

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Tuuliki Ojala

**Proteiinkinaasi Mps1 kinetohoori ja käävi polaarkeha substraatvalkude
äratundmise mehhanismid**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendaja prof. Mart Loog

TARTU 2016

Infoleht

Proteiinkinaasi Mps1 kinetohoori ja käävi polaarkeha substraatvalkude äratundmise mehhanismid.

Saccharomyces cerevisiae proteiinkinaas Mps1 on vajalik käävi polaarkeha duplikatsiooniks ja käävi kontrollpunkt aktivatsiooniks. Mutatsioonid Mps1 kinaasis põhjustavad monopolaarse käävi tekkimist ja on sageli rakule letaalsed, kuna viivad aneuploidia tekkeni. Praeguseks ei ole teada, kuidas Mps1 oma substraate teiste valkude seast ära tunneb ja nendega interakteerub. Käesolevas töös vaadeldi Mps1 interaktsioone substraatvalkudega Cdc31, Ndc80, Spc29 ja Spc42 ning leiti, et Mps1 mittekatalüütiline N-terminaalne ala on vajalik vastavate valkudega seondumiseks. Ndc80 valgu seondumises osaleb pikem regioon, mis asub Mps1 positsioonides 1–300. Seevastu käävi polaarkeha valkude Spc29, Spc42 ja Cdc31 interaktsioon kinaasiga sõltub Mps1 aminohappejääkidest positsioonides 151–200. Lisaks näidati, et Mps1 valgu tase ja fosforüleeritus tõuseb rakutsükli edenedes ning kirjeldati Ndc80^{1–257} fosforüleerimise kineetikat.

Märksõnad : proteiinkinaas Mps1, rakutsükkel, käävi kontrollpunkt, käävi polaarkeha

CERCS kood : P310 (Proteiinid, ensüümid)

Substrate recognition mechanisms of proteinkinase Mps1 with substrates from kinetochore and spindle pole body.

Saccharomyces cerevisiae protein kinase Mps1 is important for successful spindle pole body duplication and spindle assembly checkpoint activation. Mutations in Mps1 kinases cause formation of a monopolar spindle and are often lethal to the cell, causing aneuploidy. Several Mps1 substrates have been identified, but it is not well known how Mps1 interacts with its substrates. Current thesis shows that Mps1 interactions with proteins Cdc31, Ndc80, Spc29 and Spc42 are dependent on Mps1 N-terminal non-catalytic region. Ndc80 binding to Mps1 involves a larger region (1–300), but interactions with spindle pole body proteins Spc29, Spc42 and Cdc31 depend on Mps1 amino acids in positions 151–200. Additionally, it was shown that Mps1 protein level and phosphorylation rise when cell cycle progresses into mitosis and phosphorylation kinetics of Ndc80^{1–257} were described.

Keywords : protein kinase Mps1, cell cycle, spindle assembly checkpoint, SPB duplication

CERCS code : P310 (Proteins, enzymology)

Sisukord

Infoleht	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Tütarkromatiidide lahknemine	7
1.2 <i>S. cerevisiae</i> käävi polaarkeha.....	7
1.3 <i>S. cerevisiae</i> kinetohoor ja mikrotuubulite kinnitumine kinetohoorile	9
1.4 Mps1 olulisus käävi polaarkeha duplikatsiooni toimumisel	9
1.5 Mps1 mõjutab substraatide seondumist teiste valkudega.....	11
1.6 Mps1 N- ja C-terminaalne mittekatalüütiline osa.....	12
1.7 Mps1 aktiivsuse regulatsioon	14
2. Eksperimentaalne osa	16
2.1 Töö eesmärgid	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 Kasutatud tüved, söötmed	16
2.2.2 Konstruktide valmistamine PCR meetodil	16
2.2.3 <i>S. cerevisiae</i> transformatsioon.....	19
2.2.4 <i>E. coli</i> transformatsioon.....	20
2.2.5 Immunosadestamine	20
2.2.6 Sünkroniseeritud rakutsükliga kultuuri Mps1 ekspressioon.....	21
2.2.7 <i>Western Blot</i> analüüs	22
2.2.8 6xHis-Ndc80 ¹⁻²⁵⁷ puhastamine	22
2.2.9 <i>in vitro</i> kinaasikatse	23
2.3 Tulemused	24
2.3.1 Mps1 N-terminaalne ala on oluline substraatvalkude Ndc80, Spc29, Spc42 ja Cdc31 seondumiseks Mps1 valguga	24
2.3.2 Mps1 valgu tase ja fosforüleeritus muutuvad rakutsükli jooksul	27
2.3.3 Ndc80 ¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kineetiline analüüs.....	29
2.4 Arutelu	30
2.4.1 Valdav osa Mps1 N-terminaalsest alast on vajalik Ndc80-ga interakteerumiseks.....	30
2.4.2 Mps1 afiinsus Ndc80 ¹⁻²⁵⁷ suhtes on kõrge	30

2.4.3 Mps1 järjestused 151–200 ja 201 –300 sisaldavad konserveerunud aminohapete plokki	31
2.4.3 Mps1 fosforegulatsioon.....	32
Kokkuvõte	33
Kasutatud kirjanduse loetelu	35
Kasutatud veebiaadressid	42
Lisad	43
Lisa 1. <i>MPS1</i> homologide joondus.....	43
Lisa 2. <i>mps1-8</i> alleeli punktmutatsioonidest tekkinud aminohappe asendused	44
Lihtlitsents	45

Kasutatud lühendid

AS1 – i.k *analogue-sensitive 1* (Analoog-tundlik 1)

APC- i.k *anaphase promoting complex* (Anafaasi viiv kompleks)

BSA- i.k *bovine serum albumine* (Veise seerumi albumiin)

CCAN - i.k *constitutive centromere-associated network of proteins* (Konstitutiivselt tsentromeeriga seondunud valkude võrgustik)

CSM- i.k *complete supplement mixture* (Täissööde)

MTOC- i.k *microtubule-organizing center* (Mikrotuubulite organisatsioonikeskus)

K_m - Michaelise konstant

LB- Luria Bertani

MPS1 – i.k *monopolar spindle 1* (Monopolaarne kääv 1)

NTE – i.k *N-terminal extension* (N-terminaalne pikendus)

SAC- i.k *spindle assembly checkpoint* (Käävi kontrollpunkt)

SPB – i.k *spindle pole body* (Käävi polaarkeha)

SPC – i.k *spindle pole component* (Käävi pooluse komponent)

SC- i.k *synthetic medium* (Süntetiline ehk miinimumsööde)

YPD- i.k *yeast extract peptone dextrose* (Pärmiekstrakt peptoon dekstroos)

Sissejuhatus

Rakkude jagunemisel on kesksel kohal DNA replikatsioon ja kromosoomide võrdne jaotumine tütarakkude vahel. Erinevad rakutsükli protsessid on kontrollitud proteiinkinaaside poolt, mis valkude fosforüleerimise kaudu tagavad protsesside järjestikuse toimimise. Mitoosi anafaasis peab toimuma tütarchromatiidide võrdne lahknemine, milleks on lisaks DNA replikatsioonile vajalik ka mikrotuubuleid organiseerivate keskuste duplikatsioon ja korrektne mitootilise käävi moodustumine. Kahe viimati mainitud protsessi toimumist kontrollib proteiinkinaas Mps1. *Saccharomyces cerevisiae* mikrotuubuleid organiseerivat keskust nimetatakse käävi polaarkehaks. Käävi polaarkeha duplikatsioon toimub rakutsükli G1-faasis ning Mps1 kinaas on hädavajalik vastava protsessi toimumiseks. Mps1 on lokaliseerunud ka kinetohooridele, mille funktsiooniks on siduda tütarchromatiidid mitootilise kääviga. Mitootilistes rakkudes osaleb Mps1 käävi kontrollpunktis, mille eesmärgiks on inhibeerida üleminekut anafaasi enne kromosoomide korrektset seandumist mitootilise kääviga. Käävi kontrollpunkti defektide korral tekivad vead chromatiidide lahknemisel, mille tulemuseks on aneuploidia.

Kinaasi Mps1 funktsioone on kirjeldatud Mps1 mutantide abil ning on leitud, et Mps1 vajab oma ülesannete täitmiseks lisaks katalüütilisele aktiivsusele ka mitte-katalüütilist N-terminaalset ala. Vastav ala võib olla vajalik Mps1 seandumiseks substraatvalkudega, kusjuures erinevad mutatsioonid selles regioonis põhjustavad erinevaid defekte Mps1 funktsioonide täitmisel. Samas ei ole teada, mis on otsesed puudused, mida need mutatsioonid põhjustavad.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse osas antakse ülevaade kinaasist Mps1 ja selle funktsioonidest rakutsükli. Eksperimentaalse osa eesmärkideks on uurida Mps1 interaktsioone kinetohoori valguga Ndc80 ning käävi polaarkeha valkudega Cdc31, Spc29 ja Spc42. Lisaks analüüsida Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kineetikat ning kirjeldada Mps1 valgu taset ja fosforüleeritust rakutsükli eri aegadel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Tütarkromatiidide lahknemine

Geneetilise informatsiooni võrdne jaotumine tütarakkude vahel sõltub veatust kromosomaalse DNA replikatsioonist S-faasis ja selle tulemusel tekkivate tütarkromatiidide lahknemisest tütarakkudesse anafaasis. Selleks, et tütarkromatiidid lahkneksid eri rakkudesse, peab metafaasis mitootilise käävi abil tekkima bipolaarne orientatsioon. Mitootiline kääv koosneb kinetohoorsetest ja interpolaarsetest mikrotuubulitest, mis saavad alguse organellist, mida nimetatakse mikrotuubulite organisatsioonikeskuseks (MTOC) (Winey ja Bloom, 2012). Kõrgemate eukarüootide puhul nimetatakse vastavat organelli ka tsentrosoomiks ja pärimi puhul nimetatakse käävi polaarkehaks (SPB, i.k. *spindle pole body*). Bipolaarse orientatsiooni tekkeks on vajalik mikrotuubulite organisatsioonikeskuse duplikatsioon, et tsentromeersel DNA-l asetsevatele kinetohoorile kinnituvad mikrotuubulid saaksid alguse erinevatelt poolustelt (Tanaka, 2010). Juhul, kui duplikatsiooni ei toimu ja mikrotuubulid moodustatakse ainult ühel poolusel, on tulemuseks monopolaarne kääv, mis põhjustab juhuslikku kromosoomide segregatsiooni ja seeläbi aneuploidiat, mida seostatakse kasvajate ja erinevate sünnidefektide tekkega (Nagaoka *et al.*, 2012; Weaver ja Cleveland, 2006).

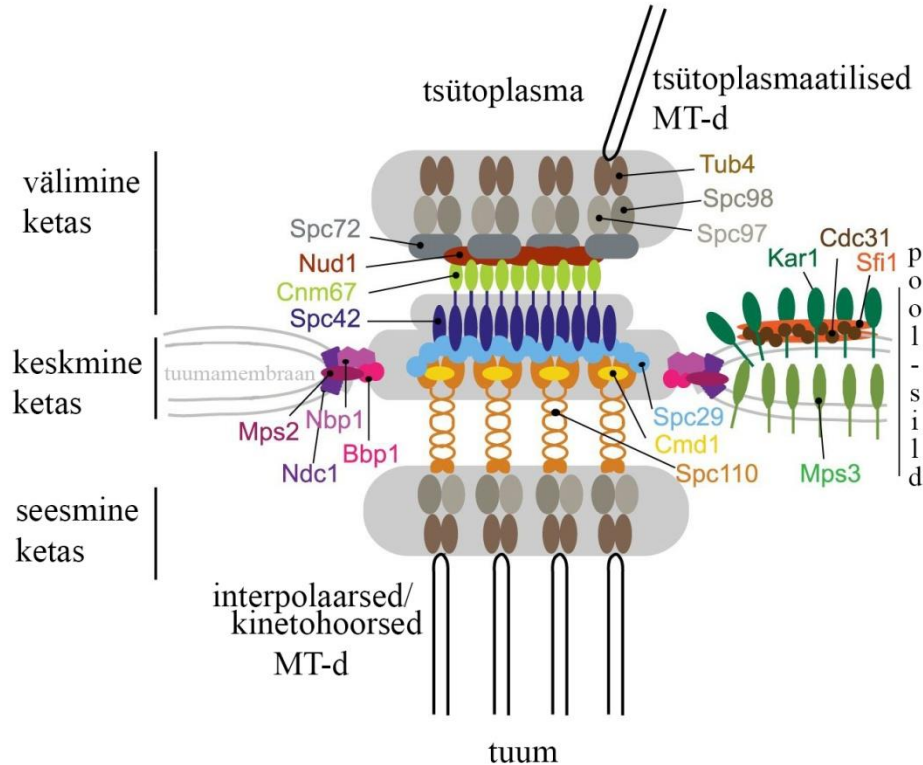
Käävi kontrollpunkt ehk SAC (i.k. *spindle assembly checkpoint*) takistab kromosoomide lahknemist enne tütarkromatiidide bipolaarse orientatsiooni saavutamist (Hwang *et al.*, 1998). SAC inhibeerib ubikvitiin-ligaasi kompleksi APC (i.k. *anaphase promoting complex*) aktiveerumist. APC ehk anafaasi viiv kompleks on vajalik üleminekuks metafaasist anafaasi, ubikvitiinüleerides sekuriini ja põhjustades selle lagundamist, misjärel vabaneb separaas (Peters, 2006). Separaas on proteaas, mis degradeerib tütarkromatiide kooshoidvad kohesiinid, misjärel toimub tütarkromatiidide lahknemine (Nasmyth, 2001).

Käesolevas töös uuriti *Saccharomyces cerevisiae* proteiinkinaasi Mps1 (i.k. *monopolar spindle protein 1*). *MPS1* avastati kui geen, mille muteerimisel tekivad defektid käävi polaarkehade duplikatsioonis ja käävi kontrollpunktis (Winey *et al.*, 1991).

1.2 *S. cerevisiae* käävi polaarkeha

Saccharomyces cerevisiae käävi polaarkeha on võrdväärne kõrgemate eukarüootide tsentrosoomiga, kuid erinevalt tsentrosoomist ei koosne SPB tsentrioolidest (Jaspersen ja Winey, 2004). Elektronmikroskoopiline analüüs paljastas, et SPB on mitmekihiline organell, mis koosneb kolmest kettast (Robinow ja Marak, 1966) (joonis 1). Välimisest kettast saavad alguse

tsütoplasmaatilised mikrotuubulid, mis pikenevad raku jagunemise ajal kasvavasse punga. Keskmine ketas interakteerub füüsiliselt tuumamembraaniga ning seesmisest kettast saavad alguse mikrotuubulid, mis moodustavad mitootilise käävi (Byers ja Goetsch, 1974, 1975; Moens ja Rapport, 1971; Robinow ja Marak, 1966).



