



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

博士学位论文

DOCTOR'S DEGREE DISSERTATION

棕榈酰化修饰的 IFITM1 和棕榈酰化转移
酶 DHHC21 在 JEV 感染中的机制研究

THE MECHANISM OF PALMITOYLATION OF IFITM1

AND PALMITOYLTRANSFERASE DHHC21

IN JEV INFECTION

研 究 生: 陈 浩 威

CANDIDATE: CHEN HAO WEI

学 号: 2021302010100

STUDENT NO.:

专 业: 兽医公共卫生学与食品安全

MAJOR: VETERINARY PUBLIC HEALTH
AND FOOD SAFETY

导 师: 崔 旻 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR CUI MIN

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

华中农业大学博士学位论文

棕榈酰化修饰的 IFITM1 和棕榈酰化转移酶

DHHC21 在 JEV 感染中的机制研究

The mechanism of palmitoylation of ifitm1 and
palmitoyltransferase dhhc21 in jev infection

博士研究生：陈浩威

学 号：2021302010100

指导教师：崔旻 教授

指导小组：傅振芳 教授

崔旻 教授

彭贵青 教授

赵凌 教授

曹罡 教授

戴金霞 副教授

专业：兽医公共卫生学与食品安全 研究方向：动物病毒学

获得学位名称：农学博士 获得学位时间：2024 年 6 月

华中农业大学动物医学院

二〇二四年六月

本课题由

国家重点研发计划

(2022YFD1800100)

自然科学基金面上项目

(32373092)

项目资助

目 录

第一章文献综述	1
1.1 流行性乙型脑炎.....	1
1.1.1 流行性乙型脑炎流行病学特征及危害	1
1.1.2 流行性乙型脑炎的症状,诊断及治疗	2
1.1.3 流行性乙型脑炎病毒的致病机理.....	3
1.1.4 流行性乙型脑炎疫苗及预防.....	5
1.1.5 流行性乙型脑炎病毒复制周期.....	5
1.1.6 热休克蛋白家族在流行性乙型脑炎病毒复制中的作用	6
1.2 棕榈酰化修饰.....	8
1.2.1 棕榈酰化修饰概述.....	8
1.2.2 棕榈酰化修饰过程.....	10
1.2.3 蛋白质酰基转移酶家族.....	11
1.2.4 蛋白质棕榈酰化修饰鉴定方法.....	12
1.2.5 棕榈酰化修饰与病毒感染.....	15
1.2.6 棕榈酰化修饰与天然免疫.....	16
1.3 永生化的脑微血管内皮细胞	18
1.4 IFITM1 的功能概述.....	19
1.5 DHHC21 的生物学功能	20
1.5.1 DHHC21 调控内皮细胞炎症	20
1.5.2 DHHC21 调控 T 细胞活化.....	21
第二章 目的与意义	23
第三章 材料和方法	24
3.1 实验材料.....	24
3.1.1 细胞、病毒、质粒与小鼠.....	24
3.1.2 仪器设备	24
3.1.3 实验药品、抗体与试剂盒.....	25
3.1.4 试剂的配制.....	26
3.2 实验方法.....	28
3.2.1 细胞的复苏.....	28
3.2.2 JEV P3 株的扩增与毒价测定.....	28
3.2.3 细胞和组织样品 RNA 的提取及处理	30
3.2.4 质粒构建.....	32
3.2.5 细胞蛋白样品提取及检测.....	38
3.2.6 间接免疫荧光,激光共聚焦和 SIM 超分辨	39

3.2.7 甲醇氯仿法沉淀蛋白质.....	40
3.2.8 酰基聚乙二醇交换法.....	40
3.2.9 体外血脑屏障模型建立及检测.....	41
3.2.10 Millicell(?)ERS-2 使用方法.....	41
3.2.11 FITC-Dextran 检测血脑屏障渗透性.....	42
3.2.12 双荧光素酶实验.....	42
3.2.13 慢病毒包装与浓缩.....	43
3.2.14 实时无标记动态细胞分析技术.....	43
3.2.15 CCK8 细胞增殖检测	44
3.2.16 手术器械消毒.....	44
3.2.17 实验动物及废物的无害化处理.....	44
3.2.18 数据的统计与分析.....	44
第四章 棕榈酰化的 IFITM1 可抑制 JEV 感染并稳定 BBB	45
4.1 IFN- β 介导 JEV 感染 hBMEC 引起的 IFITM1 上调表达	45
4.1.1 IFITM1 在 JEV 感染 hBMEC 后显著上调	45
4.1.2 IFN- β 刺激 IFITM1 上调表达.....	46
4.2 IFITM1 在 hBMEC 中限制 JEV 的复制	48
4.3 IFITM1 维持血脑屏障的完整性.....	51
4.4 棕榈酰化修饰是 IFITM1 蛋白发挥功能的关键修饰	55
4.4.1 IFITM1 的棕榈酰化位点突变体构建.....	55
4.4.2 棕榈酰化修饰位点突变损害 IFITM1 的正常功能	57
4.5 JEV 在感染早期抑制 IFITM1 的表达.....	60
4.6 讨论.....	63
4.6.1 棕榈酰化 IFITM1 抑制 JEV 复制.....	64
4.6.2 棕榈酰化 IFITM1 有助于稳定 BBB.....	65
4.7 小结.....	67
第五章 DHHC21 促进 JEV 复制的机制研究.....	68
5.1 棕榈酰化修饰调控 JEV 复制.....	68
5.1.1 2-BP 抑制 JEV 在 hBMEC 中复制	68
5.1.2 2-BP 抑制 JEV 复制具有广谱性	70
5.1.3 2-BP 抑制 hBMEC 的炎症反应.....	70
5.1.4 JEV 感染促进 hBMEC 对 PA 吸收.....	73
5.1.5 JEV 感染抑制 hBMEC 对 PA 的分解利用	75
5.1.6 PA 通过棕榈酰化修饰途径调节 JEV 复制.....	77
5.2 DHHC21 为促进 JEV 复制的关键棕榈酰化转移酶	81
5.2.1 DHHCs 在内皮细胞中的表达谱鉴定.....	81
5.2.2 与 JEV 复制相关的棕榈酰转移酶筛选.....	82
5.2.3 DHHC21 促进 JEV 复制不依赖 CAV1 介导的内化途径	83

5.2.4 敲低 DHHC21 抑制 JEV 在 hBMEC 中复制	85
5.3 转录因子 ATF3 介导 DHHC21 上调的表达	87
5.4 DHHC21 互作蛋白筛选	90
5.4.1 DHHC21 修饰的 SRC 家族蛋白参与 JEV 的复制过程	90
5.4.2 DHHC21 互作蛋白的提取与质量鉴定	93
5.4.3 DHHC21 互作蛋白的生物信息学分析	95
5.4.4 DHHC21 与 HSPA8 相互作用的验证	98
5.4.5 HSPA8 棕榈酰化位点预测与鉴定	100
5.4.6 DHHC21 促进 HSPA8 棕榈酰化修饰	103
5.4.7 棕榈酰化位点突变缩短 HSPA8 的半衰期	104
5.5 讨论	105
5.5.1 2-BP 抑制 JEV 的复制	106
5.5.2 HSPA8 的棕榈酰化修饰影响其蛋白降解	107
5.5.3 DHHC21 通过多种靶蛋白促进 JEV 复制	108
5.6 小结	111
第六章 结论	112
参考文献	113

摘要

流行性乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 主要通过三带喙库蚊传播, 该病毒会引起中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 的急性炎症反应, 也被称为流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE)。感染 JEV 后出现脑炎症状患者的死亡率高达 30%, 30%-50% 的脑炎幸存患者可出现永久性的神经系统后遗症。JEV 直接感染人脑血管内皮细胞 (Human brain microvascular endothelial cells, hBMEC) 进入 CNS 是引发 JE 最便捷的途径, 但其感染与致病机制尚未完全解析, 有待进一步研究。蛋白棕榈酰化属于蛋白质翻译后修饰 (Protein translational modifications, PTMs) 中的脂质修饰。病毒感染过程中, 棕榈酰化修饰的蛋白对宿主-病毒相互作用至关重要。本研究通过探究棕榈酰化修饰的干扰素诱导跨膜蛋白 1 (Interferon induced transmembrane protein 1, IFITM1) 以及关键棕榈酰化转移酶 DHHC21 在 hBMEC 中对 JEV 复制和致病性的影响。本研究为进一步解析 JEV 感染的机制和探索新的治疗策略提供线索, 具体内容如下:

1. IFITM1 具有抗病毒感染和稳定血脑屏障的作用

hBMEC 是血脑屏障 (Blood brain barrier, BBB) 的主要组成细胞, 在抗病毒感染、防止病毒入侵 CNS 中发挥着至关重要的作用。IFITM1 是干扰素 (Interferon, IFN) 下游的一种多功能膜蛋白。在本研究中, 我们发现 IFN- β 介导了 JEV 感染 hBMEC 后 IFITM1 的上调表达。在 hBMEC 中使用 CRISPR/Cas9 敲除 IFITM1 增强了 JEV 的复制, 而过表达 IFITM1 则限制了 JEV 的复制。此外, 定位于细胞质膜的 IFITM1 可以与紧密连接 (Tight junction, TJ) 蛋白 Occludin 相互作用, 增强内皮屏障的稳定性。在 JEV 感染由 hBMEC 组成的体外单层 BBB 模型后, 敲除 IFITM1 会导致 BBB 的跨膜细胞阻抗 (Trans epithelial electrical resistance, TEER) 降低, 渗漏增加, 以及更多的病毒粒子穿越。在 hBMEC 中过表达 IFITM1 不仅能在静息状态下促进单层屏障的形成, 且在 JEV 感染后, BBB 模型可以维持更好的完整性和更高的 TEER。上述结果表明, IFITM1 可以在 JEV 感染过程中发挥抗病毒感染及维持 BBB 稳定性的双重作用。

2. 棕榈酰化修饰对于 IFITM1 发挥正常功能至关重要

虽然, IFITM1 在 JEV 感染的 hBMEC 后显著上调表达。但并没有观察到 BBB 模型 TEER 的变化, 而且 JEV 可以在 hBMEC 中长期存在。表明内源性表达的 IFITM1 蛋白没有发挥生物学功能。因此我们探究了翻译后修饰 (Post-translation modification, PTM) 对于 IFITM 功能的影响。经预测与鉴定 IFITM1 在 CD225 保守结构域具有 C51、C52 和 C84 三个半胱氨酸 (Cysteine, Cys) 棕榈酰化修饰位点。棕榈酰化位点突变导致 IFITM1 蛋白在细胞内累积, 不能正确定位在细胞膜上。IFITM1 发挥生物学功能依赖于其细胞中的正确定位, 棕榈酰化修饰位点突变削弱了 IFITM1 的抗病毒功能, 并减少了其与 TJ 蛋白 Occludin 的相互作用。在 hBMEC 中, IFN- β 处理 hBMEC 后 IFITM1 上调表达并定位在细胞膜, 但是 JEV 感染后上调表达 IFITM 大部分在胞内累积, 无法正确定位。另外在 IFN- β 通路未激活条件下, JEV 感染会导致 IFITM1 的蛋白质含量降低。

同时, JEV 感染下调了部分调节 IFITM1 棕榈酰化修饰的 DHHCs 的表达, 而去棕榈酰化酶 ABHD16A 表达上调。这些结果表明, JEV 可以通过调节 IFITM1 的棕榈酰化修饰, 实现在 hBMEC 中的免疫逃逸。综上所述, IFITM1 的棕榈酰化修饰对于其在 hBMEC 中发挥正的抗病毒功能以及维持 BBB 稳态至关重要。

3. 在 hBMEC 中, 2-BP 可以抑制 JEV 复制以及细胞的炎症应答

2-BP (2-bromopalmitate, 2-BP) 作为广谱的棕榈酰化抑制剂, 处理 hBMEC 后 JEV 复制显著降低, 活病毒粒子减少。此外在佛波酯 (phorbol ester, PMA) 诱导的内皮细胞炎症模型中, 低剂量的 2-BP 处理可以降低炎症因子 (IL-4、6、8、1 β 和 TNF- α) 的表达。在体外由 hBMEC 构成的 BBB 模型中, 2-BP 处理同样可以减缓 TNF- α 诱导的 BBB 通透性增加。

4. DHHC21 是促进 JEV 感染的关键棕榈酰化转移酶

为了探究 2-BP 抑制 JEV 复制的具体靶点, 首先我们根据人类蛋白质图谱 (www.proteinatlas.org) 提供的单细胞测序结果, 分析了血管内皮细胞中不同 DHHCs 的表达分布情况, 并利用 PCR 进行鉴定, 确定 DHHC21 在内皮细胞中表达。在 JEV 感染 hBMEC 后共有 11 个 DHHCs 上调表达, 其中五个呈现显著

差异。通过构建 DHHC2、6、13、17、21 基因敲低细胞系，并检测 JEV 在这些细胞系中的复制差异。我们首次证明了棕榈酰化转移酶 DHHC21 是促进 JEV 复制的关键调节因子，DHHC21 的缺失会抑制 JEV 的复制。此外我们还构建了 DHHC21 的启动子的双荧光素酶报告系统，证实了 JEV 的 PrM 和 NS4 蛋白诱导激活转录因子 3 (Activating transcription factor 3, ATF3) 上调表达，ATF3 直接结合到 DHHC21 的启动子的-1330—-1321 位点，进而调控 DHHC21 的转录。通过免疫沉淀-质谱 (IP-MS) 联用技术，我们发掘了 DHHC21 的靶蛋白 HSPA8，使用 CO-IP 与 IF 鉴定了 DHHC21 和 HSPA8 的蛋白间相互作用。此外还通过酰基-聚乙二醇交换 (Acyl-PEGyl exchange, APE) 实验确定了 DHHC21 可以催化 HSPA8 棕榈酰化修饰，且 HSPA8 在 574 位 Cys 上具有棕榈酰化修饰位点，棕榈酰化修饰位点突变会导致 HSPA8 半衰期缩短，蛋白含量降低。本研究还进一步探究了 DHHC21 的偏好底物，SRC 家族激酶 (Src family kinases, SFKs) 中的 Yes 和 Lck 蛋白可以通过磷酸化促进 JEV 复制。

综上所述，本研究证明了棕榈酰化修饰的 IFITM1 具有抑制 JEV 复制和增强 BBB 稳定性的作用。同时发现了 DHHC21 是 JEV 复制过程中的关键棕榈酰化转移酶。同时初步阐释 ATF3 可以调控 DHHC21 表达，及 DHHC21 通过靶蛋白 HSPA8 和 SFKs 促进 JEV 复制的分子机制。及 DHHC21 通过靶蛋白 HSPA8 和 SFKs 促进 JEV 复制的分子机制。本研究为阐明棕榈酰化修饰影响 JEV 复制的机制提供了新的见解，有助于深入了解 JEV 感染的致病机制和寻找新的药物靶点，为相关疾病的治疗提供理论依据。

关键词：流行性乙型脑炎病毒 (JEV)；IFITM1；DHHC21；棕榈酰化修饰；人脑微血管内皮细胞 (hBMEC)

Abstract

Japanese encephalitis virus (JEV) is primarily transmitted by *Culex tritaeniorhynchus* and leads to acute inflammation of the central nervous system (CNS), resulting in Japanese encephalitis (JE). Patients infected with JEV and manifesting symptoms of encephalitis have a mortality rate reaching 30%, while 30% to 50% of those who survive may encounter lasting neurological or psychiatric issues. Direct infection of JEV in Human brain microvascular endothelial cells (hBMEC) is the most convenient route to enter the CNS and cause JE, yet the infection and pathogenic mechanisms are still not fully understood, requiring additional research. Protein palmitoylation, a type of lipid modification in protein translational modifications (PTMs), plays a crucial role in host-virus interactions during viral infections. This study explores the palmitoylation modification of interferon induced transmembrane protein 1 (IFITM1) and investigates the impact of the key palmitoyl transferase DHHC21 on JEV replication and pathogenicity. This study offers insights for advancing the understanding of JEV infection mechanisms and exploring new treatment strategies.

1. IFITM1 has a dual role of anti-viral infection and stabilizing the blood-brain barrier

hBMEC is the main component of the Blood brain barrier (BBB), which plays a crucial role in antiviral infection and preventing virus from invading the CNS. IFITM1 is a multifunctional membrane protein downstream of Interferon (IFN). In this study, it was noted that IFN- β facilitate the upregulation of IFITM1 expression in hBMECs after JEV infection. Knockdown of IFITM1 in hBMECs via CRISPR/Cas9 enhanced JEV replication, whereas IFITM1 overexpression inhibited JEV replication. Furthermore, plasma membrane localized IFITM1 can interact with Tight Junction (TJ) protein Occludin, fortifying endothelial barrier stability. In an in vitro monolayer BBB model consisting of hBMECs and following JEV infection, the absence of IFITM1 resulted in decreased Trans-Epithelial Electrical Resistance (TEER), increased permeability, and

enhanced viral transmission across the BBB. Consistent with the above results, overexpression of IFITM1 not only promotes monolayer barrier formation in its rest state but also preserved superior integrity and higher TEER in BBB model after JEV infection. These findings imply that IFITM1 may have a dual function in antiviral infection and preserving BBB stability during JEV infection.

2. Palmitoylation is essential for the proper function of IFITM1

Although IFITM1 expression was significantly upregulated in JEV infected hBMECs, there were no changes in TEER were observed in the BBB model, and JEV could persist in hBMECs for extended periods. These findings suggest that the endogenous IFITM1 protein may not play a significant biological role. Subsequently, we delved into the impact of PTMs on IFITM function. Predictions and identifications revealed three Cysteine (Cys) palmitoylation modification sites (C51, C52, and C84) within the conserved CD225 domain of IFITM1. Mutations in the palmitoylation site result in intracellular accumulation of IFITM1 protein, hindering its correct localization to the cell membrane. The biological functionality of IFITM1 relies on its accurate cellular localization, mutations in the palmitoylation modification sites impair the antiviral function of IFITM1 and reduce its interaction with TJ protein Occludin. In hBMECs, IFITM1 was up-regulated and localized on the cell membrane after IFN- β treatment, but most of the up-regulated IFITM accumulated in the cells after JEV infection and could not be correctly localized. In addition, when the IFN- β pathway was not activated, JEV infection reduced the protein content of IFITM1. Additionally, JEV infection downregulated the expression of DHHCs, which partially regulate IFITM1 palmitoylation, while upregulating ABHD16A expression. These findings imply that JEV can evade immune responses in hBMECs by modulating the palmitoylation modification of IFITM1. In conclusion, palmitoylation modification of IFITM1 is crucial for its effective antiviral role in hBMECs and for the maintenance of BBB homeostasis.

3. 2-BP has the capability to inhibit JEV replication and cellular inflammatory response in hBMECs

As a broad spectrum palmitoylation inhibitor, 2-bromopalmitate(2-BP) demonstrated a significant decrease in JEV replication and viable virions in hBMEC post treatment. Furthermore, a low dosage of 2-BP treatment led to a reduction in the expression of inflammatory cytokines (IL-4, 6, 8, 1 β , and TNF- α) in endothelial cells stimulated by phorbol ester (PMA). Within an in vitro BBB model comprising hBMEC, 2-BP treatment effectively attenuated the increase in BBB permeability induced by TNF- α .

4. DHHC21 is a key palmitoyltransferase that promotes JEV infection

To investigate the specific targets of 2-BP inhibition on JEV replication, we initially examined the expression patterns of different DHHCs in vascular endothelial cells using single cell sequencing data from the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) and then confirmed the expression of DHHC21 in endothelial cells through PCR. Following JEV infection in hBMEC, 11 DHHCs were found to be up-regulated, with five showing significant differences. We established knockdown cell lines for DHHC2, 6, 13, 17, and 21 and observed variations in JEV replication within these cell lines. Our findings indicate that palmitoyltransferases (PAT) DHHC21 plays a crucial role in promoting JEV replication, and its loss inhibits JEV replication. Moreover, we developed a dual luciferase reporting system for the DHHC21 promoter and verified that the PrM and NS4 proteins of JEV induce the upregulation of Activating Transcription Factor 3 (ATF3). ATF3 directly interacts with the -1330 to -1321 site of the DHHC21 promoter, thereby influencing DHHC21 transcription. Through immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS), we identified HSPA8 as the target protein of DHHC21 and confirmed the DHHC21-HSPA8 interaction using co-immunoprecipitation (CO-IP) and immunofluorescence (IF) assays. Acyl-PEGyl exchange (APE) experiments validated that DHHC21 could catalyze palmitoylation modification of HSPA8 at the 574 Cys site, mutation in the palmitoylation modification site can shorten the half-life of HSPA8 and reduce the protein content. This study further

explored the preferred substrates of DHHC21, showing that Yes and Lck proteins in the Src family kinases (SFks) can promote JEV replication through self-phosphorylation.

In conclusion, our study demonstrates that palmitoylated IFITM1 inhibits JEV replication and enhances blood-brain barrier (BBB) stability. DHHC21 is identified as a critical palmitoyltransferase in JEV replication, while ATF3 regulates DHHC21 expression. The molecular mechanism through which DHHC21 promotes JEV replication via target proteins HSPA8 and SFks is elucidated. These findings shed light on the impact of palmitoylation modification on JEV replication, enhance our understanding of JEV infection pathogenesis, aid in the search for new drug targets, and offer a theoretical basis for related disease treatments.

Key words: Japanese encephalitis virus (JEV); IFITM1; DHHC21; Palmitoylation; Human brain microvascular endothelial cells (hBMEC)

缩略语表（Abbreviation）

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
2-BP	2-Bromohexadecanoic acid	2-溴棕榈酸
AP	Ammonium persulphate	过硫酸铵
ATF3	Activating transcription factor 3	激活转录因子 3
BBB	Blood brain barrier	血脑屏障
BSA	Bovine albumin	牛血清白蛋白
°C	Degree celsius	摄氏度
Cav-1	Caveolin-1	小窝蛋白 1
CHX	Cycloheximide	环己酰亚胺
CNS	Central nervous system	中枢神经系统
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DHHC	palmitoyltransferase	棕榈酰转移酶
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
dNTP	dNTP	脱氧三磷酸核苷
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GO	Gene ontology	基因本体论
HBMEC	Human brain microvascular endothelial cells	人脑微血管内皮细胞
HRP	Horse radish peroxidase	辣根过氧化物酶

HSPA8	Heat shock protein family A member 8	热休克蛋白家族 A 成员 8
IF	Immunofluorescence	免疫荧光
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein	干扰素诱导跨膜蛋白
IFN	Interferon	干扰素
JE	Japanese encephalitis	日本乙型脑炎
JEV	Japanese encephalitis virus	日本乙型脑炎病毒
kD	Kilodalton	千道尔顿
KEGG	Kyoto encyclopedia of Genes and genomes	京都基因与基因组百科全书
KOG	Cluster of orthologous groups of proteins	蛋白相邻类的聚簇
mol/L	Mole per liter	摩尔每升
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
mPEG-Mal	Methoxypolyethylene glycol maleimide	甲氧基聚乙二醇-马来酰亚胺
PA	Palmitic acid	棕榈酸
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PFU	Plaque forming unit	蚀斑形成单位
pH	pondus hydrogenii	酸碱度
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
r/min	Rotation per minute	转每分钟

RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction	实时荧光定量 PCR
sec, min, h, d	Second, Minute, Hour, Day	秒, 分, 小时, 天
SFKs	SRC-family kinases	Src 家族激酶
WB	Western Blotting	蛋白免疫印迹
μg , mg, g	Microgram, Milligram, Gram	微克, 毫克, 克
μL , mL, L	Microliter, Milliliter, Liter	微升, 毫升, 升
μM	Micromolar	微摩尔
μm	Micron	微米

第一章文献综述

1.1 流行性乙型脑炎

1.1.1 流行性乙型脑炎流行病学特征及危害

流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 是一种由乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的病毒性疾病, JEV 于 1935 年首次在日本分离出来, 但早在 1870 年就有描述, 通常使用 PrM 和 E 蛋白编码基因对 JEV 进行系统发育分析(Yin et al 2024)。目前已知的 JEV 有五种基因型。JEV 主要通过蚊子叮咬传播, 如亚洲 (如三带喙库蚊) 和西太平洋部分地区 (如环状库蚊) 受感染的库蚊传播(Pearce et al 2018)。该病在亚洲地区广泛流行, 2021 年后在澳大利亚开始出现新发病例及死亡病例报的报告, 并在 80 多个猪场检测到 JEV 阳性(Mackenzie et al 2022)。据 WHO 2019 年报道 JEV 是亚洲国家病毒性脑炎的主要病因, 估计每年有 68000 例临床病例, 约 13600 至 20400 人死亡。JEV 在东南亚和西太平洋地区有 24 个国家流行, 使 30 多亿人面临感染风险(Mansfield et al 2017), 每隔 2-15 年就会爆发一次大规模疫情。JEV 等黄病毒的传播与快速全球化、人口爆炸以及工业化和森林砍伐导致的全球气候条件变化密切相关(Oliveira et al 2020, Paulraj et al 2022)。

JEV 主要在猪、涉禽和马等动物中储存和扩增, 形成宿主间循环。猪是向人间传播 JEV 的主要储存宿主和传染源。最近有证据证明 JEV 可以在缺少蚊虫媒介的情况下在猪之间传播。猪在口鼻分泌物中脱落病毒, 极易通过口鼻感染其他猪只, 而且通过针头、接触也可以感染。感染的临床症状、病毒趋性和中枢神经系统组织学病变与自然感染相似。同时研究表明, 在高水平的中和抗体存在的条件下, JEV 仍可在猪的扁桃体中存活至少 25 天(Ricklin et al 2016, Park et al 2022)。在我国除了青藏地区之外, 其他地区均存在 JEV 传播风险。每年的 5 至 10 月是主要传播季节, 发病高峰通常在 7 至 9 月与当地的雨季重合。由于 JE 的严重危害, 预防和控制该疾病的重要性不容忽视(Zhang et al 2019) (Fang et al 2021)。



图 1-1 流行性乙型脑炎的流行范围(Mackenzie et al 2022)

Fig. 1-1 Epidemic range of Japanese encephalitis(Mackenzie et al 2022)

1.1.2 流行性乙型脑炎的症状，诊断及治疗

JEV 易感人群广泛，但多数感染者表现出轻微或无症状，只有少数人会发展成典型的乙型脑炎症状。JE 常见症状包括突发高烧、寒战、头痛、肌痛、精神错乱、抽搐、恶心、呕吐、嗜睡等。据统计，JEV 感染发展为脑炎后，病死率为 20%-30%。在幸存者中，约有 30%-50% 的人有长期的神经系统后遗症，并伴有智力或身体残疾(Joe et al 2022)。

JE 患者会出现急性脑病综合征症状，而该综合征的潜在病因众多，难以诊断。因此，实验室确诊对准确诊断 JE 至关重要，但由于病毒血症极低，诊断过程较为困难。JE 的实验室诊断通常是通过检测血清或脑脊液（Cerebrospinal fluid, CSF）的病毒的特异性 IgM 抗体(Vannice et al 2021)。JE 病毒 IgM 抗体通常可在发病后 3d-8d 检测到，IgM 捕获酶联免疫吸附试验一直是检测 JE 最广泛使

用的诊断方法，发病后 10 d 内采集的血清可能检测不到 IgM，因此应在恢复期样本中重复检测。对于有 JE 病毒 IgM 抗体的患者，应进行中和抗体确证试验。在死亡病例中，核酸扩增、组织病理学免疫组化和尸检组织病毒培养是有效且准确的方法(Sahu et al 2022)。目前还没有针对 JE 特定的治疗方案，通常是支持性治疗为主，也很少有随机临床试验测试了 JE 的治疗方法(Turtle and Solomon 2018)。

1.1.3 流行性乙型脑炎病毒的致病机理

JEV 从神经入侵，引起神经炎症，介导神经细胞损伤，其致病机制十分复杂，至今尚未完全阐明。人被携带 JEV 的蚊子叮咬后，病毒首先感染叮咬部位的皮肤免疫系统细胞如肥大细胞、角质形成细胞和朗格汉斯细胞等，之后迁移至局部淋巴结增殖，引起原发性无症状病毒血症，通过循环系统扩散到身体其他实质性器官中(Wang et al 2017)。与猪不同的是，由于人的病毒血症窗口期短和病毒载量低不足以感染蚊媒，因此人不会成为 JEV 的中间宿主，也就不会发生人际传播(Zhang et al 2020c)。

据估计，0.1%-1%的 JEV 感染最终会导致脑炎。JEV 感染中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 诱发神经炎症和神经细胞损伤，需要通过血脑屏障 (Blood brain barrier, BBB)。脑微血管内皮细胞 (Brain microvascular endothelial cells, BMEC)、神经血管单元和细胞外基质组成的 BBB，通过调免疫细胞和生物分子从血液到 CNS 的运输来维持大脑内环境的稳态。其中 BMEC 被认为是维持 BBB 结构和功能完整性的关键细胞。神经血管细胞之间的相互作用对于紧密连接和调节 BBB 的完整性也非常重要。JEV 穿过 BBB 进入中枢神经系统的机制有四种可能的途径：(1) 直接途径：病毒在 BMEC 内增殖，然后病毒颗粒通过基底侧膜释放或直接被动运输穿过进入 CNS；(2) 特洛伊木马途径：携带 JEV 的免疫细胞在外周与 CNS 之间穿行造成 CNS 感染；(3) 神经轴突运输：JEV 感染外周神经元沿运动神经纤维或嗅觉和视觉神经元进入 CNS；(4) BBB 破坏后，屏障保护功能丧失，大量病毒直接渗漏进入 CNS (Ashraf et al 2021)。

JEV 进入中枢神经系统后，会感染胶质细胞和神经元细胞，小胶质细胞和星形胶质被激活后，释放大量炎症细胞因子和趋化因子，列如 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-10、IL-4 和 MMP2/3/9 等(Chhatbar and Prinz 2021)。这些细胞因子不仅会破坏血脑屏障，还会诱导大量炎症细胞渗入血管周围。进一步形放大炎症反应，最后造成神经细胞损伤和死亡(Filgueira and Lannes 2019)。研究表明，死亡患者 CSF 中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 和血浆中的趋化因子 RANTES 均高于幸存者(Winter et al 2004)。此外 CSF 中的炎症因子浓度越高，JE 患者的预后越差。2018 年夏季，在宁夏北部的 JEV 感染疫情，并出现了吉兰-巴雷综合征病例群。对 40 名患者的血清样本进行的分析中，有 30% 的患者出现了抗糖类自身免疫反应（主要是神经节苷脂 GM1、GM2、GD1a 和 GD1b）。因此，提示 JEV 持续发展到后期可能会产生自身抗体，从而损害周围神经，增加致残风险(Xiang et al 2014, Wang et al 2020)。

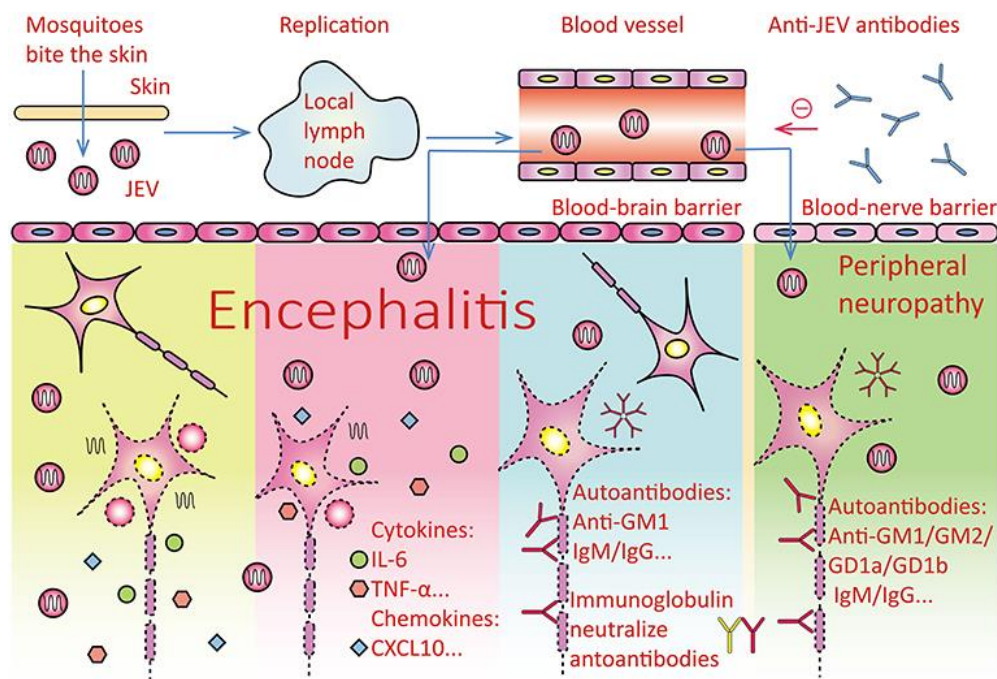


图 1-2 流行性乙型脑炎发病机制概述 (Miao et al 2021)

Fig. 1-2 Overview of the pathogenesis of Japanese Encephalitis (Miao et al 2021)

1.1.4 流行性乙型脑炎疫苗及预防

由于目前尚无特效药物治疗，预防是控制 JE 最有效的方法。根据乙脑的传播方式，主要通用的控制方式有 2 种（1）做好防蚊、灭蚊，避免蚊虫叮咬，降低感染风险；（2）接种疫苗，其中猪和人为重点免疫对象，人类免疫接种是对 JE 长期保护的首选方法。现在全球有两类疫苗：（1）小鼠脑源和细胞培养源的灭活疫苗；（2）细胞培养源和基因工程减毒活疫苗。其中在我国最广泛使用的疫苗是细胞培养的减毒活疫苗，由强毒株 SA-14，通过传代致弱的，自疫苗获批上市，在中国已经生产了超过 3 亿剂(Barzon and Palù 2018)。由于，减毒疫苗在理论上仍有可能通过重组恢复毒力，使得 SA14-14-2 株减毒活疫苗在全球范围内推广中受到限制。此外，灭活疫苗也能够产生良好的免疫效果(Hu and Lee 2021, Vannice et al 2021)。尽管接种疫苗能够减少病例，但由于其人畜共患病的特性以及病毒的环境传播，根除这种疾病充满严峻挑战。预防措施仍然是最有效的方法，对于这种毁灭性疾病，开发新的治疗方法和持续的疫苗接种计划都是至关重要的。

1.1.5 流行性乙型脑炎病毒复制周期

JEV 与宿主细胞的结合分为两个阶段：最初，JEV 包膜糖蛋白 E 中含有正电荷的氨基酸和宿主细胞表面的硫酸肝素氨基糖（负电荷）之间通过非特异性的静电相互作用，病毒在宿主细胞表面集中。随后，诱导病毒与宿主细胞表面的受体相互作用。多种细胞受体均可以介导 JEV 与细胞的吸附，如 HSP70、CLEC5A、TIM/TAM 磷脂酰丝氨酸受体、GRP78、D2 受体和 $\alpha v \beta 3$ （整合素家族的一种糖蛋白）等受体可协助 JEV 通过内吞作用进入宿主细胞(Adetunji et al 2021)。病毒与内吞受体相互作用后，可通过网格蛋白或小窝蛋白介导的内化进入宿主细胞。由于内体内部酸化，E 蛋白发生寡聚化，促进内体膜与病毒膜融合，释放病毒基因组进入细胞(Yun and Lee 2018)。病毒 RNA 进入宿主细胞后，会被转运到宿主的 ER 膜上进行复制和翻译。通过复制翻译后多聚蛋白被病毒和宿主蛋白酶裂解为 3 个结构蛋白和 7 个非结构（Non-structural, NS）蛋白。NS 蛋白参与病毒复制，其中 NS1、NS2A、NS2B、NS4A 和 NS4B 参与重塑 ER

以形成复制工厂，NS3 参与解螺旋，NS5 参与 JEV 基因组 RNA 的聚合。NS2A 与新合成的 RNA 相互作用，并从复制复合体转移到组装复合体。结构蛋白在病毒颗粒的组装过程中起着至关重要的作用，新合成的 RNA 在此与囊膜蛋白相互作用并进行封装，PrM 固定并稳定外包膜中的 E 蛋白。但这些蛋白在 ER 膜上的排列还不清楚，需要进一步研究(Kumar et al 2022)。

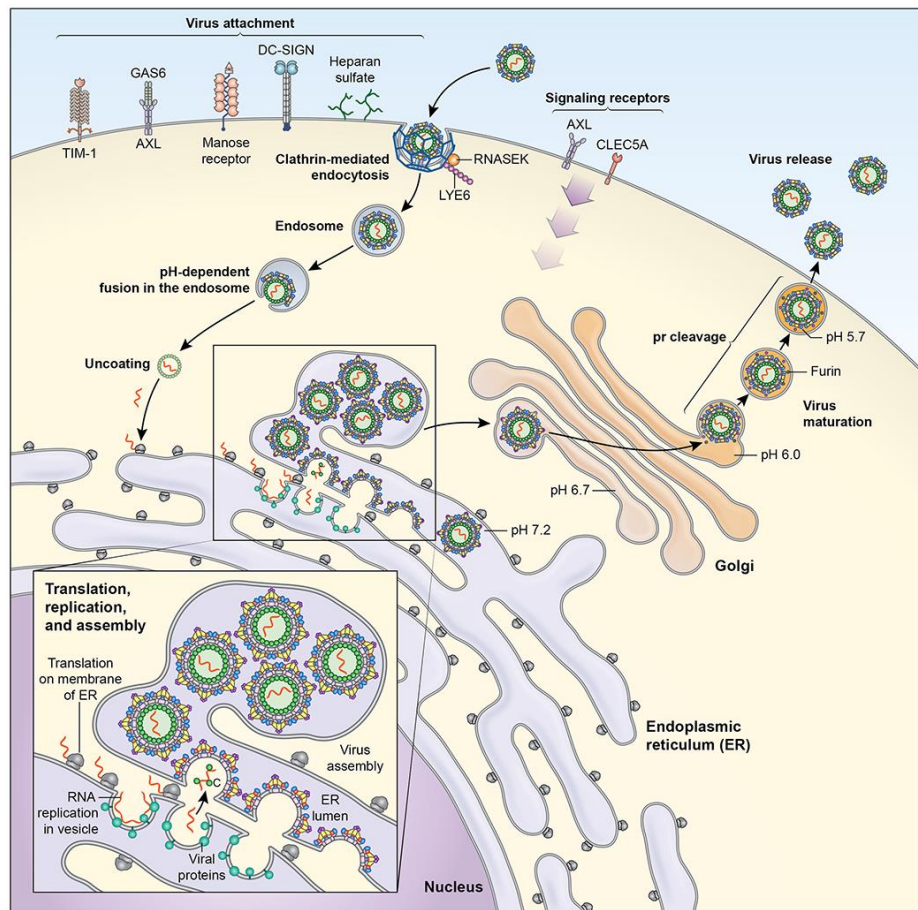


图 1-3 黄病毒的复制周期(Pierson and Diamond 2020)

