

综述

肌动蛋白成核因子Spire的研究进展

庞涛, 张丽霞, 白安娜, 杨文, 郝利霞*

内蒙古医科大学附属医院康复科, 呼和浩特 010030

摘要: 肌动蛋白成核因子主要分为3类: Arp2/3复合体、Spire和Formin蛋白。其中Spire通过稳定的纵向四聚体成核组装微丝, 将肌动蛋白结合到微丝生长端。早在1999年Wellington等人就发现Spire是肌动蛋白的成核剂, 然而多年来的研究大多数着眼于Arp2/3、Formin蛋白, 作为肌动蛋白成核因子的一员, 关于Spire的相关研究相对较少。有研究显示, Spire蛋白通过合成肌动蛋白参与囊泡运输过程。近几年还有研究发现, Spire在神经发育方面也有着重要作用。本文希望通过对Spire的结构、表达、功能以及与疾病的关联等方面的研究进行梳理, 以便找到未来针对Spire研究富有意义的可能方向。

关键词: 肌动蛋白成核因子; Spire-2; 神经元

Advances in the study of the actin nucleation factor Spire

PANG Tao, ZHANG Li-Xia, BAI An-Na, YANG Wen, HAO Li-Xia*

Department of Rehabilitation Medicine, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China

Abstract: There are three main classes of actin nucleation factors: Arp2/3 complexes, Spire and Formin. Spire assembles microfilaments by nucleating stable longitudinal tetramers and binding actin to the growing end of the microfilament. As early as 1999, Wellington *et al.* identified Spire as an actin nucleating agent, however, over the years, most studies have focused on Arp2/3 and Formin proteins; there has been relatively less research on Spire as a member of the actin nucleating factors. Recent studies have shown that Spire is involved in the vesicular transport through the synthesis of actin and plays an important role in neural development. In this paper, we reviewed the structure, expression and function of Spire, and its association with disease in order to identify meaningful potential directions for studies on Spire.

Key words: actin nucleation factors; Spire-2; neuron

肌动蛋白是肌肉结构蛋白的一种, 是一类形成微丝的球状多功能蛋白质, 在肌肉运动中起重要作用。肌动蛋白无法自主成核, 需要成核因子来启动任何基于肌动蛋白的结构组装。目前已知的成核因子有三类: Arp2/3复合体、Formin (FMN) 蛋白和 Spire^[1]。Arp2/3复合体位于新细丝和现有细丝的分叉点, 从现有细丝侧端成核新细丝, 反复成核形成分支树突状微丝网。FMN蛋白可使细丝的延伸向生长端移动; 还可捆绑细丝。其中 Spire 通过稳定的纵向四聚体成核组装微丝, 将肌动蛋白结

合到微丝生长端。

1 Spire的结构

1999年, Wellington等人^[2]发现 Spire 蛋白含有 WH2 结构域, 是肌动蛋白单体结合的结构域, 其 FYVE 锌指主要朝向内体和囊泡膜, 其 KIND 结构域主要与 FMN 结合, 其 Spire-box 结构域结合 Rab 蛋白, 为囊泡运输提供能量。Spire 蛋白在中心区域编码四个 WH2 肌动蛋白单体结合位点 (WH2-A, -B, -C 和 -D)^[3]。Spire 最初被发现为果蝇 Spire 基