Joonis 1. Käävi polaarkeha struktuur. Kohandatud, (Burns *et al.*, 2015)

Käävi polaarkeha südamik koosneb heksagonaalsest võrgustikust, mille moodustavad valgu Spc42 (i.k *spindle pole component*) dimeeride trimeerid (Bullitt *et al.*, 1997). Spc42 N-terminaalne osa interakteerub valkudega Spc110 ja Spc29 (Adams ja Kilmartin, 1999; Elliott *et al.*, 1999). Spc29, mis interakteerub Spc42 ja Spc110-ga, ühendab omavahel käävi polaarkeha seesmise ja keskmise ketta (Adams ja Kilmartin, 1999). Spc29 seob ka Bbp1-Mps2 kompleksi, mis on vajalik duplikatsiooniketta sisestamiseks tuumamembraani (Schramm *et al.*, 2000). Spc110 N-terminaalne osa on lokaliseerunud seesmisele kettale (Spang *et al.*, 1996) ning interakteerub Spc98 ning Spc97-ga (Nguyen *et al.*, 1998). Spc98 ja Spc97 seovad γ -tubuliini Tub4, moodustades käävi moodustumiseks vajaliku Tub4 kompleksi (Geissler *et al.*, 1996; Vinh *et al.*, 2002). Välimise kettaga assotsieerunud γ -tubuliini kompleksi ankurdam käävi polaarkehale Spc72 (Knop ja Schiebel, 1998), mida seob valk Nud1 (Gruneberg *et al.*, 2000). Teiselt poolt interakteerub Nud1 valguga Cnm67, mis ühendab keskmise ja välimise ketta, interakteerudes ka Spc42 valguga (Gruneberg *et al.*, 2000). Keskmine ketas on ühe küljega assotsieerunud elektron-

tiheda regiooniga tuumamembraanil, mida nimetatakse pool-sillaks (i.k *half-bridge*) (Byers ja Goetsch, 1974, 1975). Pool-silla moodustavad valgud Cdc31, Kar1, Mps3 ja Sfi1 (Biggins ja Rose, 1994; Jaspersen *et al.*, 2002; Spang *et al.*, 1993).

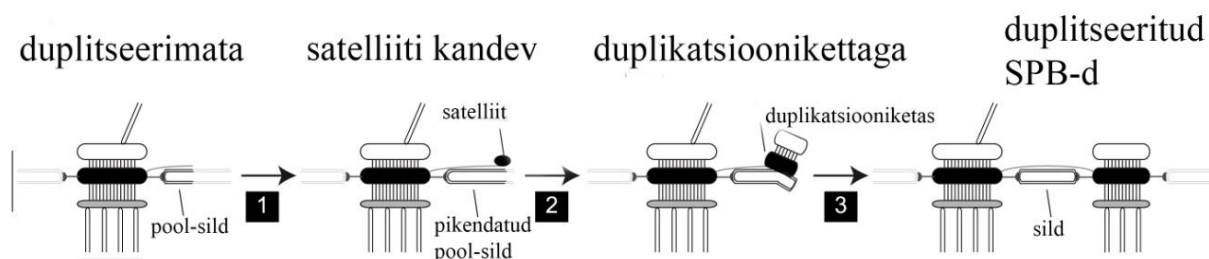
1.3 *S. cerevisiae* kinetohoor ja mikrotuubulite kinnitumine kinetohoorile

S. cerevisiae kinetohoorid mooduvad 125-bp pikkusele tsentromeerile (Clarke ja Carbon, 1980), mis koosneb elementidest CDEI, CDEII ja CDEIII (Clarke, 1998). Sellist tsentromeeri nimetatakse punkt-CEN ning vastavad elemendid on konserveerunud kõigi 16 kromosoomi vahel (Meraldi *et al.*, 2006). Kinetohoorid koosnevad enam kui 60 erinevast valgust (Santaguida ja Musacchio, 2009), mis on koondunud alamkompleksidesse (Malvezzi ja Westermann, 2014). Sõltuvalt valkude asetusest tsentromeerse DNA suhtes, jagatakse kinetohoor seesmiseks kinetohooriks ehk CCAN (i.k *constitutive centromere-associated network of proteins*) ja välimiseks kinetohooriks ehk KMN (nimetus tuletatud alamkomplekside esitähedest) (Biggins, 2013). Seesmine kinetohoor seondub tsentromeeriga (Biggins, 2013). Välimine kinetohoor koosneb kolmest alamkompleksist (Mis12, Spc105/KNL-1 ja Ndc80-kompleksid) (Biggins, 2013) ning see omab põhilist mikrotuubuleid siduvat aktiivsust (Cheeseman *et al.*, 2006). Eraldades üksteisest KMN-i moodustavad kompleksid, leiti et kinetohoorid seonduvad mikrotuubulitega peamiselt Ndc80 kompleksi kaudu (Cheeseman *et al.*, 2006). Spc105 pärmist puhastatud kompleks omab nõrka mikrotuubulite sidumise aktiivsust (Pagliuca *et al.*, 2009) ning Mis12 kompleks ei seo mikrotuubuleid (Cheeseman *et al.*, 2006; Hornung *et al.*, 2011). Ndc80 kompleks on konserveerunud pärmist inimeseni ja sisaldab nelja valku Ndc80, Nuf2, Spc24 ja Spc25 (Janke *et al.*, 2001). Kõik neli valku on rakule hädavajalikud, kuid peamist mikrotuubulite sidumise aktiivsust omab Ndc80 valgu globulaarne N-terminaalne domään (Cheeseman *et al.*, 2006; DeLuca *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2005).

1.4 Mps1 olulisus käävi polaarkeha duplikatsiooni toimumisel

Sarnaselt kõrgemate eukarüootide tsentrosoomi duplikatsioonile, toimub SPB duplikatsioon ainult ühe korra rakutsükli jooksul (Jaspersen ja Winey, 2004). Käävi polaarkeha duplikatsioon saab alguse varajases G1-faasis, mil pool-sild pikeneb enda komponendi Sfi1 polümeriseerumise arvelt (Burns *et al.*, 2015) ning selle distaalsesse tsütoplasmaatilisse otsa moodustub satelliitstruktuur, mis on algstruktuuriks uuele SPB-le (Byers ja Goetsch, 1975) (joonis 2). Satelliit laieneb kihiliseks struktuuriks, mis sarnaneb küpse SPB tsütoplasmaatilise poolega. Seda struktuuri nimetatakse duplikatsioonikettaks ning tõenäoliselt hõlmab see etapp Spc42

multimeriseerumist (Adams ja Kilmartin, 1999). Nii satelliit kui ka duplikatsiooniketas koosnevad SPB integraalsetest komponentidest- Spc42, Spc29, Cnm67 ja Nud1 (Adams ja Kilmartin, 1999) ning samuti tuumapoori valkudest Bbp1 ja Mps2 (Burns *et al.*, 2015). Uue käävi polaarkoha moodustumine loetakse lõppenuks, kui duplikatsiooniketas sisestatakse tuumamebraani ja lisanduvad valgud, mis moodustavad SPB seesmise ketta (Byers ja Goetsch, 1974). G1-faasi lõpus sisaldavad pärmirakud kahte kõrvuti asetsevat SPB-d, mis on omavahel sillaga ühendatud (Byers ja Goetsch, 1975). Duplitseeritud SPB-de vahel olev sild lõigatakse pooleks ning mikrotobulitel liikudes eraldavad kinesiini-sarnased mootorvalgud Cin8 ja Kip1 käävi polaarkohad (Jacobs *et al.*, 1988; Roof *et al.*, 1992). SPB-d liiguvad rakutuuma eri poolustele, mis võimaldab bipolaarse käävi moodustumist. Seejärel regenereritakse pool-silla struktuur, millel järgmises tsüklis moodustub uus SPB algstruktuur ehk satelliit (Byers ja Goetsch, 1974).



Joonis 2. Käävi polaarkoha duplikatsioon. Pool-silla elongatsioon (1), duplikatsiooniketta teke SPB algstruktuurist ehk satelliidist (2), seesmise ketta moodustumine (3). Kohandatud (Burns *et al.*, 2015)

MPS1 geeni muteerides on leitud mitmeid üksikuid temperatuuritundlikke mutatsioone, mis põhjustavad aminohappelisi asendusi kinaasi katalüütilises domäänis. Vastavad mutatsioonid põhjustavad defekte käävi polaarkoha duplikatsioonis ning on rakule letaalsed (Schutz ja Winey, 1998; Winey *et al.*, 1991). Temperatuuritundliku *mps1-1* alleeliga rakkudele on omane tavalisest suurem pool-sild, millele ei moodustu satelliiti. Seega ei toimu ka käävi polaarkoha duplikatsiooni ning tulemuseks on monopolaarne mitootiline kääv. Kui sünkroniseerida permissiivsel temperatuuril kasvanud *mps1-1* rakud α -faktoriga G1-faasis ning selle eemaldamisel viia rakud mittepermissiivse temperatuuriga kasvukeskkonda, ei ole satelliiti omav SPB võimeline edasisi duplikatsioonietappe läbima (Winey *et al.*, 1991). Sellest tulenevalt võib järeldada, et Mps1 on oluline SPB duplikatsiooni läbiviimisel nii enne kui ka pärast satelliidi moodustumist. Seda kinnitab ka teine temperatuuritundlik *mps1-737* (E486K) mutant, millel

moodustuvad käävi polaarkeha keskmine ja välimine ketas ja seega ka satelliit, kuid mitte seesmine ketas (Schutz ja Winey, 1998). Tekkinud struktuuri ei sisestata tuumamembraani sarnaselt *ndc1*, *mps2* ja *bbp1* mutantidele (Schramm *et al.*, 2000; Winey *et al.*, 1991, 1993).

Hiljem isoleeritud temperatuuritundlik alleel *mps1-8* sisaldab mittekatalüütilises N-terminaalses alas kümmet erinevat aminohappelist asendust, kuid ei mõjuta kinaasi aktiivsust (Castillo *et al.*, 2002). Mittepermissiivsel temperatuuril ei toimu käävi polaarkeha duplikatsiooni, kuid erinevalt eelnevalt mainitud alleelidest seiskub rakutsükkel mitoosis (Castillo *et al.*, 2002). Sellest võib järeldada, et SPB duplikatsiooni regulatsioon Mps1 poolt ei vaja ainult kinaasset aktiivsust ning N-terminaalne ala võib olla oluline substraatidega seondumiseks.

Mps1 katalüütilises domäänis temperatuuritundlikku mutatsiooni omavad rakud läbivad rakutsükli, vaatamata käävi polaarkeha duplikatsiooni ebaõnnestumisele. Sellest võib järeldada, et Mps1 kinaasne aktiivsus on vajalik SAC aktivatsiooniks ja selle puudumisel käävi kontrollpunkti ei aktiveerita (Jones *et al.*, 2005). Kuna tütarkromatiidide bipolaarset orientatsiooni ei saavutata, toimub kromosoomide ebavõrdne lahkumine (Schutz ja Winey, 1998; Winey *et al.*, 1991).

1.5 Mps1 mõjutab substraatide seondumist teiste valkudega

Mps1 interakteerub füüsiliselt mitmete SPB komponentidega ning nende fosforüleerimise kaudu mõjutab mitmete SPB komponentide omavahelist seondumist. Spc29 koos Mps2-Bbp1-Nbp1 kompleksiga sisestab moodustunud SPB tuumamembraani. *In vivo* eksperimentides interakteerub Bbp1 Spc29-ga (Schramm *et al.*, 2000) ning interaktsioon Spc29 ja Bbp1 vahel sõltub Spc29 Mps1-vahendatud fosforüleerimisest. On näidatud, et Spc29 fosforüleerimine tõstab seondumisafiinsust Bbp1 suhtes (Araki *et al.*, 2010).

Mps1 puhastamisel pärmirakkudest leiti, et Mps1-ga interakteerub ka Cdc31. Mps1 fosforüleerib Cdc31 aminohappejäägid T110 ja T128. Muutes Cdc31 T110alaniiniks (*cdc31-T110A*), tekib rakule letaalne defekt SPB duplikatsioonis. Seda defekti supresseerib üksiku *KAR1* geenikoopia lisamine. Cdc31 fosforüleerimine Mps1 poolt põhjustab 5-kordse afiinsuse languse Cdc31 Kar1 seondumismotiivi suhtes. Seega võib Cdc31 fosforüleerimine Mps1 poolt mõjutada Cdc31 assotsiatsiooni Kar1-ga (Araki *et al.*, 2010). On näidatud et Cdc31 seondumine Kar1-ga võib olla vajalik Cdc31 sidumiseks käävi polaarkehale (Vallen *et al.*, 1994).

Mps1 fosforüleerib SPB seesmise ketta valku Spc110. Vastav fosforüleerimine toimub pärast SPB duplikatsiooni lõppu ja püsib kuni metafaas-anafaas üleminekuni (Friedman *et al.*, 1996). Spc98 fosforüleerimist Mps1 poolt on näidatud *in vitro* (Pereira *et al.*, 1998). Nende komponentide fosforüleerimine võib reguleerida käävi polaarkeha ja mitootilise käävi moodustumiseks vajaliku γ -tubuliini kompleksi ja Tub4 vahelist interaktsiooni.

Spc42 multimeriseerumine *in vivo* on defektne temperatuuritundlikus *mps1-1* mutandis. Spc42 sadestub immunosadestamise eksperimentides koos Mps1-ga ning Mps1 fosforüleerib Spc42 *in vitro*. Temperatuuritundlik *mps1-8*, mis omab mutatsioone mittekatalüütilises N-terminaalses alas, põhjustab defekte SPB duplikatsioonil, mis on supresseeritavad *SPC42* koopiaarvu rakus tõstmisega (Castillo *et al.*, 2002).

