminale de MPS1 [257]. Ces motifs sont nécessaires pour la reconnaissance de leurs substrats par l'APC/C. Chez l'homme, on retrouve le même mécanisme à la différence qu'il n'y a qu'un seul motif D-box et qu'en plus de l'APC^{CDC20}, qui va principalement dégrader MPS1 en anaphase, une seconde ubiquitine ligase va continuer la dégradation de MPS1 en G1, l'APC^{Cdh1} [259]. Pour compléter ce mécanisme de dégradation, une autre enzyme participe à la dégradation en promouvant l'ubiquitination de MPS1. UFD2 (Ubiquitin Fusion Degradation 2) est une enzyme qui va promouvoir l'assemblage de chaînes d'ubiquitines en coopérant avec l'APC/C [260]. On retrouve ce mécanisme chez la levure et est conservé chez l'homme [261].

Tel que décrit précédemment, l'inactivation du SAC passe par le recrutement de protéines phosphatases qui vont s'opposer à l'action des kinases du SAC, dont MPS1. PP1 [262] et PP2A [148] sont capables de déphosphoryler les motifs MELT ayant été phosphorylés par MPS1. La déphosphorylation directe de MPS1 par des phosphatases comme PP1 et PP2A, qui seraient des candidates potentielles, serait un mécanisme de désactivation efficace mais jusqu'à présent, seule la déphosphorylation directe par PP1 a été démontrée *in vitro* [263]. Les preuves d'un tel mécanisme *in vivo*, s'il existe, restent à trouver.

Enfin, comme on l'a vu précédemment dans la section localisation de MPS1, un mécanisme de compétition entre MPS1 et les MT permet la « désactivation » de MPS1 au niveau des KT en forçant sa délocalisation et donc rendant impossible l'accomplissement de ses fonctions pour le SAC en mitose.

3.5.2. Régulation de l'activité : auto- et transphosphorylation.

MPS1 et plus particulièrement son domaine kinase C-Terminal subissent une forte autophosphorylation et sont actifs dans la phosphorylation de substrats exogènes [163, 203, 240, 245]. Depuis une dizaine d'années, plusieurs expériences de cristallographie ont permis la résolution de la structure de MPS1. Une grande majorité a utilisé un domaine kinase en complexe avec différentes molécules inhibitrices de MPS1 [162, 203, 205, 241, 264-271]. Elles ont donc montré une conformation inactive du domaine kinase. Cette conformation inactive a été également démontrée avec une version sauvage du domaine catalytique de MPS1 [203] ce qui reste étonnant car de nombreux sites sont toujours autophosphorylés même dans ce cas-là. C'est une particularité propre au domaine kinase de MPS1 qui reste toujours en attente d'une explication.

MPS1 est une protéine kinase qui est fortement autophosphorylée in vitro et in vivo [245, 272-276] sur de nombreux sites répartis sur l'ensemble de la protéine. De nombreux substrats de MPS1 ont été identifiés au travers des différentes fonctions qu'elle peut accomplir au cours du cycle cellulaire. La grande variété de ses sites de phosphorylation et d'autophosphorylation rend difficile la prédiction de nouveaux sites de phosphorylation. Un motif consensus de phosphorylation a tout de même pu être mis en évidence [275]. Caractérisé par une phosphorylation majoritaire sur les résidus thréonine et sérine et une grande préférence pour des résidus chargés négativement en position -2, ce motifs consensus très proche de celui de PLK1 sera discuté plus en détail dans la prochaine section.

Parmi tous les sites de phosphorylation de MPS1, deux ont été particulièrement étudiés, les thréonines 676 et 686. La phosphorylation de ces sites a montré des effets significatifs sur l'activité kinase de MPS1 [162, 163, 239, 240, 245, 272]. Les sites sont situés dans le segment d'activation du domaine kinase, le T676 fait partie de la boucle d'activation tandis que le T686 fait partie de la boucle P+1. La mutation en alanine du résidu 676 montre une forte baisse de l'activité kinase de MPS1 dans le cas de phosphorylation d'un

substrat, (environ 7 fois) alors que la baisse d'autophosphorylation est beaucoup plus modeste (1.4 fois) [163]. Pour le résidu 686, la mutation en alanine cause une baisse beaucoup plus forte, environ 40 fois dans le cas de la phosphorylation d'un substrat et environ 4 fois pour l'autophosphorylation de MPS1 par rapport à la protéine de type sauvage. Les deux sites sont requis pour un fonctionnement optimal de MPS1 dans les cellules humaines [245, 272].

L'autophosphorylation de MPS1 régule sa propre activité kinase. Des analyses cinétiques de la phosphorylation de MPS1 ont montré une phase de retard au début de son activation, ce qui est caractéristique d'un mécanisme d'autophosphorylation et correspond à un premier évènement de phosphorylation du résidu 676 [239, 240]. Cet évènement permet au mécanisme d'autophosphorylation de la protéine d'atteindre une activité maximale pour la phosphorylation de son substrat, et c'est à cette étape que la phosphorylation du résidu 686 participe. La phosphorylation de la boucle P+1 est unique à MPS1 et l'hypothèse impliquant la modulation de cette boucle pour l'activation de la kinase comme nouveau mécanisme d'activation a été émise [240].

Comme mentionné brièvement dans la description de la structure de MPS1 (3.3), la reconnaissance des substrats de MPS1 se fait probablement par l'intermédiaire de la région C-Terminale de MPS1. Il s'agit d'une région désordonnée de 65 acides aminés qui se situe à l'extrémité de la protéine à la suite du domaine kinase. La suppression de cette région entraîne une baisse de la phosphorylation de plusieurs substrats in vitro (MBP, Myelin Basic Protein) et in vivo (Boréoline, SMAD2) [239] ainsi qu'une perte de fonction de MPS1 pour la mise en place du SAC.

Une publication [276] a récemment attiré l'attention sur une forte coopération entre MPS1 et PLK1 au cours de la mitose. Au cours de la prochaine section (4), une revue des éléments supportant cette étroite relation entre MPS1 et PLK1 sera faite. Une partie des points abordés dans cette section utilise

les informations et la discussion de l'article de synthèse récemment publié par le laboratoire et dont j'ai participé à l'écriture. Il est mis en annexe de cette thèse.

4. Une étroite relation entre MPS1 et PLK1

4.1. Rôle de PLK1 dans la régulation du SAC

Les Polo-like kinases (PLK) sont une famille de Ser/Thr kinases qui sont largement répandues parmi les cellules eucaryotes [277]. Chez l'humain, la famille des PLK est constituée de 5 membres, PLK1 à PLK5. Parmi eux, PLK1 est le membre le plus étudié. Cette kinase exerce de très nombreux rôles au cours du cycle cellulaire. Elle participe, entre autres, au contrôle de l'entrée en mitose, à la régulation du point de contrôle de la phase G2/M, à la mise en place du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes. Elle est également impliquée dans la réplication de l'ADN, la cytotélerèse et la méiose [278].

La fonction de PLK1 que nous allons approfondir dans cette section concerne les rôles de PLK1 dans la régulation et la signalisation du SAC. La suppression de PLK1 dans les cellules mène à un arrêt mitotique précoce, et donc l'étude des fonctions de PLK1 dans les étapes plus tardives de la mitose posait problème. En effet, l'émergence de petites molécules inhibitrices de PLK1 et des approches permettant l'inhibition de PLK1 ont permis d'affiner le contrôle temporel de l'inhibition de PLK1 et à révéler plusieurs rôles de PLK1 dans les étapes plus avancées de la mitose, notamment dans la mise en place du SAC [276, 279]. Des données sur les mécanismes impliquant PLK1 au niveau de la région extérieure des KT en prométaphase et métaphase ont fait leur apparition et impliquent PLK1 dans l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique [128, 280] et au SAC [149, 169, 276, 281]. Parmi ses substrats, PLK1 va contribuer à l'activation et à la régulation des kinases MPS1, BUB1 et BUBR1 en mitose.

4.1.1. Sites de phosphorylation sur MPS1 : sites PLK1 ou sites d'autophosphorylation, similarité dans les cibles.

MPS1 étant une kinase essentielle pour le SAC, l'étude du rôle de PLK1 dans l'action de MPS1 doit être approfondie. En effet, l'autophosphorylation de MPS1 a été largement étudiée et des données récentes ont mis l'accent sur une

connexion possible entre les phosphorylations de PLK1 et MPS1. Les premiers indices sont venus de Dou et al. [275] qui ont identifié 29 sites de phosphorylation in vivo de MPS1. Parmi ces 29 sites, 4 étaient nouveaux, et 3 avaient été montrés précédemment in vitro et ont pu donc être confirmés in vivo. Les sites restants avaient été découverts à la même période [245, 272, 282]. En utilisant la spectrométrie de masse, ils ont été capables d'identifier 12 sites d'autophosphorylation de MPS1 en mitose. Pour déterminer si ces sites étaient sensibles à une inhibition de PLK1 in vivo, ils ont combiné la spectrométrie de masse avec la technique du SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) après un traitement avec le TAL (ZK-Thiazolidinone), un inhibiteur de PLK1 et ont fait la comparaison avec un inhibiteur de MPS1, le SP600125. La perte de phosphorylation de plusieurs sites supposés être des sites d'autophosphorylation de MPS1 suite à l'inhibition par les TAL et le SP600125 suggère que MPS1 et PLK1 pourraient partager la même préférence pour un substrat.

4.1.2. Similarités dans les motifs consensus

Pour compléter ces études, en regardant de plus près les sites consensus de phosphorylation de MPS1 et de PLK1, on remarque une assez grande similarité. En effet, une analyse Weblogo sur ces sites sensibles à l'inhibition par le SP600125 a montré une préférence de phosphorylation de hMPS1 pour des acides aminés E/D/N/Q en position -2 par rapport au site de phosphorylation. Ce consensus a été par la suite affiné [283] en utilisant une approche basée sur la protéomique avec plus de 500 substrats potentiels. Ils ont observé un fort enrichissement pour les résidus acides en position -2 et -3 mais avec une préférence pour la position -2. Ils ont également mis en évidence en position +3, une préférence non essentielle pour les acides aminés branchés tels que la leucine, la valine et l'isoleucine. Il a été montré que MPS1 phosphoryle des thréonines sur 90% des peptides testés. À partir de ces résultats, ils ont conclu que MPS1 pourrait sélectionner ses substrats principalement par la thréonine et le résidu acide en position -2. Ce motif consensus est vraiment très proche de celui de PLK1 qui a été révisé par Santamaria et al. [284], (L-Φ-D/E/N(Q)-X-

S/T-L-Φ) et qui montre la préférence commune pour MPS1 et PLK1 pour le résidu acide en position -2 (**Figure 1.18**).

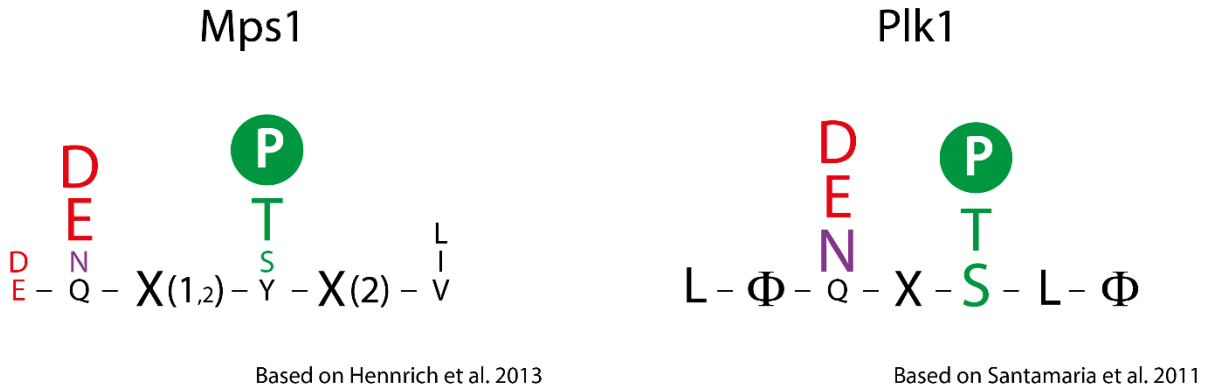


Figure 1.18 : Comparaison des motifs consensus de MPS1 et PLK1

Ce schéma représente les motifs consensus qui ont été proposés pour MPS1 [283] et PLK1 [284]. Figure provenant de l'article de revue en annexe.

4.1.3. Sites de phosphorylation sur MPS1 : on partage

En accord avec la préférence de substrat partagé entre MPS1 et PLK1, plusieurs groupes [240, 245, 272, 274] ont aussi identifié plusieurs sites d'autophosphorylation de MPS1, mais il a récemment été démontré qu'un certain nombre de ces sites était également phosphorylé par PLK1. En utilisant plusieurs types d'essai in vitro et combinés à une analyse par spectrométrie de masse, von Schubert et al. [276] ont identifié 17 sites de phosphorylation sur MPS1 qui sont ciblés par PLK1. Parmi ces 17 sites, plusieurs sites (T12, T33, S37 et S363) ont été montrés comme étant des sites d'autophosphorylation de MPS1 par des expériences in vitro et in vivo [272, 273, 275] . Le site T564 a quant à lui été identifié par Tyler et al. [274] comme site d'autophosphorylation de MPS1 dans un essai kinase in vitro avec la protéine recombinante de MPS1 comme substrat, donc il n'y a pas de possibilité de phosphorylation par PLK1. Von Schubert et al. ont également identifié ce site comme site de phosphorylation mais dans le cas de PLK1. Ils ont utilisé la protéine recombinante de MPS1 KD comme substrat, donc il n'y a pas de possibilité d'autophosphorylation dans ce cas. L'identification du même site comme étant site de phosphorylation de PLK1 et site

d'autophosphorylation de MPS1 suggère que les deux kinases peuvent non seulement cibler le même motif mais aussi les mêmes sites. Cela montre que dans certaines circonstances MPS1 et PLK1 peuvent coopérer pour assurer l'exécution de la mitose en ciblant les mêmes sites et donc cela démontre un certain niveau de promiscuité.

4.1.4. Coopération pour un SAC efficace

Pour renforcer cette idée de coopération, le même groupe [276] a montré que PLK1 et MPS1 peuvent coopérer pour le maintien du SAC, essentiellement en s'assurant de l'accumulation de MAD2 aux KT. Ils ont aussi montré que PLK1, tout comme MPS1, contribuait à la phosphorylation des motifs MELT de KNL1 [85-87, 89, 90] assurant ainsi l'enrichissement optimal en protéines de signalisation de l'axe BUB-MAD aux KT. Pour montrer que PLK1 peut directement phosphoryler ces motifs, ils ont fixé sur des membranes 19 peptides synthétiques reproduisant les motifs MELT de la protéine humaine de KNL1 [88] et les ont exposés à la protéine recombinante de PLK1 en présence d' γ -³²P-ATP. Dans ces 19 sites, 13 ont été spécifiquement phosphorylés par PLK1. Parmi ces 13 sites, 4 motifs MELT (T875, T1089, T1129 et T1154) et 2 motifs proches ((E/D) X (T/S)) (T1075 and T1167) dans la région centrale de KNL1 ont été récemment démontrés comme phosphorylés par MPS1 *in vitro* et également *in vivo* pour le site pT875, en utilisant un anticorps phosphospécifiques [86]. Pour approfondir ces résultats *in vivo*, von Schubert et al. ont montré qu'avec le même anticorps dans des cellules RPE-1 (Retinal Pigmented Epithelial-1, cellules épithéliales immortalisées) que l'inhibition de PLK1 ou de MPS1 produisait une réduction de l'intensité du signal et que la combinaison de ces inhibitions montrait un effet additif. Cela confirme la capacité de phosphorylation des MELT de KNL1 *in vivo* par PLK1. En inhibant PLK1 et MPS1, après une dépolymérisation complète des MT, ils ont aussi montré que la durée du ralentissement causé par le SAC était significativement réduite, même plus qu'avec l'inhibition de MPS1 seule [276]. Donc, un signal fort du SAC requiert l'activité des deux kinases. En revanche, ces données ont été contredites par une étude similaire qui n'a pas montré de coopération significative en MPS1 et

PLK1 dans le maintien et l'activation du SAC [285]. Ces divergences observées entre les deux études pourraient être expliquées par des différences inhérentes aux lignées cellulaires utilisées et aux doses d'inhibiteurs utilisés.

4.1.5. Et si MPS1 n'était pas là

Dans un sous-ensemble de nématodes, qui inclut *C. elegans*, il existe une perte naturelle de la kinase MPS1. Et pourtant, KNL1 possède toujours des motifs MELT fonctionnels [34, 286] suggérant qu'il existe un mécanisme alternatif pour la voie d'activation du SAC chez le ver. Une étude publiée récemment [169], montre que PLK1 sert de substitut à MPS1 dans la phosphorylation des motifs MELT de KNL1 [85-87, 89, 90], au recrutement de BUB1 et à la maintenance de l'arrêt du point de contrôle dans des cellules monopolaires. Les mutations des motifs MELT de KNL1 chez *C. elegans*, en plus d'autres sites de phosphorylation de PLK1 identifiés *in vitro*, ont montré une baisse cumulative dans le recrutement de BUB1/BUB3 au KT et un SAC non fonctionnel. Cette adaptation évolutive de PLK1 pour fonctionner en remplacement de MPS1 en son absence confirme que PLK1 pourrait jouer un rôle plus important que celui imaginé précédemment dans la mise en place et le maintien du SAC et suggère que, au moins chez le ver, PLK1 peut agir comme substitut. Ces études nous amènent à nous poser d'importantes questions, à savoir si le chevauchement des substrats de MPS1 et PLK1 est un phénomène fréquent ou ne concerne seulement qu'un petit groupe de substrats essentiels tel que MPS1 et KNL1.

4.2. PLK1 régule l'activité et la localisation de MPS1, et inversement.

4.2.1. Différences entre les organismes

Si on s'intéresse aux différences entre les organismes, on pourra avoir une vue d'ensemble des changements au cours de l'évolution. Prenons le cas de la drosophile. Après déplétion de Polo, on observe une forte baisse de l'accumulation et de l'activation de MPS1 aux KT. Cette baisse peut être en partie due à une déficience dans l'assemblage du complexe NDC80 au KT externe. En

effet, Polo se trouve au sommet de la voie de signalisation du SAC en promouvant le recrutement de MPS1 aux KT non attachés. MPS1 chez la drosophile recrute MAD1 et MAD2 et contrôle la fonction du SAC comme dans d'autres organismes à cause de motifs similaires aux MELT non-fonctionnel dans SPC105/KNL1 [174, 175]. MPS1 n'est donc pas nécessaire pour le recrutement de BUB1, BUBR1, BUB3 et CENP-Meta (un des deux paralogues de CENP-E) chez la drosophile. En revanche, la localisation de MPS1 va promouvoir l'hyperphosphorylation de BUBR1 ce qui va produire la formation du phospho-épitope 3F3/2 [176], utilisé comme marqueur de la tension aux KT. Cette fonction dépendante de MPS1 va permettre le recrutement et la localisation de CDC20 aux KT et la formation du MCC [176]. Donc, en recrutant MPS1 aux kinétochores, Polo participe à l'activation de BUBR1 à travers sa phosphorylation et à la formation du MCC. Ces résultats vont néanmoins supporter le fait que Polo possède un rôle actif dans la fonction de MPS1 au KT et la signalisation correcte du SAC chez la drosophile.

Quand on regarde leurs orthologues dans les cellules humaines [121] et les cellules de *Xenopus* [287], la relation entre MPS1 et PLK1 est inversée. MPS1 se trouve en amont de PLK1 dans la cascade du recrutement du SAC au KT, car en supprimant MPS1 dans ces deux modèles, les niveaux de PLK1 au KT vont fortement diminuer. On remarquera que l'inverse n'a pas été démontré, donc il serait intéressant de voir si la suppression de PLK1 peut affecter la localisation de MPS1 dans les cellules humaines.

Comme on peut le voir, la fonction de MPS1 est différente parmi les différentes espèces. On remarquera que chez la drosophile le changement de rôle de MPS1 est associé au changement de rôle de polo ce qui peut être interprété comme une autre preuve de la bonne coopération entre ces deux kinases à travers l'évolution.

Pour le moment, la logique derrière ces différentes variations spécifiques à chaque espèce à l'intérieur de la voie de signalisation du SAC n'est pas

complètement démontrée. Elles pourraient cependant refléter les différences fondamentales que l'on retrouve entre les mitoses de ces différents organismes, à savoir le nombre de chromosomes, la structure des KT, la quantité de microtubules interagissant avec les KT, la durée de la mitose et la taille de la cellule [174].

4.2.2. PLK1 contrôle le taux de renouvellement de MPS1 au KT

Récemment, dans les cellules humaines, un nouveau rôle de PLK1 a été démontré. En effet, il a été montré que PLK1 promeut le taux de renouvellement de MPS1 aux KT probablement grâce à un effet positif sur l'activité de MPS1 bien que cela reste à prouver.

Parmi tous les sites de phosphorylation communs entre PLK1 et MPS1 identifiés par différents groupes, la plupart se situent dans la région N-Terminale de MPS1 qui est impliquée dans le taux de renouvellement de MPS1 au KT [288]. Des études ont montré que l'activité de MPS1 promouvait sa propre dissociation des KT [119, 204, 246] donc en étudiant le taux de renouvellement de MPS1 aux KT en combinaison avec des inhibiteurs de PLK1, le rôle de PLK1 sur cette fonction de MPS1 a pu être évalué [276]. L'observation par imagerie de cellules vivantes a permis de remarquer une augmentation significative du niveau de MPS1 aux KT. Après inhibition de PLK1 et cette augmentation s'additionne à celle observée par l'inhibition de MPS1 quand la combinaison des deux inhibiteurs est testée. Pour exclure tout effet du recrutement de MPS1 par HEC1, les niveaux de localisation de HEC1 aux KT ont été vérifiés et aucun changement n'a pu être observé.

Pour confirmer l'implication de PLK1 dans le taux de renouvellement de MPS1, une expérience FRAP a été également réalisée. L'inhibition de PLK1 et MPS1 individuellement ont toutes les deux augmenté significativement le temps de demi-vie du renouvellement de MPS1 et le pourcentage de la fraction immobile. Plus important encore, l'inhibition des deux kinases simultanément

montre un effet additif en soutien de l'idée que PLK1 peut aider à augmenter le taux de renouvellement de MPS1 aux KT [276].

4.2.3. PLK1 peut phosphoryler et activer directement MPS1

Indépendamment de sa fonction dans l'attachement de MPS1 aux KT, PLK1 peut promouvoir l'activité kinase de MPS1. Dans l'étude de von Schubert et al. [276], en utilisant des anticorps phosphospécifiques reconnaissant la phosphorylation de deux sites dans la boucle d'activation du domaine kinase, pT676 et pT686 qui ont été décrits plus en détail aux points 3.3.2 et 3.5.2 [163, 272, 274], ils ont été capables de montrer que PLK1 soutenait l'activité de MPS1 par une phosphorylation directe, et donc, renforce la signalisation du SAC. Pour cela, ils ont encore utilisé des inhibiteurs de MPS1 et de PLK1 seuls et ont observé une baisse de la phosphorylation. Avec la combinaison des deux inhibiteurs, ils ont pu montrer un effet additif dans la baisse de phosphorylation. Suite à ces résultats, on pourrait se poser la question de savoir comment PLK1 phosphoryle MPS1. En effet, PLK1 phosphoryle directement MPS1, mais on ne sait pas si cela se passe directement dans la boucle d'activation ou alors ailleurs sur la protéine menant à une augmentation de l'autophosphorylation de la boucle d'activation par MPS1 elle-même.

4.2.4. D'autres coopérations PLK1-MPS1 ?

Si on regarde sur l'ensemble du cycle cellulaire, on peut voir que les fonctions de MPS1 et PLK1 peuvent converger en plusieurs points. En phase G2, l'activité de PLK1 commence à augmenter et la protéine va localiser spécifiquement aux centrosomes. Elle va permettre de recruter le matériel péricentriolaire et change les centrosomes en centre de nucléation de microtubules actifs [289]. PLK1 est connue pour être impliquée dans la maturation des centrosomes [290, 291] et leur séparation [292]. Un rôle pour MPS1 au centrosomes a été proposé mais reste controversé [192]. En effet, deux fonctions de MPS1 ont été identifiées au niveau de l'assemblage du centriole [189, 194, 198, 293] alors qu'au même moment deux études ont

montré que MPS1 n'était pas nécessaire [203, 243]. Une discussion plus approfondie sur ce point a été faite à la section 3.2.2.1.

À l'origine, MPS1 a été identifiée à cause de son implication dans la duplication du centrosome chez la levure, cette fonction n'a pas été clairement identifiée chez d'autres espèces. Dans la levure, les cellules déficientes de MPS1 montrent un fuseau monopolaire. Ce phénotype n'est pas retrouvé dans les cellules humaines, mais il est intéressant de noter qu'une interférence avec la fonction de PLK1 montre ce phénotype de fuseau mitotique dans les cellules humaines [289, 294]. Ceci n'est pas dû à un blocage de la duplication des centrosomes mais plutôt une conséquence de l'altération de la maturation et de la séparation des centrosomes. Plusieurs fonctions du centrosome semblent être affectées dans les cellules déficientes en PLK1.

Si on prend en compte la nouvelle relation mise en évidence entre ces deux kinases, la collaboration démontrée dans les fonctions de la mitose pourrait nous amener à réexaminer ces données dans le cadre d'une coopération possible entre MPS1 et PLK1. Il est tentant de spéculer sur la convergence des rôles et des fonctions de MPS1 et PLK1 au centrosome.

Si on part de l'hypothèse que la phosphorylation de KNL1 sur les motifs MELT n'est pas la seule protéine où un chevauchement de fonctions entre MPS1 et PLK1 peut se produire, alors BUBR1 est potentiellement l'un des principaux candidats. En effet, la protéine BUBR1 est un exemple de substrat potentiellement partagé entre les deux kinases. Tipton et al. [295] ont montré que la phosphorylation de BUBR1 peut être affectée directement ou indirectement par l'inhibition de MPS1 en utilisant deux inhibiteurs, le SP600125 et l'AZ3146. Ils ont obtenu des résultats similaires avec l'inhibition de PLK1 avec le BI-2536. La pseudo-kinase BUBR1 est phosphorylée par PLK1 sur la S676, un site de phosphorylation du domaine KARD de BUBR1 impliqué dans la stabilisation de l'attachement des MT aux KT [280] et dans le recrutement de la phosphatase PP2A qui participe à la régulation de la progression mitotique [129].

On ne sait pas si MPS1 contribue à la phosphorylation du domaine KARD mais Huang et al. [296] ont montré que BUBR1 est phosphorylée à plusieurs sites par MPS1 (S453, S543, S670, et S1043) qui sont également importants pour l'activation. Ainsi BUBR1 est un substrat commun aux deux kinases, donc peut-être partagent-ils des sites de phosphorylation comme il a été montré pour les motifs MELT. Bien que ces sites potentiels de phosphorylation de MPS1 et de PLK1 sur BUBR1 ne semblent pas être nécessaires pour son rôle dans le maintien du SAC, l'étude plus approfondie de la phosphorylation des sites BUBR1 pourrait mettre en évidence la coopération ou le chevauchement des rôles MPS1 et PLK1.

De plus, on sait que le CPC est sous contrôle de MPS1 et PLK1 qui phosphorylent respectivement la Boréoline et la Survivine, deux sous-unités du CPC [214, 297]. Ces phosphorylations participent au contrôle de l'activité de la kinase Aurora B et donc à la ségrégation correcte des chromosomes. Si MPS1 et PLK1 peuvent se substituer ou peut-être coopérer à l'activation de ces sites reste à être pleinement explorée.

Enfin, von Schubert et al. [276] ont révélé un autre indice de l'énigme de la coopération entre MPS1 et PLK1. PLK1 et MPS1 coopèrent dans le recrutement KT du complexe MAD1:C-MAD2, mais la question restante est de savoir comment ils collaborent à ce recrutement. PLK1 pourrait être impliquée directement dans le recrutement du complexe ou alors elle pourrait améliorer la capacité de MPS1 à recruter MAD1 au KT.

En conclusion, ces données offrent de nouvelles perspectives sur le rôle de PLK1 dans la signalisation du SAC avec ce rôle complémentaire MPS1. La **figure 1.19** récapitule les principales phosphorylations impliquant MPS1 et PLK1 au niveau du SAC et du CPC.

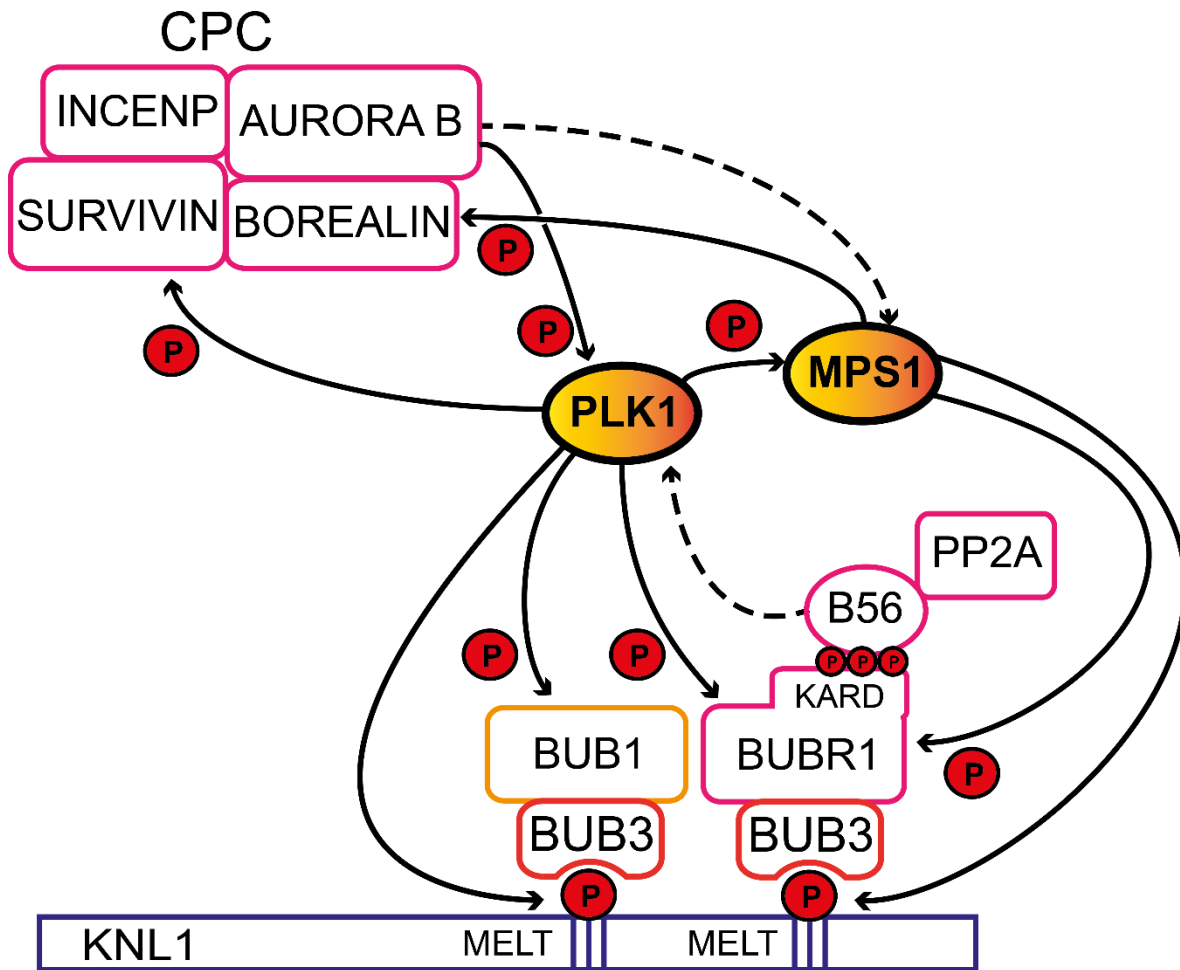


Figure 1.19 : MPS1 et PLK1 coopèrent

Ce schéma représente les principales phosphorylations attribuées à MPS1 et PLK1 au niveau du SAC et du CPC. Figure provenant de l'article de revue en annexe.

5. SAC, MPS1 et cancer

MPS1 est un maillon essentiel dans le point de contrôle de la mitose. Son expression anormale va donc influencer la fonction du SAC dans son ensemble et causer une sortie de la mitose précoce accompagnée d'erreurs dans la ségrégation des chromosomes, d'aneuploïdie et même de mort cellulaire [298]. Dans des nombreuses cellules cancéreuses, le SAC est perturbé mais pas absent car cela est létal pour les cellules normales et cancéreuses, démontrant son importance pour la survie cellulaire [299, 300]. Il a été montré que les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la mort causée par l'inhibition du SAC que les cellules normales [203, 301]. Ainsi, plus le SAC est défectueux, plus des instabilités chromosomiques sont générées. Celles-ci vont outrepasser la capacité d'adaptation de la cellule menant à sa mort. Donc cibler les protéines du SAC est une possibilité dans la lutte contre le cancer. MPS1 fait partie des cibles candidates pour cette approche [162, 205, 241].

Comme plusieurs régulateurs du cycle cellulaire, l'expression de MPS1 est dérégulée dans de nombreux types de tumeurs [302, 303]. L'expression de l'ARN messenger de MPS1 est pratiquement indétectable voir absente dans les cellules et tissus normaux excepté dans le placenta et les testicules [304]. Elle est surexprimée dans plusieurs cancers humains dont le cancer du côlon [303], les glioblastomes [305] et le cancer du sein [302] pour ne citer qu'eux. Les hauts niveaux d'expression sont en corrélation avec les pronostics les plus pessimistes [305-307] et contribuent aussi à la prolifération des cellules cancéreuses [302].

MPS1 est considérée comme une cible pour les drogues anticancer très prometteuse. C'est pour cela que depuis quelques années, la recherche d'inhibiteurs de MPS1 s'est intensifiée et plusieurs molécules ont été découvertes. Parmi les différents inhibiteurs de MPS1, la reversine [2-(4-morpholinoanilino)-N6-cyclohexyladenine], une petite molécule initialement décrite comme une molécule inhibitrice des protéines kinases Aurora [308] est aussi un inhibiteur de MPS1. En effet, Santaguida et al. [204] ont montré que cet inhibiteur pouvait aussi bloquer l'activité kinase de MPS1 et cela avec une

beaucoup plus grande spécificité. La concentration inhibitrice médiane (CI50) de la reversine est de 98.5 nM pour Aurora B et de 6 nM et 2.8 nM pour le domaine kinase et la protéine entière de MPS1 respectivement. Une étude récente a présenté les structures des domaines kinase de MPS1 et de Aurora B en complexe avec la reversine [268]. Il a été montré que la reversine possède une plus grande affinité pour MPS1 que pour Aurora B grâce à des contacts plus nombreux. Cela vient confirmer les études biochimiques et les essais dans la cellule qui montrent que la reversine inhibe MPS1 plus efficacement. La grande spécificité et la bonne efficacité de cet inhibiteur font qu'elle est couramment utilisée dans les études de MPS1 en laboratoire. Nous avons aussi fait le choix d'utiliser la reversine dans le laboratoire pour nos différents essais.

L'inhibition du SAC par l'utilisation d'inhibiteur de MPS1 a montré que cette approche était possible. De nombreuses études cliniques et des essais ont été faits depuis plusieurs années (**Tableau 2**). Il a été suggéré que l'utilisation d'agents ciblant les MT (MTA : Microtubule-targeting agents) en combinaison avec un inhibiteur de kinase du SAC pourrait perturber l'alignement correct des chromosomes pour favoriser les erreurs de ségrégation et dépasser le seuil d'erreur qui mène à la mort des cellules cancéreuses. Plusieurs exemples viennent en support de cette hypothèse [309-311]: dans des modèles cellulaires et de souris du cancer du sein, la combinaison d'un inhibiteur de MPS1 (NTRC 0066-0) et d'une dose thérapeutique de Docétaxel a permis de doubler la survie des souris et une rémission des tumeurs, sans toxicité [312]. Dans des cellules de glioblastome, l'inhibition de MPS1 (MPS1-IN-3) a causé des aberrations mitotiques et la combinaison de cet inhibiteur avec la vincristine, un poison du fuseau mitotique, a induit une dérégulation du SAC, une augmentation de l'aneuploïdie et de la mort cellulaire. Ils ont également observé une survie prolongée sur leur modèle de souris sans toxicité [305].

Récemment, une étude a montré que l'inhibition seule de MPS1 était efficace sur un modèle de souris portant des tumeurs mais le traitement montrait une toxicité incompatible à son utilisation clinique. En revanche, la combinaison

avec l'inhibiteur de CDK4/6, le palbociclib, a permis de réduire la toxicité tout en gardant la même efficacité [313]. Cette étude pose la question de l'utilisation d'inhibiteurs de MPS1 seuls ou en combinaison.

Les mutations dans les protéines clé des points de contrôle du cycle cellulaire sont assez rares dans les tumeurs humaines. Cependant, des variations de séquences ont été retrouvées dans le cancer de la vessie [314]. Des mutations provoquant des changements de cadre de lecture, produisant ainsi une protéine tronquée résulterait de l'instabilité de microsatellites dans le gène de MPS1 dans les cancers gastriques et colorectaux [315]. L'influence dans la tumorigénèse de ces mutations dans les cellules dérivées de tumeurs n'est toutefois pas encore connue.

La résistance des cellules aux thérapies anticancer est un problème récurrent et les mutations acquises pour résister aux drogues utilisées dans les traitements font partie de ces mécanismes. Gurden et al. [271] ont voulu savoir comment pouvait apparaitre une résistance contre plusieurs inhibiteurs de MPS1 qui sont en développement préclinique. Ils ont identifié cinq mutations dans le domaine kinase de MPS1 qui confèrent une résistance à la cellule. Ils ont montré que ces mutations apparaissent naturellement dans les cellules normales et dans les cellules malignes et cela expliquerait pourquoi des résistances acquises apparaissent rapidement dans les traitements ciblés comme celui de l'inhibition de MPS1. Cela montre qu'il est important d'identifier très tôt dans le développement de molécules et de préparer des stratégies pour éviter ce problème.

Tableau 2 : Recherches et essais cliniques concernant MPS1 dans plusieurs types de cancers humains.

Tableau adapté de [316].

Auteur	Type d'étude	Sujet	Type de tumeur	Résultats / Conclusion
Tannous 2013	Étude rétrospective et recherche fondamentale	Cellule, animal et patient (343)	Glioblastome	MPS1 est une cible thérapeutique putative
Maachani 2015	Étude rétrospective et recherche fondamentale	Cellule, animal et patient (197)	Glioblastome	MPS1 est un biomarqueur pour le pronostic et une cible thérapeutique
Salvatore 2007	Recherche fondamentale	Cellule et patient (90)	Carcinome de la thyroïde	TTK est surexprimé dans le carcinome de la thyroïde
Daniel 2011	Recherche fondamentale	Cellule	Cancer du sein	L'augmentation de MPS1 contribue à la tolérance de l'aneuploïdie dans les cellules du cancer du sein
Maire 2013	Recherche fondamentale	Cellule et patient (172)	Cancer du sein	TTK est une cible thérapeutique attirante
Gyorffy 2014	Recherche fondamentale	Cellule et patient (695)	Cancer du sein	TTK est une cible thérapeutique potentiel et SP00125 est un inhibiteur de TTK prometteur
Maia 2015	Recherche fondamentale	Cellule et animal	Cancer du sein	L'inhibition de TTK est une nouvelle cible thérapeutique pour les thérapies néo-adjuvantes dans les cancer triple négatif du cancer du sein
Suda 2007	Recherche fondamentale	Cellule	Cancer du poumon	TTK, LY6K et IMP-3 sont des nouveaux antigènes associés aux tumeurs
Suzuki 2013	Essai clinique : phase I NCT00633724 NCT00874588	Patient (15)	Cancer du poumon avancé	La thérapie vaccinale peptidique, y compris avec TTK, est sans danger et efficace
Mizukami 2008	Recherche clinique et fondamentale	Cellule et patient (20)	Carcinome épidermoïde œsophagien avancé	L'antigène TTK induit une réponse spécifique des cellules T est détecté dans 70% des cas (14/20)
Kono 2009	Essai clinique : phase I NCT00682227	Patient (10)	Carcinome épidermoïde œsophagien avancé	La vaccination avec de multiples peptides incluant TTK est une thérapie prometteuse
Kono 2012	Essai clinique : phase II NCT00995358	Patient (60)	Carcinome épidermoïde œsophagien avancé	La réponse immunitaire induit par la vaccination incluant TTK peut donner un meilleur pronostic

Iinuma 2014	Essai clinique : phase I NCT00632333	Patient (11)	Carcinome épidermoïde œsophagien avancé	La combinaison de l'immunothérapie, de la radiothérapie et la chimiothérapie est sûre et prometteuse
Aruga 2013	Essai clinique : phase I UMIN- CTR 000003207	Patient (9)	Cancer avancé des voies biliaires	La vaccination avec 4 peptides incluant TTK fournit un bénéfice Clinique à quelques patients
Miao 2014	Recherche clinique et fondamentale	Patient (174)	Carcinome hépatocellulaire	Les taux d'ARNm de TTK ont été corrélés négativement avec la survie sans récurrence et la survie globale chez les patients après chirurgie
Liu 2015	Recherche clinique et fondamentale	Cellule et patient (152)	Carcinome hépatocellulaire	TTK est un nouveau marqueur pour le pronostic et une cible thérapeutique dans le traitement de l'hépatocarcinome
Kaistha 2014	Recherche fondamentale	Cellule et tissu humain	Adénocarcinome canaire pancréatique	TTK est une nouvelle cible pour de nouvelles approches thérapeutiques contre l'adénocarcinome canalaire pancréatique
Slee 2014	Recherche clinique et fondamentale	Cellule et patient (45)	Adénocarcinome canaire pancréatique	TTK est un biomarqueur prometteur pour le pronostic et son inhibition (NMS-P715) peut être une stratégie de de traitement potentielle
Shiraishi 2011	Recherche clinique	Patient (72)	Cancer de le prostate	La surexpression de TTK dans le groupe récurrent a indiqué que TTK était un biomarqueur prometteur pour prédire la récurrence.
Dahlman 2012	Recherche clinique et fondamentale	Cellule et patient (242)	Cancer de le prostate	TTK pourrait être un biomarqueur potentiel pour la récurrence dans le cancer de la prostate
Liu 2013	Recherche fondamentale	Cellule	Mélanome	Cibler MPS1 et l'oncogène B-Raf peut fournir de grandes opportunités pour le traitement du cancer
Zhang 2013	Recherche fondamentale	Cellule	Mélanome	Cibler MPS1 et l'oncogène B-Raf peut fournir de grandes opportunités pour le traitement du cancer

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

Problématique

L'aneuploïdie, caractérisée par un nombre incorrect de chromosomes dans la cellule, est la conséquence d'une division cellulaire aberrante. On retrouve l'aneuploïdie dans plusieurs pathologies, elle est responsable des retards mentaux à la naissance (syndrome de Down), c'est la première cause reconnue dans les fausses couches, c'est également un marqueur dans la plupart des cancers et favorise la progression tumorale [317].