因的蛋白质产物, 是与 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 相互作用的蛋白^[2,3]。Quinlan 等发现了 Spire 蛋白的肌动蛋白成核的新机制^[4]。Spire 蛋白已经在多细胞的生物中被鉴定^[5]。脊椎动物基因组编码两个 Spire 基因, *Spire1* 和 *Spire2*^[6]。相应的蛋白 Spire-1 和 Spire-2 具有很高的相似性 (37% 同一性, 与小鼠蛋白有 50% 相似性), 特别是在进化上保守的结构域^[7]。所有已知的 Spire 蛋白共享一个共同的结构阵列, 中心区域编码四个结合 G-肌动蛋白的 WH2 结构域, 该区域对于蛋白质的肌动蛋白成核活性是必需和足够的^[4]。Spire 的 C 末端区域编码了 FYVE 锌指膜结合结构域^[3], 按照其含有的四种蛋白质 (Fab1p, YOTB, Vac1p 和 EEA1) 的初始字母命名的 FYVE 结构域是一种介导蛋白质的内体靶向的磷酸肌醇结合结构域^[8,9]。FYVE 锌指包含 8 个半胱氨酸残基, 其结合两个锌离子^[10]。该结构形成了疏水的“转塔环”能穿透膜^[9] (图 1)。Spire-FYVE 结构域与其他 FYVE 不同, 它缺乏特异性结合磷脂酰肌醇 3-磷酸的基本口袋^[11], 因此, Spire 直接结合膜的能力仍有待确认^[3]。进一步研究发现在培养的哺乳动物细胞中瞬时过表达时, Spire 蛋白具有明显的定位模式, 其定位于反高尔基网络、高尔基体后泡和再循环内体^[12], 独特的 Spire 定位取决于 FYVE 锌指结构域的完整性。删除 FYVE 锌指的突变导致突变蛋白质在细胞质中均匀分布^[12]。FYVE 锌指结构在半胱氨酸 2 和 3 之间表现出两个高度保守的疏水性氨基酸, 其形成疏水末端并与膜磷脂双层的疏水核心区域相互作用^[9,10]。Spire 蛋白 C 末端的 KIND 结构域与 FMN 相互作用, 静电相互作用介导了两种不同成核剂的亲和力^[5,13-15]。

2 Spire 的表达

2010 年 Pleiser 等^[16] 在小鼠中研究 *Spire2* 基因的表达情况, 应用 Northern 印迹分析显示 *Spire2* 基

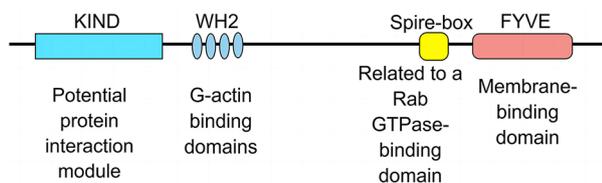


图 1. Spire 的结构示意图

Fig. 1. Structural diagram of Spire.

因的表达产物是单个 mRNA。原位杂交实验显示, 在胚胎发生过程中, *Spire2* 在神经系统和肠道的发育过程中表达。进一步研究发现 *Spire1* 和 *Spire2* 在发育过程中的表达部位有明显的不同, 发育前期它们的表达部位很少有重叠, *Spire1* 主要在神经系统中高表达, *Spire2* 在神经系统和肠道中表达, 但在发育后期, 这两者的表达位置有了较多重叠部位, 这进一步验证了 *Spire* 基因的功能冗余性。而此研究在成年小鼠大脑中又发现大多数情况下 *Spire1*、*Spire2* 基因只会有一种表达, 这可能提示 *Spire* 在细胞中的表达受某种机制的调节。*Spire2* 基因在成年小鼠消化道的上皮细胞和神经系统的神经元中检测到高表达^[6], 在睾丸精母细胞中也检测到高表达^[16]。应用原位杂交实验在果蝇的神经元中研究 *Spire* 功能, 发现果蝇 *Spire* 在中胚层和周围神经系统中广泛表达。对果蝇的神经发育研究发现 *Spire* 突变体的中枢神经系统轴突支架正常, ISNb 运动神经元的轴突通常不能支配腹侧肌肉组织, 进一步研究发现 *Spire* 蛋白在神经-肌肉接头形成中有很重要的作用^[17]。从目前 *Spire* 表达情况的研究结果来看, *Spire* 蛋白与神经发育、生殖以及细胞分裂高度相关, 这为研究 *Spire* 的功能提供了基础性证据。

3 Spire 的分布

2011 年 Schuh^[18] 通过免疫荧光标记发现 *Spire* 定位于囊泡和细胞膜表面, 肌动蛋白由此成核进入细胞质内, 同时发现卵母细胞和体细胞有一个有趣的差异, 相较于卵母细胞, *Spire* 蛋白在体细胞膜表面定位很少。2015 年 Tittel 等^[11] 通过对 *Spire*-FMN 复合体的膜结合特性的研究, 发现 *Spire*-2 有膜结合态和细胞质单体两种状态, *Spire* 蛋白不但可以在细胞膜上发挥作用, 还可以以单体的形式存在于细胞质中。同年 Manor 等^[19] 研究发现, *Spire* 蛋白还定位于线粒体外膜, *Spire* 蛋白的表达还与线粒体分裂速率呈正相关, 它通过肌动蛋白网状结构调节线粒体分裂。2023 年 Coscia 等^[20] 同样发现肌球蛋白 19 (Myo19) 可以与线粒体定位的 *Spire*-1 联系以促进线粒体分裂。了解 *Spire* 的分布位置可以为我们探究其功能发挥指明方向。