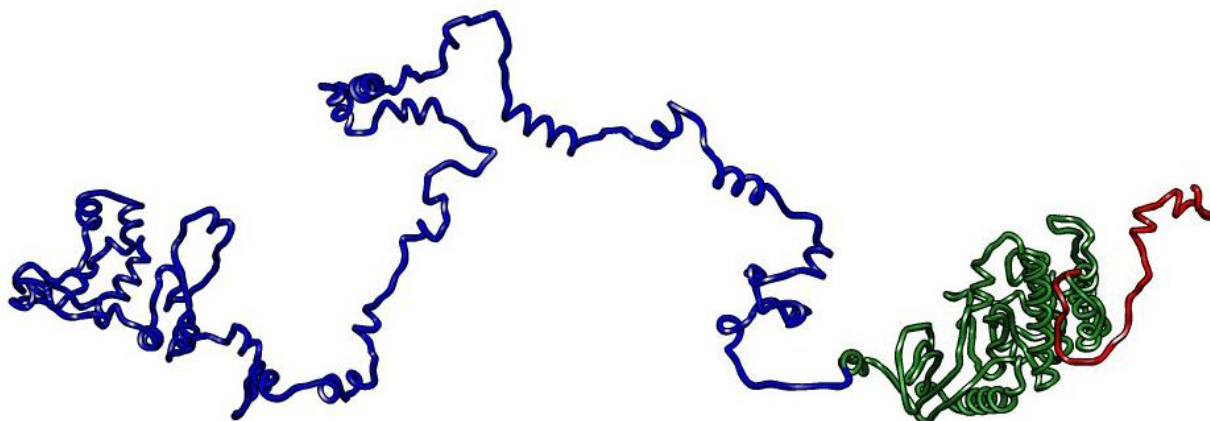
Saccharomyces cerevisiae's osalevad SAC signalisatsioonis SAC-i komponendid Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, Bub3 ja Mps1 (Hoyt *et al.*, 1991; Li ja Murray, 1991), mis inhibeerivad APC läbi selle reguleeriva subühiku Cdc20 (Hwang *et al.*, 1998; Maciejowski *et al.*, 2010). Mps1 fosforüleerib kinetohoori valke, misjärel teised SAC valgud seonduvad kinetohoorile ning SAC signaal aktiveerub (Funabiki ja Wynne, 2013). Spc105 MELT (Melt-Glu-Leu-Thr) motiivide fosforüleerimine toob Bub1 ja Bub3 kinetohoorile (London *et al.*, 2012). Mps1 fosforüleerib seejärel Bub1, mis on Mad1 ja Mad2 kinetohoorile lokaliseerumise eelduseks (London ja Biggins, 2014).

Mps1 seondumine kinetohoorile on sõltuv valgust Ndc80. Mps1 interakteerub füüsiliselt Ndc80 valguga N-terminaalse domääniga (Ndc80¹⁻²⁵⁷) ning fosforüleerib seda *in vitro* (Kemmler *et al.*, 2009). Mikrotuubulitele kinnitumata kinetohooridel asuvad Ndc80 ja Spc105 lähedusse, mis võimaldab kinaasil Mps1 fosforüleerida Spc105, ilma Spc105-ga füüsiliselt interakteerumata. Mps1-sõltuv Spc105 fosforüleerimine on piisav, et aktiveerida SAC. Mikrotuubuli kinnitumine kinetohoorile eraldab Ndc80 Mps1 siduva domääni Spc105 fosfodomäänist, takistades Spc105 fosforüleerimist Mps1 poolt ja katkestades SAC signaali (Aravamudhan *et al.*, 2015). Bipolaarse orientatsiooni saavutamisel muutub seega SAC inaktiivseks ning ei inhibeerigi APC ubikvitiin-ligaasi kompleksi, misjärel rakk läheb anafaasi.

1.6 Mps1 N- ja C-terminaalne mittekatalüütiline osa

MPS1 geen kodeerib 764 aminohappe pikkust proteiinkinaasi (Lauzé *et al.*, 1995). Mps1 sisaldab rohkem konserveerunud katalüütilist domääni ning pikemat N-terminaalset ja lühemat C-

terminaalset mittekatalüütilist osa (joonis 3). Imetajate kinaasidest omavad Mps1-ga enim struktuurset homoloogiat hiire ja inimese Mps1 kinaasid, kuid sarnasus on valdavalt konserveerunud C-terminaalsete kinaasi domäänide vahel. Mps1 N-terminaalne mittekatalüütiline ala ning 60 C-terminaalset aminohapet on nende liikide vahel vähekonserveerunud (Lauzé *et al.*, 1995).



Joonis 3. Mps1 ennustuslik struktuur. Katalüütiline domään on märgitud roheliselt, sellest N-terminaalne ala siniselt ning C-terminaalne ala punaselt. Struktuuriennustuse tegemiseks kasutati I-Tasser programmi (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)

Araki *et al.*, näitasid 2010. aastal, et Mps1 N-terminaalne mittekatalüütiline ala on rakule hädavajalik ning deletsioonid positsioonides 150-300 on pärmile letaalsed (Araki *et al.*, 2010). Nad eeldasid, et N-terminaalne ala mõjutab Mps1 seondumist substraatvalkudega ning leidsid, et Mps1^{Δ151–200} põhjustab defekte kinetohooride bipolaarse orientatsiooni tekkimisel ning Mps1^{Δ201–300} mutandis ebaõnnestub SPB duplikatsioon.

Eemaldades Mps1 N-terminaalsest kõrgema struktuurita osast aminohapped 201–300, tekivad defektid bipolaarse käävi moodustumises. Vastavates rakkudes tekib 50% juhtudel monopolaarne kääv, mida organiseerib ainult üks käävi polaarkeska ja ülejäänud juhtudel monopolaarne kääv ja ebaõnnestunud SPB duplikatsioonil tekkinud surnud SPB (Araki *et al.*, 2010). Surnud SPB on tüüpiline mutantides, milles ebaõnnestub duplikatsiooniketta sisestamine tuumamembraani ning uus SPB ei suuda moodustada käävi mikrotuubuleid (Winey *et al.*, 1991). Analüüsides valkude seondumist Mps1^{Δ201–300} mutandist põhjustatud surnud poolusele, leiti et Mps2-Bbp1 kompleks oli puudu. Selle kompleksi puudumine võib viidata sellele, et Mps1 vahendab Mps2-Bbp1 kompleksi liitumist uue SPB-ga Spc29 fosforüleerimise kaudu. Mps1^{Δ201–300} deletsioon ei

põhjusta *in vitro* kinaasi aktiivsuse vähenemist ning ei mõjuta ka seondumist Spc29-ga, seega on ebaselge, millest tuleneb antud mutandi defekt (Araki *et al.*, 2010). Mps1 aminohapete 151–200 eemaldamine ei tekita defekti SPB duplikatsioonis, mida tõestab bipolaarse käävi teke, kuid vaatamata sellele ei saavuta 75% rakkudest tütarchromatiidide bipolaarset orientatsiooni (Araki *et al.*, 2010). Mõlema deletsiooni puhul on defektne ka käävi kontrollpunkt ehk tõenäoliselt on suur osa N-terminaalsest osast oluline Mps1 funktsiooniks SAC aktivatsioonil.

Inimese Mps1 puhul on näidatud, et Mps1 C-terminaalse mittekatalüütilise ala eemaldamine ei võimalda Mps1 kinaasil aktiveerida käävi kontrollpunkti (Sun *et al.*, 2010). Samuti leiti, et selle ala eemaldamine mõjutab substraatide fosforüleerimist, kuid ei mõjuta Mps1 autofosforüleerimist. On võimalik, et Mps1 C-terminaalne ala on oluline substraatidega seondumises, kuid see ala võib hoopis osaleda katalüütilise domääni stabiliseerimises.

Mps1 muteerimisel on leitud, et erinevad mutatsioonid põhjustavad rakule erinevaid defekte. Mps1-1 mutatsioon põhjustab kinaasse aktiivsuse kadumise, kuid ei ole selge, millised on otsesed mehhanismid Mps1 N- ja C-terminaalse ala mutantide fenotüüpide taga.

1.7 Mps1 aktiivsuse regulatsioon

Mps1 ekspressiooni ja kinaasse aktiivsuse regulatsioon on oluline rakutsükli toimimiseks. *MPS1* üleekspressioon põhjustab käävi kontrollpunkti aktivatsiooni (Hardwick *et al.*, 1996) ja liiga madal Mps1 aktiivsus on letaalne (Lauzé *et al.*, 1995). Mps1 ekspressioon ja aktiivsus sõltuvad rakutsükli staadiumist nii inimese kui ka pärmirakkudes (Palframan *et al.*, 2006; Stucke *et al.*, 2002). Ekspressioon saavutab maksimumi metafasis ja langeb, kui rakud sisenevad anafaasi.

Mps1 valgu taset reguleeritakse läbi transkriptsiooni (Poch *et al.*, 1994) ja valgu stabiilsuse (Jaspersen *et al.*, 2004; Palframan *et al.*, 2006), aga Mps1 katalüütilise aktiivsuse regulatsioon ei ole hästi kirjeldatud. Praeguseks ei ole identifitseeritud kinaase ega spetsiifilisi regulaatorseid valke, mis aktiveeriks Mps1.

Tsükliin-sõltuv kinaas Cdk1, mis on rakutsükli keskne regulaator, fosforüleerib ka kinaasi Mps1, kusjuures vastav fosforüleerimine stabiliseerib Mps1 valku (Jaspersen *et al.*, 2004). Rakkudes kus Cdk1 aktiivsus on inhibeeritud, on Mps1 valgu tase üle 80% madalam. Cdk1 inhibeerimisel langeb Mps1 kinaasne aktiivsus proportsionaalselt Mps1 tasemega, viidates sellele, et peamine Cdk1 mõju on seotud Mps1 akumuleerumisega, mitte aktivatsiooniga. Pärmis Mps1 sisaldab ühte

täielikku Cdk1 konsensussaiti Thr²⁹ (T*-P-P-K) ja kolme minimaalse konsensusega saiti Ser¹⁸⁵, Ser³³⁶ ja Thr⁶⁰² (S/T*-P), kuid üle 97% Cdk1-sõltuvast fosforüleerimisest toimub Thr²⁹-jäägil. Mutatsioon T29A tekitab Mps1 taseme suhtes sama efekti, kui Cdk1 inhibeerimine, nii et tõenäoliselt on Cdk1 fosforüleerimine Mps1 taseme regulatsioonis oluline (Jaspersen *et al.*, 2004). Mitmete kinaaside aktivatsiooniks on vajalik kindlate aminohappejääkide fosforüleerimine aktivatsioonilingus. Mõnel juhul viiakse aktivatsioon läbi autofosforüleerimise kaudu (Johnson *et al.*, 1996; Nolen *et al.*, 2004). Mass-spektromeetria abil avastati, et ka Mps1 autofosforüleerib enda aktivatsioonilingus paikneva kõrgelt konserveerunud Thr⁶⁷⁶-jäägi (Kang *et al.*, 2007; Mattison *et al.*, 2007). Muutes vastava aminohappealaniiniks (T676A), leiti et kinaasi aktiivsus langeb *in vitro* 7-korda. Inimese Thr⁶⁷⁶-jäägile vastab *S.cerevisiae*'s Thr⁵⁹¹, mille muteerimine langetab samuti kinaasi aktiivsust ning takistab valgu funktsioneerimist *in vivo* (Mattison *et al.*, 2007).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks on:

1. uurida Mps1 füüsilisi interaktsioone substraatidega Ndc80, Cdc31, Spc29 ja Spc42, kasutades Mps1 mittekatalüütilise N- ja C-terminaalse ala deletsioonimutante;
2. selgitada, kas Mps1 fosforüleerimine mõjutab Mps1 seondumist substraatvalkudega;
3. analüüsida Mps1 valgu ja fosforüleerituse taseme muutusi rakutsüklis;
4. kirjeldada valgu Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kineetikat.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud tüved, söötmed

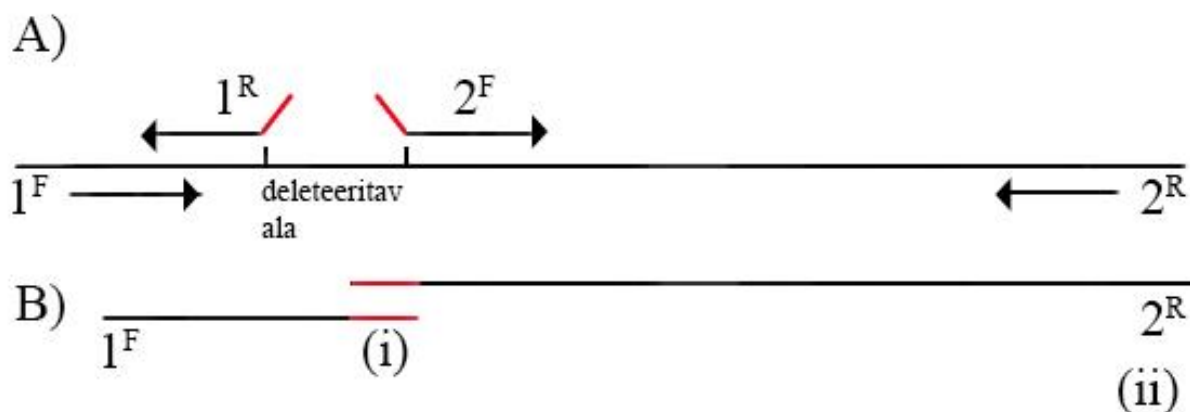
Kõik kasutatud *S.cerevisiae* tüved põhinesid tüvel DOM0090 (*MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 bar1::hisG [phi+]*). Pärmirakke kasvatati YPD (i.k. *Yeast extract, Peptone, Dextrose*) (10 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 20 g/l peptoon (Formedium), 20 g/l glükoos (Oriola)), SC-URA (7 g/l pärmi lämmastiku alust ilma aminohapeteta (BD Biosciences), 0,77 g/l CSM-URA (i.k. *complete supplement mixture*) (Formedium), 0,005% ADE/TRP) või SC-LEU (7 g/l pärmi lämmastiku alust ilma aminohapeteta (Difco), 0,69 g/l CSM-LEU (MP Biomedicals), 0,005% ADE/TRP) söötmes.

Bakterikultuuride kasvatamiseks kasutati LB söödet (10 g/l trüptoon (BD Biosciences), 5 g/l pärmiekstrakt (Formedium), 10 g/l NaCl). Erinevate konstruktide kloonimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α rakke. Rekombinantsete valkude ekspresseerimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve BL21-CodonPlus(DE3)-RP.

2.2.2 Konstruktide valmistamine PCR meetodil

Mps1 deletsioonide ja Mps1-as1 (i.k. *analogue-sensitive*) (Jones *et al.*, 2005) mutandi tegemiseks kasutati matriitsina pRSAB1234 vektorit, millesse on kloonitud *MPS1*-TAP liitvalku kodeeriv järjestus (valmistanud Mihkel Örd). pRSAB1234 baseerub *S.cerevisiae* süstikvektoril pRS426 ning sinna on viidud *GAL1* promootor ja TAP-märgist kodeeriv järjestus. Esimese PCR-i abil amplifitseeriti soovitud *MPS1* deletsioonist üles- ja allavoolu jäävad järjestused (joonis 4).

Kasutatud praimerid olid komplementaarsed eemaldatavat ala ümbritseva alla- ja ülesvoolu järjestusega, sisaldades ka omavahel kattuvat ala. Teine PCR kasutas praimerite poolt sisseviidud omavahel komplementaarseid järjestusi praimerina, et ühendada deletsioonist väljapoole jäävad amplifitseeritud N- ja C-terminaalsed järjestused. Seejärel kasutati geeniväliseid primereid, et amplifitseerida täielik, soovitud mutatsiooniga geen. Väliste praimeritega viidi PCR-i produktide otstesse 50 aluspaari pRSAB1234 vektoriga homoloogilist järjestust. *MPS1* konstruktide valmistamisel kasutati *Phusion High Fidelity* (Thermo Scientific) DNA polümeraasi, vastavalt tootja juhistele.