La compréhension des mécanismes et des voies de signalisation qui régissent et assurent une division cellulaire précise permet de combattre et prévenir ces pathologies. Le SAC est le mécanisme mis en place par la cellule pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes, il est essentiel pour la prévention de l'aneuploïdie. Les protéines du SAC vont assurer cette fonction en s'assurant que l'attachement entre les chromosomes et les MT du fuseau sont bien établis et que le processus de division est retardé pour permettre cet attachement.

Parmi les protéines du SAC, MPS1 est une protéine kinase essentielle pour son bon fonctionnement. Comme on l'a abordé au point « 5. SAC, MPS1 et cancer », plusieurs traitements à l'étude contre le cancer utilisent des inhibiteurs de l'activité kinase de MPS1. L'utilisation de ces inhibiteurs est efficace mais pose un certain nombre de problèmes incluant la spécificité et la résistance des cellules. Ces inhibiteurs sont tous dirigés contre le domaine kinase, ce qui montre une certaine limite du fait que cette structure est partagée par de nombreuses kinases. Le développement d'inhibiteurs ciblant d'autres régions de MPS1 est une piste qui pourrait palier à ce problème.

Le fonctionnement et les mécanismes de régulation de l'activité de MPS1 ne sont toujours pas complètement compris. La localisation de MPS1 aux KT nécessite la région NTE [211], c'est une région d'environ 50 acides aminés qui

ne possède de domaine fonctionnel clairement défini. Malgré une conservation de la séquence assez faible de la levure aux mammifères, le rôle dans la localisation de MPS1 est conservé chez la levure bourgeonnante [186] et la levure à fission [318, 319]. Cette région contribue à l'activité kinase chez la levure mais son rôle chez l'homme reste incertain. On ne connaît toujours pas l'implication de cette région dans la régulation de l'autophosphorylation de MPS1. Des données récentes ont montré que la région N-Terminale (NTE+TPR) est impliquée dans cette régulation. La suppression des 100 premiers acides aminés de MPS1, ce qui correspond à la perte de la région NTE et d'une partie du domaine TPR montre une baisse de l'activité kinase de la protéine. Ces résultats de supportent l'hypothèse d'une participation de la région NTE dans la régulation positive de l'activité kinase de MPS1.

Objectifs des travaux

Comprendre dans quelles mesures la région NTE de MPS1 participe à la régulation de l'activité kinase et à la localisation de MPS1.

Objectifs spécifiques

- Déterminer plus précisément la région responsable de la localisation de MPS1 aux KT
- Identifier un mécanisme participant à la régulation de l'activité kinase de MPS1
- Évaluer l'importance de la région NTE de MPS1 dans l'accomplissement de ses fonctions au cours de la mitose.

CHAPITRE 2

Distinct autoinhibitory elements within the MPS1 kinase N-terminal Extension regulate catalytic activity and kinetochore docking.

Guillaume Combes^{1,2}, Luc Murakami², Ibrahim Alharbi^{1,2}, Luciano Gama Braga^{1,2}, Philippe Thebault², Pat Eyers³, Victor Bolanos-Garcia⁴, Sabine Elowe,^{1,2,5}

1. Programme in Molecular and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université Laval.
2. Axe of reproduction, mother and youth health, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, Québec, G1V 4G2, Canada.
3. Institute of integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool L697ZB United Kingdom.
4. Department of Biological and Medical Sciences - Faculty of Health and Life Sciences Oxford Brookes University, Oxford OX3 0BP, United Kingdom
5. Author for correspondence: sabine.elowe@crchuq.ulaval.ca

Avant-propos

Ce chapitre détaille les résultats des travaux de recherche que j'ai réalisés pour cette thèse au cours de mon doctorat dans le laboratoire du Dr Elowe. Ce chapitre est écrit en anglais sous la forme d'un article scientifique intitulé : *Distinct autoinhibitory elements within the MPS1 kinase N-terminal Extension regulate catalytic activity and kinetochore docking*. Il sera soumis dans un journal scientifique spécialisé dans le domaine.

Je suis le premier auteur de cet article, j'ai effectué et complété la majeure partie des expériences. Luc Murakami, un ancien étudiant Coop du laboratoire pendant 8 mois a participé à la réalisation de plusieurs expériences (figures 2.1B, 2.5A et S2). Ibrahim Alharbi et Luciano Gama Braga, étudiants au doctorat dans le laboratoire ont participé à la réalisation de plusieurs expériences Pour Ibrahim Alharbi (figures 2.6C et D) et pour Luciano Gama Braga (figures 2.7D et S9). Philippe Thébault, ancien professionnel de recherche a également pris part aux expériences et fut d'une grande aide (figures 2.1C,D,E et S4). Le Dr Elowe a aussi participé à la réalisation de plusieurs expériences (figures 2.4A,D, 2.6B, S5 et S8B). J'ai participé au design des expériences et j'ai écrit le manuscrit de l'article sous la supervision du Dr Elowe.

Résumé en français

La kinase à double spécificité MPS1 est un composant critique du « spindle assembly checkpoint » (SAC) qui assure la ségrégation précise des chromosomes au cours de la mitose. La régulation de l'activité et de la localisation de MPS1 reste encore incomprise dans son ensemble. Des preuves récentes montrent que l'extension N-Terminale (NTE) et le domaine tetratricopeptide (TPR) de MPS1 joue un rôle important dans la régulation de sa localisation et de son activité kinase. En utilisant une approche structure-fonction, nous avons constaté que la NTE de MPS1 contribue à sa localisation et son activation par 2 modules indépendants. Nous avons démontré que les résidus 19-29 sont absolument requis pour la localisation de MPS1 et également nécessaire pour diminuer l'interaction entre MPS1 et ARGEF17/TEM4. Les résidus 40-49, et en particulier la phosphorylation dans cette région contribue à l'activation de la kinase, vraisemblablement par la relâche de l'auto-inhibition de la kinase. Nous proposons que l'activation de la kinase semble se produire successivement avec la dimérisation, puis la phosphorylation initiale de la région NTE et enfin suivie de la trans-autophosphorylation de la boucle d'activation du domaine kinase. Nous mettons en évidence que ces deux régions sont indépendamment requises pour le fonctionnement optimal du SAC et démontrons l'importance d'un réglage fin des activités de MPS1 dans le maintien de la robustesse du SAC.

Abstract

The dual specificity kinase MPS1 is a critical component of the spindle assembly checkpoint (SAC) which ensures the accurate segregation of chromosomes during mitosis, but its regulation remains unclear. Recent evidence indicates that the N-Terminal region of MPS1 which includes the N-terminal Extension (NTE) and the tetratricopeptide (TPR) domain plays an important role in the regulation of its localization and kinase activity. Using a structure-function approach, we found that the MPS1-NTE contributes to its localization and its kinase activation through two independent modules. We find that residues 19-29 are absolutely required for MPS1 localization and for attenuating the interaction between MPS1 and ARHGEF17/TEM4. Residues 40-49, and in particular phosphorylation within this region contributes to kinase activation at least in part through relief of kinase autoinhibition. We propose that MPS1 kinase activation likely occurs sequentially through dimerization, initial phosphorylation of the NTE followed by autophosphorylation of the kinase activation loop in trans. We establish that both regions are independently required for optimal function of the SAC and demonstrate the importance for fine-tuning of MPS1 activities in maintaining robustness of the SAC.

Introduction

Cell division is orchestrated by a precise and highly regulated series of events. To avoid errors in the chromosome segregation during mitosis and meiosis, the cell has evolved a complex self-monitoring signaling mechanism called the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) (Faesen et al., 2017; Musacchio, 2015; Sacristan and Kops, 2015). The SAC monitors the robustness of spindle microtubule attachments during mitosis and delays the onset of anaphase until all sister chromatids become attached. SAC activity initiates at kinetochores, protein-rich complexes that form at centromeres only during mitosis and that mediate the interaction between sister-chromatids and the spindle microtubules (Sacristan and Kops, 2015). Microtubule capture is thought to occur at the outer kinetochore by the KMN network (KNL1 Complex, NDC80 complex and MIS12 complex) (Musacchio and Desai, 2017) and some components of this network, in particular NDC80/HEC1 and KNL1, are directly involved in SAC establishment. The KNL1 protein is a major signaling hub during mitosis, and its phosphorylation by MPS1 or by PLK1 (when MPS1 activity is compromised or simply does not exist as in certain nematode lines), initiates SAC signaling whereas its dephosphorylation by a PP2A-PP1 relay is thought to attenuate the SAC (Etemad and Kops, 2016).

MPS1 has emerged as a master conductor of SAC signaling; it is virtually required for every step of the cascade and is one of the first protein kinases recruited to unattached kinetochores in early mitosis (Liu and Winey, 2012). MPS1 phosphorylation of KNL1 at the Thr residues of multiple Met-Glu-Leu-Thr (MELT) motifs generates high affinity binding sites for Bub3 and promotes recruitment the BUB1-BUB3-BUBR1-BUB3 heterotetrameric complex to kinetochores (Krenn et al., 2014; London et al., 2012; Primorac et al., 2013; Shepperd et al., 2012; Vleugel et al., 2015; Vleugel et al., 2013; Yamagishi et al., 2012; Zhang et al., 2014) as an initial step in SAC signalling. Recent evidence from both yeast and human cultured cells also indicates that phosphorylation of BUB1 by MPS1 promotes its binding to the MAD1-MAD2 protein (Ji et al., 2017; Kim et al., 2012; London and Biggins, 2014). MAD1-

MAD2 complex formation and activation occurs through a templating mechanism and involves the prion-like conversion of an “open” O-MAD2 to a SAC-competent, “closed” C-MAD2 molecule. MPS1 activity is required for retaining both the MAD1·C-MAD2 complex and O-MAD2 at unattached kinetochores during mitosis (Tipton et al., 2013). In line with its pleiotropic functions, depletion of MPS1 protein (Jelluma et al., 2008b; Tighe et al., 2008) or chemical inhibition of its catalytic activity (Hewitt et al., 2010; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010) has also indicated a requirement for MPS1 in proper chromosome alignment and accurate chromosome segregation, although the mechanistic details of this remain unclear.

Critical to MPS1 activity is its localization to the kinetochore. The N-Terminal region which includes the NTE (N-Terminal Extension) and the TPR (Tetratricopeptide repeat) domains collectively contribute to the localization, dimerization and activity of the protein (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015; Lee et al., 2012; Nijenhuis et al., 2013; Thebault et al., 2012). MPS1 localization to the kinetochore absolutely requires the NTE (Nijenhuis et al., 2013), a region of about fifty amino acids at the extreme N-terminus of MPS1 with no clear functional domains, and of unknown structure (Fig. 2.1A). Recent evidence suggests that hMPS1 localization is primarily controlled by the NTE through competition with microtubules for their binding site on the calponin homology (CH) domain of HEC1 (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015). Although poorly conserved across evolution, the NTE in both budding yeast (Araki et al., 2010) and fission yeast (Aravamudhan et al., 2016; Hervas-Aguilar and Millar, 2016) is also required for its kinetochore recruitment to the NDC80 complex albeit by potentially different mechanisms (Chmielewska et al., 2016). The middle region of MPS1 also partially contributes to MPS1 localization through interaction with the CH domain of Nuf2 (Ji et al., 2015). Moreover, although the NDC80 complex appears to be the major docking site for MPS1, other proteins have also been implicated in MPS1 localization albeit their roles are less well-understood. The pre-mRNA splicing kinase PRP4 localizes to kinetochores and is required for MPS1 kinetochore docking through an unknown mechanism. More recently the

Rho family GTPase exchange factor ARHGEF17/TEM4 (thereafter referred to as TEM4) has been shown to function as a targeting factor that controls the localization of MPS1 to kinetochores (Isokane et al., 2016). ARHGEF17 interacts directly with MPS1 through its central domain and is reciprocally regulated by MPS1 phosphorylation. In budding yeast, the NTE also contributes to kinase activity (Araki et al., 2010). Our previous studies indicated that the N-terminus of hMPS1 also promotes activation, as an MPS1 mutant lacking the first 100 amino acids exhibited a decrease in catalytic activity (Lee et al., 2012), although whether this occurred due to loss of the NTE or the TPR remains unclear. Taken together, these observations support the hypothesis that MPS1 NTE is involved in the regulation of MPS1 kinetochore docking as well as kinase activity.

Here, using a structure-function approach, we found that the MPS1-NTE contributes to its localization and its kinase activation through two independent modules, both of which appear to be autoinhibitory. We find that residues 19-29 of NTE are absolutely required for MPS1 kinetochore recruitment. Deletion of this region abolishes MPS1 localization to kinetochores with only a minor decrease of its catalytic activity. Surprisingly, MPS1 Δ 19-29 is still able to interact with the HEC1 CH domain but exhibits increased binding to TEM4, suggesting that this mutant cannot properly exchange between kinetochores and the cytoplasm. On the other hand, residues 40-49 are required for full kinase activation, likely through relief of an NTE-specific autoinhibition. Mutagenesis of three potential phosphorylation sites in this region reveals that phosphorylation within this region contributes to kinase activation. The localization and activating motifs are both independently required for optimal function of the SAC, although MPS1 chromosome alignment downstream of MPS1 appears to be more sensitive to MPS1 presence at kinetochores than to attenuation of its activity. These experiments confirm the role of the localization and the activity of MPS1 in SAC establishment and robustness.

Results

MPS1- Δ NTE exhibits attenuated activity and kinetochore localization

To verify the role of the NTE in MPS1 localization and activity, we generated an MPS1 construct lacking the first 49 amino acids (MPS1- Δ NTE, Fig. 2.1A). In agreement with previous studies (Nijenhuis et al., 2013), MYC-MPS1- Δ NTE in cells depleted of endogenous MPS1 was not observed at kinetochores (Fig. 2.1B). Moreover, we detected no significant increase of MYC-MPS1- Δ NTE kinetochore localization after inhibition of MPS1 activity with reversine (Fig. 2.1B) which is known to decrease MPS1 turnover at kinetochores ((Jelluma et al., 2010) and Fig. 2.1B), confirming previous reports that the NTE acts as the primary determinant of MPS1 localization and further demonstrate that the effect on localization of MPS1 activity is negligible in the absence of the NTE. We next sought to determine whether the NTE also contributes to MPS1 catalytic activation. As a measure of MPS1 activation we used well characterized phosphospecific antibodies recognizing MPS1 activation loop pT676 and pT686 (Tyler et al., 2009). Whereas MYC-MPS1 wild-type (WT) exhibited robust phosphorylation at both autoactivation loop sites, both MYC-MPS1 kinase-dead (D664A, KD) and MYC-MPS1- Δ NTE were poorly phosphorylated (Fig. 2.1C). In contrast phosphorylation of the MAPK site S821 in the MPS1 tail was essentially unchanged. In agreement with these observations, MPS1- Δ NTE exhibited a smaller, and less distinct mitotic gel retardation in the absence of reversine than that observed with MPS1-WT, which is characteristic of reduced activity. As expected, MPS1-KD did not exhibit any gel retardation (Fig. S2). This data strongly suggests that the MPS1 NTE contributes to kinase activity. To further confirm this, we tested the activity of MYC-MPS1- Δ NTE in in vitro kinase assays using both autophosphorylation of MPS1 as well as phosphorylation of the exogenous substrate Myelin Basic Protein (MBP) as a measure of MPS1 activity (Fig. 2.1D, E). As expected, MPS1-WT was efficient at both auto- and substrate phosphorylation, whereas MPS1-KD was completely ineffective at both.

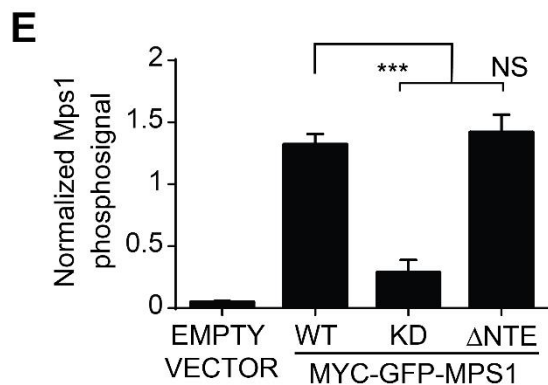
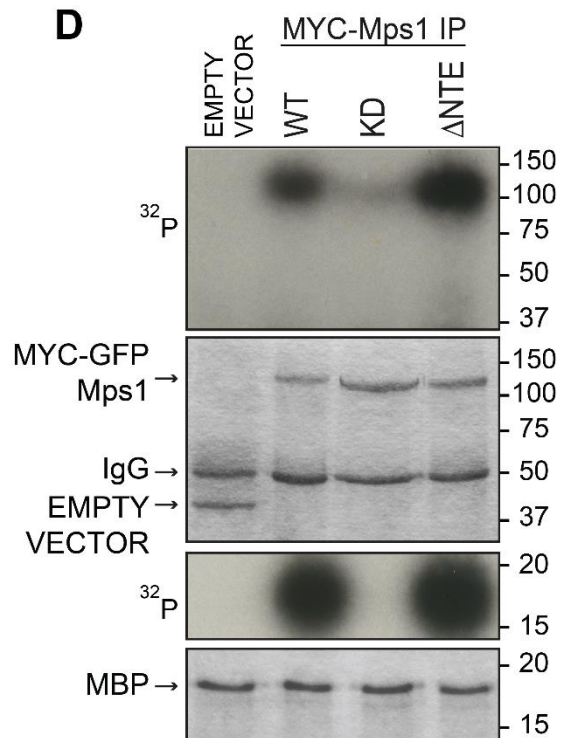
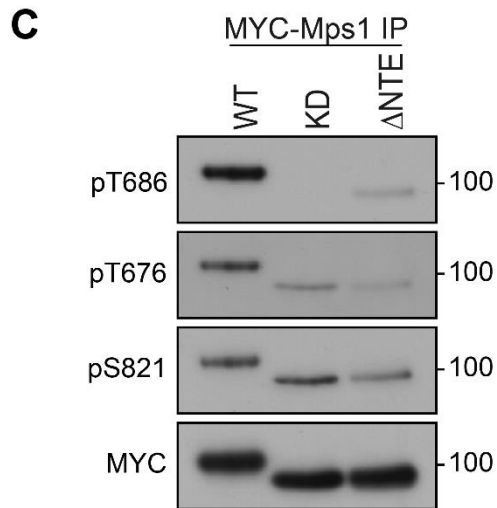
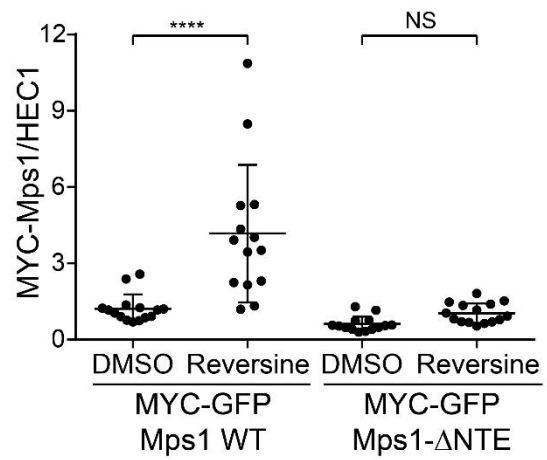
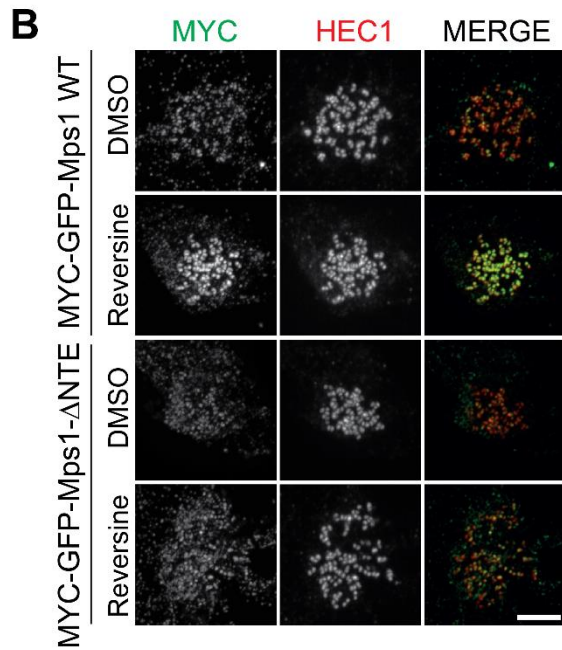
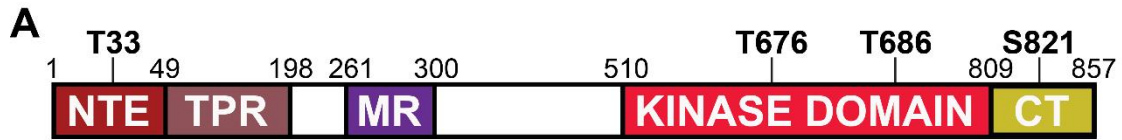


Figure 2.1: MPS1- Δ NTE exhibits attenuated activity and kinetochore localization

(A) Cartoon illustration of the different domains of the MPS1 protein. Phosphorylation sites relevant to this study are indicated in bold letters. **(B)** HeLa T-rax expressing Myc-GFP-MPS1 WT and Myc-GFP-MPS1 Δ NTE were depleted of endogenous MPS1 and synchronized in G1/S by 24H thymidine block, washed with PBS, released for approximately 10h before fixation. Cells were treated with DMSO or 0.5 μ M reversine 30min before fixation. Cells were immunostained for MYC (Green) and HEC1 (Red), and DNA was marked with Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. The graph shows the quantification of the MYC-MPS1/HEC1 ratio of the immunofluorescence in B. **(C)** 293T cells were transiently transfected with MYC-MPS1 WT and mutants KD, Δ NTE and with siRNA MPS1 for endogenous MPS1 depletion. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. Anti-pT686 (first panel), anti-pT676 (second panel) and anti-pS821 (third panel) western blotting were performed with MYC-MPS1 immunoprecipitated from equalized lysates. Anti-MYC blotting (fourth panel) shows equal loading. **(D)** In vitro kinase assay of full-length MYC-GFP-MPS1 WT, KD and Δ NTE expressed in 293T cells. MPS1 autophosphorylation and MBP protein phosphorylation were visualized after autoradiography using [γ - 32 P] ATP as a cofactor (first and third panels). Equal loading of assayed protein was confirmed by Coomassie Blue staining of the gel. **(E)** Quantification of the MPS1 autophosphorylation from (D). Data are means \pm SE from $n = 2$ independent experiments. *** $P = 0.001$.

Surprisingly, and in contrast to our observations with the antibodies above, MPS1- Δ NTE efficiently phosphorylated both itself as well as the MBP substrate.

MPS1 clustering in the NTE supports its kinase activity

One possible interpretation of the discordance between the results obtained with the phosphospecific antibodies and the in vitro kinase assays is that the degree of MPS1 clustering induced by immunoprecipitation for the in vitro kinase assay may promote MPS1 autoactivation in trans (Kang et al., 2007; Tighe et al., 2008). Indeed, our previous reports suggest that dimerization of MPS1 occurs through the NTE (Thebault et al., 2012). To test the idea that clustering of MPS1- Δ NTE may promote its activity, we turned to chemically induced dimerization. We generated MPS1 fusion proteins with the FK506-binding protein (FKBP) which homodimerizes after treatment with a small ligand, AP20187. In nocodazole-arrested cells, treatment of cells expressing MYC-MPS1- Δ NTE with AP20187 were poorly phosphorylated, whereas the same treatment applied to MYC-FKBP-MPS1- Δ NTE expressing cells resulted in a clear increase in autophosphorylation in the activation loop rendering MPS1- Δ NTE activity comparable to WT; as expected MYC-FKBP-MPS1-KD remained incapable of autophosphorylation (Fig.

2.2A). Thus, MPS1 Δ NTE dimerization in the cytoplasm is sufficient to induce its activation.

We next sought to determine whether concentrating MPS1- Δ NTE at a specific chromosomal location may be sufficient to activate this mutant maximally. We generated plasmids expressing MPS1 WT, KD and Δ NTE fused to the MYC and the Lac repressor (LACI) protein and transfected these in U2OS cell lines expressing the 256 copies of the Lac operator in the chromosome 1 (Janicki et al., 2004). In nocodazole-arrested cells, Western blotting revealed that MYC-LACI-MPS1-WT but not -KD was phosphorylated at the activation loop T686, as expected. We found that while MYC- Δ NTE was poorly phosphorylated, MYC-LACI-MPS1- Δ NTE was able to efficiently autophosphorylate in the activation loop (Fig. 2.2B). These results were further confirmed by immunofluorescence (Fig. 2.2C). Interestingly, MPS1 activation by clustering appears to be more relevant during mitosis as MYC-LACI-MPS1-WT was significantly less autophosphorylated in interphase cells. In addition, clustering at the LacO array only partially increased basal MYC-LACI-MPS1- Δ NTE T686 phosphorylation during interphase, but completely restored its autophosphorylation to WT levels in mitotic cells (Fig. 2.2D). MPS1 activation during mitosis therefore requires mitotic-specific events that are independent of the increased local concentration of MPS1 during mitosis.

Next, we explored whether MPS1 recruitment to the kinetochore may serve as a mechanism to increase its local concentration thereby promoting its transactivation as has been suggested before (Kang et al., 2007). To do this, we tested whether MPS1- Δ NTE localization specifically at kinetochores is sufficient to restore its full activity, we forced kinetochore localization of MPS1- Δ NTE by fusing it at the N-terminus to Mis12, a stable component of the KMN network (Fig. S3A). We found that forced kinetochore localization of MYC-MIS12-MPS1 Δ NTE restores its autophosphorylation at T686 and T676 to levels comparable to MPS1 WT (Fig. 2.2E).

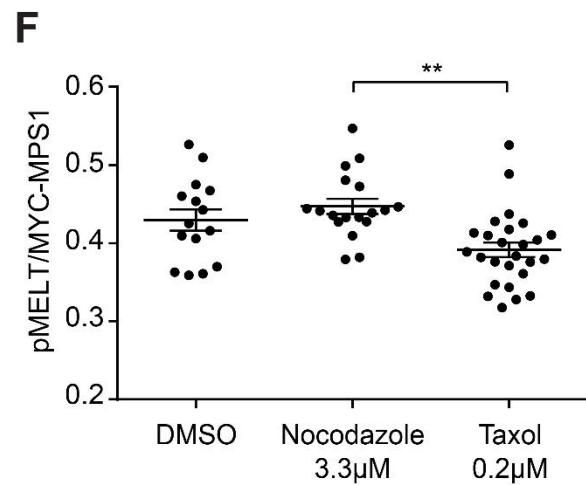
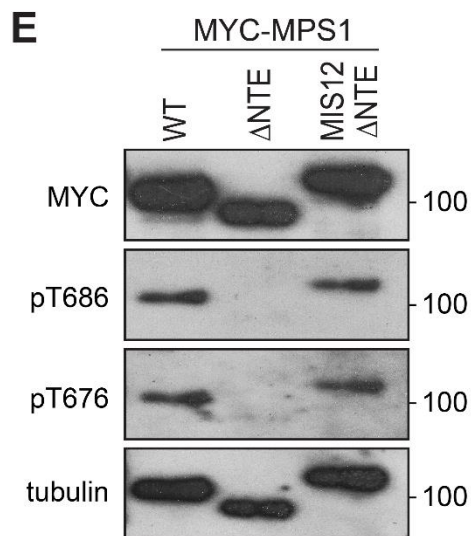
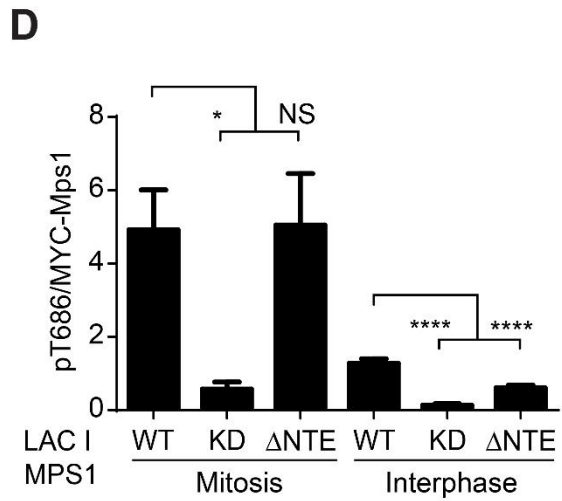
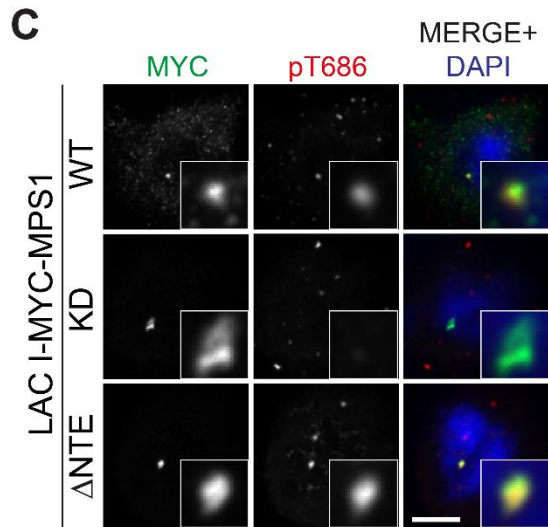
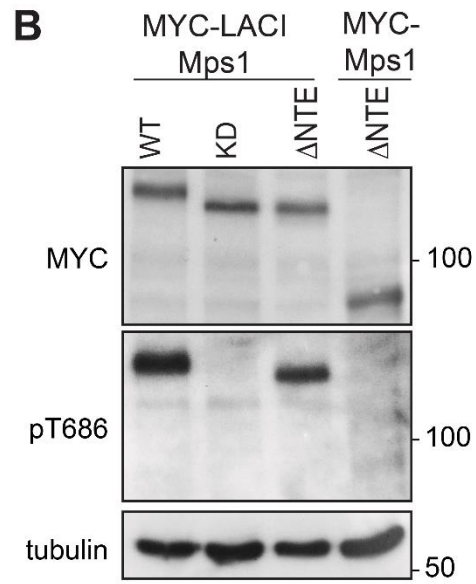
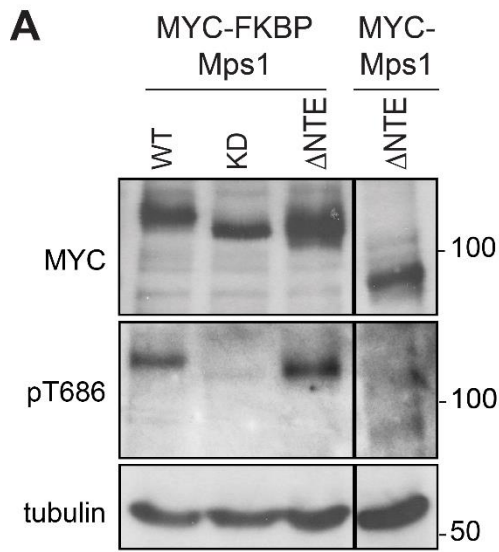


Figure 2.2: MPS1 clustering in the NTE supports its kinase activity

(A) HeLa S3 cells were transiently transfected with MYC-FKBP-MPS1 WT, KD, Δ NTE and MYC-MPS1 Δ NTE together with siRNA MPS1 for endogenous MPS1 depletion. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. 1h before harvesting, cells were treated with 10nM AP20187. Anti-pT686 (second panel) western blotting was performed from equalized lysates. MYC (first panel) and α -tubulin (third panel) westerns reveal equal expression and loading, respectively. **(B)** A U2OS cell line expressing 256 copy of LAC operator were transiently transfected with MYC-LacI-MPS1 WT, KD, Δ NTE, MYC-MPS1 Δ NTE and with siMPS1. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. pT686 (second panel) blotting was performed from equalized lysates. MYC (first panel) and α -TUBULIN (third panel) blotting reveal equal expression and loading, respectively. **(C)** U2OS cells (as in (B)) were transiently transfected with MYC-LacI-MPS1 WT, KD and Δ NTE. Cells were fixed with PTEMF in mitosis after nocodazole (0.33 μ M) synchronization for 16h. Cells were immunostained against MYC (Green), pT686 (Red), and DNA was visualized by Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. **(D)** The graph shows the quantification of the pT686/MYC-MPS1 ratio of the immunofluorescence in (C). * $P = 0.05$, **** $P = 0.0001$. **(E)** 293T cells were transiently transfected with MYC-MPS1 WT, Δ NTE, MIS12 Δ NTE and with siRNA MPS1 for endogenous MPS1 depletion. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. Anti-pT686 (second panel), anti-pT676 (third panel) and anti-pS821 (fourth panel) western blotting were performed with MYC-MPS1 immunoprecipitated from equalized lysates. Anti-MYC blotting (first panel) reveals equal expression. **(F)** HeLa cells were treated for 16 with 3.3 μ M nocodazole, 0.2 μ M taxol or DMSO before fixation. The graph shows the quantification of the pMELT/MPS1 immunofluorescence signal ratio ** $P = 0.01$.

Finally, we verified the effect of endogenous MPS1 concentration at kinetochores on phosphorylation of physiological substrates using KNL1 pT875 MELT motif phosphospecific antibodies (thereafter referred to as pMELT, (Krenn et al., 2014; London et al., 2012; Shepperd et al., 2012; Vleugel et al., 2013; Yamagishi et al., 2012; Zhang et al., 2014)). To alter the kinetochore concentration of endogenous MPS1, we treated cells with microtubules poisons that differentially regulate kinetochore-microtubule interaction and hence MPS1 docking. Treatment with taxol and nocodazole has been proposed to differentially affect MPS1 recruitment levels; taxol-hyperstabilized microtubules are thought to compete with and decrease MPS1 kinetochore levels, whereas nocodazole destabilizes these interactions allowing increased recruitment of MPS1 to kinetochores (Ji et al., 2015). We confirmed these observations (Fig. S3B) and further demonstrated that MPS1 concentration at kinetochores also affects MPS1 substrate phosphorylation. In both HeLaS3 (Fig. 2.2F and Fig. S3C) and the non-cancer cell lines RPE-1 (Fig. S3D, E), we found that the pMELT signals relative to the amount of MPS1 present at kinetochores was significantly lower in taxol-arrested cells when compared to nocodazole-arrested cells, suggesting

decreased relative MPS1 activity with decreasing MPS1 concentration. Collectively this data implies that the NTE-mediated kinetochore localization of MPS1 strongly contributes to its activation, likely through increasing its local concentration and transactivation.

Dissection of the NTE reveals independent motifs regulating kinase activity and kinetochore binding.

Our data suggests that the NTE is involved in the regulation of both the activity and the localization of MPS1 and that the high local concentration of MPS1 at kinetochores contributes to its optimal activation. We next sought to determine the precise regions in the NTE responsible for these functions. Although the NTE is generally poorly conserved, alignment of the N-terminus of several higher eukaryotes revealed short regions of strong conservation that we reasoned may be important for NTE functions (Fig. 2.3A). To study these in more detail, we generated a panel of different MPS1 mutants including the 3xMYC-tagged deletion mutants MPS1- Δ 7, MPS1- Δ 19-29, and MPS1- Δ 40-49 (Fig. 2.3A). Similarly, we generated 3xMYC-MPS1-5A, an alanine mutant of the previously identified autophosphorylation site T33 (Dou et al., 2011) and the acidic region around it (30-31-33-34-35) which is highly conserved.

Using the activation loop phosphospecific antibodies, we tested catalytic activation of the various MPS1 mutants by Western blotting. As expected the MPS1-KD was essentially not phosphorylated at the T686 and T676 sites, whereas MPS1-WT exhibited robust autophosphorylation and MPS1- Δ NTE displayed intermediate autophosphorylation as shown above. MPS1- Δ 7, MPS1- Δ 19-29 and MPS1-5A displayed slightly reduced autophosphorylation compared to MPS1-WT whereas MPS1- Δ 40-49 essentially mimicked MPS1- Δ NTE (Fig. 2.3B). We verified these observations at the level of individual cells; In HeLa cells expressing MPS1- Δ 40-49 but depleted of endogenous MPS1, we found significantly attenuated pT686 signal compared to cells rescued with MPS1-WT (Fig. 2.3C).

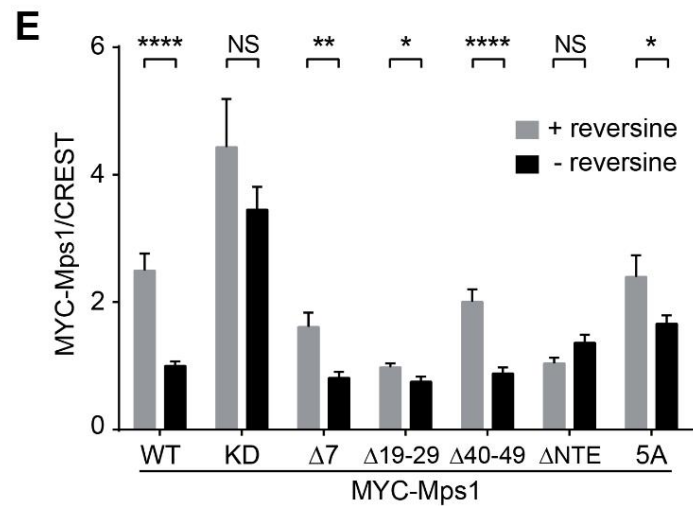
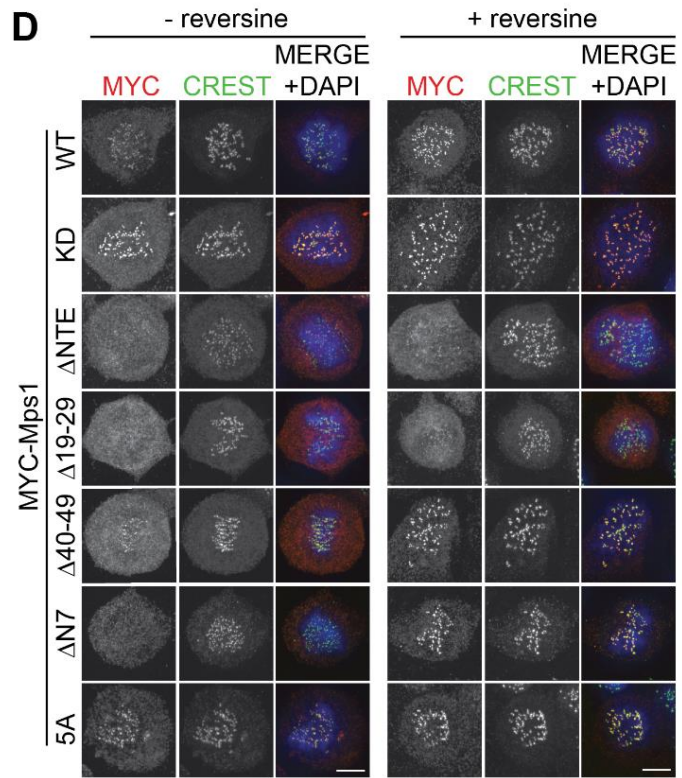
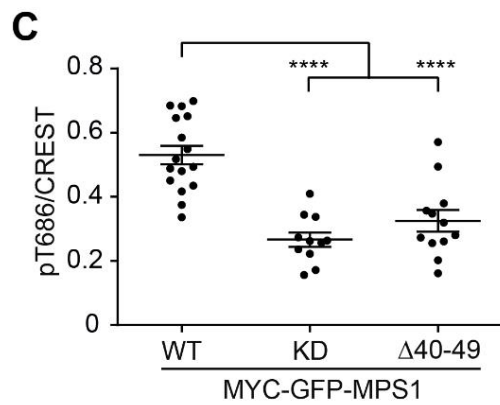
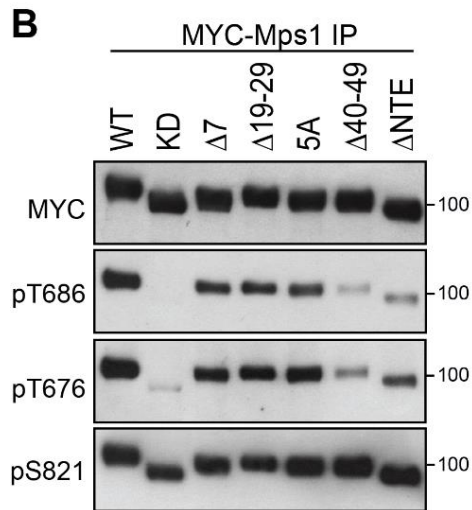
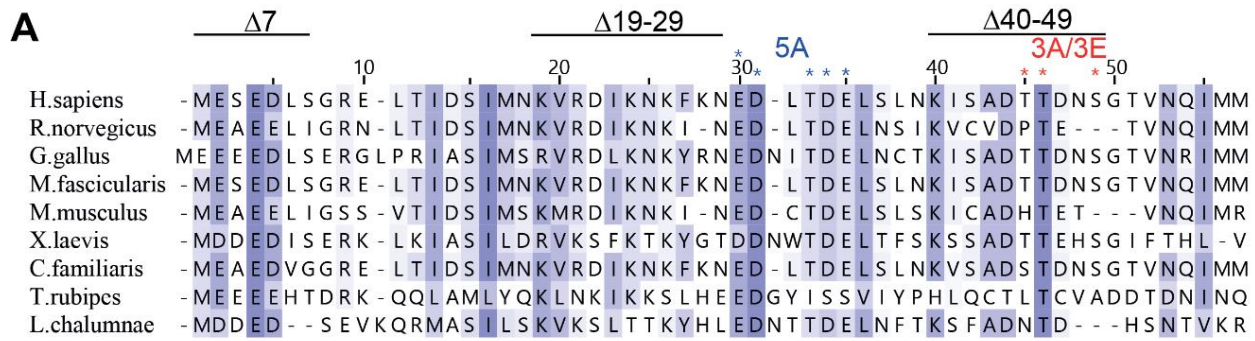


Figure 2.3: Dissection of the NTE reveals independent motifs regulating kinase activity and kinetochore binding

(A) Evolutionary conservation of the NTE region of MPS1 from higher eukaryotes and representation of the mutants generated for this study. **(B)** 293T cells were transiently transfected with MYC-MPS1 WT and mutants KD, $\Delta 7$, $\Delta 19-29$, 5A, $\Delta 40-49$, Δ NTE together with siMPS1. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. pT686 (second panel), pT676 (third panel) and pS821 (fourth panel) western blots were performed with MYC-MPS1 immunoprecipitated from equalized lysates. MYC blotting (first panel) reveals equal expression. **(C)** Cells depleted of endogenous MPS1 and expressing the indicated MPS1 constructs were synchronized in mitosis from a thymidine block before fixation and immunostaining against MYC, pT686, CREST, and Hoechst. The graph shows the quantification of pT686/CREST immunofluorescence ratio. **(D)** HeLa cells were transiently transfected with Myc-MPS1 WT, KD, Δ NTE, $\Delta 19-29$, $\Delta 40-49$, $\Delta 7$, and 5A together with siMPS1 for endogenous MPS1 depletion. Cells were synchronized in mitosis after a thymidine release and fixed before immunostaining for MYC (Red), CREST (Green), and Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. **(E)** The graph shows the quantification of the MYC-MPS1/CREST ratio of the IF in (D). * $P=0.05$, ** $P=0.01$ and **** $P=0.0001$

This suggests that while multiple regions of the NTE may incrementally contribute to MPS1 activity, residues 40-49 in the NTE plays a more significant role in MPS1 catalytic activation.