Figure 1-3 Replication cycle of flavivirus (Pierson and Diamond 2020)

1.1.6 热休克蛋白家族在流行性乙型脑炎病毒复制中的作用

在病毒复制周期中，蛋白-蛋白相互作用发挥至关重要的作用。HSP70 家族由一些高度保守的蛋白组成，如 HSP70、HSC70、GRP75 和 GRP78。HSP70 家族成员主要作为细胞质伴侣发挥作用，存在于多种细胞中，包括肿瘤细胞、神经干细胞、表皮细胞(Rosenzweig et al 2019) (Vostakolaei et al 2021)。位于细胞表

面的 HSPs 可作为病毒受体介导多种病毒感染, 如轮状病毒、人类冠状病毒、人类 T 淋巴细胞病毒 I 型、柯萨奇病毒 A9 和 登革病毒 (Dengue virus, DENV) 等 (Li et al 2020, Lubkowska et al 2021, Han et al 2023)。研究表明 HSP 家族蛋白, 参与了 JEV 生命周期中从受体结合、进入到复制的多个步骤, 突显了它在病毒感染中的重要作用。在小鼠神经母细胞瘤 (Neuro2a) 细胞和纯化的 JEV-E 蛋白进行 "病毒覆盖蛋白结合测定", 发现 HSP70 与 JEV-E 蛋白互作, 并定位于 Neuro2a 细胞表面。抗 HSP70 多克隆抗体能够阻止 JEV 进入 Neuro2a 细胞。推测 HSP70 可能是 JEV 的假定受体 (Das et al 2009)。JEV 感染 Huh7 细胞, HSP70 迁移到脂筏结构, 脂筏通过将 JEV 和 HSP70 聚集到富含胆固醇的微域中来促进病毒的进入 (Zhu et al 2012a)。HSP70 作为伴侣蛋白可能参与了 JEV-E 蛋白在膜融合过程中的构象变化 (Mandl et al 2000)。脂质筏也可通过重组和聚集 HSP70 促进信号转导, 因为 HSP70 也是信号转导蛋白的伴侣, 在反复应激期间调节级联信号。在 JEV 感染的早期阶段, HSC70 在 mRNA 和蛋白质水平上都出现了上调 PI3K /Akt 信号通路的激活需要 HSP70 被招募到脂筏中 (Wang et al 2011)。HSC70 高度参与了凝集素介导的内吞作用, JEV 通过与受体相互作用, 包裹在凝集素覆盖的小泡 (Clathrin coated vesicles, CCVs) 中, 通过内吞作用进入宿主细胞。在病毒感染的后期, 需要在酸性条件下脱去 CCVs。敲除 HSC70 导致细胞中酸化囊泡的数量减少, 内化的 JEV 颗粒可能被保留在 CCVs 内进而影响 JEV 的复制 (Newmyer and Schmid 2001, Chuang et al 2015)。据观察, 在 JEV 感染过程中, 细胞质中的 HSP70 部分存在病毒复制工厂与病毒复制酶复合物的成分真核延伸因子 1- α 和 Ras 相关核蛋白以及病毒成分包括 NS3、NS5 和病毒 dsRNA 互作, HSP70 能增强 JEV 复制酶复合物中病毒蛋白的稳定性 (Hung et al 2011)。GRP78 是一种与重组 JEV 包膜蛋白结构域 III 相互作用的蛋白质, GRP78 参与了 JEV-E 蛋白的正确折叠和病毒包装。GRP78 还可能参与了 JEV 复制所需的蛋白质的折叠 (Nain et al 2017)。其他热休克蛋白家族成员也参与 JEV 的复制过程, HSP40/DnaJ 同源物 Hdj2 与编码病毒 RNA 复制酶的 NS5 一起相互作用。在 JEV 感染细胞中过表达 Hdj2 会导致病毒 RNA 合成增加, 病毒滴度升高约 4.5-10 倍。用 siRNA 敲除 Hdj2 能显著减少病毒的产生 (Cao et al 2019b)。

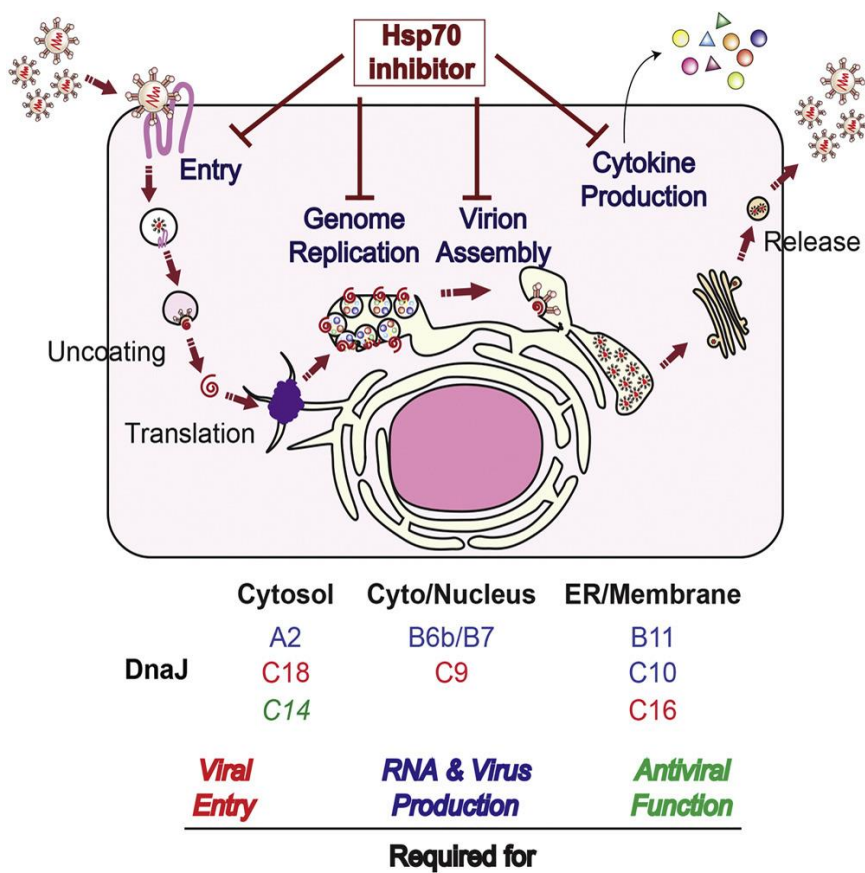


图 1-4 热休克蛋白参与 JEV 不同的复制过程 (Taguwa et al 2015)

Fig.1-4 Heat shock proteins are involved in different replication processes of JEV
(Taguwa et al 2015)

1.2 棕榈酰化修饰

1.2.1 棕榈酰化修饰概述

翻译后修饰（Post translational modifications, PTMs）是指蛋白质在生物合成后的氨基酸侧链修饰。有 400 多种不同类型的 PTMs 会影响蛋白质功能 (Barber and Rinehart 2018, Ramazi and Zahiri 2021)。PTMs 一般发生在氨基酸的 R 基侧链上，改变氨基酸和蛋白质的化学性质。PTMs 影响蛋白质的多种功能和特性，蛋白质与其他生物组分相互作用、蛋白质的降解速度、溶解度、构象改变以及亚细胞定位等(Ye et al 2022, Suskiewicz 2024)。PTMs 发生在多种细胞器中，这些修饰是调节各种细胞生物学过程的重要分子调控机制(Müller 2018)，同时对蛋白质的结构和功能有重大影响。PTMs 根据修饰基团的大小/化学性质

可以分为以下四类， 蛋白质修饰、碳水化合物分子修饰、脂质分子修饰以及小分子修饰（图 1-5）。

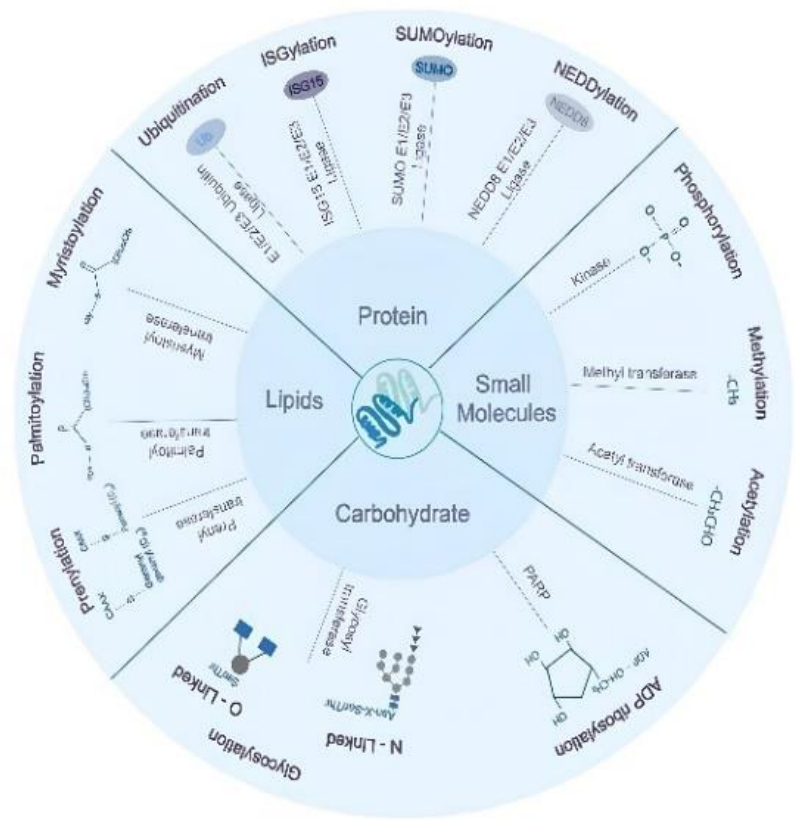


图 1-5 翻译后修饰的类型 (Kumar et al 2021)

Fig.1-5 Types of post-translational modifications (Kumar et al 2021)

蛋白质脂化大致可分为两类：组成型脂化，其中的脂质作为蛋白质合成或成熟的一个组成部分；动态脂化，其中的脂质在成熟蛋白质中动态添加或移除。蛋白质脂化在信号传导、蛋白质稳定性、细胞死亡、代谢和蛋白质运输起关键作用（图 1-6）。脂质从生物合成前体向蛋白质的转移显著增加了蛋白质在脂化位点的疏水性。蛋白质脂化对细胞功能的影响是通过调节蛋白质-膜相互作用、蛋白质-蛋白质相互作用以及蛋白质稳定性和酶活性来实现的。添加到蛋白质中的脂质部分可以是脂肪酰基或聚异戊烯基，修饰通常发生在氨基酸的 R 基上，这些 R 基含有硫、氮和氧等元素，例如半胱氨酸（Cysteine, Cys）、丝氨酸和赖氨酸。蛋白质棕榈酰化是一种常见的脂质修饰方式，通过将棕榈酰基与底物蛋白质上的一个或多个半胱氨酸硫醇反应形成硫酯键。这种修饰具有可逆性，而且能够快速调节许多细胞蛋白的功能(Li et al 2021, Suskiewicz 2024)。

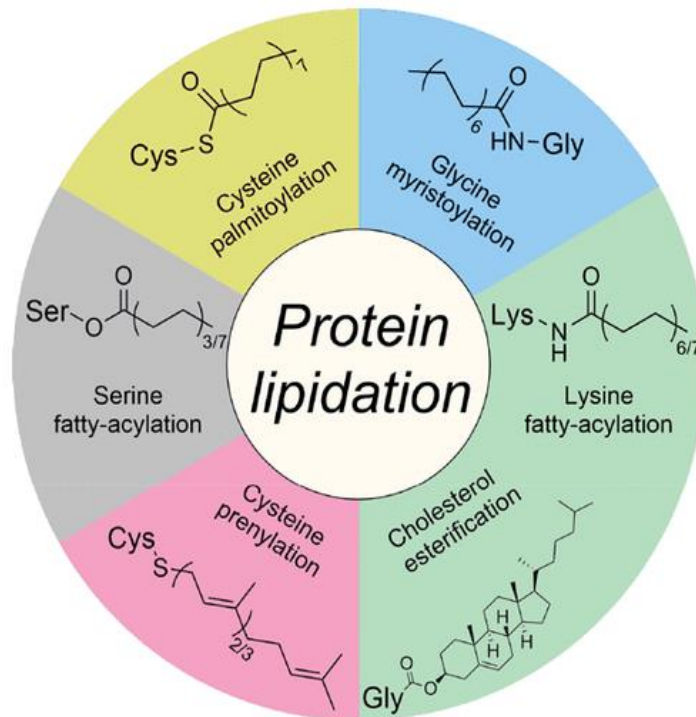


图 1-6 蛋白质脂酰化修饰类型(Jiang et al 2018)

Fig.1-6 Types of protein lipid acylation modifications (Jiang et al 2018)

1.2.2 棕榈酰化修饰过程

棕榈酰化是一种可逆的动态修饰(Bijlmakers and Marsh 2003), 首先, 在细胞质中, PA 和辅酶 A (Coenzyme A, CoA) 结合后活化生成棕榈酰-CoA, 然后棕榈酰转移酶 (Palmitoyltransferase, PATs) 将棕榈酰基团转移到蛋白质 R 基的 Cys 硫原子上。(Kodakandla et al 2024)。棕榈酰基团的去除则由一系列酶催化去棕榈酰化, 细胞硫醇交换去棕榈酰化酶的总数尚不清楚(Lin and Conibear 2015)。酰基蛋白硫酯酶 (acyl-protein thioesterases, APTs) 属于代谢丝氨酸水解酶超家族, 其特点是存在一个用于底物水解的丝氨酸活性位点, 该丝氨酸参与肽、蛋白质或脂类中酰胺、酯或硫酯键的裂解。最初被认定为溶血磷脂酶, 但越来越多的证据表明 APT1 和 APT2 是介导多种细胞底物去棕榈酰化的主要 APTs (Kathayat and Dickinson 2019)。最近 α - β 水解酶折叠蛋白家族 (ABHD) 的部分成员被证实具有脱棕榈酰化基团的能力, 包括 ABHD7 与层粘连蛋白 A 之间的相互作用促进层粘连蛋白 A 在 Cys 522、588 和 591 残基上去棕榈酰化 (Shen et al 2024); ABHD10 可调节 PRDX5 亲核活性位点残基的棕榈酰化状态, 这提供了 AB

HD10 介导的 PRDX5 S-脱棕榈酰化与其抗氧化能力之间直接的机制联系。(Cao et al 2019a)。ABHD16A 能催化 IFITM 3 蛋白 S-棕榈酰化的去棕榈酰化反应，从而降低其对 RNA 病毒的抗病毒活性(Shi et al 2022)。其中研究最多的为 ABHD17A/B/C，能使 N-Ras 去棕榈酰化并促进其重新定位到内膜(Remsberg et al 2021)。这些酶在细胞内的不同位置发挥作用，其中 APT1 分布于高尔基体、线粒体和质膜，APT2 分布于细胞质和高尔基体，PPT1/2 分布于溶酶体，分布于细胞膜和线粒体。为了方便起见，这些去棕榈酰化酶被统称为 APTs。

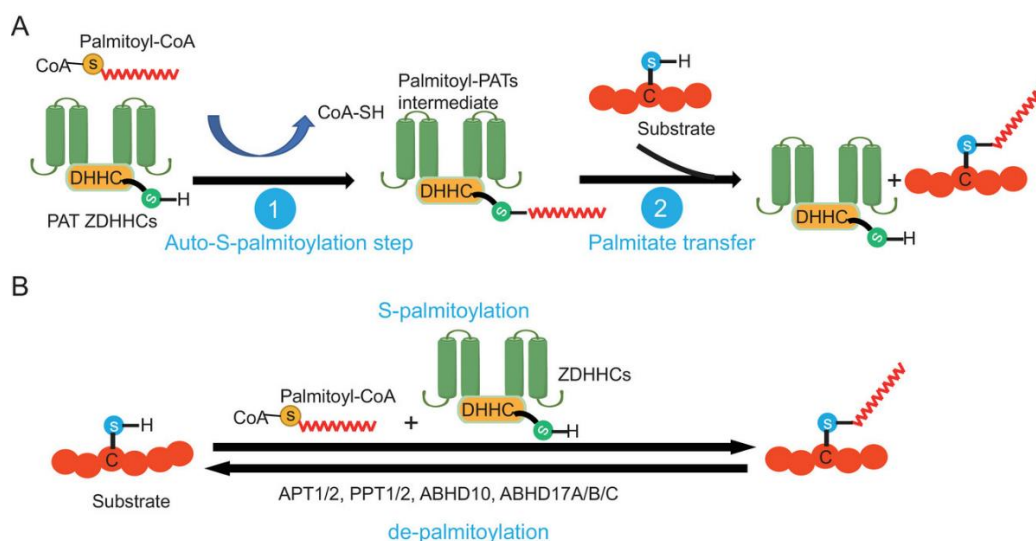


图 1-7 蛋白质棕榈酰化修饰过程 (Cai et al 2023)

Fig. 1-7 The process of protein palmitoylation(Cai et al 2023)

1.2.3 蛋白质酰基转移酶家族

棕榈酰化在生物系统中扮演着关键的角色，参与调节细胞信号传导、膜蛋白的定位和功能，以及细胞生命周期的调控。蛋白棕榈酰化主要由含锌指结构 (DHHC) 的棕榈酰 PATs 家族催化。最早发现的棕榈酰转移酶是酿酒酵母的 Erf2p 和 Erf4p，它们被认定为 Ras 蛋白酰基转移酶。至今，已有 23 个人类 DHHC 蛋白被鉴定或预测。蛋白质 PATs 含有 Zn^{2+} 结合域和保守的 "Asp-His-His-Cys" (DHHC) 基团，该结构域直接参与棕榈酰转移反应。DHHC 富 Cys 结构域是一个高度保守的结构域，可在多种真核蛋白质中找到，被认为是 DHHC 类酶的主要特征。该结构域包含一个 Cys-His 区域，可概括为 CX2CX9HCX2CX2CH4

DHHCX5X4NX3FX4。研究发现，DHHC 盒突变会使 DHHC 蛋白的失去 PATs 活性，除了 DHHC 结构域外，DHHCs 还含有四个或更多跨膜结构域(Ohno et al 2012)。

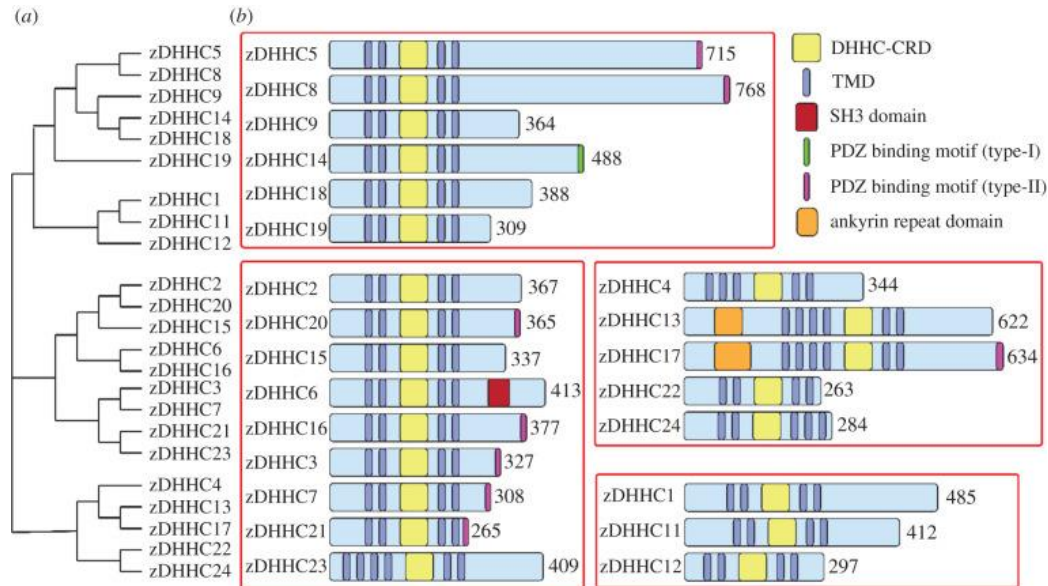


图 1-8 人类 DHHCs 的系统发育分析(Malgapo and Linder 2021)

Fig. 1-8 Phylogenetic analysis of human DHHCs(Malgapo and Linder 2021)

1.2.4 蛋白质棕榈酰化修饰鉴定方法

棕榈酰化在生命活动的调控中发挥着关键作用，这一点已得到公认，但检测蛋白质棕榈酰化的技术难题极大地阻碍了这一领域的进一步研究。相关的检测方法主要是基于“以标记棕榈酸酯为中心”和“以标记 Cys 为中心”两种思路进行开发。

1) 用放射性 PA 进行代谢标记

蛋白质棕榈酰化的经典方法是使用放射性同位素标记的 PA（如 ^3H 、 ^{14}C 和 ^{125}I -PA）对发生棕榈酰化修饰的蛋白进行代谢标记，然后对所选蛋白质进行免疫沉淀，并通过自显影法检测结合的脂肪酸，但是灵敏度低是该技术最明显的缺点，而且需要较长的曝光时间和使用放射性物质(Tsai et al 2014, Antoniewicz 2018, Barreca et al 2023)。

2) 用 PA 的非放射性衍生物进行代谢标记

基于生物正交化学研发的 PA 探针，如 17-十八碳炔酸（17ODYA）或 alk-16，提高了检测棕榈酰化修饰蛋白的灵敏度。该技术结合点击化学可以对蛋白进行可视化标记。另外通过生物素-链霉亲和素的特异相互作用，对全局棕榈酰化蛋白质进行质谱和蛋白质组学分析。结合邻近连接技术，通过免疫荧光确定棕榈酰化蛋白的亚细胞定位。(Martin and Cravatt 2009, Martin 2013)。基于点击化学的检测方法虽然可以提高棕榈酰化修饰蛋白的检测特异性，但需要引入带有特定化学团的氨基酸或其他分子标记到蛋白质中，这些标记可以用于检测新合成的蛋白质。对于已经存在且未经修改的蛋白质，点击化学方法可能无法有效地标记和检测。虽然 17ODYA 或 alk-16 优先掺入蛋白质的棕榈酰化，但它也能以较低的效率加入蛋白质的 N-肉豆蔻酰化位点。此外，那些带有糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚的蛋白质也可以用 PA 类似物标记此外，而且 PA 类似物中引入的炔基通常具有副作用，可能会干扰整体代谢状态。(Sobocińska et al 2018, Karthigeyan et al 2021)。

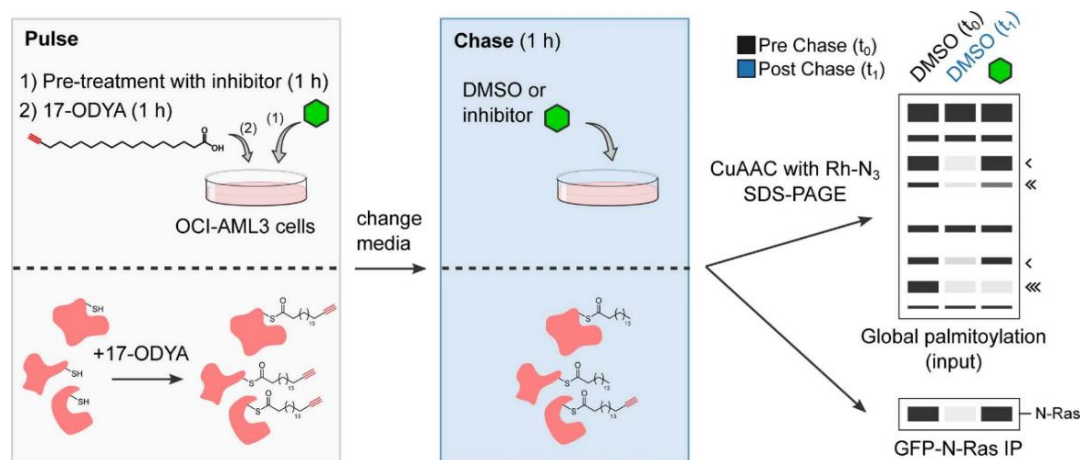


图 1-9 使用 17-ODYA 代谢标记的动态棕榈酰化实验示意图(Sobocińska et al 2017)

Fig. 1-9 Schematic of a dynamic palmitoylation assay using metabolic labeling with 17-ODYA (Sobocińska et al 2017)

3) 酰基生物素交换

酰基生物素交换（Acyl biotinyl exchange, ABE）法是通过硫酯键棕榈酸酯与生物素的衍生物进行体外交换(Edmonds et al 2017)。其中涉及以下三个主要步骤：（1）通过烷基化（通常使用 N-乙基马来酰亚胺）阻断蛋白质中的所有 Cys，保护 Cys 不被后续反应影响，从而确保后续实验中的特异性；（2）使

用中性羟胺溶液裂解棕榈酰化中的硫酯键，打开棕榈酰化修饰的硫酯键，释放出硫原子位点，为后续的分析 and 检测做准备；（3）使用巯基反应性生物素（如生物素-HPDP）或巯基反应性固相载体，对这些修饰蛋白进行富集和分析。另外不同质量的 Mal-PEG（5 或 10 kDa）也可用于结合棕榈酰化蛋白质中的 S-酰基，称为酰基-PEG 交换（Acyl-PEG exchange, APE）。在这种方法中，PEG 与蛋白偶联会导致蛋白质质量漂移，可通过 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹（Western Blot, WB）观察到，因此它不仅能量化 S-酰基的数量，还能确定每种棕榈酰化形式和非棕榈酰化形式的相对丰度(Zhou et al 2019, Zhang et al 2020a, Lei et al 2022)。

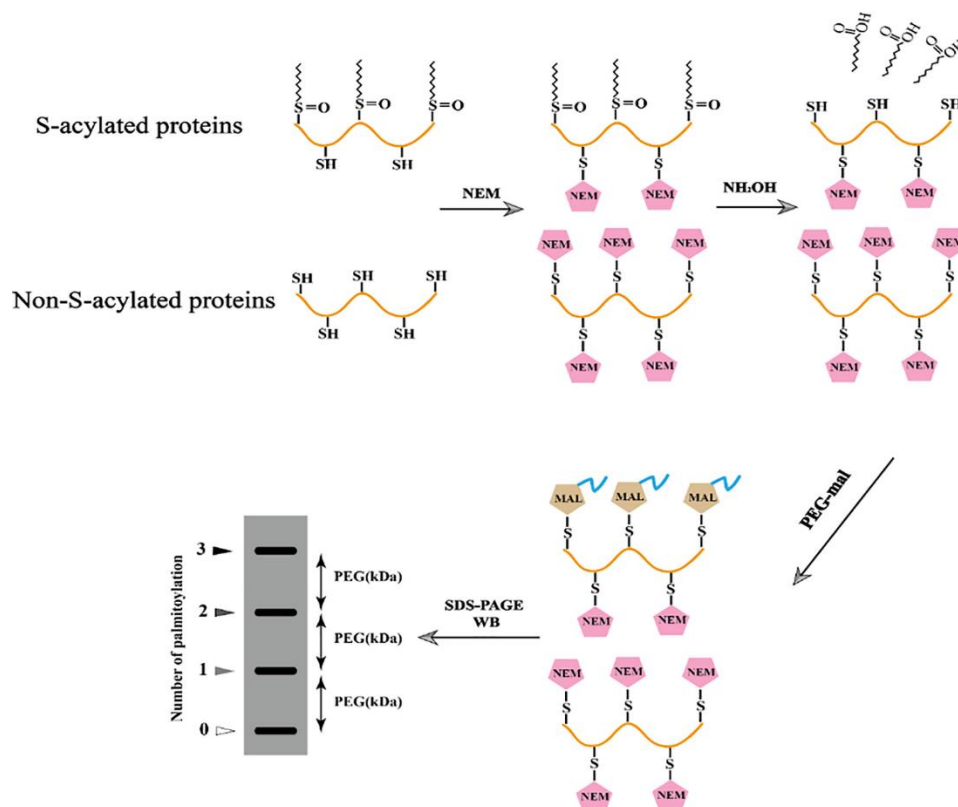


图 1-10 酰基-聚乙二醇交换凝胶移位（APEGS）实验示意图(Li et al 2022b)

Fig. 1-10 Schematic diagram of Acyl-PEGyl exchange gel-shift (APEGS) assay (Li et al 2022b)

1.2.5 棕榈酰化修饰与病毒感染

许多基于细胞和动物的研究都报道了蛋白质修饰在病毒性传染病中的多重作用。由于病毒本身不编码棕榈酰基转移酶，但它们可以“劫持”宿主的棕榈酰化机制来促进自身复制(Bakhache et al 2020)。其中研究最广泛的病毒棕榈酰化蛋白是病毒包膜中的蛋白质，这些包膜蛋白中含有棕榈酰化的糖蛋白和膜蛋白，如流感病毒的 M2 蛋白、HA 蛋白、NB 蛋白；狂犬病毒和水泡口炎病毒的 GD 蛋白；SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 的 S 蛋白；埃博拉病毒和马尔堡病毒的 Gp 蛋白；麻疹病毒和人呼吸道合胞病毒的 F 蛋白及辛德毕斯病毒和森林脑炎病毒的 E 蛋白等均被证实具有棕榈酰化修饰(Grantham et al 2009, Li et al 2022b)。这些棕榈酰化的病毒蛋白通过介导与细胞质膜的受体结合，促进病毒膜和细胞膜的后续融合，增强感染。研究揭示 SARS-CoV-2 的 S 蛋白棕榈酰化在控制膜融合和病毒感染性中的关键作用。DHHC5 和 GOLGA7 能协同增强 SARS-CoV-2 S 蛋白的棕榈酰化。更重要的是，通过敲除 DHHC5 或使用蛋白棕榈酰化抑制剂来减弱 S 蛋白棕榈酰化，可抑制 S 蛋白介导的膜融合和 SARS-CoV-2 假病毒进入宿主细胞(Sun et al 2021, Wu et al 2021b)。棕榈酰化位点突变导致 SARS-CoV-2 S 蛋白的膜和脂筏分布没有变化，但该突变导致 S 三聚体形成明显减少。然而，棕榈酰化如何影响 S 蛋白的三聚体化还不清楚(Li et al 2022a, Ramadan et al 2022)。

棕榈酰化的糖蛋白还参与新形成的病毒颗粒从细胞中释放出去的过程。包膜病毒在复制过程中从宿主细胞膜上获取脂质双分子层覆盖的病毒。蛋白的棕榈酰化修饰可促进病毒膜上糖蛋白的迁移，从而促进后代病毒在受感染上皮细胞上的组装和出芽，如流感病毒的衣壳蛋白在 M2 在两亲性螺旋区域发生棕榈酰化修饰，提高病毒衣壳蛋白与细胞膜的结合率(Meng et al 2023)。M2 蛋白在棕榈酰化、胆固醇结合和跨膜片段特性的共同作用下，定位于病毒筏的边缘，改变膜曲率，从而促进膜裂解和病毒释放(Grantham et al 2009)。

其他非膜病毒蛋白也可以通过参与病毒工厂的组装和抑制细胞的免疫应答，如丙型肝炎病毒（Hepatitis C virus, HCV）核心蛋白借助棕榈酰基团内质网膜结

合，随后结合基因组 RNA 和其他病毒组成蛋白完成病毒组装，此外 HCV NS2 等非结构性病毒蛋白的棕榈酰化可以增强病毒的感染性(Wu et al 2019)。基孔肯雅病毒（Chikungunya virus, CHIKV）复制复合物锚定在质膜上。CHIKV 的非结构蛋白 1 的 C 端 Cys 的棕榈酰化增强了其与脂质双分子层的相互作用，这对于靶向富含胆固醇的脂质筏和病毒基因组复制至关重要(Bakhache et al 2020)。

在对感染人类免疫缺陷病毒 1 型（Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1）的细胞中的蛋白质肉豆蔻酰化和棕榈酰化进行分析时，发现宿主蛋白质酰化发生了全局性变化，其中 17 种棕榈酰化蛋白质和 7 种肉豆蔻酰化蛋白质在 HIV-1 感染细胞和未感染细胞之间的丰度存在显著差异(Rousso et al 2000)。换句话说，HIV-1 不仅编码在宿主细胞中酰化的蛋白质，而且还改变了宿主蛋白质的棕榈酰化，以利于它们的复制和出芽(Sengupta et al 2019)。因此，进一步研究这些蛋白对于更好地了解病毒感染至关重要。基于点击化学的方法在揭示宿主蛋白棕榈酰化变化方面非常有效，为鉴定新型抗病毒药物靶点提供了新的可能性。

1.2.6 棕榈酰化修饰与天然免疫

先天性免疫反应是抵御微生物感染的第一道主动防御线，是宿主生存的进化反应，依赖于种系编码受体，也称为模式识别受体（PRR）(Li and Wu 2021)。溶酶体和细胞膜是检测病原体相关分子模式的两个主要场所(Hatinguais et al 2020)。先天性免疫反应是由不同的先天性免疫传感器启动的：内体定位的跨膜 Tol1 样受体、C 型凝集素受体、和位于内质网的干扰素基因刺激器（Stimulator of interferon genes, STING）和细胞膜核苷酸结合寡聚结构域样受体。这些作为 DNA 和 RNA 传感器可确保对低水平刺激做出快速免疫反应。基于点击化学和 ABE 方法的应用及蛋白质棕榈酰化的大规模分析中的应用，极大地促进了对参与先天性免疫反应的宿主受体和信号蛋白棕榈酰化作用的理解。

已经表明多个 DHHCs 均可以增加 STING 两个膜近端 Cys 残基（Cys 88 和 91）棕榈酰化，虽然棕榈酰化修饰不影响 STING 的转运，但在 STING 的跨高尔基网络中的集群聚类需要其棕榈酰化和由胆固醇定义的高尔基脂质秩序，这对于下游 IRF3 和 TBK1 的招募和激活至关重要(Mukai et al 2016, Kemmoku et al

2024)。核苷酸寡聚化结构域样受体 1 和 2 (Nucleotide binding oligomerization domain, NOD1/2) 这两种负责检测细菌产物的蛋白质需要棕榈酰化修饰才能被招募到细胞膜上并发挥作用。NOD1/2 被 DHHC5 在多个 Cys 残基上 (NOD1 上的 Cys 558、567 和 592) 催化棕榈酰化修饰, NOD1/2 棕榈酰化缺陷会破坏 NOD1/2 被招募到含细菌的吞噬体, 不能激活 NF- κ B 信号的以及有效地启动下游信号传导(Lu et al 2019)。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLR) 家族也存在棕榈酰化修饰。TLR2 的棕榈酰化位点位于其跨膜结构域下端的 Cys 609 位上。这种修饰存在于未受刺激的细胞中, 并与 TLR2 细胞表面定位的上调有关。Cys609 的突变削弱了该受体诱导促炎症信号传导的能力(Chesarino et al 2014a)。TLR9 在 C258 和 C265 处发生棕榈酰化, 棕榈酰化循环开始于 DHHC3 在高尔基体中对 TLR9 进行棕榈酰化, 在溶酶体, PPT1 在此对 TLR9 进行去棕榈酰化。TLR9 的棕榈酰化循环直接调节其与配体的结合(Ni et al 2024)。TLR 信号的适配蛋白 MYD88 也受棕榈酰化的调控, DHHC6 负责 MYD88 的 Cys 113 和 Cys 274 位点上的棕榈酰化。Cys113 棕榈酰化修饰对 MYD88 与 IRAK4 的相互作用非常重要, IRAK4 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 对来自 TLR 的先天性免疫反应信号非常重要(Kim et al 2019)。

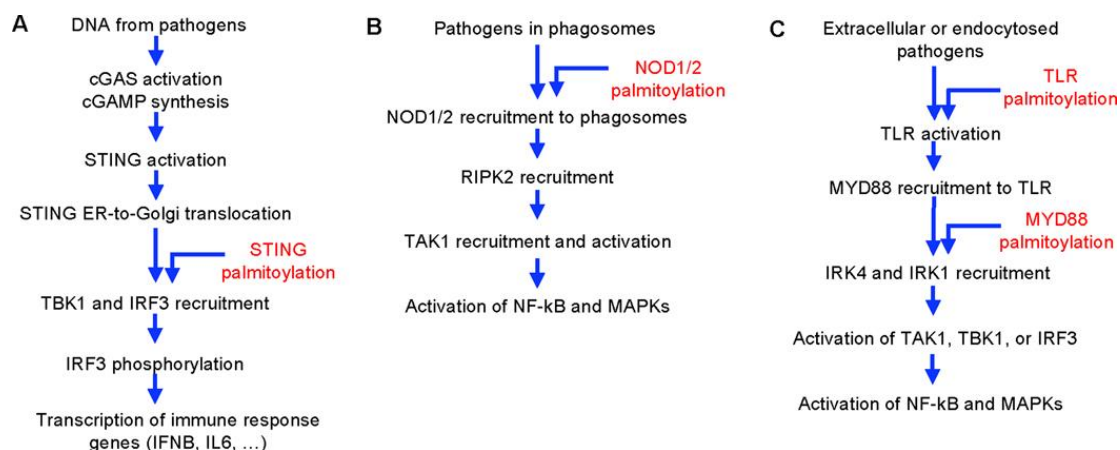


图 1-11 蛋白质棕榈酰化修饰参与调节天然免疫途径(Cai et al 2023)