Joonis 4. Deletsioonide tegemine PCR meetodil. A) Esmalt tehti kaks PCR-i reaktsiooni, et amplifitseerida deletsioonist välja jääv N-terminaalne (praimeritega 1F ja 1R) ning C-terminaalne järjestus (2F ja 2R). 1R praimer sisaldab deletsioonist ülesvoolu jääva järjestusega komplementaarset osa ja 2F praimer sisaldab allavoolu jääva järjestusega identset ala. B) Esimese PCR-i abil amplifitseeritud DNA lõigud segati kokku PCR-i, milles esimese 5 minuti jooksul DNA polümeraas kasutab omavahel komplementaarseid (i) järjestusi praimerina, et ühendada N- ja C-terminaalsed järjestused. Seejärel lisatakse reaktsiooni 1F ja 2R praimerid, et amplifitseerida täielik, deletsiooniga või mutatsiooniga geen (ii).

Mps1 substraatide Spc29 ja Spc42 endogeenseks C-terminaalseks märgistamiseks 6HA-märgisega ja Mps1 märgistamiseks 13-myc epitoopmärgisega kasutati PCR meetodil ja homoloogilisel rekombinatsioonil põhinevat süsteemi (Janke *et al.*, 2004; Longtine *et al.*, 1998). Spc29 ja Spc42 jaoks kasutati pYM17 plasmidi (Janke *et al.*, 2004) ja Mps1-13myc jaoks pFA6a-13myc-kanMX6 plasmidi (Longtine *et al.*, 1998). Nende PCR-ide puhul kasutati Taq DNA polümeraasi vastavalt tootja juhistele (Solis BioDyne). PCR produktide kontrollimiseks kanti 5 μ l PCR produkti 1% agarosgeelile, kuhu oli lisatud etiidiumbromiid (0,3 μ g/ml). Elektroforees viidi läbi TAE puhvril (40 mM Tris-atsetaat (pH 8,3), 1 mM EDTA) Ülejäänud

PCR produkt (45 µl) puhastati *Gel/PCR Purification Kit-iga* (Favorgen) järgides tootja protokoll. Puhastatud DNA transformeeriti pärmitüve DOM0090 rakkudesse.

Ndc80¹⁻²⁵⁷ ning Cdc31 N-terminaalseks märgistamiseks 3HA-epitoomärgisega amplifitseeriti geenid praimeritega, millega viidi sisse XbaI ja SacI restriктаaside lõikejärjestused. PCR-i matriitsina kasutati DOM0090 genoomset DNA-d. Pärmilüüsimiseks suspendeeriti väike kogus rakke 30 µl 20 mM NaOH lahuses ning kuumutati 10 minutit 100°C termostaadis. Lüsaati tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 20 sekundit 13400 rpm ning supernatant pipeteeriti uude tuubi. PCR-i reaktsiooni lisati 1 µl lüsaati ja PCR viidi läbi vastavalt tootja juhistele *Phusion High Fidelity* DNA polümeraasiga. 3HA-epitoomärgis amplifitseeriti PCR-i abil ning praimeritega viidi sisse BamHI ja XbaI restriктаaside lõikejärjestused. PCR-i produktide sisestamiseks pRS315 vektorisse, millesse oli eelnevalt viidud ADH promooter, lõigati vektorit BamHI ja SacI, 3HA PCR-i produkti BamHI ja XbaI ning geeni PCR-i produkti XbaI ja SacI restriктаasidega. Lõikamiseks kasutati *FastDigest* restriктаase (Thermo Scientific) vastavalt tootja juhistele ning vektori restriksioonisegusse lisati ka *FastAP* fosfataasi (Thermo Scientific). Ensüümide inaktiveerimiseks inkubeeriti restriksioonisegu 5 minutit 80°C juures. Restriksioonisegudele lisati *6x Orange DNA Loading Dye* laadimispuhvrit (Thermo Scientific) ning laaditi 1% agarosgeelile, et lõigatud produktid lahutada. Sobiva pikkusega DNA lõigud lõigati geelist välja ning puhastati *Gel/PCR Purification Kit-iga* (Favorgen) järgides tootja protokoll. Restrikteeritud DNA lõikude ligeerimiseks pRS315-Padh vektorisse kasutati T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific) vastavalt tootja protokollile. Ligatsioonisegu inkubeeriti 2 tundi 16°C juures ning seejärel transformeeriti *E.coli* DH5α tüve rakkudesse. DH5α rakkudest eraldati plasmiidne DNA kasutades *Plasmid Extraction Mini Kit-i* (Favorgen) vastavalt tootja juhistele. Hiljem tõsteti Padh-3HA-geen konstrukti ümber pRS405 vektorisse. pRS405 on vektor, mida kasutatakse DNA integreerimiseks *LEU2* markergeeni lookusesse. Padh-3HA-geen konstrukti lõigati vektorist välja *FastDigest* SalI ja SacI restriктаasidega (Thermo Scientific). pRS405 plasmiid eraldati DH5α rakkudest, kasutades *Plasmid Extraction Mini Kit-i* ning lineariseeriti AflIII restriктаasiga (Thermo Scientific). 100 ng lineariseeritud vektorit transformeeriti DOM0090 rakkudesse.

Ndc80¹⁻²⁵⁷ märgistamiseks N-terminaalse 6xHis-märgisega amplifitseeriti PCR meetodil Ndc80¹⁻²⁵⁷ kodeeriv järjestus praimeritega, mis sisaldasid NheI ja BamHI restriктаaside lõikejärjestusi. Matriitsina kasutati DOM0090 lüsaati ja PCR-il kasutati *Phusion High Fidelity* DNA

polümeraasi. PCR-i produkti lõigati *FastDigest* restriктаasidega (NheI ja BamHI) ning ensüümid inaktiveeriti 5 minuti jooksul 80°C termostaadis. Resktriktsioonil saadud fragmendid ligeeriti T4 DNA ligaasi kasutades vastavalt tootja protokollile ja transformeeriti DH5 α rakkudesse.

2.2.3 *S. cerevisiae* transformatsioon

Erinevad *MPS1*-TAP PCR-i produktid transformeeriti pärmis koos lineariseeritud pRSAB1234 vektoriga. Homoloogilise rekombinatsiooni abil integreeritakse pärmirakus PCR-i produkt vektorisse.

DOM0090 tüve rakud kasvatati 50 ml YPD söötmes 30°C loksutil. Kultuuri optilisel tihedusel lainepikkusel 600 nm (OD600) 0,6-0,8 tsentrifugeeriti kultuuri 1 minut 2500 g ja sademe pealt eemaldati vedelik. Rakkude sade suspendeeriti 1 ml H₂O-s, pipeteeriti 1,5 ml ruumalaga tuubi ja tsentrifugeeriti lauatsentrifugeerimis 1 minut 2000 g. Pesu korrati 1 ml PL1 lahuses (5 mM Tris-HCl (pH 8), 0,5 mM EDTA, 100 mM LiOAc) ja seejärel suspendeeriti rakud rakkude ruumalast kahekordses PLI mahus. Rakke inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Segati kokku transformatsioonisegu, kuhu lisati 500 ng puhastatud PCR-i produkti, 50 ng lineariseeritud pRSAB1234 vektorit, 10 μ l *Salmon Sperm* DNA-d (kontsentratsiooniga 10 mg/ml, eelnevalt hoitud 10 minutit 100°C termostaadis) (Sigma) ning lisati vett lõppmahuni 100 μ l. Sellele segule lisati veel 100 μ l pärmirakke, 48 μ l DMSO-d ja 700 μ l PLII (10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 40% polüetüleenglükool (PEG 3350), 100 mM LiOAc). Segu suspendeeriti korralikult läbi ning inkubeeriti 40 minutit 42°C termostaadis. Pärast inkubeerimist hoiti segu 2 minutit jääl, misjärel tsentrifugeeriti segu 30 sekundit 3000 g. Rakud pesti 1 ml H₂O-ga ja korrati tsentrifugeerimist. Sademe pealt eemaldati vedelik ning rakud suspendeeriti 200 μ l H₂O-s.

pRSAB1234 vektori ja *MPS1* PCR-i produktidega transformeeritud pärmirakud plaaditi selektiivse SC-URA söötmega plaatidele, kuhu oli lisatud 2% glükoos. Spc42-6HA ja Spc29-6HA rakud plaaditi YPD söötmega plaadile, millelt järgmine päev tehti tempelkylv YPD plaadile, kuhu oli lisatud norseotritsiin lõppkontsentratsiooniga 100 mg/l (Werner BioAgents). Pärmirakud, millesse transformeeriti pRS405 vektoril põhinevad 3HA-Ndc80¹⁻²⁵⁷ ja 3HA-Cdc31 liitvalke kodeerivad lineariseeritud vektorid, külvati SC-LEU (+2% glükoos) plaadile.

2.2.4 *E. coli* transformatsioon

E. coli tüvede BL21-CodonPlus(DE3)-RP või DH5 α kompetentsed rakud sulatati jääl. Samal ajal segati 1,5 ml tuubis kokku transformatsioonisegu, mille koostises oli DNA (ligatsiooni puhul kogu ligatsiooni segu või 50-100 pg plasmiidset DNA-d) ja 20 μ l 5x KCM lahust (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂) ning vesi lõppmahuni 100 μ l. Transformatsioonisegule lisati 100 μ l rakke ning segu hoiti 20 minutit jääl. Kuumašoki jaoks tõsteti segu BL21 rakkude puhul 1 minutiks ja DH5 α rakkude puhul 1,5 minutiks 42°C termostaati ja seejärel kaheks minutiks tagasi jääle. Tuubi lisati 500 μ l LB söödet ja inkubeeriti 37°C loksutil 60 minutit. Rakud tsentrifugeeriti 2 minutit 3000 g ning sademelt eemaldati 400 μ l söödet. Bakterisade suspendeeriti ülejäänud söötmes ning plaaditi LB plaadile, kuhu oli lisatud antibiootikumid. pET28a transformatsioonil BL21 rakkudesse kasutati LB plaate kuhu oli lisatud 100 μ g/ml kanamütsiin (Applichem) ja 100 μ g/ml klooramfenikool (Applichem). pRS315 ja pRS405 transformatsioonil kasutati ampitsilliiniga (100 μ g/ml) LB plaate (Applichem). Plaati hoiti üleöö 37°C kapis.

2.2.5 Immunosadestamine

Immunosadestamise katseks transformeeriti *MPS1* deletsioonidega pRSAB1234 plasmiidid *S.cerevisiae* tüvedesse, milles oli uuritav Mps1 substraatvalk märgistatud epitoopmärgisega (Spc42-6HA, Spc29-6HA, 3HA-Ndc80¹⁻²⁵⁷ või 3HA-Cdc31). Rakud üksikutest kolooniatest inokuleeriti 5 ml SC-URA söötmes, kuhu oli lisatud 2% rafinoos ning kasvatati 30°C loksutil üleöö. Järgneval hommikul lahjendati kultuur ruumalani 30 ml ja kasvatati tiheduseni OD₆₀₀=0,6-0,8. Seejärel indutseeriti 2% galaktoosi lisamisega *GALI* promooterilt Mps1-TAP liitvalgu ekspressioon. Kaks tundi pärast galaktoosi lisamist koguti rakud tsentrifugeerides 1 minut 3500 g. Rakke pesti 30 ml 1x PBS-iga, misjärel korrati tsentrifugeerimist. Sademelt eemaldati vedelik ning rakud külmutati vedellämmastikus ja säilitati -80°C kapis. Lüüsimiseks suspendeeriti rakud 0,5 ml lüüsipuhvrts (25 mM Hepes-NaOH (pH 8,0), 0,1% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 30 mM EGTA) proteaaside inhibiitorite (1 mM PMSF ehk fenüülmetüülsulfonüül fluoriid, 1 μ g/ml aprotiniin, 1 μ g/ml pepstatiin A) ja fosfataasi inhibiitorite (180 μ g/ml Na₃VO₄, 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml β -glütserofosfaat) juuresolekul. Suspensioonile lisati üks-ühele suhtes *Silibead* keraid, läbimõõduga 0,4-0,6 mm (Biotop) ja rakud lüüsiiti 40 sekundit 4 m/s *FastPrep-24* homogenisaatoriga (MP Biomedicals). Rakusademe eemaldamiseks lüsaadist tsentrifugeeriti lüsaati lauatsentrifugeerimis 10 minutit (13400 rpm, 4°C) ja supernatant pipeteeriti uude tuubi. Kontsentratsioonide võrdsustamiseks määrati need Bradford

meetodil, milleks kasutati *Bio-Rad Protein Assay* lahust (Bio-Rad) vastavalt tootja juhistele. Immunosadestamiseks kasutati *Dynabeads M-270 Epoxy* magnetilisi keraid (Thermo Fischer), millele seoti küüliku seerumi IgG (Sigma-Aldrich) vastavalt tootja protokollile. IgG magnetilised kerad pesti kaks korda lüüsipuhvril (25 mM Hepes-NaOH (pH 8,0), 0,1% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 30 mM EGTA). Võrdsustatud kontsentratsioonidega lüsaatidele lisati 0,5 mg IgG keraid ning segu inkubeeriti 4°C juures *end-over-end* segajal tund aega (*Rotator-Mixer*, Biosan). Tuubid magnetiliste keradega asetati *Dynal MPCTM-S* magnetisse (Invitrogen) ja pesti 2 korda (pöörates tuube kolm korda) 1 ml lüüsipuhvril. Pestud magnetilised kerad suspendeeriti 20 µl 1x Laemmli SDS puhvril (60 mM Tris-Cl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glütserool, 5% β-merkaptotanool, 0,01% bromofenoolsinine), kuumutati 100°C juures 1 minut, misjärel eraldati kerad SDS-puhvril magneti abil. Proovid analüüsiti *Western Blot* meetodil, kasutades 10% SDS-polüakrüülamiidgeele.

Mps1-as1-TAP immunosadestamise puhul jagati enne indutseerimist kultuurid pooleks ja koos galaktoosiga lisati pooltele kultuuridele 1-NM-PP1 (Bishop *et al.*, 2000) lõppkontsentratsiooniga 10 µM (Carbosynth).

2.2.6 Sünkroniseeritud rakutsükliga kultuuri Mps1 ekspressioon

S.cerevisiae tüve, milles Mps1 ekspresseerub Mps1-13myc liitvalguna, kasvatati 50 ml YPD söötmes 30°C loksutil. Kultuuri tihedusel OD₆₀₀=0,3 lisati kultuurile α-faktorit lõppkontsentratsioonini 1 mg/l. 2,5 tunni möödudes tsentrifugeeriti kultuuri 1 minut 2000 g ja α-faktori eemaldamiseks pesti sadet kolm korda YPD söötmega. Iga pesu vahel korraldati tsentrifugeerimist ning seejärel suspendeeriti rakud 45 ml YPD söötmes ja asetati tagasi loksutile. Loksutil kasvavast kultuurist võeti 15-minutilise intervalliga kaheksa alikvooti. Alikvoote tsentrifugeeriti 1 min 2000 g ning külmutati vedellämmastikus. Proovid säilitati -80°C kapis.

