

G蛋白偶联受体激酶5在有丝分裂中的作用

王菲菲 龙 慧 陈跃军* 马 兰

(复旦大学上海医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 G蛋白偶联受体激酶(GRK)是G蛋白偶联受体(GPCR)信号通路的负性调节因子。近来的研究发现, GRK除了磷酸化G蛋白偶联受体使其脱敏外, 还能与其他非受体底物结合, 功能呈现多样性。GRK5是GRK家族成员之一, 该研究探索了GRK5在细胞周期和有丝分裂中的作用, 结果显示: 在细胞内干扰GRK5的表达导致分裂中期的细胞数目增多和细胞凋亡。进一步的研究发现, 干扰GRK5的表达导致有丝分裂中期的染色体不能正常排列到赤道板, 而对分裂后期染色质分离以及胞质分裂没有影响。在细胞内干扰GRK蛋白家族的另一个成员GRK2对有丝分裂则没有明显影响。该研究提示GRK5是细胞有丝分裂的重要调控蛋白。

关键词 G蛋白偶联受体激酶; 有丝分裂; 细胞凋亡; 细胞周期

G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)是种类最多的受体超家族, 它们具有7次跨膜螺旋结构特征, 介导多种配体信号, 包括神经递质、激素、气味及其它小分子, 是多种药物的靶点。G蛋白偶联受体激酶(G protein coupled receptor kinases, GRKs)是体内一类重要的丝/苏氨酸激酶, 能够磷酸化GPCR, 从而参与调节GPCR信号, 调节多种配体及药物的作用^[1-2]。

GRK5是GRK家族重要一员, 广泛分布于心、脑、肺等器官, 介导多种GPCR信号转导^[3-4]。最近研究报导, GRK5还能与许多非受体底物结合, GRK5与I κ B α 结合, 调节NF κ B转录活性^[5]。体外实验证明, GRK5还能够与肌动蛋白^[6]以及DNA^[7]结合。我们最近的研究发现, GRK5可以通过调控肌动蛋白细胞骨架调节神经元的形态生成^[8]。这些研究提示, GRK5的功能具有多样性, GRK5在体内功能的实现, 不仅是对GPCR信号的调节, 其自身也可能是重要的信号分子。

真核细胞的有丝分裂过程是一个受到精确调控的动力学变化的过程。在细胞分裂过程中, 染色体在赤道板的正确排列和分离是细胞遗传物质稳定性的保障。遗传不稳定将会导致遗传病和肿瘤的发生^[9-13]。在有丝分裂中期, 在微管蛋白的动力调节下, 染色体排列到赤道板, 到后期两个染色单体的着丝粒分开, 纺锤丝把两条染色单体拉向两极^[14-15]。在有丝分裂过程中, 很多蛋白都锚定于着丝粒上, 对细胞周期的程序转换有调节作用^[16-17]。染色体乘客复合体(chromosomal passenger complex, CPC)是近来研究较多的可以与染色体结合并调控细胞有丝分裂的蛋白复合体, 主要由Aurora B激

酶、着丝粒中心蛋白(inner centromere protein, INCENP)、Survivin及Borealin/DasarB等蛋白组成^[18]。采用荧光定位标记染色显示, CPC在有丝分裂过程中呈动态分布, CPC在着丝粒上的准确定位对染色体在赤道板的排列和分离具有重要调节作用^[19]。Survivin蛋白在有丝分裂中期迅速转位到着丝粒, 并通过与INCENP的相互作用将Aurora B锚定到着丝粒上, 实现Aurora B对底物蛋白的磷酸化作用, 调节细胞分裂过程^[20-22]。近来, Zheng Yixian研究组^[23]发现, Survivin到着丝粒的定位受去泛素化酶USP9X的调节。USP9X使Survivin的63位的赖氨酸去泛素化, 使Survivin从着丝粒上解离。当USP9X的表达被抑制后, Survivin无法从着丝粒上解离, 导致有丝分裂中期染色体无法正确排列到赤道板上, 姐妹染色体分离时部分染色体滞后。我们实验室基因芯片检测结果显示, 下调GRK5后, 多个细胞周期相关的基因表达改变(数据未显示), 同时下调GRK5, 可以抑制细胞增殖^[24], 提示GRK5可能参与了细胞周期的调控, 在本研究中我们探索了GRK5在细胞周期及有丝分裂中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 Hela细胞购自美国American Type Culture Collection公司。