Next, we sought to determine the localization of these NTE mutants. To this end, MPS1 mutant constructs were expressed in HeLaS3 cells while concomitantly depleting endogenous MPS1 to avoid dimerization with the endogenous protein. We examined the localization of the MPS1 mutants in the presence or absence of reversine as MPS1 activity is known to influence its turnover at kinetochores (Fig. 2.3D,E). As expected, kinetochore localization of MPS1-KD was strong and remained unaltered, whereas MPS1-WT signals were significantly more marked upon reversine treatment. In the absence of reversine all the mutants behaved essentially like MPS1-WT with low kinetochore localization. However, while the localization of most mutants was restored to kinetochores after treatment with reversine, MPS1- Δ NTE and MPS1 $\Delta 19-29$ localized poorly to kinetochores, suggesting that residues 19-29 are absolutely required for MPS1 localization. Collectively, our data shows that while MPS1 kinetochore docking clearly promotes its catalytic activity, the kinase and localization functions of MPS1-NTE can be uncoupled, with residues 40-49 contributing significantly to catalytic activation and residues 19-29 determining kinetochore docking.

Residue 40-49 autoinhibit NTE-mediated kinase activation

We first decided to explore the contribution of residues 40-49 to kinase activity. We considered the possibility that they may mediate MPS1 dimerization, which is known to promote its activity ((Hewitt et al., 2010; Kang et al., 2007; Mattison et al., 2007; Wang et al., 2009) and Fig. 2.2). Considering that immunoprecipitation and clustering of MPS1- Δ NTE restored activity, we reasoned that a similar effect may be observed upon clustering of MPS1- Δ 40-49. As shown in Fig. 2.1D above, MPS1- Δ NTE demonstrated a level of autophosphorylation equivalent to MPS1-WT in an in vitro kinase assay (Fig. 2.4A). Surprisingly, however, immunoprecipitation of MPS1- Δ 40-49 did not restore its activity, and this mutant remained only partially autophosphorylated in this assay. As an additional control, we tested the activity of the localization mutant MPS1- Δ 19-29, which we found to be comparable to MPS1-WT, suggesting that the effect was specific to the amino acids 40-49 and not a non-specific effect due to the deletion *per se*. The observation that clustering restores full kinase activity to MPS1- Δ NTE but not MPS1- Δ 40-49 strongly suggests that MPS1 residues 40-49 are required to relieve an autoinhibition within the NTE itself. To test this idea, we generated double mutants of the NTE, combining the 40-49 deletion with the other NTE mutants, namely Δ 19-29, Δ 7 and 5A, and assessed phosphorylation of the double mutant by Western blotting with the activation loop phosphospecific antibodies. We found that MPS1 Δ 40-49/5A double mutant exhibited autophosphorylation at the MPS1 activation loop to levels that are comparable to MPS1-WT (Fig. 2.4B). The activity of two other double mutants, MPS1- Δ 40-49/ Δ 7 and MPS1- Δ 40-49/ Δ 19-29, remained unchanged compared to the single MPS1- Δ 40-49 mutant.

The 40-49 region harbors several potential phosphorylation sites including the well-conserved T45, T46 and S49 (Fig. 2.3.A). We thus reasoned that autoinhibition may be a result of the loss of phosphorylation in this region. Mutation of T45, T46 and S49 to alanine (MPS1-3A), but not the individual mutants (data not shown) indicated that loss of phosphorylation at these

residues contributes to the decrease of MPS1 activation and autophosphorylation (Fig. 2.4C, top 3 panels). Moreover, the decrease in autophosphorylation is rescued at least in part by the phosphomimetic MPS1-3E (Fig. 2.4C, top 3 panels). In *in vitro* kinase assays, however, we found that MPS1-3A exhibits robust kinase activity (Fig. S4). We interpret this to mean that while phosphorylation in the NTE is important for catalytic activation it is not the only contributing factor, and the presence of entire 40-49 motif is required for full relief of autoinhibition. Therefore, phosphorylation in the NTE, between residues 30 and 50 is required for full activation of MPS1, likely through the release of an NTE-specific autoinhibition, and restoration of activation loop phosphorylation.

Dimerization-mediated activation loop autophosphorylation *in trans* is thought to be the initiating event in kinase activation for MPS1 (Kang et al., 2007). The surprising finding that autophosphorylation in the MPS1 NTE was required for efficient activation loop phosphorylation and kinase activation suggested that temporally, NTE autophosphorylation occurs before activation loop phosphorylation. To test this idea, we sought to determine the phosphorylation of the NTE in the hypoactive MPS1- Δ 40-49 mutant. We generated a phosphospecific antibody against T33, a known autophosphorylation site (Dou et al., 2011; Jelluma et al., 2008a; Xu et al., 2009), and one of the residues implicated in relief of the autoinhibition. Antibody characterization and verification of T33 as an autophosphorylation site is shown in fig. S5. We used this antibody initially to determine NTE phosphorylation in MPS1-3A and MPS1-3E. We found that both mutants exhibited T33 phosphorylation that was equivalent to MPS1-WT, whereas neither MPS1-KD nor MPS1- Δ NTE were phosphorylated as expected (Fig. 2.4C, bottom panel). Consistent with these results, MPS1- Δ 40-49 exhibited comparable phosphorylation at T33 to MPS1-WT despite attenuation of pT686 and pT676 autophosphorylation (Fig. 2.4D). Phosphorylation at the S821 remained unchanged amongst the various mutants, as expected.

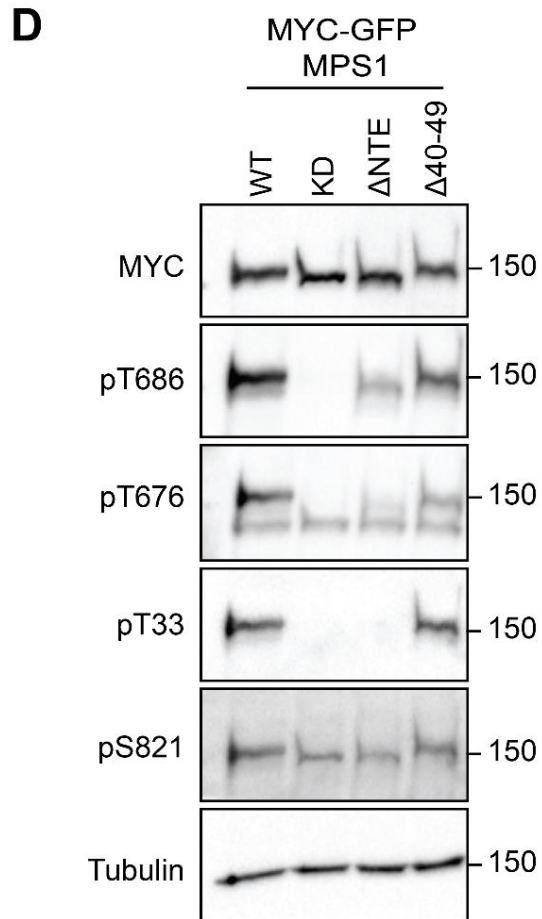
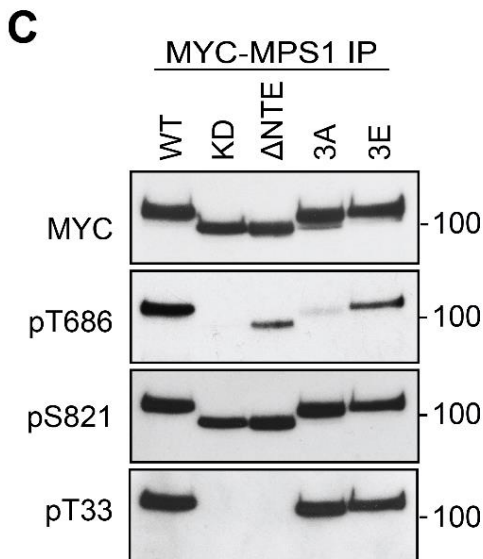
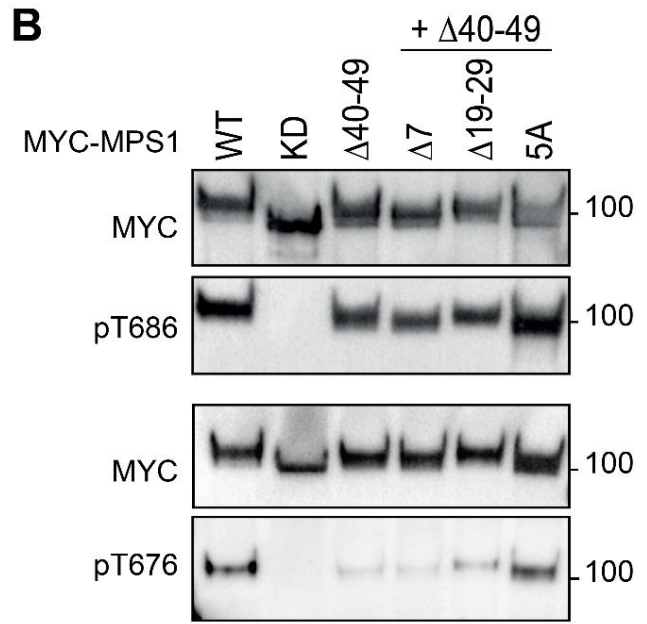
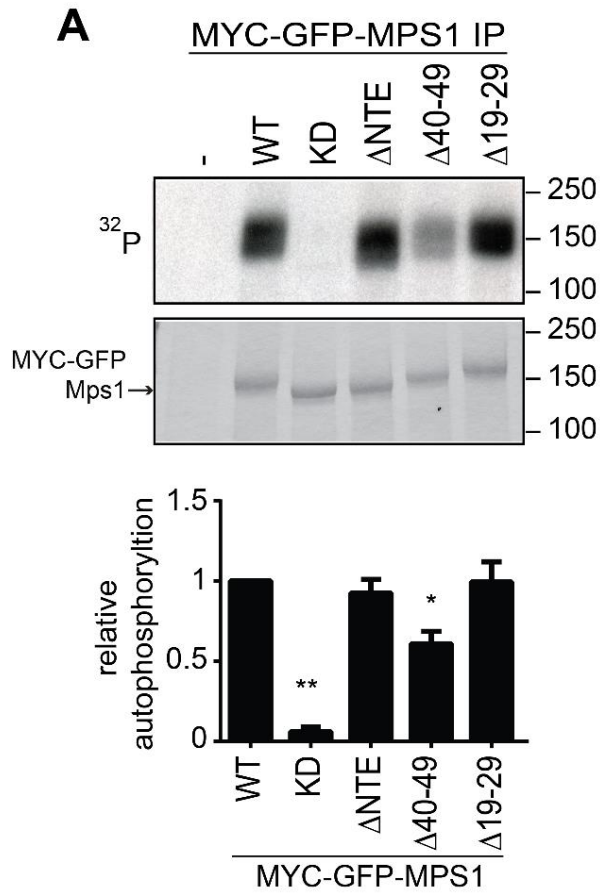


Figure 2.4: Residue 40-49 autoinhibit NTE-mediated kinase activation

(A) In vitro kinase assay of full-length MYC-GFP-MPS1 indicated constructs expressed in 293T cells. MPS1 autophosphorylation was visualized after autoradiography using [γ - 32 P]ATP as a cofactor (upper panel). Equal loading of assayed protein was confirmed by Coomassie Blue staining of the gel. Quantification of MPS1 autophosphorylation, data are means \pm SE from $n = 3$ independent experiments. * $P=0.05$ and ** $P=0.01$. **(B)** 293T cells were transiently transfected with MYC-MPS1 constructs as indicated and enriched in mitosis by nocodazole treatment. pT686 (second panel) and pT676 (fourth panel) and MYC (first and third panels) western blots are shown. **(C)** 293T cells were transiently transfected with the indicated MYC-MPS1 plasmids together with siMPS1 for endogenous MPS1 depletion. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. pT686 (second panel), pS821 (third panel) and pT33 (fourth panel) western blotting were performed with MYC-MPS1 immunoprecipitated from equalized lysates. MYC blotting (first panel) shows equal expression. **(D)** HeLa T-rax expressing MYC-GFP MPS1 WT, KD, Δ NTE and Δ 40-49 were grown for 48 hours and enriched in mitosis by nocodazole treatment. pT686 (second panel), pT676 (third panel), pT33 (fourth panel) and pS821 (fifth panel) western blotting were performed from equalized lysates. MYC (first panel) and α -tubulin (sixth panel) blots reveal equal expression and loading, respectively.

These observations demonstrate that NTE phosphorylation at T33 is independent of the presence of the 40-49 module, and likely occurs before full activation, as measured by activation loop phosphorylation. The observation that phosphorylation in the NTE occurred independently of the activation loop phosphorylation was intriguing. We, therefore, asked whether T33 phosphorylation could be done by MPS1 clustering and phosphorylation in trans as has been demonstrated for the activation site loop T676 (Kang et al., 2007). To test this, we co-transfected MPS1 WT and KD tagged with MYC or MYC-GFP to allow distinction of the different constructs based on the size of the tag and verified phosphorylation of T33 in the NTE and T686 in the activation loop (Fig. S6). Co-transfection of MPS1 WT and KD resulted in phosphorylation of the KD mutant at both T686 and T33, indicating that the phosphorylation can occur in trans. Taken together, these results confirm that MPS1 activation is a complex, multistep process that requires initial trans-autophosphorylation in the MPS1 NTE, likely before activation loop phosphorylation. Because T33 is one of the residues in the 5A region whose mutation rescues kinase activity in the Δ 40-49 mutant, it is likely that inactive MPS1 is autoinhibited and that phosphorylation in the NTE region is an initial step for the release of this autoinhibition, thereby allowing for increased MPS1 trans-autophosphorylation and activation.

MPS1 residues 19-29 inhibit kinetochore docking through increased affinity to TEM4.

We next sought to determine the role of the individual NTE motifs in cellular functions of MPS1. To this end we generated a panel of stable inducible MPS1 WT, KD, Δ NTE, Δ 19-29, and Δ 40-49 HeLa T-Rex cell lines (see Fig. S7 for cell line characterization). As shown in Fig. 2.3D and 2.3E, residues 19-29 appear to be required for MPS1 kinetochore loading. Considering that MPS1 kinetochore binding occurs through HEC1 (Martin-Lluesma et al., 2002), we asked whether loss of HEC1 affects residual kinetochore levels of this mutant. While depletion of HEC1 in the HeLa T-Rex cell lines significantly decreased MPS1-WT signals at kinetochores compared to control siGL2-treated cells, there was no appreciable difference in MPS1- Δ 19-29 localization, in the presence or absence of HEC1 (Fig. 2.5A, B). Because MPS1 localization at kinetochores is also known to be strongly influenced by microtubules occupancy perhaps in competition with HEC1 (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015), we also sought to determine whether MPS1- Δ 19-29 kinetochore levels are affected by nocodazole or taxol treatment. As shown previously ((Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015) and Fig. 2.2F), MPS1-WT kinetochore levels were significantly lower in taxol arrested compared to nocodazole-arrested cells. However, neither treatment altered MPS1- Δ 19-29 loading at kinetochores, both of which remained comparable to DMSO-treated cells (Fig. 2.5C). The uniformly low level of MPS1- Δ 19-29 signals at kinetochores is also reflected by pMELT intensity, which remained constant regardless of the drug treatment (Fig. 2.5D).

The observation that MPS1- Δ 19-29 is not responsive to changes in HEC1 or microtubules occupancy at kinetochores indicated that this region is a major determinant of NTE localization to kinetochores and implied that it might represent the primary interaction site between the MPS1 NTE and the CH domain of HEC1, the recently identified NTE interaction site in higher eukaryotes (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015). To test this idea, we generated recombinant N-terminal MPS1 fragments expressed in bacteria corresponding to either the MPS1^{WT} (N-MPS1^{WT}) protein or MPS1 lacking the NTE or the 19-29 and 40-49

motifs (N-MPS1^{ΔNTE}, N-MPS1^{Δ19-29} and N-MPS1^{Δ40-49}, respectively), and tested their direct interaction with immobilized recombinant CH domain of HEC1 (GST-HEC1^{CH}, Fig. S8A) in in vitro binding studies.

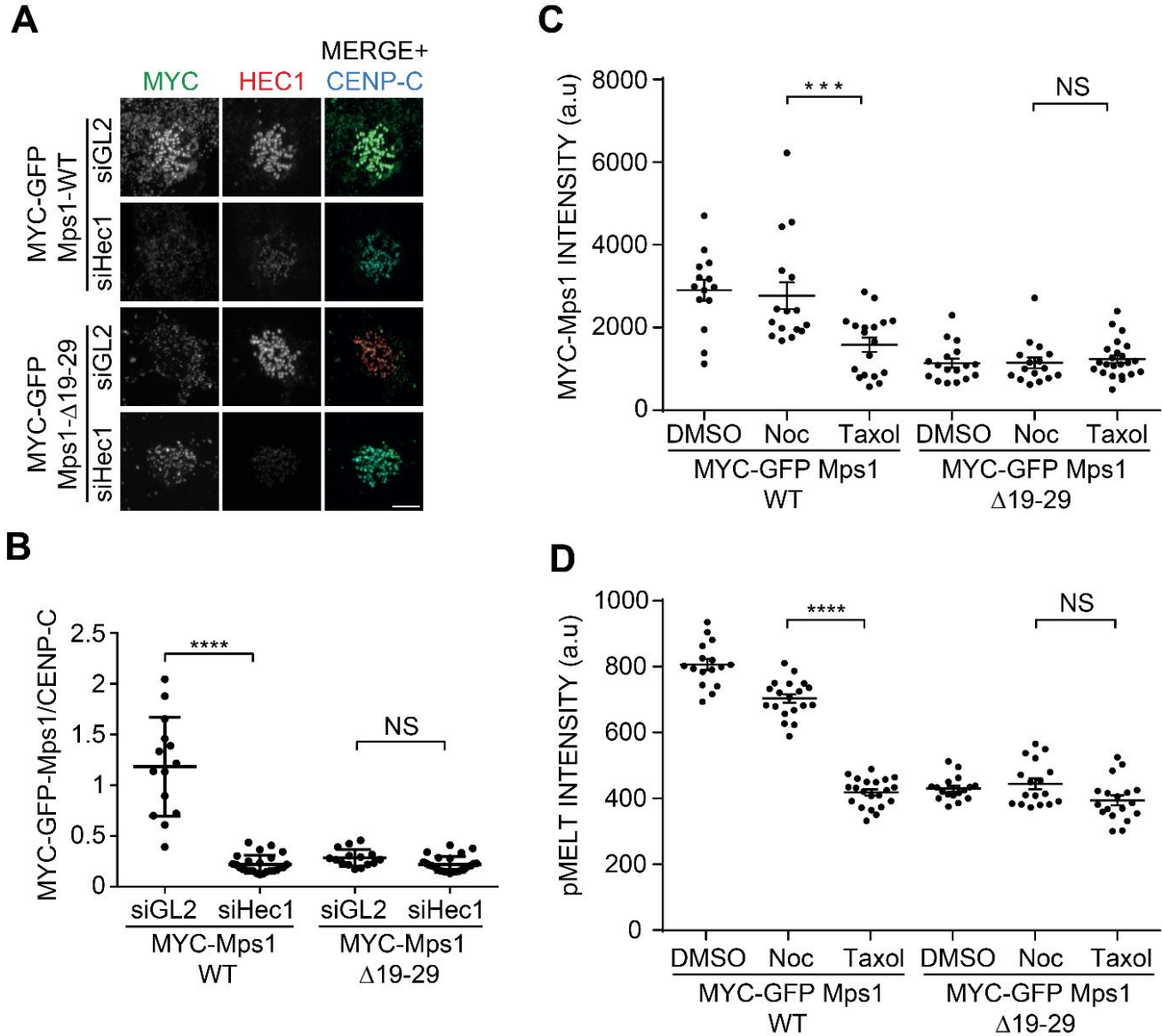


Figure 2.5: MPS1-Δ19-29 is a major determinant of NTE localization to kinetochores

(A) Cells expressing MYC-GFP-MPS1 WT and MPS1-Δ19-29 were depleted of endogenous HEC1 were synchronized in mitosis after release from a thymidine arrest. Cells were immunostained against MYC (Green), HEC1 (Red), CENP-C (Cyan) and DNA were visualized with Hoechst (Blue). Scale bar = 5μm. **(B)** The graph shows the quantification of the MYC-GFP-MPS1/CENP-C ratio of the IF in (A). **** $P = 0.0001$. **(C)** HeLa T-rex cells lines expressing MYC-GFP MPS1 WT and Δ19-29. Cells depleted of endogenous MPS1 were fixed with PTEMF in mitosis after treatment with 3.3μM

nocodazole, 0.2 μ M taxol or DMSO. Cells were immunostained for MYC (Green), pMELT (Red), CREST (Cyan) and Hoechst (Blue). The graph show quantification of the MYC-MPS1 signal. **(D)** Cells treated as in C. The graph shows quantification of the pMELT signal in immunofluorescence. *** $P = 0.001$, **** $P = 0.0001$.

In agreement with previous reports (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015), we find that N-MPS1 Δ NTE is unable to interact with the CH domain of HEC1, whereas a strong direct interaction is observed with the WT protein. Surprisingly, we found that much like N-MPS1^{WT}, N-MPS1 Δ 19-29 bound effectively to the immobilized GST-HEC1^{CH}, as did the control N-MPS1 Δ 40-49 protein (Fig. 2.6A). We observe similar effects in HEC1^{CH} pull-downs from the full-length WT and mutant MPS1 proteins exogenously expressed in 293T cells (Fig. 2.6B). This data indicates that the 19-29 region of the MPS1 NTE is not strictly required for association of MPS1 with HEC1.

An alternative explanation for the poor localization of MPS1- Δ 19-29 to kinetochores is that this mutant may modulate binding to another factor required for MPS1 localization such as the RhoGEF TEM4 (Isokane et al., 2016). TEM4 is an MPS1 binding partner and substrate in mitosis and has been proposed to serve as a targeting factor for MPS1 at kinetochores. The interaction of MPS1 with TEM4 occurs through the TEM4 middle region (TEM4- Δ NC) independently of its RhoGEF activity ((Isokane et al., 2016) and Fig. 2.6C,D). As TEM4 docks at kinetochores, we initially considered the possibility that TEM4 may directly associate with the HEC1 CH domain, but we were unable to identify such an interaction (Fig. S8B). We considered the possibility that the 19-29 motif may be required for the interaction with TEM4. To test this, we co-transfected various MYC-GFP-MPS1 constructs and Flag-TEM4- Δ NC into HEK293T cells and tested the interaction by co-immunoprecipitation. Surprisingly, while MPS1-WT immunoprecipitated efficiently with Flag-TEM4- Δ NC, MPS1- Δ NTE and MPS1- Δ 19-29 both interacted more efficiently (Fig 2.6C). Identical results were observed in reciprocal immunoprecipitations (Fig. 2.6D). Taken together, these results establish that while the 19-29 region is not strictly required for interaction with the HEC1 CH domain. Rather, it is necessary for attenuating the interaction

between MPS1 and TEM4 which may then allow for timely MPS1 localization at kinetochores.

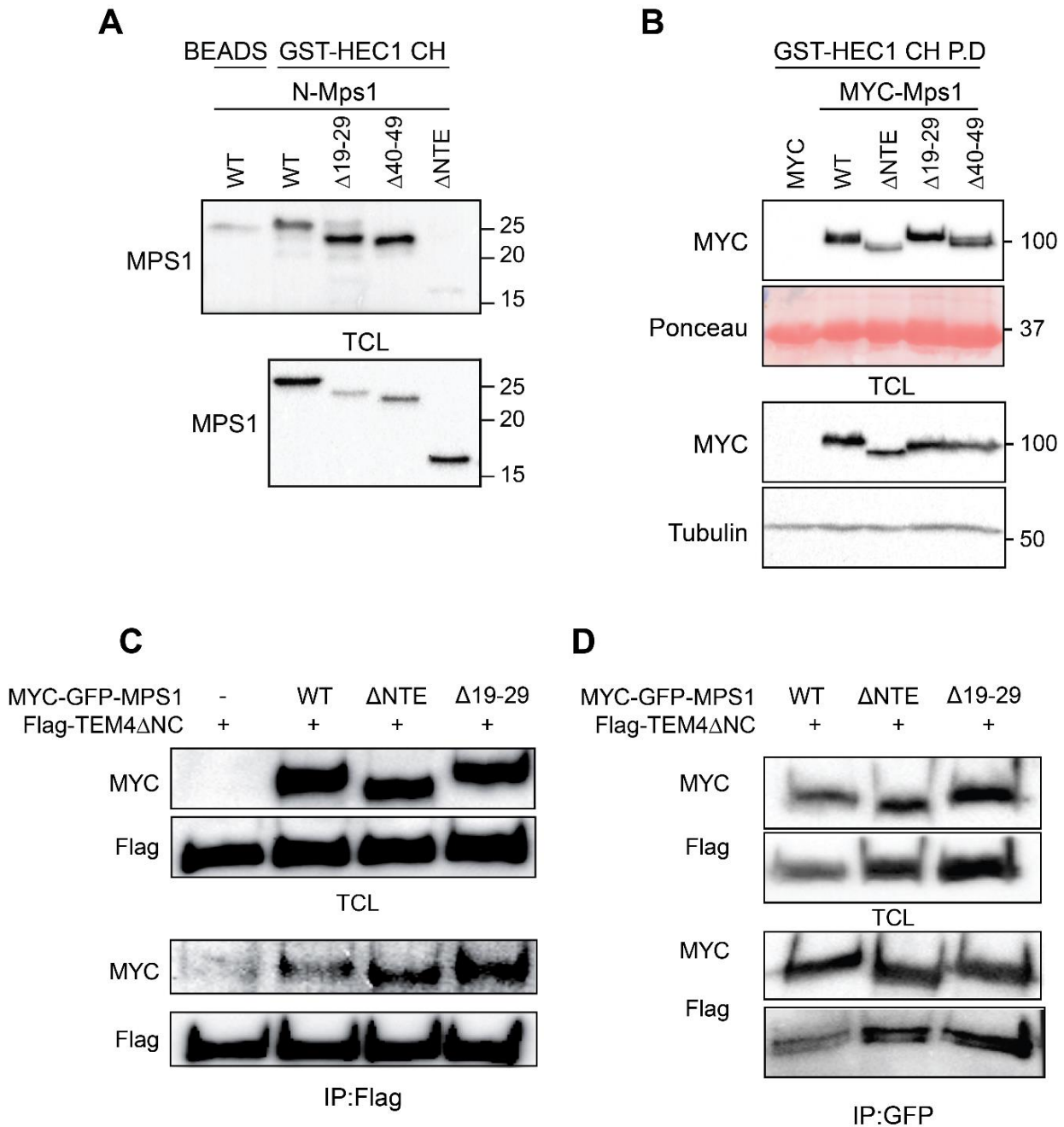


Figure 2.6: MPS1 residues 19-29 inhibit kinetochore docking through increased affinity to TEM4

(A) In vitro pull-down of MPS1 N-Terminal fragments with HEC1 CH domain. GST-tagged HEC1 CH domain (bait) and untagged MPS1 fragments (1-239, 1-210 $\Delta 19-29$, 1-210 $\Delta 40-49$, 55-210) were precipitated using Glutathione Sepharose beads bound to the GST-HEC1 CH domain protein (5 μ l, see supplemental S8A). Input and precipitates were

resolved by SDS-PAGE and the bound fraction of MPS1 was visualized by MPS1 Western blotting. **(B)** In vitro pull-down of full-length MPS1 proteins by HEC1 CH domain. GST-tagged HEC1 CH domain (bait) and the indicated MYC-MPS1 proteins were precipitated using Glutathione Sepharose beads bound to the GST-HEC1 CH domain protein. Samples were treated as in A. Tubulin was used as loading control for the input and Ponceau S staining was used as loading control for beads bound to the GST-HEC1 CH domain. **(C)** 293T cells were transiently co-transfected with the indicated MYC-GFP-MPS1 constructs and Flag-TEM4 Δ NC. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment and Flag-TEM4 Δ NC was immunoprecipitated from equalized lysates. Total cell lysates and immunoprecipitates were blotted for MYC and Flag. **(D)** Cells and samples were treated as in C, but samples were reciprocally immunoprecipitated with GFP nanobeads.

Effects of MPS1 N-terminal mutants on SAC signaling and chromosome congression

We next sought to determine the effects of the individual MPS1 NTE motifs on the functions of MPS1 during mitosis in the Hela T-Rex stable cell lines generated above, and in the absence of the endogenous protein. In particular, we focused on the effect of the separation of function mutants (Δ 19-29 and Δ 40-49) on the SAC, mitotic timing, and on chromosome congression.

As a first test for SAC signaling, we examined MELT motif phosphorylation by immunofluorescence (Fig. 2.7A). MPS1-WT expressing cells demonstrated robust pMELT signals in immunofluorescence, whereas as expected cells expressing MPS1-KD and MPS1- Δ NTE exhibited significantly lower pMELT signals, in agreement with previous results (Fig. 2.7A). MPS1- Δ 19-29 and MPS1- Δ 40-49 expressing cells also exhibited a significant decrease of MELT motif phosphorylation compared to MPS1-WT (Fig. 2.7A) suggesting that these MPS1 mutants generate attenuated SAC signals. MELT phosphorylation initiates the signaling cascade that ultimately results in the accumulation of MAD2 at kinetochores. We thus determined the levels of O-MAD2 recruited to kinetochores using a monoclonal antibody specific to this which confirmed that MPS1- Δ 19-29 and MPS1- Δ 40-49 both result in significantly reduced O-MAD2 recruitment (Fig. 2.7B, (Hewitt et al., 2010; Kwiatkowski et al., 2010; Liu et al., 2003; Martin-Lluesma et al., 2002; Tighe et al., 2008; Xu et al., 2009)). Finally, we measured the ability of the MPS1 NTE mutants to induce mitotic arrest in the presence of nocodazole (mitotic index) and found that both MPS1- Δ 19-29 and MPS1- Δ 40-49 expressing cells induced a significantly lower mitotic arrest when

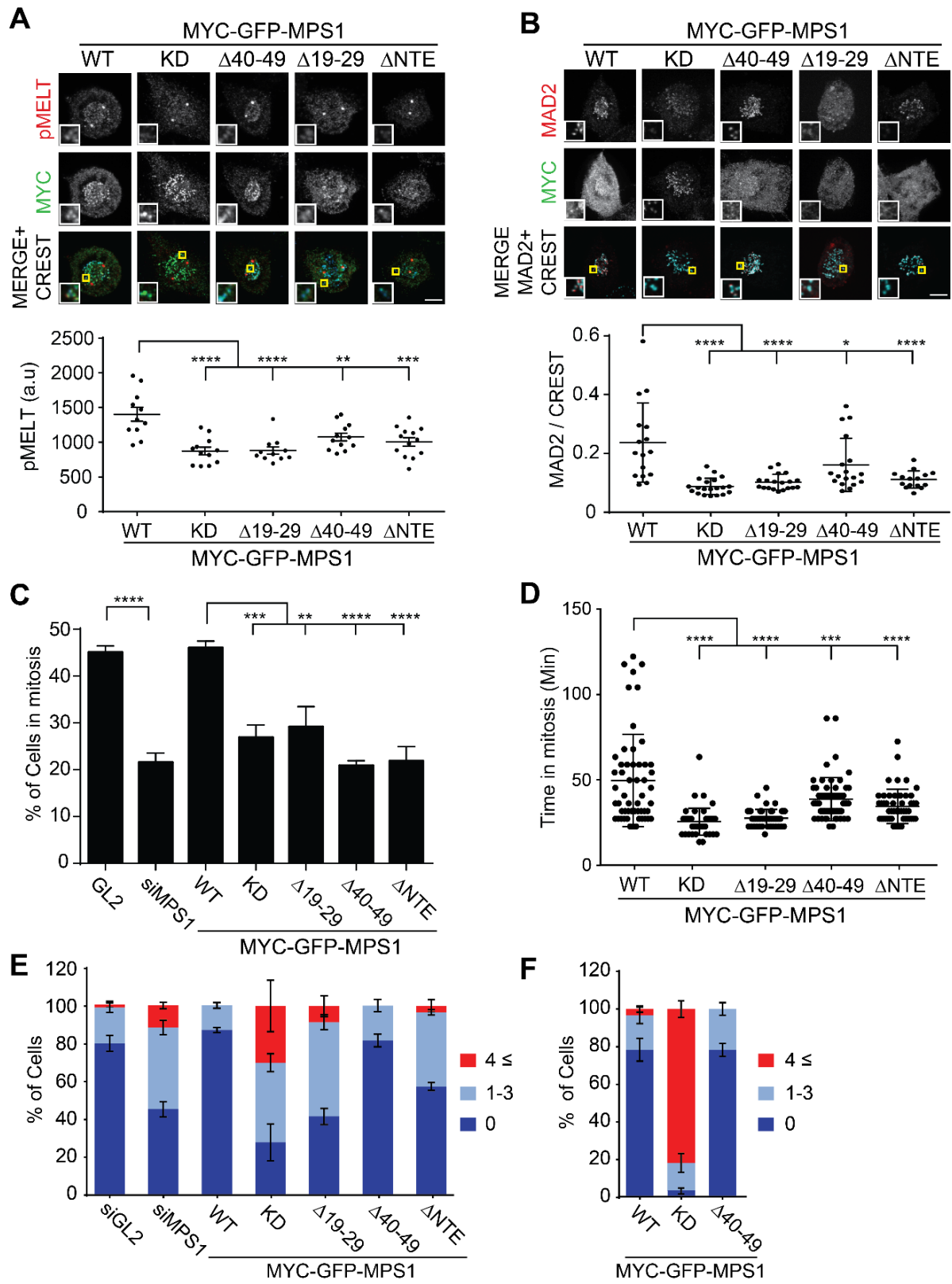


Figure 2.7: Effects of MPS1 N-terminal mutants on SAC signaling and chromosome congression MPS1

(A and B) HeLa T-rex stable cell lines expressing MYC-GFP MPS1 WT and mutants KD, Δ 19-29, Δ 40-49, Δ NTE were treated with siMPS1 to deplete endogenous protein, were synchronized in mitosis after release from a thymidine arrest before fixation. Cells were immunostained against pMELT (Red) for (A) and MAD2 (Red) for (B), MYC (Green), CREST (Cyan) and DNA was visualized by Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. The graph shows the quantification of the pMELT intensity for (A) and the MAD2/CREST ratio of the IF for (B). **(C)** Cells were treated as in A but fixed after overnight nocodazole treatment. The percentage mitotic GFP-MPS1 expressing cells was then counted. The graph represents 3 independent experiments of the mitotic index. A minimum of 100 cells was counted per cell lines per experiment. **(D)** Mitotic progression of HeLa-T-rex expressing GFP-MPS1 WT and mutants as indicated was monitored by time-lapse microscopy. Quantification of the mitotic timing — from nuclear envelope breakdown to anaphase onset. A minimum of 50 expressing cells was counted for each condition. N=2. **(E)** Cells were treated as in A and the numbers of lagging chromosomes in anaphase cells were determined by crest staining. The severity of the phenotype was classified according to the number of lagging chromosomes as indicated. The graph shows the means of three independent experiments, and for each experiment, 30 cells were counted for each condition. **(F)** Cells were treated as in (E) with the addition of nocodazole (7.5ng/ml) upon thymidine release. * p = 0.05, ** p = 0.01, *** p = 0.001, **** p = 0.0001.

compared to MPS1-WT in the presence of nocodazole (Fig. 2.7C). Thus both 19-29 and 40-49 NTE motifs are required for full SAC function.

We next used live cell imaging determine the duration of mitosis in our stable cells lines. As controls, we used the parental HeLa T-rex cell line treated with siGL2 and siMPS1. The duration of division as defined by the time interval between nuclear envelope breakdown and anaphase onset considerably decreased from an average of 40.8 ± 2.09 mins for siGL2 treated cells to $26.32 \pm 0,94$ mins ($p < 0.0001$ one-way analysis of variance (ANOVA)) in MPS1-depleted cells in agreement with previous literature (Fig. S9) (Dou et al., 2015; Jelluma et al., 2008b; Tighe et al., 2008). MYC-GFP MPS1 WT rescued the duration of mitosis with an average time of 43.78 ± 3.25 mins, whereas MPS1 KD did not rescue the phenotype at all with an average of $22,51 \pm 0,9699$ mins ($p < 0.0001$, ANOVA), as expected (Fig. 2.7D). MPS1- Δ 19-29 and MPS1- Δ NTE expressing cells also demonstrated a significant decrease in mitotic duration at 24.32 ± 0.63 mins and 30.40 ± 1.25 mins, respectively ($p < 0.0001$, ANOVA). Although MPS1- Δ 40-49 expressing cells completed mitosis at a significantly faster rate than MPS1-WT expressing cells, this effect was not as pronounced as

that observed with the other NTE mutants (34.21 ± 1.46 mins ($p < 0.001$, ANOVA)).

MPS1 kinase activity and localization promote proper kinetochore-microtubule interactions and chromosome congression (Hewitt et al., 2010; Jelluma et al., 2008b; Maciejowski et al., 2010; Santaguida et al., 2010; Tighe et al., 2008). To examine the role of the NTE mutants in this process, we determined the extent of lagging chromosomes in anaphase (Fig. 2.7E). As expected, the lagging chromosomes were most pronounced in cells expressing MPS1-KD with approximately 60% of the cells displaying lagging chromosomes including approximately 30% that had more than 4 lagging chromosomes. Cells expressing MPS1- Δ 19-29 and - Δ NTE displayed lagging chromosomes in approximately 58% and 43% of cells respectively ($P < 0.0001$ and $P < 0.001$ compared to MPS1-WT, 2-way ANOVA). In contrast, MPS1- Δ 40-49 expressing cells showed no apparent increase in lagging chromosomes ($P > 0.9999$, 2-way ANOVA), even in the presence of low doses of nocodazole to induce spindle stress (Fig 2.7F). Collectively, these observations show that while the MPS1 19-29 region (which controls localization) is essential for both SAC and chromosome segregation, the 40-49 region (which is required for optimal kinase activity) appears to be more important for the SAC function than for chromosome segregation.

Discussion

MPS1 is one of the major kinases involved in the spindle assembly checkpoint and several of its substrates in mitosis are known, but the regulation of MPS1 activity itself and its localization are poorly understood.

Regulation of the localization by the NTE

Here we confirm that deletion of the NTE region of MPS1 abolishes its localization to the kinetochore. Knowing that MPS1 activity is important for its localization (Jelluma et al., 2010) and that its inhibition decreases its turnover at the kinetochore leading to an increase of localization, we used the MPS1 inhibitor reversine to rule out the effect MPS1 activity on localization. The MPS1- Δ NTE mutant exhibited no changes in its localization following reversine treatment confirming the importance of this region for a direct role in MPS1 localization (Fig. 2.1B). NTE implication in localization has already been demonstrated (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015; Nijenhuis et al., 2013), but we went further in the study of the NTE and identified a smaller region essential for MPS1 localization to the kinetochore, the 19-29 region (Fig. 2.5A). This region, well conserved and globally positively charged as a result of a number of basic residues, could potentially create an interaction interface with HEC1 protein, which has been shown to be involved in MPS1 localization to the kinetochore (Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015; Martin-Lluesma et al., 2002; Nijenhuis et al., 2013; Zhu et al., 2013).

In agreement with the literature, we were able to determine that the requirement of the 19-29 region of MPS1 is likely dependent on HEC1 and the NDC80 complex (Fig. 2.5B). As reported by the Yu Lab (Ji et al., 2015), MPS1 recruitment at kinetochores is sensitive to microtubules attachment status. With different microtubule poison treatments as shown in figures 2.5C and 2.5D, we were able to show that the 19-29 fragment of MPS1 may play a role in sensing the attachment of kinetochore to microtubules. Following these clues, we decided to test by pull-down experiments if this region was directly involved in

the MPS1 N-Terminal region/HEC1 CH Domain interaction. Surprisingly, we found that the MPS1 fragment deleted of the 19-29 region bound more effectively to the GST-CH domain of HEC1 than the complete N-Terminal MPS1 fragment (Fig. 2.6A). One reason that could explain why the mutant binds better to the CH domain of HEC1 is that the recombinant MPS1 mutant is monomeric in solution rather than dimeric for the WT MPS1 fragment. Analytical ultracentrifugation (AUC) experiment of this MPS1 1-210 Δ 19-29 fragment was done and showed a predominantly monomeric state (Data not shown). We also tried the pull-down experiment with the full-length MPS1 proteins expressed in cells (Fig. 2.6B) and we observed similar results with a better binding of MPS1 Δ 19-29 mutant to GST-HEC1 CH Domain. Collectively, these data support the idea that the 19-29 region alone is not sufficient for CH domain binding.