Alikvoodid lüüsiit uurea lüüsipuhvril (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 M urea, 2 M tiourea, 65 mM CHAPS, 65 mM DTT, 1 mM PMSF, 180 µg/ml Na₃VO₄, 2,1 mg/ml NaF, 17,3 mg/ml β-glütserofostaat). Rakkude lüüsimine toimus sarnaselt immunosadestamise proovide lüüsimisele ning lüsaatide kontsentratsioonid võrdsustati Bradford meetodi abil. Alikvoodid analüüsiti *Western Blot* meetodil standardses SDS-polüakrüülamiidgeelides (SDS-PAA) ja *Phos-Tag* (Wako Chemicals) SDS-PAA geelides (6% akrüülamiid, 25 µM *Phos-tag*, 50 µM MnCl₂). Elektroforeesi järgselt pesti *Phos-Tag* geeli kaks korda 15 minutit elektroforeesipuhvril (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0,1% SDS), kuhu oli lisatud 10 mM EDTA ning seejärel lasti geelil veel 10 minutit elektroforeesipuhvril seista.

2.2.7 Western Blot analüüs

Lahutatud valgud kanti nitrotselluloosmembraanile *semi-dry* puhvril (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS, 20% metanool) *Pierce G2 Fast Blotter* aparaadiga (Thermo Scientific), kasutades *Standard Semi-Dry* ülekandeprogrammi. Membraani blokeeriti 5% rasvavaba lõssipulbri lahuses TBS-T puhvril (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,05% Tween 20, 150 mM NaCl) 1 h toatemperatuuril või 4°C juures üleöö. Seejärel inkubeeriti membraani 1 h primaarse antikehaga (1:500 lahjendus) 3% lõssilahuses TBS-T puhvril. MYC- või TAP-märgise korral kasutati C-myc (A-14) sC-789 küüliku polükloonaalset IgG antikeha (Santa Cruz Biotechnology) ja HA-märgise korral hiire anti-HA 11 kloon 16B12 monokloonaalset IgG antikeha (Biolegend). Clb2 puhul kasutati Clb2 (y-180) küüliku polükloonaalset IgG antikeha (Santa Cruz Biotechnology). Membraani pesti TBS-T lahuses 15 minutit ja 3 korda 5 minutit. Pärast pesu inkubeeriti membraani 30 minutit sekundaarse antikehaga (1:7500 lahjendus) 3% lõssilahuses TBS-T puhvril. Myc- või TAP-märgise ja Clb2 puhul kasutati kitses toodetud küüliku IgG vastase antikeha mädarõika peroksidaasi konjugaati (LabAs) ja HA-märgise puhul kasutati kitses toodetud hiire IgG vastase antikeha mädarõika peroksidaasi konjugaati (LabAs). 30 minuti möödumisel korraliti membraani pesusid TBS-T lahuses. Seondunud antikehade detekteerimiseks kanti membraanile üks-ühele suhtes Supersignal™ *West Pico Chemiluminescent Substrate* reagente (Thermo Scientific) ja membraan eksponeeriti röntgenfilmile.

2.2.8 6xHis-Ndc80¹⁻²⁵⁷ puhastamine

6xHis-Ndc80¹⁻²⁵⁷ konstrukti pET28a plasmiidis transformeeriti *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP tüve rakkudesse. Bakterirakke kasvatati 37°C loksutil 100 ml LB söötmes, kuhu oli lisatud 100 µg/ml kanamütsiini (Applichem). Kultuuri tihedusel OD₆₀₀=0,6 indutseeriti 6xHis-Ndc80¹⁻²⁵⁷-liitvalgu ekspressioon IPTG lisamisega lõppkontsentratsioonini 1 mM. Kolm tundi pärast indutseerimist tsentrifuugiti rakud põhja (10 minutit, 5000 g) ja sade külmutati vedellämmastikus. Lüüsimiseks sulatati sade jääl ning suspendeeriti 1,8 ml lüüsi puhvril (25 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10% glütserool, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatiin A, 1 µg/ml aprotiniin, 1 µg/ml leupeptiin, 0,1 U/µl DNAas I), kuhu oli lisatud lüsotsüüm (1 mg/ml). Seejärel inkubeeriti rakke 4°C juures 20 minutit, pidevalt segades. Lõplikuks lüüsimiseks sonikeeriti rakke 45% võimsusel 3 korda 10 sekundit (Bandelin Sonoplus HD 2070) ultraheligeneraatoriga, jahutades lüsaati iga sonikeerimise vahel 1 minut jääl. Lüsaati tsentrifuugiti 4°C lauatsentrifuugis 15 min, 14 000 rpm ning supernatant pipeteeriti uude tuubi.

Supernatant kanti 100 µl *Chelating Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare) kolonnile, mida eelnevalt pesti kümne kolonni ruumalaga H₂O-ga, 100 µl 200 mM CoCl₂-ga ja kümne kolonni ruumala lüüsi puhvriga (25 mM Hepes-NaOH (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10% glütserool). Pärast lüsaadi läbijooksmist kolonnist pesti kolonni kaks korda kümne kolonni ruumala lüüsi puhvriga ja ühe korra sama mahu lüüsi puhvriga kuhu oli lisatud 20 mM imidasool. Valgu elueerimiseks kanti kolonnile neli korda 100 µl lüüsi puhvrit, mis sisaldas 200 mM imidasooli.

II-, III- ja IV-eluaatidest laaditi 1-2 µl alikvoodid SDS-polüakrüülaamiidgeelile. Geelile laaditi ka BSA (veise seerumi albumiin) (Thermo Scientific) kindlate lahjendustega, et luua kalibreerimiskõver, mille abil arvutati puhastatud valkude kontsentratsioon. Geelide fikseerimiseks hoiti geele 15 minutit fikseerimispuhvris (30% etanool, 30% äädikhape) ning seejärel värviti geele *Coomassie Brilliant-Blue G-250* (Applichem) värvilahusega. Kahe tunni möödudes tõsteti geelid üleliigse värvi mahapesemiseks vette ja hoiti seal üleöö. Geel skanneeriti sisse *Epson Scan* skanneri abil (Epson) ning analüüsiti *ImageQuantTM TL* programmiga (GE Healthcare).

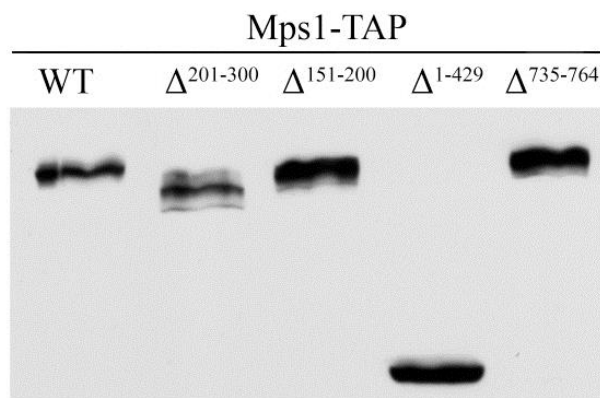
2.2.9 in vitro kinaasikatse

6xHis-Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kineetika kirjeldamiseks kasutati eelnevalt kirjeldatud puhastamisel saadud II eluaati ning TAP-meetodil puhastatud Mps1 kinaasi, mille puhastas pärmirakkudest Mihkel Örd. Reaktsiooni ruumala oli 20 µl ning see sisaldas substraati, 120 mM imidasooli, 2% glütserooli, 50 mM Hepes-NaOH, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mg/ml BSA, 500 µM ATP, 0,1 µCi/µl [γ -³²P]ATP, 2 nM Mps1 ja H₂O. Substraadist tehti elueerimispuhvris kolme-kordsete lahjendustega lahjendusrida, kokku 8 lahjendust (7 µM–3 nM). Reaktsiooni alustati ensüümisegu lisamisega substraadile. Igast proovist võeti 8 µl alikvoodid 6-ndal ja 12-ndal minutil, peatades reaktsiooni 9 µl 2x Laemmli SDS puhvri lisamisega. Proovid elektroforeesiti 10% SDS-polüakrüülamidiidgeelis ning värviti *Coomassie Brilliant-Blue R-250* lahusega. Pärast värvimist pesti geeli *High Methanol Destain* lahusega (40% metanooli, 7% äädikhapet) ja seejärel veega. Substraatvalku inkorporeeritud ³²P signaalide detekteerimiseks kasutati *Typhoon TRIO* skannerit (Amersham) ja tulemuste analüüsimiseks kasutati *ImageQuant TL* programmi.

2.3 Tulemused

2.3.1 Mps1 N-terminaalne ala on oluline substraatvalkude Ndc80, Spc29, Spc42 ja Cdc31 seondumiseks Mps1 valguga

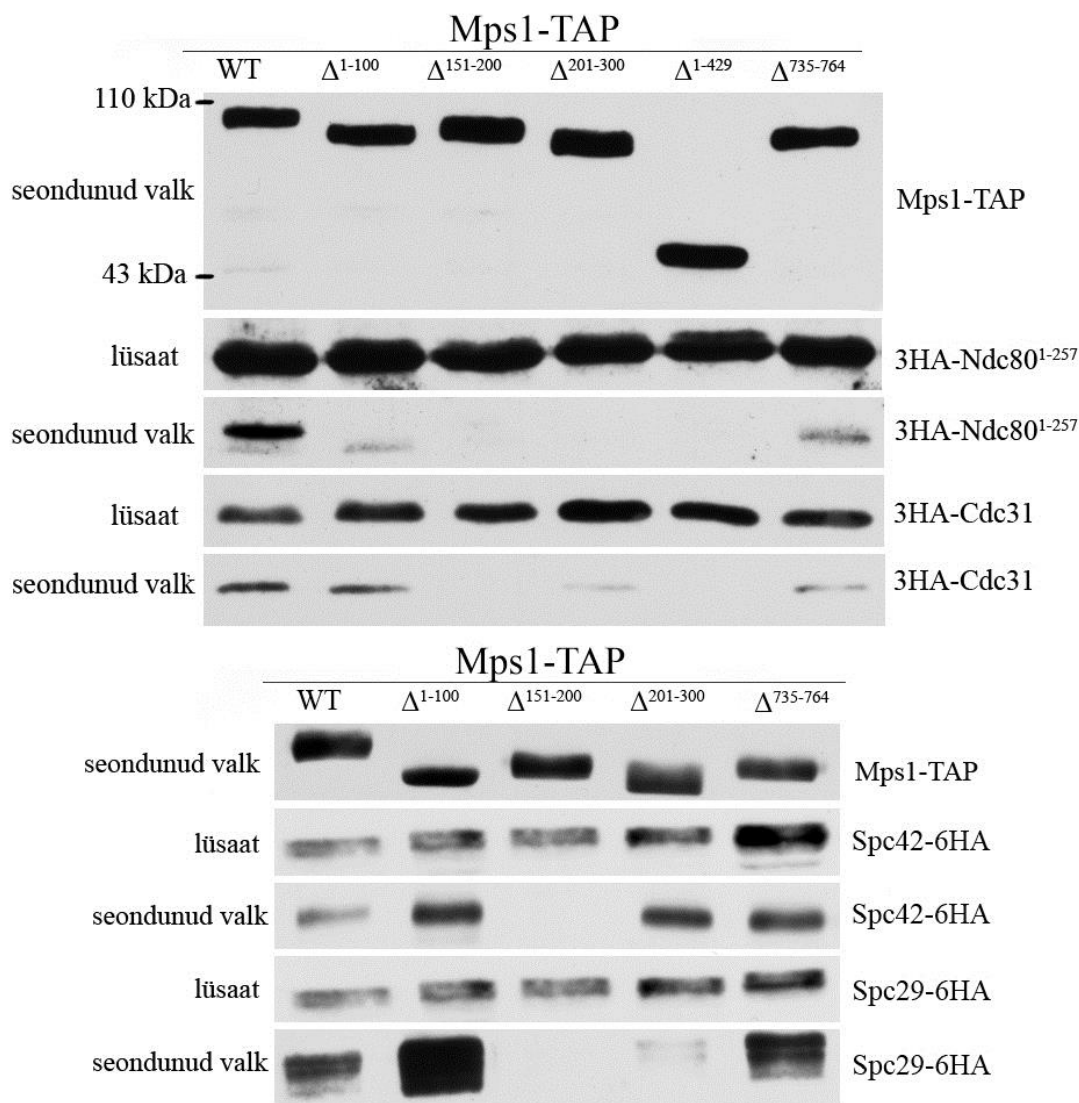
Araki *et al.* oletasid 2010. aastal, et Mps1 N-terminaalne mittekatalüütiline ala on oluline Mps1 substraadispetsiifilisuse määramiseks. Nad näitasid, et erinevad deletsioonid Mps1 N-terminaalses alas põhjustavad erinevaid defekte rakutsükli. Käesolevas bakalaureusetöös uuriti, kas need deletsioonid mõjutavad Mps1 seondumist substraatidega. Analüüsima Mps1 interaktsioone Cdc31, Ndc80, Spc29 ja Spc42 valkudega, kasutati valkude immunosadestamist pärmi lüsaatidest. Selleks indutseeriti *GALI* promooterilt Mps1-TAP liitvalgu ekspressioon pärmirakkudes, milles üks uuritav substraatvalk oli liidetud epitoopmärgisega. Pärmilüsaatidest seoti Mps1-TAP IgG-ga konjugeeritud keradele, kerasid pesti ning seondunud valke detekteeriti *Western Blot* meetodil. Uuritavad Mps1-TAP mutantsed valgud ekspresseeruvad metsiktüüpi Mps1-TAP valguga sarnasel tasemel (joonis 5), mistõttu võib arvata, et ükski tehtud deletsioon ei põhjusta olulisi defekte Mps1 valgu voltumises.



Joonis 5. Mps1 mutantsete valkude ekspressiooni kontrollimine. *GALI* promooteri all olevad erinevad mutantsed Mps1-TAP liitvalgud ekspresseeriti pRS426 plasmiididelt DOMOO90 tüve rakkudes. Valgud lüsaadis lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil ning detekteeriti *Western Blot* meetodil.