收稿日期: 2012-01-09 接受日期: 2012-02-17

国家自然科学基金(No.30900852, No.30900438)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54237680, E-mail: yuejunchen@fudan.edu.cn

1.1.2 主要试剂 MEM培养液和DMEM培养液购自GIBCO公司。胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司。Lipofectamine™ RNAiMAX购于Invitrogen公司。抗GRK2和GRK5的多克隆抗体购自Santa Cruze公司。抗centromere以及tubulin抗体从Sigma公司购得。抗组蛋白磷酸化抗体(p-H3)购自Millipore公司。FITC和Cy3偶联的荧光二抗购自Jackson Immol/Lunoresearch公司。DAPI从Sigma公司购得。IRDye 800CW和700CW偶联的抗鼠IgG抗体由Rockland公司购得。Tunel染色试剂盒购于Cell Signal公司。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦扫描显微镜(LSM-510)为Zeiss公司产品。细胞培养盘和培养板购自Falcon公司。Mini Protein II蛋白电泳仪、蛋白转移槽购自Bio-Rad公司。硝酸纤维素膜购自Amersham Biosciences公司。

1.2 方法

1.2.1 siRNA的合成 干扰人GRK2和GRK5的小干扰RNA寡核苷酸GRK2 siRNA、GRK5 siRNA1以及GRK5 siRNA2由Invitrogen公司合成。GRK5 siRNA1的干扰序列为: 5'-AGU AGA AGU CGU CGU CUG UGU GGUC-3'; GRK5 siRNA2的干扰序列为: 5'-UCA GGC AGU AUC GAG UGC UAG GAAA-3'; GRK2 siRNA的干扰序列为: 5'-GUU CCA GAA AUU CAU UGA GAG CGAU-3'。

1.2.2 细胞培养和siRNA、质粒转染及检测 HeLa细胞用含10% FBS的DMEM培养液传代培养, HeLa细胞以 5×10^4 /孔接种于24孔板中进行siRNA转染实验。4 μ L Lipofectamine™ RNAiMAX和5 μ L浓度为20 μ mol/L的siRNA分别加入100 μ L Opti-MEM中并静置5 min。将两种溶液混合后再于室温静置20 min。将混合液加入培养的细胞中, 混匀。56 h或者72 h后, 进行细胞分裂期染色体观察实验。siRNA干扰效率, 采用Western blot方法通过相应一抗以及IRDye 800CW和700CW偶联的二抗检测, 用Odyssey红外图像系统进行图像采集。

1.2.3 细胞免疫荧光染色 HeLa细胞用4%多聚甲醛室温固定10 min, PBS洗两次, 每次5 min, 采用1% BSA、1% FBS、1% Saponin封闭打孔30 min, 4 $^{\circ}$ C一抗孵育过夜, PBS洗三次, 每次5 min, 二抗室温孵育一小时, PBS洗三次, 每次5 min, 最后用封片剂封片。在HeLa染色体观察实验中采用DAPI孵育10 min, 使用的一抗为anti-p-H3, FITC偶联的anti-centromere抗体以及

anti-tubulin抗体, 二抗为Cy3-M。细胞Tunel染色按试剂盒提供的步骤进行。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观测以及采图 HeLa细胞荧光免疫染色封片后采用激光共聚焦显微镜观察, 63倍油镜(63 \times 1.3 NA)下用双通道(488, 543 nm)或是三通道(488, 543, 633 nm)激发光激发样品扫描。FITC的激发波长为488 nm, 测定波长510~530 nm, Cy3的激发波长为543 nm, 测定波长560 nm, DAPI激发波长为405 nm, 测定波长为420 nm。