Fig. 1-11 Protein palmitoylation modification is involved in the regulation of innate immune pathways(Cai et al 2023)

1.3 永生化的脑微血管内皮细胞

BBB 是一个动态的复杂系统，负责通过调节营养物质、免疫细胞转运以及毒素和病原体等物质的进入来维持大脑的平衡(Wu et al 2023)。构成人脑约 600 千米毛细血管的 BMEC 在血管系统与脑内神经元、胶质细胞和壁细胞之间传递生化和生物力学等信号(Smyth et al 2024)。与外周内皮细胞相比，BMEC 具有独特的特性，BMECs 的主要特征包括：高跨内皮屏障电阻（Trans epithelial electrical resistance, TEER）（ $TEER > 1000 \Omega \text{ cm}^2$ ）、低通透性、表达紧密连接蛋白如 Claudin-5、ZO1 和 Occludin 以及葡萄糖转运蛋白 1 型的高表达可将葡萄糖转运到大脑以满足能量需求。小鼠全身来自不同器官的内皮细胞种类有 78 种亚群，其中脑内的血管内皮细胞的异质性更强可分为 9 个亚群(Kalucka et al 2020)。

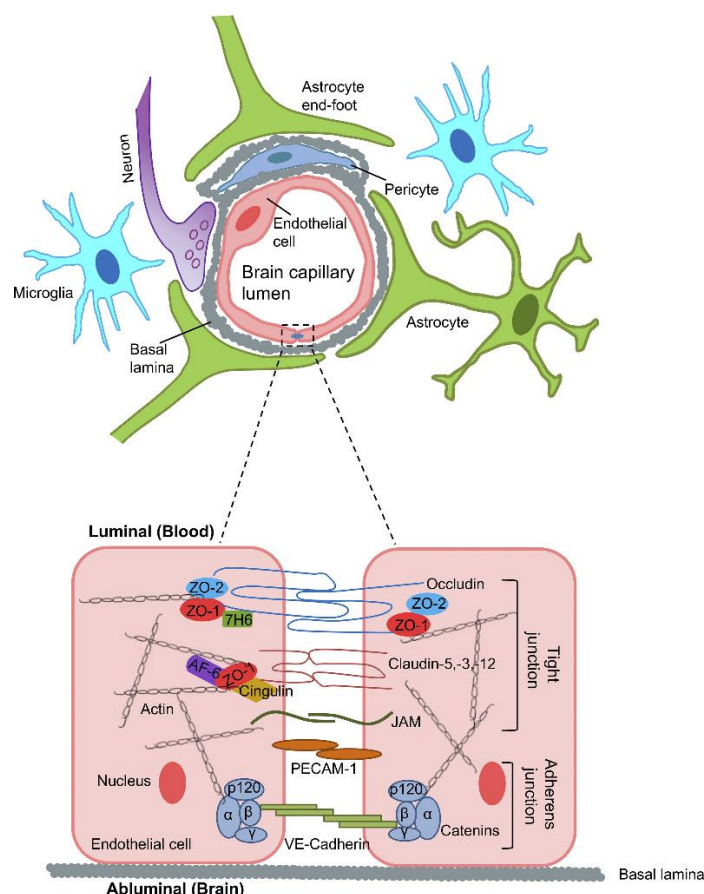


图 1-12 血脑屏障示意图(Yang et al 2019)

Fig. 1-12 Schematic diagram of the Blood-brain barrier (Yang et al 2019)

1.4 IFITM1 的功能概述

IFITM1 是 IFN 信号传导的关键效应物，由一个短的胞浆域、一个跨膜域和一个较大的胞外域组成，分子量为 16-18 KD (Diamond and Farzan 2013)。IFITM1 的保守 Cys 残基中含有三个棕榈酰化位点，与蛋白稳定性、细胞膜定位和多种细胞过程相关(Das and Hang 2023)。IFITM1 蛋白阻隔病毒包膜与细胞膜的融合过程，限制病毒进入和传播(Sun et al 2020)。棕榈酰化是一种可逆的翻译后修饰过程，通过将 PA 脂肪酸附着到靶蛋白上的 Cys 残基上。IFITMs 的棕榈酰化是由一组 PATs 催化的，其中多个 DHHCs 参与棕榈酰化 IFITMs，调节它们的生物功能(Das and Hang 2023)。研究表明，IFITM1 在抑制西尼罗病毒 (West Nile Virus, WNV)、DENV、埃博拉病毒和 SARS-CoV-2 的进入和复制，在抗病毒免疫应答中扮演关键角色(Meischel et al 2021, Prelli Bozzo et al 2021)。此外，IFITM1 对于功能性血管的形成至关重要，它通过管理紧密连接的组装，在内皮管腔的发育过程中稳定内皮细胞之间的连接。IFITM1 可以调节 HCV 共受体 CD81 和 Occludin 之间的相互作用，从而阻止 HCV 的进入。

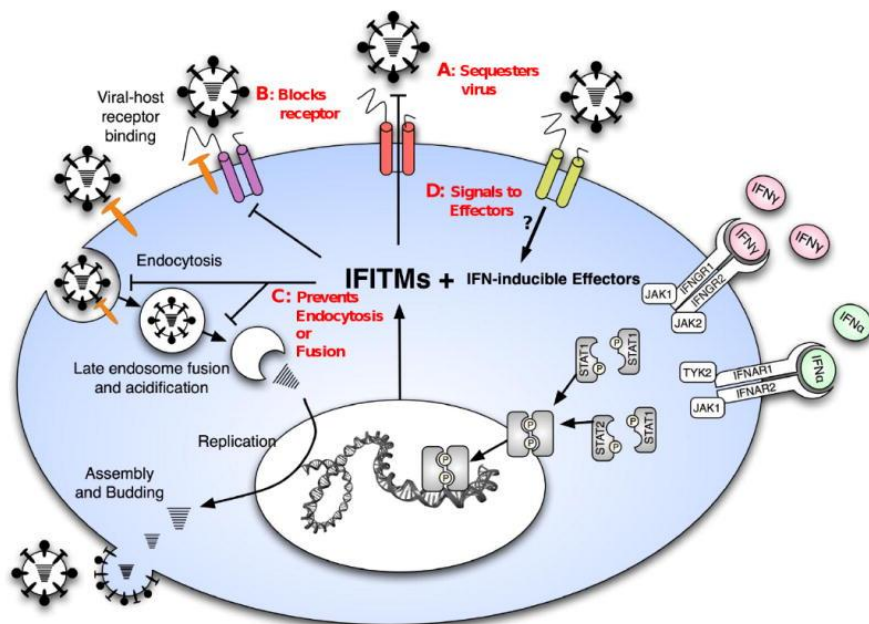


图 1-13 IFITM 蛋白作为抗病毒限制因子发挥作用(Wilkins et al 2013)

Fig. 1-13 IFITM proteins function as anti-viral restriction factors(Wilkins et al 2013)

1.5 DHHC21 的生物学功能

DHHC21 人体中主要在大脑组织和内皮细胞中高表达，在细胞内与其他大多数 DHHCs 定位于内质网和高尔基体不同，DHHC21 在质膜和胞内同时表达，而且这使得 DHHC21 有可能具有更多的调节功能。DHHC21 主要生物学功能包括介导 Src 家族激酶（Src family kinases, SFKs）的 S-棕榈酰化，启动其自身的磷酸化与 S-棕榈酰化之间一种新的 PTM-串联关系和调控 T 细胞的激活与分化。DHHC21 的其他重要靶点包括性类固醇受体，如孕酮、雌激素和雄激素受体、血小板内皮细胞粘附分子 1（PECAM1）、小窝蛋白 1（Caveolin1, CAV1）和 $\alpha 1D$ 肾上腺素受体(Marin et al 2012, Pedram et al 2012, De and Sadhukhan 2018)。此外已发现 DHHC21 在乳腺癌、淋巴瘤和白血病等多种癌症类型中过度表达，这表明 DHHC21 是一种促癌蛋白(Sosa et al 2019, Coronel Arrechea et al 2021)。

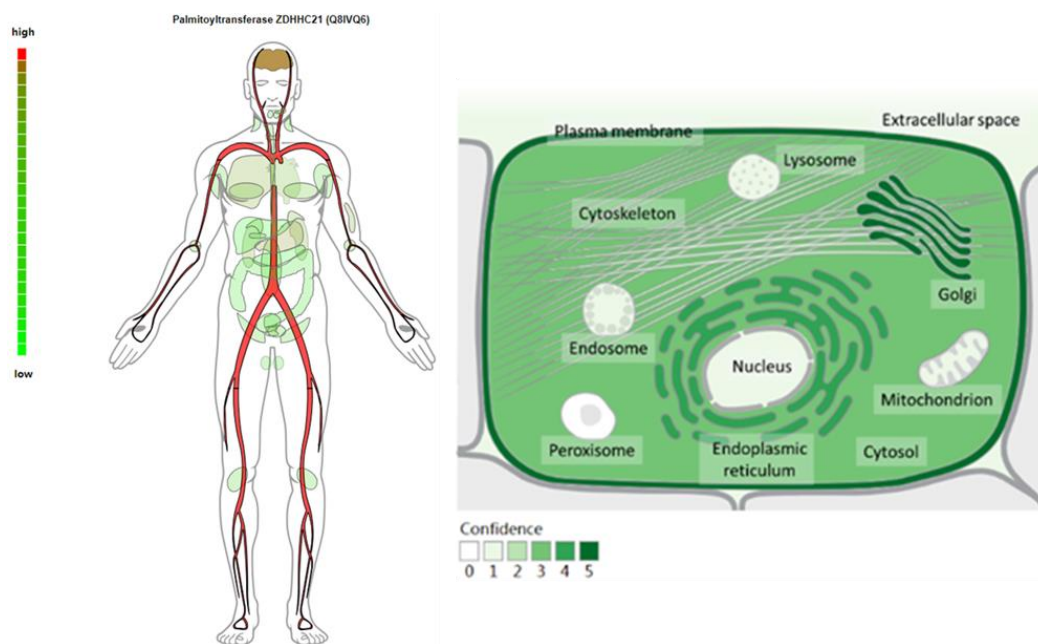


图 1-14 DHHC21 器官与组织表达特异性及亚细胞定位(Stelzer et al 2016)

Fig. 1-14 Organ and tissue expression specificity and subcellular localization of DHHC21 (Stelzer et al 2016)

1.5.1 DHHC21 调控内皮细胞炎症

与其他大多数 DHHCs 不同，DHHC21 在质膜和胞内同时表达，而且 DHHC21 在各个器官的内皮细胞高表达，这使得 DHHC21 有可能具有更多的调

节功能(Shao et al 2023)。关于 DHHC21 的研究主要集中在内皮细胞相关功能, DHHC21 通过催化血管 α 1-肾上腺素能受体 (α 1A adrenergic receptor, α 1AR) 棕榈酰化调节血管张力。在盲肠结扎和穿刺诱导的脓毒症模型中, DHHC21 通过促进 α 1AR 棕榈酰化及其下游效应物 ERK 的激活引起血管收缩, 导致脓毒症损伤期间肾脏灌注和功能受损(Yang et al 2021)。在全身炎症模型中, 炎症增强需要 PLC β 1 的棕榈酰化和信号活性, DHHC21 作为 PLC β 1 棕榈酰化修饰酶参与了内皮炎症。DHHC21 功能缺失的小鼠 (DHHC21^{dep/dep}) 在炎症模型中表现出血浆渗漏减少、白细胞粘附减少及肺部病理变化改善和明显的抗损伤能力, 最终提高了存活率(Beard et al 2016)。DHHC21 能特异性地催化线粒体腺苷酸激酶 2 的棕榈酰化, 并进一步激活白血病细胞中的线粒体氧化磷酸化削弱急性髓性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 细胞干性潜能, 阻止 AML 的体内生长。抑制 DHHC21 可延长接种了急性髓细胞白血病细胞系和病人异种移植急性髓细胞白血病细胞的小鼠的存活时间(Shao et al 2023)。这些研究表明, DHHC21 可能通过影响特定蛋白质的棕榈酰化来调节炎症信号通路的激活。

1.5.2 DHHC21 调控 T 细胞活化

T 细胞活化是一个复杂的过程, 对 T 细胞的增殖、调节和正确获得效应功能至关重要。抗原递呈细胞递呈的肽通过主要组织相容性复合物与 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 连接后, 会触发一系列信号传导事件, 引发 T 细胞的活化。这些信号传导事件包括细胞内信号通路的激活, 导致细胞增殖、分化和产生特定的效应功能(Hwang et al 2020)。Cys 残基的可逆棕榈酰化修饰是 T 细胞信号传导过程中的一种重要调节机制。DHHC21 通过招募蛋白质到 T 细胞受体复合物后迅速触发由 TCR 诱导的细胞质 Ca^{2+} 流入, 启动随后的信号级联。DHHC21 是 T 细胞受体信号转导机制的重要组成部分(Akimzhanov and Boehning 2015)。DHHC21 是一种 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性酶, 对激活幼稚 CD4^{+} T 细胞以应对 T 细胞受体刺激至关重要。破坏 DHHC21 的 Ca^{2+} /calmodulin 结合域不会影响胸腺 T 细胞的发育, 但会阻止外周 CD4^{+} T 细胞分化成 Th1、Th2 和 Th17 效应 T 辅助细胞以及主要 T 细胞激活标记物的上调显著减少(Bieerkehazhi et al 2022)。

DHHC21 的 C 端尾部的一个苯丙氨酸残基是经典的 Ca^{2+} /calmodulin 结合基团中的第一个苯丙氨酸，该残基的缺失会破坏钙调蛋白与 DHHC21 之间的 Ca^{2+} 依赖性相互作用。ER 贮存的钙耗尽会导致质膜上的钙通道被激活，这一过程被称为储存操作 Ca^{2+} 通道 (Store-operated Ca^{2+} entry, SOCE)。储存耗竭时，质膜定位的 DHHC21 被动态地招募到 Orai1/STIM1 点中，DHHC21 催化 Orai1 和 STIM1 动态地发生棕榈酰化，这是 SOCE 所必需的。抑制 DHHC21 的表达会抑制 SOCE 并导致 STIM1/Orai1 S-酰化减少。通过脱毛小鼠模型，我们发现 STIM1 和 Orai1 S-酰化以及随后的体内 T 细胞信号传导都需要 DHHC21 (Kodakandla et al 2024)。

棕榈酰化影响 TCR 信号通路中特征明确的成分如 Lck、Fyn、LAT 和 ZAP-70 的质膜定位和功能 (Palacios and Weiss 2004)。DHHC21 对 Lck 和 Fyn 以及 PLC- γ 1 具有底物偏好，而最近已鉴定所有这些蛋白都具有棕榈酰化修饰 (Salmond et al 2009, Katz et al 2017)。同时发现 DHHC21 底物 Lck 的 S-酰化依赖于 PLC- γ 1 介导的 Ca^{2+} 从 ER 储存库中释放，而消除 Ca^{2+} 信号可阻止激动剂诱导的 Lck 棕榈酰化。破坏 DHHC21 的 Ca^{2+} /calmodulin 结合基团并不会影响基础棕榈酰化水平，但会减弱 TCR 诱导的 DHHC21 蛋白靶标的棕榈酰化水平 (Akimzhanov and Boehning 2015)。此外 DHHC21 的靶蛋白 PLC- γ 1 和 Lck 还参与了由 Fas 诱导细胞凋亡和活化 T 细胞死亡的调控 (Akimzhanov et al 2010) (Wozniak et al 2006)。因此，DHHC21 有可能在调节 TCR 和 Fas 受体信号通路中发挥双重作用 (Yu et al 2004)。

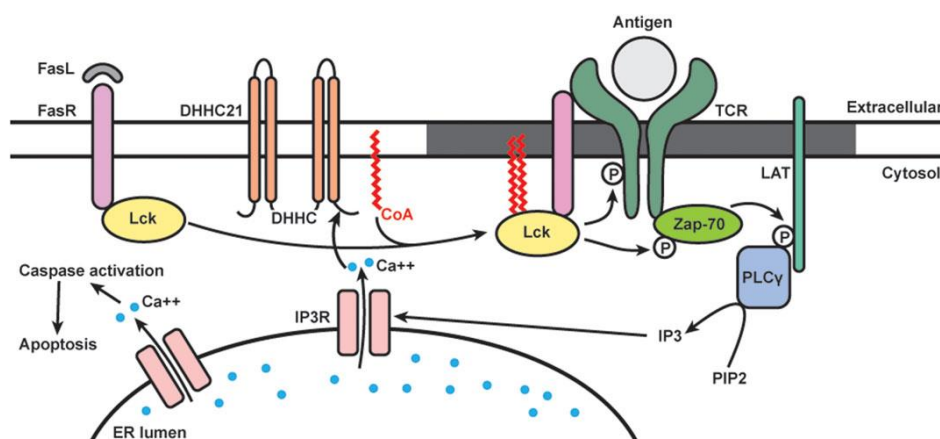


图 1-15 DHHC21 调节 T 细胞激活 (Chen et al 2021)

Fig. 1-15 DHHC21 regulates T cell activation (Chen et al 2021)

第二章 目的与意义

JEV 属于人畜共患病病毒，是引起人类病毒性脑炎的一种主要病毒。JEV 可以通过感染 hBMEC 直接进入 CNS 引起炎症，最终导致 BBB 破坏。重症脑炎患者死亡率高，可留下长期的神经系统后遗症。目前尚无特效治疗药物。宿主体内多种蛋白质均可进行棕榈酰化修饰，其中包括抗病毒蛋白与促病毒蛋白。在 JEV 感染过程中是否可以通过改变 hBMEC 的棕榈酰化修饰状态，从而促进自我复制和进行免疫逃逸，还没有得到详细阐述。

因此本研究首先研究了 JEV 通过抑制抗病毒蛋白 IFITM1 的棕榈酰化修饰进行免疫逃逸，接着探究了关键棕榈酰化转移酶 DHHC21 通过多个靶蛋白促进 JEV 复制过程来阐明棕榈酰化修饰与 JEV 复制的关系，为我们理解病毒感染机制提供了重要线索，并有助于发展相关的治疗和预防策略。

第三章 材料和方法

3.1 实验材料

3.1.1 细胞、病毒、质粒与小鼠

日本乙型脑炎强毒株 JEV P3 由华中农业大学曹胜波教授实验组赠与，本实验室扩毒保存。

A549 人非小细胞肺癌细胞系、BHK-21 仓鼠肾上皮细胞系、293T 人胚肾细胞系和 hBMEC 人脑微血管内皮细胞系由本实验室扩增保存。

pGL3-DHHC21-Luc 荧光素酶报告系统质粒是通过克隆人基因组中的 DHHC21 的启动子区域，并连接到 pGL3-Luc 骨架上，质粒由实验室保存扩增。

真核细胞瞬时表达质粒为 pCAGGS-HA、pCAGGS-Flag、pCDNA3.1；真核细胞慢病毒包装质粒 pLKO.1-shRNA、pHKO-EGFP 均由实验室保存扩增。

DH5 α 菌株和 Stbl3 菌株均购买于易白生物。

实验所使用的 C57BL/6 小鼠均为 6-8 周龄雌鼠，购于华中农业大学动物中心，所有实验动物均在 SPF 级环境下饲养，并进行实验。

3.1.2 仪器设备

实验仪器	品牌
CO ₂ 培养箱	日本 SANYO 公司
MCO-18AIC 生物安全柜	美国 LABCONCO 公司
荧光倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司
倒置显微镜	德国 ZEISS 公司
4 °C 药品保存柜	Haier 公司
-20 °C 冰箱	Haier 公司
-80 °C 超低温冰箱	日本 SANYO 公司
SIM-F140 制冰机	日本 SANYO 公司
超净工作台	哈尔滨东联公司
普通 PCR 仪	德国 Biometra 公司

荧光定量 PCR 仪	美国 ABI 公司
超纯水仪	美国 Millipore-Q 公司
冷冻离心机	德国 Hettich 公司
常温离心机	德国 Eppendorf 公司
FACS Calibur 流式细胞仪	美国 BD 公司
FV1000 共聚焦显微镜	日本 OLYMPUS 公司
SIM 超分辨显微镜	日本 Nikon 公司
RTCA 实时无标记细胞分析仪	美国 ACEA 公司
Millicell-ERS 电压电阻表	美国 Merck millipore 公司

3.1.3 实验药品、抗体与试剂盒

试剂名称	品牌
0.22 μ m PVDF 膜	Sigma-Aldrich
2 \times Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	Abclonal
2 \times MultiF Seamless Assembly Mix	Abclonal
Anti-Flag magnetic beads	Bimake
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天
BeyoZonase TM 超级核酸酶	碧云天
CCK8	翌圣
DMEM	Cytiva
DNA Marker	Abclonal
ECL 化学发光底物试剂盒	雅酶生物
First strand cDNA 反转录试剂盒	Abclonal
Flag-tag 抗体	Proteintech
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 555	Thermo Fisher Scientific
Gsk2606414	Selleck
HA-tag 抗体	Proteintech
HighGene transfection reagent	Abclonal
HRP goat-anti-mouse IgG	博奥龙
HRP goat-anti-rabbit IgG	博奥龙
JEV-E 单克隆抗体	实验室留存

TNF- α	Proteintech
甲基纤维素	Sigma-Aldrich
2-Bromopalmitate	Sigma-Aldrich
PMA	eBioscience
FITC-Dextran	Sigma-Aldrich
pSFK 单克隆抗体	艾比玛特
MPEG-MAL	芃硕生物
RIAP 裂解液	碧云天
T4 DNA 连接酶	New England Biolabs
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	诺唯赞
蛋白分子量 Marker	Abclonal
蛋白酶抑制剂	Sigma-Aldrich
限制性内切酶	Thermo Fisher Scientific

3.1.4 试剂的配制

DMEM 基础培养基：DMEM 粉末一瓶，称取 NaHCO_3 3.7 g，加入 800 mL ddH₂O，充分搅拌至完全溶解后，用 1 mol/L HCl 调 pH 值至 7.0-7.2，定容至 1000 mL，0.22 μm 滤膜过滤除菌，置于 4 °C 冰箱保存。

hBMEC 细胞培养基：在 RPMI 1640 培养基中添加 L-谷氨酰胺溶液（终浓度为 2 mM）、丙酮酸钠溶液（终浓度为 1 mM）、MEM amino acid solution 50 \times 溶液（按体积比 1:50 添加）、MEM non-amino acid solution 100 \times 溶液（按体积比 1:100 添加）、MEM vitamin solution 100 \times 溶液（按体积比 1:100 添加）、1% 双抗和热灭活的 FBS（终浓度为 10%）。

细胞生长液：在 DMEM 基础培养基中加入 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素，置于 4 °C 冰箱保存。

细胞维持液：在 DMEM 基础培养基中加入 2% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素，置于 4 °C 冰箱保存。

胰酶：称取 EDTA 0.20 g、NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、 NaH_2PO_4 0.06 g、 NaHCO_3 1.00 g、五水柠檬酸钠 1.12 g、葡萄糖 1.00 g、胰酶粉 2.50 g，加入 800 mL ddH₂O 搅拌溶解后，定容至 1000 mL，-20 °C 保存备用。

细胞冻存液：FBS 9 mL，DMSO 1 mL，现用现配，注意放热。

磷酸缓冲盐溶液 (PBS): 称 NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.42 g、KH₂PO₄ 0.27 g, 加入 800 mL ddH₂O 搅拌溶解后, 调 pH 到 7.2, ddH₂O 定容至 1000 mL, 高压灭菌后室温保存备用。

蛋白酶抑制剂: 将一片 cocktail 药片溶于 50 mL 细胞裂解液中配成工作液, 溶解后分装, -20 °C 保存。

空斑固定液: 固定液 A, 称取 4 g 羧甲基纤维素钠于 100 mL ddH₂O 中, 搅拌溶解后于高压灭菌锅内 121 °C, 20 min。固定液 B, 2×DMEM, 将固定液 A 和固定液 B 按 1:1 的比例混合, 置 4 °C 冰箱保存。

结晶紫染色液: 取 0.34 g 粉剂加到 15 mL 无水酒精中, 溶解后再用蒸馏水定溶到 100 mL。

细胞裂解液: 罗氏蛋白酶抑制剂 1 片加入 50 mL RIPA buffer, 充分混匀, 置于 4 °C 保存备用。

10% AP: 称取 0.2 g 的 AP 溶于 2 mL ddH₂O 中, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液: 称取 Tris-Base 15.1 g, 甘氨酸 94.0 g, SDS 5.0 g, 溶于 800 mL ddH₂O 中, 搅拌溶解后, 定容至 1000 mL, 室温保存备用。

10×TBS 缓冲液: 称取 Tris 24.2 g, NaCl 80.0 g, 溶于 1000 mL ddH₂O 中, 用 1 mol/L HCl 调 pH 值至 7.6, 置室温保存。

1×TBST 缓冲液: 10×TBS 缓冲液 100 mL, Tween-20 1 mL, 用蒸馏水定容到 1000 mL。

封闭液/抗体稀释液: 称取 5 g 脱脂奶粉溶于 100 mL 1×TBST 缓冲液中, 溶解后置于 4 °C 冰箱保存, 一周内使用。

5% 封闭液: 称取 5 g BSA 分别溶解于 100 mL PBS 中, 4 °C 保存备用。

10×TEA 缓冲液: 三乙醇胺 372.98 mg, NaCl 438.3 mg, 50 mL ddH₂O, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.3, 在室温下保存。

4% SDS TEA 缓冲液: 5 mL 10×TEA 缓冲液, 2 g SDS, 45 mL ddH₂O, 在室温下长期保存。

0.2% Triton X-100 TEA 缓冲液: 5 mL 10×TEA 缓冲液, 100 μL Triton X-100, 44.9 mL ddH₂O, 在室温下保存长达 1 年。

羟胺 (NH_2OH): 称取 347.4 mg 羟胺盐酸盐, 加入 4 mL 0.2% Triton X-100 TEA 缓冲液中, 用 1 mol/L NaOH 中和至 $\text{pH} = 7.3$, 0.2% Triton X-100 TEA 缓冲液调整至 5 mL。

N-乙基马来酰亚胺 (N-Ethylmaleimide, NEM): NEM 25.03 mg, 加入 200 μL 无水乙醇, 冰上保存, 现配现用。

1.33 mM PEG-MAL 5 kDa: 5 kDa PEG-MAL 6.66mg, 1 mL 0.2% Triton X-100 TEA 缓冲液, 现配现用。

200 mM TCEP 溶液: TCEP-HCl 286.6 mg, 加入 1 mL ddH₂O, 用 1mol/L NaOH 中和至 $\text{pH} 7.3$, ddH₂O 定容至 5 mL。

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g, 胰化蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 加入 800 mL ddH₂O 搅拌溶解后, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 定容至 1000 mL, 121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 高压灭菌。

LB 固体培养基: LB 液体培养基 1000 mL, 琼脂粉 15 g, 121 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 高压灭菌后, 加入抗生素倒平皿, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3.2 实验方法

3.2.1 细胞的复苏

从液氮罐中分别取出冻存 BHK-21 细胞、A549 细胞、293T 细胞和 hBMEC 细胞的冻存管, 立即放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中, 快速摇晃, 直至冻存液完全融化。将细胞悬液分别移入无菌的 15 mL 离心管中, 缓慢加入 9 mL 培养液, 混匀后于 1000 r/min 离心 5 min。弃上清, 用含 10% FBS 的培养液培养细胞, 调整细胞浓度, 移入 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养。

3.2.2 JEV P3 株的扩增与毒价测定

3.2.2.1 乳鼠脑内扩增 JEV P3 株

- 1) 购买孕鼠 (昆明鼠) 5 只;
- 2) 用无血清的 DMEM 将 JEV P3 株进行 10 倍倍比稀释到 100 倍 (5 窝乳鼠大概需要 900 μL), 并将微量注射器消毒备用;

- 3) 用酒精棉球轻轻擦拭乳鼠颅脑皮肤;
- 4) 微量注射器吸取 15 μL 已稀释的病毒液, 经脑部顶端三角区插入约 2-3 mm 注射 (注射时一定要戴手套, 防止小鼠沾上异味);
- 5) 用酒精棉球擦拭注射部位后, 将小鼠放回鼠笼中;
- 6) 注射完成之后每天观察小鼠症状两次;
- 7) 三天后当小鼠出现运动失调, 四肢抽搐等症状时处死小鼠, 取脑组织, 每个鼠脑用 1 mL DMEM 进行匀浆化。研磨后将匀浆液冻于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24 h 后解冻;
- 8) 匀浆液解冻后于 8,500 r/min 离心 45 min, 去除沉淀后再用 8,500 r/min 离心 15 min, 将上清分装在 500 μL EP 管内, 每管 100 μL , 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存。

3.2.2.2 JEV P3 株毒价的测定

采用空斑实验对 JEV P3 株进行毒价滴定, 具体步骤如下:

- 1) 将 BHK-21 细胞接种于 12 孔板内, 每孔接种 $1-2 \times 10^5$ 个, 均匀接种;
- 2) 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12-18 h, 待细胞长满单层, 弃去生长液, 用无血清 DMEM 洗涤 2 次;
- 3) 用无血清 DMEM 将病毒液进行 10 倍倍比稀释, 稀释度为 10^{-1} - 10^{-7} ;
- 4) 12 孔板中每孔加入 300 μL 病毒稀释液, 每个稀释度做两个复孔, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 1-1.5 h;
- 5) 将病毒吸附液吸出, 每孔加入 2 mL 空斑固定液;
- 6) 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 5 d (5 d 内勿动培养板);
- 7) 5 d 后, 向 12 孔板中每孔加满 10% 甲醛, 室温固定过夜;
- 8) 用自来水温和地冲去甲醛固定液和空斑固定液后, 每孔加入 500 μL 结晶紫染色液过夜; 自来水冲去染色液, 将细胞板倒扣于卫生纸上晾干后, 计算空斑数目。

3.2.3 细胞和组织样品 RNA 的提取及处理

3.2.3.1 细胞和组织 RNA 样品的提取及浓度测定

- 1) 将细胞板孔内的上清弃掉；
- 2) 加入 1 mL Trizol 将细胞刮下来，转移至无 RNA 酶 1.5 mL EP 管中；
- 3) 样品可放入 -80 °C 冰箱暂存；
- 4) 将细胞和组织样品取出，静置溶解 10 min；
- 5) 每管加入 200 μL 氯仿，涡旋振荡 15 sec，冰上静置 10 min；
- 6) 4 °C，12000 r/min 离心 10 min；
- 7) 取 400 μL 上清于另一无 RNA 酶 1.5 mL EP 管中；
- 8) 加入等体积的异丙醇，混匀，静置 10 min；
- 9) 4 °C，12,000 r/min 离心 10 min；
- 10) 小心弃掉上清，加入含 75 %无水乙醇的 DEPC 水，涡旋混匀；
- 11) 4 °C，12,000 r/min 离心 5 min，重复 10) -11) 两次；
- 12) 弃掉上清，吸净液体，将 EP 管置于超净工作台中静置 5-10 min；
- 13) 每管加入 20 μL DEPC 水溶解，用 Nano Drop 检测浓度；
- 14) 调整浓度为 50 ng/μL，以备后续使用。

3.2.3.2 RNA 处理和反转录

表 3-1 反转录 PCR 体系

Table 3-1 Reverse transcription PCR reaction system	
体系成分	体积 (μL)
5 × RT Master Mix	4
RNA template	15
20× gDNA remover	1
Total	20

将上述反应体系轻轻地搅拌混匀后，按以下温度进行反应。37 °C 15 min，50 °C 5 min，98 °C 5 min。将得到的 cDNA 置于 -80 °C 冰箱保存。

3.2.3.3 荧光定量引物及扩增引物

表 3-2 DHHCs 相关表达谱鉴定引物

Table 3-2 Identification primers for DHHCs-related expression profiles

Gene name	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
DHHC1	CAACAAGCCCTCCAACAAGACG	GGTCTCAGACGTTTCGCACTTTATAC
DHHC2	CTCCTGCTCGGCTGGTCCCTACTACG	CCTGGGTTTATGCTGCTCTCCGTCC
DHHC3	TACCTCCAGCCAGAGAAGTGTGTCC	ACATACTGGTACGGGTCTGCCTTCC
DHHC4	GTTCTTATCTGCGTCTGCTCG	GATCTCTTGAAGGTTGCTCCG
DHHC5	CGGCTGTCACAATGGCAGTAATG	GATTGTCGTAACGGACTGGTGAGGG
DHHC6	AGCCCTTGGTGTATAGCAATATG	TCAGCATCACAGGGACACTTTTC
DHHC7	ACGTCGAGCATCATCTCTCCTGGC	CCTTTTCTGGGTCTCGTGGGACAGTC
DHHC8	CAAGGTGCCCTTCTGTGGACCAG	AGCGTCATAGACGCCTGAGTCGC
DHHC9	TGATGGTGGTGAGAAAGAAGGTGA	CATCTCTTCGGGAGTGCTGCTGTC
DHHC11	TGGAGAGCCGTTTTCCGTTGCC	GGCTTCCCACGCAGTTGTTGATCC
DHHC12	ACCGTGCTGACCTGGGGAATCAC	CTGCTGCCCTCTTCTCCTCCTCAG
DHHC13	AGACCCCACTCTTATTGATGGAGAG	TTTGAATGTTGTGGCACAATGACTG
DHHC14	TGGAGGCTGTGGTGTGCTTCTTC	CAGGGCAACACAGCAGTTGGTAAAG
DHHC15	TGCCAGTGCTCGTTATTGTCTC	GTTGTATCCTCGTTGTCTTCCAG
DHHC16	CGCCTACCTGTGTGCTCCTGCTCTC	AGCACCCGAGTAAGCCAGTGCCTTC
DHHC17	GGTGAACCTCTTGGACGGAAACT	AGGTCTGCTATAAACCCAACCAGCC
DHHC18	TACCTGGCTCGCAAGCTGACCCTTG	GCTTCTGATGGGTGAGGGCAACACG
DHHC19	GGAGCCCCATCCCCTGCCTCTGG	CAGCCTCACCACGCCCCGGGGG
DHHC20	TTTCACATCTCCCGCTTCCCCCTC	TCAGCTCCATTCTCCAGCCACTGAG
DHHC21	CGGATTCACCTTGTGTGACCCAC	TTGCCTCTGCCTGAAAGGAATGAAC
DHHC22	ATGCTGGCCCTGCGGCTGCTC	CTACTATCCTGCTGCTTGGAGCTCTCA
DHHC23	TGCGAGTACATAGATCGGAATGGGG	TCCAAGTAACCCTGTGTCCACGATG
DHHC24	TGGCTTACGTGCTGGTGTCTCGGTC	AGGAGGCTGTGTGTCCACATCTGC
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTG	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

表 3-3 其他相关基因 RT-qPCR 引物

Table 3-3 RT-qPCR primers for other related genes

Gene name	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
LIPA	GTGGGTCATTCTCAAGGCACCA	CCATAGGGCTAGTACAGAAGGC
CD36	CAGGTCAACCTATTGGTCAAGCC	GCCTTCTCATCACCATGGTCC
PPAR	AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG
ACAT1	TTCACTCCACCTTGTGACGCGA	GTCAGAGAAGCAGCCCATCACT
PGC1	TGAGCAGACCTTGACAGTGGAG	GACTATGCTTGATGTCTGGTTTGA
β -actin	AGCGGGAAATCGTGCCTGAC	GGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG
JEV-C	GGCTCTTATCACGTTCTTCAAGTTT	TGCTTTCCATCGGCCYAAAA
GAPDH	CAACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTTCCACGATACCA

IFITM1	TATGCCTCCACCGCCAAGT	GTCACAGAGCCGAATACCAGTA
IFITM2	CGTCCAGGCCAGCGATAGAT	GTCACAGAGCCGAATACCAGTA
IFITM3	CGCCAAGTGCCTGAACAT	TGATGCCTCCTGATCTATCCA