Immunosadestamisega kinnitati, et Mps1 N-terminaalne mittekatalüütiline ala on oluline Mps1 füüsilisteks interaktsioonideks substraatidega (joonis 6). Mps1 ^{Δ^{1-429}} mutant, millel on eemaldatud peaaegu terve N-terminaalne mittekatalüütiline regioon, ei seo Ndc80 ega Cdc31 lühemate regioonide deletsioon tõi esile substraatspetsiifilised efektid (joonis 6). Mps1 aminohappejääkide deleteerimine positsioonides 1–100 ei omanud olulist mõju Cdc31 seondumisele, kuid parendas seondumist Spc42 ja Spc29-ga võrreldes metsiktüüpi Mps1-ga. Vastupidine efekt oli Ndc80^{1–257}

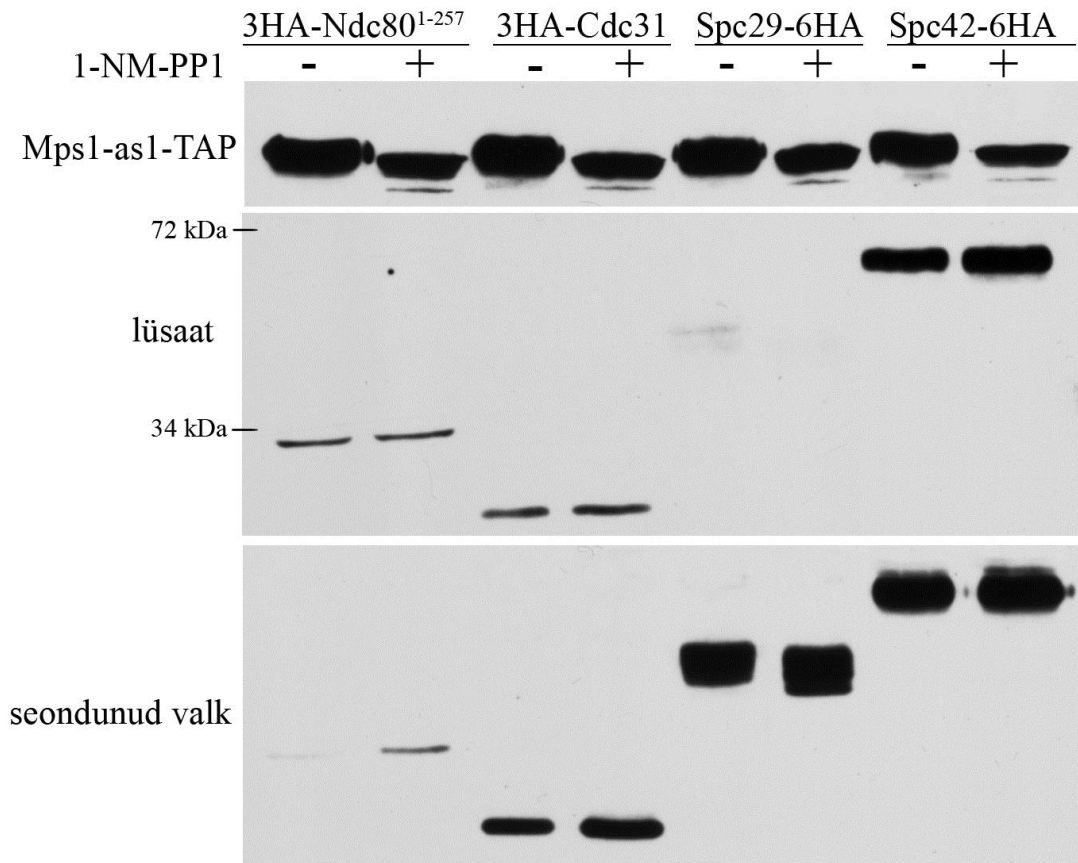
seondumisel, mille puhul oli seondunud valgu hulk võrreldes metsiktüüpi Mps1-ga tunduvalt madalam. Seetõttu võib see regioon sisaldada järjestusi, mis on olulised Ndc80 seondumiseks. Mps1 aminohappejääkide 151–200 deleteerimisel puudub immunosadestamise analüüsil detekteeritav signaal kõigil neljal substraadil. Deleteerides aminohapped positsioonil 201–300, sidus Mps1 ikkagi Spc29, Spc42 ja Cdc31 valke, kuid signaal puudus Ndc80^{1–257} puhul. Spc29 puhul varieerus signaal korduskatsete vahel. Tõenäoliselt nõrgendab aminohapete 201–300 eemaldamine interaktsiooni Spc29-ga ja seondumine on tundlik immunosadestamisel tehtud pesudele.



Joonis 6. Deletsioonid Mps1 N- ja C-terminaalses mittekatalüütilises alas mõjutavad Mps1 valgu seondumist substraatvalkudega. *Western Blot* analüüsi pildid näitavad immunosadestamise tulemusi. *GAL1* promooteri all ekspresseeritud Mps1-TAP liitvalgu immunosadestamine koos epitoopmärgisega substraatvalguga Ndc80, Cdc31, Spc29 või Spc42.

Immunosadestamisega analüüsi ka Mps1 C-terminaalse mittekatalüütilise ala mõju Mps1 seondumisele. Mps1, millel puudus C-terminaalne mittekatalüütiline ala (735-764), sidus paremini valke Spc42 ja Spc29, kuid Ndc80 ja Cdc31 puhul seondumine vähenes (joonis 6). Mõju seondumisele ei olnud siiski nii tugev, kui N-terminaalsete deletsioonide puhul, mistõttu võib järeldada, et kesksel kohal Mps1 substraatvalkude Ndc80, Spc29, Spc42 ja Cdc31 sidumisel on Mps1 N-terminaalne ala.

Inimese Mps1 puhul on näidatud, et Mps1 N-terminaalse ala aminohappejääkide autofosforüleerimine on vajalik Mps1 eemaldamiseks kinetohoorilt (Wang *et al.*, 2014). Analüüsiks, kas Mps1 autofosforüleerimine mõjutab interaktsioone valkudega Ndc80, Cdc31, Spc29 ja Spc42, kasutati immunosadestamist rakkudest, mis sisaldasid Mps1-as1-TAP liitvalku ja epitoopmärgisega substraatvalku. Mps1-as1 mutantne valk sisaldab üksikut mutatsiooni katalüütilises domäänis, mis võimaldab inhibeerida rakkudes Mps1 kinaasse aktiivsuse ATP analoogi 1-NM-PP1 abil. Mps1 kinaasse aktiivsuse inhibeerimisel kiireneb Mps1-TAP liitvalgu liikumine elektrofooresil, mis võib tuleneda Mps1 vähenenud autofosforüleerimisest (joonis 7). Mps1 kinaasse aktiivsuse inhibeerimine ei mõjutanud oluliselt seondumist Cdc31, Spc29 ja Spc42 valkudega (joonis 7). Seevastu 1-NM-PP1 lisamine rakkudele tugevdas Mps1-as1-TAP ja Ndc80¹⁻²⁵⁷ vahelist interaktsiooni. Mps1 kinaasse aktiivsuse inhibeerimine langetab Mps1 fosforüleerituse taset, mistõttu võib järeldada, et Mps1 autofosforüleerimine mõjub negatiivselt Ndc80 seondumisele.

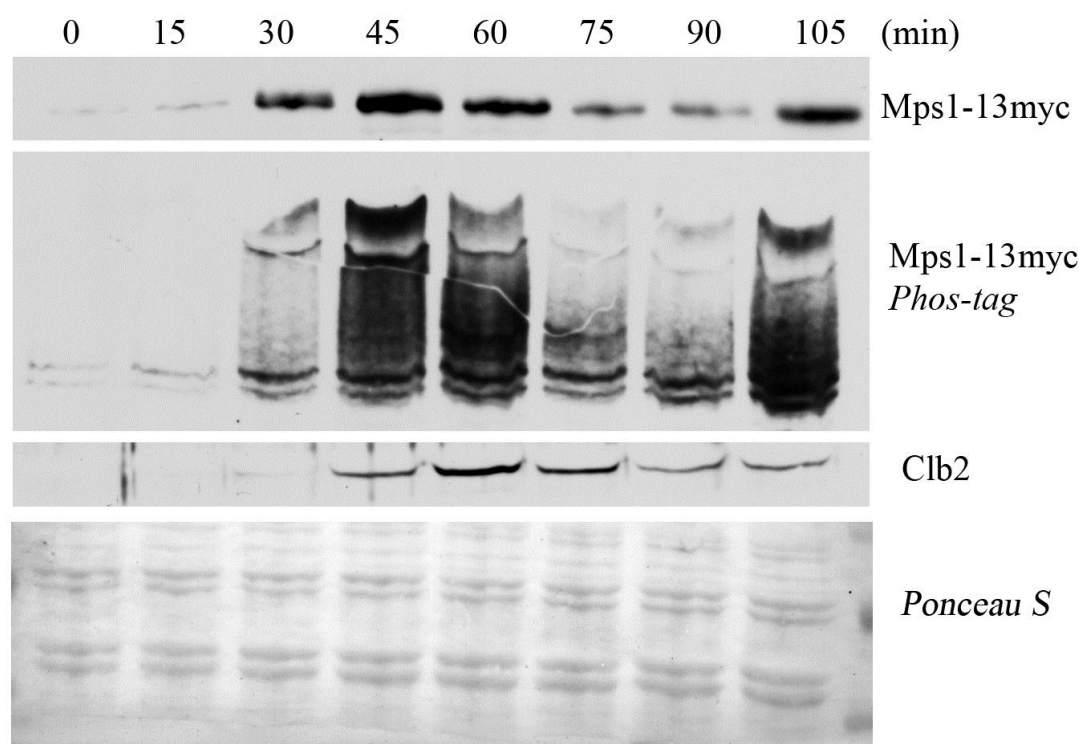


Joonis 7. Mps1 kinaase aktiivsuse mõju substraatvalkude sidumisele. *Western Blot* analüüsi pildid näitavad *GAL1* promooteri all ekspresseeritud Mps1-as1-TAP immunosadestamist koos epitoopmärgisega substraatvalguga. Pooltele kultuuridele lisati ATP analoogi 1-NM-PP1, mis inhibeerib Mps1 kinaase aktiivsuse (+). Ülemisel pildil on IgG keradele seondunud Mps1-as1-TAP liitvalk, keskmisel pildil on lüsaat enne keradele sidumist ja alumisel pildil on IgG keradele seotud Mps1-as1-TAP liitvalguga seondunud substraatvalgud.

2.3.2 Mps1 valgu tase ja fosforüleeritus muutuvad rakutsükli jooksul

Mps1 ekspressiooni uurimiseks sünkroniseeriti endogeenselt Mps1-13myc liitvalku ekspresseerivad rakud α -faktoriga G1-faasis ning α -faktori eemaldamisel võeti kultuurist 15-minutiliste intervallidega 8 alikvooti. Võetud alikvoodid analüüsiti 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis ja *Phos-Tag* SDS-PAA geelis, milles valkude fosforüleeritud vormid liiguvad elektroforeesil aeglasemalt. Hindamaks rakutsükli progressiooni, tehti samadest lüsaatidest *Western Blot* analüüs Clb2 suhtes. Clb2 on mitootiline tsükliin, mille valgu tase tõuseb kui rakk siseneb mitoosi ning saavutab maksimumi vahetult enne anafaasi, misjärel Clb2 degradeeritakse (Surana *et al.*, 1991). Mps1 valgu tase muutub rakutsükli jooksul oluliselt (joonis 8). Varases G1-faasis (0 ja 15 min pärast α -faktori mahapesu) on Mps1 valgu tase madal ning

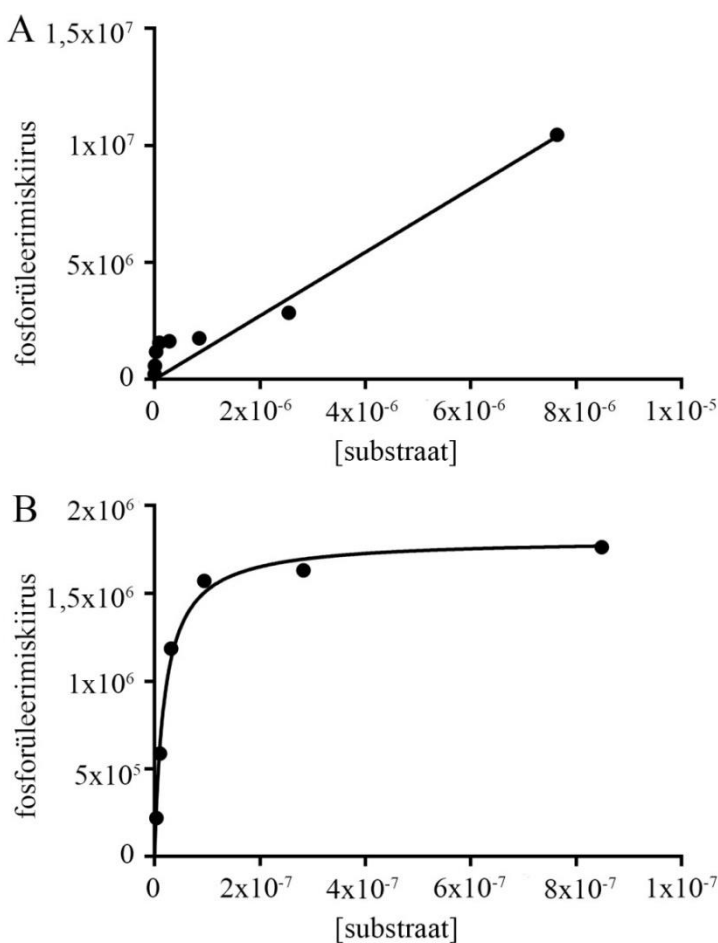
detekteeritav on ainult valgu vähe fosforüleeritud vorm. 30 minutit pärast rakutsükli G1-faasi seisakust vabanemist tõuseb Mps1 valgu tase ning jõuab maksimaalse tasemeni 45. minutil. Clb2 valk koguneb alates 45. minutist ning saavutab maksimaalse taseme 60. minutil, seega suureneb Mps1 valgu tase enne rakkude jõudmist mitoosi. Muutused valgu Mps1 fosforüleerituses sarnanevad üldiselt muutustega valgu tasemes, kuid kui 30 minutit pärast α -faktori mahapesu on levinum Mps1 elektroforeesil kiiresti liikuv vähefosforüleeritud vorm, siis 45. minutil on enamuse Mps1 valgust maksimaalselt fosforüleeritud vormis. Lisaks toimub vähenemine Mps1 fosforüleerituses enne Clb2 maksimaalse taseme saavutamist ning seega enne anafaasi.