1.2.5 数据分析 所有的数值都用平均值 \pm 标准误差(mean \pm SEM)表示。采用Student's-*t*检验两组间比较。

2 结果

2.1 下调GRK5的表达导致分裂期细胞增多

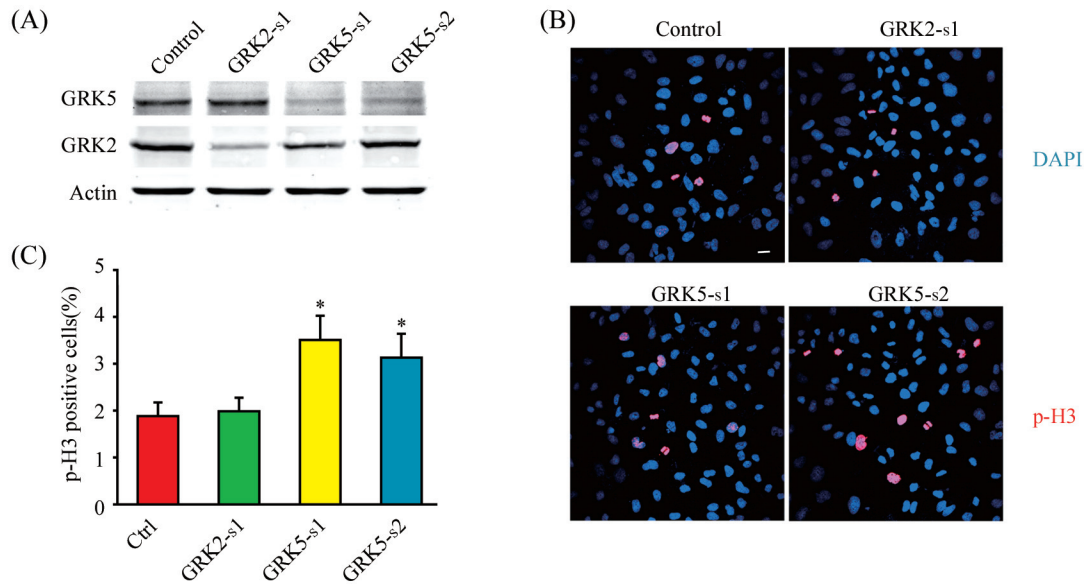
为了研究GRK5对细胞周期的影响, 我们采用siRNA干扰GRK5表达。首先, 将一个针对GRK2以及两个针对GRK5不同靶区的siRNA转染到HeLa细胞中, 56~72 h后采用Western blot检测干扰效率, GRK2以及GRK5的两个siRNA都能有效降低相应蛋白的表达, 而actin的蛋白量基本没有变化(图1A)。我们采用细胞免疫荧光染色的方法, 用DAPI标记细胞核, 用组蛋白3磷酸化(p-H3)抗体检测处于分裂期的细胞。细胞处于分裂期时, 组蛋白3会被Aurora B磷酸化, 是细胞处于分裂期的标志之一^[25-26]。在HeLa细胞中, 下调GRK5的表达以后, p-H3阳性细胞显著增多, 而下调GRK2的表达, 处于分裂期的细胞数与对照组相比没有显著差异(图1B和图1C)。结果表明, 下调GRK5的表达使分裂期的细胞增多。

2.2 下调GRK5的表达导致细胞凋亡

细胞周期的异常会诱导细胞凋亡, 因此我们又进一步检测了下调GRK5后, 对细胞凋亡的影响。采用Tunel染色检测凋亡的细胞, 统计凋亡细胞所占的比率。结果表明, GRK5的表达被干扰56 h以后, 凋亡细胞的数目增多, 两个靶区的凋亡细胞数目比率分别为对照组的2.84倍和4.21倍, 而GRK5表达下调72 h以后, 凋亡细胞数目的比率上升, 为对照组的4.86倍和5.74倍。而GRK2表达下调以后, 凋亡细胞的数目与对照组相比没有显著差异(图2A和图2B)。这些结果提示, 下调GRK5的表达, 可导致细胞凋亡。