表 3-4 DHHCs 的 RT-qPCR 引物

Table 3-4 RT-qPCR primers for DHHCs

Gene name	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (5'-3')
DHHC1	CAACAAGCCCTCCAACAAGACG	GGTCTCAGACGTTTCGACTTTATAC
DHHC2	CTCCTGCTCGGCTGGTCTACTACG	CCTGGGTTTATGCTGCTCTCCGTCC
DHHC3	TACCTCCAGCCAGAGAAGTGTGTCC	ACATACTGGTACGGGTCTGCCTTCC
DHHC4	GTTCTTATCTGCGTCTGCTCG	GATCTCTTGAAGGTTGCTCCG
DHHC5	CGGCTGTCAATGGCAGTAATG	GATTGTCGTAACGGACTGGTGAGGG
DHHC6	AGCCCTTGGTGTATAGCAATATG	TCAGCATCACAGGGACACTTTTC
DHHC7	ACGTCGAGCATCATCTCTCCTGGC	CCTTTTCTGGGTCTCGTGGGCAGTC
DHHC8	CAAGGTGCCCTTCTGTGGACCAG	AGCGTCATAGACGCCTGAGTCGC
DHHC9	TGATGGTGGTGAGAAAGAAGGTGA	CATCTCTTCGGGAGTGCTGCTGTC
DHHC11	TGGAGAGCCGTTTTCCGTTGCC	GGCTTCCCACGCAGTTGTTGATCC
DHHC12	ACCGTGCTGACCTGGGGAATCAC	CTGCTGCCCTCTTCCTCCTCCTCAG
DHHC13	AGACCCCACTCTTATTGATGGAGAG	TTTGAATGTTGTGGCACAATGACTG
DHHC14	TGGAGGCTGTGGTGTGCTTCTTC	CAGGGCAACACAGCAGTTGGTAAAG
DHHC15	TGCCAGTGCTCGTTATTGTCCTC	GTTGTCATCCTCGTTGTCTTCCCAG
DHHC16	CGCCTACCTGTGTGTCCTGCCTCTC	AGCACCCGAGTAAGCCAGTGCCTTC
DHHC17	GGTGAACCTCTTGGACGGAAAACT	AGGTCTGCTATAAACCCAACCAGCC
DHHC18	TACCTGGCTCGCAAGCTGACCCTTG	GCTTCTGATGGGTGAGGGCAACACG
DHHC19	GGAGCCCCATCCCCTGCCTCTGG	CAGCCTCACCACGCCCCGGGGG
DHHC20	TTTCACATCTCCCGCTTCCCCCTC	TCAGCTCCATTCTCCAGCCACTGAG
DHHC21	CGGATTCACCTTGTGTGTTGACCCAC	TTGCCTCTGCCTGAAAGGAATGAAC
DHHC22	ATGCTGGCCCTGCGGCTGCTC	CTACTTATCCTGCTGCTTGGAGCTCTCA
DHHC23	TGCGAGTACATAGATCGGAATGGGG	TCCAAGTAACCCTGTGTCCACGATG
DHHC24	TGGCTTACGTGCTGGTGTCTCGGTC	AGGAGGCTGTGTGTCCACATCTGC
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTG	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC

3.2.4 质粒构建

3.2.4.1 过表达及突变质粒构建

本研究中过表达质粒为 pCAGGS-N-HA、pCAGGS-C-Flag、以及慢病毒包装质粒 pHKO-EGFP-pour。克隆目标基因片段均由 cDNA 扩增得到，载体连接使用无缝克隆技术。构建成功后的载体通过 PCR 及测序检测，确认克隆成功并

确认所需的序列已经正确插入后，用于下一步实验。本实验使用的 PCR 反应体系、程序及引物如下所示：

表 3-5 PCR 反应体系

Table 3-5 The PCR reaction system

组分	体积 (μL)
模板 DNA	2
上游引物 (10 μM)	2
下游引物 (10 μM)	2
2 × Phanta Max Master Mix	25
ddH ₂ O	up to 50

表 3-6 PCR 反应程序

Table 3-6 PCR reaction procedure

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	3 min	
变性	95 °C	15 sec	
退火	56 ~ 72 °C	15 sec	25 - 35 循环
延伸	72 °C	30 - 60 sec/kb	
彻底延伸	72 °C	5 min	

表 3-7 突变体引物

Table 3-7 Mutant primers

Primers	Sequence (5'-3')
	HSPA8 突变引物
WT-F	gtccagattacgctgaattcATGTCCAAGGGACCTGCAGTT
WT-R	ccttaattaattaagatctgctagcTTAATCAACCTCTTCAATGGTGGG
17-F	TACTCTgctGTGGGTGTTTTCCAGCACGGAAA
17-R	ACACCCACagcAGAGTAGGTGGTGCCAAGATCAA
267-F	TACTGCTgctGAACGTGCTAAGCGTACCCTCT
267-R	CACGTTcagcAGCAGTACGGAGGCGTCTTACA
574-F	CTGGACAAGgctAATGAAATTATCAACTGGCTTGATAAG
574-R	TCATTagcCTTGTCCAGAATCTTCTGTTTGTCC

603-F	GAAAGTTgccAACCCCATCATCACCAAGCTGT
603-R	TGGGGTTggaAACTTTCTCCAGCTCTTTCTGTTGA
IFITM1 突变引物	
WT-F	ctagcgtttaacttaagcttGCCACCATGGATTACAAAGACG
WT-R	tgctggatatctgcagaattcCTAGTAACCCCGTTTTTCCTGTATT
C2A-F	TTCTTGAACCTGGgctgcgCTGGGCTTCATAGCATTCGC
C2A-R	cgcagcCCAGTTCAAGAAGAGGGTGTTGA
C84A-F	GCCAAGgcaCTGAACATCTGGGCCCTGATT
C84A-R	ATGTTCAgtgcCTTGCGGTGGAGGCATAG
S16E-F	GAGGTGGCTGTGCTGGGGCCACCCCCCgagACCATCCTTC

小写字母为同源臂序列和突变序列

对于 PCR 扩增的产物，进行琼脂糖凝胶检测，回收。将测序正确的产物与双酶切线性化的载体连接。无缝克隆连接体系如下：

表 3-8 无缝克隆反应体系

Table 3-8 Seamless cloning reaction system

组分	体积（ μL ）
线性化载体	X
插入片段	Y
2 \times MultiF Seamless Assembly Mix	10
ddH ₂ O	to 20

$X = 0.02 \times \text{碱基对数} / \text{载体产物浓度}$

$Y = 0.04 \times \text{碱基对数} / \text{PCR 产物浓度}$

3.2.4.2 shRNA 和 sgRNA 设计与相关质粒构建

本实验涉及 shRNA 靶向序列，均通过 BLOCK-iT™ RNAi Designer 设计，使用 NCBI 网站对得到的靶向序列进行 BLAST 验证，最后进行载体连接。本研究使用 shRNA 质粒为 pLKO.1-EGFP-pour，在合成的引物上面分别添加 5' 端（CCGG）和 3' 端（CTTAA）粘性末端序列，以及中间添加茎环序列（TCAAGAG）。随后将合成好的序列，按照程序退火磷酸化，并使用 T4 连接酶进行连接。具体程序及引物如下表：

表 3-9 shRNA 引物序列

Table 3-9 shRNA primer sequences

Primers	Sequence (5'-3')
与 DHHCs 相关的 shRNA 引物序列	
DHHC2F	CCGGTAGCTACTGCTAGAAAGTCTTATCAAGAGTAAGACTTCTAGCAGTAGCTATTTTTG
DHHC2R	AATTCAAAAATAGCTACTGCTAGAAAGTCTTACTCTTGATAAGACTTCTAGCAGTAGCTA
DHHC6F	CCGGAAGGCTAAAGATCGAATTCAGTCAAGAGCTGAATTCGATCTTTAGCCTTTTTTTTG
DHHC6R	AATTCAAAAAAAGGCTAAAGATCGAATTCAGCTCTTGACTGAATTCGATCTTTAGCCTT
DHHC13F	CCGGCAGCATAGTAGCCTTTCTATATTCAAGAGATATAGAAGGCTACTATGCTGTTTTTG
DHHC13R	AATTCAAAAACAGCATAGTAGCCTTTCTATATCTCTTGAATATAGAAAGGCTACTATGCTG
DHHC17F	CCGGTAGCGACATCTTATCCTATGATTCAAGAGATCATAGGATAAGATGTCGCTATTTTTG
DHHC17R	AATTCAAAAATAGCGACATCTTATCCTATGATCTCTTGAATCATAGGATAAGATGTCGCTA
DHHC21F	CCGGCACCTTCTTATAGTATAGGTATCAAGAGTACCTATACATAAGAAGGTGTTTTTG
DHHC21R	AATTCAAAAACACCTTCTTATAGTATAGGTACTCTTGATACCTATACTATAAGAAGGTG
与 SFKs 相关 shRNA 序列	
Lck1F	CCGGGCACACATCAGGAGTTCAATATCAAGAGTATTGAAC TCCTGATGTGTGCTTTTTG
Lck1R	AATTCAAAAAGCACACATCAGGAGTTCAATACTCTTGATA TTGAACTCCTGATGTGTGC
Lck2F	CCGGAGCCATTAACACTACGGGACATTTCAAGAGAATGTCCCGTAGTTAATGGCTTTTTTG
Lck2R	AATTCAAAAAGCCATTAACACTACGGGACATTCTCTTGAAATGTCCCGTAGTTAATGGCT
Yes1F	CCGGGCTGCACTGTATGGTCGGTTTTCAAGAGAAACCGACCATACAGTGCAGCTTTTTG
Yes1R	AATTCAAAAAGCTGCACTGTATGGTCGGTTTCTCTTGAAAA CCGACCATACAGTGCAGC
Yes2F	CCGGCCAGCCTACATTCACCTTCTAATCAAGAGTTAGAAGTGAATGTAGGCTGGTTTTTG
Yes2R	AATTCAAAAACCAGCCTACATTCACCTTCTAACTCTTGATTAGAAGTGAATGTAGGCTGG
Lyn1F	CCGGGAGTGACGATGGAGTAGATTTTCAAGAGAAATCTACTCCATCGTCACTCTTTTTG
Lyn1R	AATTCAAAAAGAGTGACGATGGAGTAGATTTCTCTTGAAATCTACTCCATCGTCACTC

Lyn2F	CCGGGGAAGAAGCCAACCTCATGAATCAAGAGTTCATGAG GTTGGCTTCTTCCTTTTGG
Lyn2R	AATTCAAAAAGGAAGAAGCCAACCTCATGAACTCTTGATT CATGAGGTTGGCTTCTTCC
Fyn1F	CCGGGCCTATTCACCTTTCTATCCGTTCAAGAGACGGATAGA AAGTGAATAGGCTTTTGG
Fyn1R	AATTCAAAAAGCCTATTCACCTTTCTATCCGTCTCTTGAACG GATAGAAAGTGAATAGGC
Fyn2F	CCGGGCGCATGAATTATATCCATAGTCAAGAGCTATGGAT ATAATTCATGCGCTTTTGG
Fyn2R	AATTCAAAAAGCGCATGAATTATATCCATAGCTCTTGACT ATGGATATAATTCATGCGC

表 3-10 与 IFITM1 相关的 sgRNA 序列

Table 3-10 sgRNA sequences associated with IFITM1

Primers	Sequence (5' -3')	
sgRNA-1F	CACCGCCAGCATCCGGACACCACAG	5'UTR 区域
sgRNA-1R	AAACCTGTGGTGTCCGGATGCTGG	
sgRNA-2F	CACCGCAGGGCCAGCATTGCACAG	3'UTR 区域
sgRNA-2R	AAACCTGTGCAATGCTGGCCCTGC	

表 3-11 寡聚核苷酸磷酸化与 T4 连接酶体系

Table 3-11 Oligonucleotide phosphorylation and T4 ligase system

成分	体积 (μL)
正义链	2
反义链	2
10×T4 缓冲液	2
T4 PNK	1
ddH ₂ O	17

反应程序设定为：37°C 孵育 30 min，95°C 保持 2min，0.1°C/s 降至 25°C

3.2.4.3 组装产物转化和鉴定

将重组产物按照下列步骤转化到感受态细胞中：

- 1) 取 5 μL 组装产物加入到 100 μL 感受态细胞中：将重组产物与感受态细胞混合，注意重组产物的体积不要超过感受态细胞的 10%，然后轻轻混合混匀，保持冰上静置 30 min；

- 2) 42 °C 水浴热激 60 sec 后，立即置于冰上冷却 2-3 min：将样品在 42 °C 水浴中短暂加热，然后立即转移到冰上冷却，这一步有助于促进 DNA 的转化；
- 3) 加入 900 μ L LB 培养基：加入适量的培养基，然后在 37 °C 条件下摇菌 1 h，培养基中不含抗生素；
- 4) 4000 r/min 离心 3 min，弃掉 800 μ L，用剩余的 200 μ L 液体重悬：通过离心将细胞沉淀，然后弃掉上层的溶液，再将细胞沉淀悬浮在剩余的 200 μ L 液体中；
- 5) 将悬浮的细胞均匀涂布在含有抗性的平板上，然后在 37 °C 条件下过夜培养；
- 6) 在培养后的平板上挑选出单个克隆，然后进行菌液 PCR，最后进行一代测序来鉴别目标克隆；
- 7) 对测序正确菌株进行，扩大培养，提取质粒保存备用。

3.2.4.4 质粒的提取

对于构建完成的载体，扩大培养后按照以下步骤进行质粒提取：

- 1) 取 5-15 mL 的培养 14 h 菌液，加入离心管中，以 12,000 r/min 离心 1 min，去除全部上清；
- 2) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 500 μ L 的 Buffer P1，使用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀；
- 3) 向离心管中加入 500 μ L 的 Buffer P2，温和地上下颠倒混匀 8-10 次使菌体充分裂解；
- 4) 向离心管中加入 500 μ L 的 Buffer P4，混匀后室温静置 10 min，然后 12,000 r/min 离心 10 min，使沉淀在离心管底部；
- 5) 将收集的上清液分次加入吸附柱，12,000 r/min 离心 2 min，将滤液转移到干净的 2 mL 离心管中；
- 6) 向滤液中加入 0.3 倍滤液体积的异丙醇，混匀后转移到吸附柱中；
- 7) 12,000 r/min 离心 1 min，倒掉废液，重新放回吸附柱；
- 8) 向吸附柱中加入 500 μ L 的 Buffer DW，12,000 r/min 离心 30 sec，倒掉废液，重新放回吸附柱。重复两次；
- 9) 12,000 r/min 离心 3 min，去除残留的 Buffer DW2；

- 10) 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中，加入 100-300 μL 的 Buffer EB2，室温放置 1 min，12,000 r/min 离心 1 min 将质粒溶液收集到离心管中。最后提取的 DNA 应保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，以防 DNA 降解。

3.2.5 细胞蛋白样品提取及检测

3.2.5.1 细胞蛋白样品提取

- 1) 将细胞孔内的上清弃掉，用预冷的 PBS 洗细胞 3 遍；
- 2) 每孔加入 100 μL 含 Cocktail 的 RIPA。将细胞刮下来，冰上静置 15 min；
- 3) 超声破碎仪 30% 功率破碎 4 sec 停 8 sec，3 个循环；
- 4) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，12,000 r/min，离心 5 min；
- 5) 取上清，分装，可置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存。

3.2.5.2 BCA 蛋白浓度测定

- 1) 取 1.2 mL 蛋白标准配制液加入到蛋白标准品（30 mg BSA）中，充分溶解后配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液。配制后可立即使用，也可 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存；
- 2) 取适量 25 mg/mL 蛋白标准溶液，稀释至终浓度为 0.5 mg/mL；
- 3) 将标准品按 0、1、2、4、12、16 和 20 μL 分别加到 96 孔板的标准品孔里，加标准品稀释液补足到 20 μL ；
- 4) 加待测样品稀释到合适浓度，每孔 20 μL ；
- 5) 根据样品数量，按 50: 1 的比例将 BCA 试剂 A 与试剂 B 混合，配制成工作液；
- 6) 在各孔中加入 200 μL BCA 工作液， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱放置 20-30 min；
- 7) 测定 A562，根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。

3.2.5.3 Western Blot 样品制备及分析

- 1) 加入 $5\times$ Loading Buffer，将细胞蛋白样品浓度调为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，组织蛋白样品浓度调为 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后，煮沸 10 min，冰上静置 10 min；

- 2) 80 V 恒压 30 min, 120 V 恒压 1 h, 电泳结束后, 取出凝胶, 采用湿法转 PVDF 膜, 200 mV 湿转 30-45 min。转膜结束后, 将 PVDF 膜置于含 5% BSA 封闭液中, 室温封闭 1-2 h;
- 3) 一抗包括 HA-tag、Flag-tag、HSPA8、 β -actin、pSFK、用含 5% 脱脂奶粉封闭液稀释, 稀释倍数参见说明书, 4 °C 孵育过夜;
- 4) TBST 洗 3 遍, 每次 5 min。HRP 标记的羊抗鼠或抗兔 IgG 作为二抗, 用含 5% 脱脂奶粉封闭液稀释, 稀释比例为 1: 5,000, 37 °C 孵育 1 h。TBST 清洗 3 遍, 每次 5 min;
- 5) 用 ECL 化学发光进行底物显色, 于化学发光成像系统中成像拍照。

3.2.6 间接免疫荧光, 激光共聚焦和 SIM 超分辨

本研究的间接免疫荧光 (Indirect immunofluorescence, IF) 图像获得均按照以下步骤进行:

- 1) 用预冷的 PBS 洗液三次, 每次洗涤 5 min, 以确保清洁细胞并去除残留的培养基;
- 2) 在室温条件下使用 4% 多聚甲醛固定细胞, 固定时间为 30 min, 以保留细胞结构;
- 3) 使用 PBS 洗涤细胞三次, 每次洗涤 5 min, 去除多余的多聚甲醛;
- 4) 使用 0.2% Triton X-100 进行通透处理, 处理时间为 10 min, 有助于细胞膜的通透性;
- 5) 用 PBS 洗涤细胞三次, 每次洗涤 5 min, 去除残留的 Triton X-100;
- 6) 在室温条件下使用 2% BSA 封闭细胞, 封闭时间为 2 h 或 4 °C 过夜, 减少非特异结合;
- 7) 用 PBS 洗涤细胞三次, 每次洗涤 5 min, 去除残留的 BSA;
- 8) 加入对应的一抗, 按照说明书稀释倍数, 使用室温摇床孵育 2 h;
- 9) 用 PBS 洗涤细胞三次, 每次洗涤 5 min, 去除未结合的一抗;
- 10) 加入与一抗种属对应的荧光二抗, 使用摇床室温孵育 2 h;
- 11) 使用 DAPI (1: 5,000) 染色细胞核, 然后 PBS 洗涤细胞三次, 每次洗涤 5 min;

- 12) 使用甘油，或封片剂进行封片；
- 13) 最后，使用普通荧光显微镜、激光共聚焦或 SIM 超分辨显微镜拍摄照片，并记录观察结果。

3.2.7 甲醇氯仿法沉淀蛋白质

本研究中使用甲醇氯仿法从溶液中富集和纯化蛋白质，具体步骤如下：

- 1) 150 μL 蛋白样品加入 1.5 mL 离心管中，加入 4 倍体积，600 μL 预冷的甲醇，涡旋混合；
- 2) 加入 1.5 倍体积，225 μL 氯仿，涡旋混合；
- 3) 加入 3 倍体积，450 μL 氯仿，涡旋混合；
- 4) 室温 14,000 r/min，离心 10 min 分离相，应分为两相，蛋白层在两相之间；
- 5) 弃去上层与下层液体，保留中间蛋白，加入 1 mL 预冷甲醇清洗；
- 6) 室温 14,000 r/min，离心 10 min，弃去甲醇，保留沉淀，以备后用。

3.2.8 酰基聚乙二醇交换法

本研究使用酰基聚乙二醇交换法（Acyl-PEG Exchange, APE）检测棕榈酰化修饰蛋白，APE 利用 Cys 特异性化学交换脂肪酰化位点，在棕榈酰化位点上偶联 5 kDa 的质量标签，并通过 WB 检测。具体操作如下：

- 1) 140 μL 蛋白上清加入 1.4 μL (0.5 mol/L, PH=8, EDTA)，终浓度为 5 mM；
- 2) 加入 7 μL 的 200 mM TCEP，终浓度为 10 mM，室温转动孵育 30 min；
- 3) 加入 3.75 μL NEM，溶解在无水乙醇中（现配现用），终浓度为 25 mM，室温转动孵育 2 h；
- 4) 甲醇氯仿法沉淀蛋白，沉淀完使用预冷甲醇清洗 1 次，重复 2 次；
- 5) 干燥，保持湿润无明显水分，过分干燥不能溶解；
- 6) 60 μL TEA 缓冲液（4% SDS, 4 mM EDTA）重悬，完全溶解后，分成两份 A，B 两份；
- 7) A 加入 90 μL 1mol/L 中和的 NH_2OH （TEA 缓冲液，0.2%TX-100），B 加入 90 μL TEA 缓冲液（0.2%TX-100），室温转动孵育 2 h；
- 8) 甲醇氯仿法沉淀蛋白，沉淀完使用预冷甲醇清洗 1 次。重复 2 次；
- 9) 干燥，保持湿润无明显水分，过分干燥不能溶解；

- 10) 每管使用 30 μ L 的 TEA 缓冲液 (4% SDS, 4mM MEDTA) 重悬;
- 11) 每管加入 90 μ L 的 TEA buffer (1.33 mM MPEG-MAL, 0.2% TX-100), 现配现用, 室温转动孵育 2 h;
- 12) 甲醇氯仿法沉淀蛋白, 沉淀完使用预冷甲醇清洗 1 次, 重复沉淀清洗 2 次;
- 13) 干燥, 保持湿润无明显水分, 过分干燥不能溶解;
- 14) 100 μ L TEA 缓冲液 (4% SDS) 重悬, WB 检测漂移条带。

3.2.9 体外血脑屏障模型建立及检测

本研究使用康宁公司 24 孔板 Transwell 培养小室, 膜孔径为 0.4 μ m (货号: 3413), 建立屏障使用细胞系为 hBMEC。具体步骤如下所示:

- 1) 包被 transwell 小室, 每孔中加入 50 μ L, 50 mg/mL 的鼠尾胶原蛋白, 室温静置 1 h 后, 吸出多余的鼠尾胶原蛋白, 使用 PBS 清洗膜表面 3 次。包被完成的小室可直接使用或 4 $^{\circ}$ C 冰箱保持一周;
- 2) Transwell 小室预处理, 上室中加入无血清 DMEM, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中静置 1.5 h 后, 弃去 DMEM, 即可使用;
- 3) 消化 hBMEC 细胞, 并调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。然后在上室加入 0.1 mL 细胞悬液, 同时下室加入 0.6 mL 完全培养基;
- 4) 观察并测定模型的 TEER 值, 待 TEER 值达到最大, 且稳定后进行后期实验。

3.2.10 Millicell® ERS-2 使用方法

本研究中使用 Millicell® ERS-2 电压电阻表 (货号: MERS00002) 测量体外 BBB 的 TEER 值, 测量之前需要对电极进行预处理, 将电极插入 70%乙醇浸泡 15 min 进行灭菌, 取出电极风干 15 sec; 然后用培养基冲洗电极。在测量电阻之前, 确保电极已经平衡, 并将电极放入培养皿内测量电阻值。测量步骤如下

- 1) 将细胞置于室温下平衡 30 min
- 2) 测试 Millicell ERS-2 系统, 并确保电极经过平衡;
- 3) 将模式调至 Ohms, 将开关打开;

- 4) 将电极短端浸入培养皿内部，长端浸入外部。短端不要碰到膜上生长的细胞，长端需碰到外侧的底部。为了实验结果的稳定和可重复性，确保电极平稳，并与培养板成 90 度垂直；
- 5) 记录电阻值。

3.2.11 FITC-Dextran 检测血脑屏障渗透性

FITC-Dextran（10 kDa 和 70 kDa）是一种异硫氰酸荧光素葡聚糖荧光探针，用来检测体外 BBB 模型的渗漏情况。具体操作步骤如下：

- 1) 在 Transwell 上室的中加入 FITC-Dextran（0.1 mg/mL）；
- 2) 在 15 min 后分别在从 transwell 上室和下室中收集培养基；
- 3) 测量荧光信号（激发波长 = 485 nm, 发射波长 = 538 nm）；
- 4) 根据荧光强度计算 FITC-Dextran 浓度；
- 5) 计算渗透率。

3.2.12 双荧光素酶实验

本研究按照双荧光素酶试剂盒为 Dual Luciferase Reporter Assay Kit（货号：DL101-01），进行样品收集与检测，具体操作步骤如下所示：

- 1) 吸弃细胞培养基，用 PBS 洗涤两次，将 5×Cell Lysis Buffer 与 ddH₂O 按 1:4 的比例混合，并置于冰上备用；
- 2) 按照 100 μL，1×Cell Lysis Buffer/孔的比例，在 24 孔板中振摇裂解 5 min。吹打并吸取细胞裂解产物至 1.5 ml 离心管中，以 12,000 r/min 常温离心 2 min，取上清用于后续检测；
- 3) 将 100 μl 平衡至室温的 Luciferase Substrate 加入黑色酶标板中。小心吸取 20 μl 细胞裂解上清至酶标板孔中，迅速混匀后立即于酶标仪中检测 Firefly luciferase 报告基因活性；
- 4) 以 50:1 的比例将 Stop & Reaction Buffer 和 Renilla Substrate 混匀，配置成 Renilla substrate 工作液。在以上反应液中加入 100 μL 新鲜配制的 Renilla subst-rate 工作液，迅速混匀后立即于酶标仪中检测 Renilla luciferase 报告基因活性。

3.2.13 慢病毒包装与浓缩

本研究涉及的慢病毒包装及浓缩程序如下所示（以 12 孔细胞培养板为例）：

- 1) 将 293T 细胞接种至 12 孔细胞培养板中，细胞密度约为 5×10^5 个/mL，当细胞融合程度为 75%-85% 时，进行细胞转染；
- 2) 在 12 孔板中，每孔转染质粒按照固定比例，pMD2G: 0.5 μ g/孔、psPAX: 1 μ g/孔和 pLenti plasmid: 1 μ g/孔；
- 3) 细胞转染完成后 48 h，收取第一次病毒上清液，存放于 4 $^{\circ}$ C；
- 4) 更换细胞维持液（2% FBS 培养液+双抗），继续培养，36 h 后收取第二次病毒上清液；
- 5) 将两次病毒液混合后，使用经 0.45 μ m 滤器过滤；
- 6) 将过滤后的病毒液加入 $5 \times$ 慢病毒浓缩液进行混合，4 $^{\circ}$ C 浓缩过夜；
- 7) 在 4 $^{\circ}$ C 下以 8,000 r/min 离心 60 min；
- 8) 弃去上清，将病毒沉淀使用 5% FBS 培养液重悬，直接用于细胞感染或分装后冻存备用。

3.2.14 实时无标记动态细胞分析技术

本研究中使用的实时无标记动态细胞分析技术（Real Time Cellular Analysis, R-TCA）是一种先进的细胞分析技术，利用每孔中覆盖 70% - 80% 的表面面积的金微电极生物传感器，来实现对细胞形态、功能和状态的实时监测和跟踪。通过测量细胞生长、扩散、形态变化等引起的细胞-电极界面阻抗的变化，对屏障功能等进行无标记实时研究。具体操作步骤如下：

- 1) 向 16 孔板的 E-Plate 检测板中加入培养基并测定背景阻抗值；
- 2) 消化并计数，调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL，向 E-Plate 检测板中加入 100 μ L 的细胞，然后在 37 $^{\circ}$ C 培养箱内放置 30 min；
- 3) 将 E-Plate 接入检测电极进行检测；
- 4) 待细胞增殖曲线稳定后，按照实验设计加入 TNF- α 和 2-BP，并以 30 min 间隔的 RTCA 检测；
- 5) 获得不同时间点的德尔塔细胞指数（Delta cell index, DCI），并作图。

3.2.15 CCK8 细胞增殖检测

CCK-8（Cell Counting Kit-8）含有水溶性的甲臞染料，在细胞内的脱氢酶的作用下被氧化还原成橙黄色，这个染料可以溶解在组织培养基中。生成的染料的量与活细胞的数量成正比。是一种用于评估细胞数量、活力和增殖能力的方法。具体操作步骤如下：

- 1) 首先，分别将 WT-HB、IFITM1-OE 和 IFITM1-KO 细胞消化重悬，调整细胞密度为 $5 \times 10^3/\text{mL}$ ，每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种在 96 孔板中，使其适应培养条件；
- 2) 在培养后的不同时间点，在 96 孔板中每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂，使其与细胞反应；
- 3) 孵育：将 96 孔板放入细胞培养箱中，让细胞与 CCK-8 试剂孵育 45 min；
- 4) 测量吸光度：使用多功能酶标仪，在 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 波长下，测量各组细胞的吸光度值。

3.2.16 手术器械消毒

在开始消毒之前，对器械进行预处理，将器械进行清洁，去除表面的血液、油脂和其他污物。清洗后，对器械进行充分冲洗，确保清洁剂残留物完全被清除。使用无菌包装袋对器械进行包装，最后进行高压蒸汽灭菌。

3.2.17 实验动物及废物的无害化处理

对于完成实验的小鼠进行引颈处死后，使用消毒剂浸泡 1 h，送至专业处理机构处理。实验过程中产生的实验用品垃圾，按照分类要求进行分类，最后送至专业处理机构处理。

3.2.18 数据的统计与分析

本研究使用数据应用分析软件 GraphPad Prism 9.5 进行分析并作图，数据以平均数 \pm 标准偏差（Mean \pm SD）的形式表示。统计数据的相关性分析使用 t-检验、One-Way ANOVA 或 Two-Way ANOVA 进行计算。统计显著性报告使用下列符号表示 “ns”： $P > 0.05$ 无显著差异，“*”： $P \leq 0.05$ 存在显著差异，“**”： $P \leq 0.01$ 差异较显著，“***”： $P \leq 0.001$ 差异极显著。

第四章 棕榈酰化的 IFITM1 可抑制 JEV 感染并稳定 BBB

4.1 IFN- β 介导 JEV 感染 hBMEC 引起的 IFITM1 上调表达

4.1.1 IFITM1 在 JEV 感染 hBMEC 后显著上调

通过对 JEV (MOI=1) 感染 hBMECs 后不同时间间隔内 IFITMs 表达变化的转录组数据进行分析, 发现感染后 IFITM1 和 IFITM3 的表达均上调 (图 4-1)。随后, 使用 RT-qPCR 的方法验证了在 JEV 感染 hBMECs 24 h 后, IFITMs (IFITM1、23) 的 mRNA 转录水平均显著增加。值得注意的是, 在 JEV 感染后, hBMECs 中的 IFITM1 的在 mRNA 水平增加的最为显著 (图 4-2A)。与 mRNA 检测结果一致, 在 JEV 感染后 24 h 和 48 h, 通过 WB 检测 IFITM1 蛋白含量的变化, 结果显示与对照组相比, IFITM1 的蛋白表达显著上调 (图 4-2C)。同样在 JEV 感染人胶质瘤细胞 U251 后, 在 mRNA 水平 IFITMs 的上调表达规律与 hBMEC 一致, IFITM1 是 IFITMs 中上调幅度最为显著的基因 (图 4-2B)。同时与 U251 细胞相比, 未感染状态下, hBMECs 中内源性 IFITM1 蛋白的表达水平较低 (图 4-2D)。

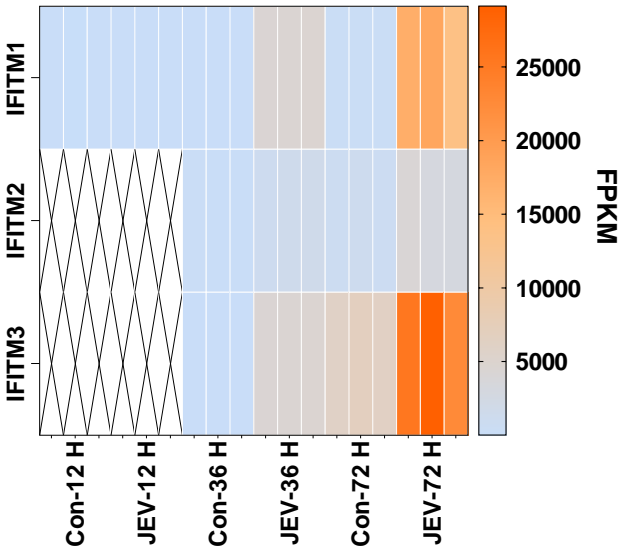


图 4-1 热图表示 JEV 感染 hBMEC 后 hIFITMs 基因的表达情况

Fig. 4-1 A heat map was constructed based on FPKM expression values of IFITMs genes in hBMEC at different time point after JEV infection

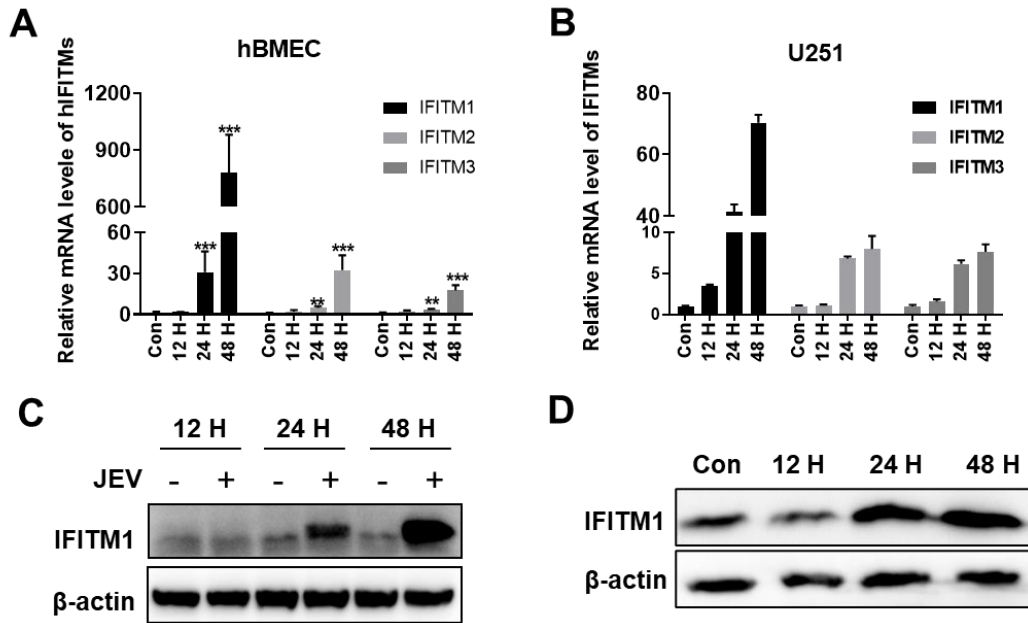


图 4-2 JEV 感染后 IFITM1 的表达上调

Fig. 4-2 Up-regulated expression of IFITM1 after JEV infection

(A) RT-qPCR 检测 JEV 感染后 hIFITMs 基因的转录水平；(B) WB 检测 JEV 感染 hBMEC 后 IFITM1 的表达情况；(C) RT-qPCR 检测 JEV 感染 U251 后 IFITM1 的表达情况；(D) WB 检测 JEV 感染 U251 后 IFITM1 的蛋白质含量变化情况；

(A) Transcription levels of the hIFITMs' gene in JEV infected hBMEC were determined with RT-qPCR; (B) The expression of IFITM1 was examined at various time points following JEV infection hBMEC cells; (C) RT-qPCR are used to detect the expression of IFITM1 after JEV infects U251 cells; (D) Western blot was used to detect the changes of IFITM1 protein content after JEV infection in U251 cells.

4.1.2 IFN- β 刺激 IFITM1 上调表达

I型、II型和 III型的 IFNs 均可以诱导 IFITM 蛋白的表达(Zhao et al 2014, Ogony et al 2016, Forero et al 2019)。根据实验室前期结果验证和转录组分析显示, 在参与调控 IFITM1 的基因中, 只有 IFN- β 1 和 IFN- λ 1-3 在 JEV 感染后上调表达 (图 4-3A) (Zhang et al 2023)。因此我们使用不同浓度的 IFN- β (1 ng/mL、10 ng/mL) 或 IFN- λ (1 ng/mL、10 ng/mL) 处理 hBMEC 24 h 后, 收集蛋白样本检测 IFITM1 的变化。结果显示, III型 IFN- λ 刺激 IFITM1 上调表达的程度较低, I

型 IFN- β 可以显著刺激 IFITM1 的上调表达，且 1 ng/mL 和 10 ng/mL 的 IFN- β 在促进 IFITM1 表达程度上没有差异（图 4-3B）。

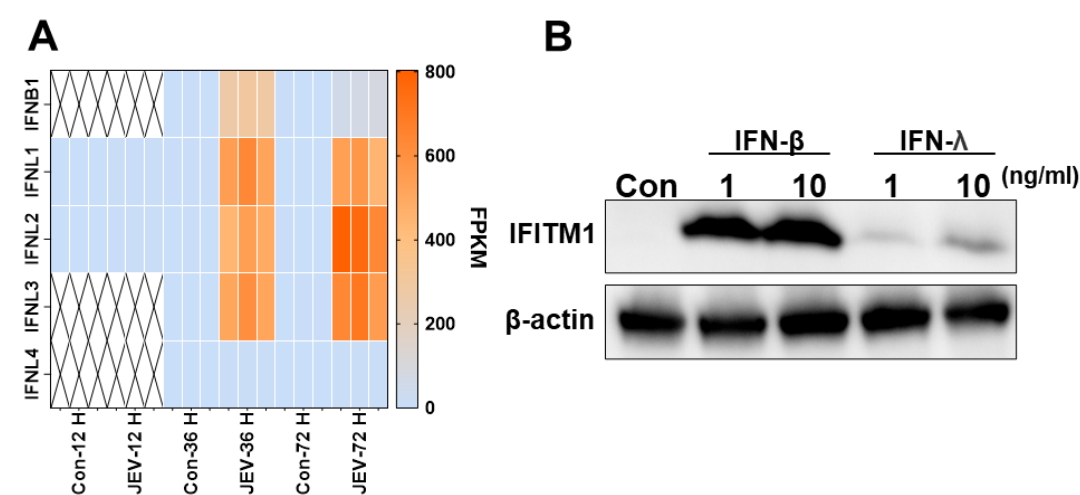


图 4-3 IFN- β 处理刺激 IFITM1 上调表达

Fig.4-3 IFN- β treatment stimulates upregulation of IFITM1 expression

(A) 使用 FPKM 值热图可视化 IFN- β 和 IFN- λ 基因的表达；(B) hBMECs 用 IFN- β (1 ng/mL、10 ng/mL) 或 IFN- λ (1 ng/mL、10 ng/mL) 处理 24 H，通过 WB 测定 IFITM1 的表达。

(A) The FPKM values heat map was used to visualize the expression of IFN- β and IFN- λ genes; (B) hBMECs were treated with IFN- β (1 ng/ml, 10 ng/ml) or IFN- λ (1 ng/ml, 10 ng/ml) for 24 h, then the expression of IFITM1 was determined by WB.