TEM4 protein is involved in the control of the localization of MPS1 to the kinetochore (Isokane et al., 2016). We determined whether the 19-29 region could be involved in the interaction of MPS1 with TEM4. Our co-immunoprecipitation experiments (Fig. 2.6C and 6D) uncover a new function for the 19-29 region, which is to attenuate the interaction between MPS1 and TEM4. By attenuating this interaction, the 19-29 region may participate in a mechanism which regulates MPS1 localization at the kinetochores. Additional studies need to be done to further characterize this new regulatory mechanism.

MPS1 clustering is essential for activity

With the deletion of the NTE of MPS1, we observed a decrease in the autophosphorylation and the mitotic hyperphosphorylation of the protein compared to the MPS1 WT (Fig. 2.1C and S2). Due to the loss of localization when NTE is removed, we wondered whether the decrease in MPS1 activity was the consequence of the loss of localization at the kinetochore. To test this, we forced localization to the kinetochore by adding the Mis12 fusion protein to the NTE deleted mutant (Fig. 2.2E and S3A). We observed the restoration of MPS1 activity to WT levels which raises two possible explanations; one in which there is an effect of the kinetochore environment on MPS1 activity, the other in which

an accumulation of the protein at the same location promotes MPS1 dimerization/oligomerization. MPS1 dimerization has been suggested to be critical for MPS1 functions in mitotic checkpoint signaling (Hewitt et al., 2010; Jelluma et al., 2010) and supported by a study of the N-Terminal region of MPS1 which demonstrates by analytical gel filtration chromatography that the fragment NTE+TPR associates in aqueous solution to form homodimers (Lee et al., 2012). Indeed, MPS1 accumulation could promote its activity. The relocation and forced accumulation of the MPS1 NTE-deleted mutant outside the kinetochore (Fig.2.2A and 2B) indicate that the clustering of MPS1 is a major determinant of MPS1 activity, at least during mitosis (Fig. 2.2B, C). Forced dimerization of the NTE-deleted mutant fused to an FKBP protein, where the activity of the mutant was restored to WT levels, confirms these results (Fig. 2.2A). Consequently, MPS1 forced dimerization in the cytoplasm is sufficient to induce its activation. All the data suggest that the NTE is also essential for optimal kinase activation and this likely happens by inducing clustering of MPS1 at the kinetochore.

MPS1 full activation in mitosis

MPS1 is more active in mitosis (Stucke et al., 2002) and when it localizes to kinetochore (Howell et al., 2004). We also looked at the MPS1 pT686 phosphorylation in interphase and we were able to confirm that MPS1 is more active in mitosis (Fig. 2.2D). Also, we noticed that in interphase the rescue of the LacI-MPS1 Δ NTE pT686 signal was lower compared to the LacI-MPS1 WT whereas in mitosis the rescue was complete. This difference could be explained by the requirement of factors or events which occur during interphase through the NTE while in mitosis there are probably additional mechanisms which replace or compensate for this NTE-dependent mechanism to allow MPS1 full activation in mitosis where its function is essential. This is in agreement with the observation that MPS1- Δ NTE does not lose complete activity as measured by the activation loop phosphoantibodies. Interestingly, one such mechanism may be PLK1-mediated phosphorylation of the activation loop (von Schubert et al., 2015).

Regulation of the activity by the NTE

As discussed previously, deletion of the MPS1 NTE causes a decrease in its autophosphorylation and mitotic hyperphosphorylation (Fig. 2.1C and S2). We identified a smaller region essential for MPS1 activation, the 40-49 region as required for MPS1 activity. Results from WB, IF and IVK support the role of the 40-49 region in the full activity of MPS1 (Fig. 2.3B, 2.3C and 2.4A). Surprisingly, the 40-49 region was required in the context of the full-length MPS1. If we remove the entire NTE (Fig. 2.1D and 4A), the requirement for residues 40-49 for full MPS1 activation is voided. This suggests that MPS1 residues 40-49 are required to relieve an auto-inhibition within the NTE itself. To test this, double mutants of the NTE combining the 40-49 deletion and $\Delta 19-29$, $\Delta 7$ and 5A mutations were created. Our results (Fig. 2.4B) show an increase of the activity with the MPS1 $\Delta 40-49+5A$ mutant compared to the MPS1 $\Delta 40-49$ mutant. This rescue of activity led us to conclude that phosphorylation at multiple sites in the NTE between residues 30 and 50 are required for proper MPS1 activity. The T33 autophosphorylation site is one of the mutated sites in the 5A mutants so it's tempting to think that this phosphorylation is involved in the mechanism. How this inhibitory region works remain to be determined and further effort need to be done to uncover this mechanism.

New potential phosphorylation sites in the NTE

Mutagenesis in the 40-49 region at the potential phosphorylation sites T45, T46 and S49 was done. The individual mutations didn't demonstrate any effects on MPS1 activity (data not shown) but the combination of the three mutations into alanine contributed to the decrease of MPS1 activity by WB as measured by the MPS1 pT686 antibody. The phosphomimetic MPS1-3E partially restored the activity (Fig. 2.4C). That led us to wonder whether T45, T46 and S49 are autophosphorylation sites or other kinase phosphorylation sites? We tried to answer this question by IVK with MPS1 fragments 1-239 and 1-210 $\Delta 40-49$ as substrates for MPS1 and PLK1 kinases. We observed that PLK1 was unable to phosphorylate an N-terminal MPS1 fragment and we saw a small but

reproducible decrease in MPS1 1-210 Δ 40-49 versus MPS1 1-239 (WT) (data not shown). Thus, the NTE appears to be primarily an MPS1 and not a PLK1 target. Indeed, we chose PLK1 as a candidate to phosphorylate these sites because as it has been demonstrated, PLK1 and MPS1 possess a very similar phosphorylation consensus motif (Dou et al., 2011) and also PLK1 has been shown able to phosphorylate several MPS1 autophosphorylation sites (von Schubert et al., 2015). Further investigation concerning the importance of these phosphorylation sites and clarification of their role in MPS1 activation will be needed. This may be done with the aid of novel phosphospecific antibodies for these sites.

Trans-autophosphorylation in the NTE

Due to the close vicinity of the T33 autophosphorylation site to the 40-49 region, we checked the phosphorylation of this site in the MPS1 Δ 40-49 mutant (Fig. 2.4D) and the MPS1 3A/3E mutants (Fig. 2.4C). Results indicate that this region is not required for the phosphorylation of the T33, suggesting that the T33 is phosphorylated before the activation loop. MPS1 modifies itself in trans by autophosphorylation (Hewitt et al., 2010; Jelluma et al., 2008a; Kang et al., 2007; Mattison et al., 2007). We were able to confirm these data in figure S6 for the autophosphorylation in the kinase domain with the T686 phospho-signal, but, we also demonstrated that this autoactivation occurs in trans in the NTE with the T33 phospho-signal.

Is the 40-49 region involved in the dimerization of MPS1?

Knowing that the NTE is involved in the dimerization/clusterization of MPS1, it could be interesting to test if the diminished phosphorylation in the activation loop observed in the MPS1 mutants of the 40-49 region, i.e. MPS1 Δ 40-49, MPS1 3A and MPS1 3E can be restored by adding the FKBP fusion protein we used in figure 2.2A. This experiment will allow us to know if this region is involved in the dimerization/clusterization of MPS1. To support our data and have a better understanding of the functions and regulation occurring in the NTE, a structure

of N-terminal region of MPS1 in the context of the whole protein could provide important additional insights into the role of this region in MPS1 activation and function.

Model of NTE regulation of MPS1

As a conclusion, we hypothesized a model which summarizes some of our results concerning the role of the NTE in the regulation of MPS1 activity and localization. (Fig. 2.8). In mitosis, MPS1 localizes to the kinetochores through the NTE and the 19-29 region regulates its localization by interacting with the protein TEM4. When MPS1 localizes at the kinetochores, its local concentration increases promoting its clustering which is involved with the NTE region. MPS1 clustering increases its trans-autophosphorylation leading to an increase of its activity. In the NTE, we uncover a new mechanism suggesting that the residues 40-49 region are required to relieve an auto-inhibition within the NTE. It seems that the T33 and surrounding residues are involved in this mechanism of auto-inhibition.

Effects through the course of mitosis

The deletion of the localization module (19-29) and the activity module (40-49) in cells (Fig. 2.7) allow us to separate the functions of localization and activity and verify their effect on MPS1 mitosis functions. First, checking the establishment of SAC by looking at KNL1 MELT phosphorylation and MAD2 recruitment (Fig. 2.7A and 2.7B) allowed us to demonstrate that both localization and full-MPS1 activity are required for a correct SAC organization. Secondly, mitotic index and measurement of mitotic timing by live cell imaging (Fig. 2.7C and 2.7D) confirmed the requirement of both, localization and full activity, for a robust and efficient SAC. Finally, with the counting of lagging

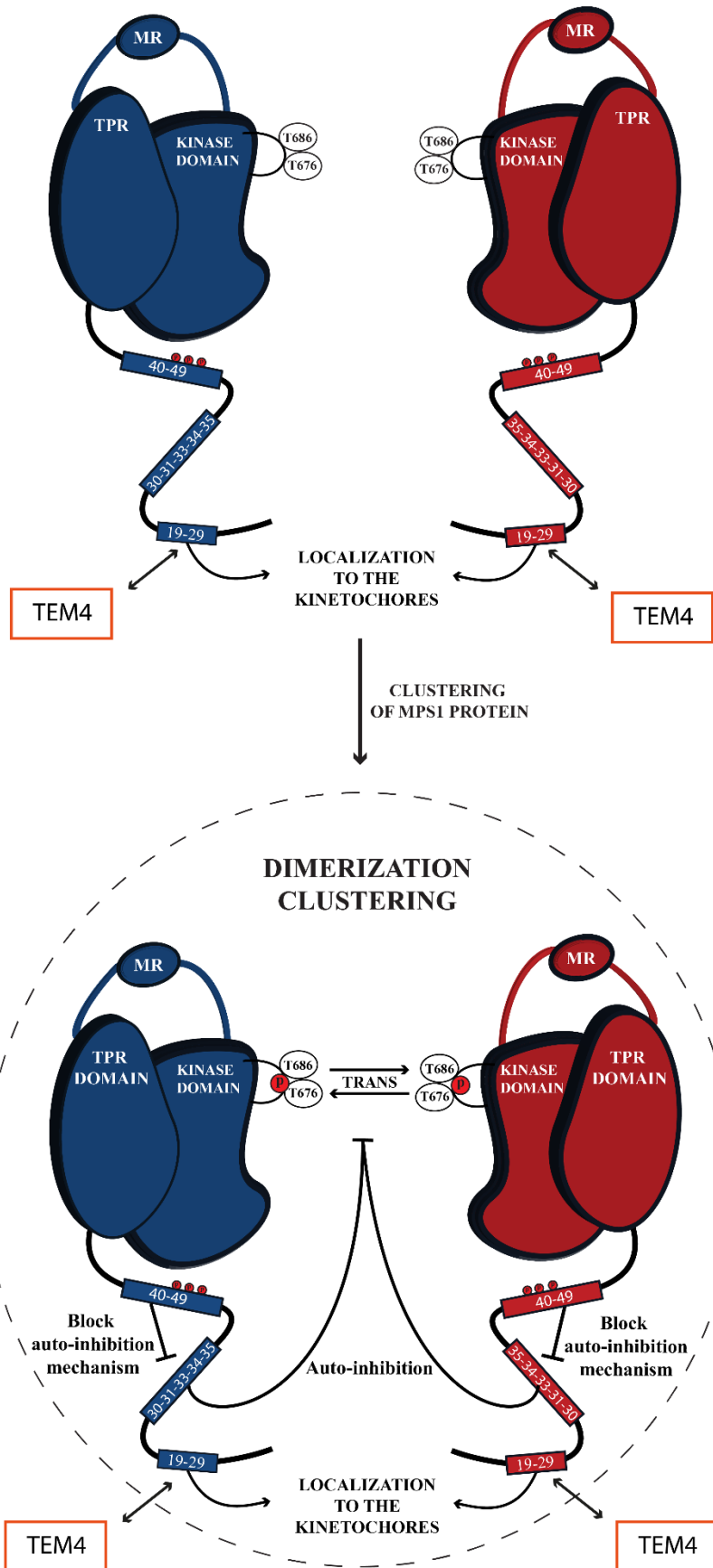


Figure 2.8: MPS1 regulation hypothetical model

MPS1 localizes to the kinetochores through the NTE and 19-29 region regulates this localization by interacting with TEM4. Localization of MPS1 at the kinetochores increase its local concentration promoting its clustering. MPS1 clustering increases autophosphorylation in trans leading to its increased activity. In the NTE, phosphorylation in the 40-49 region and the preceding residues 30-31-33-34-35 is a primary step in MPS1 activation.

chromosomes in anaphase (Fig. 2.7E and 2.7F), we demonstrated that the localization module (19-29 region) is essential for an optimal chromosome segregation whereas the optimal kinase activity module (40-49 region) was dispensable for this function. Partial MPS1 activity seems to be sufficient for chromosomes segregation functions of MPS1. In summary, MPS1 localization is absolutely required for all MPS1 mitotic functions tested and full activity of the protein is necessary for SAC establishment and efficiency.

This study brings new insights concerning the role and the importance of the N-Terminal Extension. MPS1 is one of the potential targets in cancer therapy and several small-molecule inhibitors have been developed in recent years. But problems of resistance and specificity appeared in these kinase domain-targeting inhibitors (Koch et al., 2015). Thus, designing new inhibitors targeting the N-Terminal region, especially the NTE could be an interesting alternative to kinase domain inhibitors.

Material and methods

Cell culture, drugs treatments and transfection

Cell lines

Cell lines were grown at 37°C with 5% CO₂ in DMEM (Hyclone) supplemented with 10% fetal bovine serum or bovine growth serum (PAA) and supplemented with pen/strep (100 µg.ml⁻¹, Hyclone). U2OS cells expressing a 256-copy array of the Tet operator sequences were a gracious gift of David Spector (CSHL) and were maintained in the presence of 100 mg.ml⁻¹ of hygromycin B (Multicell). A HeLa Flip-in T-rex cell line was used for generation of stable isogenic cell lines and was a generous gift from Arshad Desai (Ludwig cancer research).

Stable cell lines were generated using Flip-In system (Life Technologies). Transfection was done with TransIT®-LT1 (Mirus Bio) reagent according to the manufacturer's instructions. The transfection reagent was mixed with the pOG44 Flp-Recombinase Expression Vector and the pCDNA5/TO/FRT-MPS1 vector with a 1:1 ratio in OptiMEM media. Selection started 48h after the transfection in a DMEM media supplemented with 10% of bovine growth serum (PAA), pen/strep (100 µg.ml⁻¹, Hyclone) and in the presence of hygromycin B (200 mg.ml⁻¹) and Blastidicin (10 µg.ml⁻¹, Gibco by Life technologies). Media was replaced 3 times a week for 3 weeks and then single colonies were picked and grown separately. Expression of the MPS1 construct was then tested by IF and WB after 24h of tetracycline treatment.

Drug treatments and transfections

Drugs treatments were realized as follows unless otherwise indicated: nocodazole (Sigma, as indicated, 16h), thymidine (Acros Organics, 2mM for 16 h), reversine (Sigma, 0.5µM for 30min), taxol (Calbiochem, 0.2µM, 16h). For experiments with stable cell lines, 24h before harvesting cells, 1µg/ml of tetracycline was added to express the protein of interest. Plasmid transfections were performed with PEI (polyethyleneimine) at a 15:2 (PEI/DNA) ratio for HEK 293T cells and with TransIT® (Mirus Bio) for HeLa S3 cells according to the

manufacturer's instructions. Endogenous protein depletion was carried out with DsiRNAs (IDT), using Oligofectamine™ (Invitrogen) for HEK 293T cells and Hela S3 or JetPRIME® (Polyplus) for stable cell line Hela Flip-in Trex and analyzed at 48-72h after transfection. The MPS1 and HEC1 DsiRNA targets the following sequence:

MPS1 A: 5'-GUAGAUUCCACAGGGAUUCAAGAGUA- 3'

MPS1 B: 5'-AUACAGUGCCAUAAGUGGUUGCUAUUU-3'

HEC1: 5'-CCCUGGGUCGUGUCAGGAAACUGGA-3'

Cloning and mutagenesis

All constructs were generated as indicated in the supplementary data Table 1. Mutagenesis was performed using the QuickChange site-directed mutagenesis. PCRs were generated using Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). For all cloning, enzymes from NEB and from Thermo Scientific for the fast Digest enzyme were used.

Western blotting, protein detection and fractionation

Lysis of cell pellets for immunoblotting and immunoprecipitation was done with RIPA lysis buffer (150mM Tris-HCL pH 7.5, 150mM NaCl, 10mM NaF, 1% NP-40, 0.1% Na-deoxycholate and a protease and phosphatase inhibitor cocktail that included 20mM B-glycerophosphate, 0.1mM sodium vanadate, 10mM sodium pyrophosphate, 1mg.ml⁻¹, leupeptin, 1mg.ml⁻¹, aprotinin and 1mM AEBSF) or Mild lysis buffer (75mM HEPES pH 7.5, 150mM KCl, 1.5mM EGTA, 1.5mM MgCl₂, 10% Glycerol, 0.075% NP-40 and the same protease and phosphatase inhibitor cocktail used in the RIPA buffer). For at least 30min, cells were lysed on an orbital shaker at 4°C and lysates were centrifuged at 14,000 r.p.m for 10min at 4°C. The supernatant was collected and quantified using the BCA assay (Thermo Scientific) for protein concentration. For immunoprecipitation, transfected proteins (3xMyc or 3xMyc-GFP tagged MPS1-WT or mutants) were immunoprecipitated with anti-MYC antibodies bound to agarose beads overnight. Beads with immunoprecipitated MPS1 were washed 3 times with RIPA lysis buffer or Mild Lysis buffer and 1 time with the corresponding buffer supplemented with

150mM of salt (NaCl for RIPA lysis buffer or KCl for Mild lysis buffer). To dissociate immunoprecipitated protein from beads, SDS-PAGE sample buffer was added and followed by 95°C heating for 5 min. After separation on a polyacrylamide gel, proteins were transferred to a PVDF (Polyvinylidene fluoride) membrane with Trans-Blot® Turbo™ Transfer System® (Bio-Rad). Then, the membrane was blocked for 30 min with a solution of TBS-T – Milk 5% (Tris-Buffered Saline – Tween). Primary antibodies were incubated in the same solution and secondary antibodies in a TBS-T Solution. Target proteins were revealed with Enhanced chemiluminescence (ECL) commercial buffer (Thermo scientific) or homemade buffer (100mM Tris-HCl pH 8.5, 90mM coumaric acid, 250mM luminol, H₂O₂ 0.00009% (3µl of H₂O₂ 30% per 10ml of solution)). To reveal membranes, a ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad) or photographic films were used.

In-vitro Kinase Assay

293T cells were transfected as previously described with 3xMyc or 3xMyc-GFP tagged MPS1-WT or mutants. Cells were incubated for 36h, then an additional 16h of incubation with nocodazole was done to synchronize cells in mitosis. Cells were harvested and lysed in RIPA lysis buffer or Mild Lysis buffer. 3xMyc or 3xMyc-GFP tagged MPS1-WT or mutants were immunoprecipitated and washed as described previously. The immunoprecipitates were then subjected to an IVK. Kinase Reaction Buffer (KRB: 50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 µM Na orthovanadate, 10 mM NaF, 200 µM unlabeled ATP, 5 µCi ATP (³²P) and the indicated substrate) was added to the immunoprecipitates and incubated at 30°C for 30 min with agitation. The addition of SDS-PAGE sample buffer stopped the reaction. Samples were heated for 5 min at 95°C, loaded and resolved by SDS-PAGE for protein separation. The acrylamide gel was then stained with Coomassie Brilliant Blue, destained to remove the background, and dried on Whatman paper and visualized by autoradiography.

Recombinant protein production

pGEX-6P3-HEC1 CH domain plasmid was transformed into BL21 competent cells and selected on an ampicillin-treated LB plate. One colony was picked and was seeded in a 10ml tube of LB-ampicillin, overnight at 37°C and 250 rpm. From this pre-culture, a 200ml culture was started at 37°C and 250 rpm until an O.D value of 0.7-0.9. Synthesis of the recombinant protein was started by adding 0.5mM of IPTG (MP biomedical) for 5h at 30°C and 250rpm. Bacteria were then centrifuged at 7700g for 10min at 4°C and washed one time with PBS 1X and frozen. The next day, the pellet was then lysed in Lysis buffer II ((Ji et al., 2015) 25mM Tris, 100mM NaCl, 5% glycerol, 1mM β -Mercaptoethanol, 0.1% Triton-X-100, 20mM B-glycerophosphate, 10mM Na-pyrophosphate, 100mM Na-Vanadate, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 1mM AEBSF, pH=8). After sonication (3 rounds of 30 seconds each at 10% amplitude, waiting for 0.5s between pulses and 1min on ice between rounds) and 30min incubation on ice, the lysate was centrifuged for 10min at 4°C and 13000 rpm. The supernatant was incubated on an orbital shaker for 2h at 4°C with glutathione/Sepharose beads and then washed 2 times with lysis buffer, 1 time with TBS 1X and 1 time with GTB buffer (80mM PIPES pH=7, 2mM MgCl₂, 0.5mM EGTA). 50% of glycerol was added and the beads were frozen.

Protein-binding assays

For HEC1 CH domain pull-down assays, empty beads or beads bound to GST-HEC1 CH Domain were incubated for 1h with end-on mixing in GTB buffer containing 5% glycerol and 1mg/ml of BSA. Beads were washed once and recombinant MPS1 protein fragments were added to the beads in GTB buffer supplemented with 5% glycerol, 1mg/ml of BSA and 250mM NaCl. The mix was incubated for a minimum of 2h or overnight on an orbital shaker at 4°C. Then, the beads were washed 4 times with the supplemented GTB buffer. SDS-PAGE sample buffer was added and samples were heated to 95°C for 5min. After separation on an acrylamide gel, proteins were transferred to PVDF membrane and western blot was done as described in the 1.3 Western blotting section.

Immunofluorescence and antibodies

Cells were grown on coverslips and arrested in mitosis either by nocodazole (330nM) or by 10–12 h release from thymidine block. For experiments with Hela Flip-in T-rex cells expressing MPS1 stably, cells were grown on coverslips coated with a solution of PEI 25µg/ml and 150mM NaCl. Cells were fixed in PTEMF buffer (0.2% Triton X-100, 20mM PIPES pH 6.8, 1mM MgCl₂, 10mM EGTA and 4% formaldehyde) for 10min or an MPS1-specific fixation (5 min incubation with 1% formaldehyde in PBS, followed by 0.1M glycine treatment as a quencher for 1h and 0.1% triton X-100 for 3 min to permeabilize cells) when visualizing MPS1. Before starting immunofluorescence, coverslips were incubated for at least 30 min with 3%BSA in PBS-T 0.2%. Coverslips were incubated with primary and secondary antibodies for 2h and 1h respectively at room temperature, except for MPS1 pT686 and KNL1 pT875, which were incubated at 4°C overnight in humidified chambers.

Antibodies were used at 1 µg.ml⁻¹, unless otherwise indicated, as follows: anti-MYC (9E10, Thermo Scientific), anti-KNL1 pT875 (1:2000, gift from Dr Yoshinori Watanabe, University of Tokyo), anti-MPS1 (1mg.ml⁻¹ for WB and 5 mg.ml⁻¹ for IF, Sigma), Rabbit polyclonal phosphospecific antibodies against MPS1 T686, T676 and S821, Rabbit polyclonal phosphospecific antibody against MPS1 T33 (1:500) was generated against phosphopeptide CKNEDL(pT)DELS, anti MAD2 (4µg/ml, Fava et al 2011 (Fava et al., 2011)) anti-GFP (1:500, Roche), anti-α-tubulin (DM1A, Santa Cruz), CENP-C (used at 1:1000, MBL), CREST anti-centromere serum (1:1000, Immunovision). To stain chromosomes, we used HOESCHT 33342 (Sigma).

Dylight series secondary antibodies (Thermo) or (Jackson ImmunoResearch) were used for immunofluorescence (1:1000) and horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used for western blotting (1:10000).

Microscopy and live cell imaging:

All images were acquired by confocal microscopy on an inverted Olympus IX80 microscope equipped with a WaveFX-Borealin-SC Yokagawa spinning disc (Quorum Technologies) and an Orca Flash4.0 camera (Hamamatsu). Metamorph software (Molecular Devices) was used to perform image acquisition. Optical sections were acquired with identical exposure times for each channel within an experiment and then projected into a single picture using ImageJ (rsb.info.nih.gov). For Image processing Image J or Photoshop were used and all images shown in the same figure have been identically scaled.

Live cell imaging was performed on the above-indicated microscopy system that is also equipped with a motorized stage (ASI) and an incubator with atmospheric CO₂ heated to 37°C. MPS1 stable cell lines were subjected to depletion of endogenous MPS1 for 72 hours, then synchronized in mitosis after a further 16h block with thymidine. Image acquisition was started 7h after release. Only cells visibly expressing the GFP-tagged MPS1 were included in subsequent analysis.

Quantification and statistical analysis.

Unless otherwise stated, all experiments were performed in triplicate. Image quantification was realized using Image J. For measurement of signal intensities at kinetochores, the CREST, CENP-C or MYC signal were used to generate a binary mask to include kinetochore and centromere signals. Integrated signal intensity was measured in all relevant channels and intensities indicated are values relative to CREST, CENP-C or MYC, unless otherwise stated. A minimum of ten cells was quantified per condition for all experiments involving kinetochore quantification. All statistical analysis was performed with Sigmaplot. Data are expressed as means \pm s.e.m. The data were analyzed by ANOVA (one or two way) with Bonferroni's multiple comparison tests for determination of the significance of the differences or as otherwise indicated. Statistical significance was considered with a P-value of <0.05. The symbols * were used in the different

graphics to represent the P-value: *P=0.05, ** P=0.01, *** P=0.001, ****
P=0.0001.

Bibliography

- Araki, Y., L. Gombos, S.P. Migueleti, L. Sivashanmugam, C. Antony, and E. Schiebel. 2010. N-terminal regions of MPS1 kinase determine functional bifurcation. *The Journal of cell biology*. 189:41-56.
- Aravamudhan, P., R. Chen, B. Roy, J. Sim, and A.P. Joglekar. 2016. Dual mechanisms regulate the recruitment of spindle assembly checkpoint proteins to the budding yeast kinetochore. *Molecular biology of the cell*. 27:3405-3417.
- Chmielewska, A.E., N.H. Tang, and T. Toda. 2016. The hairpin region of Ndc80 is important for the kinetochore recruitment of Mph1/MPS1 in fission yeast. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 15:740-747.
- Dou, Z., X. Liu, W. Wang, T. Zhu, X. Wang, L. Xu, A. Abrieu, C. Fu, D.L. Hill, and X. Yao. 2015. Dynamic localization of MPS1 kinase to kinetochores is essential for accurate spindle microtubule attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:E4546-4555.
- Dou, Z., C. von Schubert, R. Korner, A. Santamaria, S. Elowe, and E.A. Nigg. 2011. Quantitative mass spectrometry analysis reveals similar substrate consensus motif for human MPS1 kinase and PLK1. *PLoS one*. 6:e18793.
- Etemad, B., and G.J. Kops. 2016. Attachment issues: kinetochore transformations and spindle checkpoint silencing. *Curr Opin Cell Biol*. 39:101-108.
- Faesen, A.C., M. Thanasoula, S. Maffini, C. Breit, F. Muller, S. van Gerwen, T. Bange, and A. Musacchio. 2017. Basis of catalytic assembly of the mitotic checkpoint complex. *Nature*.
- Fava, L.L., M. Kaulich, E.A. Nigg, and A. Santamaria. 2011. Probing the in vivo function of Mad1:C-Mad2 in the spindle assembly checkpoint. *EMBO J*. 30:3322-3336.
- Hervas-Aguilar, A., and J.B. Millar. 2016. Mph1/MPS1 checks in at the kinetochore. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 15:1313-1314.
- Hewitt, L., A. Tighe, S. Santaguida, A.M. White, C.D. Jones, A. Musacchio, S. Green, and S.S. Taylor. 2010. Sustained MPS1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *The Journal of cell biology*. 190:25-34.
- Hiruma, Y., C. Sacristan, S.T. Pachis, A. Adamopoulos, T. Kuijt, M. Ubbink, E. von Castelmur, A. Perrakis, and G.J. Kops. 2015. CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science (New York, N.Y.)*. 348:1264-1267.
- Howell, B.J., B. Moree, E.M. Farrar, S. Stewart, G. Fang, and E.D. Salmon. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Current biology : CB*. 14:953-964.
- Isokane, M., T. Walter, R. Mahen, B. Nijmeijer, J.K. Heriche, K. Miura, S. Maffini, M.P. Ivanov, T.S. Kitajima, J.M. Peters, and J. Ellenberg. 2016. ARHGEF17 is an essential spindle assembly checkpoint factor that targets MPS1 to kinetochores. *The Journal of cell biology*. 212:647-659.
- Janicki, S.M., T. Tsukamoto, S.E. Salghetti, W.P. Tansey, R. Sachidanandam, K.V. Prasanth, T. Ried, Y. Shav-Tal, E. Bertrand, R.H. Singer, and D.L. Spector. 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*. 116:683-698.
- Jelluma, N., A.B. Brenkman, I. McLeod, J.R. Yates, 3rd, D.W. Cleveland, R.H. Medema, and G.J. Kops. 2008a. Chromosomal instability by inefficient MPS1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS one*. 3:e2415.

- Jelluma, N., A.B. Brenkman, N.J. van den Broek, C.W. Cruijssen, M.H. van Osch, S.M. Lens, R.H. Medema, and G.J. Kops. 2008b. MPS1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*. 132:233-246.
- Jelluma, N., T.B. Dansen, T. Sliedrecht, N.P. Kwiatkowski, and G.J. Kops. 2010. Release of MPS1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset. *The Journal of cell biology*. 191:281-290.
- Ji, Z., H. Gao, L. Jia, B. Li, and H. Yu. 2017. A sequential multi-target MPS1 phosphorylation cascade promotes spindle checkpoint signaling. *Elife*. 6.
- Ji, Z., H. Gao, and H. Yu. 2015. CELL DIVISION CYCLE. Kinetochores attachment sensed by competitive MPS1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science (New York, N.Y.)*. 348:1260-1264.
- Kang, J., Y. Chen, Y. Zhao, and H. Yu. 2007. Autophosphorylation-dependent activation of human MPS1 is required for the spindle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:20232-20237.
- Kim, S., H. Sun, D.R. Tomchick, H. Yu, and X. Luo. 2012. Structure of human Mad1 C-terminal domain reveals its involvement in kinetochores targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:6549-6554.
- Koch, A., A. Maia, A. Janssen, and R.H. Medema. 2015. Molecular basis underlying resistance to MPS1/TTK inhibitors. *Oncogene*. 35:2518-2528.
- Krenn, V., K. Overlack, I. Primorac, S. van Gerwen, and A. Musacchio. 2014. KI motifs of human Knl1 enhance assembly of comprehensive spindle checkpoint complexes around MELT repeats. *Current biology : CB*. 24:29-39.
- Kwiatkowski, N., N. Jelluma, P. Filippakopoulos, M. Soundararajan, M.S. Manak, M. Kwon, H.G. Choi, T. Sim, Q.L. Deveraux, S. Rottmann, D. Pellman, J.V. Shah, G.J. Kops, S. Knapp, and N.S. Gray. 2010. Small-molecule kinase inhibitors provide insight into MPS1 cell cycle function. *Nature chemical biology*. 6:359-368.
- Lee, S., P. Thebault, L. Freschi, S. Beaufils, T.L. Blundell, C.R. Landry, V.M. Bolanos-Garcia, and S. Elowe. 2012. Characterization of spindle checkpoint kinase MPS1 reveals domain with functional and structural similarities to tetratricopeptide repeat motifs of Bub1 and BubR1 checkpoint kinases. *The Journal of biological chemistry*. 287:5988-6001.
- Liu, S.T., G.K. Chan, J.C. Hittle, G. Fujii, E. Lees, and T.J. Yen. 2003. Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. *Molecular biology of the cell*. 14:1638-1651.
- Liu, X., and M. Winey. 2012. The MPS1 family of protein kinases. *Annu Rev Biochem*. 81:561-585.
- London, N., and S. Biggins. 2014. Mad1 kinetochores recruitment by MPS1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes & development*. 28:140-152.
- London, N., S. Ceto, J.A. Ranish, and S. Biggins. 2012. Phosphoregulation of Spc105 by MPS1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Current biology : CB*. 22:900-906.
- Maciejowski, J., K.A. George, M.E. Terret, C. Zhang, K.M. Shokat, and P.V. Jallepalli. 2010. MPS1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *The Journal of cell biology*. 190:89-100.
- Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg. 2002. Role of HEC1 in spindle checkpoint signaling and kinetochores recruitment of Mad1/Mad2. *Science (New York, N.Y.)*. 297:2267-2270.
- Mattison, C.P., W.M. Old, E. Steiner, B.J. Huneycutt, K.A. Resing, N.G. Ahn, and M. Winey. 2007. MPS1 activation loop autophosphorylation enhances kinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 282:30553-30561.
- Musacchio, A. 2015. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current biology : CB*. 25:R1002-1018.
- Musacchio, A., and A. Desai. 2017. A Molecular View of Kinetochores Assembly and Function. *Biology (Basel)*. 6.

- Nijenhuis, W., E. von Castelmur, D. Littler, V. De Marco, E. Tromer, M. Vleugel, M.H. van Osch, B. Snel, A. Perrakis, and G.J. Kops. 2013. A TPR domain-containing N-terminal module of MPS1 is required for its kinetochore localization by Aurora B. *The Journal of cell biology*. 201:217-231.
- Primorac, I., J.R. Weir, E. Chirolì, F. Gross, I. Hoffmann, S. van Gerwen, A. Ciliberto, and A. Musacchio. 2013. Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *Elife*. 2:e01030.
- Sacristan, C., and G.J. Kops. 2015. Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol*. 25:21-28.
- Santaguida, S., A. Tighe, A.M. D'Alise, S.S. Taylor, and A. Musacchio. 2010. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *The Journal of cell biology*. 190:73-87.
- Shepperd, L.A., J.C. Meadows, A.M. Sochaj, T.C. Lancaster, J. Zou, G.J. Buttrick, J. Rappsilber, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2012. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Current biology : CB*. 22:891-899.
- Stucke, V.M., H.H. Sillje, L. Arnaud, and E.A. Nigg. 2002. Human MPS1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *The EMBO journal*. 21:1723-1732.
- Thebault, P., D.Y. Chirgadze, Z. Dou, T.L. Blundell, S. Elowe, and V.M. Bolanos-Garcia. 2012. Structural and functional insights into the role of the N-terminal MPS1 TPR domain in the SAC (spindle assembly checkpoint). *The Biochemical journal*. 448:321-328.
- Tighe, A., O. Staples, and S. Taylor. 2008. MPS1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *The Journal of cell biology*. 181:893-901.
- Tipton, A.R., W. Ji, B. Sturt-Gillespie, M.E. Bekier, 2nd, K. Wang, W.R. Taylor, and S.T. Liu. 2013. Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex. *The Journal of biological chemistry*. 288:35149-35158.
- Tyler, R.K., M.L. Chu, H. Johnson, E.A. McKenzie, S.J. Gaskell, and P.A. Evers. 2009. Phosphoregulation of human MPS1 kinase. *The Biochemical journal*. 417:173-181.
- Vleugel, M., M. Omerzu, V. Groenewold, M.A. Hadders, S.M. Lens, and G.J. Kops. 2015. Sequential multisite phospho-regulation of KNL1-BUB3 interfaces at mitotic kinetochores. *Mol Cell*. 57:824-835.
- Vleugel, M., E. Tromer, M. Omerzu, V. Groenewold, W. Nijenhuis, B. Snel, and G.J. Kops. 2013. Arrayed BUB recruitment modules in the kinetochore scaffold KNL1 promote accurate chromosome segregation. *The Journal of cell biology*. 203:943-955.
- von Schubert, C., F. Cubizolles, J.M. Bracher, T. Sliedrecht, G.J. Kops, and E.A. Nigg. 2015. PLK1 and MPS1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells. *Cell Rep*. 12:66-78.
- Wang, W., Y. Yang, Y. Gao, Q. Xu, F. Wang, S. Zhu, W. Old, K. Resing, N. Ahn, M. Lei, and X. Liu. 2009. Structural and mechanistic insights into MPS1 kinase activation. *Journal of cellular and molecular medicine*. 13:1679-1694.
- Xu, Q., S. Zhu, W. Wang, X. Zhang, W. Old, N. Ahn, and X. Liu. 2009. Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by MPS1 phosphorylation. *Molecular biology of the cell*. 20:10-20.
- Yamagishi, Y., C.H. Yang, Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2012. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nature cell biology*. 14:746-752.

- Zhang, G., T. Lischetti, and J. Nilsson. 2014. A minimal number of MELT repeats supports all the functions of KNL1 in chromosome segregation. *Journal of cell science*. 127:871-884.
- Zhu, T., Z. Dou, B. Qin, C. Jin, X. Wang, L. Xu, Z. Wang, L. Zhu, F. Liu, X. Gao, Y. Ke, Z. Wang, F. Aikhionbare, C. Fu, X. Ding, and X. Yao. 2013. Phosphorylation of microtubule-binding protein HEC1 by mitotic kinase Aurora B specifies spindle checkpoint kinase MPS1 signaling at the kinetochore. *The Journal of biological chemistry*. 288:36149-36159.

Supplemental data

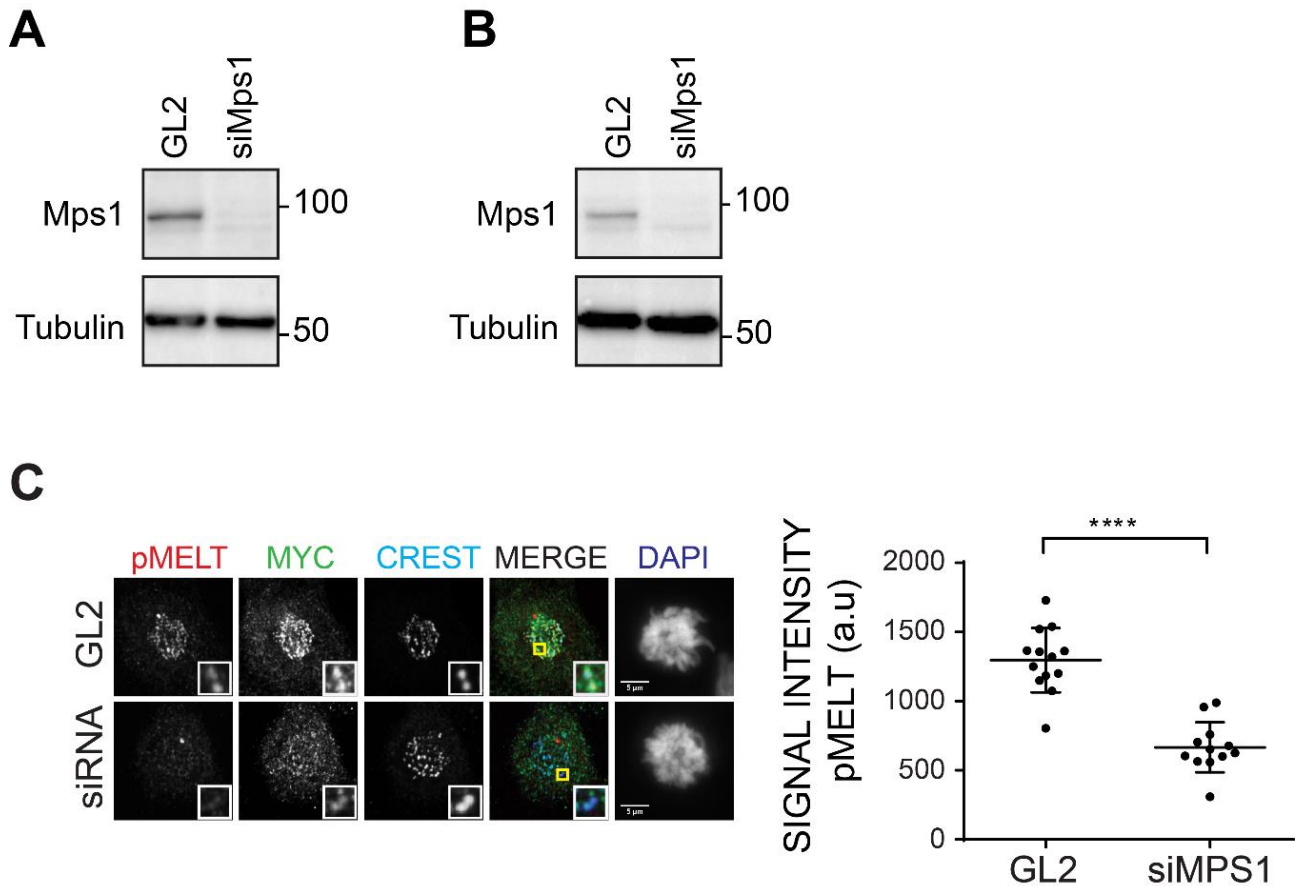


Figure S1: Verification of MPS1 siRNA

siRNA GL2 (75nM) or siRNA MPS1-A(25nM)+MPS1-B(50nM) were transfected in HeLaS3 **(A)** and HeLa Trex **(B)** cell lines. Cells were enriched in mitosis by nocodazole treatment. Anti-MPS1 (first panel) and anti-tubulin (second panel) western blotting were performed from equalized lysates. **(C)** Immunofluorescence of HeLa T-rex cell lines transfected with siGL2 and siMPS1. Cells were fixed with PTEMF fixation in mitosis after synchronization with thymidine and released for approximately 10h. Cells were immunostained against pMELT (Red) for, MYC (Green), CREST (Cyan) and Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. The graph shows the quantification of the pMELT intensity. **** $P = 0.0001$. Control of the experiment in (7A).