Joonis 8. Mps1 valgu tase ja fosforüleerimine muutuvad rakutsükli vältel. *Western Blot* analüüsi pildid näitavad Mps1-13myc liitvalgu taset, fosforüleeritust ning Clb2 valgu taset α -faktoriga sünkroniseeritud rakukultuuris 0 kuni 105 minutit pärast α -faktori mahapesu. Ajahetkel 0 on rakud G1-faasis sünkroniseeritud. Kõigi kolme analüüsi puhul on kasutatud samasid lüsaate. Ülemisel pildil analüüsiti endogeense liitvalgu Mps1-13myc ekspressiooni, kasutades 10% SDS-PAA-geeli. Keskmisel pildil lahutati Mps1 erinevad fosfovormid *Phos-tag* SDS-PAA-geelis. Alumisel *Western Blot* pildil on endogeense valgu Clb2 ekspressiooni analüüs 10% SDS-PAA geelis. Viimasel pildil on Mps1-13myc ekspressiooni analüüs 10% SDS-PAA geelis pärast valkude ülekandmist nitrotselluloosmembraanile. Nitrotselluloosmembraan on värvitud *Ponceau S* värvilahusega.

2.3.3 Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kineetiline analüüs

Kemmler *et al.*, näitasid 2009. aastal, et *Saccharomyces cerevisiae* Mps1 interakteerub füüsiliselt Ndc80 N-terminaalse ala aminohappejääkidega positsioonides 1–257. Samuti sisaldab see ala aminohappejääke, mis on Mps1 poolt fosforüleeritavaid. Iseloomustamaks Mps1 afiinsust substraadi Ndc80¹⁻²⁵⁷ suhtes mõõdeti eksperimentaalselt K_m (Michaelise konstant). Michaelis-Menteni parameetrite leidmiseks teostati fosforüleerimisreaktsioonid substraatvalgu kontsentratsioonidel 3 nM kuni 7000 nM. Analüüsid kineetikat substraatvalgu kontsentratsioonide vahemikus 3 nM kuni 7000 nM, saadi tulemuseks ebatavalise kujuga graafik (joonis 9A).



Joonis 9. Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimise kiiruse sõltuvus substraatvalgu kontsentratsioonist. *In vitro* kinaasi reaktsioonides fosforüleeriti Ndc80¹⁻²⁵⁷ valg Mps1 kinaasiga. Erinevates reaktsioonides oli Ndc80 kontsentratsioon vahemikus 7000 nM – 3 nM. Graafikutel on fosforüleerimise kiiruse sõltuvust substraadi kontsentratsioonist analüüsitud mittelineaarse regressiooni abil. X-teljel on substraadi kontsentratsioon (M) ja y-teljel on fosforüleerimiskiirus (määramata ühik).

Michaelis-Menteni kineetika kohaselt kiireneb substraadi kontsentratsiooni tõustes ka reaktsioonikiirus kuni reaktsiooni piirkiiruseni (V_{Max}). Antud reaktsioonis ei toimu substraadi kontsentratsioonide vahemikus 800–9 nM reaktsiooni olulist kiirenemist, kuid kõrgematel kontsentratsioonidel reaktsiooni kiirus kasvab koos substraadi kontsentratsiooni tõusmisega. Seega võib Ndc80¹⁻²⁵⁷ fosforüleerimine Mps1 poolt toimuda kahel erineval mehhanismil ning saadud ebatavaline graafik võib olla nende segu. Kui analüüsida fosforüleerimiskiiruse sõltuvust substraadi kontsentratsioonist vahemikus 3–800 nM, allub reaktsioon Michaelis-Menteni kineetikale, kusjuures K_m on 19,2 nM (joonis 9B).

2.4 Arutelu

2.4.1 Valdav osa Mps1 N-terminaalsest alast on vajalik Ndc80-ga interakteerumiseks

Käesolevas töös näidati, et Mps1 aminohappejääkide positsioonides 151-200 ja 201-300 eemaldamine vähendavad oluliselt Ndc80 interakteerumist Mps1-ga. Araki *et al.* näitasid 2010. aastal, et nende alade eemaldamine põhjustab defekti käävi kontrollpunktis. Jones *et al.* näitasid 2005. aastal, et SAC aktivatsioon on sõltuv Mps1 kinaasest aktiivsusest, kuid deletsioonid positsioonides 151–200 ja 201–300 ei mõjuta Mps1 kinaasest aktiivsust *in vitro* (Araki *et al.*, 2010). Seega on võimalik, et vastavate deletsioonidega Mps1 ei ole võimeline interakteeruma Ndc80-ga *in vivo*, mistõttu ei saa Mps1 fosforüleerida valku Spc105, et indutseerida SAC aktivatsiooniks vajalike valkude seondumist kinetohoorile.

Inimese Mps1 puhul on näidatud, et kinetohooridele lokaliseerumiseks ja Ndc80 sidumiseks on olulised aminohapped positsioonides 1–200. See ala sisaldab kahte domääni, mis on vajalikud kinetohooridele lokaliseerumiseks. Olulisem neist on NTE ehk N-terminaalne pikendus (i.k. *N-terminal extension*, 1–62), mille puudumisel oli kinetohooridele lokaliseerunud Mps1 tase tunduvalt madalam võrreldes metsiktüüpi Mps1-ga (Ji *et al.*, 2015). Immunosadestamise katses vähenes interaktsioon Ndc80-ga Mps1^{Δ1-100} puhul, kuid tugevam mõju oli Mps1 151–200 ja 201–300 alade eemaldamisel (joonis 6). Kuna Mps1 N-terminaalne ala pärmi ja inimese vahel ei ole väga konserveerunud, on võimalik, et Ndc80 seondumine Mps1-ga ei oma sarnasusi peale selle, et mõlemad seovad Ndc80 N-terminaalset lõiku.

2.4.2 Mps1 afiinsus Ndc80¹⁻²⁵⁷ suhtes on kõrge

Ndc80¹⁻²⁵⁷ Mps1-vahendatud fosforüleerimise Michaelis-Menteni graafiku ebatavaline kuju võib kirjeldada Mps1 toimemehhanismi kinetohooridel (joonis 9A). Selline graafiku kuju võib

tähendada, et madalatel substraadi kontsentratsioonidel toimub Ndc80 seondumine Mps1 valguga N-terminaalse alaga, mis viib seondunud Ndc80 fosforüleerimisele. Kui vastav seondumine on stabiilne ning juba fosforüleeritud substraat ei dissotsieeru kinaasi küljest, võib see põhjustada olukorra, kus substraadi kontsentratsiooni tõstmine ei kiirenda fosforüleerimist, kuna Mps1 N-terminaalne ala on juba substraadiga küllastunud. Ndc80 interaktsioon Mps1 N-terminaalse alaga võib olla kõrge afiinsusega ($K_m=19,2$ nM). Edasisel substraadi kontsentratsiooni tõstmisel võib Mps1 fosforüleerida ka Ndc80 molekule, mis seonduvad ainult kinaasi katalüütilise domääniga. Niisugune fosforüleerimismehhanism on madala afiinsusega ning seetõttu ebaoluline madalatel substraadi kontsentratsioonidel, kuid võimaldab efektiivset fosforüleerimist kõrgetel substraadi kontsentratsioonidel. Leitud kõrge afiinsusega seondumismehhanism võib olla vajalik Ndc80 lokaliseerumiseks kinetohooridele *in vivo*. Olles seondunud N-terminaalse alaga Ndc80 kaudu kinetohooridele, võib Mps1 fosforüleerida teisi kinetohoori valke, nagu Spc105, kuna stabiilne interaktsioon Ndc80-ga tagab teiste substraatvalkude kõrge lokaalse kontsentratsiooni. Biorientatsiooni saavutamisel Ndc80-Mps1 interaktsioon kaob (Hiruma *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2015) ning sel juhul Mps1 madal afiinsus teiste substraatide suhtes ei võimalda enam efektiivset fosforüleerimist. Selle tagajärjel Spc105 defosforüleeritakse ning SAC inaktiveeritakse.

2.4.3 Mps1 järjestused 151–200 ja 201–300 sisaldavad konserveerunud aminohapete plokki

Mps1 N-terminaalne mitte-katalüütiline ala on pärmi ja kõrgemate eukarüootide vahel vähekonserveerunud, kuid võrreldes järjestuste homoloogiat *Saccharomycetales* seltsis, tuleb esile, et Mps1 järjestused positsioonides 151–200 ja 201–300 sisaldavad kõrgelt konserveerunud aminohapete plokkide, mis paiknevad positsioonides 152–171 ja 217–259 (Lisa 1). Võrreldes neid järjestusi *mps1-8* alleeli mutatsioonide tagajärjel tekkinud aminohappeliste muutustega (Lisa 2), tuli esile, et kümnest kaks asendust (I244V, E254G) toimusid konserveerunud aminohapetega 201–300 alas. Nii Mps1 aminohapete 201–300 eemaldamine, kui ka *mps1-8* alleel tekitab SPB duplikatsiooni ebaõnnestumist (Araki *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2002). Kas need konserveerunud aminohappejäägid omavad olulisust SPB duplikatsiooni defekti tekkel või mitte, vajab veel uurimist. Kuid käesolevas töös näidati, et Mps1 aminohappejäägid positsioonides 201–300 ei ole olulised käävi polaarkeha komponentide Spc42, Spc29 ja Cdc31 seondumiseks.

Araki *et al.* näitasid 2010. aastal, et Mps1, millel on eemaldatud aminohappejäägid positsioonides 151–201, suudab läbi viia käävi polaarkeha duplikatsiooni. Käesolevas töös näidati, et Mps1, millel on eemaldatud aminohappejäägid positsioonides 151–200, ei seonu Spc42, Spc29 ja

Cdc31 valkudega. Sellest võiks järeldada, et Mps1 ei vaja füüsilist interaktsiooni valkudega Spc42, Spc29 ega Cdc31, et neid fosforüleerida ja seeläbi täita oma funktsiooni. Kuigi kinetohooril on näidatud, et Mps1 lokaliseerimine ja sidumine on sõltuv ainult Ndc80 kompleksist, ei ole tõenäoline, et käävi polaarkehal on sarnane mehhanism, kuna Mps1 immunosadestub koos mitmete käävi polaarkeha valkudega. Samas on Mps1 kinaasil veel substraate käävi polaarkehal, mille täpsemad interaktsioonid Mps1-ga on tuvastamata. Huvitav substraat on kindlasti pool-silla komponent Sfi1, mille fosforüleerimine Mps1 poolt mõjutab Sfi1 polümeeriseerumist, et toimiks silla pikenemine (Elserafy *et al.*, 2014).

2.4.3 Mps1 fosforegulatsioon

Inimese Mps1 puhul on näidatud, et Mps1 autofosforüleerimine reguleerib kinetohoorile lokaliseerumist (Wang *et al.*, 2014). Kinaasse aktiivsusetas Mps1 lokaliseerub kinetohooridele paremini kui metsiktüüpi Mps1 ja Mps1 vabastatakse kinetohoorilt, kui toimub mitmete aminohappejääkide fosforüleerimine N-terminaalses mittekatalüütilises alas. *S.cerevisiae* Mps1 puhul ei ole sarnast regulatsiooni täheldatud, kuid immunosadestamisega näidati, et Mps1 kinaasse aktiivsuse inhibeerimine tõstab Ndc80 seondumist (joonis 7). Saadud tulemuse alusel võib inimeserakkudes kirjeldatud mehhanism toimida ka pärmirakkudes.

Käesolevas töös näidati, et G1-faasis on Mps1 valgu ja fosforüleerituse tase madal, kuid valgu tase tõuseb enne mitootilise tsükliini Clb2 akumulatsioonist. Eelnevalt on näidatud, et Mps1 on tsükliin-sõltuva kinaasi Cdk1 substraat ning vastav fosforüleerimine stabiliseerib Mps1 valgu (Jaspersen *et al.*, 2004). Seetõttu võib arvata, et Mps1 valgu taseme tõus pärast rakkude vabanemist G1-faasi seisakust on tingitud Cdk1 aktiivsuse tõusmisest ning Mps1 fosforüleerimisest. Kuna Mps1 valk koguneb vähemalt 15 minutit enne tsükliini Clb2, võivad Mps1 fosforüleerimist läbi viia G1- või S-faasi tsükliin-Cdk1 kompleksid. Mps1 valgu taseme tõus võib olla vajalik käävi polaarkehade duplikatsiooni lõpuleviimiseks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärkideks oli analüüsida Mps1 N- ja C-terminaalse mittekatalüütilise ala olulisust Ndc80, Cdc31, Spc29 ja Spc42 valkudega seandumisel ning puhastada Mps1-ga interakteeruv Ndc80 N-terminaalne lõik (1–257) ja kirjeldada selle fosforüleerimise kineetikat. Samuti analüüsida Mps1 ekspressiooni ja fosforüleerituse taseme muutusi rakutsüklis ning uurida, kas Mps1 autofosforüleerimine mõjutab substraatidega seandumist. Immunosadestamise abil näidati, et Mps1 N-terminaalne ala on vajalik Ndc80, Cdc31, Spc29 ja Spc42 valkudega seandumiseks. Mps1, millel puuduvad aminohappejäägid positsioonides 151–200, ei seo ühtegi uuritud substraatvalku. Seevastu eemaldades aminohappejäägid positsioonides 201–300, säilisid interaktsioonid Mps1 ning valkude Cdc31, Spc29 ja Spc42 vahel, kuid seundumine puudus Ndc80 valguga. Mps1 kinaasse aktiivsuse inhibeerimine ei mõjutanud seandumist käävi polaarkeha valkudega Cdc31, Spc29 ja Spc42, kuid Mps1, mille aktiivsus oli inhibeeritud, sidus Ndc80 valku paremini. Seega on võimalik, et Mps1 autofosforüleerimine reguleerib Mps1 lokaliseerimist rakus, sarnaselt inimese Mps1 kinaasile. Mps1 C-terminaalse mittekatalüütilise ala eemaldamine ei omanud väga olulist mõju Ndc80, Cdc31, Spc29 ja Spc42 valkudega seandumisele. Seetõttu võib arvata, et Mps1 interaktsioonid vastavate valkudega on sõltuvad peamiselt N-terminaalsest alast. Eelnevalt on näidatud, et Mps1 aminohappejääkide positsioonides 151–200 puudumine põhjustab defekte käävi biorientatsioonis ning käesolevas töös leiti, et vastava deletsiooniga Mps1 valk ei seonu Ndc80^{1–257} valguga. Lisaks näidati, et Mps1 valgu tase ja fosforüleeritus tõusevad rakutsükli progresseerudes, kusjuures Mps1 valk koguneb juba enne rakkude jõudmist mitoosi. Analüüsides Ndc80^{1–257} fosforüleerimist in vitro selgus, et Ndc80 N-terminaalne ala seondub kinaasiga Mps1 kõrge afiinsusega ($K_m = 19,2$ nM). Seega võib Ndc80^{1–257} lõik olla piisav, et tagada Mps1 stabiilne lokaliseerimine kinetohooridele.

Substrate recognition mechanisms of protein kinase Mps1 with substrates from kinetochore and spindle pole body.