4 Spire 的功能

4.1 Spire 与细胞分裂

2011 年 Pfender 等^[21] 通过对小鼠卵母细胞减数

分裂的研究,发现了 Spire 蛋白通过组装肌动蛋白网络介导了纺锤体的定位,进一步研究发现 Spire-1 和 Spire-2 可以和 Fmn2 协同组装肌动蛋白。鉴于人类卵母细胞与小鼠卵母细胞有许多共同特征, Pfender 团队提出 *Spire1*、2 基因或许与人类不孕症有关。2018 年 Wen 等^[22] 对小鼠睾丸细胞进一步研究发现,敲除 *Spire1* (*Spire2* 正常表达) 不但导致了精原细胞无法完成减数分裂、过早脱离、无法通过上皮组织,还导致了精子发育畸形,这或许提示 Spire-1 在生殖细胞的发育中发挥主要功能,而 Spire-2 发挥协同作用。可惜,此次研究并没有详细探究 Spire-2 的具体作用。

4.2 Spire与囊泡运输

2001 年 Kerkhoff 等^[12] 研究发现 Spire 蛋白参与囊泡运输。进一步的研究证实了此猜想, Spire 蛋白与 Rab11 GTPase 共定位,其位于反高尔基网络、高尔基体后泡和再循环内体。肌动蛋白成核剂 Spire 通过 FYVE 锌指膜定位结构域专门针对内体膜,并提供了研究肌动蛋白动力学在调节细胞内膜转运中作用的重要基础。2011 年 Schuh^[18] 的研究发现,囊泡运动依赖于肌动蛋白而不是微管,并进一步阐明了 Spire 蛋白与囊泡运输的关系,在 Spire 蛋白缺失情况下,囊泡移动速度显著降低并且失去了方向性。2015 年 Tittel 等^[11] 研究发现肌动蛋白成核剂 Spire 蛋白在囊泡膜表面启动肌动蛋白聚合,是囊泡长距离运输过程所必需的,在正常情况下 Spire-2 FYVE 结构域和 C-末端 KIND 之间有分子内相互作用,当需要运送囊泡时, Spire-2 分子内结构被打开,其 FYVE 结构域以静电吸引的方式吸附到囊泡膜表面,开始进行肌动蛋白的成核作用,聚合成螺旋状的肌动蛋白丝,使肌球蛋白沿着肌动蛋白丝移动。2020 年 Bradley 等^[23] 研究显示 Spire 作为一种成核促进因子,可以促进肌球蛋白合成的进程,还可以增强 Capu (一种 FMN 蛋白) 的肌动蛋白组装活性,提高合成效率。

4.3 Spire与神经系统

2014 年 Pleiser 等^[24] 对小鼠恐惧行为的研究发现, Spire-1 蛋白的低表达导致小鼠树突棘减少,他们同时还提出 Spire-1 和 Spire-2 可能存在功能上的互补。2014 年 Ferreira 等^[25] 应用果蝇幼虫进行对伤害的感受研究,发现 Spire 蛋白的表达可以调控果蝇幼虫树突棘的生长。2017 年 Agis-Balboa 等^[26] 将小鼠的 *Fmn2* 基因敲除后发现小鼠的恐惧反应消

失了,同时小鼠还表现出年龄相关的加速记忆衰退,鉴于 Spire 和 *Fmn2* 的协同作用,这或许提示 Spire 基因可能与阿尔茨海默病有关联。2022 年 Stürner 等^[27] 通过计算机建模研究树突棘发育与肌动蛋白因子的关联时发现,敲除 Spire 使新生成的树突棘数量减少,表明了 Spire 蛋白在树突棘第一步分支形成中起重要作用。同时, Spire 敲除后树突棘稳定分支增加,提示 Spire 还发挥了独立于 Capu 的功能。