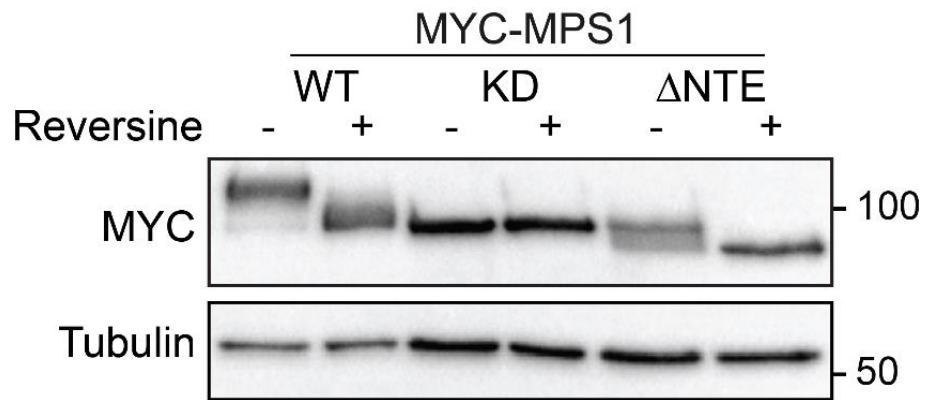


Figure S2: MPS1 NTE contributes to kinase activity

293T cells were transiently transfected with MPS1 WT and mutants KD and ΔNTE and enriched in mitosis by nocodazole treatment. Cells were treated as indicated with 0.5 μM reversine 30min before harvesting. MYC (top panel) and α-tubulin (bottom panel) blotting were performed on equalized lysates.

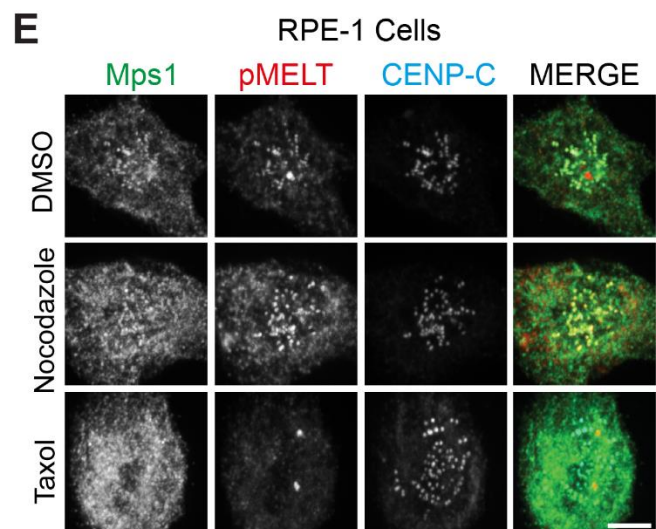
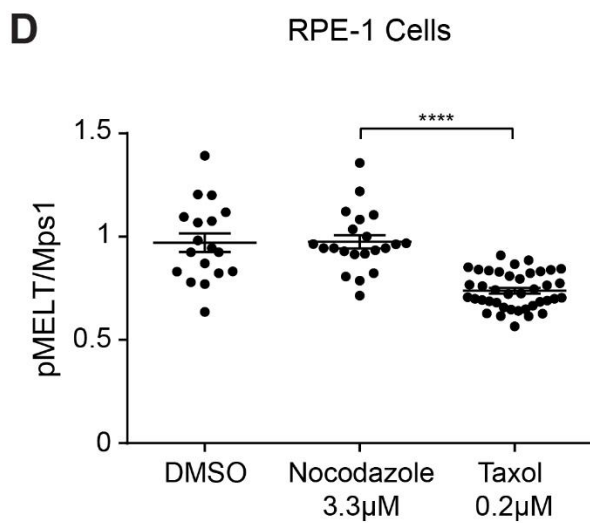
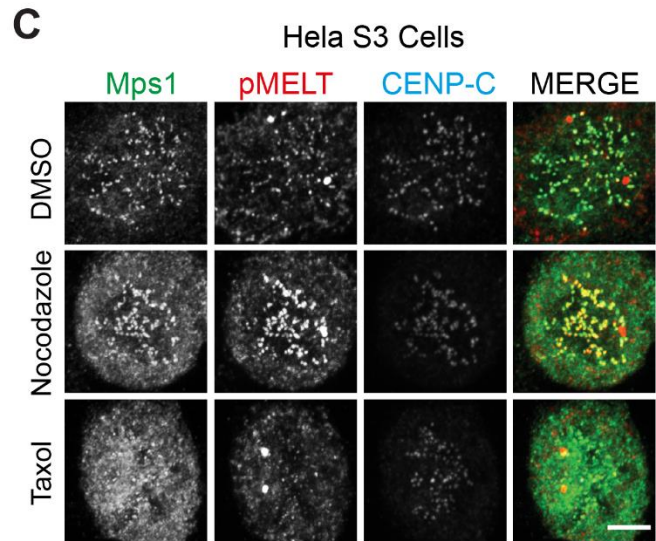
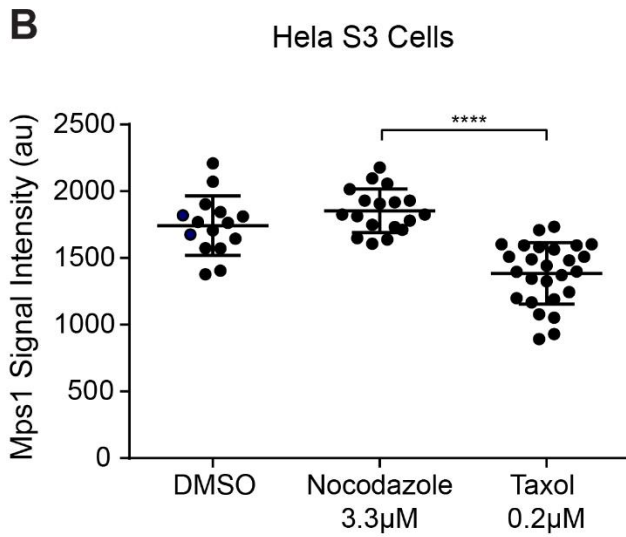
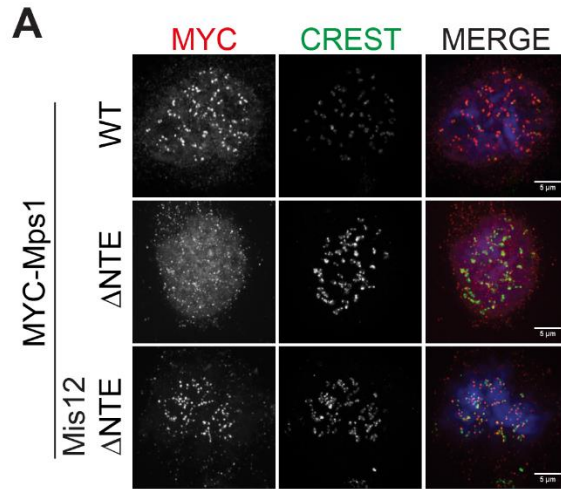


Figure S3: Increased local concentration and transactivation contribute to MPS1 activation

(A) HeLaS3 cells were simultaneously transfected with the indicated constructs and siMPS1 and fixed 10h after release from a thymidine arrest. Cells were immunostained against MYC (Red), CREST (Green), and DNA was marked with Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m **(B)** HeLa S3 cells treated for 16h with 3.3 μ M nocodazole, 0.2 μ M taxol or DMSO, and then fixed. The graph shows the quantification of the MYC-MPS1 signal of the IF in S3C. **(C)** Representative images of cells quantified in figures 2.2F and S3B. Cells were immunostained against MYC (Green), pMELT (Red), CENP-C (Cyan) and Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. **(D)** RPE-1 cells treated for 16h with 3.3 μ M nocodazole, 0.2 μ M taxol or DMSO, and then fixed. The graph shows the quantification of the pMELT signal of the immunofluorescence in S3E. **(E)** Representative images of immunofluorescence representing the graph in figure S3D. Cells were immunostained against MYC (Green), pMELT (Red), CENP-C (Cyan) and DNA was marked by Hoechst (Blue). Scale bar = 5 μ m. **** $p = 0.0001$

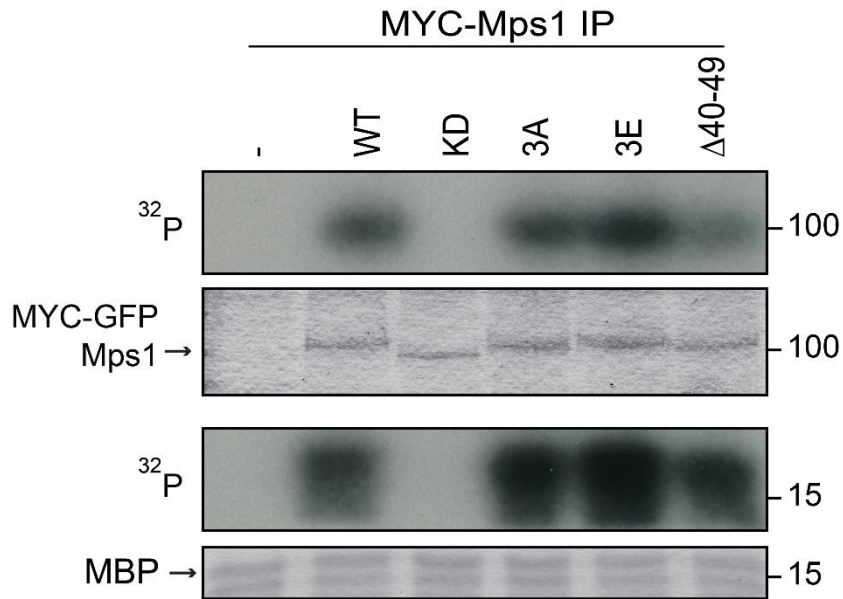


Figure S4: MPS1-3A mutant exhibits robust kinase activity

In vitro kinase assay of full-length MPS1 WT, KD, 3A, 3E and Δ40-49 expressed in 293T cells. MPS1 autophosphorylation and MBP protein phosphorylation were visualized after autoradiography using [γ -³²P]ATP as a cofactor (first and third panels). Equal loading of assayed protein was confirmed by Coomassie Blue staining of the gel (second and fourth panels).

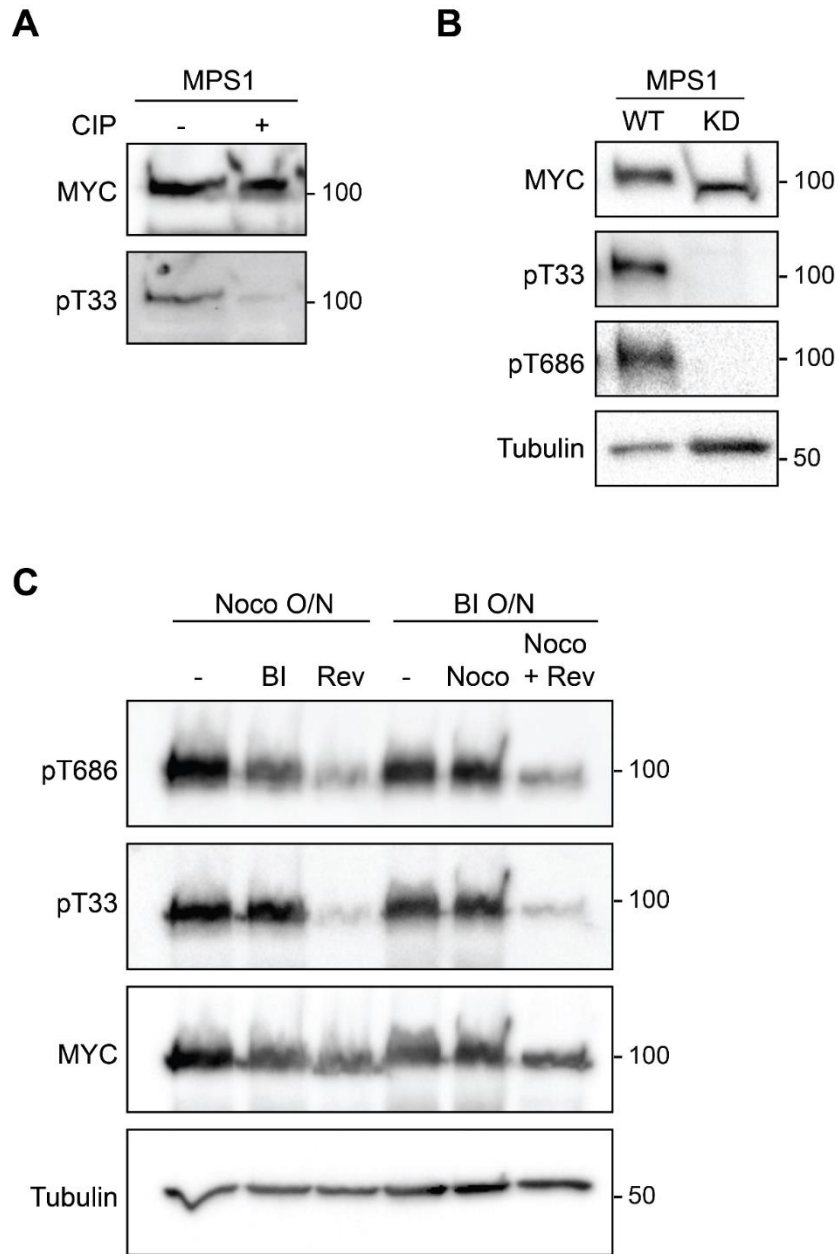


Figure S5: Characterization of the anti-pT33 MPS1 antibody

(A) MYC-MPS1 was immunoprecipitated from nocodazole-arrested 293T cells and treated with either untreated or treated with calyculin B (CIP) for 60 minutes at 37° before the reaction was stopped with SDS-PAGE sample buffer. Resolved samples were probed with pT33 antibodies before stripping and reprobing with MYC. **(B)** Cells expressing MYC-MPS1 WT and KD were arrested in mitosis with nocodazole and the MYC-MPS1 proteins were immunoprecipitated from equalized lysates before being resolved by SDS-PAGE and blotted for pT33, pT686 and MYC. **(C)** 293T cells expressing MPS1-WT were treated as indicated before being harvested and equalized lysates blotted with antibodies as indicated in (B).

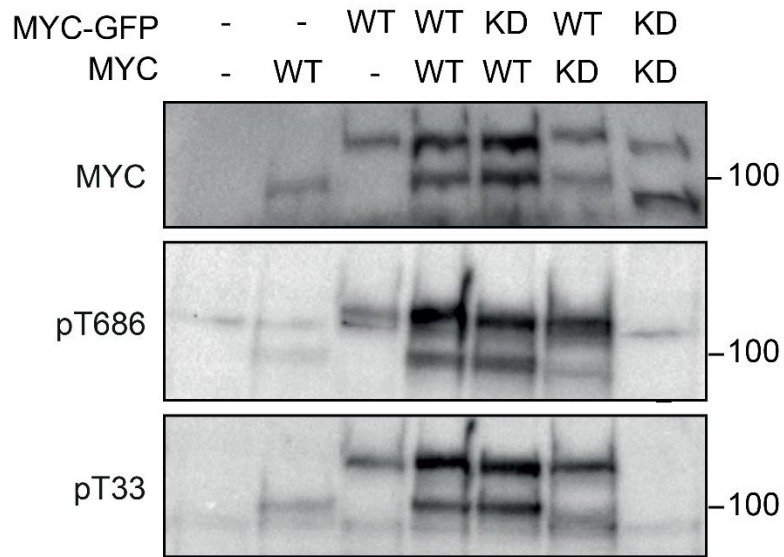
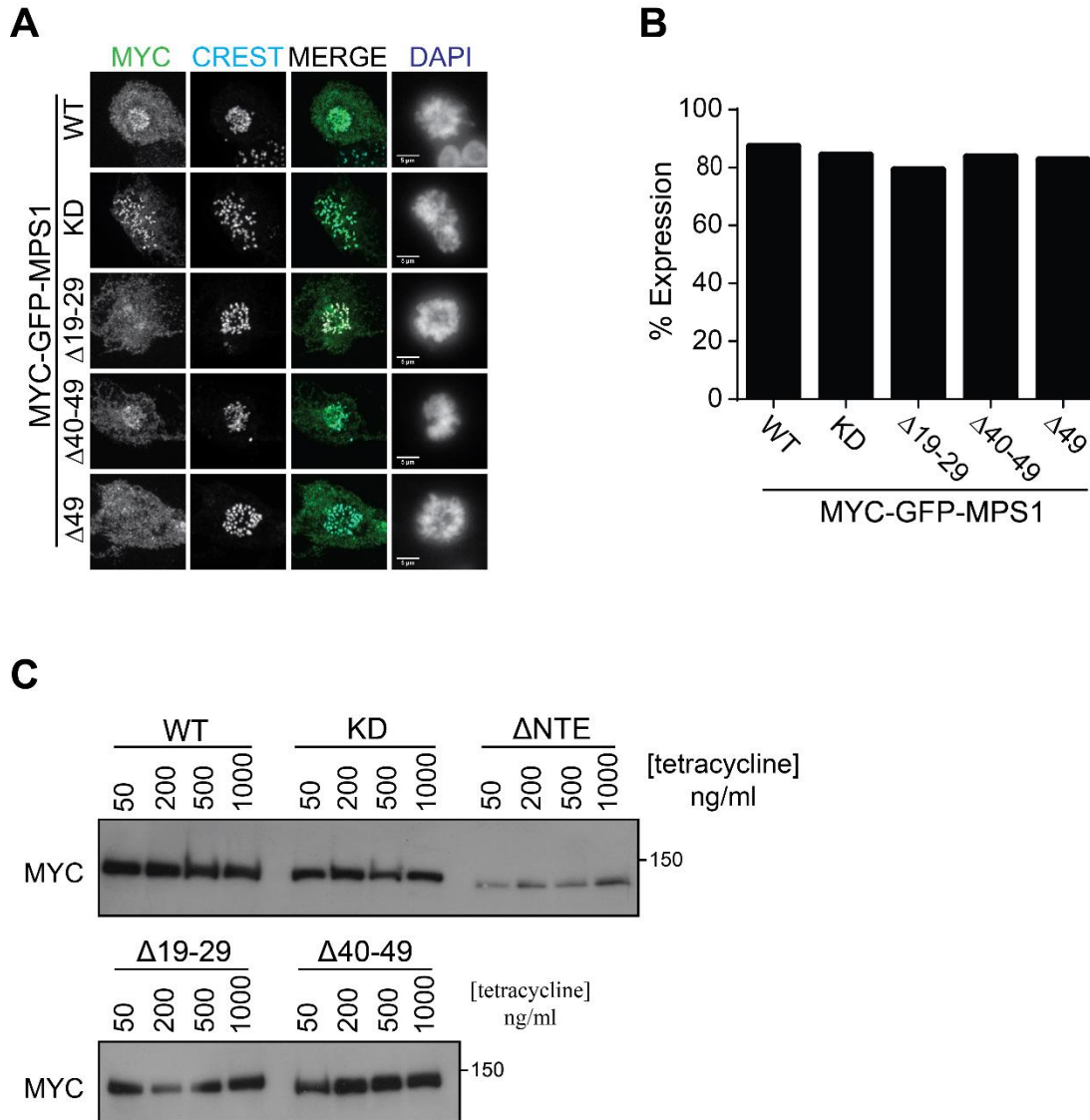


Figure S6: Trans-autophosphorylation in the MPS1 NTE

293T cells were transiently transfected with MPS1 WT and KD with the indicated tags. Cells were enriched in mitosis by nocodazole. pT686 (second panel) and pT33 (third panel) western blotting were performed from equalized lysates. MYC blotting (first panel) shows expression.



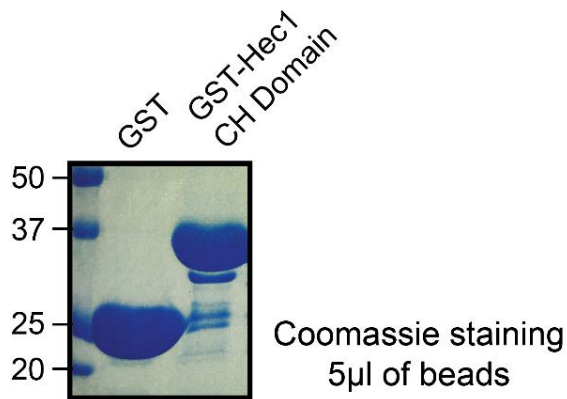
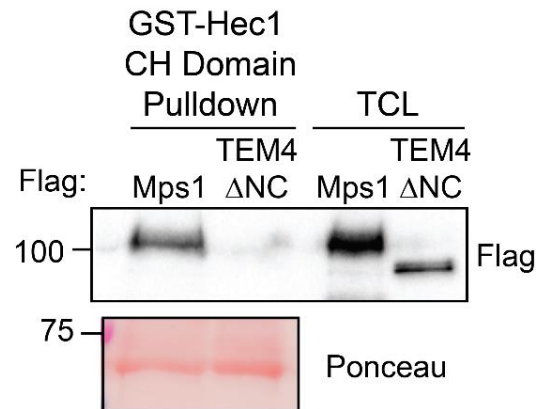
A**B**

Figure S8: GST-CH domain of HEC1 binds to MPS1 but not to TEM4

(A) Recombinant protein GST-HEC1 CH domain bound to Glutathione-Sepharose beads. Migration of 5µl of beads. Gel stained with Coomassie blue. **(B)** In vitro pull-down of MPS1 and TEM4ΔNC proteins and by HEC1 CH domain. GST-tagged HEC1 CH domain (bait) and Flag-MPS1 WT and Flag-TEM4ΔNC were precipitated using Glutathione Sepharose beads bound to the GST-HEC1 CH domain protein. Input (Unbound) and precipitates (Bound) were analyzed by WB anti-Flag. Ponceau S staining was used as loading control for beads bound to the GST-HEC1 CH domain.

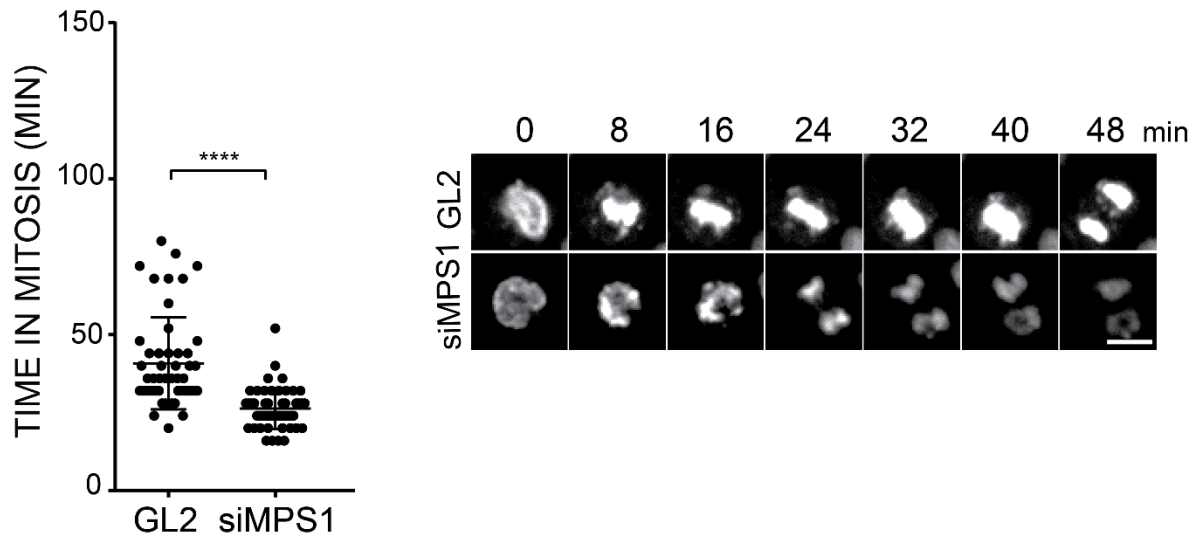


Figure S9: Live cell imaging of HeLa T-Rex cells

Quantitation of time in mitosis (nuclear envelope breakdown-anaphase) in siGL2 and siMPS1 treated cells. Stills from representative cells are shown on the right Control of the experiment in (2.7D). Time is in minutes. A minimum of 50 expressing cells was counted for each condition. N=2. Scale bar = 10 μ m. **** $P = 0.0001$.

Table 1 : Construction of plasmids

Parental Plasmid	Tag	Protein name	Fusion protein	Sequence oligo's	Cloning sites	PCR-Subcloning-Mutagenesis	Comment
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 WT	-		BamH1 / Xho1		
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 KD	-		BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of D664 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 3X	-	Mps1 30-31 Forward: 5'ATGCAGCCCTACTGATGAACCTAAGCTTGAATAAAATTTCTGCTG-3' Reverse: 5'ATCAGTAAGGGCTGCATTTTAAACTTATTTTTAATGTCTCTCCTTGTTC-3' Mps1 33-34-35 Forward: 5'-CTTGCTGCTGCACCTAAGCTTGAATAAAATTTCTGCTGATACTACAG-3' Reverse: 5'-CTTAGTGCAGCAAGGGCTGCATTTTAAACTTATTTTTAATGTC-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of E30-D31-T33-D34-E35 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT. Mutagenesis performed in two times.
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 Δ7	-	Forward: 5'-GTAGGATCCGGCAGAGAATTGACAAATTG-3' Reverse: 5'-GGGCCTCGAGTCA TTTTTTCCCT-3'	BamH1 / Xho1	PCR	Depletion of the 1-7 region from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 Δ19-29	-	Forward: 5'Phos-GAAGACCTTACTGATGAACCTAAGCTTGAAT-3' Reverse: 5'Phos-GTTCATTATGGAATCAATTGTCAATTCTCT-3'	BamH1 / Xho1	PCR	Depletion of the 19-29 region from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 Δ40-49	-	Forward: 5'Phos-GGAACCTGTTAACCAAAATTTGATGATGG-3' Reverse: 5'Phos-ATTCAGCTTAGTTTCATCAGTAAGTCTTC-3'	BamH1 / Xho1	PCR	Depletion of the 40-49 region from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 ΔTPR	-	Forward: 5'Phos-GAGGAAAAGAAGATTTTACAGCATCTACG-3' Reverse: 5'Phos-GTTTGCATCATATAATTTGGTTAAC-3'	BamH1 / Xho1	PCR	Depletion of the 60-198 region from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 45A	-	Forward: 5'-GATGCTACAGATAAATCTCGGGAACCTGTTAACCAAAT-3' Reverse: 5'-CGAGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATCAA-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of T45 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 46A	-	Forward: 5'-ACTGCAGATAAATCTCGGGAACCTGTTAACCAA-3' Reverse: 5'-CGAGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATTC-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of T46 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 49A	-	Forward: 5'-ACTACAGATAACCGGGAACTGTTAACCAAATATG-3' Reverse: 5'-GCGCGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATCAA-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of S49 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 45-46A	-	Forward: 5'-ACTGCAGATAAATCTCGGGAACCTGTTAACCAA-3' Reverse: 5'-CGAGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATTC-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of T45-T46 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 45-49A	-	Forward: 5'-ACTACAGATAACCGGGAACTGTTAACCAAATATG-3' Reverse: 5'-GCGCGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATCAA-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of T45-S49 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 AAA	-	Forward: 5'-GCTGCAGATAACCGGGAACTGTTAACCAAAT-3' Reverse: 5'-CGCGTTATCTGAGCATCAGCAGAAAATTTTATCAA-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Ala of T45-T46-S49 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	Mps1 EEE	-	Forward: 5'-TCTGCTGATGAAGAAGATAACGAGGGAACCTGTTAACCAAATATG-3' Reverse: 5'-CTCGTTATCTTCTCAGCAGAAAATTTTATCAAAGCTAGTTCATC-3'	BamH1 / Xho1	Mutagenesis	Mutagenesis into Glu of T45-T46-S49 from pcDNA 3.1 (A) 3xMyc Mps1 WT
pcDNA 3.1 (C)	3xMyc	Mis12 - Mps1 Δ49	hMis12	-	Kpn1 / BamH1 / Xho1	Subcloning	hMis12 (KPN1/BamH1) subcloned in N-Terminal of pcDNA 3.1 (C) 3xMyc Mps1 Δ49 (BamH1/Xho1)
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	FKBP - Mps1 WT	FKBP	FKBP PCR Forward: 5'-GACGGTACCCGAATTCGGGCTCCAAAGTC-3' Reverse: 5'-GACGGTACCCCTCCAGTTTGAAGAAGCTCCAC-3' Vector frame correction Forward: 5'-AGATCGATGATGGAATCCGAGGATTTAAGTGGCAGAGAATTG-3' Reverse: 5'-GGATCCATCATCGATCTGCAGAATTCACCACTGG-3'	Kpn1	PCR / Mutagenesis	Insertion of FKBP into pcDNA3.1.3xmyc (A)-Mps1 WT at Kpn1 cloning site. FKBP come from PCS2-myc- FKBP-Mps1 WT. Correction of vector frame by mutagenesis.
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	FKBP - Mps1 KD	FKBP	Forward: 5'-GACGGTACCCGAATTCGGGCTCCAAAGTC-3' Reverse: 5'-GACGGTACCCCTCCAGTTTGAAGAAGCTCCAC-3'	Kpn1	PCR	Insertion of FKBP into pcDNA.3.1.3xmyc (A)-Mps1 KD at Kpn1 cloning site. FKBP come from PCS2-myc- FKBP-Mps1 WT.

FKBP PCR							
pcDNA 3.1 (C)	3xMyc	FKBP - Mps1 Δ49	FKBP	Forward: 5'-GACGGTACCCGAATTCGGCGTCCAAGTC-3' Reverse: 5'-GACGGTACCCCTCCAGTTTTAGAAAGCTCCAC-3' Vector frame correction Forward: 5'-TACCAGGATGGAACCTGTTAACCAAAATATGATGATGGCAAAAC-3' Reverse: 5'-GTAAACAGTCCATCCTGGTACCCCTCCAGTTTTAGAAAGCTCC-3'	Kpn1	PCR / Mutagenesis	Insertion of FKBP into pcDNA3.1.3xmyc (A)-Mps1 Δ49 at Kpn1 cloning site. FKBP come from PCS2-myc- FKBP-Mps1 WT. Correction of vector frame by mutagenesis.
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	LacI - Mps1 WT	LacI	Forward: 5'-GCGGTACCTGTGAAACCAGTAACGTTATAC-3' Reverse: 5'-CTTGGGTACCTGAACTTCCTCTCTCTT-3'	Kpn1	PCR	Insertion of LacI into pcDNA3.1.3xmyc (A)-Mps1 WT at Kpn1 cloning site. LacI come from PSV2-YFP-LacI, a gift from Spector Lab.
pcDNA 3.1 (A)	3xMyc	LacI - Mps1 KD	LacI	Forward: 5'-GCGGTACCTGTGAAACCAGTAACGTTATAC-3' Reverse: 5'-CTTGGGTACCTGAACTTCCTCTCTCTT-3'	Kpn1	PCR	Insertion of LacI into pcDNA.3.1.3xmyc (A)-Mps1 KD at Kpn1 cloning site. LacI come from PSV2-YFP-LacI, a gift from Spector Lab.
pcDNA 3.1 (C)	3xMyc	LacI - Mps1 Δ49	LacI	Forward: 5'-GCGGTACCTGTGAAACCAGTAACGTTATAC-3' Reverse: 5'-CTTGGGTACCTGAACTTCCTCTCTCTT-3'	Kpn1	PCR	Insertion of LacI into pcDNA3.1.3xmyc (C)-Mps1 Δ49 at Kpn1 cloning site. LacI come from PSV2-YFP-LacI, a gift from Spector Lab.
pcDNA 5 (A) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 WT	-	-	BamH1 / Xho1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning of Mps1 WT from pcDNA3.1.3xmyc. Mps1 WT into pcDNA5 (A)/FRT/TO.3xMyc.GFP
pcDNA 5 (A) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 KD	-	-	BamH1 / Xho1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning pf Mps1 KD from pcDNA3.1.3xmyc. Mps1 KD into pcDNA5 (A)/FRT/TO.3xMyc.GFP
pcDNA 5 (A) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 Δ19-29	-	-	BamH1 / Xho1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning of Mps1 Δ19-29 from pcDNA3.1.3xmyc. Mps1 Δ19-29 into pcDNA5 (A)/FRT/TO.3xMyc.GFP
pcDNA 5 (A) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 Δ40-49	-	-	BamH1 / Xho1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning of Mps1 Δ40-49 from pcDNA3.1.3xmyc. Mps1 Δ40-49 into pcDNA5 (A)/FRT/TO.3xMyc.GFP
pcDNA 5 (C) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 Δ49	-	-	BamH1 / Kpn1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning of GFP from pcDNA5(C) /FRT/TO.3xMyc.GFP into pcDNA5 (C)/FRT/TO.3xMyc.Mps1 Δ49
pcDNA 5 (A) FRT-TO	3xMyc-GFP	Mps1 ΔTPR	-	-	BamH1 / Xho1	Subcloning	Tet-inducible vector to use with Trex Flip-in cell lines. Subcloning of Mps1 ΔTPR from pcDNA3.1.3xmyc. Mps1 ΔTPR into pcDNA5 (A)/FRT/TO.3xMyc.GFP

CHAPITRE 3

Conclusions générales et perspectives de recherches

Conclusions générales

La division cellulaire et plus particulièrement la mitose est l'un des mécanismes les plus complexes de la cellule. Sa régulation fait intervenir le SAC ainsi que plus d'une centaine de protéines qui vont œuvrer pour que la division cellulaire soit précise, robuste et dépourvue d'erreurs. Une vue d'ensemble de ces mécanismes a été décrite dans l'introduction du présent ouvrage et l'importance et la nécessité de MPS1 dans leur mise en place a été fortement mise en valeur. Maillon essentiel de cette organisation, MPS1 fait l'objet d'une recherche importante afin de mieux comprendre ses fonctions et sa régulation. Depuis sa découverte chez la levure, il y a 26 ans, d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension et la caractérisation de cette protéine. Néanmoins, on est encore loin d'avoir percé tous ses secrets. Les travaux réalisés au cours de cette thèse de doctorat apportent de nouveaux éléments qui participeront à la meilleure compréhension de la régulation de MPS1 et plus généralement à celle du SAC et de la division cellulaire.

La régulation de l'activité de MPS1 et les mécanismes permettant la localisation de MPS1 aux KT restent encore mal compris. Il a été démontré que la région NTE qui ne présente pas de particularité structurale notable est nécessaire pour la localisation de la protéine [211]. Au cours de mes travaux de doctorat, cette fonction a pu être confirmée et approfondie. Parmi ces 50 acides aminés qui composent la région NTE, on a montré qu'une région de 10 résidus globalement chargés positivement (acides aminés 19 à 29) est nécessaire à la localisation de MPS1 aux KT. Il a été démontré que la localisation de MPS1 est sensible au statut d'attachement des KT aux MT [72, 146]. Il existe donc une compétition entre MPS1 et les MT, MPS1 joue le rôle de senseur de l'attachement des MT et on a montré que ce rôle de senseur pourrait impliquer la région 19-29 que l'on a mise en évidence. On a donc réussi à démontrer l'importance d'une région précise de la région NTE dans la localisation de MPS1 et son rôle de senseur de l'attachement KT-MT.

Étonnamment, nos données ont montré que cette région 19-29 n'est pas impliquée directement dans l'attachement de MPS1 avec le domaine CH de HEC1 mais participe probablement à la régulation de cette interaction. Connaissant le rôle de la protéine TEM4 dans la régulation de la localisation de MPS1 aux KT, nous avons étudié le rôle de la région 19-29 dans l'interaction entre MPS1 et TEM4. Nous avons mis en évidence que la région 19-29 atténue l'interaction entre MPS1 et TEM4 participant donc à la régulation de la localisation de MPS1.

Observant une baisse de l'autophosphorylation et de l'hyperphosphorylation de MPS1 après la suppression de la région NTE, on a étudié l'importance de la localisation et de l'accumulation de la protéine tronquée sur ce phénomène. J'ai pu montrer que la localisation de MPS1 permet son accumulation et, par conséquent, l'augmentation de sa concentration locale favorisant ainsi sa dimérisation et donc son autophosphorylation et son activation optimale.

Il est connu depuis longtemps que la protéine kinase MPS1 est beaucoup plus active en mitose qu'en interphase [243]. On a pu observer et confirmer cette donnée, mais aussi on a mis en évidence que lorsqu'on force la localisation de MPS1 en un point particulier de la cellule (voir figures 2.2.B.C.D), on peut restaurer l'activité déficiente du mutant dépourvu de la région NTE au niveau de MPS1 sauvage. On voit que cette restauration atteint le niveau de la protéine sauvage quand on mesure le signal de l'activité de MPS1 au cours de la mitose mais la restauration reste partielle dans le cas de mesures pendant l'interphase. Cela suggère l'intervention de mécanismes ou facteurs présents uniquement au cours de la mitose pour permettre l'activation de MPS1 et ceci par l'intermédiaire de la région NTE. La restauration complète de l'activité de MPS1 du mutant dépourvu de la région NTE au niveau de MPS1 sauvage en mitose nous amène à penser que d'autres mécanismes indépendants de la région NTE remplacent ou compensent la perte de la NTE pour permettre l'activation complète de MPS1 en mitose où sa fonction est essentielle. On pourrait imaginer qu'une ou

plusieurs autres protéines kinases prennent le relais de Mps1 et soient capables de d'effectuer les fonctions de Mps1.

La perte de la région NTE entraîne une baisse de l'autophosphorylation et de l'hyperphosphorylation mitotique de MPS1. Nous avons identifié plus précisément une région à l'intérieur de la NTE qui participe à la régulation de l'activité de MPS1, la région comprenant les acides aminés 40 à 49. Avec une certaine surprise, nous avons remarqué que cette région est requise seulement dans un contexte de protéine complète, c'est-à-dire que si la région NTE est enlevée complètement, la nécessité des résidus 40-49 pour l'activation complète de MPS1 n'est plus nécessaire. Cela suggère que cette région est requise pour empêcher une auto-inhibition qui se produit par la région NTE elle-même. Avec la création de mutants combinant la suppression de la région 40-49 et d'autres mutations à l'intérieur de la région NTE, nous avons mis en évidence une région fortement chargée incluant un site d'autophosphorylation (E30, D31, T33, D34, E35) qui serait responsable de ce mécanisme d'auto-inhibition.

La mutation de plusieurs sites potentiels de phosphorylation (T45, T46 et S49) parmi les résidus de la région 40-49 a montré leur importance dans la régulation de la phosphorylation de MPS1. Au moins un de ces sites, la T46, est phosphorylé (Von Schubert). Le statut de ces sites potentiels reste à déterminer, on ne sait pas s'il s'agit de sites d'autophosphorylation ou de sites de phosphorylation d'une autre protéine kinase. Par contre, on a pu montrer que la mutation de ces sites ou la suppression complète de la région 40-49 n'avait aucune influence sur la phosphorylation de la T33, site d'autophosphorylation pour lequel nous avons développé un anticorps phosphospécifique. Cela nous a également permis de montrer que ce site d'autophosphorylation présent dans la région NTE était phosphorylé en trans et préalablement aux sites d'autophosphorylation de la boucle d'activation du domaine kinase.

La mise en évidence de ces deux modules nous permet de séparer les fonctions de localisation et de régulation de l'activité et de vérifier l'effet de la

suppression de ces deux régions sur le déroulement du cycle cellulaire et sur la fonction de MPS1 dans la mise en place du SAC. La localisation de MPS1 aux KT et une activité complète sont donc nécessaires pour la phosphorylation des motifs MELT de KNL1, substrat de MPS1 au KT, et pour le recrutement de la protéine MAD2, composant du MCC recruté par MPS1. Logiquement, observant ces effets sur les fonctions de MPS1, on s'attend à voir un effet sur le SAC. On a observé un index mitotique en baisse et un temps de mitose fortement réduit ce qui confirme la nécessité d'une bonne localisation et d'une activité optimale de MPS1 pour la mise en place d'un SAC efficace et robuste. Enfin, l'étude de la ségrégation des chromosomes en anaphase nous montre que la localisation de MPS1 est absolument nécessaire pour éviter les chromosomes retardés alors que l'activité optimale de MPS1 ne semble pas requise pour cette fonction. En effet, l'activité partielle de MPS1 semble suffisante pour la ségrégation des chromosomes.

MPS1 est une cible potentielle dans les thérapies contre le cancer et fait l'objet d'une recherche importante dans le développement de petites molécules inhibitrices. De nombreux essais cliniques ont été réalisés ces dernières années démontrant une assez bonne efficacité seule ou en combinaison avec d'autres drogues dans le traitement de plusieurs types de cancer. Des problèmes de résistance et de spécificité de ces molécules inhibitrices ciblant le domaine kinase de MPS1 ont été mis en évidence [271, 320]. Il serait donc intéressant de développer des inhibiteurs qui ne ciblent pas le domaine kinase de MPS1. Les résultats apportés par cette étude de la région NTE montrent son importance pour les fonctions essentielles de MPS1 dans la mise en place du SAC et donc le développement d'inhibiteurs de la région N-Terminale serait une alternative aux inhibiteurs du domaine kinase intéressante à tester.