2.3 下调GRK5的表达导致有丝分裂中期染色体排列异常

以上结果提示, GRK5的下调使细胞阻滞在分

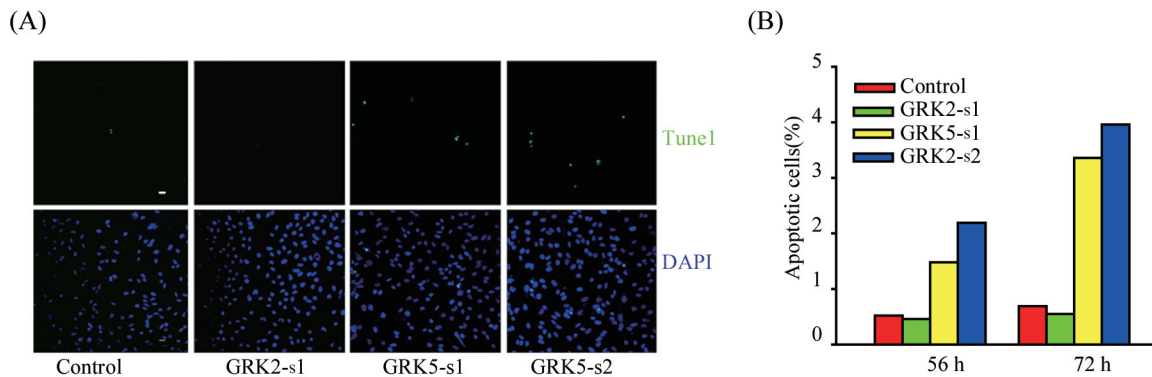


Hela细胞转染GRK2和GRK5的siRNA 56~72 h后。A: Western blot检测GRK2和GRK5 siRNA的干扰效率; B: HeLa固定后用抗组蛋白3磷酸化抗体标记分裂期的细胞(红色), DAPI标记细胞核, Zeiss-510激光共聚焦显微镜扫描采图, 标尺=10 μ m; C: 统计组蛋白3磷酸化阳性细胞的比率, 统计数据来自四次独立实验结果。* P <0.05, 与对照组比较。

Hela cells were transfected with GRK2 and GRK5 siRNA for 56~72 h. A: Western blot detected the knockdown efficiency of GRK2 and GRK5 siRNA. B: HeLa cells were fixed and detected by anti-p-H3 antibody (mitotic cells, red) and DAPI (nuclear, blue). Images were taken by Zeiss-510 confocal microscope, bar=10 μ m; C: quantitative result of the percentage of p-H3 positive cells from 4 independent experiments. * P <0.05 vs the cells transfected with control siRNA.

图1 下调GRK5的表达导致分裂期细胞增多

Fig.1 Down regulation of GRK5 leads to increased mitotic cells



Hela细胞转染GRK2和GRK5的siRNA 56~72 h后。A: HeLa细胞固定后, 用Tunel染色标记凋亡细胞, DAPI标记细胞核, Zeiss-510激光共聚焦显微镜扫描采图, 标尺=10 μ m; B: Tunel阳性细胞的比率, 统计数据来自四次独立实验结果, n =800~1 000。

Hela cells were transfected with GRK2 and GRK5 siRNA for 56~72 h. A: HeLa cells were fixed and labeled by Tunel to detect the apoptotic cells. Nuclear was labeled by DAPI. Images were taken by Zeiss-510 confocal microscope, bar=10 μ m; B: quantitative results of the percentage of Tunel positive cells from 4 independent experiments (n =800~1 000).

图2 下调GRK5的表达导致细胞凋亡

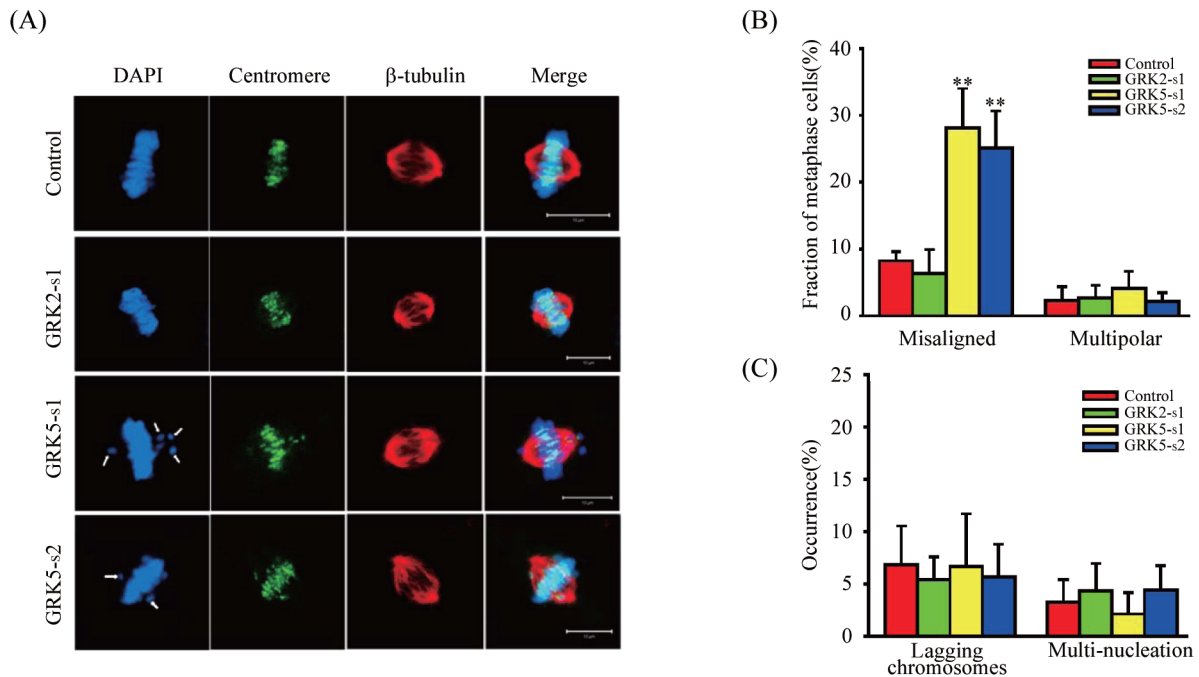
Fig.2 Down regulation of GRK5 leads to apoptosis of cells