4.4 Spire与DNA修复

2015 年 Belin 等人^[28] 对核内肌动蛋白进行了可视化研究, DNA 的损伤可引起 FMN2 和 Spire-1/2 的反应,通过生成微丝参与到 DNA 损伤修复中,同时还发现单独敲除 *Spire1* 或 2 对 DNA 损伤后的肌动蛋白微丝生成几乎没有影响,也反映出 Spire-1/2 在功能上的重叠。这同时提示我们 Spire 蛋白在基因稳定性层面可能起着重要作用,但还需要更深入的研究。

5 Spire与多种疾病的关联

Spire 蛋白在细胞物质转运方面的调控作用间接影响了病原体在机体的侵袭力。2001 年 Kerkhoff 等研究发现 Spire 显性干扰突变体 (*Spire-1-CT*) 的过度表达强烈地抑制水泡性口炎病毒 G 蛋白 (vesicular-stomatitis-virus-G protein, VSV-G) 向质膜的转运^[12]。2014 年 Lagal 等^[29] 在癌细胞侵袭性的研究中发现, Spire 蛋白的肌动蛋白成核和在囊泡运输中的作用,可以促进细胞的侵袭转移行为。*Spire1* 的过度表达可以增加并加快内皮的侵袭程度。2016 年 Andritschke 等^[30] 发现 Spire 蛋白在鼠伤寒沙门氏菌的感染中起作用, Spire-1 干扰细菌结合,而 Spire-2 影响鼠伤寒沙门氏菌的细胞内复制。因此,这两种蛋白可能在病原体-宿主相互作用中发挥非冗余功能。2022 年 Torres 等^[31] 在研究病毒感染机制时发现, Spire 蛋白可以参与到先天免疫中,是一种先天免疫的促进因子,进一步研究发现 Spire-1 的 C 段与牛痘病毒蛋白 K7 相互作用,同时作用于线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS) 下游,抑制 RNA 和 DNA 病毒的复制和传播,但其具体机制还需要进一步的研究。

同样地, Spire 蛋白的作用还可影响人体细胞因子的释放。2022 年 Holthenrich 等^[32] 研究发现, Spire 蛋白或许通过肌动蛋白成核作用影响内皮细胞释放血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF), 从

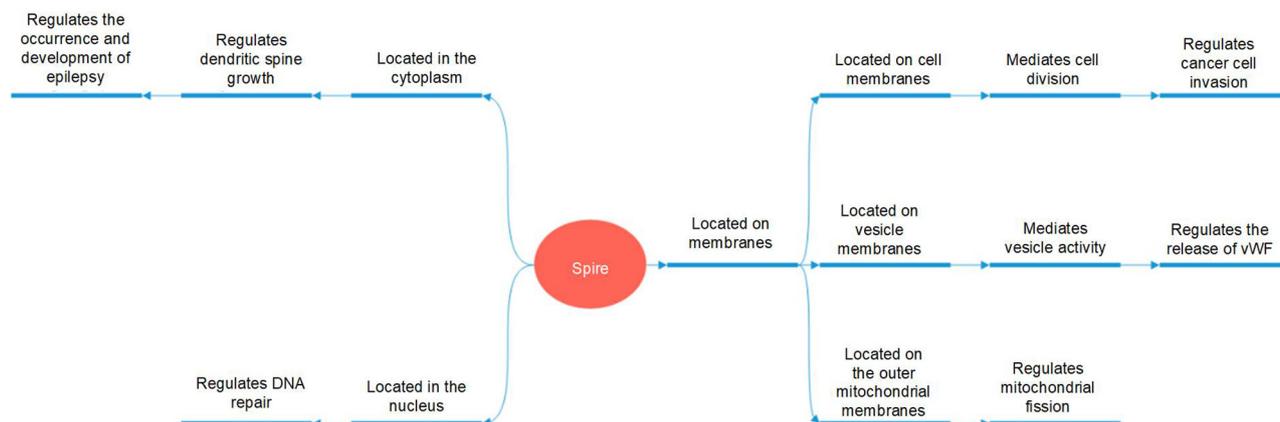


图 2. Spire的功能总结示意图: Spire蛋白的不同定位指向不同的功能

Fig. 2. Summary diagram of the functions of Spire: different localizations of the Spire protein point to different functions. vWF: von Willebrand factor.