同时，为了进一步探究 JEV 复制与 IFITM1 表达之间的关系，我们使用 JEV 以 MOI=1 感染 b-End3 细胞系（只感染不复制的细胞）和 Vero 细胞（I 型干扰素受体缺失的细胞），JEV 在这两个细胞系中无法诱导 IFITM1 的上调表达（图 4-4A, B）。此外，经过紫外（Ultraviolet, UV）灭活的 JEV 也无法刺激 hBMEC 上调 IFITM1 的表达（图 4-4C, D）。这些结果表明，JEV 复制激活了 IFN 信号通路，其中 IFN- β 介导了 hBMEC 中 IFITM1 的上调表达。

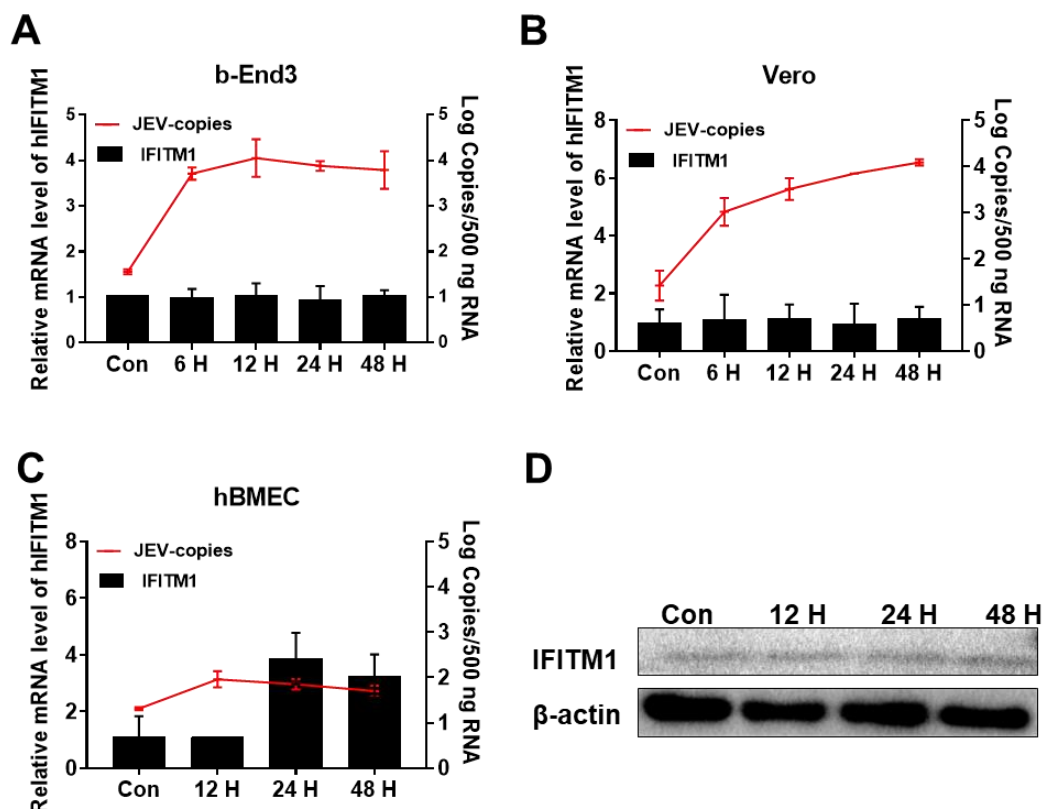


图 4-4 IFN-β 介导了 JEV 感染后 IFITM1 的上调表达

Fig.4-4 IFN-β mediates up-regulation of IFITM1 expression after JEV infection

JEV 感染后，使用 RT-qPCR 测定 IFITM1 和 JEV-C 基因的 mRNA 水平，黑色柱状图表示 IFITM1 的相对定量，红色折线表示不同细胞系中 JEV-C 基因拷贝的绝对定量。（A）b-end3 细胞、（B）Vero 细胞、（C）UV 灭活 JEV 感染 hBMEC；（D）WB 检测 UV 灭活 JEV 感染 hBMEC 后 IFITM1 的表达情况。

RT-qPCR was used to determine the mRNA levels of IFITM1 and JEV-C genes after JEV infection, and the black bars indicate the relative quantification of IFITM1, while the red lines represent the absolute quantification of JEV-C gene copies in different cell lines. (A) b-end3, (B) Vero cells, (C) UV inactivated JEV infection hBMEC; (D) WB was used to detect the expression of IFITM1 in hBMEC infected with UV-inactivated JEV.

4.2 IFITM1 在 hBMEC 中限制 JEV 的复制

IFITM1 为典型的干扰素刺激基因（Interferon-stimulating gene, ISG），主要作为抗病毒因子发挥作用，如在 WNV 和 ZIKV 感染中发挥作用。为了阐明

IFITM1 在 hBMEC 是否抑制可以发挥抑制 JEV 复制的功能，我们利用慢病毒在 hBMEC 中过表达 IFITM1 (IFITM1-OE)，并通过 WB 实验证实 Flag-IFITM1 的过表达情况 (图 4-5A)。随后，我们采用 CRISPR/Cas9 技术成功建立了 IFITM1 基因敲除细胞系 (IFITM1-KO)，由于 hBMEC 本底表达 IFITM1 表达水平较低，因此在使用 IFN- β 处理后对 IFITM1 敲除效率进行了检测 (图 4-5B)。实验结果显示，过表达和敲除效率符合我们的预期。

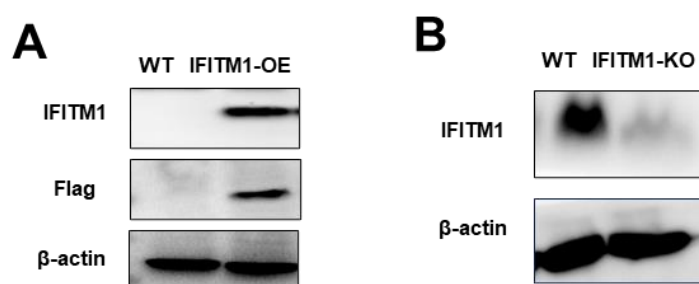


图 4-5 IFITM1 过表达和敲除细胞系鉴定

Fig.4-5 Identification of over expression and knockout cell lines of IFITM1

然后使用 RT-qPCR 检测野生型 hBMEC (WT-HB) 和 IFITM1-OE 细胞中 JEV 的复制动力学。从 JEV 感染后 12 h 开始，WT-HB 细胞比 IFITM1-OE 细胞表现出更高的病毒 mRNA 拷贝数 (图 4-6A)。此外，与 WT-HB 细胞相比，在 JEV 感染后 24 h 和 48 h，IFITM1-OE 细胞中的 JEV-E 蛋白含量显著降低 (图 4-5B)。与过表达结果一致的是，与 WT-HB 细胞相比，在用 JEV 感染 IFITM1-KO 细胞的 24 h 和 48 h，IFITM1-KO 细胞中的 JEV-C 基因拷贝数显著增加 (图 4-6C)。同时，WB 结果也显示 IFITM1-KO 细胞中的 JEV-E 蛋白含量高于对照组 (图 4-6D)。在 hBMEC 中感染 JEV 24 h 后，对 JEV-E 蛋白和 IFITM1 进行抗体标记，IFA 结果显示在 IFITM1 高表达的区域中 JEV-E 蛋白表达较少 (图 4-6E)。以上结果提示 IFITM 可以有效限制 JEV 在 hBMEC 中复制。

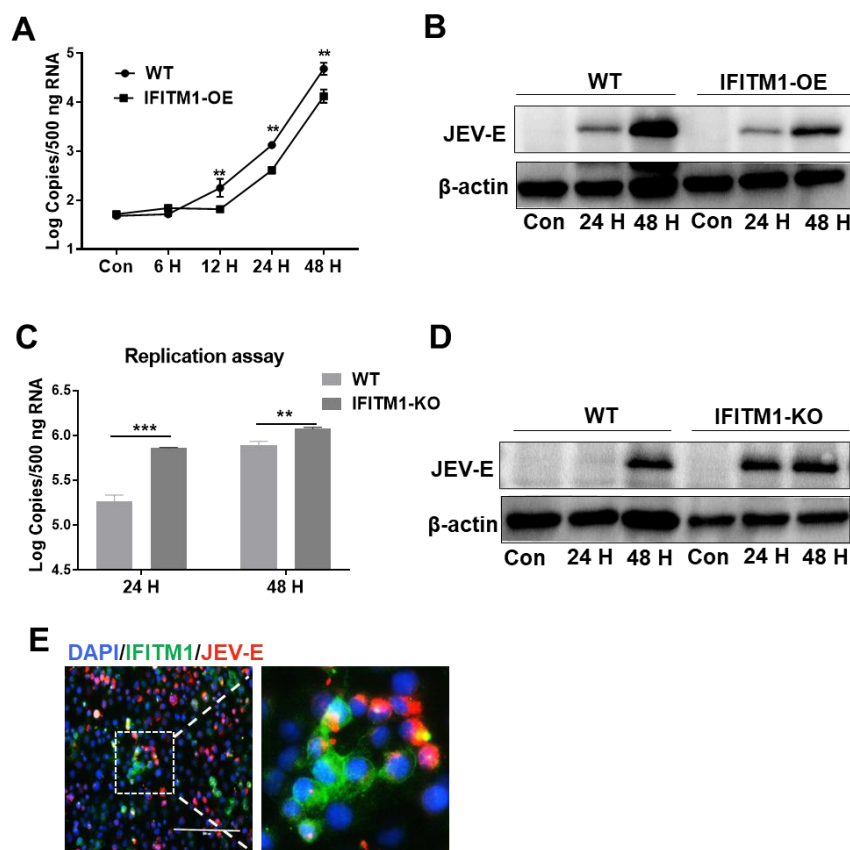


图 4-6 IFITM1 在 hBMEC 中限制 JEV 的复制

Fig. 4-6 IFITM1 restricts JEV replication in hBMEC

(A) 使用 JEV 以 MOI=0.01 感染 IFITM1-OE 和 WT-HB，以绝对定量方法测定 JEV 的生长动力学；(B) WB 检测不同时间点 WT-HB 和 IFITM1-OE 细胞中 JEV-E 蛋白的表；(C) RT-qPCR 检测 JEV 感染 24 和 48 h 后 WT-HB 和 IFITM1-KO 细胞中 JEV-C 基因；(D) WB 检测 WT-HB 和 IFITM1-KO 细胞在 JEV 感染 24 和 48 h 后的 JEV-E 蛋白表达。(E) IF 显示 JEV 感染 hBMEC 24 h 后 E 蛋白（红色）和 IFITM1（绿色）的分布情况。比例尺，100 μm 。

(A) JEV growth kinetics were measured by absolute quantification of JEV-C gene in IFITM1-OE and WT-HB cells infected with JEV at MOI of 0.01; (B) Expression of JEV-E protein was determined by WB WT-HB and HB -OE cells at different time points of JEV infection; (C) RT-qPCR detection of JEV-C gene in WT-HB and IFITM1-KO cells at 24 and 48 hours post infection of JEV; (D) Expression of JEV-E protein was determined by WB both WT-HB and IFITM1-KO cells at 24 and 48 hours post infection of JEV; (E) IF shows the distribution of E protein(red) and IFITM1(green) after 48 h of JEV infection in hBMEC. Scale bar, 100 μm .

4.3 IFITM1 维持血脑屏障的完整性

IFITM1 是一种高度保守的多功能膜蛋白，除了抗病毒功能外，IFITM1 还参与其他生物过程，如生殖细胞增殖、内皮管腔形成和免疫反应调节等(Huang et al 2011, Yáñez et al 2020)。考虑到 hBMEC 在维持 BBB 稳定性方面的重要性(Eigenmann et al 2016)，接下来，我们探究了 IFITM1 对 BBB 稳定性的影响。为了评估 IFITM1 对屏障功能的影响，我们分别使用 WT-HB、IFITM1-OE 和 IFITM1-KO 细胞系建立了体外 BBB 模型（图 4-7A）。首先通过 CCK8 实验确定，IFITM1 的过表达或基因敲除不影响 hBMEC 的增殖（图 4-7B）。然后通过测量体外 BBB 模型的跨 TEER 和对相对分子量为 10 kDa 和 70 kDa 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖（FITC-dextran）的渗透性来评估 BBB 的完整性。结果显示，过表达 IFITM1 在静息状态下增加了单层 BBB 的 TEER 值，但对 FITC-dextran（10 kDa 和 70 kDa）渗透性没有影响（图 4-7C，D）。

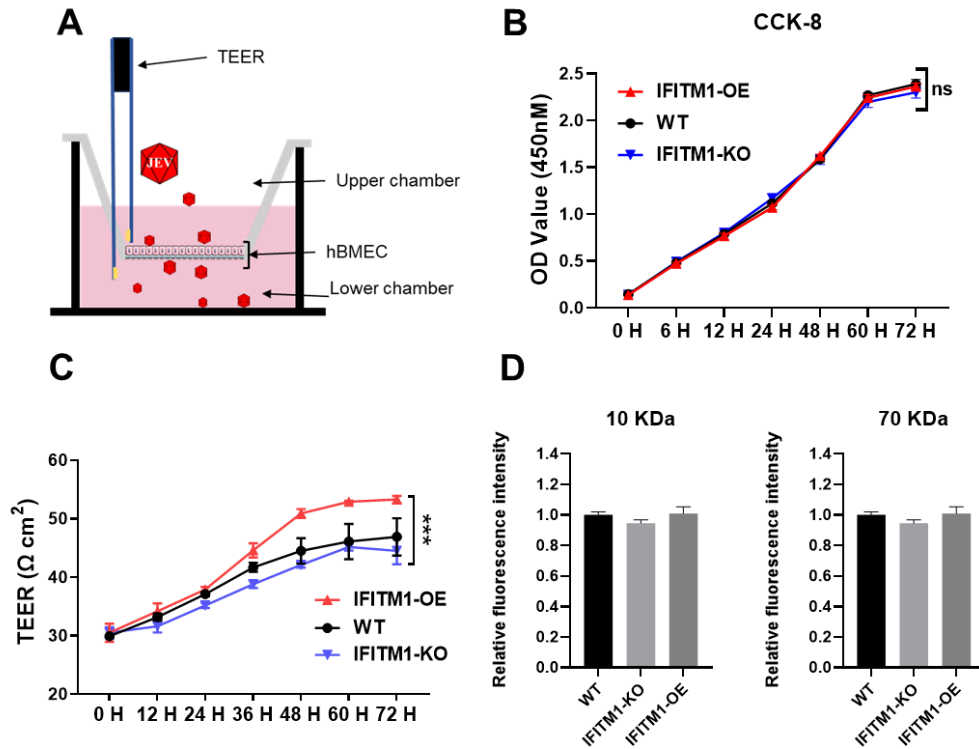


图 4-7 IFITM1 增强 BBB 稳定性

Fig. 4-7 IFITM1 enhances BBB stability

(A) 体外血脑屏障模型示意图; (B) CCK-8 法检测 WT-HB、IFITM1-OE 和 IFITM1-KO 细胞系细胞增殖情况; (C) 在 WT-HB、IFITM1-KO 和 IFITM1-OE 细胞系的单层形成过程中测定 TEER; (D) 细胞接种在 BBB 模型上室中 72 h 后, 10 kDa 和 70 kDa 的 FITC-dextran 穿过 BBB 的百分比, 以 WT-HB 组归一化。

(A) Schematic diagram of the invitro BBB model; (B) Cell proliferation was detected with CCK-8 assays in WT-HB, IFITM1-OE and IFITM1-KO cell lines; (C) TEER was determined during the formation of monolayer in WT-HB, IFITM1-KO and IFITM1-OE cell lines; (D) Graphs showing the percentage of 10 KD and 70 KD FITC-dextran that crosses the BBB after 72 h of cell seeded into the upper chambers, normalized to WT-HB.

接下来, 我们检测了在 JEV 感染后不同时间点, 不同细胞系构建的 BBB 模型中 TEER 值的差异, 结果显示与 WT-HB 组和 IFITM1-OE 组相比 IFITM1-KO 组的 TEER 值显著降低, 而 IFITM1-OE 组和 WT-HB 组在 96 h 和 120 h 的 TEER 值未显示出显著差异 (图 4-8A)。同时, 病毒空斑试验表明敲除 IFITM1 后 BBB 模型中下室内感染性病毒颗粒显著增多 (图 4-8B)。接下来, 我们使用 FITC-

dextran 来测试 BBB 模型的渗透性。与 WT-HB 组和 IFITM1-OE 组相比，敲除 IFITM1 后 10 kDa 和 70 kDa FITC-dextran 渗漏至下室的比例显著增加，但 WT-HB 组和 IFITM1-OE 组未表现出明显差异（图 4-8C, D）。这些结果表明，在 hBMEC 中敲除 IFITM1 的基因导致 BBB 渗漏增加和 JEV 病毒穿透增加。

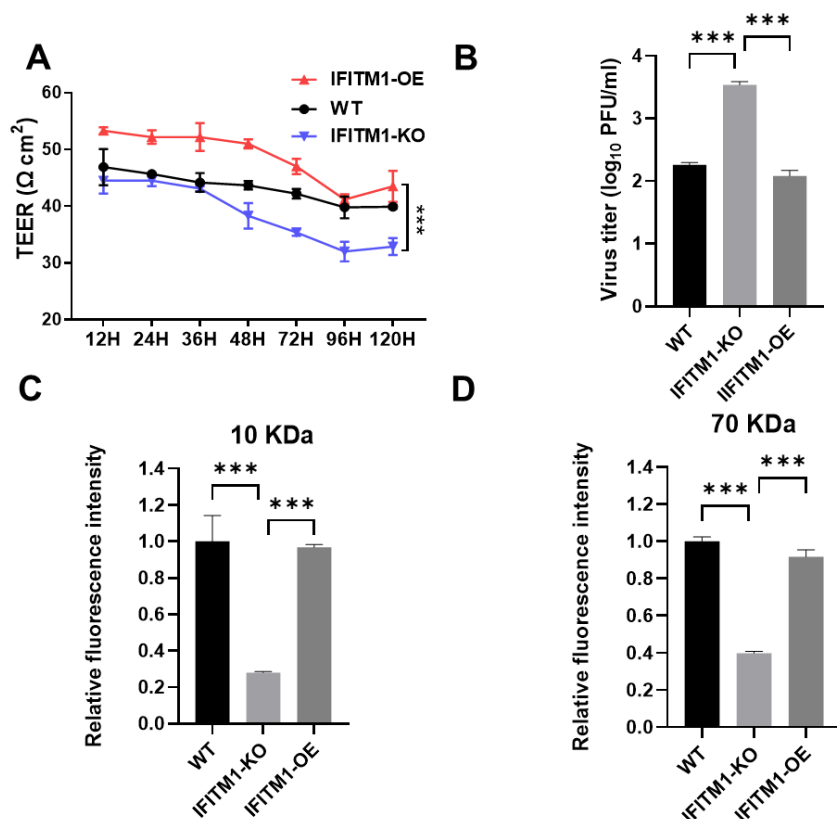


图 4-8 敲除 IFITM1 破坏 BBB 完整性

Fig. 4-8 Knockout of IFITM1 disrupts BBB integrity

(A) JEV 感染后，WT-HB、IFITM1-KO 和 IFITM1-OE 细胞系形成的单层 BBB 模型的 TEER 变化；(B) 病毒噬斑法检测 BBB 下室的病毒滴度；(C) 和 (D) JEV 感染后，10 kDa 和 70 kDa 的 FITC-dextran 穿过 BBB 的百分比，以 WT-HB 组归一化。

(A) TEER changes of BBB monolayer model formed by JEV infection in WT-HB, IFITM1-KO and IFITM1-OE cell lines; (B) Virus titer in the lower BBB chamber was detected by virus plaque assay; (C) and (D) Percentage of 10 kDa and 70 kDa FITC-dextran crossing the BBB after JEV infection, normalized to the WT-HB group.

4.3.2 IFITM1 直接与 occludin 相互作用

为了验证 IFITM1 与紧密连接蛋白（Tight junction protein, TJP）之间是否存在物理的直接相互作用，我们在 293T 细胞中过表达 Flag-IFITM1 蛋白，进行免疫共沉淀（Co-immunoprecipitation, Co-IP）实验，将偶联 Flag 抗体的磁珠与细胞裂解液孵育后，对酸性洗脱液进行 WB 检测。使用 ZO1、Occludin 和 Claudin-5 抗体进行免疫印迹显色，观察到 IFITM1 与 Occludin 以及 ZO-1 之间存在相互作用，而与 Claudin-5 无相互作用（图 4-9A）。IFA 图像显示，在 JEV 感染 hBMEC48 H 后，IFITM1 与 Occludin 有明显的共定位，但与 ZO-1 的共定位程度较低。使用 Fiji 软件沿白色线段获得二维的荧光强度分布图，对 Occludin 或 ZO-1 与 IFITM1 的荧光强度，进行皮尔森共定位系数（Pearson correlation coefficient, Pearson's r ）分析。结果显示 Occludin 与 IFITM1 呈强正相关（ $r = 0.8975$ ），而 ZO-1 与 IFITM1 呈弱负相关（ $r = -0.1939$ ）（图 4-9）。

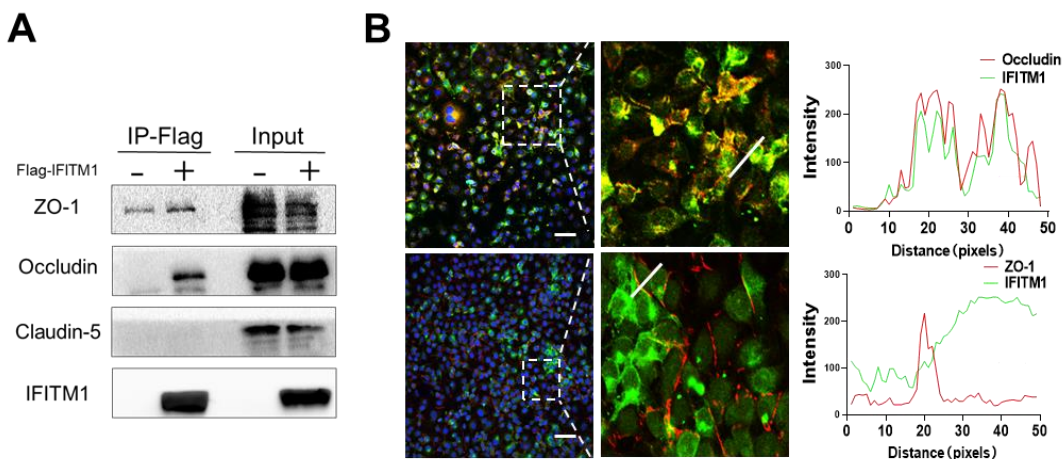


图 4-9 IFITM1 与紧密连接蛋白 Occludin 互作

Fig. 4-9 IFITM1 interacts with the tight junction protein Occludin

(A) Co-IP 检测 IFITM1 与紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin 互作情况；(B) IF 检测 IFITM1 与 Occludin 和 ZO-1 的共定位情况。

(A) Co-IP was used to detect the interaction between IFITM1 and tight junction proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-5; (B) Colocalization of IFITM1 with Occludin and ZO-1 was detected by IF.

此外，在 Poly(I:C) 刺激 hBMEC 后对分别使用抗体对 IFITM1 和 Occludin 进行标记染色，通过 IFA 分析观察到在 Occludin（绿色）蛋白缺失的区域，

IFITM1（红色）高表达（图 4-10）。以上结果表明 IFITM1 可以与 Occludin 相互作用，且在 Occludin 缺失区域高表达参与屏障的维持。

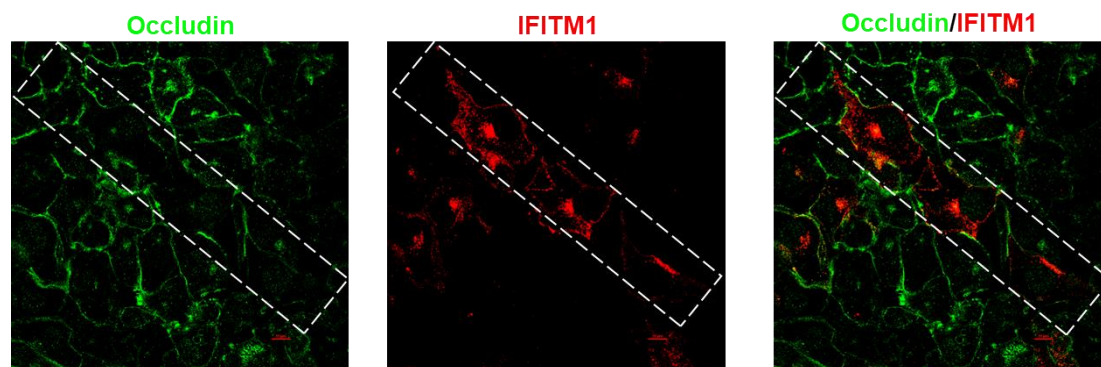


图 4-10 IFITM1 参与紧密连接蛋白形成

Fig. 4-10 IFITM1 participates in tight junction protein formation

4.4 棕榈酰化修饰是 IFITM1 蛋白发挥功能的关键修饰

4.4.1 IFITM1 的棕榈酰化位点突变体构建

作为一种跨膜蛋白，IFITM1 的正确定位是其正常发挥功能的先决条件，IFITM1 的亚细胞定位受到 PTMs 的调控。棕榈酰化和磷酸化修饰都影响 IFITM1 的亚细胞定位 (Chesarino et al 2014b, Ramazi and Zahiri 2021)。根据 CSS-palm 6.0 (<https://csspalm.biocuckoo.org/>) 预测，IFITM1 的棕榈酰化位点位于 51、52 和 84 位的 Cys。基于 GPS6.0 (<https://gps.biocuckoo.cn/>) 预测发现 IFITM1 第 16 位丝氨酸 (Serine, Ser) 存在磷酸化位点。为了探究翻译后修饰对于 IFITM1 功能的影响，我们分别构建了 IFITM1 的 16 位 Ser 突变为谷氨酸磷酸化突变体 (S16E) 和棕榈酰化修饰位点 Cys 突变丙氨酸 (Alanine, Ala) 的突变体 C51-52A (C2A)、C84A 和 C51-52-84A (C3A) (图 4-11A, B)。在 12 孔板中转染相同质量 (1 ng/孔) 的质粒进入 293T 细胞 48 h 后收集蛋白样品进行 WB 检测，通过对蛋白条带灰度分析发现棕榈酰化突变体的 IFITM1 的蛋白质含量低于野生型 (Wild Type, WT) 的 IFITM1 (图 4-11B)。同时，对转染了 WT-IFITM1 和突变体质粒的 293T 细胞进行间接免疫荧光标记，IFA 结果显示 WT-IFITM1 和 S16E 突变体的蛋白定位在细胞膜周围，磷酸化位点的突变不影响 IFITM1 的亚细胞定位，而棕榈酰基化位点 (C2A 和 C3A) 的突变导致 IFITM1 聚集在细胞核周围，不能正确定位到细胞膜上 (图 4-11C)。

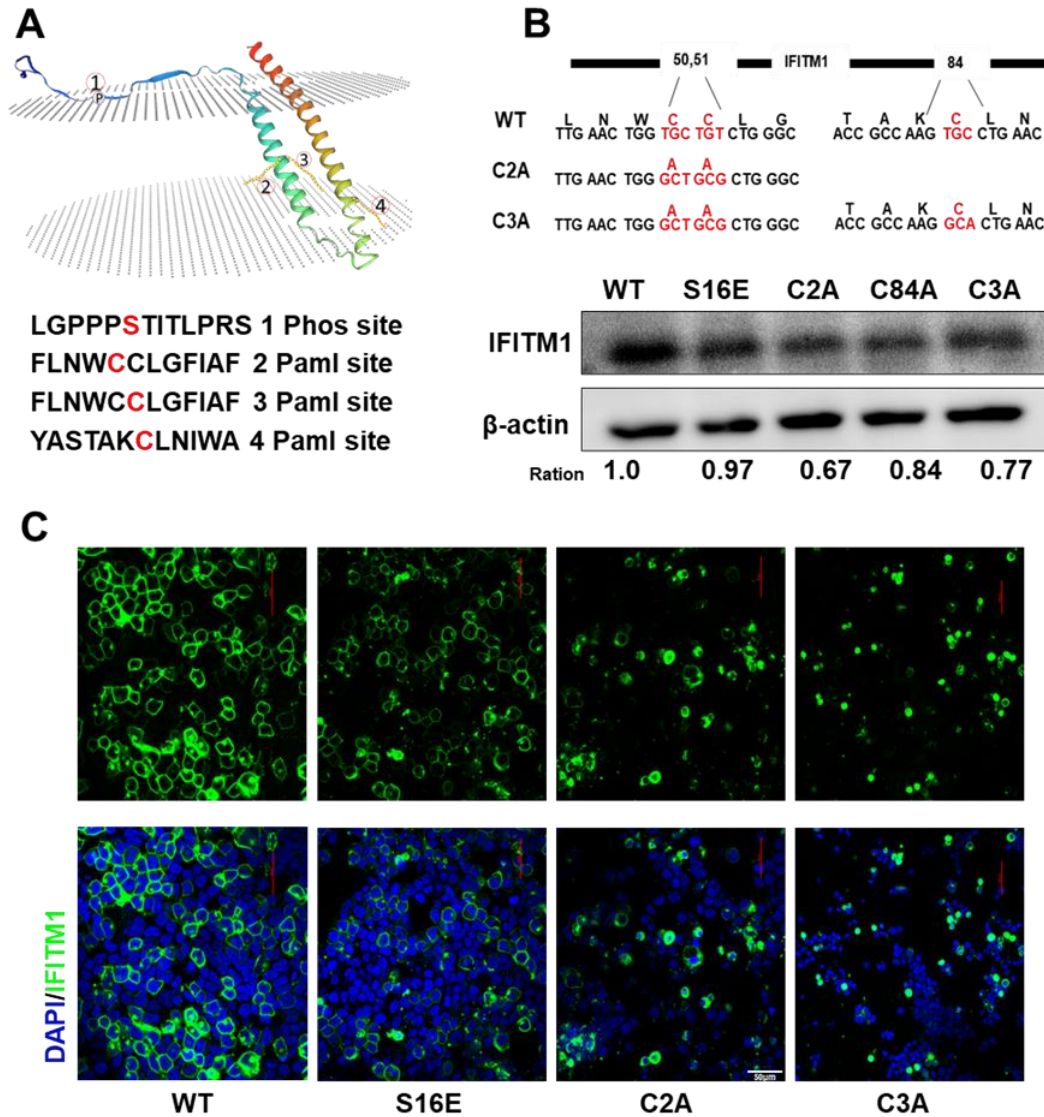


图 4-11 IFITM1 的棕榈酰化位点影响其亚细胞定位

Fig. 4-11 Palmitoylation sites of IFITM1 influence its subcellular localization

(A) IFITM1 磷酸化和棕榈酰化修饰位点示意图；(B) 磷酸化和棕榈酰化位点突变载体的构建；(C) 不同 IFITM1 构建体转染 293T 细胞 24 h 后，用共聚焦成像评估 IFITM1 及其突变体的亚细胞定位。

(A) Schematic representation of the phosphorylation and palmitoylation modification sites of IFITM1; (B) Construction of vectors with mutated phosphorylation and palmitoylation sites; (C) The subcellular localization of IFITM1 and mutants was assessed with confocal imaging after 24 h of transfection with different IFITM1 constructs to 293T cells.

随后，为了确定预测位点是否存在棕榈酰化修饰，我们转染含有棕榈酰化位点突变的 IFITM1 质粒进入 293T 细胞，48 h 后收集蛋白裂解液，采用 APE 方法检查了不同位点突变对 IFITM1 棕榈酰化修饰状态的影响。WB 结果显示，WT-IFITM1 显示出 3 条质量漂移带，C2A 显示 1 条，C84A 显示 2 条，而 C3A 没有显示任何质量漂移带（图 4-12）。以上结果表明，IFITM1 具有三个棕榈酰化（C51、52、84）修饰位点，且棕榈酰化修饰影响其亚细胞定位。

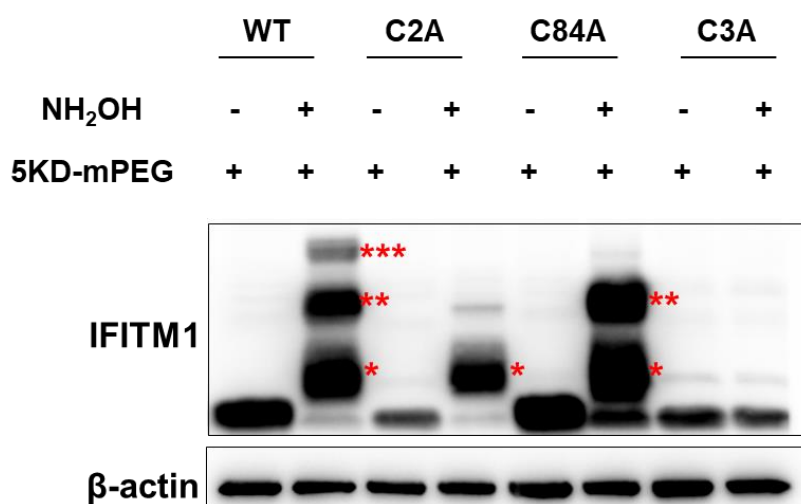


图 4-12 酰基-聚乙二醇交换质量漂移实验检测 IFITM1 的棕榈酰化修饰

Fig. 4-12 Palmitoylation of IFITM1 was detected by acyl-peg exchange

Mass drift test

4.4.2 棕榈酰化修饰位点突变损害 IFITM1 的正常功能

以上结果表明 IFITM1 的棕榈酰化位点突变会导致 IFITM1 不能正确定位于细胞膜上，而 IFITM1 发挥生物学功能依赖于其正确定位。因此接下来我们检测了在不同棕榈酰化位点突变体与 WT-IFITM1 之间抗病毒功能的差异，首先将不同修饰位点突变体质粒转染进入 293T 细胞，24 h 后使用 JEV 以 MOI=1 感染 293T 细胞，感染 24 h 收集 RNA 样品，最后使用 RT-qPCR 检测 JEV-C 基因的复制，结果显示与转染了空载体的对照相比，JEV 在转染了 WT-IFITM1 的 293T 细胞中的复制受到显著抑制，而与其他转染不同修饰的突变体的细胞没有显著差异（图 4-13A）。前期结果，我们实验已经证明 IFITM1 可以直接与 Occludin 互作，为了阐明 IFITM1 的棕榈酰化修饰对其与 Occludin 相互作用的影响，我们用

WT-IFITM1 以及棕榈酰化位点突变体 C2A 或 C3A 质粒转染进入 293T 细胞。最后通过 Co-IP 实验检测 IFITM1 与 Occludin 的互作差异。WB 结果显示，与 WT-IFITM1 相比，C2A 和 C3A 与 Occludin 蛋白的相互作用都显著降低（图 4-13B）。

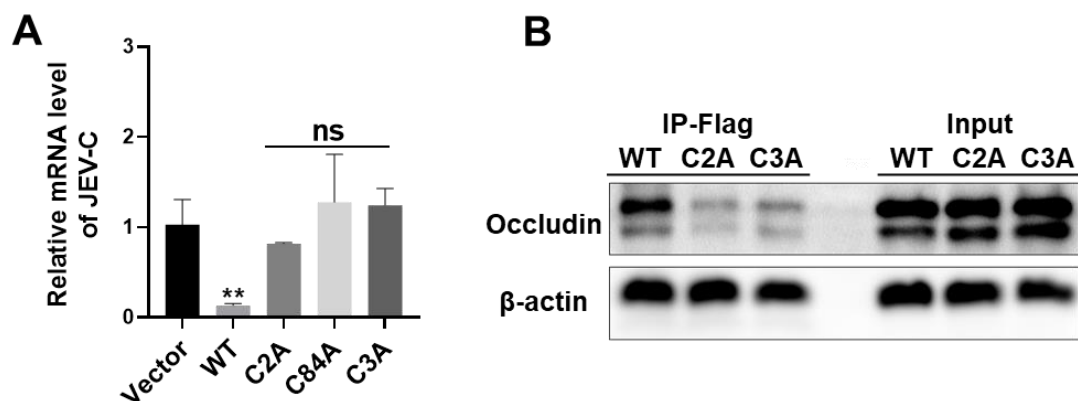


图 4-13 IFITM1 的棕榈酰化位点影响其生物学功能

Fig. 4-13 The palmitoylation site of IFITM1 affects its biological function

(A) RT-qPCR 检测转染 IFITM1 突变体后，JEV-C 基因的拷贝数；(B) Co-IP 测定

Occludin 与 WT-IFITM1、IFITM1 (C2A) 和 IFITM1 (C3A) 的相互作用。

(A) RT-qPCR to detect the copy number of the JEV-C gene after transfection of different IFITM1 mutants; (B) Co-immunoprecipitation (Co-IP) to determine the interaction of Occludin with WT-IFITM1, IFITM1(C2A) and IFITM1(C3A).