Perspectives de recherche

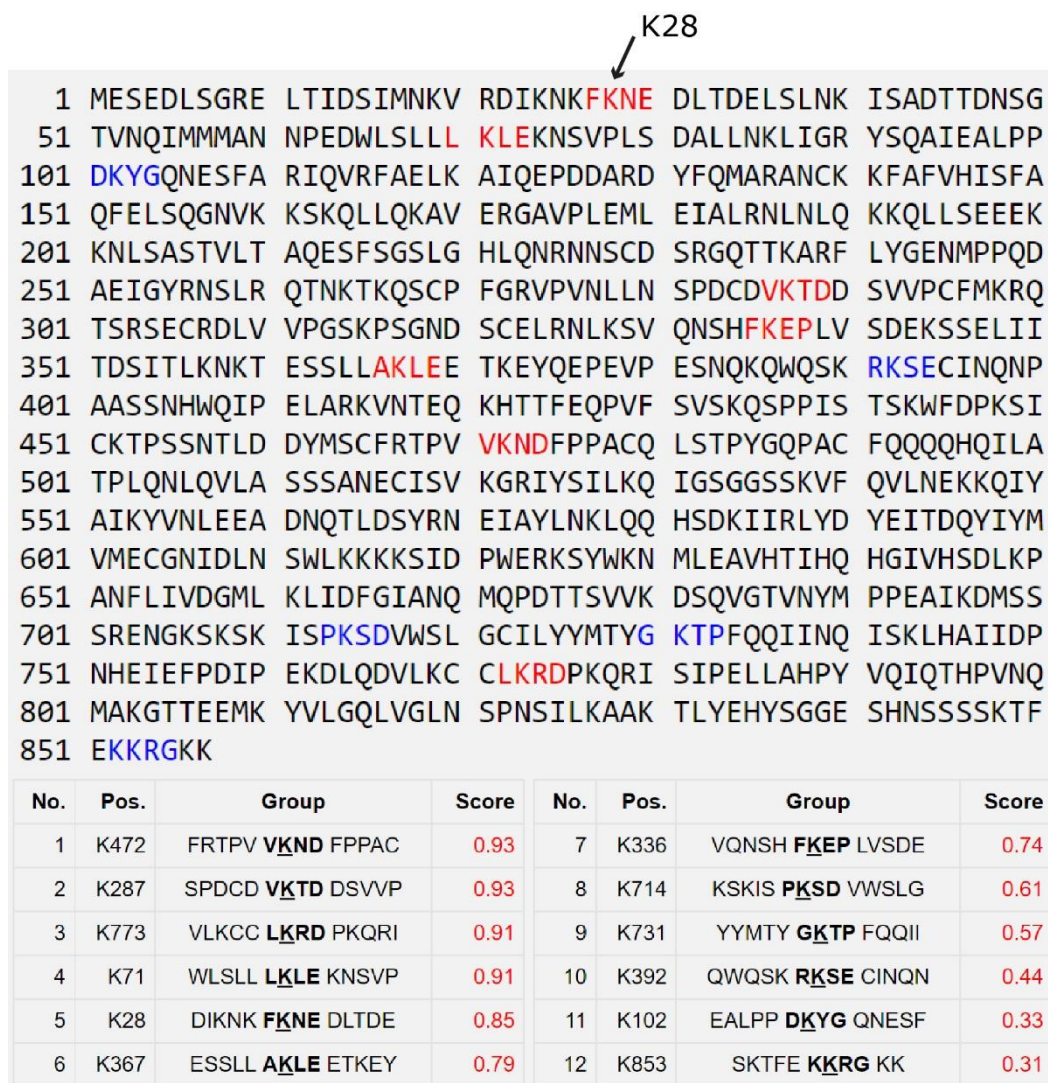
Dans l'optique d'une poursuite de ce projet, plusieurs pistes de recherche pourraient être explorées avec des perspectives à court et long termes.

Au cours de cette thèse, j'ai montré l'importance d'un module de localisation de MPS1 que nous avons mis en évidence dans la région NTE. Cependant nous n'avons pas encore complètement élucidé sa fonction. Participant à la localisation de MPS1 aux KT et à la régulation de l'attachement de MPS1 avec le domaine CH de HEC1, on ne connaît pas exactement le rôle du module 19-29. Sachant qu'il participe à la régulation de l'attachement de MPS1 avec le domaine CH de HEC1, on pourrait vérifier si le module 19-29 interagit directement avec le domaine CH ou s'il n'interagit pas avec une autre région de HEC1. Par exemple, il a été montré que la région en épingle à cheveux située en C-Terminale du domaine CH participe au recrutement de MPS1 chez *S.pombe* [321]. Il serait aussi intéressant d'identifier quelle(s) région(s) de la NTE interagit directement avec le domaine CH de HEC1 ou si c'est la région entière qui est nécessaire pour cette interaction. Une étude dans un contexte proche de la cellule serait préférable, c'est-à-dire, faire les tests avec les protéines HEC1 et NUF2 et pas seulement avec le domaine CH de HEC1 car il est possible que dans ce contexte l'interaction soit différente.

On pourrait également regarder du côté de protéines comme TEM4 [253] et PRP4 [251] qui ont été impliquées dans la localisation de MPS1 aux KT en mitose. TEM4 interagit directement avec la protéine MPS1 en mitose et la recrute aux KT. On a montré que la NTE et le module 19-29 en particulier participe à la régulation de la localisation de MPS1 au KT en diminuant l'interaction de MPS1 avec TEM4. Il serait intéressant de continuer la caractérisation de ce nouveau mécanisme de régulation de la localisation de MPS1.

Comme mentionné dans le chapitre d'introduction, la sumoylation de MPS1 participe à sa localisation. Dans leur étude, Restuccia et al. [254] ont omis un site de sumoylation potentiel dans la région NTE de MPS1. En effectuant la même analyse qu'eux, avec le programme d'analyse disponible sur le site d'Abgent, SUMOplot™ Analysis Program, j'ai identifié la Lysine 28 (K28) (**Figure 3.1**) qui fait partie d'un motif à forte probabilité de sumoylation. Cette lysine est très intéressante car elle fait partie du module de localisation 19-29 que nous

avons découvert. Peut-être que la sumoylation de ce résidu participe à la fonction de ce module et il serait utile de tester cela.



■ Motifs à forte probabilité de sumoylation

■ Motifs à faible probabilité de sumoylation

Figure 3.1: Sites de sumoylation potentiels de MPS1

Résultats de l'analyse de la séquence de MPS1 avec le programme d'analyse disponible sur le site d'Abgent, SUMOplot™ Analysis Program. On retrouve les motifs à forte probabilité de sumoylation en rouge et ceux à faible probabilité en bleu. Le tableau montre les motifs identifiés et présente un score associé à chaque motif.

Si on s'intéresse au module impliqué dans la régulation de l'activité que l'on a mis en évidence, la région 40-49, il serait intéressant d'approfondir les connaissances relatives à sa fonction. Dans ce module, on a identifié plusieurs sites potentiels de phosphorylation, les T45 et T46 ainsi que la S49. Le statut de ces sites reste à définir. Ces sites peuvent soit être des sites d'autophosphorylation, MPS1 étant une protéine kinase qui s'autophosphoryle, ou alors des sites de phosphorylation d'une autre kinase. L'une des premières kinases à laquelle on peut penser est PLK1. En plus, du fait que la T46 et la S49 possèdent un résidu acide en position -2, ce qui correspond aux motifs consensus de MPS1 et PLK1, il a été montré que la T46 est phosphorylée par PLK1 in vitro [276]. La génération d'anticorps phosphospécifiques de ces sites individuellement et peut être un anticorps spécifique de la phosphorylation des 3 sites car on a pu voir que la mutation des 3 sites affecte l'activité de MPS1 alors que la mutation individuelle ne montre pas de baisse significative. Ces anticorps permettraient d'étudier l'importance et de définir les rôles de ces résidus dans l'activation de MPS1.

Au cours des prochaines années, il est évident que si on parvenait à résoudre la structure de la région NTE et de la protéine complète par cristallographie, la compréhension de la régulation de MPS1 par cette région serait grandement facilitée. Même si on peut essayer de prédire comment cette région peut se replier et s'organiser en fonction de sa séquence, il n'est pas possible de savoir comment cela va s'organiser dans le contexte de la protéine entière. Il faut aussi penser que MPS1 dimérise ce qui peut aussi mener à une réorganisation de la structure de la protéine.

Dans un autre ordre d'idées, il serait intéressant d'étudier la relation entre MPS1 et PLK1 et de mettre à jour de potentielles coopérations. Comme présenté dans l'introduction, des nombreux indices et éléments amènent de nouvelles questions.

Dans l'étude de von Schubert et al. [276], ils ont montré que PLK1 soutenait directement l'activité de MPS1 en la phosphorylant directement, mais comment PLK1 peut phosphoryler et activer MPS1 reste toujours indéterminé. En étudiant la séquence de MPS1, j'ai noté la présence d'un site STP (Sérine-Thréonine-Proline) assez bien conservé chez certains orthologues de MPS1 incluant la grenouille, le poisson et les plusieurs mammifères dont l'homme (**Figure 3.2**). Le motif STP est un motif communément retrouvé sur les substrats de PLK1. Il est généralement pré-phosphorylé par une autre kinase ce qui permet l'interaction avec le PBD (Polo Box Domain) de PLK1. Cette possible interaction offre un mécanisme potentiel d'activation de MPS1 par PLK1 même si la phosphorylation et la fonction de ce motif reste à démontrer.

	483
Homo sapiens	CQLSTPYGQP
Macaca fascicularis	CQLSTPYGQP
Rattus norvegicus	CPSSTPYSQL
Mus musculus	CPSSTPYSQL
Canis canis	CQLSTPYSQL
Gallus gallus	YQISTPYSQL
Xenopus laevis	AQMSTPYNNR
Latimeria chalumnae	SQISTPYNYP

Figure 3.2: Alignement du motifs STP potentiel de MPS1

Cet alignement montre la conservation de ce motif STP à travers l'évolution. Les espèces utilisées pour cet alignement sont : le Cœlacanthe (*Latimeria chalumnae*), la Xénope lisse (*Xenopus laevis*), la poule (*Gallus gallus*), le chien (*Canis canis*), la souris (*Mus musculus*), le rat (*Rattus norvegicus*), le macaque (*Macaca fascicularis*) et l'homme (*Homo sapiens*). Figure provenant de l'article de revue en annexe.

La coopération entre ces deux kinases dans la phosphorylation de KNL1 mise en évidence [276] montre une collaboration dans une fonction essentielle de la mitose. L'idée de réexaminer les autres fonctions de MPS1 en mitose et dans le cycle cellulaire mériteraient qu'on s'y attarde au cours des prochaines années. Plusieurs rôles et fonctions semblent démontrer une convergence et une

coopération possible entre ces deux kinases. Comme détaillé au point 4.2.4, plusieurs fonctions pourraient faire l'objet d'une étude plus poussée en gardant à l'esprit cette possible coopération. L'action de ces kinases au niveau du CPC, de la duplication des centrosomes et dans la phosphorylation de BUBR1 seraient des points de départ intéressants. On peut également penser au nouveau rôle de MPS1 dans la phosphorylation et l'activation des protéines MAD1/MAD2 [120, 140] pour la mise en place du SAC et la formation du MCC. L'implication de PLK1 n'a pas été vérifiée dans cette fonction et il est possible que PLK1 supporte MPS1 dans son action comme pour la phosphorylation des motifs MELT de KNL1.

Finalement, l'ensemble de ces travaux fourniront des informations cruciales nous permettant de mieux comprendre les fonctions de MPS1 et sa régulation. Le but ultime de ces travaux est de pouvoir par exemple se servir de ces informations afin de développer de nouveaux inhibiteurs de MPS1 qui seraient plus spécifiques et efficaces pour le traitement du cancer. Un projet visant à développer des inhibiteurs de MPS1 ciblant la région N-Terminale de MPS1 (NTE+TPR) a été initié dans le laboratoire en collaboration avec Victor Bolanos-Garcia (Oxford Brookes University) et le CDRD à Vancouver (Centre for Drug Research and Development). Un criblage de fragment de petites molécules a permis l'identification de plusieurs fragments qui pourraient devenir des candidats potentiels. Leur utilisation en combinaison avec des inhibiteurs mimétiques de l'ATP serait un moyen de réduire les effets secondaires, augmenter la spécificité et baisser la résistance qui peut apparaître.

RÉFÉRENCES

1. Schafer, K.A., *The cell cycle: a review*. Vet Pathol, 1998. **35**(6): p. 461-78.
2. Pines, J., *Cyclins: wheels within wheels*. Cell Growth Differ, 1991. **2**(6): p. 305-10.
3. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, 1989. **246**(4930): p. 629-34.
4. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
5. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
6. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
7. Speidel, D., *The role of DNA damage responses in p53 biology*. Arch Toxicol, 2015. **89**(4): p. 501-17.
8. Finn, K., N.F. Lowndes, and M. Grenon, *Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(9): p. 1447-73.
9. Skibbens, R.V., *Buck the establishment: reinventing sister chromatid cohesion*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(9): p. 507-13.
10. Fu, J., I.M. Hagan, and D.M. Glover, *The centrosome and its duplication cycle*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(2): p. a015800.
11. Rivera-Rivera, Y. and H.I. Saavedra, *Centrosome - a promising anti-cancer target*. Biologics, 2016. **10**: p. 167-176.
12. Moniz, L., et al., *Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer*. Cell Div, 2011. **6**: p. 18.
13. Kleylein-Sohn, J., et al., *Plk4-induced centriole biogenesis in human cells*. Dev Cell, 2007. **13**(2): p. 190-202.
14. Habedanck, R., et al., *The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(11): p. 1140-6.
15. Bettencourt-Dias, M., et al., *SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development*. Curr Biol, 2005. **15**(24): p. 2199-207.
16. Chang, J., et al., *PLK2 phosphorylation is critical for CPAP function in procentriole formation during the centrosome cycle*. Embo j, 2010. **29**(14): p. 2395-406.
17. Zitouni, S., et al., *Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 433-52.
18. Hohegger, H., S. Takeda, and T. Hunt, *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(11): p. 910-6.
19. Oakes, V., et al., *Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle*. Cell Cycle, 2014. **13**(20): p. 3302-11.
20. Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema, *The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network*. J Cell Biol, 2009. **185**(2): p. 193-202.
21. Fu, H., R.R. Subramanian, and S.C. Masters, *14-3-3 proteins: structure, function, and regulation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 617-47.
22. Kousholt, A.N., T. Menzel, and C.S. Sorensen, *Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle*. Biomolecules, 2012. **2**(4): p. 579-607.
23. Vagnarelli, P., *Mitotic chromosome condensation in vertebrates*. Exp Cell Res, 2012. **318**(12): p. 1435-41.

24. Waizenegger, I.C., et al., *Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase*. Cell, 2000. **103**(3): p. 399-410.
25. Nigg, E.A., *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 21-32.
26. Tanaka, T.U., *Bi-orienting chromosomes: acrobatics on the mitotic spindle*. Chromosoma, 2008. **117**(6): p. 521-33.
27. Kapoor, T.M., et al., *Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation*. Science, 2006. **311**(5759): p. 388-91.
28. Maiato, H. and M. Lince-Faria, *The perpetual movements of anaphase*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(13): p. 2251-69.
29. Larijani, B. and D.L. Poccia, *Nuclear envelope formation: mind the gaps*. Annu Rev Biophys, 2009. **38**: p. 107-24.
30. Green, R.A., E. Paluch, and K. Oegema, *Cytokinesis in animal cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 29-58.
31. Rieder, C.L., et al., *The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores*. J Cell Biol, 1995. **130**(4): p. 941-8.
32. Santaguida, S. and A. Musacchio, *The life and miracles of kinetochores*. Embo j, 2009. **28**(17): p. 2511-31.
33. Cheeseman, I.M. and A. Desai, *Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 33-46.
34. Cheeseman, I., et al., *A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension*. Genes & development, 2004. **18**(18): p. 2255-2268.
35. Cheeseman, I.M., et al., *The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore*. Cell, 2006. **127**(5): p. 983-97.
36. Rieder, C.L., *The structure of the cold-stable kinetochore fiber in metaphase PtK1 cells*. Chromosoma, 1981. **84**(1): p. 145-58.
37. Aldrup-MacDonald, M. and B. Sullivan, *The Past, Present, and Future of Human Centromere Genomics*. Genes, 2014. **5**(1): p. 33-50.
38. Sullivan, K.F., M. Hechenberger, and K. Masri, *Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere*. J Cell Biol, 1994. **127**(3): p. 581-92.
39. Hori, T. and T. Fukagawa, *Establishment of the vertebrate kinetochores*. Chromosome Res, 2012. **20**(5): p. 547-61.
40. Mendiburo, M.J., et al., *Drosophila CENH3 is sufficient for centromere formation*. Science, 2011. **334**(6056): p. 686-90.
41. Allshire, R.C. and G.H. Karpen, *Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(12): p. 923-37.
42. Liu, S.T., et al., *Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells*. J Cell Biol, 2006. **175**(1): p. 41-53.
43. Fachinetti, D., et al., *A two-step mechanism for epigenetic specification of centromere identity and function*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(9): p. 1056-66.
44. Logsdon, G.A., et al., *Both tails and the centromere targeting domain of CENP-A are required for centromere establishment*. J Cell Biol, 2015. **208**(5): p. 521-31.
45. Moroi, Y., et al., *Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1627-31.

46. McKinley, K.L., et al., *The CENP-L-N Complex Forms a Critical Node in an Integrated Meshwork of Interactions at the Centromere-Kinetochore Interface*. Mol Cell, 2015. **60**(6): p. 886-98.
47. Weir, J.R., et al., *Insights from biochemical reconstitution into the architecture of human kinetochores*. Nature, 2016. **537**(7619): p. 249-253.
48. Klare, K., et al., *CENP-C is a blueprint for constitutive centromere-associated network assembly within human kinetochores*. J Cell Biol, 2015. **210**(1): p. 11-22.
49. Hori, T., et al., *CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1039-52.
50. Amano, M., et al., *The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure*. J Cell Biol, 2009. **186**(2): p. 173-82.
51. Musacchio, A. and A. Desai, *A Molecular View of Kinetochore Assembly and Function*. Biology (Basel), 2017. **6**(1).
52. Wigge, P.A., et al., *Analysis of the Saccharomyces spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 967-77.
53. DeLuca, J.G., et al., *Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1*. Cell, 2006. **127**(5): p. 969-82.
54. McClelland, M.L., et al., *The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment*. Curr Biol, 2004. **14**(2): p. 131-7.
55. Wei, R., et al., *Phosphorylation of the Ndc80 complex protein, HEC1, by Nek2 kinase modulates chromosome alignment and signaling of the spindle assembly checkpoint*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(19): p. 3584-94.
56. Welburn, J.P., et al., *Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface*. Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 383-92.
57. Jia, L., S. Kim, and H. Yu, *Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C*. Trends in Biochemical Sciences, 2013. **38**(6): p. 302-311.
58. Bharadwaj, R., W. Qi, and H. Yu, *Identification of two novel components of the human NDC80 kinetochore complex*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 13076-85.
59. Zheng, L., Y. Chen, and W.H. Lee, *Hec1p, an evolutionarily conserved coiled-coil protein, modulates chromosome segregation through interaction with SMC proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(8): p. 5417-28.
60. Osborne, M.A., et al., *Nuf2, a spindle pole body-associated protein required for nuclear division in yeast*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 853-66.
61. Janke, C., et al., *The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control*. Embo j, 2001. **20**(4): p. 777-91.
62. Ciferri, C., et al., *Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex*. Cell, 2008. **133**(3): p. 427-39.
63. Wei, R.R., J. Al-Bassam, and S.C. Harrison, *The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(1): p. 54-9.
64. Gascoigne, K.E., et al., *Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes*. Cell, 2011. **145**(3): p. 410-22.
65. Stucke, V.M., C. Baumann, and E.A. Nigg, *Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1*. Chromosoma, 2004. **113**(1): p. 1-15.
66. Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg, *Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2*. Science, 2002. **297**(5590): p. 2267-70.

67. Valverde, R., J. Ingram, and S.C. Harrison, *Conserved Tetramer Junction in the Kinetochores Ndc80 Complex*. Cell Rep, 2016. **17**(8): p. 1915-1922.
68. Miller, S.A., M.L. Johnson, and P.T. Stukenberg, *Kinetochores attachments require an interaction between unstructured tails on microtubules and Ndc80(Hec1)*. Curr Biol, 2008. **18**(22): p. 1785-91.
69. DeLuca, K.F., S.M. Lens, and J.G. DeLuca, *Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochores-microtubule attachment stability during mitosis*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 4): p. 622-34.
70. Guimaraes, G.J., et al., *Kinetochores-microtubule attachment relies on the disordered N-terminal tail domain of Hec1*. Curr Biol, 2008. **18**(22): p. 1778-84.
71. Zaytsev, A.V., et al., *Multisite phosphorylation of the NDC80 complex gradually tunes its microtubule-binding affinity*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(10): p. 1829-44.
72. Ji, Z., H. Gao, and H. Yu, *CELL DIVISION CYCLE. Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C*. Science, 2015. **348**(6240): p. 1260-4.
73. Petrovic, A., et al., *The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochores assembly*. J Cell Biol, 2010. **190**(5): p. 835-52.
74. Przewloka, M.R. and D.M. Glover, *The kinetochores and the centromere: a working long distance relationship*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 439-65.
75. Petrovic, A., et al., *Structure of the MIS12 Complex and Molecular Basis of Its Interaction with CENP-C at Human Kinetochores*. Cell, 2016. **167**(4): p. 1028-1040.e15.
76. Kops, G.J., et al., *ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochores*. J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 49-60.
77. Wang, H., et al., *Human Zwint-1 specifies localization of Zeste White 10 to kinetochores and is essential for mitotic checkpoint signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54590-8.
78. Gama, J.B., et al., *Molecular mechanism of dynein recruitment to kinetochores by the Rod-Zw10-Zwilch complex and Spindly*. J Cell Biol, 2017. **216**(4): p. 943-960.
79. Kasuboski, J.M., et al., *Zwint-1 is a novel Aurora B substrate required for the assembly of a dynein-binding platform on kinetochores*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(18): p. 3318-30.
80. Famulski, J.K. and G.K. Chan, *Aurora B kinase-dependent recruitment of hZW10 and hROD to tensionless kinetochores*. Curr Biol, 2007. **17**(24): p. 2143-9.
81. Liu, D., et al., *Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochores by KNL1 opposes Aurora B kinase*. J Cell Biol, 2010. **188**(6): p. 809-20.
82. Rosenberg, J.S., F.R. Cross, and H. Funabiki, *KNL1/Spc105 recruits PP1 to silence the spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2011. **21**(11): p. 942-7.
83. Lesage, B., J. Qian, and M. Bollen, *Spindle checkpoint silencing: PP1 tips the balance*. Curr Biol, 2011. **21**(21): p. R898-903.
84. Bolanos-Garcia, V.M., et al., *Structure of a Blinkin-BUBR1 complex reveals an interaction crucial for kinetochores-mitotic checkpoint regulation via an unanticipated binding Site*. Structure, 2011. **19**(11): p. 1691-700.
85. Shepperd, L.A., et al., *Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(10): p. 891-9.
86. Yamagishi, Y., et al., *MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochores protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 746-52.
87. London, N., et al., *Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores*. Curr Biol, 2012. **22**(10): p. 900-6.
88. Vleugel, M., et al., *Arrayed BUB recruitment modules in the kinetochores scaffold KNL1 promote accurate chromosome segregation*. J Cell Biol, 2013. **203**(6): p. 943-55.

89. Krenn, V., et al., *KI motifs of human Knl1 enhance assembly of comprehensive spindle checkpoint complexes around MELT repeats*. *Curr Biol*, 2014. **24**(1): p. 29-39.
90. Zhang, G., T. Lischetti, and J. Nilsson, *A minimal number of MELT repeats supports all the functions of KNL1 in chromosome segregation*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 4): p. 871-84.
91. Ghongane, P., et al., *The dynamic protein Knl1 - a kinetochore rendezvous*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 16): p. 3415-23.
92. Tromer, E., B. Snel, and G.J. Kops, *Widespread Recurrent Patterns of Rapid Repeat Evolution in the Kinetochore Scaffold KNL1*. *Genome Biol Evol*, 2015. **7**(8): p. 2383-93.
93. Kline, S.L., et al., *The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation*. *J Cell Biol*, 2006. **173**(1): p. 9-17.
94. Cheeseman, I.M., *The kinetochore*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **6**(7): p. a015826.
95. Salmon, E., et al., *Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. **360**(1455): p. 553-68.
96. Cimini, D., et al., *Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 20): p. 4213-25.
97. Shrestha, R.L. and V.M. Draviam, *Lateral to end-on conversion of chromosome-microtubule attachment requires kinesins CENP-E and MCAK*. *Curr Biol*, 2013. **23**(16): p. 1514-26.
98. Adams, R.R., M. Carmena, and W.C. Earnshaw, *Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(2): p. 49-54.
99. Kitagawa, M. and S.H. Lee, *The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis*. *Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 14.
100. Biggins, S., et al., *The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast*. *Genes Dev*, 1999. **13**(5): p. 532-44.
101. Tanaka, T.U., et al., *Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections*. *Cell*, 2002. **108**(3): p. 317-29.
102. Chan, Y.W., et al., *Aurora B controls kinetochore-microtubule attachments by inhibiting Ska complex-KMN network interaction*. *J Cell Biol*, 2012. **196**(5): p. 563-71.
103. Schmidt, J.C., et al., *The kinetochore-bound Ska1 complex tracks depolymerizing microtubules and binds to curved protofilaments*. *Dev Cell*, 2012. **23**(5): p. 968-80.
104. Carmena, M., et al., *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 789-803.
105. Liu, D., et al., *Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates*. *Science*, 2009. **323**(5919): p. 1350-3.
106. Vader, G., R.H. Medema, and S.M. Lens, *The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis*. *J Cell Biol*, 2006. **173**(6): p. 833-7.
107. Cooke, C.A., M.M. Heck, and W.C. Earnshaw, *The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(5): p. 2053-67.
108. Rieder, C.L., et al., *Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(5): p. 1301-10.
109. Rudner, A.D. and A.W. Murray, *The spindle assembly checkpoint*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(6): p. 773-80.
110. Saurin, A.T., et al., *Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis*. *Nat Commun*, 2011. **2**: p. 316.

111. Musacchio, A., *The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics*. Curr Biol, 2015. **25**(20): p. R1002-18.
112. Primorac, I., et al., *Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling*. Elife, 2013. **2**: p. e01030.
113. Logarinho, E., et al., *The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): p. 1798-813.
114. Perera, D., et al., *Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint*. Dev Cell, 2007. **13**(4): p. 566-79.
115. Toledo, C.M., et al., *BuGZ is required for Bub3 stability, Bub1 kinetochore function, and chromosome alignment*. Dev Cell, 2014. **28**(3): p. 282-94.
116. Krenn, V., et al., *Structural analysis reveals features of the spindle checkpoint kinase Bub1-kinetochore subunit Knl1 interaction*. J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 451-67.
117. Sharp-Baker, H. and R.H. Chen, *Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1239-50.
118. Johnson, V.L., et al., *Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1577-89.
119. Hewitt, L., et al., *Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex*. J Cell Biol, 2010. **190**(1): p. 25-34.
120. Ji, Z., et al., *A sequential multi-target Mps1 phosphorylation cascade promotes spindle checkpoint signaling*. Elife, 2017. **6**.
121. Maciejowski, J., et al., *Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling*. J Cell Biol, 2010. **190**(1): p. 89-100.
122. Collin, P., et al., *The spindle assembly checkpoint works like a rheostat rather than a toggle switch*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(11): p. 1378-85.
123. Dick, A.E. and D.W. Gerlich, *Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(11): p. 1370-7.
124. D'Arcy, S., et al., *Defining the molecular basis of BubR1 kinetochore interactions and APC/C-CDC20 inhibition*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14764-76.
125. Izawa, D. and J. Pines, *The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C*. Nature, 2015. **517**(7536): p. 631-4.
126. Primorac, I. and A. Musacchio, *Panta rhei: the APC/C at steady state*. J Cell Biol, 2013. **201**(2): p. 177-89.
127. Overlack, K., et al., *A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint*. Elife, 2015. **4**: p. e05269.
128. Suijkerbuijk, S.J., et al., *Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments*. Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 745-55.
129. Kruse, T., et al., *Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 5): p. 1086-92.
130. Xu, P., et al., *BUBR1 recruits PP2A via the B56 family of targeting subunits to promote chromosome congression*. Biol Open, 2013. **2**(5): p. 479-86.
131. Suijkerbuijk, S.J., et al., *The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase*. Dev Cell, 2012. **22**(6): p. 1321-9.
132. Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon, *The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochore Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 1-11.

133. Zhang, G., et al., *Distinct domains in Bub1 localize RZZ and BubR1 to kinetochores to regulate the checkpoint*. Nat Commun, 2015. **6**.
134. Vader, G. and A. Musacchio, *HORMA domains at the heart of meiotic chromosome dynamics*. Dev Cell, 2014. **31**(4): p. 389-91.
135. Musacchio, A., *Closing the Mad2 cycle*. Elife, 2015. **4**.
136. Luo, X., et al., *The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(4): p. 338-45.
137. Kim, Y., et al., *The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins*. Dev Cell, 2014. **31**(4): p. 487-502.
138. Chao, W.C., et al., *Structure of the mitotic checkpoint complex*. Nature, 2012. **484**(7393): p. 208-13.
139. Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen, *Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 925-36.
140. Faesen, A.C., et al., *Basis of catalytic assembly of the mitotic checkpoint complex*. Nature, 2017.
141. Howell, B.J., et al., *Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation*. J Cell Biol, 2001. **155**(7): p. 1159-72.
142. Raaijmakers, J.A., M.E. Tanenbaum, and R.H. Medema, *Systematic dissection of dynein regulators in mitosis*. J Cell Biol, 2013. **201**(2): p. 201-15.
143. Gassmann, R., et al., *Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells*. Genes Dev, 2010. **24**(9): p. 957-71.
144. Funabiki, H. and D.J. Wynne, *Making an effective switch at the kinetochore by phosphorylation and dephosphorylation*. Chromosoma, 2013. **122**(3): p. 135-58.
145. Howell, B.J., et al., *Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells*. Curr Biol, 2004. **14**(11): p. 953-64.
146. Hiruma, Y., et al., *CELL DIVISION CYCLE. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling*. Science, 2015. **348**(6240): p. 1264-7.
147. Etemad, B. and G.J. Kops, *Attachment issues: kinetochore transformations and spindle checkpoint silencing*. Curr Opin Cell Biol, 2016. **39**: p. 101-8.
148. Espert, A., et al., *PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing*. J Cell Biol, 2014. **206**(7): p. 833-42.
149. Nijenhuis, W., et al., *Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(12): p. 1257-64.
150. Hagan, R.S., et al., *p31(comet) acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(22): p. 4236-46.
151. Yang, M., et al., *p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry*. Cell, 2007. **131**(4): p. 744-55.
152. Miniowitz-Shemtov, S., et al., *Role of phosphorylation of Cdc20 in p31(comet)-stimulated disassembly of the mitotic checkpoint complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(21): p. 8056-60.
153. Eytan, E., et al., *Disassembly of mitotic checkpoint complexes by the joint action of the AAA-ATPase TRIP13 and p31(comet)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(33): p. 12019-24.
154. Wang, K., et al., *Thyroid hormone receptor interacting protein 13 (TRIP13) AAA-ATPase is a novel mitotic checkpoint-silencing protein*. J Biol Chem, 2014. **289**(34): p. 23928-37.
155. Ye, Q., et al., *TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching*. Elife, 2015. **4**.

156. Miniowitz-Shemtov, S., et al., *Mode of interaction of TRIP13 AAA-ATPase with the Mad2-binding protein p31comet and with mitotic checkpoint complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(37): p. 11536-40.
157. Kaisari, S., et al., *Role of CCT chaperonin in the disassembly of mitotic checkpoint complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(5): p. 956-961.
158. Winey, M., et al., *MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication*. J Cell Biol, 1991. **114**(4): p. 745-54.
159. Lauze, E., et al., *Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase*. Embo j, 1995. **14**(8): p. 1655-63.
160. Weiss, E. and M. Winey, *The Saccharomyces cerevisiae spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint*. J Cell Biol, 1996. **132**(1-2): p. 111-23.
161. Hardwick, K.G., et al., *Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption*. Science, 1996. **273**(5277): p. 953-6.
162. Chu, M.L., et al., *Crystal structure of the catalytic domain of the mitotic checkpoint kinase Mps1 in complex with SP600125*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21495-500.
163. Mattison, C.P., et al., *Mps1 activation loop autophosphorylation enhances kinase activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30553-61.
164. Mills, G.B., et al., *Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 16000-6.
165. Hogg, D., et al., *Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 89-96.
166. Douville, E.M., et al., *Multiple cDNAs encoding the esk kinase predict transmembrane and intracellular enzyme isoforms*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(6): p. 2681-9.
167. Poss, K.D., et al., *Mps1 defines a proximal blastemal proliferative compartment essential for zebrafish fin regeneration*. Development, 2002. **129**(22): p. 5141-9.
168. Fischer, M.G., et al., *The mitotic arrest in response to hypoxia and of polar bodies during early embryogenesis requires Drosophila Mps1*. Curr Biol, 2004. **14**(22): p. 2019-24.
169. Espeut, J., et al., *Natural Loss of Mps1 Kinase in Nematodes Uncovers a Role for Polo-like Kinase 1 in Spindle Checkpoint Initiation*. Cell Rep, 2015. **12**(1): p. 58-65.
170. Abrieu, A., et al., *Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint*. Cell, 2001. **106**(1): p. 83-93.
171. Zich, J., et al., *Kinase activity of fission yeast Mph1 is required for Mad2 and Mad3 to stably bind the anaphase promoting complex*. Curr Biol, 2012. **22**(4): p. 296-301.
172. Fisk, H.A. and M. Winey, *Spindle regulation: Mps1 flies into new areas*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. R1058-60.
173. Althoff, F., R.E. Karess, and C.F. Lehner, *Spindle checkpoint-independent inhibition of mitotic chromosome segregation by Drosophila Mps1*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(12): p. 2275-91.
174. Vleugel, M., et al., *Evolution and function of the mitotic checkpoint*. Dev Cell, 2012. **23**(2): p. 239-50.
175. Schittenhelm, R.B., R. Chaleckis, and C.F. Lehner, *Intrakinetochore localization and essential functional domains of Drosophila Spc105*. Embo j, 2009. **28**(16): p. 2374-86.
176. Conde, C., et al., *Drosophila Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation*. EMBO J, 2013. **32**(12): p. 1761-77.
177. Vigneron, S., et al., *Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom?* Mol Biol Cell, 2004. **15**(10): p. 4584-96.
178. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart regeneration in zebrafish*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2188-90.

179. Wills, A.A., et al., *Fgfs control homeostatic regeneration in adult zebrafish fins*. Development, 2008. **135**(18): p. 3063-70.
180. Wei, J.H., et al., *TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7748-57.
181. Petsalaki, E. and G. Zachos, *Chk1 and Mps1 jointly regulate correction of merotelic kinetochore attachments*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 5): p. 1235-46.
182. Yeh, Y.H., et al., *The cell cycle checkpoint kinase CHK2 mediates DNA damage-induced stabilization of TTK/hMps1*. Oncogene, 2009. **28**(10): p. 1366-78.
183. Huang, Y.F., M.D. Chang, and S.Y. Shieh, *TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(11): p. 2935-44.
184. Yu, Z.C., Y.F. Huang, and S.Y. Shieh, *Requirement for human Mps1/TTK in oxidative DNA damage repair and cell survival through MDM2 phosphorylation*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(3): p. 1133-50.
185. Nihira, K., et al., *TTK/Mps1 controls nuclear targeting of c-Abl by 14-3-3-coupled phosphorylation in response to oxidative stress*. Oncogene, 2008. **27**(58): p. 7285-95.
186. Araki, Y., et al., *N-terminal regions of Mps1 kinase determine functional bifurcation*. J Cell Biol, 2010. **189**(1): p. 41-56.
187. Pereira, G., M. Knop, and E. Schiebel, *Spc98p directs the yeast gamma-tubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(4): p. 775-93.
188. Liu, S.T., et al., *Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1638-51.
189. Fisk, H.A., C.P. Mattison, and M. Winey, *Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14875-80.
190. Marquardt, J.R., et al., *Modular elements of the TPR domain in the Mps1 N terminus differentially target Mps1 to the centrosome and kinetochore*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(28): p. 7828-33.
191. Majumder, S., et al., *VDAC3 regulates centriole assembly by targeting Mps1 to centrosomes*. Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3666-78.
192. Pike, A.N. and H.A. Fisk, *Centriole assembly and the role of Mps1: defensible or dispensable?* Cell Div, 2011. **6**: p. 9.
193. Kanai, M., et al., *Physical and functional interaction between mortalin and Mps1 kinase*. Genes Cells, 2007. **12**(6): p. 797-810.
194. Yang, C.H., et al., *Mps1 phosphorylation sites regulate the function of centrin 2 in centriole assembly*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(24): p. 4361-72.
195. Sawant, D.B., et al., *Centrin 3 is an inhibitor of centrosomal Mps1 and antagonizes centrin 2 function*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(21): p. 3741-53.
196. Flachbartova, Z. and B. Kovacech, *Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration*. Acta Virol, 2013. **57**(1): p. 3-15.
197. Fisk, H.A. and M. Winey, *The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication*. Cell, 2001. **106**(1): p. 95-104.
198. Kasbek, C., et al., *Preventing the degradation of mps1 at centrosomes is sufficient to cause centrosome reduplication in human cells*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4457-69.

199. Mangold, U., et al., *Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation and its inhibitor localize to centrosomes and modulate centriole amplification.* *Oncogene*, 2008. **27**(5): p. 604-13.
200. Kasbek, C., C.H. Yang, and H.A. Fisk, *Antizyme restrains centrosome amplification by regulating the accumulation of Mps1 at centrosomes.* *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(22): p. 3878-89.
201. Sliedrecht, T., et al., *Chemical Genetic Inhibition of Mps1 in Stable Human Cell Lines Reveals Novel Aspects of Mps1 Function in Mitosis.* *PLoS One*, 2010. **5**(4).
202. Tighe, A., O. Staples, and S. Taylor, *Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores.* *J Cell Biol*, 2008. **181**(6): p. 893-901.
203. Kwiatkowski, N., et al., *Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function.* *Nat Chem Biol*, 2010. **6**(5): p. 359-68.
204. Santaguida, S., et al., *Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine.* *J Cell Biol*, 2010. **190**(1): p. 73-87.
205. Colombo, R., et al., *Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase.* *Cancer Res*, 2010. **70**(24): p. 10255-64.
206. He, X., et al., *Mph1, a member of the Mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in S. pombe.* *J Cell Sci*, 1998. **111** (Pt 12): p. 1635-47.
207. Gilliland, W.D., *The Multiple Roles of Mps1 in Drosophila Female Meiosis.* 2007. **3**(7).
208. Kemmler, S., et al., *Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling.* *Embo j*, 2009. **28**(8): p. 1099-110.
209. Aravamudhan, P., A.A. Goldfarb, and A.P. Joglekar, *The kinetochore encodes a mechanical switch to disrupt spindle assembly checkpoint signalling.* *Nat Cell Biol*, 2015. **17**(7): p. 868-79.
210. Dou, Z., et al., *Dynamic localization of Mps1 kinase to kinetochores is essential for accurate spindle microtubule attachment.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(33): p. E4546-55.
211. Nijenhuis, W., et al., *A TPR domain-containing N-terminal module of MPS1 is required for its kinetochore localization by Aurora B.* *J Cell Biol*, 2013. **201**(2): p. 217-31.
212. Bischoff, J.R. and G.D. Plowman, *The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis.* *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(11): p. 454-9.
213. Giet, R. and C. Prigent, *Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases.* *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 21): p. 3591-601.
214. Jelluma, N., et al., *Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment.* *Cell*, 2008. **132**(2): p. 233-46.
215. van der Waal, M.S., et al., *Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B.* *EMBO Rep*, 2012. **13**(9): p. 847-54.
216. Elowe, S., *Bub1 and BubR1: at the Interface between Chromosome Attachment and the Spindle Checkpoint.* *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(15): p. 3085-93.
217. Di Fiore, B., et al., *The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators.* *Dev Cell*, 2015. **32**(3): p. 358-72.
218. Diaz-Martinez, L.A., et al., *The Cdc20-binding Phe box of the spindle checkpoint protein BubR1 maintains the mitotic checkpoint complex during mitosis.* *J Biol Chem*, 2015. **290**(4): p. 2431-43.
219. Han, J.S., et al., *Bimodal activation of BubR1 by Bub3 sustains mitotic checkpoint signaling.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(40): p. E4185-93.
220. Jia, L., B. Li, and H. Yu, *The Bub1-Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation.* *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10818.

221. Lischetti, T., et al., *The internal Cdc20 binding site in BubR1 facilitates both spindle assembly checkpoint signalling and silencing*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5563.
222. Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R966-80.
223. London, N. and S. Biggins, *Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint*. Genes Dev, 2014. **28**(2): p. 140-52.
224. Ciliberto, A. and S. Hauf, *Micromanaging checkpoint proteins*. eLife, 2017. **6**.
225. Leng, M., et al., *MPS1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11485-90.
226. Pradhan, A., et al., *Monopolar spindle 1 (MPS1) protein-dependent phosphorylation of RecQ-mediated genome instability protein 2 (RMI2) at serine 112 is essential for BLM-Topo III alpha-RMI1-RMI2 (BTR) protein complex function upon spindle assembly checkpoint (SAC) activation during mitosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 33500-8.
227. Ellis, N.A. and J. German, *Molecular genetics of Bloom's syndrome*. Hum Mol Genet, 1996. **5 Spec No**: p. 1457-63.
228. Neff, N.F., et al., *The DNA helicase activity of BLM is necessary for the correction of the genomic instability of bloom syndrome cells*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(3): p. 665-76.
229. Bloom, D., *Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity*. AMA Am J Dis Child, 1954. **88**(6): p. 754-8.
230. German, J., R. Archibald, and D. Bloom, *CHROMOSOMAL BREAKAGE IN A RARE AND PROBABLY GENETICALLY DETERMINED SYNDROME OF MAN*. Science, 1965. **148**(3669): p. 506-7.
231. Zhu, S., et al., *Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18327-38.
232. Hirschhorn, T., et al., *Differential regulation of Smad3 and of the type II transforming growth factor-beta receptor in mitosis: implications for signaling*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43459.
233. Maachani, U.B., et al., *Modulation of miR-21 signaling by MPS1 in human glioblastoma*. Oncotarget, 2015.
234. Mattison, C.P., et al., *Mip1 associates with both the Mps1 kinase and actin, and is required for cell cortex stability and anaphase spindle positioning*. Cell Cycle, 2011. **10**(5): p. 783-93.
235. Sikorski, R.S., et al., *A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis*. Cell, 1990. **60**(2): p. 307-17.
236. Lee, S., et al., *Characterization of spindle checkpoint kinase Mps1 reveals domain with functional and structural similarities to tetratricopeptide repeat motifs of Bub1 and BubR1 checkpoint kinases*. J Biol Chem, 2012. **287**(8): p. 5988-6001.
237. D'Andrea, L.D. and L. Regan, *TPR proteins: the versatile helix*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(12): p. 655-62.
238. Thebault, P., et al., *Structural and functional insights into the role of the N-terminal Mps1 TPR domain in the SAC (spindle assembly checkpoint)*. Biochem J, 2012. **448**(3): p. 321-8.
239. Sun, T., et al., *Cellular abundance of Mps1 and the role of its carboxyl terminal tail in substrate recruitment*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38730-9.
240. Wang, W., et al., *Structural and mechanistic insights into Mps1 kinase activation*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8b): p. 1679-94.
241. Chu, M.L., et al., *Biophysical and X-ray crystallographic analysis of Mps1 kinase inhibitor complexes*. Biochemistry, 2010. **49**(8): p. 1689-701.
242. Dar, A.C., L.E. Wybenga-Groot, and F. Sicheri, *The Eukaryotic Protein Kinase Domain, in Modular Protein Domains*. 2005, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 181-209.