而参与凝血过程, 其具体机制仍需进一步研究, 也许未来可通过相关研究, 探索出止血新药物。

Spire 蛋白在促进神经生长方面也有新的发现。2022 年我们团队^[33]前期在研究 Spire-2 与癫痫的关联时发现, 癫痫患者及癫痫小鼠的脑组织中 Spire-2 表达降低, 而沉默 Spire-2 可导致癫痫发作的严重程度加重, Spire-2 的过度表达则可以使癫痫发作的严重程度减轻, 由此我们团队认为 Spire-2 的表达可能参与调节癫痫的发生和发展。

6 展望

过去对 Spire 的研究着重于 Spire-1, 多项研究显示 Spire-1 在发育和囊泡运输方面有突出作用, 最近的研究发现与 Spire-1 高度同源的 Spire-2 也有着不可或缺的地位。由于 Spire 蛋白在囊泡运输过程中的重要作用, 未来的研究或许可以着眼于通过囊泡运输所需物质至靶点位置以达到治疗目的。同时 Spire 蛋白在病毒免疫方面的表现也值得关注, 可以进一步研究相关的抗病毒疗法。值得注意的是, Spire 蛋白在神经发育方面的作用以及 Spire 在促进树突棘生长发育方面的作用提示我们未来可以针对树突棘关联的神经系统疾病展开研究。另外 Spire 蛋白在癌细胞侵袭方面的促进作用或许有望启发新的抗癌疗法。综上所述, 由于 Spire 蛋白在机体多项基础功能中扮演着重要角色 (图 2), 进一步阐明 Spire 蛋白的功能和作用机制对多种疾病的临床治疗有着重要意义。

参考文献

- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 545–576.
- Wellington A, Emmons S, James B, Calley J, Grover M, Tolia P, Manseau L. Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development* 1999; 126(23): 5267–5274.
- Otto IM, Raabe T, Rennfahrt UE, Bork P, Rapp UR, Kerkhoff E. The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* 2000; 10(6): 345–348.
- Quinlan ME, Heuser JE, Kerkhoff E, Mullins RD. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 2005; 433(7024): 382–388.
- Ciccarelli FD, Bork P, Kerkhoff E. The KIND module: a putative signalling domain evolved from the C lobe of the protein kinase fold. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(7): 349–352.
- Schumacher N, Borawski JM, Leberfinger CB, Gessler M, Kerkhoff E. Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr Patterns* 2004; 4(3): 249–255.
- Kerkhoff E. Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol* 2006; 16(9): 477–483.
- Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 1996; 271(39): 24048–24054.
- Hurley JH. Membrane binding domains. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(8): 805–811.