随后的 IFA 显示，棕榈酰化位点突变的 IFITM1 聚集在核周侧的细胞质中，呈点状分布，只有一小部分蛋白与 Occludin 在细胞膜上共定位。相比之下，WT-IFITM1 蛋白与 Occludin 在细胞膜上共定位良好（图 4-14A）。皮尔森共定位系数（Pearson correlation coefficient, Pearson's r ）分析显示 Occludin 与 WT-IFITM1 之间共定位程度呈强正相关（ $r = 0.8807$ ）。相反，C2A 和 C3A 与 IFITM1 之间共定位程度呈强呈弱负相关（ $r = -0.2533$, -0.4664 ）（图 4-14A）。通过随机选择同时表达 IFITM1 和 Occludin 的细胞，测定整个细胞中 Occludin 与 IFITM1 的 Pearson's r ，与 WT-IFITM1 组（ $r = 0.575 \pm 0.013$ ）相比，C2A 组（ $r = 0.044 \pm 0.165$ ）和 C3A 组（ $r = 0.148 \pm 0.021$ ）的 Pearson's r 显著下降且具有统计学意义（图 4-14B）。这一发现表明棕榈酰化在 IFITM1 向 Occludin 的定位中起着至关重要的作用。综合以上研究结果，我们可以得出结论：棕榈酰化修饰对于 IFITM1 发挥抗病毒作用以及维护 BBB 稳定性具有重要作用。

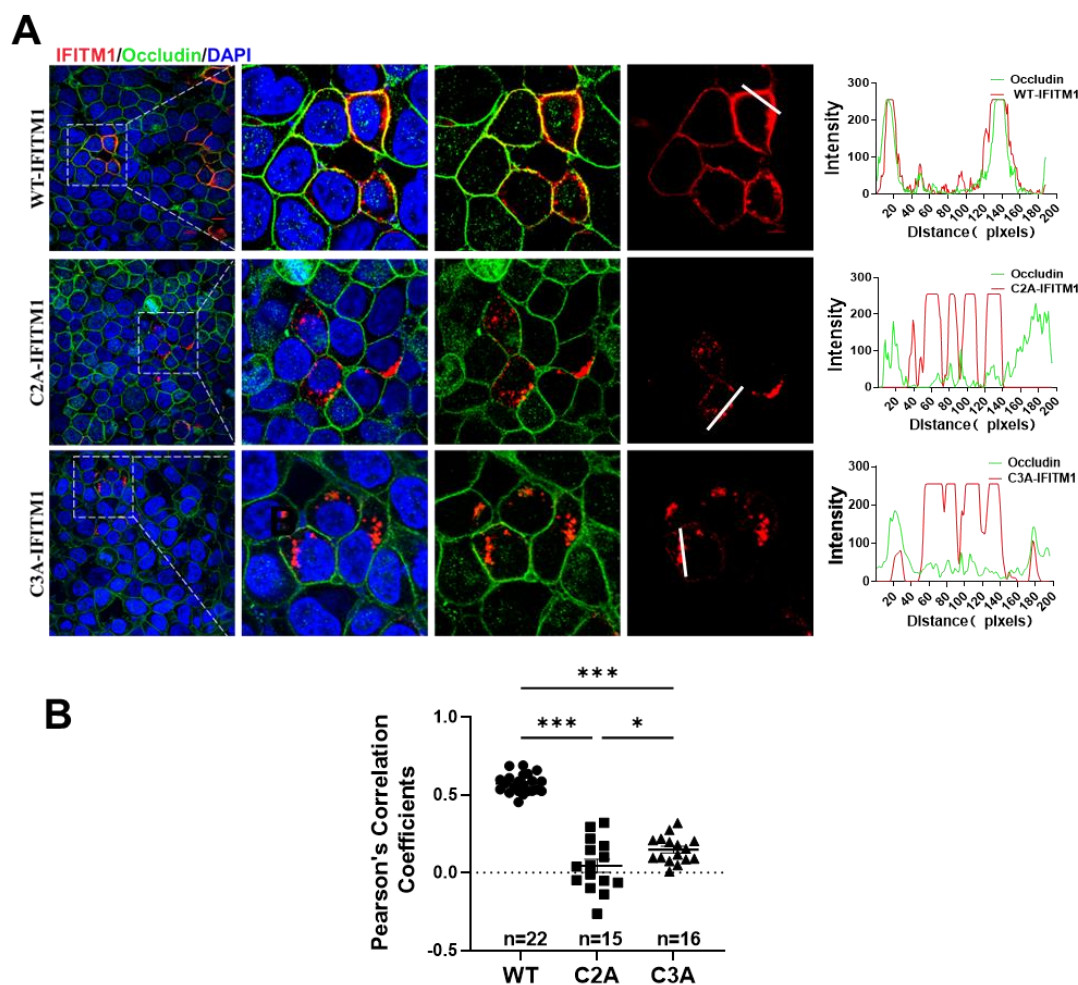


图 4-14 榈酰化位点修饰影响 IFITM1 与 Occludin 共定位

Fig. 4-14 The palmitoylation site of IFITM1 affects its biological function

(A) IF 显示 Occludin 与 Flag-IFITM1 及其突变体共定位情况，细胞核（蓝色）、IFITM1（红色）和 Occludin（绿色）；(B)、(C) 和 (D) 用 FiJi 软件计算 IFITM1（红色）和 Occludin（绿色）沿白线分布的荧光强度；(E) Pearson's r 表示完整细胞中 WT ($n = 22$)、C2A ($n = 15$)、C3A ($n = 16$)，IFITM1 和 Occludin 共定位程度。

(A) IF shows the co-localization of Occludin with Flag-IFITM1 and its mutants, nuclei(blue), IFITM1(red) and Occludin(green); (B), (C), and (D) The fluorescence intensities of IFITM1(red) and Occludin(green) distributed along the white line were calculated using FiJi software; (E) Pearson's r represents the degree of IFITM1 and Occludin colocalization in WT($n = 22$), C2A($n = 15$), and C3A($n = 16$) in intact cells.

4.5 JEV 在感染早期抑制 IFITM1 的表达

前期结果已知, IFN- β 是可以诱导 IFITM1 上调表达, 但通常情况 JEV 感染细胞的早期不能诱导在 IFN- β 的产生(Zhang et al 2023), 我们的结果也表明 JEV 感染 hBMEC 24 h 后 IFN- β 的基因才出现上调表达(Bian et al 2020)。因此我们接下来探究在感染早期在缺乏 IFN- β 的情况下 JEV 对 IFITM1 的调控作用。大多数肿瘤细胞系内源性表达 IFITM1, 如 U251 和 A549(Yu et al 2015, Liang et al 2020)。因此首先我们使用 JEV 以 MOI=1 感染 A549 和 U251 细胞, 通过 WB 检测在 12 H 时发现 IFITM1 蛋白丰度下降(图 4-15A)。同时, 在缺乏 I 型干扰素受体的 Vero 细胞中用慢病毒过表达 IFITM1, 观察到 JEV 感染后 Flag-IFITM1 蛋白呈时间依赖性逐渐减少(图 4-15B)。此外, 在 MOI=1 和 MOI=10 时感染 IFITM1-OE 细胞, 均可以导致在 12 h 时 Flag-IFITM1 蛋白含量下降(图 4-15C)。在 JEV 感染后, IF 检测到大量的 IFITM1, 但仍有相当一部分 IFITM1 定位在细胞质中, 而不是锚定在细胞膜上。相反, 在 IFN- β 刺激下, 大部分 IFITM1 定位在细胞膜上(图 4-16D)。JEV 在感染早期时间点负调控 IFITM1 的表达。

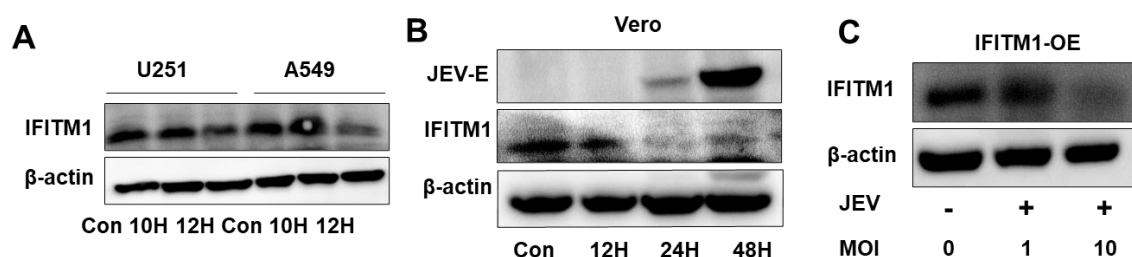


图 4-15 JEV 感染降低 IFITM1 蛋白含量

Fig. 4-15 JEV infection reduces the protein content of IFITM1

WB 检测不同类型细胞中 IFITM1 蛋白含量的变化。实验设置如下: (A) 使用 JEV 以 MOI=1 感染 A549 和 U251 细胞; (B) 用 MOI=1 的 JEV 感染过表达人 IFITM1 的 Vero 细胞; (C) JEV 感染 IFITM1-OE 细胞的 MOI 分别为 1 和 10。

WB detects the changes in IFITM1 protein levels in different types of cells. The experimental settings are as follows: (A) JEV infects A549 and U251 cells at an MOI of 1; (B) JEV infects Vero cells overexpressing IFITM1 with an MOI of 1; (C) JEV infects IFITM1-OE cells at MOIs of 1 or 10, respectively.

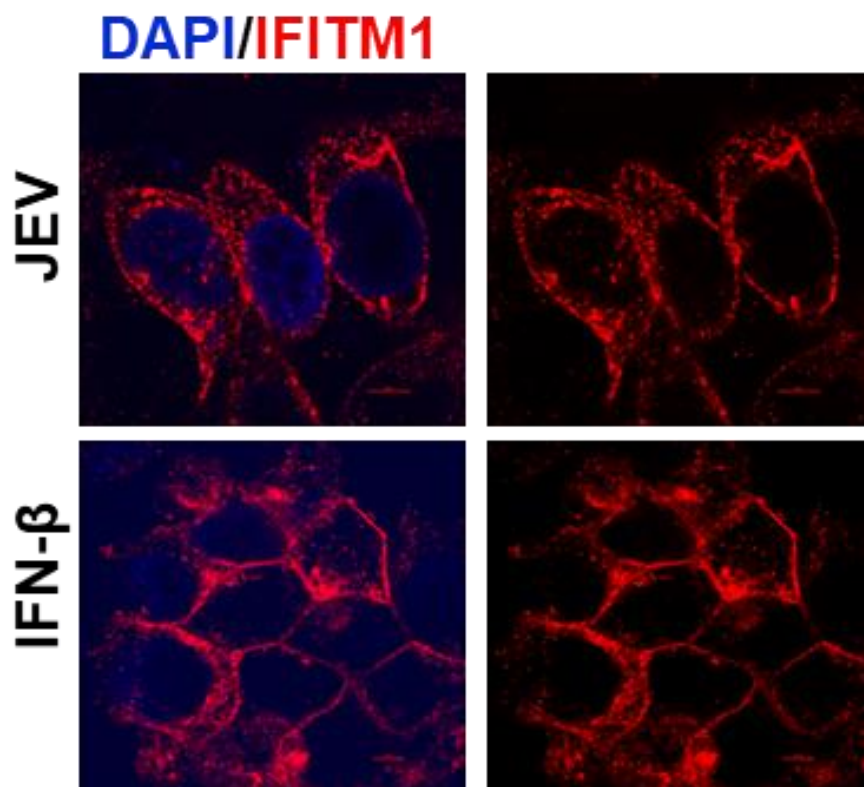


图 4-16 JEV 感染或 IFN- β 处理后 hBEMC 中 IFITM1 蛋白的分布。比例尺，50 μ m

Fig. 4-16 The images show the distribution of IFITM1 protein in HBEMC after JEV infection or IFN- β treatment. Scalebar, 50 μ m

IFITMs 的棕榈酰化主发生在 CD225 结构域三个半胱氨酸上，所有的棕榈酰化修饰均受棕榈酰化转移酶 DHHC 家族调控(Korycka et al 2012)。氨基酸序列分析表明，CD225 区域在 IFITMs 中高度保守（图 4-15A）。使用 AlphaFold 预测 IFITM1 和 IFITM3 中 CD225 的三维结构。在 SWISS-MODEL Workspace 模型中进行比较，所有三个棕榈酰化位点的 Cys 的空间位置一致性 >0.97 （图 4-17B）。因此，我们在 JEV 感染后用 RT-qPCR 检测了 12 个 DHHCs，这些 DHHCs 鉴定为能增强 IFITM3 的棕榈酰化。JEV 感染后，DHHC1、23 和 24 的表达明显降低（图 4-157）。此外，去棕榈酰化酶 ABHD16A 表达上调（图 4-17C）。综上所述，JEV 感染负调控 IFITM1 棕榈酰化过程，调节其在细胞内的定位和功能。

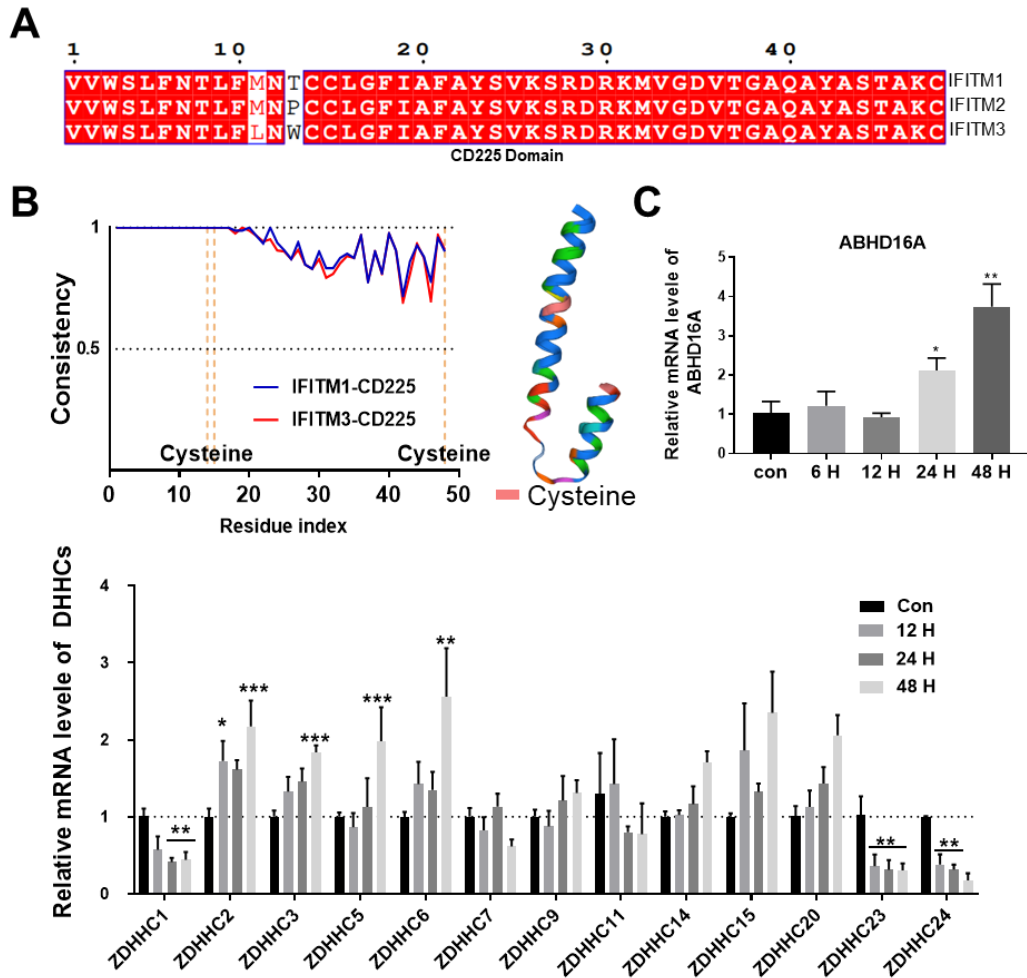


图 4-17 JEV 感染改变 IFITM1 棕榈酰化相关基因的表达

Fig. 4-17 JEV infection alters the expression of genes related to IFITM1 palmitoylation

(A) CD225 区域氨基酸序列一致性分析; (B) IFITM1 与 IFITM3 之间 CD225 的 3D 结构域集合的一致性分析。半胱氨酸代表棕榈酰化位点; (C) RT-qPCR 检测 JEV 感染后 ABHD16A mRNA 表达情况; (D) 利用 RT-qPCR 检测 JEV 感染后 hBMEC 中 DHHCs 变化情况。

(A) Analyzing the consistency of the amino acid sequence in the CD225 region; (B) Consistency analysis of the assembly of the 3D structural domain of CD225 between IFITM1 and IFITM3; Cysteine represents palmitoylation sites; (C) RT-qPCR detects the expression of ABHD16A mRNA after JEV infection; (D) RT-qPCR to detect the changes in DHHCs in hBMEC after JEV infection.

4.6 讨论

JE 是一种主要通过库蚊传播的病毒性人畜共患病，JEV 对 CNS 具有嗜性，会导致严重的炎症性脑病，可能引起脑部损伤和神经系统问题。目前尚无有效的治疗方案。hBMEC 是 BBB 的主要组成和功能细胞，在外周和 CNS 之间发挥着直接屏障作用，可以有效阻止嗜神经病毒进入 CNS (Benmimoun et al 2020)。IFITM1 属于 ISG 家族的成员之一，对许多种病毒的感染具有抑制作用，包括流感病毒、DENV 和非洲猪瘟病毒等(Muñoz-Moreno et al 2016)。但是在 JEV 通过感染 hBMEC 直接进入 CNS 的过程中，IFITM1 是否发挥作用研究仍未得到阐明。本研究发现在 JEV 感染 hBMEC 后产激活了 IFN- β 1 和 IFN- λ 2/3/4 的表达，其中只有 IFN- β 可以显著刺激 IFITM1 的上调表达，通过在 hBMEC 中过表达和敲低 IFITM1 证实了 IFITM1 在 hBMEC 中具有抑制 JEV 复制的能力（结果 4.2）。同时发现 IFITM1 可以与 TJ 蛋白 Occludin 相互作用，增强由 hBMEC 组成的 BBB 的稳定性（结果 4.2）。但是这些功能受 IFITM1 的棕榈酰化修饰的调控，通过 APE 实验鉴定了 IFITM1 具有 C51、C52 和 C84 三个棕榈酰化修饰位点，若缺失棕榈酰化修饰，将导致其无法准确地定位在细胞膜上，及蛋白质稳定性降低，损害了它的抗病毒和稳定 BBB 的功能。JEV 感染 IFN 信号缺陷的 Vero 细胞，随着感染时间的延长发现 IFITM1 的蛋白含量逐渐降低。此外，在 JEV 感染 24 h 之前 IFN 信号没有被激活的条件下(Zhang et al 2023)，用 JEV 感染内源性高表达 IFITM1 癌细胞系 U251 和 A549 (Wang et al 2019a, Gobillot et al 2020)，也发现 IFITM1 的表达量也显著降低。在 IFN 信号缺失情况下，JEV 感染负调控了 IFITM1 蛋白的含量。棕榈酰化是通过将棕榈酸共价结合到蛋白质上来改变其属性。这种修饰可以影响蛋白质的定位和稳定性(Kong et al 2023)。JEV 感染降低了 IFITM1 的棕榈酰化修饰酶 DHHC1/23/24 的表达量，同时激活了去棕榈酰化酶 ADBH16A 的上调表达。抑制 IFITM1 的棕榈酰化修饰，改变其亚细胞定位使其更容易被降解，从而影响其功能。这些结果进一步提示了 JEV 可以通过负调控抗病毒蛋白的翻译后修饰进行免疫逃逸，有助于深入了解 JEV 感染过程中对宿主免疫应答的影响机制。

4.6.1 棕榈酰化 IFITM1 抑制 JEV 复制

先天免疫系统是宿主细胞防御的第一道防线，负责识别和消除威胁。IFN 信号是免疫调节的核心，其中 IFITMs 可以限制多种包膜病毒病原体如，甲型流感病毒、黄病毒、横纹肌病毒、布尼亚病毒和人类免疫缺陷病毒等(Meischel et al 2021) (Wilkins et al 2013)。鉴于 IFITM1 是 JEV 感染后 hBMEC 中表达上调最显著的 IFITMs，我们基于 hBMEC 构建了敲除和过表达 IFITM1 的稳定细胞系。敲除 IFITM1 增强了 JEV 的复制，过表达 IFITM1 可以抑制 JEV 在 hBMEC 中复制，同时减少了病毒颗粒从 hBMEC 基底侧向外释放（结果 4.4.2）。

作为一种跨膜蛋白，IFITM1 的细胞膜定位是其发挥抗病毒能的先决条件，报道称，IFITM1 在病毒感染早期通过调节膜的刚度和曲率，以防止病毒膜和细胞膜的融合(Li et al 2013)。也可以在病毒感染的晚期抑制病毒 mRNA 的合成。但有报道称，人爱知病毒（Aichi virus, AiV）毒感染细胞后，AiV 感染可以劫持细胞膜上的 IFITM1 参与胆固醇转运到高尔基衍生病毒 RNA 复制位点。此外过表达 AiV 生的病毒蛋白（非结构膜相关蛋白 2B、2BC、2C、3A 和 3AB），也会导致 IFITM1 定位到高尔基体上(Ishikawa-Sasaki et al 2023)。在 Vero 细胞、A549 细胞或 HTX 细胞中也发现 IFITM1 不在细胞膜上定位(Amini-Bavil-Olyae et al 2013, Weston et al 2014)。IFITM1 不能在细胞膜定位的机制尚不明晰，拓扑结构和翻译后修饰的改变都可能影响其亚细胞定位(Spence et al 2019)。有报道称，棕榈酰化修饰和磷酸化修饰都影响 IFITMs 的亚细胞定位(Das and Hang 2023)。棕榈酰化可以通过在蛋白质中加入 PA 基团增加了它们的疏水性，可以促进膜结合，从而使蛋白质折叠更稳定，从而可以防止蛋白质降解并延长其半衰期。在我们的结果中发现棕榈酰化位点突变改变了 IFITM1 的膜定位，并使 IFITM1 滞留在细胞质中，但磷酸化突变（S16E）没有改变（结果 4.4.1）。棕榈酰化位点突变可能影响 IFITM1 蛋白的稳定性。当转染相同质量的质粒时，与野生型和 S16E 突变体相比，棕榈酰化位点突变的 IFITM1 蛋白水平较低（结果 4.4.1）。同时，过表达 IFITM1 棕榈酰化突变体也失去了抗 JEV 感染的功能（结果 4.4.2）。在 SARS-CoV-2 的研究中同样发现，在 293T 细胞中过表达 IFITMs 蛋白可阻止含有 S-刺突蛋白的假病毒和 SARS-CoV-2 进入细胞。然而，在人肺细胞中过表达 IFITMs 表达后，却观察到相反的结果，IFITM 蛋白促进了 SARS-CoV-2 的增

殖，SARS-CoV-2 劫持了具有抗病毒作用的因子，作为自己复制的辅助因子 (Prelli Bozzo et al 2021)。IFITM1 可以在 B 细胞 (BJAB) 和内皮细胞 (HMVEC-d) 也可以促进 KSHV、EBV 和 HSV-2 的复制 (Hussein and Akula 2017)。在这些研究中均出现，病毒感染导致 IFITM1 向胞内迁移的现象，IFITM1 的错误定位可能会使其抗病毒功能转化。造成这种差异的原因目前尚不清楚，可能是由于不同细胞的棕榈酰化修饰水平的差异或在病毒感染情况下改变了 IFITM1 的棕榈酰化修饰状态。这提示我们，病毒感染可能可以在不影响蛋白表达的情况，通过调节抗病毒蛋白的翻译后修饰达到免疫逃逸及促进自身复制的目的。

4.6.2 棕榈酰化 IFITM1 有助于稳定 BBB

IFITM1 是一种高度保守的多功能膜蛋白，赋予细胞对许多病毒的抵抗力。此外 IFITM1 还参与其他生物过程，如生殖细胞规范、内皮管腔形成和免疫反应调节。本实验室前期研究表明，IFN- β 可以发挥稳定 BBB 的作用，但相关的干扰素诱导基因 (IFITs) 处理并不影响 hBMEC 的完整性 (Zhang et al 2023)。此外，IFN- β 被批准用于治疗复发缓解型多发性硬化症 (RRMS)，但其潜在机制尚未完全了解。在我们研究中发现与 WT-HB 相比，IFITM1-OE 形成的单层 BBB 模型具有较高的 TEER 和较低的 FITC-Dextran 通透性。一项关于不同内皮屏障特点的研究表示，与 Huh7.5 细胞和 HUVECs 相比，iBMECs 表达内源性高水平的 IFITM1。与 HUVECs 或 BMEC 形成的 BBB 模型相比，iBMECs 单层 BBB 模型具有更高的 TEER 和更低的渗透率 (Eigenmann et al 2013)。据报道 IFITM1 在肿瘤组织和癌细胞系中，如胆囊癌、食管癌、结直肠癌、胃癌均有高表达，IFITM1 过表达促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移、血管生成和 (Liang et al 2020)。此外，IFITM1 也在原始生殖细胞中表达，在小鼠胚胎发育过程中由中胚层过渡到内胚层是必需的 (Tanaka et al 2005)。这些生物学过程都涉及了新的细胞间连接的形成。在我们的实验中，发现 IFITM1 可以与 TJ 蛋白 Occludin 互作，同时观察到在 Occludin 缺失的区域，IFITM1 的表达量升高。表明 IFITM1 可能与 Occludin 一起组成复合物，增强内皮屏障稳定的稳定性。同样这个过程也受到棕榈酰化修饰的调控，棕榈酰化位突变削弱了与 Occludin 的相互作用，同时不能定位至细胞膜。与前述报道一致的是 IFITM1 调节与 Occludin 和 Claudin-5 在

胞内循环，参与内皮发芽和管腔形成过程 (Wilkins et al 2013)。I 型 IFN 还参与免疫调节作用包括调节抗体产生、抑制淋巴细胞增殖、抑制延迟型超敏反应以及增强 T 细胞和 NK 细胞的细胞毒性等 (Chen et al 2017)。同时 I 型 IFN 信号通路在预防 DENV、WNV 和 ZIKV 等脑部病毒感染中扮演关键保护角色 (Chotiwan et al 2023, van Leur et al 2021)。干扰素虽然具有多重生物学功能，但同时也有许多不可避免的副作用 (Neilley et al 1996, Stübiger et al 2011)。可能是由于 IFN 下游的干扰素刺激基因涉及多个信号通路，因此在治疗时不能避免副作用产生。因此探究单个具有功效的干扰素刺激因子，可以为发挥更为独特单一的干扰素效应提供新的见解。这里我们显示 IFITM1 在 JEV 感染过程中，可以发挥抗病毒感染和稳定 BBB 作用的双重功能，但正确的棕榈酰化修饰是发挥 IFITM1 功能的必要条件。上述研究为理解 JEV 的免疫逃逸机制和理解 I 型干扰素保护 BBB 的机制提供新的思路，同时为抗 JEV 感染治疗提供新的方法。

4.7 小结

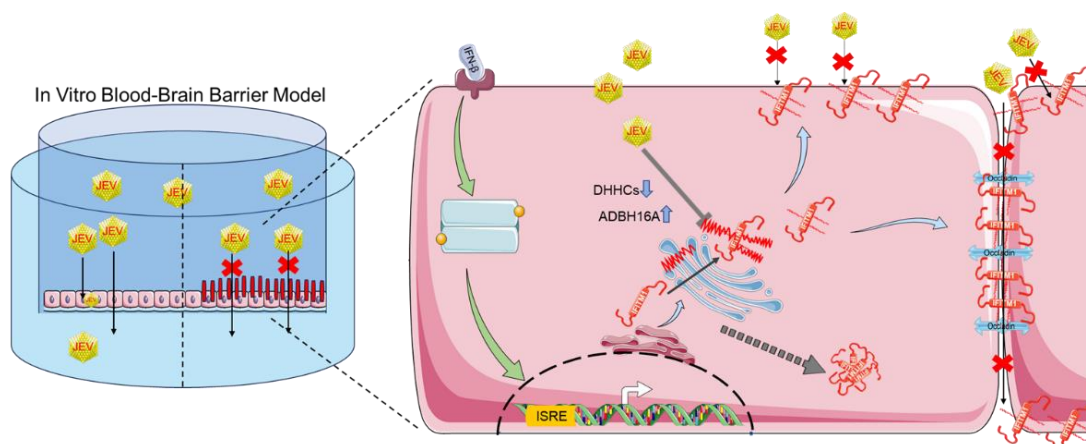


图 4-18 棕榈酰化调节 IFITM1 在抗 JEV 感染和 BBB 稳定中的功能

Fig.4-18 Palmitoylation regulates IFITM1 function in anti-JEV infection and blood-brain barrier stabilization

在这里我们总结了棕榈酰化对 IFITM1 在抗 JEV 感染和维持 BBB 稳定中的功能（图 4-18）。IFN- β 可显著增强 IFITM1 的 mRNA 转录和蛋白翻译。IFITM1 在翻译后需要进行棕榈酰化，促进其定位于细胞膜，从而阻止 JEV 进入细胞，限制病毒复制。此外，棕榈酰化的 IFITM1 与紧密连接蛋白 occludin 相互作用，有助于增强 BBB 稳定性，防止病毒通过 BBB 的细胞旁路进入 CNS。然而，JEV 可以通过干扰 IFITM1 的棕榈酰化来实现免疫逃避。JEV 感染导致与催化 IFITM1 棕榈酰化修饰的 DHHCs 表达下降，去棕榈酰化酶 ADBH16A 表达上调，从而阻止 IFITM1 的棕榈酰化。这一发现强调了棕榈酰化对于 IFITM1 的生物学功能的影响。

第五章 DHHC21 促进 JEV 复制的机制研究

5.1 棕榈酰化修饰调控 JEV 复制

5.1.1 2-BP 抑制 JEV 在 hBMEC 中复制

为了探究棕榈酰化修饰在 JEV 复制的过程中是否发挥作用，待 hBMEC 细胞生长至致密单层后，我们使用不同浓度的 2-BP（0-70 μM ）处理 hBMEC 细胞，24 h 后利用 CellTiter-Lumi 检测细胞内 ATP 的含量，来表征细胞活性的变化，结果显示 2-BP 并不影响细胞活性（图 5-1A）。在 2-BP 处理的同时，使用 JEV 以 MOI=1 感染 hBMEC，24 h 后收集感染样品的 RNA 和蛋白样品进行检测，结果显示随着 2-BP 浓度的增加，JEV-C 基因的拷贝数呈剂量依赖性的下降且具有显著性差异，同时 JEV-E 蛋白的含量在 2-BP 浓度大于 30 μM 时已不能被检测到（图 5-1B, C）。以上结果说明 2-BP 处理 hBMEC 细胞在基因和蛋白水平可以显著抑制 JEV 的复制。

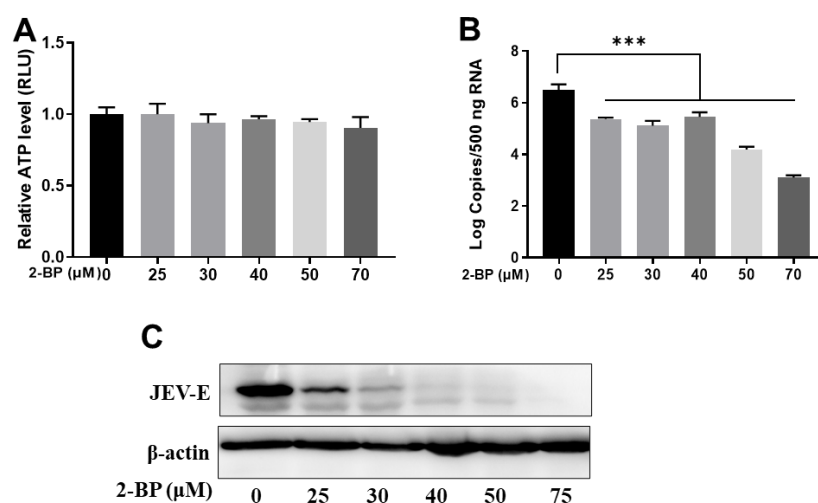


图 5-1 2-BP 抑制 JEV 的复制

Fig.5-1 2-BP inhibits the replication of JEV

使用 2-BP 处理 hBMEC，同时使用 JEV 感染 24 h。（A）检测其胞内 ATP 含量；（B）RT-qPCR 检测 JEV-C 基因的拷贝数；（C）WB 检测 JEV-E 蛋白的含量。

The hBMECs were treated with 2-BP and simultaneously infected with JEV for 24 h. (A) Intracellular ATP levels were measured; (B) RT-qPCR was used to detect the copy number of the JEV-C gene; (C) WB was used to detect the content of the JEV-E protein.