裂中期, 同时细胞凋亡增多。为了详细研究GRK5对有丝分裂进程的影响, 我们采用siRNA干扰GRK5, 观察细胞有丝分裂过程中, 染色质的形态学变化。采用DAPI标记细胞染色质, 用细胞荧光免疫标记的

方法标记着丝粒和微管蛋白显示纺锤体形态, 在激光共聚焦显微镜下观察细胞分裂过程中染色体在赤道板排列以及胞质分裂的情况。结果表明, 两个不同靶序列的GRK5 siRNA干扰以后, 细胞有丝分裂中

期染色体不能正常排列到赤道板的细胞数目显著增多。但是细胞仍然为两极,纺锤体形态正常。而在GRK2被干扰以后染色体排列没有改变(图3A)。统

计结果也显示,与对照组相比,GRK5表达下调以后,发生染色体排列异常的细胞数目有显著增高,而干扰GRK2的表达后和对照组相比则没有显著差异(图



Hela细胞转染GRK2和GRK5的siRNA 56~72 h后, Hela细胞固定后用centromere抗体标记着丝粒(绿色),用微管蛋白 β -tubulin抗体记纺锤体(红色),DAPI标记细胞核与染色质(蓝色),荧光图用Zeiss-510激光共聚焦显微镜扫描,标尺=10 μ m。A: 有丝分裂中期细胞染色体在赤道板排列的形态; B: 统计有丝分裂中期发生染色体错排的细胞比率以及多极细胞的比率,统计数据来自五次独立实验结果, ** P <0.01, 与对照组比较; C: 统计有丝分裂后期发生染色体分离滞后的细胞比率以及多核细胞的比率,统计数据来自五次独立实验结果。

Hela cells were transfected with GRK2 and GRK5 siRNA for 56~72 h. Hela cells were fixed and labeled by anti-centromere antibody (green), anti β -tubulin antibody (red) and DAPI (blue). Images were taken by Zeiss-510 confocal microscope. A: representative images of chromosome alignment at the metaphase plate, bar=10 μ m; B: quantitative results of the percentage of metaphase chromosome misalignment and multipolar cells from 5 independent experiments, ** P <0.01 vs the cells transfected with control siRNA; C: quantitative results of the percentage of anaphase chromosome lagging and multi-nucleation cells from 5 independent experiments.

图3 下调GRK5的表达导致有丝分裂中期染色体排列异常

Fig.3 Down regulation of GRK5 leads to the misalignment of chromosome

3B)。接下来,我们用同样的方法观察细胞分裂后期染色体分离和胞质分裂的情况。与对照组一样,GRK5表达下调以后,染色体可以在纺锤丝牵引下向两极分离,表明GRK5表达下调对有丝分裂后期染色体的分离没有明显影响,统计有丝分裂后期发生染色体分离滞后的细胞数目与对照组相比也没有显著差异,干扰GRK2的表达和对照组相比染色体分离也没有明显影响(图3C)。由于细胞胞质分裂若发生障碍,则会产生双核以及多核细胞,我们统计了双核以及多核的细胞数目比率,结果显示,对照以及GRK2,GRK5干扰组中双核及多核细胞数目比率并没有差异,GRK5表达的下调并不影响胞质分裂(图3C)。