- 10 Misra S, Hurley JH. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 1999; 97(5): 657–666.
- 11 Tittel J, Welz T, Czogalla A, Dietrich S, Samol-Wolf A, Schulte M, Schwille P, Weidemann T, Kerkhoff E. Membrane targeting of the Spir-formin actin nucleator complex requires a sequential handshake of polar interactions. *J Biol Chem* 2015; 290(10): 6428–6444.
- 12 Kerkhoff E, Simpson JC, Leberfinger CB, Otto IM, Doerks T, Bork P, Rapp UR, Raabe T, Pepperkok R. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol* 2001; 11(24): 1963–1968.
- 13 Pechlivanis M, Samol A, Kerkhoff E. Identification of a short Spir interaction sequence at the C-terminal end of formin subgroup proteins. *J Biol Chem* 2009; 284(37): 25324–25333.
- 14 Vizcarra CL, Kreutz B, Rodal AA, Toms AV, Lu J, Zheng W, Quinlan ME, Eck MJ. Structure and function of the interacting domains of Spire and Fmn-family formins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(29): 11884–11889.
- 15 Zeth K, Pechlivanis M, Samol A, Pleiser S, Vornrhein C, Kerkhoff E. Molecular basis of actin nucleation factor cooperativity: crystal structure of the Spir-1 kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND)*formin-2 formin SPIR interaction motif (FSI) complex. *J Biol Chem* 2011; 286(35): 30732–30739.
- 16 Pleiser S, Rock R, Wellmann J, Gessler M, Kerkhoff E. Expression patterns of the mouse Spir-2 actin nucleator. *Gene Expr Patterns* 2010; 10(7–8): 345–350.
- 17 Gates MA, Kannan R, Giniger E. A genome-wide analysis reveals that the *Drosophila* transcription factor Lola promotes axon growth in part by suppressing expression of the actin nucleation factor Spire. *Neural Dev* 2011; 6: 37.
- 18 Schuh M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol* 2011; 13(12): 1431–1436.
- 19 Manor U, Bartholomew S, Golani G, Christenson E, Kozlov M, Higgs H, Spudich J, Lippincott-Schwartz J. A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* 2015; 4: e08828.
- 20 Coscia SM, Thompson CP, Tang Q, Baltrusaitis EE, Rhodenhiser JA, Quintero-Carmona OA, Ostap EM, Lakadamyali M, Holzbaur ELF. Myo19 tethers mitochondria to endoplasmic reticulum-associated actin to promote mitochondrial fission. *J Cell Sci* 2023; 136(5): jcs260612.
- 21 Pfender S, Kuznetsov V, Pleiser S, Kerkhoff E, Schuh M. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol* 2011; 21(11): 955–960.
- 22 Wen Q, Li N, Xiao X, Lui WY, Chu DS, Wong CKC, Lian Q, Ge R, Lee WM, Silvestrini B, Cheng CY. Actin nucleator Spire 1 is a regulator of ectoplasmic specialization in the testis. *Cell Death Dis* 2018; 9(2): 208.
- 23 Bradley AO, Vizcarra CL, Bailey HM, Quinlan ME. Spire stimulates nucleation by Cappuccino and binds both ends of actin filaments. *Mol Biol Cell* 2020; 31(4): 273–286.
- 24 Pleiser S, Banchaabouchi MA, Samol-Wolf A, Farley D, Welz T, Wellbourne-Wood J, Gehring I, Linkner J, Faix J, Riemenschneider MJ, Dietrich S, Kerkhoff E. Enhanced fear expression in Spir-1 actin organizer mutant mice. *Eur J Cell Biol* 2014; 93(5–6): 225–237.
- 25 Ferreira T, Ou Y, Li S, Giniger E, van Meyel DJ. Dendrite architecture organized by transcriptional control of the F-actin nucleator Spire. *Development* 2014; 141(3): 650–660.
- 26 Agís-Balboa RC, Pinheiro PS, Rebola N, Kerimoglu C, Benito E, Gertig M, Bahari-Javan S, Jain G, Burkhardt S, Delalle I, Jatzko A, Dettenhofer M, Zunszain PA, Schmitt A, Falkai P, Pape JC, Binder EB, Mülle C, Fischer A, Sananbenesi F. Formin 2 links neuropsychiatric phenotypes at young age to an increased risk for dementia. *EMBO J* 2017; 36(19): 2815–2828.
- 27 Stürner T, Ferreira Castro A, Philipps M, Cuntz H, Tavoisanis G. The branching code: A model of actin-driven dendrite arborization. *Cell Rep* 2022; 39(4): 110746.
- 28 Belin BJ, Lee T, Mullins RD. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. [corrected]. *Elife* 2015; 4: e07735.
- 29 Lagal V, Abrivard M, Gonzalez V, Perazzi A, Popli S, Verzeroli E, Tardieux I. Spire-1 contributes to the invadosome and its associated invasive properties. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 2): 328–340.
- 30 Andrichschke D, Dilling S, Emmenlauer M, Welz T, Schmich F, Misselwitz B, Rämö P, Rottner K, Kerkhoff E, Wada T, Penninger JM, Beerenwinkel N, Horvath P, Dehio C, Hardt WD. A genome-wide siRNA screen implicates Spire1/2 in SipA-driven salmonella typhimurium host cell invasion. *PLoS One* 2016; 11(9): e0161965.
- 31 Torres AA, Macilwee SL, Rashid A, Cox SE, Albarnaz JD, Bonjardim CA, Smith GL. The actin nucleator Spir-1 is a virus restriction factor that promotes innate immune signalling. *PLoS Pathog* 2022; 18(2): e1010277.
- 32 Holthenrich A, Terglane J, Naß J, Mietkowska M, Kerkhoff E, Gerke V. Spire1 and Myosin Vc promote Ca²⁺-evoked externalization of von Willebrand factor in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2022; 79(2): 96.
- 33 Hao L, Zhang H, Peng X, Yang Y, Yang M, Guo Y, Wang X, Jing W. Decreased Spire2 expression is involved in epilepsy. *Neuroscience* 2022; 504: 1–9.