随后，我们通过空斑试验检测了 JEV 感染 hBMEC 24 h 后上清液中的感染性的病毒粒子个数。对比结果显示，相较于未经处理的组别，2-BP 处理组的上清液在孵育 BHK 细胞的过程中，需要将时间延长到 6 h 才能观察到病毒嗜斑（图 5-2 A, B）。在 2-BP 浓度在 25 μM 时，hBMEC 上清液中的病毒毒价约为 $1.2 \times 10^2 \text{ PFU/mL}$ 对照组的毒价约为 $1.38 \times 10^4 \text{ PFU/mL}$ 。与（图 5-1C）中 E 蛋白检测结果一致，2-BP 浓度大于 25 μM 后细胞上清液中不能检测出病毒粒子。

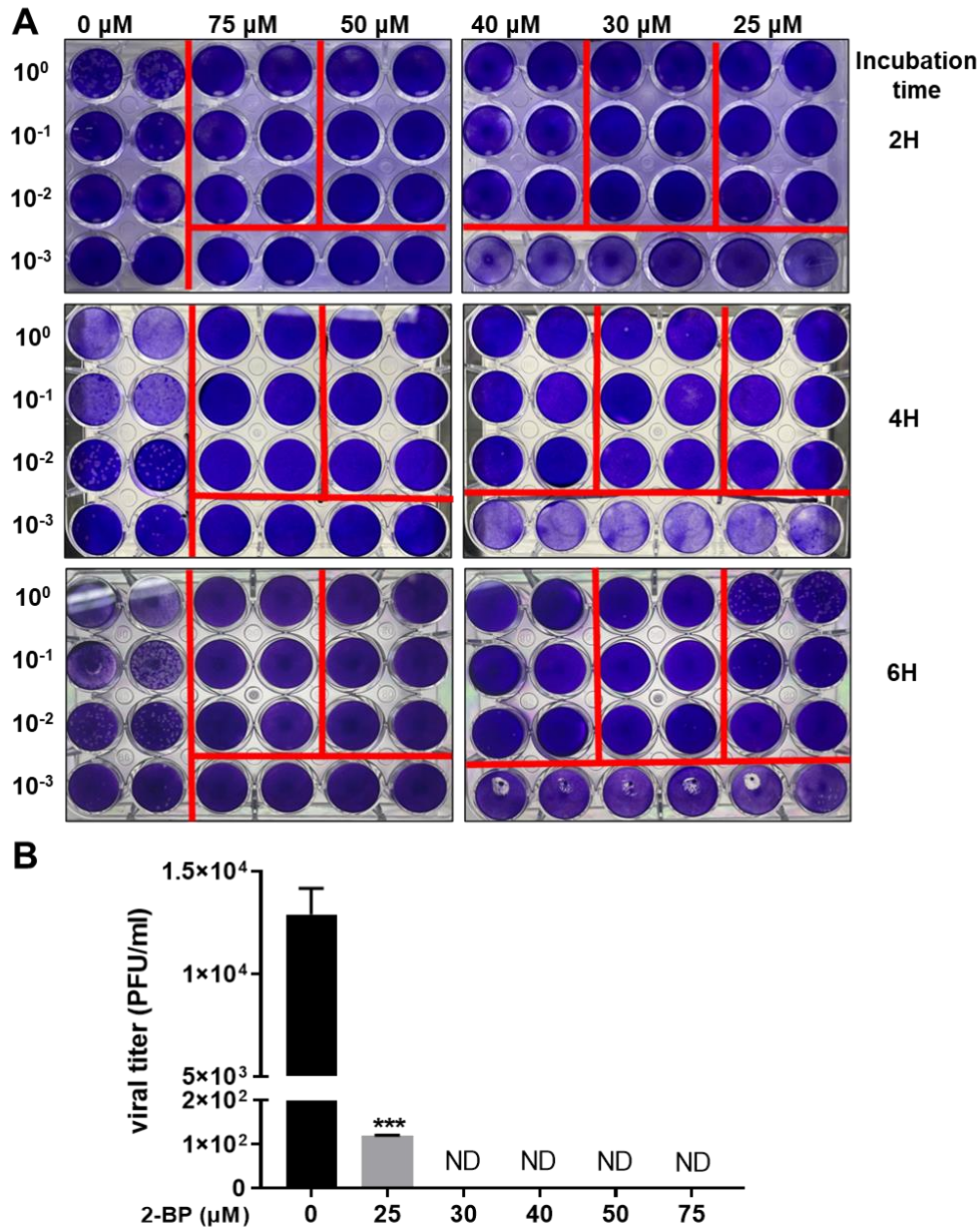


图 5-2 不同浓度 2-BP 处理后，空斑形成法测定 JEV 滴度

Fig.5-2 After treatment with different concentrations of 2-BP, the plaque assay method was used to determine the titer of JEV

5.1.2 2-BP 抑制 JEV 复制具有广谱性

为了进一步明确 2-BP 是否能够广泛地抑制 JEV 的复制，我们选取了三种 JEV 敏感的 BHK、A549 以及 293T 细胞系 (Ye et al 2016, Yu et al 2021, Zhang et al 2021)。在 JEV 感染同时使用不同浓度的 2-BP 处理的 24 h 后，收集 RNA 样本，并进行 JEV-C 基因的检测，我们发现 25 μM 以及 50 μM 的 2-BP 都能在 mRNA 水平显著抑制 JEV 的复制（图 5-3A、B、C）。综合以上结果来看，我们得出结论，2-BP 在一定浓度范围内可以抑制 JEV 的复制，并且抑制作用具有浓度依赖性，同时它的抑制效果是广泛适用的。

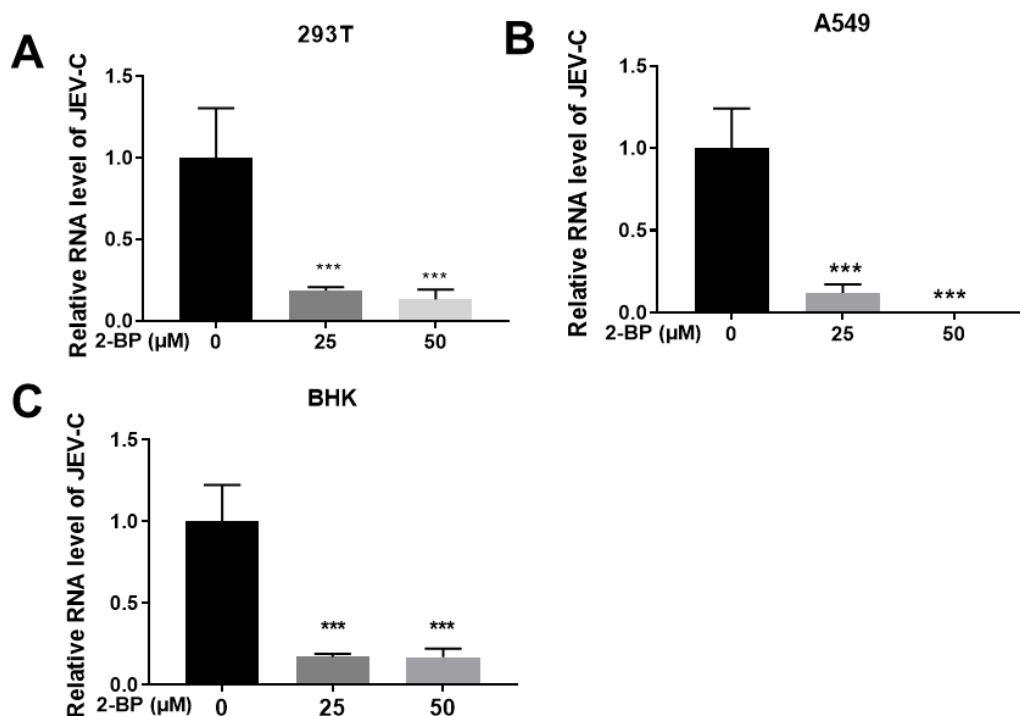


图 5-3 2-BP 抑制 JEV 的复制具有广谱性

Fig. 5-3 Replication inhibition of JEV by 2-BP is broad-spectrum

5.1.3 2-BP 抑制 hBMEC 的炎症反应

JEV 感染引起不可控的炎症反应是导致 CNS 病理损伤和 BBB 破坏的主要原因 (Filgueira and Lannes 2019, Mohapatra et al 2023)。先前的研究已证实在多种因素诱发的细胞炎症中，2-BP 能起到缓解作用 (Kim et al 2019, Xie et al 2021)。因此我们在 hBMEC 细胞中，检测 2-BP 是否具有缓解炎症的作用，首先使用佛波酯 (Phorbol12-myristate13-acetate, PMA) 处理 hBMEC 构建炎症模型，同时在

培养基中加入不同浓度的 2-BP，3 h 后收集 RNA 样品，对相关的炎症因子（IL-4、6、8、1 β 和 TNF- α ）、趋化因子（MCP-1）以及细胞间黏附分子（ICAM-1）进行检测。结果显示 PMA 可以显著刺激炎症因子的上调表达，即使低浓度的 2-BP 处理也可以抑制 hBMEC 细胞的激活（图 5-4）。综上所述，2-BP 可以抑制 JEV 在 hBMEC 细胞中复制同时具有抑制细胞炎症反应的功能。

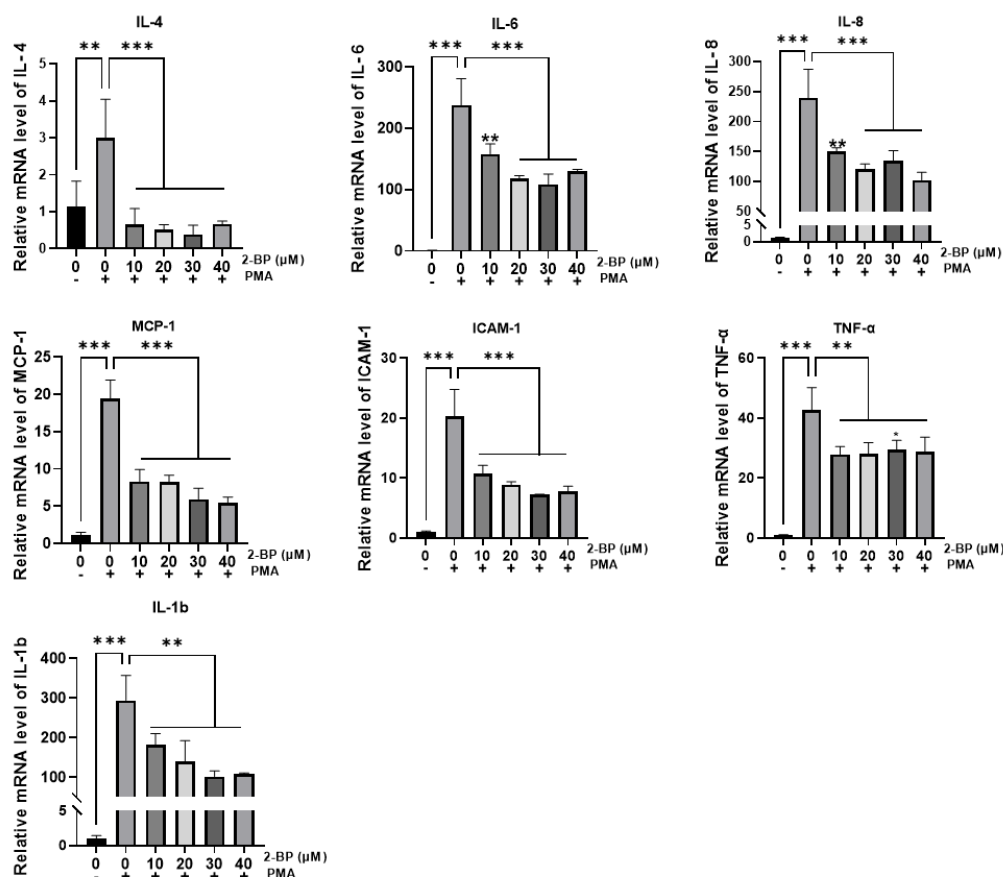


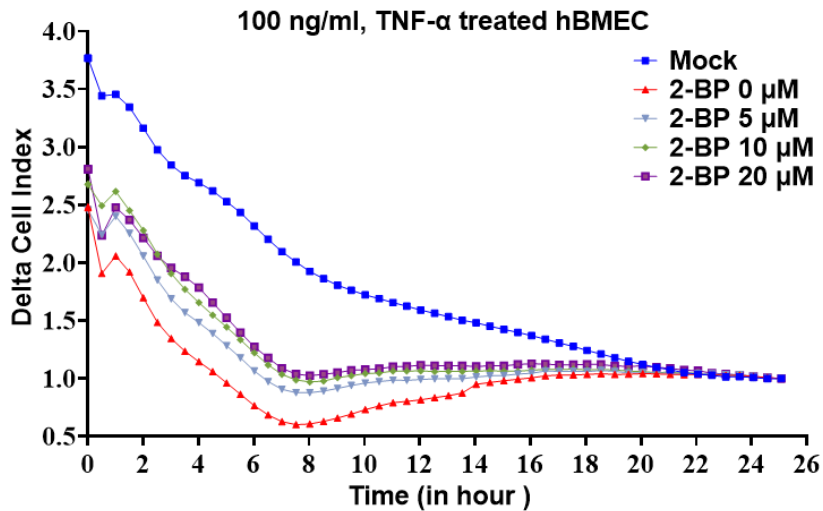
图 5-4 2-BP 抑制 hBMEC 炎症反应

Fig. 5-4 Inhibition of hBMEC inflammation by 2-BP

TNF- α 已被证明可以通过多种机制破坏 BBB(Cheng et al 2018, Gao and Bayraktutan 2023)。本实验室前期实验也证实 TNF- α 介导了 JEV 感染后引起的 BBB 破坏，并构建了相关体外 BBB 模型(Wang et al 2018, Zhang et al 2023)。接下来我们使用 RTCA 来探究 2-BP 是否可以缓解由炎症因子导致的屏障破坏。在本研究中我们分别使用 100 ng/mL 和 200 ng/mL TNF- α 处理接种于 E-Plate 检测板中的 hBMEC 细胞，以 30 min 为时间间隔收集一次数据，一共收集 25 h。数据收集并计算后以 DCI 的形式呈现出来。结果显示在 100 ng/mL 的 TNF- α 处理

组，没有添加 2-BP 组的 DCI 迅速下降，且低于所有浓度的 2-BP 处理组。在 200 ng/mL 的 TNF- α 处理组中只有 20 μ M 2-BP 处理组的 DCI 高于无 2-BP 组（图 5-5 A, B）。以上结果表明 2-BP 处理可以缓解由 TNF- α 引起的屏障功能损坏。

A



B

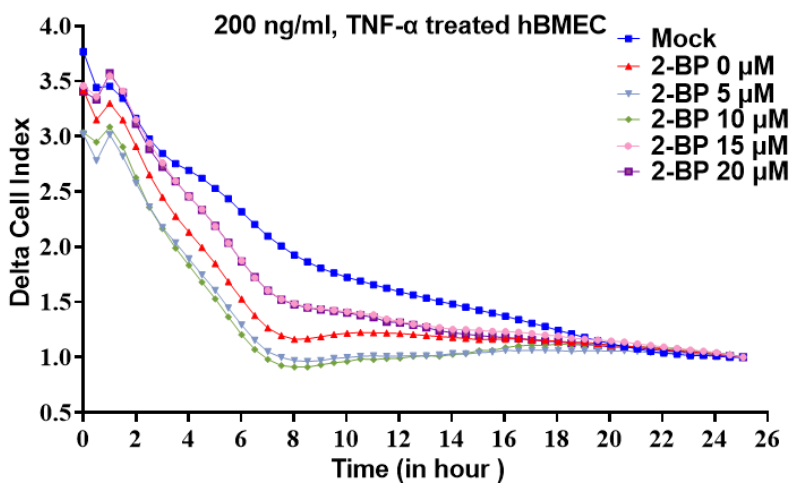


图 5-5 2-BP 处理对德尔塔细胞指数 (DCI) 的影响

Fig. 5-5 Effect of 2-BP treatment on Delta cell index

随后我们在 RTCA 的检测数据中，截取第 8 h 的观测时间点，并对其差异性进行分析，在 100 ng/mL 处理组，与 Mock 组比较后发现，TNF- α 处理导致 DCI 下降，10 μ M 和 20 μ M 的 2-BP 处理均可以恢复 DCI，且差异具有显著性。但是 100 ng/mL 处理组，只有 20 μ M 处理组可以恢复 DCI，但尚未达到显著水平。5

μM 和 $10\ \mu\text{M}$ 处理却导致 DCI 下降幅度增加, 其具体机制还需探究。总体来说 2-BP 在一定条件下可以保护 BBB 屏障的完整性 (图 5-6)。

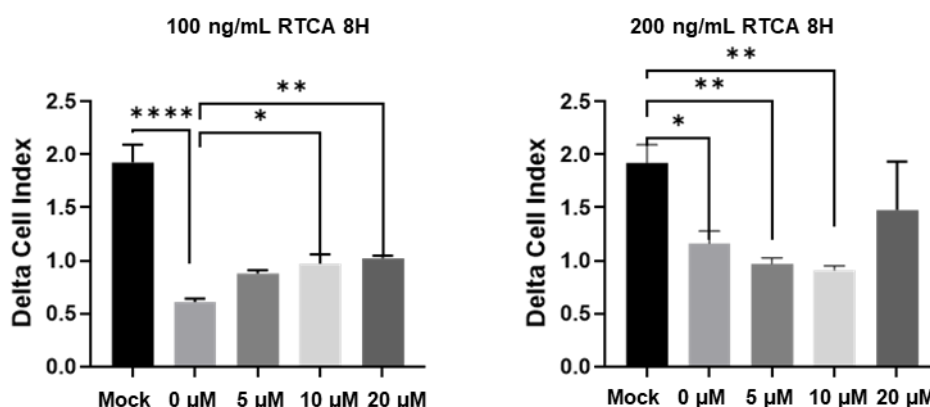


图 5-6 2-BP 和 $\text{TNF-}\alpha$ 处理在第 8 h 对德尔塔细胞指数的影响

Fig. 5-6 Effect of 2-BP and $\text{TNF-}\alpha$ treatment on Delta cell index at 8 H

5.1.4 JEV 感染促进 hBMEC 对 PA 吸收

PA 作为棕榈酰化修饰活性基团, 具备与其他分子中的巯基及胺基进行反应, 以此构建酯键或是酰胺键的能力, 从而实现对分子的棕榈酰化修饰(Ge et al 2022, Jeong et al 2023)。棕榈酰化修饰改变分子的亲水性、脂溶性、溶解度和生物活性等性质(Yuan et al 2024)。2-BP 是一种 PA 的溴代化合物, 通过将溴原子引入 PA 分子中第二位碳原子而得到。与 PA 相比, 2-BP 在一些生物活性和化学性质上可能有所不同。在研究中, 2-BP 常用于模拟棕榈酰化修饰或干扰相关的生物过程。上述结果已表明 2-BP 处理可以显著抑制 JEV 的复制, 因此接下来探究在 JEV 感染过程中 hBMEC 细胞对于 PA 的吸收变化情况。我们利用绿色荧光标记的 PA, BODIPYTMFLC16 探究 JEV 感染过程中 hBMEC 对于 PA 的吸收和利用情况, 在以 MOI=1 的 JEV 感染 hBMEC 的 12 h、24 h 和 48 h 后分别加入终浓度为 $2\ \mu\text{M}$ 的 BODIPYTMFLC16, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱吸附和内化 1h, 清洗多余的 BODIPYTMFLC16 并用流式检测, 并统计每个时间点的平均荧光强度 (Mean fluorescence intensity, MFI) 结果显示在 JEV 感染 24 h 后 hBMEC 开始对于 PA 的吸收增加且随着时间差异逐渐加大 (图 5-8A, B)。

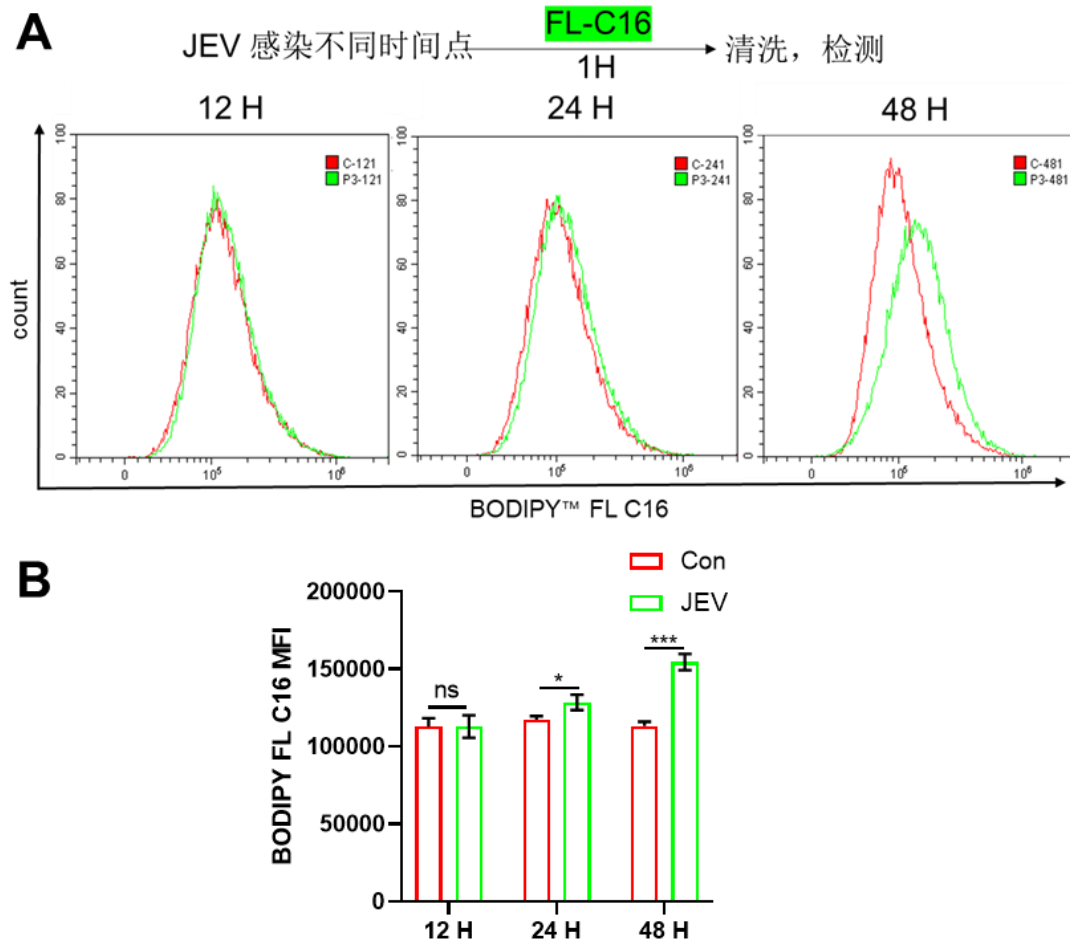


图 5-8 流式检测 hBMEC 对 PA 的吸收情况

Fig. 5-8 Flowcytometry detection of hBMEC absorption of PA

随后在 JEV 感染 48 h 后, 我们使用 IFA 分析, 并统计 PA 形成荧光斑点的面积和数量变化, 结果显示在 JEV 感染 48 h 后 hBMEC 吸收 PA 后单位面积内 (10^4 Pixels^2) 形成的荧光斑点数量显著增加, 但荧光斑点的面积没有明显差异 (图 5-9C, D)。

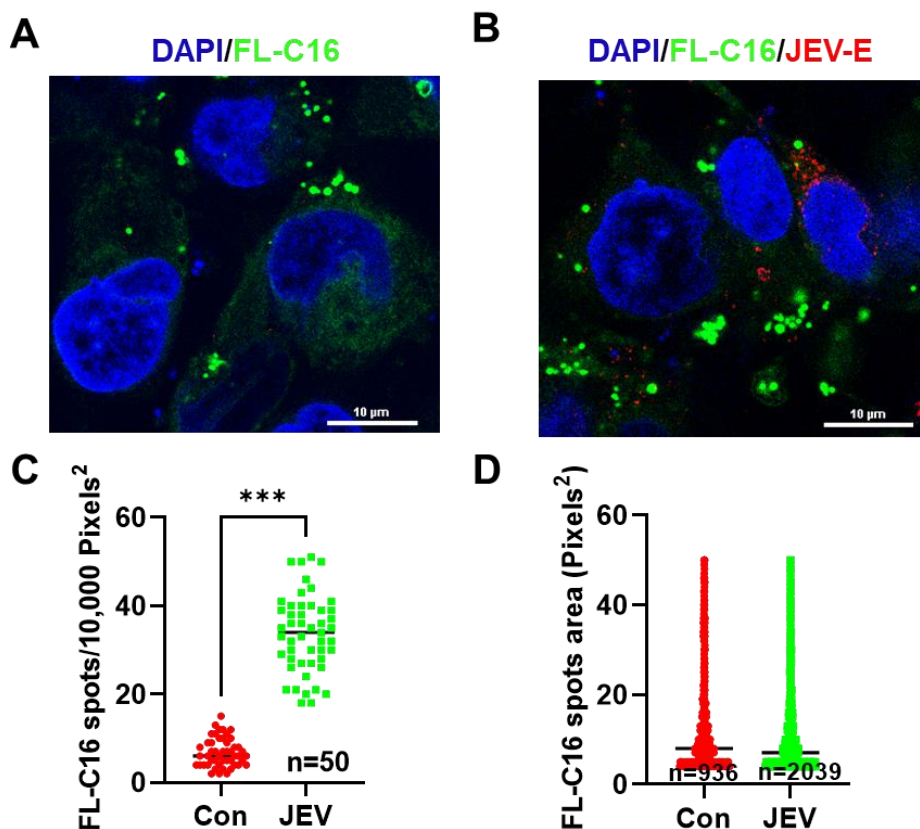


图 5-9 共聚焦显微镜检测 hBMEC 对 PA 的吸收情况

Fig. 5-9 Detection of PA absorption by hBMEC by confocal microscopy

(A) 和 (B) 共聚焦显微镜观察 JEV 感染 48 h 后 PA 的分布差异, PA (绿色), JEV-E (红色); (C) FiJi 软件统计单位面积内 PA 荧光斑点数; (D) FiJi 软件统计 PA 荧光斑点面积。

(A) and (B) Confocal microscopy was used to observe the distribution of PA (green) and JEV-E (red) at 48 h after JEV infection; (C) The number of PA fluorescent spots per unit area was counted by FiJi software; (D) FiJi software was used to calculate the area of PA fluorescent spots.

5.1.5 JEV 感染抑制 hBMEC 对 PA 的分解利用

接下来, 我们对在 JEV 感染过程中 hBMEC 对 PA 的利用情况进行了检测和分析。首先, 我们使用终浓度为 $2\ \mu\text{M}$ 的 BODIPYTMFLC16 处理 hBMEC, 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中使其吸附和内化 1 h, 并清洗掉多余的 BODIPYTMFLC16。随后, 我们使用 MOI=1 的 JEV 感染 hBMEC, 并在感染后的 12、24 和 48 h 收集样本进行流式细胞术检测。结果显示, JEV 感染后导致 hBMEC 对 PA 的利用减少。通过统

计 MFI，我们发现随着感染时间的增加，差异利用的减少程度逐渐增大（图 5-10A, B）。

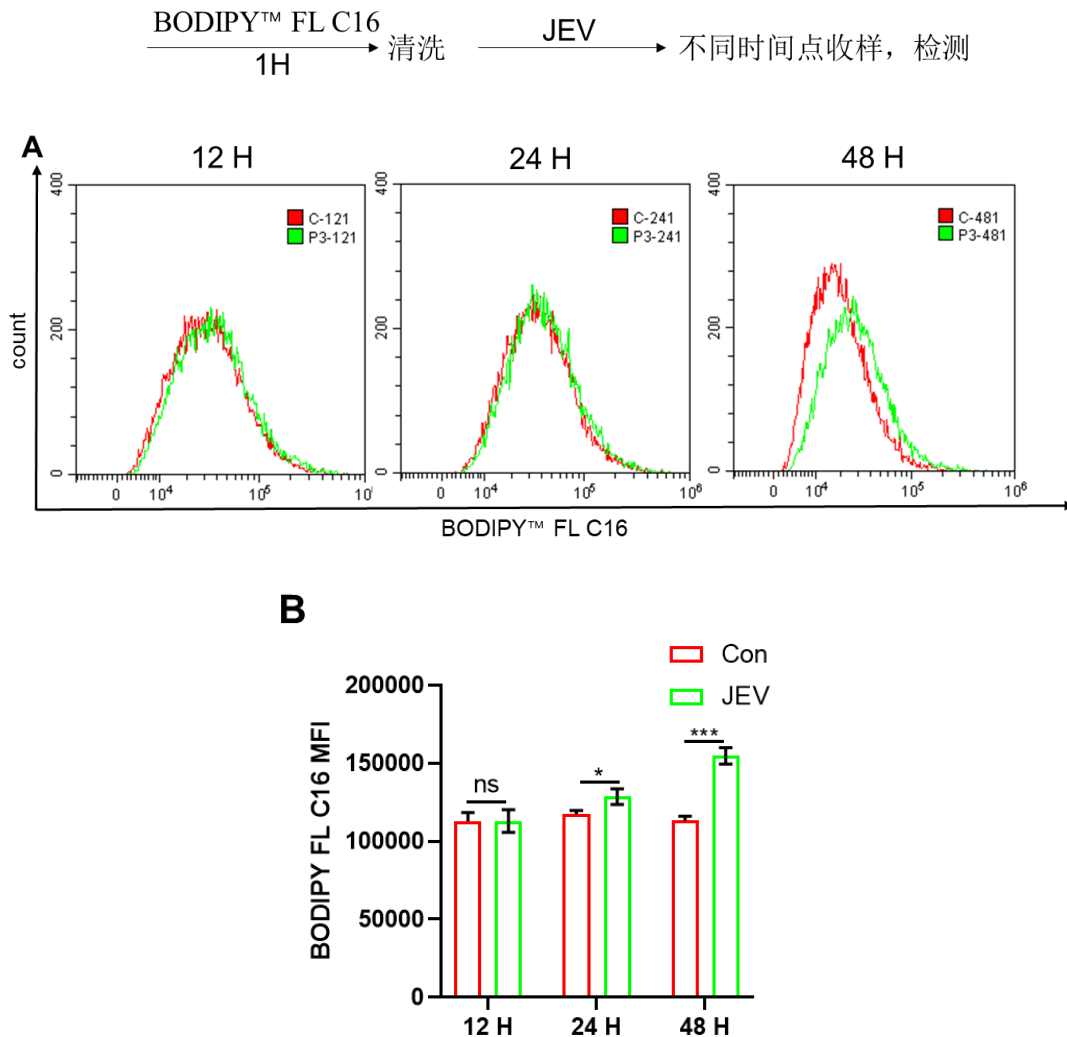


图 5-10 流式细胞术检测 hBMEC 对 PA 利用情况

Fig. 5-10 Flowcytometry detection of hBMEC utilization of PA

接下来，通过对感染 48 h 后免疫荧光图片分析可知，JEV 感染 hBMEC 后，不仅单位面积内 (10^4 Pixels^2) BODIPY™FLC16 形成的荧光斑点数更多，而且荧光斑点的面积也显著大于未感染组（图 5-11C, D）。以上结果表明 JEV 感染后，增强了 hBMEC 对于 PA 的吸收，但对 PA 的分解利用降低（图 5-8）。

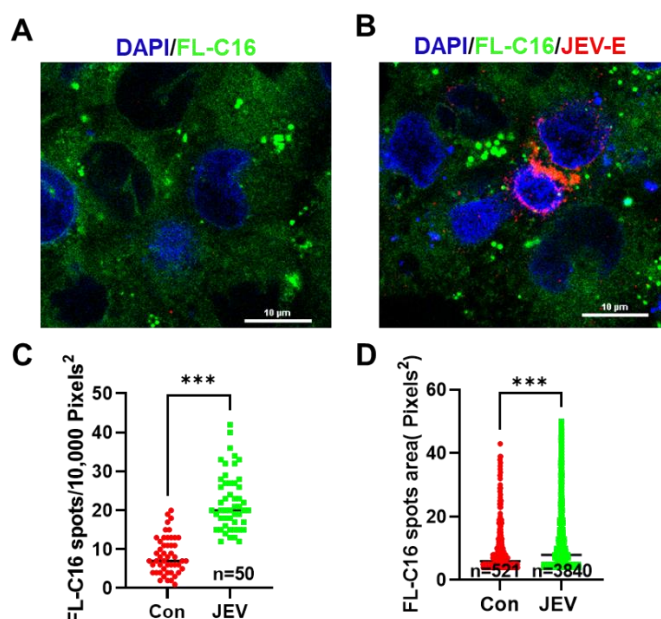


图 5-11 共聚焦显微镜检测 hBMEC 对 PA 利用情况

Fig. 5-11 Detection of PA utilization by hBMEC by confocal microscopy

5.1.6 PA 通过棕榈酰化修饰途径调节 JEV 复制

上述结果表明，2-BP 处理可以抑制 JEV 的复制，且 JEV 感染增强了 hBMEC 对于 PA 的吸收。2-BP 作为 PA 的溴代衍生物，在 PA 和 2-BP 具有相互竞争性作用。接下来在使用 25 μM 的 2-BP 处理 hBMEC 时，同时添加 PA（20 μM 或 40 μM ），在 JEV 感染 24 h 后收取 RNA 样品进行 RT-qPCR 检测，结果显示 PA 可以恢复 2-BP 对于 JEV 复制的抑制作用，当 PA 的终浓度为 40 μM 时可以将 JEV 的复制恢复至正常水平（图 5-12）。

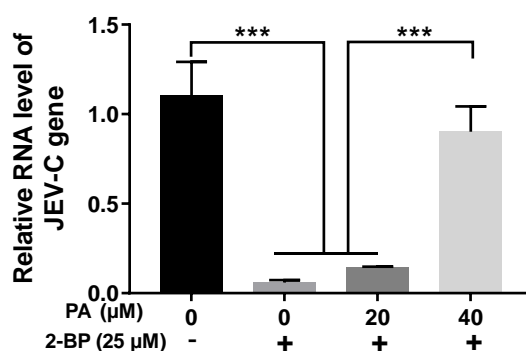


图 5-12 PA 和 2-BP 处理 hBMEC 后检测 JEV-C 基因的表达

Fig. 5-12 Detection of JEV-C gene expression after treatment of hBMECs

With PA and 2-BP

PA 可以恢复 2-BP 对 JEV 复制的抑制。同时 JEV 感染 hBMEC 后促进了 PA 的吸收，但对于 PA 的分解利用没有增加，PA 在细胞内累积。因此我们想探究 PA 以什么方式参与了 JEV 的复制过程？PA 在细胞内的代谢途径主要有三种分别为 1) β 氧化：PA 可以通过 β 氧化途径进行分解，产生 ATP 提供能量；2) 酯化：PA 可以与辅酶 A 发生酯化反应，形成棕榈酰辅酶 A (Palmitoyl-CoA)，从而参与蛋白质棕榈酰化修饰；3) 脂肪酸合成：PA 的合成通常发生在细胞质的脂肪酸合成途径中，通过连续的脂肪酸合成酶催化反应逐渐增加碳链长度脂肪酸合成途径中，通过连续的脂肪酸合成酶催化反应逐渐增加碳链长度（图 5-9）。

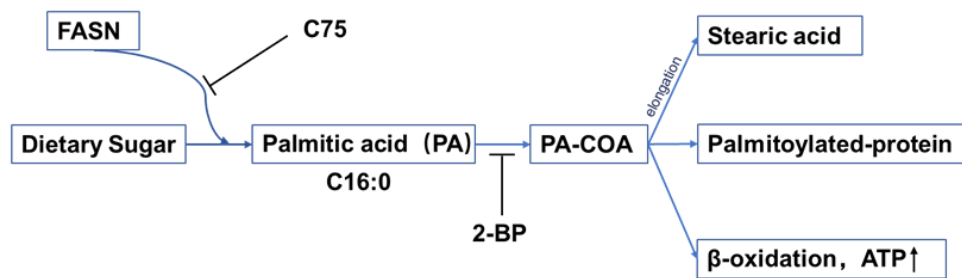


图 5-13 PA 在细胞内代谢途径机制图

Fig. 5-13 Schematic diagram of PA metabolism pathway in cells

为了探究 PA 在 JEV 感染中的作用，首先我们使用了脂肪酸合成酶（FASN）的小分子抑制剂 C75 处理 hBMEC，结果显示 C75 可以抑制 JEV 的复制，同时添加 PA 可以恢复 C75 对 JEV 复制的抑制作用（图 5-14A）。接下来，我们检测了 JEV 感染后胞内 ATP 含量的变化，实验结果显示 JEV 感染 hBEMC 后胞内的 ATP 含量在 24 h 和 48 h 显著低于对照组（图 5-14B）。有文献报道 JEV 非结构蛋白 5（NS5）与参与长链脂肪酸（棕榈酸酯） β 氧化的线粒体三功能蛋白相互作用损害细胞的 β 氧化作用(Kao et al 2015)。使用终浓度为 20 μ M、40 μ M 和 60 μ M 的 PA 处理 hBMEC 24 h 后检测细胞内 ATP 含量的变化，胞内 ATP 含量与对照组相比没有显著差异（图 4-10C）。脂肪酸吸收，氧化利用相关基因 CD36、LIAP、PPARG、PPARGA1B 和 ATCA1 基因，在 60 μ M PA 处理后有上调趋势但没有显著性差异（图 5-14D）。综上，PA 处理促进 JEV 的复制并不是通过长链脂肪酸的 β 氧化途径供能的途径。

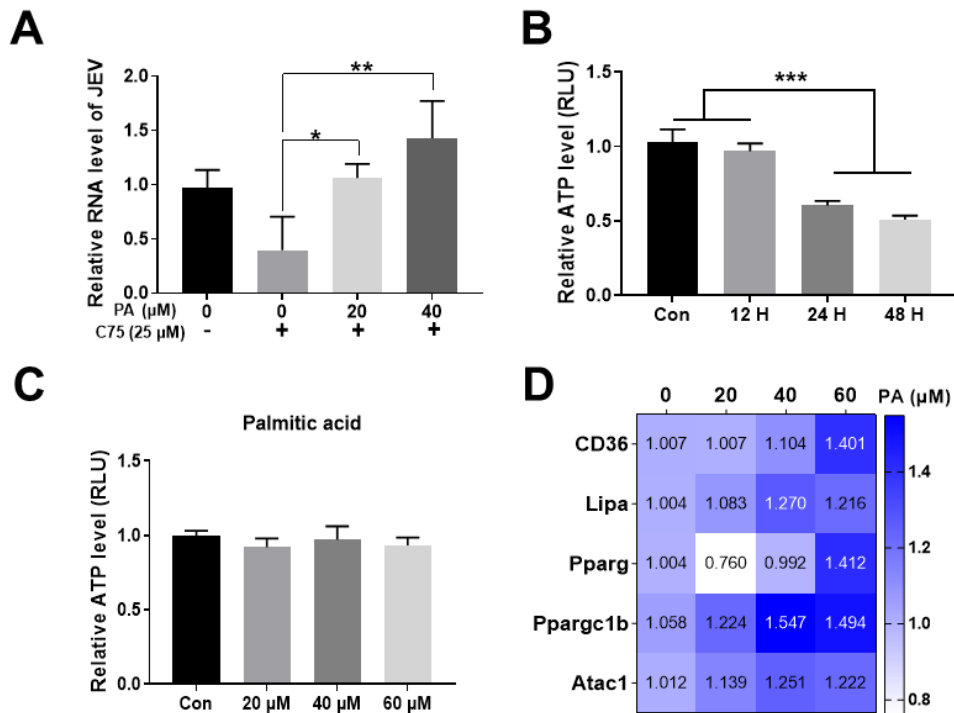


图 5-14 PA 处理 hBMEC 后，关于脂肪酸吸收和氧化利用基因变化

Fig.5-14 Changes in genes related to fatty acid uptake and oxidative utilization after PA treatment of cells

(A) RT-qPCR 检测不同处理条件下 JEV-C 基因的相对表达量；利用 CellTiter-Lumi 检测细胞内 ATP 的变化水平。(B) JEV 感染 hBMEC 后不同时间点；(C) 不同浓度 PA 处理 hBMEC 后；(D) RT-qPCR 检测 PA 处理细胞后脂肪酸吸收，氧化利用基因的变化。

(A) RT-qPCR was used to detect the relative expression of JEV-C gene under different treatment conditions; CellTiter-Lumi was used to detect intracellular ATP levels. (B) different time points after JEV infection of hBMEC; (C) HBMECs treated with different concentrations of PA; (D) RT-qPCR was used to detect the changes in fatty acid uptake and oxidation utilization genes after PA treatment.