243. Stucke, V., et al., *Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication*. The EMBO journal, 2002. **21**(7): p. 1723-1732.
244. Beenstock, J., N. Mooshayef, and D. Engelberg, *How Do Protein Kinases Take a Selfie (Autophosphorylate)?* Trends Biochem Sci, 2016.
245. Kang, J., et al., *Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20232-7.
246. Jelluma, N., et al., *Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset*. J Cell Biol, 2010. **191**(2): p. 281-90.
247. Dou, Z., et al., *Dynamic distribution of TTK in HeLa cells: insights from an ultrastructural study*. Cell Res, 2003. **13**(6): p. 443-9.
248. Jia, H., et al., *A putative N-terminal nuclear export sequence is sufficient for Mps1 nuclear exclusion during interphase*. BMC Cell Biol, 2015. **16**.
249. Ossareh-Nazari, B., F. Bachelierie, and C. Dargemont, *Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export*. Science, 1997. **278**(5335): p. 141-4.
250. Zhang, X., et al., *Two LXXLL motifs in the N terminus of Mps1 are required for Mps1 nuclear import during G(2)/M transition and sustained spindle checkpoint responses*. Cell Cycle, 2011. **10**(16): p. 2742-50.
251. Montembault, E., et al., *PRP4 is a spindle assembly checkpoint protein required for MPS1, MAD1, and MAD2 localization to the kinetochores*. J Cell Biol, 2007. **179**(4): p. 601-9.
252. Mitin, N., K.L. Rossman, and C.J. Der, *Identification of a novel actin-binding domain within the Rho guanine nucleotide exchange factor TEM4*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41876.
253. Isokane, M., et al., *ARHGEF17 is an essential spindle assembly checkpoint factor that targets Mps1 to kinetochores*. J Cell Biol, 2016. **212**(6): p. 647-59.
254. Restuccia, A., et al., *Mps1 is SUMO-modified during the cell cycle*. Oncotarget, 2016. **7**(3): p. 3158-70.
255. Dasso, M., *Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis*. Cell Div, 2008. **3**: p. 5.
256. Tauchman, E.C., F.J. Boehm, and J.G. DeLuca, *Stable kinetochore-microtubule attachment is sufficient to silence the spindle assembly checkpoint in human cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 10036.
257. Palframan, W.J., et al., *Anaphase inactivation of the spindle checkpoint*. Science, 2006. **313**(5787): p. 680-4.
258. Ren, B., et al., *E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints*. Genes Dev, 2002. **16**(2): p. 245-56.
259. Cui, Y., et al., *Degradation of the human mitotic checkpoint kinase Mps1 is cell cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 ubiquitin ligases*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32988-98.
260. Hatakeyama, S. and K.I. Nakayama, *U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(4): p. 635-45.
261. Liu, C., et al., *Ubiquitin ligase Ufd2 is required for efficient degradation of Mps1 kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 43660-7.
262. Sivakumar, S., et al., *The human SKA complex drives the metaphase-anaphase cell cycle transition by recruiting protein phosphatase 1 to kinetochores*. Elife, 2016. **5**.
263. Moura, M., et al., *Protein Phosphatase 1 inactivates Mps1 to ensure efficient Spindle Assembly Checkpoint silencing*. Elife, 2017. **6**.
264. Kusakabe, K., et al., *Indazole-based potent and cell-active Mps1 kinase inhibitors: rational design from pan-kinase inhibitor anthrapyrazolone (SP600125)*. J Med Chem, 2013. **56**(11): p. 4343-56.

265. Kusakabe, K., et al., *A unique hinge binder of extremely selective aminopyridine-based Mps1 (TTK) kinase inhibitors with cellular activity*. *Bioorg Med Chem*, 2015. **23**(9): p. 2247-60.
266. Kusakabe, K., et al., *Discovery of imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives: selective and orally available Mps1 (TTK) kinase inhibitors exhibiting remarkable antiproliferative activity*. *J Med Chem*, 2015. **58**(4): p. 1760-75.
267. Naud, S., *Structure-Based Design of*. 2013. **56**(24): p. 10045-65.
268. Hiruma, Y., et al., *Structural basis of reversine selectivity in inhibiting Mps1 more potently than aurora B kinase*. *Proteins*, 2016. **84**(12): p. 1761-1766.
269. Innocenti, P., et al., *Rapid Discovery of Pyrido[3,4-d]pyrimidine Inhibitors of Monopolar Spindle Kinase 1 (MPS1) Using a Structure-Based Hybridization Approach*. *J Med Chem*, 2016. **59**(8): p. 3671-88.
270. Langdon, S.R., et al., *Scaffold-focused virtual screening: prospective application to the discovery of TTK inhibitors*. *J Chem Inf Model*, 2013. **53**(5): p. 1100-12.
271. Gurden, M.D., et al., *Naturally Occurring Mutations in the MPS1 Gene Predispose Cells to Kinase Inhibitor Drug Resistance*. *Cancer Res*, 2015. **75**(16): p. 3340-54.
272. Jelluma, N., et al., *Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes*. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2415.
273. Xu, Q., et al., *Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by Mps1 phosphorylation*. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(1): p. 10-20.
274. Tyler, R.K., et al., *Phosphoregulation of human Mps1 kinase*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 173-81.
275. Dou, Z., et al., *Quantitative mass spectrometry analysis reveals similar substrate consensus motif for human Mps1 kinase and Plk1*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18793.
276. von Schubert, C., et al., *Plk1 and Mps1 Cooperatively Regulate the Spindle Assembly Checkpoint in Human Cells*. *Cell Rep*, 2015. **12**(1): p. 66-78.
277. Golsteyn, R.M., et al., *The family of polo-like kinases*. *Prog Cell Cycle Res*, 1996. **2**: p. 107-14.
278. van de Weerd, B.C. and R.H. Medema, *Polo-like kinases: a team in control of the division*. *Cell Cycle*, 2006. **5**(8): p. 853-64.
279. Santamaria, A., et al., *Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis*. *Molecular biology of the cell*, 2007. **18**(10): p. 4024-4036.
280. Elowe, S., et al., *Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions*. *Genes Dev*, 2007. **21**(17): p. 2205-19.
281. Lera, R.F., et al., *Decoding Polo-like kinase 1 signaling along the kinetochore-centromere axis*. *Nat Chem Biol*, 2016. **12**(6): p. 411-8.
282. Daub, H., et al., *Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle*. *Mol Cell*, 2008. **31**(3): p. 438-48.
283. Hennrich, M.L., et al., *Universal quantitative kinase assay based on diagonal SCX chromatography and stable isotope dimethyl labeling provides high-definition kinase consensus motifs for PKA and human Mps1*. *J Proteome Res*, 2013. **12**(5): p. 2214-24.
284. Santamaria, A., et al., *The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(1): p. M110 004457.
285. O'Connor, A., et al., *Requirement for PLK1 kinase activity in the maintenance of a robust spindle assembly checkpoint*. *Biol Open*, 2015.
286. Desai, A., et al., *KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in C. elegans*. *Genes Dev*, 2003. **17**(19): p. 2421-35.
287. Wong, O.K. and G. Fang, *Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(5): p. 709-19.

288. Wang, X., et al., *Dynamic autophosphorylation of mps1 kinase is required for faithful mitotic progression*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e104723.
289. Lane, H.A. and E.A. Nigg, *Antibody Microinjection Reveals an Essential Role for Human Polo-like Kinase 1 (Plk1) in the Functional Maturation of Mitotic Centrosomes*. The Journal of Cell Biology, 1996.
290. Casenghi, M., et al., *Polo-like Kinase 1 Regulates Nlp, a Centrosome Protein Involved in Microtubule Nucleation*. Developmental Cell, 2003. **5**(1): p. 113-125.
291. Lee, K. and K. Rhee, *PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis*. J Cell Biol, 2011. **195**(7): p. 1093-101.
292. Mardin, B.R., et al., *Plk1 controls the Nek2A-PP1gamma antagonism in centrosome disjunction*. Curr Biol, 2011. **21**(13): p. 1145-51.
293. Kasbek, C., C.-H. Yang, and H.A. Fisk, *Antizyme Restrains Centrosome Amplification by Regulating the Accumulation of Mps1 at Centrosomes*. Molecular Biology of the Cell, 2010. **21**(22): p. 3878-3889.
294. van Vugt, M.A., et al., *Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36841-54.
295. Tipton, A.R., et al., *Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex*. J Biol Chem, 2013. **288**(49): p. 35149-58.
296. Huang, H., et al., *Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit*. J Cell Biol, 2008. **183**(4): p. 667-80.
297. Chu, Y., et al., *Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(4): p. 260-7.
298. Dominguez-Brauer, C., et al., *Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies*. Mol Cell, 2015. **60**(4): p. 524-36.
299. Kops, G.J., D.R. Foltz, and D.W. Cleveland, *Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8699-704.
300. Michel, L., et al., *Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4459-64.
301. Stolz, A., et al., *Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3874-83.
302. Daniel, J., et al., *High levels of the Mps1 checkpoint protein are protective of aneuploidy in breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5384-9.
303. Ling, Y., et al., *Overexpression of Mps1 in colon cancer cells attenuates the spindle assembly checkpoint and increases aneuploidy*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **450**(4): p. 1690-5.
304. Saito-Hisaminato, A., et al., *Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray*. DNA Res, 2002. **9**(2): p. 35-45.
305. Tannous, B.A., et al., *Effects of the selective MPS1 inhibitor MPS1-IN-3 on glioblastoma sensitivity to antimetabolic drugs*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(17): p. 1322-31.
306. Salvatore, G., et al., *A cell proliferation and chromosomal instability signature in anaplastic thyroid carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10148-58.
307. Slee, R.B., et al., *Selective inhibition of pancreatic ductal adenocarcinoma cell growth by the mitotic MPS1 kinase inhibitor, NMS-P715*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(2): p. 307-15.

308. D'Alise, A.M., et al., *Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells*. *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(5): p. 1140-9.
309. Wengner, A.M., et al., *Novel Mps1 Kinase Inhibitors with Potent Antitumor Activity*. *Mol Cancer Ther*, 2016. **15**(4): p. 583-92.
310. Jemaa, M., et al., *Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(11): p. 1532-45.
311. Janssen, A., G.J. Kops, and R.H. Medema, *Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(45): p. 19108-13.
312. Maia, A.R., et al., *Inhibition of the spindle assembly checkpoint kinase TTK enhances the efficacy of docetaxel in a triple-negative breast cancer model*. *Ann Oncol*, 2015. **26**(10): p. 2180-92.
313. Martinez, R., et al., *Mitotic Checkpoint Kinase Mps1 Has a Role in Normal Physiology which Impacts Clinical Utility*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0138616.
314. Olesen, S.H., T. Thykjaer, and T.F. Orntoft, *Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity*. *Carcinogenesis*, 2001. **22**(5): p. 813-5.
315. Ahn, C.H., et al., *Mutational analysis of TTK gene in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability*. *Cancer Res Treat*, 2009. **41**(4): p. 224-8.
316. Xie, Y., et al., *Mps1/TTK: a novel target and biomarker for cancer*. *Journal of Drug Targeting*, 2017. **25**(2): p. 112-118.
317. Potapova, T. and G. Gorbsky, *The Consequences of Chromosome Segregation Errors in Mitosis and Meiosis*. *Biology*, 2017. **6**(1): p. 12.
318. Aravamudhan, P., et al., *Dual mechanisms regulate the recruitment of spindle assembly checkpoint proteins to the budding yeast kinetochore*. *Mol Biol Cell*, 2016. **27**(22): p. 3405-3417.
319. Hervas-Aguilar, A. and J.B. Millar, *Mph1/MPS1 checks in at the kinetochore*. *Cell Cycle*, 2016. **15**(10): p. 1313-4.
320. Koch, A., et al., *Molecular basis underlying resistance to Mps1/TTK inhibitors*. *Oncogene*, 2015. **35**(19): p. 2518-2528.
321. Chmielewska, A.E., N.H. Tang, and T. Toda, *The hairpin region of Ndc80 is important for the kinetochore recruitment of Mph1/MPS1 in fission yeast*. *Cell Cycle*, 2016. **15**(5): p. 740-7.

ANNEXES

Review

PLAYING POLO DURING MITOSIS: PLK1 TAKES THE LEAD

Guillaume Combes^{1,2}, Ibrahim Alharbi^{1,2}, Luciano Gama Braga^{1,2}, Sabine Elowe^{1,2,3}

- 1- Program in Molecular and Cellular biology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.
- 2- Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada.
- 3- Axe of Reproduction, Mother and Youth Health, CHU de Québec Research Centre, Quebec City, Quebec, Canada.

Correspondance : Dr S Elowe, Département de Pédiatrie, Université Laval, 2705, boulevard Laurier, T3-67, Québec City, Québec, Canada G1V 4G2. E-mail: Sabine.Elowe@crchudequebec.ulaval.ca

Received 30 January 2017; revised 16 March 2017; accepted 18 March 2017
Oncogene advance online publication, 24 April 2017;
doi:10.1038/onc.2017.113
Oncogene (2017), 1–9 © 2017 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved 0950-9232/17 www.nature.com/onc

Résumé

Polo like kinase 1 (PLK1) fait partie des kinases sérine/thréonine et est le membre type de la famille polo like ; c'est un régulateur central de la mitose et de la cytotérièse chez les eucaryotes. Plusieurs niveaux de régulation ont évolué pour cibler PLK1 vers différentes structures intracellulaires et ses divers substrats mitotique en adéquation avec ses nombreuses fonctions pendant la mitose. Le travail collectif commence à mettre à jour un groupe de substrats pour PLK1 : les kinases mitotiques qui ensemble vont assurer la fidélité du processus de division cellulaire. Parmi celle-ci, des découvertes récentes affirment que PLK1 régule l'activité des kinases Aurora B et Haspin pour définir l'identité du centromère, de MPS1 pour initier la signalisation du point de contrôle de la mitose et de BUB1 et son paralogue pseudokinase BUBR1 pour coordonner l'activation et la désactivation du point de contrôle. Ici nous passons en revue les travaux récents décrivant la régulation de ces kinases par Plk1. Nous mettons en évidence des thèmes communs et soutenons qu'une fonction mitotique majeur de PLK1 est d'agir en tant que régulateur principal de ces kinases clés.

Abstract

Polo-like kinase 1 (PLK1), the prototypical member of the polo-like family of serine/threonine kinases, is a pivotal regulator of mitosis and cytokinesis in eukaryotes. Many layers of regulation have evolved to target PLK1 to different subcellular structures and to its various mitotic substrates in line with its numerous functions during mitosis. Collective work is starting to illuminate an important set of substrates for PLK1: the mitotic kinases that together ensure the fidelity of the cell division process. Amongst these, recent developments argue that PLK1 regulates the activity of the histone kinases Aurora B and Haspin to define centromere identity, of MPS1 to initiate spindle checkpoint signaling, and of BUB1 and its pseudokinase paralog BUBR1 to coordinate spindle checkpoint activation and inactivation. Here, we review the recent work describing the regulation of these kinases by PLK1. We highlight common themes throughout and argue that a major mitotic function of PLK1 is as a master regulator of these key kinases.

INTRODUCTION

Cell cycle progression is regulated by post-translational modifications, with reversible phosphorylation being arguably the most dynamic of these. Protein kinases and phosphatases collectively balance the level of phosphorylation of key substrates to ensure an accurate and timely transition of the cell cycle.^{1,2} Often, kinases or phosphatases are themselves regulated by phosphorylation, resulting in complex regulatory networks with multiple feedback loops.³ In mitosis, a set of highly conserved kinases is responsible for the overall control of these regulatory networks including the polo-like kinases (PLKs).⁴⁻⁶ Since its discovery almost 30 years ago in *Drosophila*, the polo-like kinase (PLK) family has risen to the ranks as a driving force in cell cycle progression in both meiosis and mitosis. PLKs are well conserved between species, with at least one PLK family member present from fungi to humans, but are conspicuously absent in plants and a number of protozoan parasites.^{4,6} Five PLKs have been discovered in humans; they appear to be for the most part functionally distinct with little or no overlap in substrates.⁷ In all organisms that do have PLKs, the single family member (for example *cdc5* in *S.cerevisiae*) or multiple family members (at least PLK1 and PLK4 in humans) assist in the execution of cell division.

PLKs consist of an N-terminal Ser/Thr kinase domain and the characteristic two polo box regions in the C terminus. The exceptions in humans are PLK4 which has a cryptic polo box region that includes 2 polo boxes and a third bona fide polo box, and PLK5 which lacks a functional kinase domain.⁷ The two polo boxes of PLK proteins fold together to form a functional polo box domain (PBD), that binds principally to phosphorylated peptides but may also associate with partners in a phosphor-independent manner.⁸⁻¹⁰

In humans, the most pleiotropic of the PLKs is surely PLK1, which directs a remarkable number of functions across the cell cycle, and several excellent recent reviews have provided in-depth perspectives on the role of PLK1 in the cell cycle and beyond.^{6,7,11-13} Most recently, PLK1 has been shown to have a role

in maintaining an active spindle assembly checkpoint (SAC) response. The SAC is a signaling cascade that ascertains the integrity of the attachments between the mitotic spindle and chromatids at kinetochores, subsequently delaying the transition to anaphase allowing time for correction of attachment errors.^{14,15} PLK1 performs its functions coordinately and in conjunction with other major mitotic kinases, several of which have been shown to be themselves substrates of PLK1, and through mechanisms that often involve positive and negative feedbacks. Here, we highlight recent advances in the relationship between PLK1 and the kinases critical for mitotic progression and the SAC, namely Haspin, Aurora B, Monopolar Spindle 1 (MPS1), budding uninhibited by benzimidazole 1 (BUB1), and its pseudokinase paralog BUB1-related 1 (BUBR1), and argue that the common role of PLK1 is to ensure their timely and efficient activation and functioning. Much of the emergent evidence is largely due to the development of a number of PLK inhibitors, and we highlight the contribution of these where relevant.

PLK1 AND CENTROMERE ESTABLISHMENT

The breadth of PLK1 substrates identified in mitosis suggests that several centromere and kinetochore pools of PLK1 must exist, in addition to a centrosome-associated population. Recently, the bulk pool of PLK1 has been proposed to be at the centromere and inner kinetochore;¹⁶ indeed PLK1 functions at chromatin and the inner centromere in a manner distinct from its roles in chromosome attachment at outer kinetochore.¹⁶ Somewhat surprisingly, centromere-localized PLK1 greatly contributes to ensuring accurate chromosome alignment at metaphase and preventing lagging chromosomes at anaphase,¹⁶ although it is clear that outer kinetochore PLK1 substrates also contribute to these functions.¹⁷ PLK1 promotes catalytic activation of at least two kinases, Aurora B and Haspin in early mitosis. These kinases, together with another PLK1-regulated kinase, BUB1, function to establish the centromere as defined by recruitment of the chromosomal passenger complex (CPC). The evolutionarily conserved CPC, consisting of the Aurora B kinase, the scaffolding protein inner centromere protein (INCENP), and two other non-enzymatic subunits Survivin

and Borealin, is a major regulator of mitosis and cytokinesis.¹⁸⁻²³ The remarkable range of activities covered by the CPC is, like PLK1, due in part to its dynamic localization throughout mitosis.

AURORA B

The regulation of Aurora B activity is extremely complex and occurs at multiple levels, in line with its pleiotropic functions and diverse localization which has been expertly reviewed elsewhere.^{21,23-25} Although the exact mechanisms may differ depending on cell type or organisms, emergent evidence indicates that PLK1 contributes to optimal Aurora B activation.

Treatment of cancer and primary cell lines with the PLK1 inhibitors BI 6727 and BI 2536 elicits a biphasic response where an accumulation of mitotic cells due to monopolar spindles occurs at low levels of PLK1 inhibition whereas mitotic exit occurs at higher levels of inhibition.²⁶ The ability of PLK1 to sustain a mitotic arrest was attributed at least in part to the maintenance of Aurora B centromere levels and activity. Treatment with high doses of BI 6727 and BI 2536 reduced Aurora B levels but also further reduced its autophosphorylation, and phosphorylation of the Aurora B substrate Histone 3 Serine10 (H3S10p), suggesting that Aurora B activity is attenuated under these conditions.²⁶ Importantly, this effect is mimicked by chemically distinct PLK inhibitors; GW843682X caused a decrease in phosphorylation of another Aurora B substrate, CenpA-S7p,²⁷ and DAP-81 induced dephosphorylation of an Aurora B centromere fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensor.²⁸ The data are consistent with previous reports demonstrating a role for PLK1 in Aurora B centromere recruitment in normal diploid cells.²⁹

A caveat of inhibitor experiments is of course the potential for off-target activity. Indeed BI 2536 and BI 6727 have been shown in vitro to inhibit PLK1, 2 and 3, although both compounds reproduce mitotic phenotypes consistent with PLK1 depletion by RNA interference (RNAi),¹³ and BI 2536 is known to regulate transcriptional activity through inhibiting BRD4.^{30,31} Moreover, both compounds

mediated loss of Aurora B levels and activity at concentrations that did not affect Aurora B activity itself when tested in vitro.²⁶ In addition, in checkpoint-arrested cells, treatment with an analog-sensitive PLK1 which shows a profound resistance to BI 253632 did not affect Aurora B activity or localization, whereas similar treatment of PLK1 wild-type isogenic lines caused a decrease of Aurora B kinetochore levels and markers of its activity. Thus, at the concentrations of inhibitors that elicit attenuation of Aurora B activity and homeostasis, the likely target remains PLK1.

The regulation of Aurora B activity and CPC localization appears to be conserved, at least in *Drosophila* where Polo (the PLK orthologue in flies) is required for the correct localization of the CPC in spermatocytes, larval neuroblasts,³³ and tissue culture cells.³⁴ Notably, and in agreement with observations in human cells, significant reduction of Polo activity was required for a robust reduction in CPC localization and function; partial inhibition of kinase activity resulted in a majority of spermatocytes exhibiting mild or no defects, whereas further decreasing the level of Polo kinase resulted in a significant increase in the proportion of cells showing the most extreme defects.³³ In contrast to these observations, treatment of the non-transformed RPE1 cells with the PLK1 inhibitor TAL or with BI 2536 alone did not significantly decrease Aurora B localization or activity in a number of assays.³⁵ Moreover, two independent large scale phosphoproteomics screens for PLK1 substrates during mitosis that relied on different inhibitors and PLK1 depletion by inducible shRNA independently concluded that phosphorylation by Aurora A rather than Aurora B, may be broadly regulated by PLK1 activity.^{36,37} Thus, while the effect of PLK1 activity on Aurora B activation and localization appears to be conserved between cell lines and organisms, some exceptions have been identified. As the Aurora B response to PLK1 appears to be graded, the relative contribution may be a reflection of the extent of PLK1 activity in a particular context, but also the relative activity of the phosphatases and site accessibility to these phosphatases, all of which contributes to a distinct activity threshold. The two major mitotic protein phosphatases PP1 and PP2A are exquisitely regulated by Aurora B and

PLK1 through mechanisms that are just starting to be explored.³⁸⁻⁴¹ In addition, PLK1 activity at kinetochores is itself promoted by Aurora B (and Aurora A) which phosphorylates the PLK1 T-loop in flies and human cells.^{42,43} The potential for feedbacks between PP1, PP2A, PLK1 and Aurora B will be an important topic of future research.

Mechanisms of Aurora B regulation by PLK1

PLK1 reportedly regulates Aurora B at the level of its expression, localization and through indirect stimulation of its activity. The transcription factor Forkhead Box M1 (FoxM1) is important in regulating mitotic entry and subsequent execution of the mitotic program by controlling the expression of a cluster of G2/M target genes,⁴⁴⁻⁴⁸ including PLK1 and Aurora B. FoxM1 activity is in turn enhanced by PLK1 phosphorylation, resulting in a positive feedback loop. At the G2/M transition, CDK1 priming phosphorylation promotes PBD-dependent binding of PLK1 to FoxM1 and its subsequent phosphorylation in the transcription activation domain. This phosphorylation results in enhanced FoxM1 activity and increased expression of both PLK1 and Aurora B.⁴⁴ Inhibition of PLK1 with BI 6727, BI 253626 or ON0191044 in various cell types, or expression of a non-phosphorylatable FoxM1 results in decreased transcription of Aurora B.

PLK1 has also been proposed to stimulate Aurora B activity via phosphorylation of at least 2 subunits of the CPC, INCENP and Survivin. Firstly, CDK1 phosphorylates INCENP generating a PBD binding site for the PLK1 interaction with INCENP, which localizes a significant pool of PLK1 to the vicinity of Aurora B, and thus, potentially, its substrates.⁴⁹ Indeed in *Xenopus laevis*, phosphorylation of the microtubule depolymerase MCAK by PLK1 appears to prime it for Aurora B phosphorylation, which activates MCAK depolymerization of microtubules and allows for error correction. PLK1 also directly phosphorylates Survivin on S20 in humans,^{28,50} and expression of survivin-S20A resulted in a reduction of centromeric Aurora B kinase activity as measured by a FRET-based Aurora B sensor. In contrast, the phosphomimetic SurvivinS20D could sustain

Aurora B activity at increasing concentrations of BI 2536,²⁶ confirming that PLK1-phosphorylated Survivin contributes to Aurora B kinase activity.

PLK1 therefore contributes to Aurora B activation through multiple inputs (**Figure 1**), although the exact mechanisms may not be widely conserved. MCAK priming phosphorylation has only been observed in frog extracts, and S20 of Survivin is not well conserved. Moreover, exactly how PLK1-mediated phosphorylation of the individual CPC components affects Aurora B activity remains unclear and will require detailed structural and biochemical studies, and neither Aurora B localization nor the integrity of the CPC interactions was addressed in these studies. Notably, PLK1 inhibition only partially reduces Aurora B activity and kinetochore localization, consistent with the existence of multiple and redundant mechanisms promoting Aurora B tethering and activation.

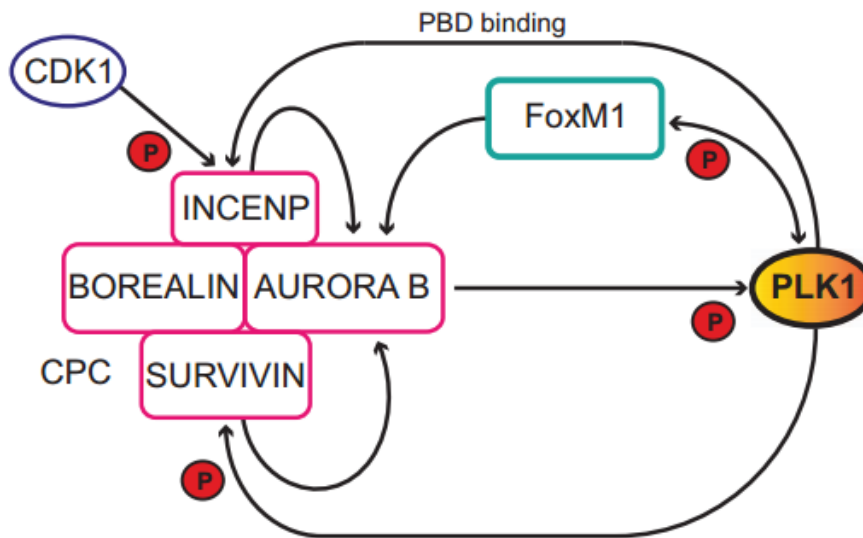


Figure 1: PLK1 activates Aurora B through multiple inputs.

PLK1 may activate Aurora B through phosphorylation and activation of the FoxM1 transcription factor which drives a mitotic gene expression program that includes Aurora B and PLK1 itself. PLK1 can activate Aurora B through binding to (as shown for INCENP) and phosphorylation of (as shown for Borealin) components of the CPC. How PLK1 regulates Aurora B localization is unclear but may contribute to this indirectly through modulation of Aurora B activity which is itself required for optimal localization.

Haspin

Haspins are atypical protein kinases that are conserved in many eukaryotic lineages including animals, fungi and plants.^{51,52} Haspin depletion or chemical inhibition in human cell lines causes premature loss of centromere cohesin, failure of metaphase chromosome alignment, and SAC-dependent mitotic delay.⁵³⁻⁵⁵ An important development in understanding centromere identity and function was the identification of Haspin as the major histone H3 threonine 3 (H3T3) kinase during mitosis. The overlap between the H3T3p mark generated by Haspin and histone H2A phosphorylation at threonine 120 (H2AT120p) generated by BUB1 is a major determinant of centromere identity.⁵⁶ Collectively, these provide the direct binding interfaces for the CPC in mitosis. Moreover, an important consequence of proper Aurora B positioning is the establishment of a positive feedback loop in which Aurora B further stimulates Haspin activity.⁵⁷

Inhibition of PLK1 by either BI 2536 or GSK461364A caused a mobility shift of Haspin in gels, accompanied by reduced phosphorylation in mitosis.⁵⁸ The mechanism of PLK1-mediated Haspin phosphorylation and activation has been recently described in *Xenopus* and human cells.⁵⁹ Although the activation loop of Haspin harbors an evolutionarily conserved potential PLK1 target site, its mutation did not alter xHaspin's capacity to phosphorylate H3T3 in egg extracts,⁶⁰ consistent with a mechanism of Haspin activation that is independent of activation loop phosphorylation, implying that it might be constitutively active.^{61,62} Nevertheless, phosphorylation of H3T3, the only known physiological substrate other than Haspin itself, is limited to mitosis. This paradox was explained by the demonstration that Haspin is autoinhibited outside mitosis, and this autoinhibition is relieved specifically upon G2/M transition through phosphorylation of Haspin by PLK1 (**Figure 2**).

Haspin autoinhibition outside mitosis is ascribed to the conserved region in Haspin just upstream of the kinase domain known as the Haspin basic inhibitory segment (HBIS). The HBIS is rich in positively charged residues,

suggesting it may be involved in electrostatic interactions.⁶⁰ In *Xenopus*, deletion of the HBIS from xHaspin lacking the N terminus not only restored its capacity to phosphorylate H3T3 in metaphase extracts depleted of endogenous xHaspin, but also promoted H3T3 phosphorylation in interphase extracts indicating that the HBIS is responsible for maintaining Haspin in an inactive conformation (**Figure 2a**). Upon mitotic entry, CDK1 phosphorylation in the N-terminal PBD binding site of Haspin promotes the interaction with PLK1 and subsequent Haspin phosphorylation^{58,60} (**Figure 2b**). Disrupting this interaction and Haspin phosphorylation by inhibiting PLK1 with BI 2536 or GSK461364A, deleting the PBD binding motif, or mutating PLK1 target residues in Haspin considerably reduced H3T3p, confirming a function for PLK1 as an upstream activator of Haspin.^{58,60} Deleting the HBIS bypassed the requirement for the PBD docking site on Haspin in H3T3 phosphorylation, suggesting that a major function of PLK1 phosphorylation is to displace the HBIS away from Haspin kinase domain thereby establishing an active enzyme.⁶⁰

The interaction mode of the HBIS peptide is complex, and a model proposed by Gheniou et al. suggests that in the autoinhibited state, the HBIS peptide interacts with the kinase domain of Haspin in a sequence-dependent and phosphorylation-independent manner, whereas in mitosis, PLK1-mediated phosphorylation in the N-terminal region of Haspin efficiently displaces the autoinhibitory interaction, likely through electrostatic interaction between the positively charged HBIS and the negatively charged phosphorylated N-terminal domain. This bimodal mechanism of activation is supported by peptide binding studies that showed HBIS peptide interaction with the kinase domain of Haspin was significantly enhanced when the HBIS region was deleted, and that binding of the HBIS peptide to an N-terminal fragment of xHaspin is sensitive to PLX1 inhibition in egg extracts. In agreement, mutational analysis of several combinations of phosphorylation sites in the N terminus of Haspin attenuated Haspin activity. Altogether, it appears that significant phosphorylation of the Haspin N terminus by PLK1, and perhaps by Haspin itself, is required for its full mitotic activation.

PLK1 may also regulate Haspin activity indirectly through control of its localization. Recently, in *Xenopus* egg extracts PLK1 binding and increased mitotic phosphorylation of Haspin was shown to stabilize an interaction between Haspin and SUMOylated topoisomerase IIA (TOP2A) at centromeres, and promote Haspin centromeric localization.⁶³ Mutation of 2 SUMO interaction motifs on TOP2A and the PBD binding site on Haspin individually decreased centromeric Haspin levels, and the effect was additive in the combined mutant.⁶³ Strikingly, the budding yeast ortholog of TOP2A, Topo II, also promotes enrichment of H3T3p in a manner dependent on the *S. cerevisiae* Haspin homologs Alk1 and Alk2,⁶⁴ suggesting conservation of this pathway.

In addition to TOP2A, cohesion components may be important for Haspin localization in human cells in particular during early mitosis when Haspin and H3T3p along chromosome arms are observed in human cells.⁵⁶ Because PLK1 activity in early mitosis removes cohesin from chromosome arms via the prophase pathway,⁶⁵ PLK1 may serve to concentrate Haspin at centromeres simply by removing it from the arms. Thus, through promoting cohesion removal through the prophase pathway and promoting the association with the SUMOylated C-terminal domain of TOP2A, PLK1 plays a dual role in concentrating Haspin protein and activity to the centromere.

PLK1 REGULATION OF THE SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT

A definitive role for PLK1 in late mitosis was initially difficult to demonstrate because PLK1 depletion results in an early mitotic arrest with monopolar spindles. The emergence of small-molecule PLK inhibitors and chemical genetics approaches to the inhibition of PLK1 was an important development that allowed fine-tuned temporal control of PLK1 inhibition and revealed roles for PLK1 in late mitotic events like SAC signaling and cytokinesis.^{35,66,67} Mechanistic insight has recently emerged into PLK1 function at the outer kinetochore in prometaphase and metaphase where it functions in attaching chromosomes to the spindle microtubules^{68,69} and the spindle checkpoint.^{16,35,40,70} Amongst its substrates at the outer kinetochore, PLK1

contributes to the activation and functional regulation of the checkpoint kinases MPS1 and BUB1, and is an important signaling partner of the BUB1 pseudokinase paralog BUBR1.

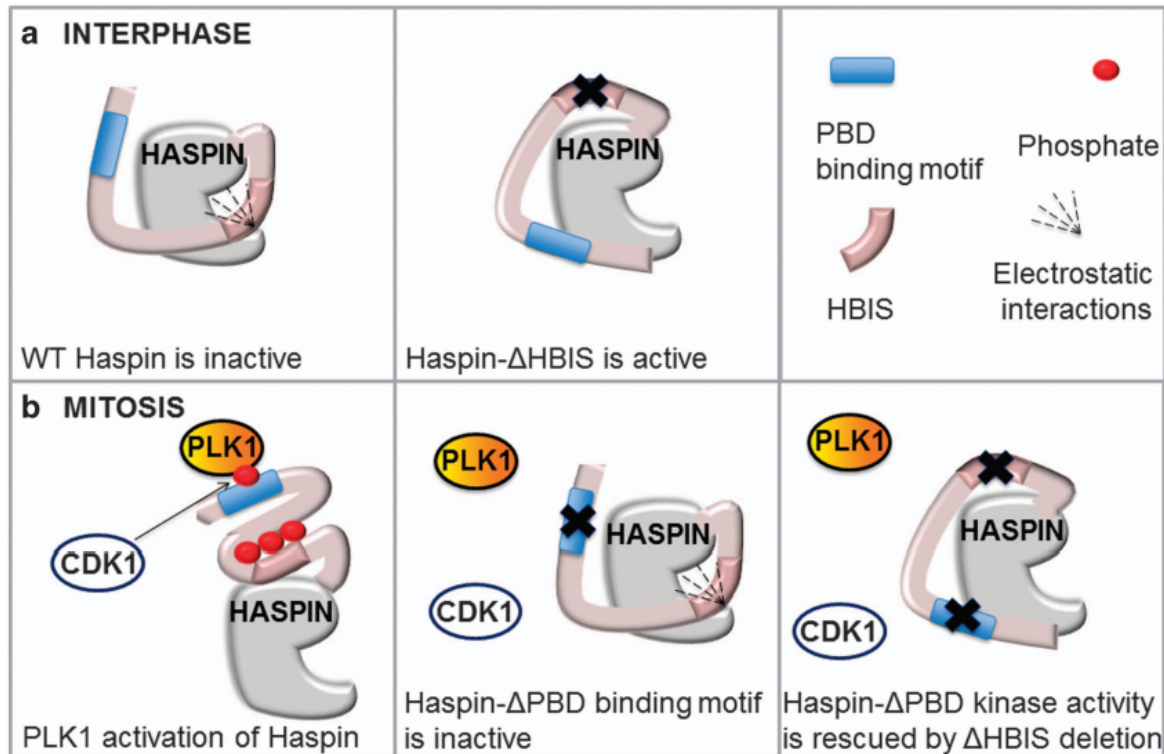


Figure 2: Autoinhibited Haspin is directly activated by PLK1 phosphorylation. (a) Haspin is held in an inactive conformation during interphase, and this autoinhibition can be relieved by deletion of the HBIS. (b) During mitosis, CDK1-primed PLK1 binding and phosphorylation of Haspin relieves Haspin autoinhibition. Deletion or mutation of the PBD binding site on Haspin severely attenuates its activity. Haspin activity can be restored by simultaneously mutating the PBD binding site and the HBIS.

MPS1

MPS1 (also known as TTK in humans) is a conserved dual specificity kinase first identified in budding yeast as being important for the duplication of the spindle pole body.⁷¹ MPS1's most conserved function, however, is during mitosis where it is essential for the establishment of the SAC and chromosome congression.⁷²⁻⁷⁴ In human cells and yeasts, MPS1 activity is paramount to mounting a full SAC at unattached kinetochores through phosphorylation of MELT motifs (for the consensus sequence M/I/L/V-E/D-M/I/L/V-T) on Kinetochores-Null-1 (KNL1).⁷⁵⁻⁷⁷ KNL1 is a protein of the KNL1-Mis12-NDC80 (KMN) complex which acts as the

principal scaffold for SAC components and contributes to kinetochore-microtubule attachment.^{78,79} MELT motif phosphorylation is essential for the recruitment of BUB1 and BUBR1 to unattached kinetochores, subsequent loading of the most downstream SAC components MAD1 and MAD2, the formation of the major APC/C inhibitor, the mitotic checkpoint complex (MCC) and consequent activation of the SAC.⁷⁹⁻⁸¹ MPS1 recruitment to kinetochores is important for these functions and has been reported to occur through a direct interaction with the NDC80 complex; the MPS1 N-terminal extension (NTE) interacts with the calponin homology (CH) domain of HEC1 in humans,^{82,83} and through the HEC1 hairpin⁸⁴ in fission yeast, whereas the middle region of human MPS1 binds to the CH domain of Nuf2. More recently, the nucleotide exchange factor ARHGEF17 (also known as TEM4) has also been shown to directly bind to MPS1 and regulate its activity and localization in human cells.⁸⁵

In *Drosophila*, Polo lies at the top of the SAC pathway to promote efficient recruitment of MPS1 to unattached kinetochores. Depletion of Polo, both in fly S2 cells and neuroblasts, markedly reduced MPS1 kinetochore accumulation and activation, which may be at least in part due to the inefficient assembly of the NDC80 complex at outer kinetochores.⁸⁶ *Drosophila* MPS1 kinase recruits MAD1 and MAD2 and controls SAC functionality as in other organisms, but due to non-functional MELT-like motifs in Spc105 (the *Drosophila* ortholog of KNL1) MPS1 is not required for the recruitment of BUB1 and BUBR1 in fruit flies.^{87,88} MPS1 localization instead, promotes hyperphosphorylation of BUBR1 and formation of the 3F3/2 phosphoepitope,⁸⁶ a marker for kinetochore tension, which then supports the recruitment and localization of CDC20 at kinetochores and MCC formation,⁸⁶ essentially mimicking MPS1 function in higher eukaryotes. Direct Polo targets essential for MPS1 recruitment are unknown, but may include outer and inner kinetochore components required for robust kinetochore assembly.^{33,86,89}

The relationship between PLK1 and MPS1 orthologs in higher eukaryotes may be more complex. In human cells MPS1 activity promotes its own

dissociation from the kinetochores,⁹⁰⁻⁹² and this appears to be further enhanced by PLK1, likely through a positive effect on MPS1 activity or potentially through direct phosphorylation of the MPS1 NTE, although this remains to be formally shown.³⁵ MPS1 and PLK1 share a similar consensus motif,^{93,94} and some MPS1 autophosphorylation sites in the N terminus can also be targeted by PLK1.⁹⁵ In agreement with this, inhibition of PLK1 by TAL resulted in a significant increase in MPS1 levels at kinetochores, and this was further enhanced by co-inhibition of MPS1 suggesting that not all phosphorylation sites are shared between MPS1 and PLK1. Individual inhibition of PLK1 and MPS1 increased significantly both turnover half-time and the percentage immobile fraction of MPS1, and this effect was additive when both kinases were simultaneously inhibited.³⁵ Genetic ablation of the MPS1 locus in non-transformed hTERT-RPE cells⁹⁶ or immunodepletion of MPS1 from *Xenopus* extracts⁹⁷ attenuated PLK1 kinetochore levels in these systems, suggesting a reciprocal relationship may also exist.