3 讨论

对GRK生理功能的研究主要集中在GRK催化磷酸化GPCR,进而导致GPCR脱敏的作用上。对不同亚型GRK基因敲除小鼠的研究也进一步确证了GRK在GPCR信号转导中的重要作用^[1]。我们实验室近来的工作以及其他实验室的工作都发现,GRK除了能磷酸化G蛋白偶联受体使其脱敏外,还能与其他非受体底物结合,功能呈现多样性^[5-8]。在本研究中,我们首次发现GRK5是细胞有丝分裂的重要调控蛋白:在细胞内下调GRK5的表达导致分裂期的细胞数目增多,细胞凋亡增多;进一步的研究发现,下调GRK5的表达导致有丝分裂中期的染色体不能正

常排列到赤道板,而不影响分裂后期染色质分离以及胞质分裂。有趣的是,在细胞内干扰GRK蛋白家族的另一个成员GRK2对有丝分裂进程则没有明显影响,提示GRK对有丝分裂的调控作用有亚型特异性。

我们的研究发现,下调GRK5导致组蛋白H3磷酸化阳性的细胞数目增高,组蛋白H3的磷酸化是细胞处于分裂期的标志之一,这一结果提示下调GRK5会导致细胞发生G₂/M期的阻滞。G₂/M期的阻滞可以激活p53,进而诱导p53依赖的细胞凋亡途径。p53通过抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的功能,上调促凋亡蛋白BAX的表达,以及上调p53AIP1、Noxa、PUMA等促进线粒体释放细胞色素C的蛋白的表达,从而导致细胞的凋亡^[27]。我们通过Tunel染色的方法发现,和我们预期的一致,下调GRK5的表达可以导致凋亡细胞数量的增加。

有丝分裂过程中染色体的正确排列和分离对细胞遗传稳定性具有重要作用。在本研究中我们发现,下调GRK5可以导致有丝分裂中期染色体不能正常排列到赤道板的细胞数目显著增多。在细胞有丝分裂中期,染色体要正确排列到赤道板上,姐妹着丝粒首先要与发自纺锤体两极的微管蛋白双向结合,在微管蛋白的动力学变化调节下,将染色体牵引到赤道板位置^[28]。而某些与微管蛋白单向结合的染色体,会被CPC中激活的Aurora B所校正,直到另一极的微管蛋白正确结合到着丝粒上^[29-30]。微管蛋白与染色体着丝粒的捕获结合的异常,直接导致染色体在分离时发生方向错误^[31-32]。以前的研究证明,在体外实验中GRK5可以与微管蛋白相互作用,并且磷酸化tubulin^[33]。但是在本研究中,我们发现GRK5表达下调以后,纺锤体形态正常,在染色体分离过程中发生染色体滞后的细胞数目没有显著改变,提示GRK5对有丝分裂过程中微管蛋白的功能没有明显影响。

定位于着丝粒的染色体乘客复合体(CPC)是调控有丝分裂的重要蛋白复合物。CPC在有丝分裂过程中扮演了重要的角色,涉及纺锤体形成、染色体排列、姊妹染色单体分离、纺锤体检查点信号及胞质分裂等多种重要功能^[22];另外,大量的研究结果表明CPC各组成蛋白无论在细胞定位还是在功能上都是相互依存的,Survivin可以与CPC组成蛋白中的INCENP以及Aurora B相互作用,调节CPC到着丝粒定位^[34]。干扰CPC复合体的成员蛋白Survivin、INCENP、Aurora B的表达或调节Survivin的泛素化修

饰都可以导致分裂中期染色体到赤道板的排列和姊妹染色体分离的异常,以及细胞凋亡的增加^[18-19,23]。这一现象和本研究中下调GRK5导致分裂中期染色体到赤道板排列的异常和细胞凋亡的增多的现象是类似的,提示干扰GRK5的表达可能影响了CPC复合体的部分功能,进而导致了有丝分裂进程的异常。

参考文献 (References)

- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 653-92.
- Guo J, Wu Y, Zhang W, Zhao J, Devi LA, Pei G, *et al.* Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2000; 58(5): 1050-6.
- Martini JS, Raake P, Vinge LE, DeGeorge BR Jr, Chuprun JK, Harris DM, *et al.* Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(34): 12457-62.
- Eckhart AD, Duncan SJ, Penn RB, Benovic JL, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Hybrid transgenic mice reveal *in vivo* specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart. *Circ Res* 2000; 86(1): 43-50.
- Sorriento D, Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Altobelli GG, Cimini V, *et al.* The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(46): 17818-23.
- Freeman JL, de la Cruz EM, Pollard TD, Lefkowitz RJ, Pitcger JA. Regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) by actin. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20653-7.
- Johnson LR, Scott MG, Pitcher JA. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Mol Cell Biol* 2004; 24(23): 10169-79.
- Chen YJ, Wang FF, Long H, Chen Y, Wu ZY, Ma L. GRK5 promotes F-actin bundling and targets bundles to membrane structures to control neuronal morphogenesis. *J Cell Biol* 2011; 194(6): 905-20.
- Cimini D, Degraffi F. Aneuploidy: A matter of bad connections. *Trends Cell Biol* 2005; 15(8): 442-51.
- Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2(4): 280-91.
- Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14(2): 120-5.
- Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: A chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2003; 2(3): 202-10.
- Sen S. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12(1): 82-8.
- Mitchison TJ, Kirschner MW. Properties of the kinetochore *in vivo*. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. *J Cell Biol* 1985; 101(3): 766-77.
- Rieder CL, Salmon ED. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 1998; 8(8): 310-8.
- Maney T, Ginkel LM, Hunter AW, Wordeman L. The kinetochore of higher eucaryotes: A molecular view. *Int Rev Cytol* 2000; 194:

- 67-131.
- 17 Shannon KB, Salmon ED. Chromosome dynamics: New light on Aurora B kinase function. *Curr Biol* 2002; 12(13): R458-60.
- 18 Vagnarelli P, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: The four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 2004; 113(5): 211-22.
- 19 Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11(2): 49-54.
- 20 Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC. INCENP is required for proper targeting of survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 2001; 11(11): 886-90.
- 21 Earnshaw WC, Cooke CA. Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in cleavage furrow formation. *J Cell Sci* 1991; 98(4): 443-61.
- 22 Murata-Hori M, Tatsuka M, Wang YL. Probing the dynamics and functions of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol Biol Cell* 2002; 13(4): 1099-108.
- 23 Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* 2005; 310(5753): 1499-504.
- 24 Chen XQ, Zhu HL, Yuan Man, Fu J, Zhou YQ, Ma L. G-protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylates p53 and inhibits DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285(17): 12823-30.
- 25 Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, *et al.* Mitotic phosphorylation of histone H3: Spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002; 22(3): 874-85.
- 26 Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M. Aurora-B phosphorylates histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 2002; 7(1): 11-7.
- 27 Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 2002; 181/182: 475-81.
- 28 Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, Earnshaw WC. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt23): 5461-77.
- 29 Cimini D, Wan X, Hirel CB, Salmon ED. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol* 2006; 16(17): 1711-8.
- 30 Pinsky BA, Kung C, Shokat KM, Biggins S. The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol* 2006; 8(1): 78-83.
- 31 Cimini D, Moree B, Canman JC, Salmon ED. 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(Pt20): 4213-25.
- 32 Khodjakov A, Cole RW, McEwen BF, Buttle KF, Rieder CL. Chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J Cell Biol* 1997; 136(2): 229-4.
- 33 Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL. Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1998; 273(32): 20308-16.
- 34 Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: Conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(10): 798-812.

The Role of GRK5 in Mitosis

Wang Feifei, Long Hui, Chen Yuejun*, Ma Lan

(The State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract G protein-coupled receptor (GPCR) kinases (GRKs) are known as a family of serine/threonine kinases that desensitize GPCR signaling by phosphorylating agonist-occupied receptors. Receptor phosphorylation catalyzed by GRK leads to the recruitment of arrestins to the cell membrane and the internalization of GPCRs. GRKs are also capable to phosphorylate a variety of non-GPCR substrates and regulate several signaling pathways via direct interactions with other proteins in a phosphorylation-independent manner. GRK5 is an important member of GRKs. The current study explored potential roles of GRK5 in cell cycle and cell mitosis. Our results showed that knockdown of GRK5 arrests cells in metaphase and induces cell apoptosis. Using DAPI labeling chromosome, we found that knockdown of GRK5 induces chromosome misalignment but has no effect on cytokinesis. However, knockdown of GRK2, another member of GRKs, has no effect on cell cycle and cell mitosis. Our results suggest that GRK5 is an important regulator of cell mitosis.

Key words G protein-coupled receptor kinase; mitosis; apoptosis; cell cycle

Received: January 9, 2012 Accepted: February 17, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30900852, No.30900438)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237680, E-mail: yuejunchen@fudan.edu.cn