Tuuliki Ojala

Summary

Proper chromosome segregation is dependent on the formation of a bipolar spindle. Several processes in cell cycle that lead up to this have been shown to be regulated by protein kinases. *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase Mps1 participates in spindle pole body duplication and spindle assembly checkpoint. Mutations in *MPS1* gene can cause defects in said processes and therefore cause aneuploidy, resulting in lethality. Many Mps1 substrates have been identified, but it is unclear which Mps1 region is significant for interacting with substrates. However, based on speculations that Mps1 N-terminal non-catalytic area is involved in interactions with substrates, various co-immunopurification experiments were carried out, using Mps1 mutant proteins. Spindle pole body components Cdc31, Spc29, Spc42 and kinetochore protein Ndc80¹⁻²⁵⁷ (Ndc80 N-terminal region 1–257 has been identified to be responsible for binding Mps1) were used as substrates. Removal of most of the Mps1 N-terminal region failed to create interactions between Mps1 and its substrates, similar to the removal of amino acids 150–200. Whereas removing amino acids 201–300 did not seem to affect binding to the spindle pole body components Cdc31, Spc29 and Spc42, it decreased Mps1 binding to Ndc80. Both segments (151–200 and 201–300) include amino acid blocks that are conserved between the species of the order *Saccharomycetales*. Further studies are needed to see if these conserved segments are behind individual interactions with substrates. Mps1 expression is low during the G1- and S-phase. However, it increases before cells enter mitosis, peaks in metaphase and drops during the cell cycle progression to anaphase. It has been shown that Mps1 homologue in humans is autophosphorylated in order to release Mps1 from kinetochores. So far, this has not been shown in budding yeast. But there might be a similar mechanism, as Mps1 did bind Ndc80 better, when its kinase activity was inhibited. Kinetic parameters regarding Mps1 activity towards Ndc80¹⁻²⁵⁷ were measured and Mps1 appears to have high affinity for Ndc80¹⁻²⁵⁷. The necessity for this is unknown. In conclusion, even though Mps1 functions in cell cycle are well described, the mechanism behind different phenotypes and Mps1 regulation is not that well understood.

Kasutatud kirjanduse loetelu

Adams, I.R., ja Kilmartin, J. V. (1999). Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145: 809–823.

Araki, Y., Gornbos, L., Migueleti, S.P.S., Sivashanmugam, L., Antony, C., ja Schiebel, E. (2010). N-terminal regions of Mps1 kinase determine functional bifurcation. *J. Cell Biol.* 189: 41–56.

Aravamudhan, P., Goldfarb, A.A., ja Joglekar, A.P. (2015). The kinetochore encodes a mechanical switch to disrupt spindle assembly checkpoint signalling. *Nat. Cell Biol.* 17: 868–879.

Biggins, S. (2013). The composition, functions, and regulation of the budding yeast kinetochore. *Genetics* 194: 817–846.

Biggins, S., ja Rose, M.D. (1994). Direct interaction between yeast spindle pole body components: Kar1p is required for Cdc31p localization to the spindle pole body. *J. Cell Biol.* 125: 843–852.

Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., *et al.* (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407: 395–401.

Bullitt, E., Rout, M.P., Kilmartin, J. V, ja Akey, C.W. (1997). The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell* 89: 1077–1086.

Burns, S., Avena, J.S., Unruh, J.R., Yu, Z., Smith, S.E., Slaughter, B.D., Winey, M., ja Jaspersen, S.L. (2015). Structured illumination with particle averaging reveals novel roles for yeast centrosome components during duplication. *Elife* 4: 1–27.

Byers, B., ja Goetsch, L. (1974). Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38: 123–131.

Byers, B., ja Goetsch, L. (1975). Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 124: 511–523.

Castillo, A.R., Meehl, J.B., Morgan, G., Schutz-Geschwender, A., ja Winey, M. (2002). The

yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J. Cell Biol.* 156: 453–465.

Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., Desai, A., Cheeseman, I.M., Brew, C., Wolyniak, M., Desai, A., Anderson, S., Muster, N., *et al.* (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127: 983–997.

Clarke, L. (1998). Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 212–218.

Clarke, L., ja Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504–509.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., Salmon, E.D., Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., *et al.* (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* 127: 969–982.

Elliott, S., Knop, M., Schlenstedt, G., ja Schiebel, E. (1999). Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *PNAS* 96: 6205–6210.

Elserafy, M., Šarić, M., Neuner, A., Lin, T.C., Zhang, W., Seybold, C., Sivashanmugam, L., ja Schiebel, E. (2014). Molecular mechanisms that restrict yeast centrosome duplication to one event per cell cycle. *Curr. Biol.* 24: 1456–1466.

Friedman, D.B., Sundberg, H.A., Huang, E.Y., ja Davis, T.N. (1996). The 110-kD spindle pole body component of *Saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein that is modified in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Biol.* 132: 903–914.

Funabiki, H., ja Wynne, D.J. (2013). Making an effective switch at the kinetochore by phosphorylation and dephosphorylation. *Chromosoma* 122: 135–158.

Geissler, S., Pereira, G., Spang, A., Knop, M., Souès, S., Kilmartin, J., ja Schiebel, E. (1996). The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *EMBO J.* 15: 3899–3911.

Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J., ja Schiebel, E. (2000). Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *EMBO J.* 19: 6475–6488.

- Hardwick, K.G., Weiss, E., Luca, F.C., Winey, M., ja Murray, A.W. (1996). Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* (80-). 273: 953–956.
- Hiruma, Y., Sacristan, C., Pachis, S.T., Adamopoulos, A., Kuijt, T., Ubbink, M., von Castelmur, E., Perrakis, A., ja Kops, G.J.P.L. (2015). Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* (80-). 348.
- Hornung, P., Maier, M., Alushin, G.M., Lander, G.C., Nogales, E., ja Westermann, S. (2011). Molecular architecture and connectivity of the budding yeast Mtw1 kinetochore complex. *J. Mol. Biol.* 405: 548–559.
- Hoyt, M.A., Totis, L., ja Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66: 507–517.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., ja Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* (80-). 279: 1041–1044.
- Jacobs, C.W., Adams, A.E., Szaniszló, P.J., ja Pringle, J.R. (1988). Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 107: 1409–1426.
- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M.M., Schramm, C., ja Schiebel, E. (2001). 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.* 20: 777–791.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., ja Reber, S. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes : new fluorescent proteins , more. *Yeast* 21: 947–962.
- Jaspersen, S.L., ja Winey, M. (2004). The budding yeast spindle pole body: structure, duplication, and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 20: 1–28.
- Jaspersen, S.L., Giddings, T.H., ja Winey, M. (2002). Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J. Cell Biol.* 159: 945–956.

- Jaspersen, S.L., Huneycutt, B.J., Giddings, T.H., Resing, K.A., Ahn, N.G., ja Winey, M. (2004). Cdc28/Cdk1 regulates spindle pole body duplication through phosphorylation of Spc42 and Mps1. *Dev. Cell* 7: 263–274.
- Ji, Z., Gao, H., ja Yu, H. (2015). Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* (80-.). 348: 1260–1263.
- Johnson, L.N., Noble, M.E., ja Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85: 149–158.
- Jones, M.H., Huneycutt, B.J., Pearson, C.G., Zhang, C., Morgan, G., Shokat, K., Bloom, K., ja Winey, M. (2005). Chemical genetics reveals a role for Mps1 kinase in kinetochores attachment during mitosis. *Curr. Biol.* 15: 160–165.
- Kang, J., Chen, Y., Zhao, Y., ja Yu, H. (2007). Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. *PNAS* 104: 20232–20237.
- Kemmler, S., Stach, M., Knapp, M., Ortiz, J., Pfannstiel, J., Ruppert, T., ja Lechner, J. (2009). Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J.* 28: 1099–1110.
- Knop, M., ja Schiebel, E. (1998). Receptors determine the cellular localization of a gamma-tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *EMBO J.* 17: 3952–3967.
- Lauzé, E., Stoelcker, B., Luca, F.C., Weiss, E., Schutz, A., ja Winey, M. (1995). Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *EMBO J.* 14: 1655–1663.
- Li, R., ja Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66: 519–531.
- London, N., ja Biggins, S. (2014). Mad1 kinetochores recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* 28: 140–152.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., ja Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr. Biol.* 22: 900–906.
- Longtine, M.S., Iii, A.M.K., Demarini, D.J., ja Shah, N.G. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Yeast* 14: 953–961.

Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.E., Zhang, C., Shokat, K.M., ja Jallepalli, P. V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* 190: 89–100.

Malvezzi, F., ja Westermann, S. (2014). “ Uno , nessuno e centomila ” : the different faces of the budding yeast kinetochore. *Chromosoma* 123: 447–457.

Mattison, C.P., Old, W.M., Steiner, E., Huneycutt, B.J., Resing, K.A., Ahn, N.G., ja Winey, M. (2007). Mps1 activation loop autophosphorylation enhances kinase activity. *J. Biol. Chem.* 282: 30553–30561.

Meraldi, P., McAinsh, A.D., Rheinbay, E., ja Sorger, P.K. (2006). Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins. *Genome Biol.* 7: R23.

Moens, P.B., ja Rapport, E. (1971). Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 50: 344–361.

Nagaoka, S.I., Hassold, T.J., ja Hunt, P.A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* 13: 493–504.

Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35: 673–745.

Nguyen, T., Vinh, D.B.N., Crawford, D.K., ja Davis, T.N. (1998). A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast γ -tubulin complex. *Mol. Biol. Cell* 9: 2201–2216.

Nolen, B., Taylor, S., Ghosh, G., Adams, J.A., Adams, J.A., Ahmed, Z., Smith, B.J., Kotani, K., Wilden, P., Pillay, T.S., *et al.* (2004). Regulation of protein kinases. *Mol. Cell* 15: 661–675.

Pagliuca, C., Draviam, V.M., Marco, E., Sorger, P.K., ja De Wulf, P. (2009). Roles for the conserved Spc105p/Kre28p complex in kinetochore-microtubule binding and the spindle assembly checkpoint. *PLoS One* 4: e7640.

Palframan, W.J., Meehl, J.B., Jaspersen, S.L., Winey, M., ja Murray, A.W. (2006). Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science* (80-.). 313: 680–684.

Pereira, G., Knop, M., ja Schiebel, E. (1998). 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* 9: 775–793.

Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644–656.

Poch, O., Schwob, E., de Fraipont, F., Camasses, A., Bordonné, R., ja Martin, R.P. (1994). RPK1, an essential yeast protein kinase involved in the regulation of the onset of mitosis, shows homology to mammalian dual-specificity kinases. *Mol. Gen. Genet.* 243: 641–653.

Robinow, C.F., ja Marak, J. (1966). A fiber apparatus in the nucleus of the yeast cell. *J. Cell Biol.* 29: 129–151.

Roof, D.M., Meluh, P.B., ja Rose, M.D. (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 118: 95–108.

Santaguida, S., ja Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28: 2511–2531.

Schramm, C., Elliott, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., ja Schiebel, E. (2000). The Bbp1p – Mps2p complex connects the SPB to the nuclear envelope and is essential for SPB duplication. *EMBO J.* 19: 421–433.

Schutz, A., ja Winey, M. (1998). New alleles of the yeast MPS1 gene reveal multiple requirements in spindle pole body duplication. *Mol. Biol. Cell* 9: 759–774.

Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M., ja Schiebel, E. (1993). The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J. Cell Biol.* 123: 405–416.

Spang, A., Grein, K., ja Schiebel, E. (1996). The spacer protein Spc110p targets calmodulin to the central plaque of the yeast spindle pole body. *J. Cell Sci.* 109.

Stucke, V.M., Silljé, H.H.W., Arnaud, L., ja Nigg, E.A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* 21: 1723–1732.

- Sun, T., Yang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, Q., Zhu, S., Kuchta, R., Chen, G., ja Liu, X. (2010). Cellular abundance of Mps1 and the role of its carboxyl terminal tail in substrate recruitment. *J. Biol. Chem.* 285: 38730–38739.
- Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B., ja Nasmyth, K. (1991). The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65: 145–161.
- Tanaka, T.U. (2010). Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* 29: 4070–4082.
- Vallen, E.A., Ho, W., Winey, M., ja Rose, M.D. (1994). Genetic interactions between CDC31 and KAR1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 407–422.
- Vinh, D.B.N., Kern, J.W., Hancock, W.O., Howard, J., ja Davis, T.N. (2002). Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex. *Mol. Biol. Cell* 13: 1144–1157.
- Wang, X., Yu, H., Xu, L., Zhu, T., Zheng, F., Fu, C., Wang, Z., ja Dou, Z. (2014). Dynamic autophosphorylation of Mps1 kinase is required for faithful mitotic progression. *PLoS One* 9: 1–10.
- Weaver, B.A.A., ja Cleveland, D.W. (2006). Does aneuploidy cause cancer? *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 658–667.
- Wei, R.R., Sorger, P.K., ja Harrison, S.C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *PNAS* 102: 5363–5367.
- Winey, M., ja Bloom, K. (2012). Mitotic spindle form and function. *Genetics* 190: 1197–1224.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., ja Byers, B. (1991). MPS1 and MPS2: Novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 114: 745–754.
- Winey, M., Hoyt, M.A., Chan, C., Goetsch, L., Botstein, D., ja Byers, B. (1993). NDC1: a nuclear periphery component required for yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 122: 743–751.

Kasutatud veebiaadressid

<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

Lisa 2. *mps1-8* alleeli punktmutatsioonidest tekkinud aminohappe asendused

1 MSTNSFHDYVDL^SKSRTNTRQFSDDEEFTTP
31 PKLSNFGSALLSHTEKTSASEILSSHNNDK

61 IANRLEEMDRSSSR^GSHPPPSMGNLTSGHTS
91 TSSHSTLFGRYLRNNHQ^VTSMTTMNTSDIEI

121 NVGNSLDKSFERIRNLRQNMKEDITAKYAE

151 RRSKRFLISNRTTKLGP^MAKRAMTLTNIFDE
181 DVPNSPNQPINARETV^IELPLED^GSHQTNFKE

211 TKRNTDYDSIDFGDLNPIQYIKKHNLPTSD

241 LPLISQIYFDKQRE^VENRQAALRKHSSRELL
271 YKSRSSSSSLSSNNLLANKDNSITSNNGSQ

301 PRRKVSTGSSSSKSSIE^GIRALKENIDTSN
331 NSNFNSPIHKIYKGISRNKDSSEKREVL^AR
361 NISINANHADNLLQ^DQENKRLKRS^ALDDAITN

391 ENINSKNLEVFYHRPAPKPPVTKK^AVEIVEP

421 AKSASLSNNRN^DNIITVND^DSQYEKIELLGRGG

Lisa joonis 2. *mps1-8* alleeli punktmutatsioonidest tekkinud aminohappe asendused. Kohandatud
(Castillo *et al.*, 2002)

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Tuuliki Ojala
(sünnikuupäev: 12.01.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Proteiinkinaasi Mps1 kinetohoori ja käävi polaarkeha substraatvalkude äratundmise mehhanismid”,

mille juhendaja on Mart Loog.

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016