Independent of its role in MPS1 kinetochore tethering, PLK1 may also promote MPS1 kinase activity. PLK1 directly phosphorylated MPS1 and was able to rapidly stimulate MPS1 autophosphorylation *in vitro*.³⁵

	483
Homo sapiens	CQLSTPYGQP
Macaca fascicularis	CQLSTPYGQP
Rattus norvegicus	CPSSTPYSQL
Mus musculus	CPSSTPYSQL
Canis canis	CQLSTPYSQL
Gallus gallus	YQISTPYSQL
Xenopus laevis	AQMSTPYNNR
Latimeria chalumnae	SQISTPYNYP

Figure 3: A conserved potential PBD binding site in Mps1 proteins.

Alignment of Mps1 homologs from a select group of higher eukaryotes showing conservation of the putative PBD binding motif. The numbering corresponds to the T483 in human Mps1.

Individual inhibition of PLK1 and MPS1 partially suppressed phosphorylation of the MPS1 activation loop phosphorylation, and dual inhibition reduced the phosphorylation to below the detection limit. How PLK1 can phosphorylate and activate MPS1 is not clear, but it is noteworthy that a potential PBD docking site is well conserved in MPS1 orthologs in *Xenopus*, fish, and mammals (**Figure 3**), although phosphorylation and functionality of this motif await demonstration.

PLK1 and MPS1 cooperativity in the SAC

Evidence for overlap between MPS1 and PLK1 phosphorylation first came from Dou et al. who identified MPS1 autophosphorylation sites in mitosis by quantitative mass spectrometry.⁹³ Intriguingly, loss of phosphorylation of some putative MPS1 autophosphorylation sites was observed after inhibition of either PLK1 by TAL or MPS1 by SP600125 suggesting that these kinases may share a substrate preference. Indeed, sites sensitive to the MPS1 inhibitor SP600125 and previously reported autophosphorylation sites suggested MPS1 preference for E/D/N/Q at the -2 position relative to the target site, strikingly similar to the recently broadened PLK1 consensus motif L-Φ-D/E/N(Q)-X-S/T-L-Φ.³⁷ In vitro phosphorylation by PLK1 of a number of sites matching this consensus on MPS1 itself was observed, including a number of annotated MPS1 autophosphorylation sites.³⁵ Sensitivity to PLK1 inhibition of a subset of these sites was independently confirmed in vivo^{93,98} and in vitro^{99,100} This suggests that under certain circumstances PLK1 and MPS1 may cooperate to ensure essential execution of mitosis through targeting of an overlapping set of sites on essential targets, indicating a certain level of promiscuity.

One consequence of this substrate-sharing, is that PLK1 and MPS1 cooperate to maintain the SAC in human cells. In vitro phosphorylation indicated that most MELT motifs can be targeted by PLK1.⁷⁷ Thus, PLK1 and MPS1 likely collaborate in ensuring phosphorylation of essential SAC proteins such as KNL1 and MPS1 itself, and ensuring optimal SAC signaling. The extent of this

cooperation may be inherent to differences in cell lines or developmental stage.¹⁰¹ Indeed, an extreme example of the division of labor between PLK1 and MPS1 occurs in a subset of the nematode lineage that includes *Caenorhabditis elegans* which naturally lacks MPS1 kinase^{102,103} but has retained the KNL1 MELT motifs. In this case, PLK1 substitutes entirely for MPS1 in MELT repeat phosphorylation,⁷⁵⁻⁷⁹ BUB1 recruitment, and maintenance of checkpoint arrest.⁷⁰

The evolutionary adaptation of PLK1 to function as a replacement of MPS1 (when it is absent) represents an important discovery in our understanding of SAC signaling but leads to several additional questions. For example, PLK1 is present at different pools across the sister chromatid pair but no direct interaction has been reported between PLK1 and KNL1. The exact pools of PLK1 required for MELT phosphorylation remain unclear. Another important question is whether the overlap in MPS1 and PLK1 substrates pertains only to a small select group of substrates such as KNL1, or whether other MPS1 substrates also serve as potential PLK1 targets. Interestingly, MPS1 has been proposed to phosphorylate Borealin at one site that fits the consensus, resulting in enhanced Aurora B activation and proper chromosome alignment⁷⁴ but whether PLK1 can also phosphorylate this residue is unknown. A related question is whether the relationship is reciprocal; can MPS1 phosphorylate known PLK1 target sites? Both MPS1 and PLK1 have been proposed to phosphorylate BUBR1.^{68,104-106} BUBR1 phosphorylation by PLK1 in the kinetochore alignment regulatory domain (KARD) promotes chromosome congression and may contribute to SAC silencing (see below). Whether MPS1 can collaborate with PLK1 to ensure timely phosphorylation of the KARD is unknown. Finally, the identification of cooperativity between PLK1 and MPS1 at the kinetochore makes it tempting to speculate about the convergence of their roles and functions at the centrosome. PLK1 promotes centrosome maturation^{107,108} and centrosome disjunction/separation.¹⁰⁹ In higher eukaryotes, the role of MPS1 at the centrosome remains controversial, and it will be interesting to determine whether such a function at centrosomes may become more penetrant in cells sensitized by PLK1 inhibition.

BUBR1

The pseudokinase BUBR1 was identified as a PLK1 substrate by several groups almost concurrently.^{68,105,110} BUBR1 is a major player in SAC signaling and is implicated in both initiating and terminating the SAC. Direct binding between BUBR1 and PLK1 or Plx1 occurs through a classical and well conserved PBD docking site and is enhanced by CDK1 priming phosphorylation.^{68,106} In *Xenopus*, phosphorylation of BUBR1 by Plx1 creates the 3F3/2 epitope.¹⁰⁶ In human cells, PLK1 phosphorylates BUBR1 at T792, T1008, S676, T680, and possibly T608,^{68,69,105} and is required for the characteristic mitotic hyperphosphorylation of BUBR1. Independent of phosphorylation, PLK1 may be responsible for BUBR1 kinetochore docking which is essential for its phosphorylation.^{35,70} PLK1 orthologs also promote the phosphorylation—directly or indirectly—of BUBR1 homologs in budding yeast and flies,^{86,111} suggesting that PLK1 is an evolutionarily conserved modulator of BUBR1.

In human cells, evidence suggests that PLK1 phosphorylation of BUBR1 may be involved in two key integrated events required for mitotic exit: stabilization of kinetochore–microtubule interactions and SAC inactivation. Loss of the BUBR1–PLK1 interaction results in poorly aligned chromosomes and unstable kinetochore–microtubule attachments.⁶⁸ This effect is due, at least in part, to loss of interaction between BUBR1 and the B56 specificity subunit of PP2A. BUBR1 phosphorylation in the central KARD at S676 and T680 by PLK1^{68,69} and at S670 by CDK1112 promotes recruitment of a subpopulation of B56-PP2A to BUBR1.^{41,69,113} Each phosphoresidue seems to independently stabilize the binding of the B56 subunit, and the combination of all three increases BUBR1 affinity for B56, demonstrating a precise tuning of B56-PP2A recruitment.¹¹³ Cells complemented with BUBR1 KARD mutants cannot associate with B56, fail to progress to metaphase, and arrest in mitosis for a prolonged time, with several unaligned chromosomes indicating that BUBR1-B56-PP2A association contributes to chromosome alignment.^{41,69,113} Importantly, chromosome attachment defects caused by general loss of B56 proteins in human cells are partially rescued by Aurora B or PLK1 inhibition, suggesting that kinetochore

substrates of these kinases represent a major pool of B56-PP2A targets.³⁸ The BUBR1-bound pool of B56-PP2A seems to specifically counteract Aurora B phosphorylation,⁴¹ suggesting that another, as yet uncharacterized pool of B56 may be important for reversing PLK1 phosphorylation. This may be partially mediated through B56-PP2A regulation of PLK1 itself via a feedback loop, as loss of B56 proteins resulted in an increase in PLK1 at kinetochores, as well as KARD phosphorylation.³⁸

The same pool of BUBR1-bound B56-PP2A may concurrently regulate SAC silencing through dephosphorylation of KNL1 MELT motifs and exclusion of BUB1, BUBR1 and other SAC components from kinetochores. Loss of the B56-BUBR1 interaction compromises the delocalization of BUB1 and BUBR1 and retards mitotic exit once the SAC is satisfied, suggesting that BUBR1 recruitment of B56-PP2A promotes SAC inactivation,^{35,40,114} although the direct targets of BUBR1-B56-PP2A in this context are unclear. The current model suggests that BUBR1-bound B56-PP2A primes the silencing of the SAC upon bi-orientation, through promoting dephosphorylation of the pMELT motifs on KNL1, either directly or indirectly through opposing Aurora B activity, thereby promoting recruitment of PP1 to its N-terminal docking site on KNL1^{40,114} (**Figure 4**). This pool of PP1 would subsequently dephosphorylate the pMELT mark, effectively delocalizing the KNL1-bound SAC components. In either case, the outcome is a negative feedback loop where MPS1 and PLK1 in early mitosis can phosphorylate KNL1 in the absence of opposing phosphatases, generating a maximal SAC signal that recruits B56-PP2A in a PLK1-dependent manner, thereby priming its own silencing as soon as MPS1 activity drops. Because B56-PP2A declines together with MELT phosphorylation, the precise balance between kinase and phosphatase activity is key to determining the status of this loop. PLK1 contributes to both BUBR1 recruitment to KNL1 and phosphorylation of the KARD, and thus plays a potentially critical role in maintaining this balance. How BUBR1 KARD phosphorylation by PLK1 is regulated in the context of this model remains unclear and will be important to fully understand how microtubule attachment and SAC silencing are synchronized. Notably, the effect of depleting

all B56 isoforms on SAC termination in cells is stronger than the effect of losing the BUBR1-bound, and additional depletion of B56 isoforms in cells expressing BUBR1 KARD mutants further accentuated the prolonged SAC arrest.⁴⁰ This indicates redundancy in the B56-PP2A SAC exit network, and suggests that other pools of B56 must also be important to silence the SAC. Dissecting the contribution of individual B56-PP2A populations and whether PLK1 also has a role in further B56 interactions remains a challenge for the future. Because microtubule attachment and SAC signaling are intimately intertwined,^{82,83} there may well be a significant overlap in the targets of different isoforms of B56-PP2A.

Outside the KARD, PLK1 is proposed to phosphorylate BUBR1 in its pseudokinase domain.^{105,115} While initial reports suggested that such phosphorylation may serve to activate BUBR1 catalytically,¹⁰⁵ this is unlikely to be the case at least in human cells, as recent evidence strongly supports the idea that BUBR1 is an atypical pseudokinase.¹¹⁵ However, the observations that pseudokinase domain integrity is required for BUBR1 stability which is important for mitotic fidelity,¹¹⁶ suggests that phosphorylation in the pseudokinase domain may contribute to BUBR1 stability, an intriguing idea that remains to be explored.

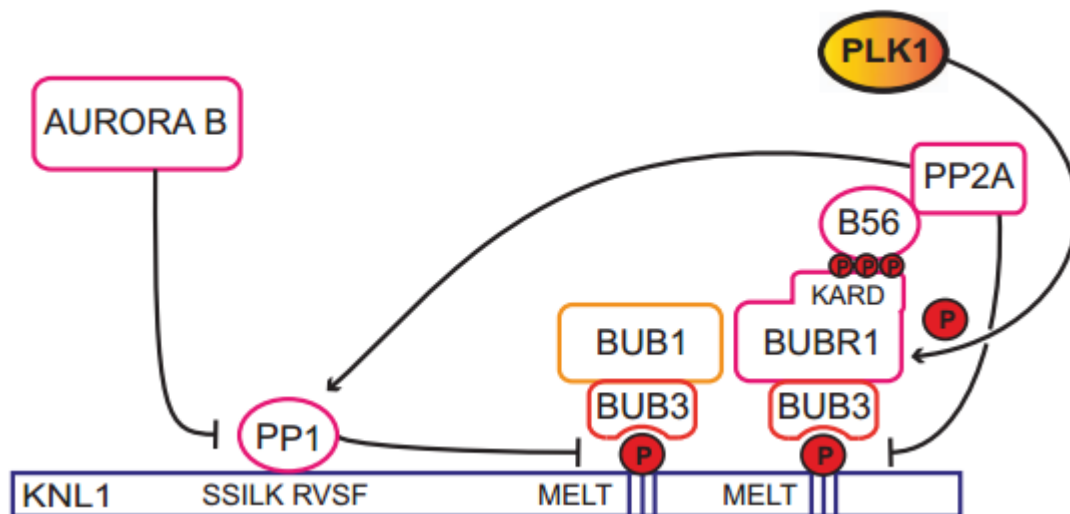


Figure 4: A model for the interplay between kinases and phosphatases in Knl1 phosphorylation.

Mps1 phosphorylation of MELT motifs on Knl1 in early mitosis results in the recruitment of Bub3-Bub1-BubR1 complexes and the initiation of SAC signaling which continues unhindered in early mitosis due to lack of activity by opposing phosphatases. Accumulation of BubR1 and its phosphorylation by Plk1 and others in the KARD signals the recruitment of B56-PP2A which dephosphorylated the SILK and RVSF motifs in the N terminus of Knl1 which subsequently promotes the association of PP1 to these sites and dephosphorylation of MELT motifs, effectively triggering SAC silencing and mitotic exit. B56-PP2A has also been suggested to directly dephosphorylate MELT motifs.

BUB1

As its original discovery in budding yeast, a SAC function for BUB1 has been verified in all model organisms studied to date.¹¹⁷ The role of kinase activity in the SAC remains unclear, but it has been suggested that only a small amount of activity may be sufficient.¹¹⁸ The major contribution of BUB1 to the SAC is dependent on its non-catalytic N terminus, which functions as a scaffold for SAC proteins through a number of conserved motifs. BUB1 recruits BUBR1 through the (R1LM motif),^{119,120} MAD1- MAD2 complexes through the CD1 region,¹²¹ and CDC20 through the Phe box (also known as the ABBA motif and A-box),¹²²⁻¹²⁴ and (Lys-Glu-Asn) KEN motifs.^{112,125-127} Like BUBR1, BUB1 associates directly with PLK1 through a classical PBD binding motif following prior phosphorylation by CDK1, and this association may regulate the localization of a subpopulation of PLK1 to kinetochores, as well as the phosphorylation of BUB1 by PLK1.¹²⁸ More recently it has been suggested that BUB1 may serve as a scaffold to colocalize and facilitate phosphorylation of CDC20 by PLK1 in a branch of the SAC that is independent of the canonical MCC pathway.

Work from the Yu lab has shown that CDC20 is a direct substrate of BUB1, and that phosphorylation by BUB1 inhibits APC/CCDC20 substrate ubiquitination in vitro. A CDC20 protein with a number of phosphomimetic substitutions at potential BUB1 sites poorly supports SAC function in vivo.¹¹⁸ In late mitosis and early G1, the KEN boxes of BUB1 become more important for the CDH1-dependent BUB1 degradation at mitotic exit, which has been proposed to be an important mechanism for attenuating BUB1 kinase activity outside mitosis.^{128,129} In follow-up work, Yu and colleagues showed that in the absence of BUB1 kinase

activity, BUB1-bound PLK1 may also contribute to the SAC through CDC20 phosphorylation and APC/CCDC20 inhibition which requires both CDC20-binding motifs of BUB1, as well as a functional PBD binding site of BUB1. Mutation of either the Phe or KEN boxes to eliminate CDC20 binding or the PBD binding motif to eliminate PLK1 binding failed to support PLK1-dependent CDC20 phosphorylation and inhibition of APC/CCDC20 in vitro, and failed to restore nocodazole-induced mitotic arrest. These observations are in agreement with the scaffolding function of BUB1, and may explain why low levels of BUB1 activity still support the SAC. Synergistic defects in SAC maintenance after PLK1 inhibition by either BI 2536 or GSK461364 together with partial BUB1 depletion in a number of cell lines suggest that BUB1 and PLK1 cooperate to maintain checkpoint-dependent mitotic arrest exerted by spindle poisons. The checkpoint becomes dependent on PLK1 in cells with a compromised BUB1 function, and this cooperation is dependent on the scaffolding function of BUB1.¹³⁰ Thus, BUB1-enabled and PLK1-mediated phosphorylation of CDC20 may represent an APC/ C-inhibitory mechanism that is independent of, but complementary to MCC formation. The collaboration between PLK1 and BUB1 is reminiscent of the cooperative relationship between PLK1 and MPS1 in maintaining KNL1 MELT phosphorylation and the SAC, with some important differences. While PLK1 clearly promotes phosphorylation of CDC20 and other APC/C subunits in vivo and CDC20 is known to be phosphorylated on a number of sites in mitosis,^{118,131} none of these match the well-defined PLK1 consensus, and it will be important to determine how PLK1 could potentially phosphorylate these sites. In addition, the PLK1 and CDC20 docking motifs of BUB1 are shared with BUBR1, and BUBR1 can scaffold the PLK1-mediated phosphorylation of CDC20, although this may be limited by BUBR1-bound B56-PP2A.¹³⁰ It is intriguing to note that like BUBR1, BUB1 has an as yet uncharacterized KARD-like motif (**Figure 5**) that fits the very recently defined B56 binding motif,^{113,132} and which has been reported to be phosphorylated.¹³³ Whether the KARD-like region of BUB1 associates with B56-PP2A and functions in the same manner as BUBR1 will be important to address.

BUB1 PSRDGKFSPIQEKSPKQALSSHM
 BUBR1 TLSIKKLSPIIEDSREATHSSGF
 * : *** * . *

Figure 5: A potential KARD motif in Bub1. Alignment of the KARD of human BubR1 with the putative KARD of human Bub1. Known phosphorylated sites are indicated in red and residues that contribute majorly to the B56–BubR1 interaction are shown in green.

CONCLUSION

Accumulating evidence is now mounting to support the notion of PLK1 as a master regulator and coordinator of mitotic kinase signaling (summarized in **Figure 6**). Common themes are emerging to explain this functionality. PLK1 may perform this task through controlling timely and efficient kinetochore tethering of these kinases as has been shown for Aurora B, Haspin and MPS1, thereby ensuring that they are active at the right time and place. Alternatively, PLK1 can promote catalytic activation of the kinase itself directly as in the case of MPS1 or through relief of autoinhibition as with Haspin, or indirectly through phosphorylation of accessory subunits as in the case of CPC phosphorylation and Aurora B activation. Remarkably, in certain cases and under circumstances where downstream kinase activity cannot be regulated simply because it is not present (in *C. elegans* that lack MPS1) or experimentally incapacitated (BUB1 lacking kinase activity or the kinase domain entirely), PLK1 has evolved to step up its game and compensate for the absence of the relevant kinase by phosphorylating the relevant substrate itself. Undoubtedly, this truly pleiotropic kinase will continue to fascinate in the future.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

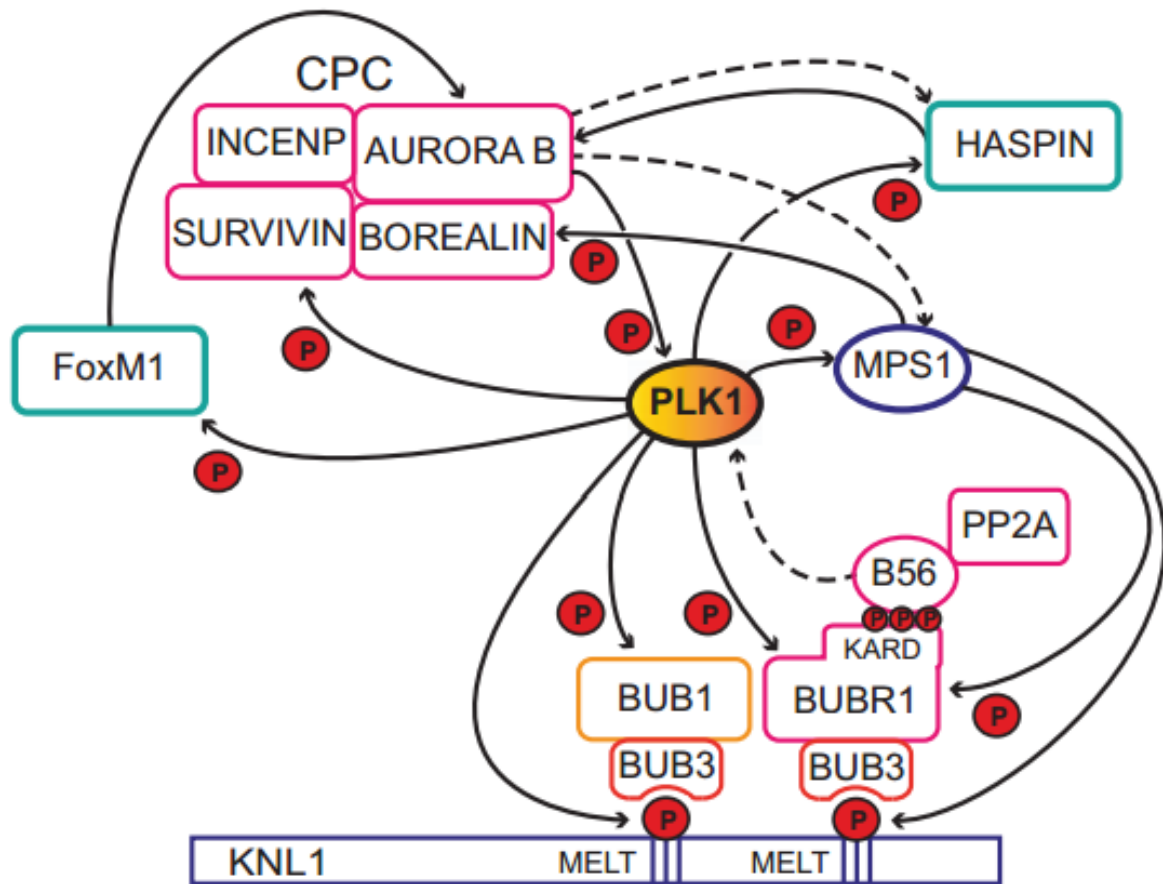


Figure 6: Coordination of mitotic kinase signaling by Plk1. Plk1 regulates and integrates the activities of the major mitotic kinases. Plk1 promotes defines the centromere through activation of Aurora B and Haspin, and contributes to SAC signaling through Mps1 recruitment and activation then to reversing SAC signaling at the end of mitosis through promoting recruitment of the phosphatases PP1 and PP2A. Plk1 may also promote the SAC through phosphorylation of Cdc20. See main text for details.

References

1. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novák B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci* 2012; 125: 4703–4711.
2. Novak B, Kapuy O, Domingo-Sananes MR, Tyson JJ. Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 801–808.
3. Hégarat N, Rata S, Hochegger H. Bistability of mitotic entry and exit switches during open mitosis in mammalian cells. *BioEssays* 2016; 38: 627–643.
4. Archambault V, Lepine G, Kachaner D. Understanding the Polo Kinase machine. *Oncogene* 2015; 34: 4799–4807.
5. Schmucker S, Sumara I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. *Mol Cell Oncol* 2014; 1: e954507.
6. Zitouni S, Nabais C, Jana S, Guerrero A, Bettencourt-Dias M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 433–452.
7. de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5. *Cell Cycle* 2011; 10: 2255–2262.
8. Archambault V, D'Avino PP, Deery MJ, Lilley KS, Glover DM. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphoprime-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis. *Genes Dev* 2008; 22: 2707–2720.
9. García-Alvarez B, de Cárcer G, Ibañez S, Bragado-Nilsson E, Montoya G. Molecular and structural basis of polo-like kinase 1 substrate recognition: implications in centrosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3107–3112.
10. Seki A, Coppinger JA, Jang C-YY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 2008; 320: 1655–1658.
11. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 265–275.
12. Petronczki M, Lénárt P, Peters J-MM. Polo on the rise—from mitotic entry to cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 2008; 14: 646–659.
13. Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 643–660.
14. Etemad B, Kops G. Attachment issues: kinetochore transformations and spindle checkpoint silencing. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 39: 101–108.
15. Musacchio A. The molecular biology of spindle assembly checkpoint signaling dynamics. *Curr Biol* 2015; 25: 18.
16. Lera RF, Potts GK, Suzuki A, Johnson JM, Salmon ED, Coon JJ et al. Decoding Polo-like kinase 1 signaling along the kinetochore-centromere axis. *Nat Chem Biol* 2016; 12: 411–418.
17. Liu D, Davydenko O, Lampson MA. Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing. *J Cell Biol* 2012; 198: 491–499.
18. Honda R, Körner R, Nigg EA. Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3325–3341.
19. Klein UR, Nigg EA, Gruneberg U. Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of borealin, survivin, and the N-terminal domain of INCENP. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2547–2558.
20. Vader G, Kauw JJ, Medema RHH, Lens SM. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 2006; 7: 85–92.
21. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 789–803.
22. Kitagawa M, Lee SH. The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol* 2015; 3: 14.

23. van der Horst A, Lens SM. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma* 2014; 123: 25–42.
24. Carmena M, Earnshaw WC, Glover DM. The dawn of aurora kinase research: from fly genetics to the clinic. *Front Cell Dev Biol* 2015; 3: 73.
25. Krenn V, Musacchio A. The aurora B kinase in chromosome bi-orientation and spindle checkpoint signaling. *Front Oncol* 2015; 5: 225.
26. Raab M, Krämer A, Hehlhans S, Sanhaji M, Kurunci-Csacsco E, Dötsch C et al. Mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Polo-like kinase 1. *Mol Oncol* 2015; 9: 140–154.
27. O'Connor A, Maffini S, Rainey MD, Kaczmarczyk A, Gaboriau D, Musacchio A et al. Requirement for PLK1 kinase activity in the maintenance of a robust spindle assembly checkpoint. *Biol Open* 2015; 5: 11–19.
28. Chu Y, Yao PY, Wang W, Wang D, Wang Z, Zhang L et al. Aurora B kinase activation requires survivin priming phosphorylation by PLK1. *J Mol Cell Biol* 2011; 3: 260–267.
29. Salimian KJ, Ballister ER, Smoak EM, Wood S, Panchenko T, Lampson MA et al. Feedback control in sensing chromosome biorientation by the Aurora B kinase. *Curr Biol* 2011; 21: 1158–1165.
30. Ciceri P, Muller S, O'Mahony A, Fedorov O, Filippakopoulos P, Hunt JP et al. Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. *Nat Chem Biol* 2014; 10: 305–312.
31. Ember SW, Zhu JY, Olesen SH, Martin MP, Becker A, Berndt N et al. Acetyl-lysine binding site of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) interacts with diverse kinase inhibitors. *ACS Chem Biol* 2014; 9: 1160–1171.
32. Burkard ME, Santamaria A, Jallepalli PV. Enabling and disabling polo-like kinase 1 inhibition through chemical genetics. *ACS Chem Biol* 2012; 7: 978–981.
33. Carmena M, Lombardia MO, Ogawa H, Earnshaw WC. Polo kinase regulates the localization and activity of the chromosomal passenger complex in meiosis and mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Open Biol* 2014; 4: 140162.
34. Moutinho-Santos T, Conde C, Sunkel CE. POLO ensures chromosome biorientation by preventing and correcting erroneous chromosome-spindle attachments. *J Cell Sci* 2012; 125: 576–583.
35. von Schubert C, Cubizolles F, Bracher JM, Sliedrecht T, Kops GJ, Nigg EA. Plk1 and Mps1 cooperatively regulate the spindle assembly checkpoint in human cells. *Cell Rep* 2015; 12: 66–78.
36. Kettenbach AN, Schweppe DK, Faherty BK, Pechenick D, Pletnev AA, Gerber SA. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci Signal* 2011; 4: rs5.
37. Santamaria A, Wang B, Elowe S, Malik R, Zhang F, Bauer M et al. The Plk1- dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10: 004457.
38. Foley EA, Maldonado M, Kapoor TM. Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 1265–1271.
39. Grallert A, Boke E, Hagting A, Hodgson B, Connolly Y, Griffiths JR et al. A PP1- PP2A phosphatase relay controls mitotic progression. *Nature* 2015; 517: 94–98.
40. Nijenhuis W, Vallardi G, Teixeira A, Kops GJ, Saurin AT. Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 1257–1264.
41. Xu P, Raetz EA, Kitagawa M, Virshup DM, Lee SH. BUBR1 recruits PP2A via the B56 family of targeting subunits to promote chromosome congression. *Biol Open* 2013; 2: 479–486.
42. Asteriti IA, De Mattia F, Guarguaglini G. Cross-talk between AURKA and Plk1 in mitotic entry and spindle assembly. *Front Oncol* 2015; 5: 283.

43. Carmena M, Pinson X, Platani M, Salloum Z, Xu Z, Clark A et al. The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol* 2012; 10: e1001250.
44. Fu Z, Malureanu L, Huang J, Wang W, Li H, van Deursen JM et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1076–1082.
45. Laoukili J, Kooistra MR, Bras A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 126–136.
46. Thiru P, Kern DM, McKinley KL, Monda JK, Rago F, Su KC et al. Kinetochores genes are coordinately up-regulated in human tumors as part of a FoxM1-related cell division program. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 1983–1994.
47. Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ et al. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10875–10894.
48. Wonsey DR, Follettie MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer Res* 2005; 65: 5181–5189.
49. Goto H, Kiyono T, Tomono Y, Kawajiri A, Urano T, Furukawa K et al. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 180–187.
50. Colnaghi R, Wheatley SP. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *J Biol Chem* 2010; 285: 22592–22604.
51. Higgins JM. Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 2010; 119: 137–147.
52. Yamagishi Y, Sakuno T, Goto Y, Watanabe Y. Kinetochores composition and its function: lessons from yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38: 185–200.
53. Dai J, Sullivan BA, Higgins JM. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* 2006; 11: 741–750.
54. Dai J, Kateneva AV, Higgins JM. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J Cell Sci* 2009; 122: 4168–4176.
55. Wang F, Dai J, Daum JR, Niedzialkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT et al. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 2010; 330: 231–235.
56. Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y, Watanabe Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 2010; 330: 239–243.
57. Wang F, Ulyanova NP, van der Waal MS, Patnaik D, Lens SM, Higgins JM. A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr Biol* 2011; 21: 1061–1069.
58. Zhou L, Tian X, Zhu C, Wang F, Higgins JM. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep* 2014; 15: 273–281.
59. Moutinho-Santos T, Maiato H. Plk1 puts a (Has)pin on the mitotic histone code. *EMBO Rep* 2014; 15: 203–204.
60. Ghenoiu C, Wheelock MS, Funabiki H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol Cell* 2013; 52: 734–745.
61. Eswaran J, Patnaik D, Filippakopoulos P, Wang F, Stein RL, Murray JW et al. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20198–20203.
62. Villa F, Capasso P, Tortorici M, Forneris F, de Marco A, Mattevi A et al. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20204–20209.

63. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP, Azuma Y. SUMOylation of DNA topoisomerase II α regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis. *J Cell Biol* 2016; 213: 665–678.
64. Edgerton H, Johansson M, Keifenheim D, Mukherjee S, Chacon JM, Bachant J et al. A noncatalytic function of the topoisomerase II CTD in Aurora B recruitment to inner centromeres during mitosis. *J Cell Biol* 2016; 213: 651–664.
65. Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA et al. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Pololike kinase. *Mol Cell* 2002; 9: 515–525.
66. Burkard ME, Randall CL, Laroche S, Zhang C, Shokat KM, Fisher RP et al. Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 4383–4388.
67. Santamaria A, Neef R, Eberspächer U, Eis K, Husemann M, Mumberg D et al. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4024–4036.
68. Elowe S, Hummer S, Uldschmid A, Li X, Nigg EA. Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev* 2007; 21: 2205–2219.
69. Suijkerbuijk SJ, Vleugel M, Teixeira A, Kops GJ. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochoremicrotubule attachments. *Dev Cell* 2012; 23: 745–755.
70. Espeut J, Lara-Gonzalez P, Sassine M, Shiao AK, Desai A, Abrieu A. Natural loss of Mps1 kinase in nematodes uncovers a role for Polo-like kinase 1 in spindle checkpoint initiation. *Cell Rep* 2015; 12: 58–65.
71. Winey M, Goetsch L, Baum P, Byers B. MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol* 1991; 114: 745–754.
72. Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, Winey M, Murray AW. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* 1996; 273: 953–956.
73. Weiss E, Winey M. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle Pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol* 1996; 132: 111–123.
74. Jelluma N, Brenkman A, van den Broek N, Cruijssen C, van Osch M, Lens S et al. Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* 2008; 132: 233–246.
75. London N, Ceto S, Ranish J, Biggins S. Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol* 2012; 22: 900–906.
76. Shepperd LA, Meadows JC, Sochaj AM, Lancaster TC, Zou J, Buttrick GJ et al. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol* 2012; 22: 891–899.
77. Yamagishi Y, Yang CH, Tanno Y, Watanabe Y. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 746–752.
78. Krenn V, Overlack K, Primorac I, van Gerwen S, Musacchio A. KI motifs of human Knl1 enhance assembly of comprehensive spindle checkpoint complexes around MELT repeats. *Curr Biol* 2014; 24: 29–39.
79. Zhang G, Lischetti T, Nilsson J. A minimal number of MELT repeats supports all the functions of KNL1 in chromosome segregation. *J Cell Sci* 2014; 127: 871–884.
80. Primorac I, Weir JR, Chiroli E, Gross F, Hoffmann I, van Gerwen S et al. Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *Elife* 2013; 2: e01030.

81. Vleugel M, Omerzu M, Groenewold V, Hadders MA, Lens SM, Kops GJ. Sequential multisite phospho-regulation of KNL1-BUB3 interfaces at mitotic kinetochores. *Mol Cell* 2015; 57: 824–835.
82. Hiruma Y, Sacristan C, Pachis ST, Adamopoulos A, Kujit T, Ubbink M et al. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* 2015; 348: 1264–1267.
83. Ji Z, Gao H, Yu H. Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 2015; 348: 1260–1264.
84. Chmielewska AE, Tang NH, Toda T. The hairpin region of Ndc80 is important for the kinetochore recruitment of Mph1/MPS1 in fission yeast. *Cell Cycle* 2016; 15: 740–747.
85. Isokane M, Walter T, Mahen R, Nijmeijer B, Heriche JK, Miura K et al. ARHGEF17 is an essential spindle assembly checkpoint factor that targets Mps1 to kinetochores. *J Cell Biol* 2016; 212: 647–659.
86. Conde C, Osswald M, Barbosa J, Moutinho-Santos T, Pinheiro D, Guimaraes S et al. Drosophila Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J* 2013; 32: 1761–1777.
87. Schittenhelm RB, Chaleckis R, Lehner CF. Intrakinetochores localization and essential functional domains of Drosophila Spc105. *EMBO J* 2009; 28: 2374–2386.
88. Vleugel M, Hoogendoorn E, Snel B, Kops GJ. Evolution and function of the mitotic checkpoint. *Dev Cell* 2012; 23: 239–250.
89. Nogueira C, Kashevsky H, Pinto B, Clarke A, Orr-Weaver TL. Regulation of centromere localization of the Drosophila Shugoshin MEI-S332 and sister-chromatid cohesion in meiosis. *G3 (Bethesda)* 2014; 4: 1849–1858.
90. Hewitt L, Tighe A, Santaguida S, White AM, Jones CD, Musacchio A et al. Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-CMad2 core complex. *J Cell Biol* 2010; 190: 25–34.
91. Jelluma N, Dansen T, Sliedrecht T, Kwiatkowski N, Kops G. Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset. *J Cell Biol* 2010; 191: 281–290.
92. Santaguida S, Tighe A, D'Alise A, Taylor S, Musacchio A. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 2010; 190: 73–87.
93. Dou Z, von Schubert C, Korner R, Santamaria A, Elowe S, Nigg EA. Quantitative mass spectrometry analysis reveals similar substrate consensus motif for human Mps1 kinase and Plk1. *PLoS One* 2011; 6: e18793.
94. Hennrich ML, Marino F, Groenewold V, Kops GJ, Mohammed S, Heck AJ. Universal quantitative kinase assay based on diagonal SCX chromatography and stable isotope dimethyl labeling provides high-definition kinase consensus motifs for PKA and human Mps1. *J Proteome Res* 2013; 12: 2214–2224.
95. Wang X, Yu H, Xu L, Zhu T, Zheng F, Fu C et al. Dynamic autophosphorylation of mps1 kinase is required for faithful mitotic progression. *PLoS One* 2014; 9: e104723.
96. Maciejowski J, George K, Terret M-E, Zhang C, Shokat K, Jallepalli P. Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* 2010; 190: 89–100.
97. Wong OK, Fang G. Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores. *J Cell Biol* 2005; 170: 709–719.
98. Oppermann FS, Grundner-Culemann K, Kumar C, Gruss OJ, Jallepalli PV, Daub H. Combination of chemical genetics and phosphoproteomics for kinase signaling analysis enables confident identification of cellular downstream targets. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: 012351.

99. Jelluma N, Brenkman AB, McLeod I, Yates JR 3rd, Cleveland DW, Medema RH et al. Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS One* 2008; 3: e2415.
100. Xu Q, Zhu S, Wang W, Zhang X, Old W, Ahn N et al. Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by Mps1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 10–20.
101. O'Connor A, Maffini S, Rainey MD, Kaczmarczyk A, Gaboriau D, Musacchio A et al. Requirement for PLK1 kinase activity in the maintenance of a robust spindle assembly checkpoint. *Biol Open* 2015; 5: 11–19.
102. Cheeseman I, Niessen S, Anderson S, Hyndman F, Yates J, Oegema K et al. A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev* 2004; 18: 2255–2268.
103. Desai A, Rybina S, Muller-Reichert T, Shevchenko A, Shevchenko A, Hyman A et al. KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev* 2003; 17: 2421–2435.
104. Huang H, Hittle J, Zappacosta F, Annan RS, Hershko A, Yen TJ. Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *J Cell Biol* 2008; 183: 667–680.
105. Matsumura S, Toyoshima F, Nishida E. Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J Biol Chem* 2007; 282: 15217–15227.
106. Wong OK, Fang G. Cdk1 phosphorylation of BubR1 controls spindle checkpoint arrest and Plk1-mediated formation of the 3F3/2 epitope. *J Cell Biol* 2007; 179: 611–617.
107. Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Körner R, Nigg EA. Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* 2003; 5: 113–125.
108. Lee K, Rhee K. PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol* 2011; 195: 1093–1101.
109. Mardin BR, Agircan FG, Lange C, Schiebel E. Plk1 controls the Nek2A-PP1gamma antagonism in centrosome disjunction. *Curr Biol* 2011; 21: 1145–1151.
110. Lénárt P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M et al. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of pololike kinase 1. *Curr Biol* 2007; 17: 304–315.
111. Rancati G, Crispo V, Lucchini G, Piatti S. Mad3/BubR1 phosphorylation during spindle checkpoint activation depends on both Polo and Aurora kinases in budding yeast. *Cell Cycle* 2005; 4: 972–980.
112. Elowe S, Dulla K, Uldschmid A, Li X, Dou Z, Nigg EA. Uncoupling of the spindle checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J Cell Sci* 2010; 123: 84–94.
113. Kruse T, Zhang G, Larsen MS, Lischetti T, Streicher W, Kragh Nielsen T et al. Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci* 2013; 126: 1086–1092.
114. Espert A, Uluocak P, Bastos RN, Mangat D, Graab P, Gruneberg U. PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J Cell Biol* 2014; 206: 833–842.
115. Suijkerbuijk SJ, van Dam TJ, Karagoz GE, von Castelmur E, Hubner NC, Duarte AM et al. The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell* 2012; 22: 1321–1329.
116. Suijkerbuijk SJ, van Osch MH, Bos FL, Hanks S, Rahman N, Kops GJ. Molecular causes for BUBR1 dysfunction in the human cancer predisposition syndrome mosaic variegated aneuploidy. *Cancer Res* 2010; 70: 4891–4900.

117. Elowe S. Bub1 and BubR1: at the interface between chromosome attachment and the spindle checkpoint. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 3085–3093.
118. Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S, Yu H. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell* 2004; 16: 387–397.
119. Overlack K, Primorac I, Vleugel M, Krenn V, Maffini S, Hoffmann I et al. A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *Elife* 2015; 4: e05269.
120. Zhang G, Lischetti T, Hayward DG, Nilsson J. Distinct domains in Bub1 localize RZZ and BubR1 to kinetochores to regulate the checkpoint. *Nat Commun* 2015; 6: 7162.
121. Klebig C, Korinth D, Meraldi P. Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol* 2009; 185: 841–858.
122. Di Fiore B, Davey NE, Hagting A, Izawa D, Mansfeld J, Gibson TJ et al. The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Dev Cell* 2015; 32: 358–372.
123. Diaz-Martinez LA, Tian W, Li B, Warrington R, Jia L, Brautigam CA et al. The Cdc20-binding Phe box of the spindle checkpoint protein BubR1 maintains the mitotic checkpoint complex during mitosis. *J Biol Chem* 2015; 290: 2431–2443.
124. Kang J, Yang M, Li B, Qi W, Zhang C, Shokat KM et al. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. *Mol Cell* 2008; 32: 394–405.
125. Burton JL, Solomon MJ. Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev* 2007; 21: 655–667.
126. King EM, van der Sar SJ, Hardwick KG. Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS One* 2007; 2: e342.
127. Malureanu LA, Jeganathan KB, Hamada M, Wasilewski L, Davenport J, van Deursen JM. BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C (Cdc20) in interphase. *Dev Cell* 2009; 16: 118–131.
128. Qi W, Tang Z, Yu H. Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 3705–3716.
129. Asghar A, Lajeunesse A, Dulla K, Combes G, Thebault P, Nigg EA et al. Bub1 autophosphorylation feeds back to regulate kinetochore docking and promote localized substrate phosphorylation. *Nat Commun* 2015; 6: 8364.
130. Jia L, Li B, Yu H. The Bub1-Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation. *Nat Commun* 2016; 7: 10818.
131. Kraft C, Herzog F, Gieffers C, Mechtler K, Hagting A, Pines J et al. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* 2003; 22: 6598–6609.
132. Hertz EP, Kruse T, Davey NE, Lopez-Mendez B, Sigurethsson JO, Montoya G et al. A conserved motif provides binding specificity to the PP2A-B56 phosphatase. *Mol Cell* 2016; 63: 686–695.
133. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: D512–D520.