在使用由 PA 生成的长链脂肪酸硬脂酸 (Stearicacid, SA) 处理 hBMEC 后我们同样检测了胞内的 ATP 变化和长链脂肪酸吸收，氧化利用相关基因，与 PA 处理一致的，SA 处理也没有改变胞内的 ATP 含量。

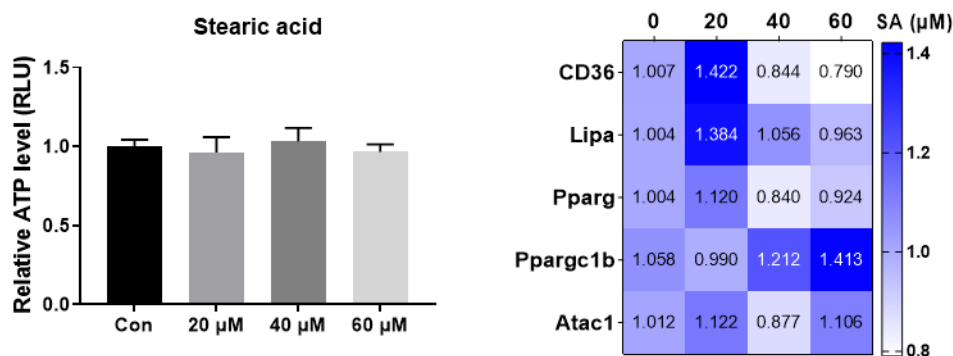


图 5-15 SA 处理细胞后脂肪酸吸收，氧化利用相关基因变化

Fig. 5-15 Changes in genes related to fatty acid up take and oxidative utilization after SA treatment of cells

接下来我们检测了 JEV 感染 hBMEC 后整体棕榈酰化修饰水平的变化情况，在 JEV 感染后 24 h 和 48 h 收集蛋白样品，首先 NEM 阻断未修饰的半胱氨酸巯基，HAM 异性切割暴露棕榈酰化半胱氨酸的巯基，最后使用巯基偶联琼脂糖凝胶标记并富集棕榈酰化的蛋白，对富集的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并染色，结果显示，JEV 感染后整体的棕榈酰化修饰水平增加（图 5-16）。

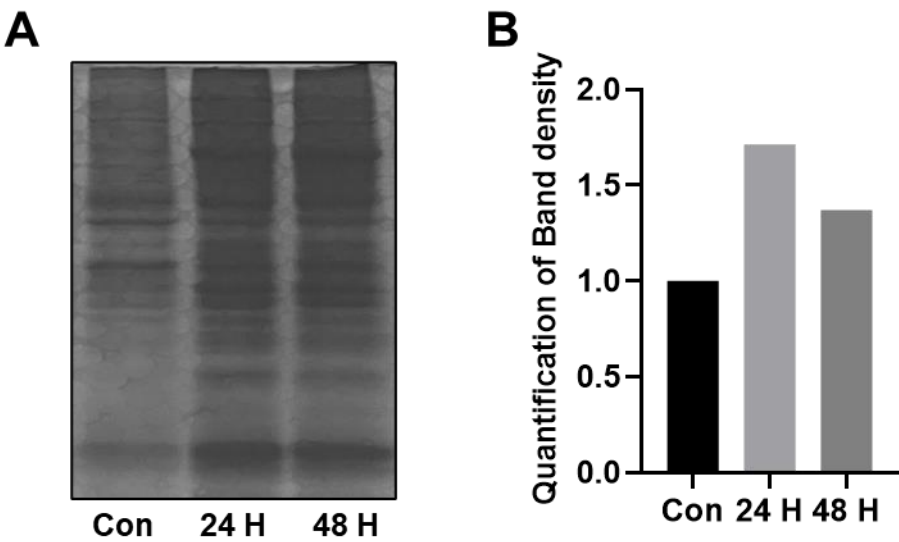


图 5-16 JEV 感染 hBMEC 后整体棕榈酰化修饰水平检测

Fig. 5-16 Detection of overall palmitoylation modification levels in hBMEC after JEV infection

5.2 DHHC21 为促进 JEV 复制的关键棕榈酰化转移酶

5.2.1 DHHCs 在内皮细胞中的表达谱鉴定

已知所有的棕榈酰化修饰是有棕榈酰化转移酶 DHHCs 介导，上述实验已经明确 JEV 通过改变 hBMEC 的棕榈酰化修饰水平来促进病毒复制。DHHCs 家族基因在不同类型的器官、组织、和细胞中 DHHCs 表达差异较大，因此我们首先根据人类蛋白质图谱（www.proteinatlas.org）提供的单细胞测序结果，分析了血管内皮细胞中不同 DHHCs 的表达情况，血管内皮细胞共分为 4 个簇，Cluster2、15、16 和 19。统计不同 DHHCs 在四个内皮细胞簇中的归一化百万转录本（Normalized transcript per million, nTPM）然后按照平均值进行降序排列，其中 DHHC11、19、22 在 4 个内皮细胞簇中 nTPM 统计值均为 0（图 5-17）。

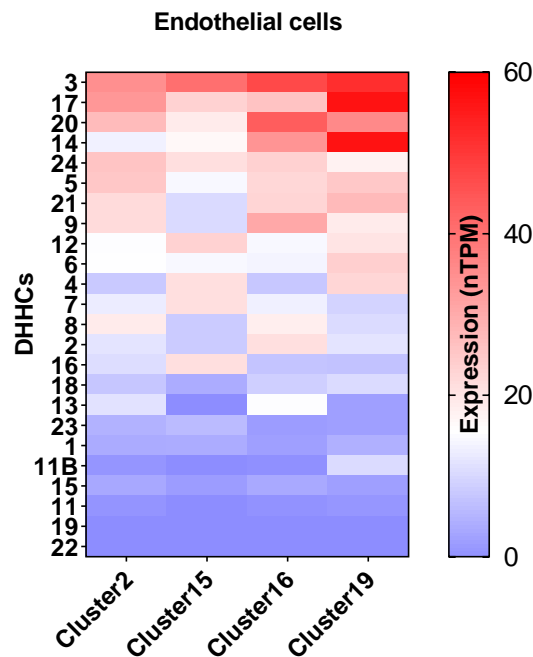


图 5-17 根据人类蛋白质图谱的的单细胞测序结果，总结了不同 DHHCs 在血管内皮细胞中的表达情况

Fig. 5-17 The expression of different DHHCs in vascular endothelial cells was summarized based on single-cell sequencing results from the HPA

为了进一步确定 DHHCs 在 hBMEC 中的表达情况，接下来我使用 PCR 扩增 DHHCs 片段，同时使用已经报道过的 A549 和 293-T 作为阳性对照(Ohno et al

2012, Gadalla et al 2021)。结果显示在 hBMEC 中 DHHC1、2、5、19、22 表达较弱或不表达（图 5-18）。

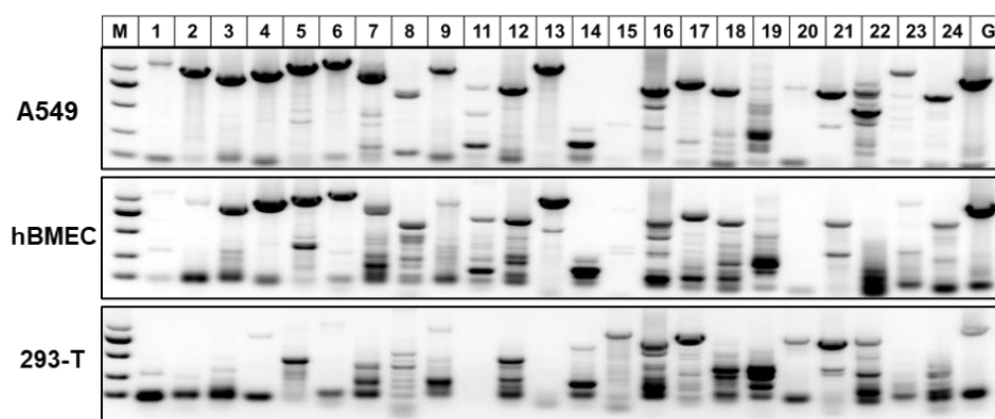


图 5-18 利用 PCR 扩增不同 DHHCs 片段

Fig. 5-18 Amplification of different DHHCs fragments using PCR

5.2.2 与 JEV 复制相关的棕榈酰转移酶筛选

为了探究那个 DHHC 在 JEV 复制的过程中起到关键作用，我们用 JEV 以 MOI=1 感染 hBMEC，分别在感染后的 12 h、24 h 和 48 h 取 RNA 样品，并用 RT-qPCR 检测不同 DHHCs 的表达变化，其中 DHHC1、12、23、24 表达量逐渐降低。13 个 DHHCs 表达量均上调，DHHC2、6、13、17 和 21 上调最为显著（图 5-19A）。因此我们选择使用 shRNA 分别敲低 DHHC2、6、13、17 以及 21，使用 RT-qPCR 检测敲低效率结果显示敲低的 DHHCs 表达量均下降 50% 以上。然后在筛选出来的稳定细胞系中检测了 JEV 复制的差异，敲低 DHHC13、17 并不影响 JEV 的复制，敲低 DHHC2、6 和 21 均在 hBMEC 中抑制 JEV 复制且具有显著性差异其中 DHHC21 的差异最为显著（图 5-19B）。因此我们选取 DHHC21 作为下一步试验的靶蛋白进行分析。

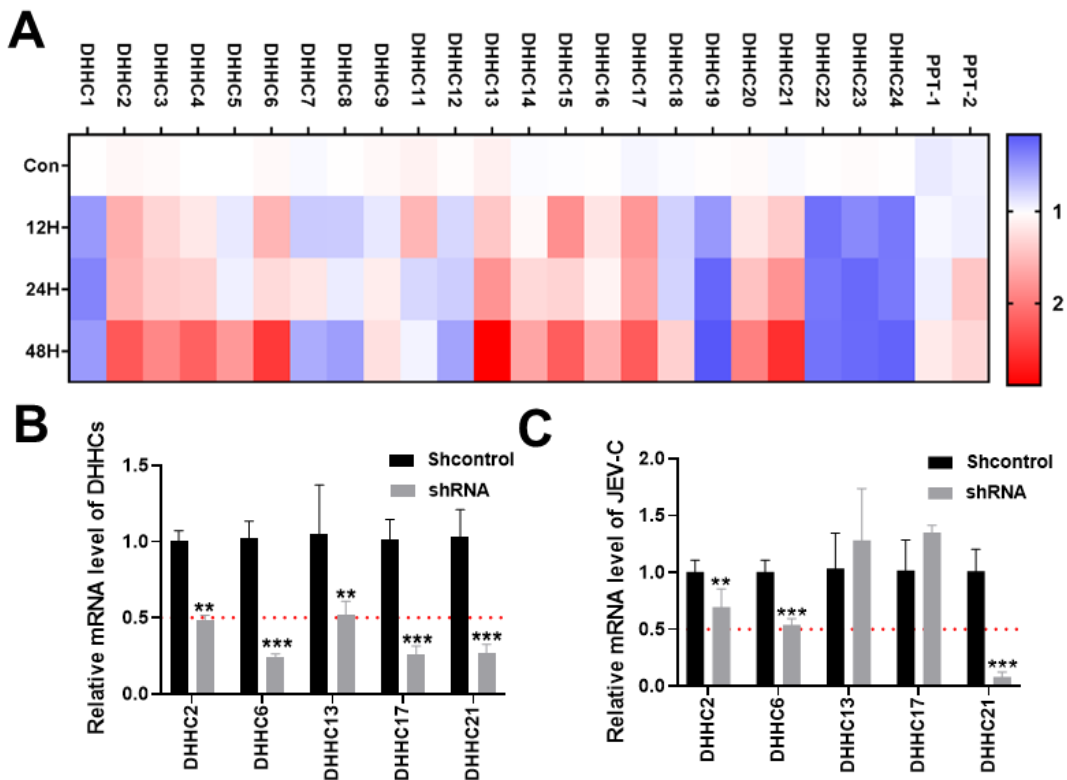


图 5-19 DHHC21 为调控 JEV 在 hBMEC 中复制的关键酶类

Fig. 5-19 DHHC21 as a key palmitoyltransferases regulating JEV replication in hBMEC

(A) RT-qPCR 检测 JEV 感染 hBMEC 后的 12、24、48 h，不同的 DHHCs 表达变化情况；(B) RT-qPCR 检测 shRNA 对不同 DHHCs 的敲低效率；(C) RT-qPCR 检测 JEV 在不同 DHHCs 敲低的细胞系上的复制差异

(A) RT-qPCR to detect the expression changes of different DHHCs at 12, 24, and 48 h after JEV infection with hBMEC; (B) RT-qPCR to detect the efficiency of shRNA knockdown on different DHHCs; (C) RT-qPCR to detect the replication differences of JEV on different DHHCs knockdown cell lines

5.2.3 DHHC21 促进 JEV 复制不依赖 CAV1 介导的内化途径

内化是病毒进入细胞的关键一步，多数病毒会利用宿主蛋白进入细胞细胞内。网格蛋白介导内化是 JEV 进入大多数细胞易感细胞的主要方式，如 HeLa、Huh7、C6/36、BS-C-1 和 BHK-21 等(Tani et al 2010, Khasa et al 2019)。但也存在非网格蛋白依赖的途径进入，对于神经元衍生的 B104 细胞、SK-N-SH 细胞以及 hBMEC 是通过小窝蛋白 (caveolin-1, CAV1) 依赖性途径内化(Kalia et al 2013)。

JEV 感染 hBMEC 后, Src、ezrin 和 CAV1 依次被激活并形成复合物并介导 JEV 进入(Liu et al 2020)。CAV1 需要棕榈酰化后才可以发挥作用, DHHC7 和 DHHC21 共通作用才可以使 CAV1 棕榈酰化(Tonn Eisinger et al 2018)。因此我们想知道敲低 DHHC21 是否能够通过抑制 CAV1 的棕榈酰化过程实现对 JEV 复制的抑制。因此在下一步实验中我们在 hBMEC 中同时敲低了 DHHC7 和 DHHC21, RT-qPCR 检测双敲低后相对表达量均低于 30% (图 5-20A)。用 JEV 以 MOI=1 感染 DHHC7 和 21 双敲低的细胞系, 检测 JEV 复制的动力学曲线, 与对照细胞系相比两者在不同时间点的复制没有显著的差异 (图 5-20B)。

同时我们在以 MOI=20 检测了 shRNA 敲低与对照组对于 JEV 吸附和内化的差异, 敲低 DHHC21 不会影响 JEV 的吸附和内化过程 (图 5-20C)。且我们检测了与 DHHC21 酶催化区域一致的同家族其他棕榈酰化转移酶 DHHCs、13、16、17 和 20 在 JEV 感染后两个细胞系中 DHHCs 的表达模式没有改变, 敲低 DHHC21 没有引起其他棕榈酰化转移酶的代偿作用 (图 5-20D)。上述结果证明 DHHC21 不通过 CAV1 介导的内化途径影响 JEV 的复制, 同时敲低 DHHC21 也不影响 JEV 的吸附与内化。

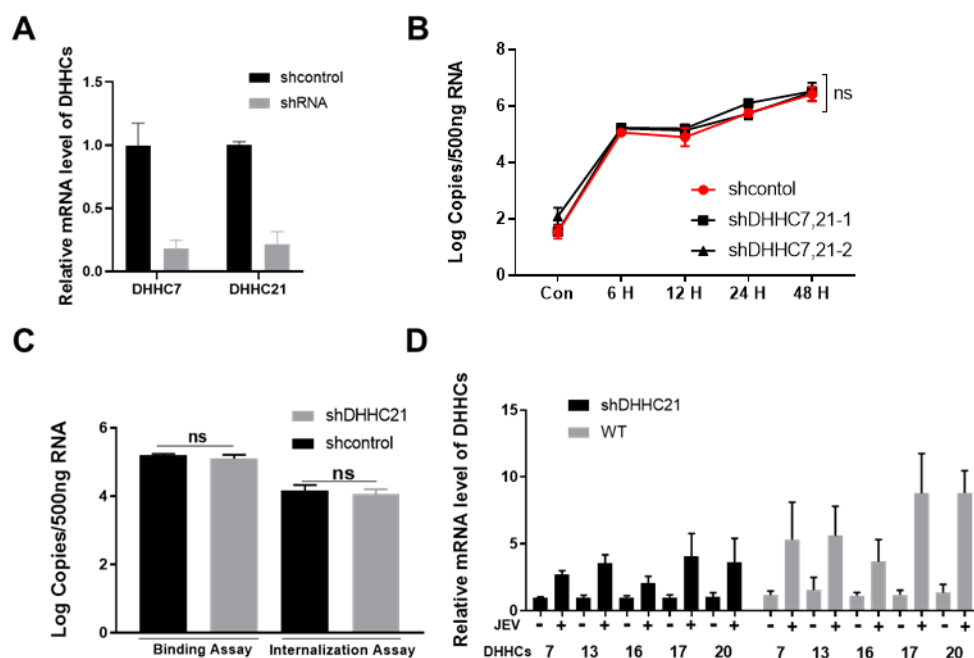


图 5-20 敲低 DHHC7 和 DHHC21 不影响 JEV 在 hBMEC 中复制

Fig. 5-20 Knockdown of DHHC7 and DHHC21 does not affect JEV replication in hBMEC

5.2.4 敲低 DHHC21 抑制 JEV 在 hBMEC 中复制

使用 JEV 以 MOI=1 感染 hBMEC 和 shRNA DHHC21 敲低的 hBMEC 细胞系 (shDHHC21) 后, 不同时间点分别收集 RNA 和蛋白样品, 根据 RT-qPCR 和 WB 检测结果可知敲低 DHHC21 可以在 mRNA 水平和蛋白质水平抑制 JEV 的复制, 具有显著性差异 (图 5-21A, B)。对 24 h 和 48 h 的感染性上清进行空斑试验, 同样观察到在 DHHC21 敲低组上清中的感染性病毒粒子数显著下降 (图 5-21D)。JEV 感染未纯化的 shDHHC21 敲低的 hBMEC 细胞系后, 对 JEV-E 蛋白进行抗体标记染色, IFA 显示, 在 shRNA-EGFP 高表达的细胞内检测不到 JEV-E 蛋白, 未表达 EGFP 的细胞中可以检测到大量的 JEV-E 蛋白 (红色) 积累 (图 5-21C)。最后使用 20、40 和 60 μ M 的 PA 处理 shDHHC21 细胞, 探究 PA 能过恢复 JEV 的复制。结果显示由于 DHHC21 的敲低, 不能有效利用 PA, 在 PA 敲低细胞系中 PA 对 JEV 复制的促进作用有限, 不能恢复 JEV 的复制至正常水平。以上结果说明 DHHC21 为促进 JEV 复制的关键棕榈酰化酶。

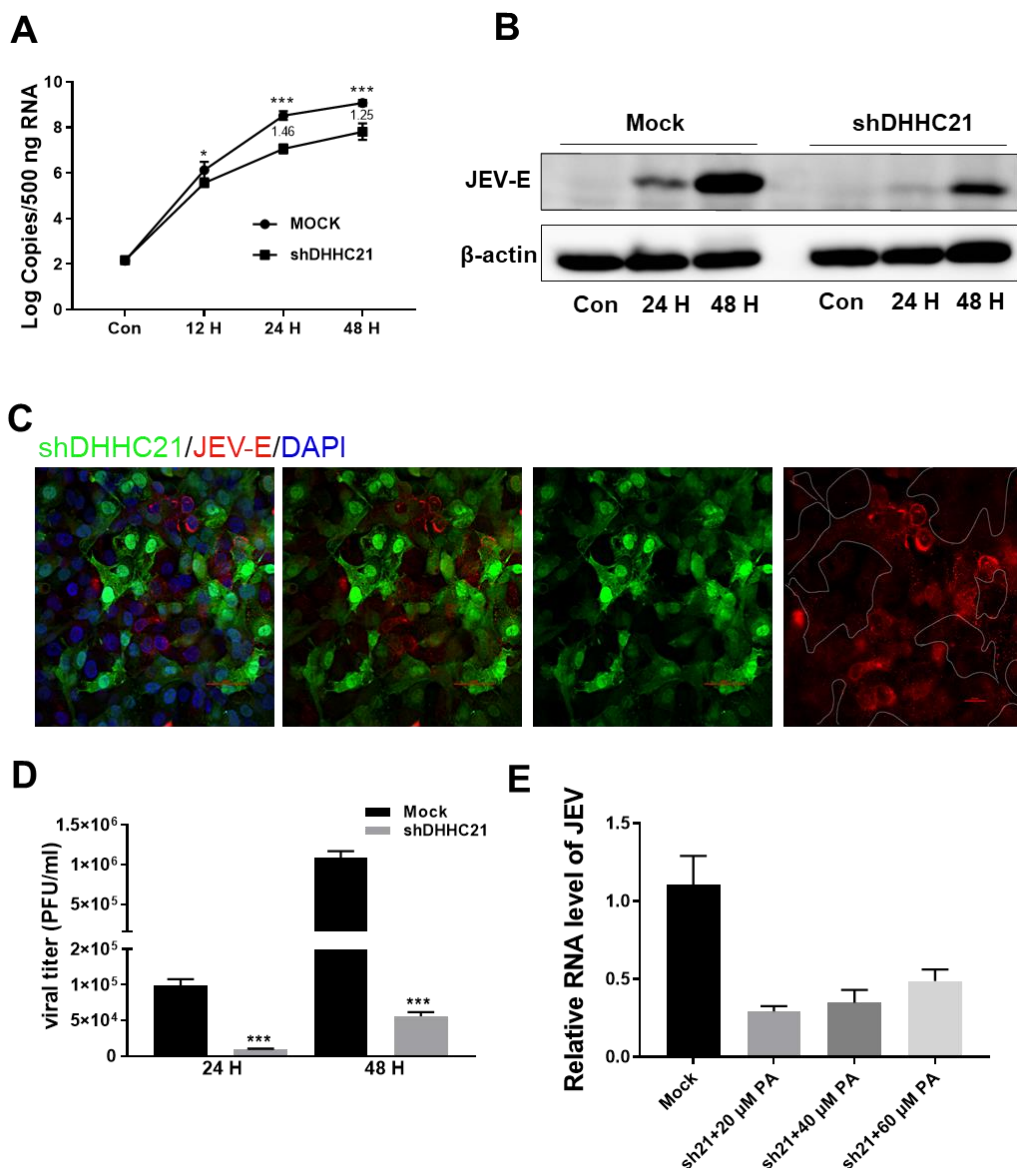


图 5-21 敲低 DHHC21 抑制 JEV 在 hBMEC 中复制

Fig. 5-21 Knockdown of DHHC21 inhibits JEV replication in hBMEC

(A) RT-qPCR 检测不同时间点 JEV-C 基因表达；(B) WB 检测 JEV-E 蛋白在 24 h、48 h 的表达量；(C) IF 检测 JEV-E 蛋白在不同细胞上的分布。JEV-E 蛋白-红色、shDHHC21-绿色、细胞核-蓝色；(D) 病毒噬斑形成试验检测感染性病毒粒子；(E) RT-qPCR 检测 PA 处理条件下 JEV-C 基因的相对表达量。

(A)The expression of JEV-C gene was detected by RT-qPCR at different time points; (B) The expression level of JEV-E protein at 24 H and 48 h was detected by WB; (C) IF detected the distribution of JEV-E protein on different cells. JEV-E protein-red, shDHHC21-green, nucleus-blue.

5.3 转录因子 ATF3 介导 DHHC21 上调的表达

我们探索了哪些转录因子可以直接或间接地调控 DHHC21 的表达，首先利用 hTFtarget 和 GeneHancer 转录因子数据库，下载了与 DHHC21 有关的转录因子(Fishilevich et al 2017, Zhang et al 2020b)。并结合本实验室前期对 JEV 感染 hBMEC 的 RNA-seq 行合并筛选，在两个转录因子数据库中共有 10 个基因 ATF3、KLF4、EGR1、STAT1、GATA3、MYC、GATA2、FOS、NR2F1、FOXA3 在感染后上调表达（图 5-21A）。ATF3、KLF4、EGR1、STAT1 和 GATA3 与对照组相比在两个时间点持续上调表达符合 DHHC21 的表达模式（图 5-21B）。因此我们用 RT-qPCR 对持续上调表达的基因进行 mRNA 水平的验证，结果显示 ATF3、KLF4、EGR1 和 STAT1 在感染后上调表达与测序结果一致，GATA3 上调幅度不明显，且不具有差异显著性（图 5-21C）。下一步我们构建了 ATF3、KLF4、EGR1 和 STAT1 蛋白的真核表达载体和 DHHC21 的启动子双荧光素酶报告系统，并利用双荧光素酶试验探究影响 DHHC21 启动子活性的蛋白。与对照组相比，转染 ATF3 蛋白可以显著提高 DHHC21 启动子的活性（图 5-21D）。这些结果表明 JEV 感染 hBMEC 后刺激转录因子 ATF3 的上调表达，ATF3 可以增强 DHHC21 启动子活性。

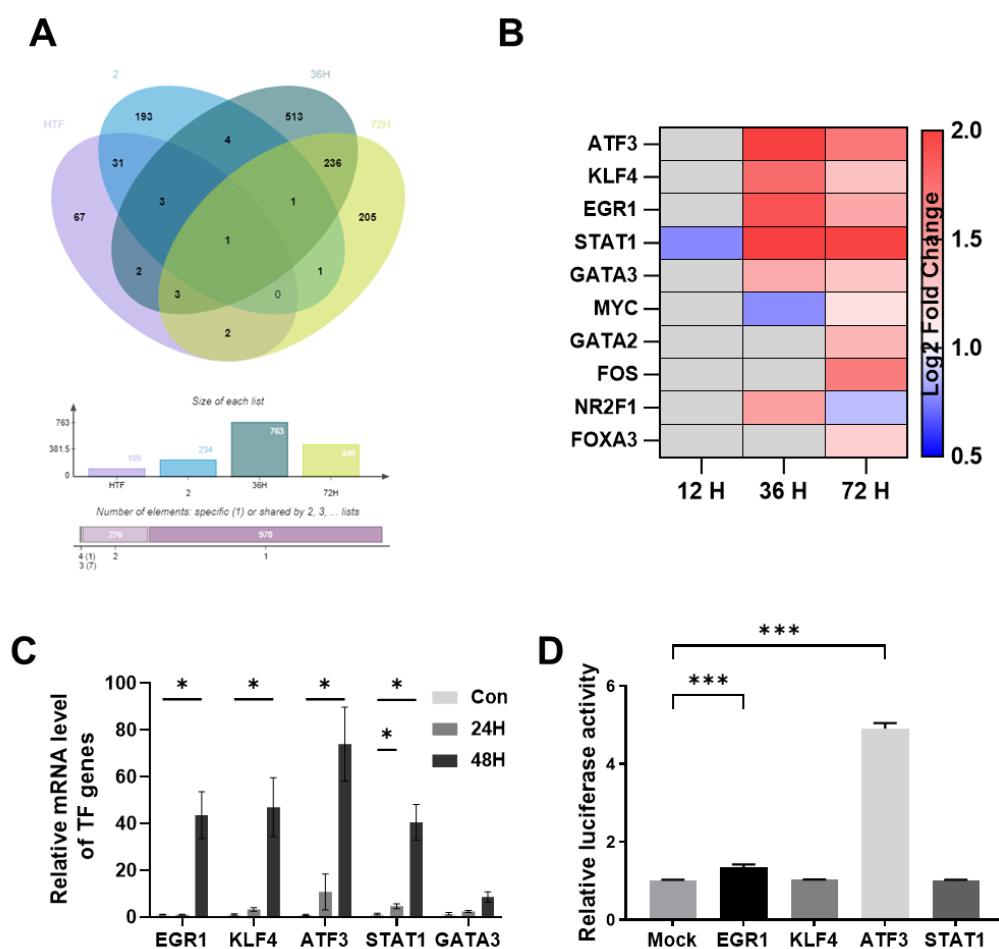


图 5-22 ATF3 激活 DHHC21 启动子

Fig. 5-22 Activation of DHHC21 promoter by the transcription factor ATF3

(A) hTFtarget 和 GeneHancer 中与 DHHC21 相关转录因子筛选; (B) 热图表示转录因子在 JEV 感染不同时间点的表达情况; (C) RT-qPCR 检测 JEV 感染后转录因子表达变化; (D) 双荧光素酶试验检测 DHHC21 表达

(A) DHHC21-related transcription factor screening in hTFtarget and GeneHancer; (B) Heatmap showed the expression of transcription factors at different time points of JEV infection; (C) The expression of transcription factors after JEV infection was detected by RT-qPCR; (D) Dual luciferase assay to detect DHHC21 expression

为了进一步检测 ATF3 与 DHHC21 启动子区域的结合位点，我们利用 JASPAR 预测和评估 ATF3 的结合位点(Castro-Mondragon et al 2022)，在相对配置文件分数阈值为 75%时，启动子区域正义链共有三个 ATF3 的结合位点。其中 -1330--1321 结合位点得分最高。我们构建了 DHHC21 启动子截短的双荧光素酶

报告系统，并转染 ATF3 蛋白后检测荧光素酶活性。PGL3-1 和 PGL3-2 截短体产生的的荧光素酶活性较高，PGL3-3、PGL3-4 和 PGL3-5 无荧光素酶活性。根据以上结果可以判断 ATF3 的结合位点在-1330—-1321。

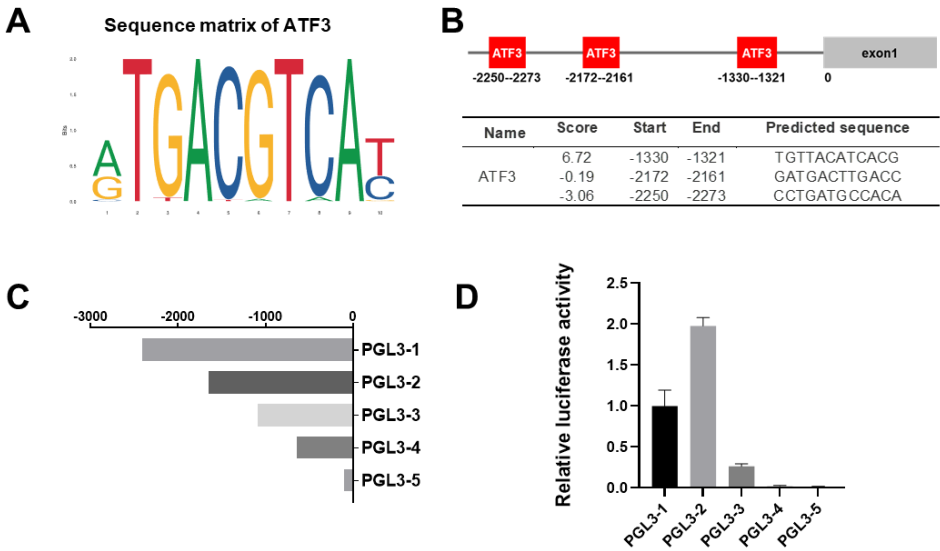


图 5-23 转录因子 ATF3 结合位点检测

Fig. 5-23 Transcription factor ATF3 binding site detection

(A) ATF3 结合位点示意图；(B) ATF3 结合位点预测；(C) DHHC21 启动子序列截短表达；(D) 双荧光素酶实验检测 DHHC21 启动子活性。

(A)Schematic diagram of ATF3 binding site; (B) ATF3 binding site prediction; (C) DHHC21 promoter sequence truncated expression; (D) Dual luciferase assay to detect DHHC21 promoter activity.

转录激活因子 3 (Activated transcription factor3, ATF3) 是 ATF/cAMP 反应元件结合家族的一员，它通过与启动子中的 cAMP 反应元件共有序列 TGACGTCA 结合。(Ku and Cheng 2020)。已知在 ZIKV 寨卡病毒感染期间刺激 ATF4/ATF3 上调表达，JEV 通过 PERK-eIF2 α 轴激活 ATF4 表达(Tan et al 2018, Wang et al 2019b)。在本实验中我们探究了，JEV 是否通过 PERK 途径激活 ATF3 上调表达，在 JEV 感染 hBMEC 之前，使用 1nM 和 5nM 的 PERK 磷酸化抑制剂 GSK2606414 处理细胞 6 h，24 h 后收获蛋白样品，进行 WB 检测。JEV 感染后 PERK 的磷酸化程度以及 ATF3 的蛋白表达量均升高，但在 GSK2606414 处理组可以发现 pPERK 和 ATF3 的蛋白含量均下降。据报道 JEV 的 NS4B 蛋白可以在小鼠脑神经瘤细胞 (Neuro-2a) 中诱导 PERK 的磷酸化。为了鉴别诱导

ATF3 上调表达的病毒蛋白，我们分别用表达 JEV 的 PrM、E、NS1、NS2A、NS2B、NS4A、NS4B 和 NS5 蛋白的质粒转染 293T 细胞。转染完成 24 h 后，使用 WB 分析 ATF3 的表达差异，与转染空载体（Vec）相比，NS4B 蛋白仅可以轻微上调 ATF3 表达，而 PrM 蛋白可以显著诱导 ATF3 上调表达。以上结果表明，在 JEV 感染后可以通过 PrM 和 NS4B 蛋白诱导转录因子 ATF3 上调表达，ATF3 与 DHHC21 的启动子区域-1330—1321 位点结合，促进 DHHC21 的 mRNA 转录。

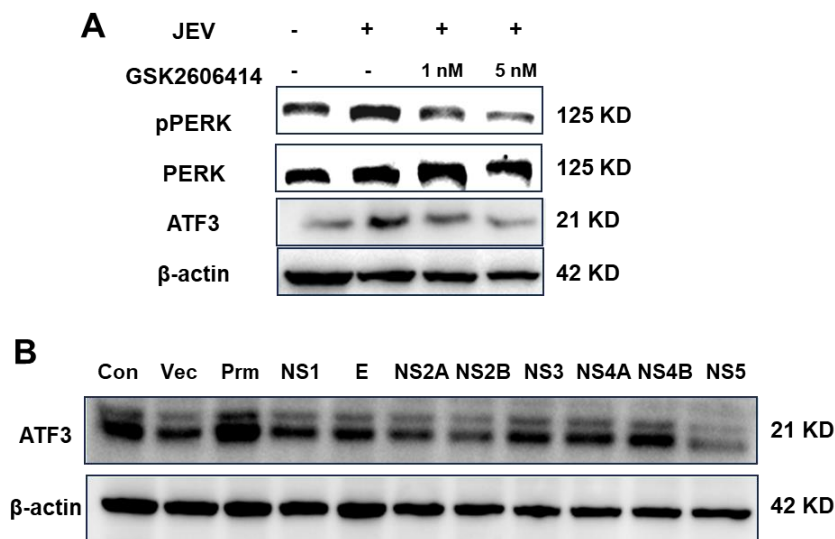


图 5-24 PrM 和 NS4B 蛋白诱导 ATF3 表达

Fig. 5-24 PrM and NS4B proteins of JEV induce ATF3 expression

5.4 DHHC21 互作蛋白筛选

5.4.1 DHHC21 修饰的 SRC 家族蛋白参与 JEV 的复制过程

为了进一步探究在 JEV 感染过程中 DHHC21 通过哪些下游蛋白促进 JEV 复制？首先，我们利用 Swiss-Palm (<https://swisspalm.org/>) 数据库下载了 293T 细胞、人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）细胞、小鼠脑和人脑的棕榈酰化蛋白质组学数据(Blanc et al 2015)。然后，我们对这些数据进行了筛选，在这 4 组数据中共同存在的棕榈酰化修饰蛋白共有 748 个蛋白（图 5-25A）。我们通过 String (<https://string-db.org/>) 蛋白质相互作用网络数据库，筛选了宿主与黄病毒相关的棕榈酰化蛋白 CAV1、EGFR 和 Furin，这些

蛋白已被证明具有棕榈酰化位点且与 JEV 复制相关(Liu et al 2020, Xiong et al 2022, Zhang et al 2022) (图 5-25B)。此外, SFKs 是非受体型酪氨酸激酶, 参与黄病毒家族组装和分泌过程(Chu and Yang 2007, Valencia et al 2021)。SFks 的完全激活通常按以下顺序实现, N 端结构域进行脂质修饰, 接着是 C 端保守酪氨酸残基 (Tyr-527) 磷酸化激活发挥作用。SFks 包括八个成员, 分别是 Src、Yes、Fyn、Fgr、Lyn、Hck、Lck 和 Blk, 五个成员 Yes、Fyn、Lyn、Lck 和 Fgr 具有 N 端保守的棕榈酰化位点 (图 5-25C)。同时 DHHC21 是催化 SFK 棕榈酰化的关键棕榈酰化修饰转移酶(Fan et al 2020, Gauthaman et al 2022)。

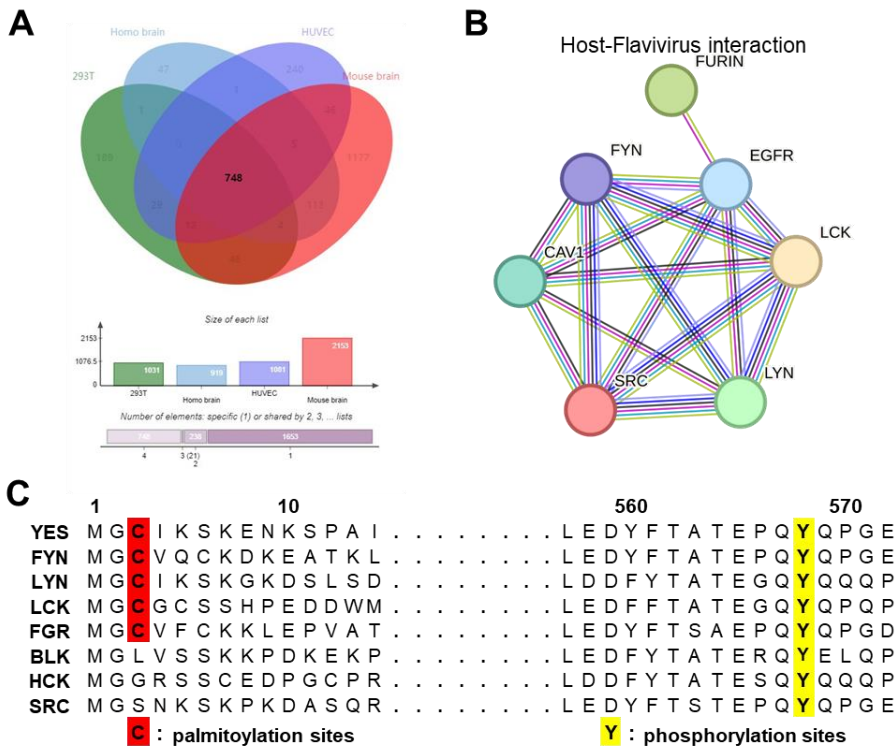


图 5-25 与 JEV 复制相关棕榈酰化蛋白筛选

Fig. 5-25 Screening of palmitoylated proteins associated with JEV replication

(A) 韦恩图分析 293T 细胞、HUVEC 细胞、小鼠脑和人脑的棕榈酰化蛋白质; (B) String 分析与黄病毒相关的棕榈酰化蛋白的蛋白互作网络; (C) SFKs 的棕榈酰化修饰位点和磷酸化修饰位点示意图。

(A) Venn diagram analysis of palmitoylated proteins in 293T cells, HUVEC cells, mouse brain, and human brain; (B) String analysis of the protein interaction network of palmitoylated proteins related to flaviviruses; (C) Schematic diagram of SFK palmitoylation sites and phosphorylation

因此我们接下来探究 DHHC21 是否可以通过介导 SFKs 的棕榈酰化修饰影响 JEV 的复制。SFks 包括八个成员, Src、Yes、Fyn、Fgr、Lyn、Hck、Lck、Blk。在 JEV 感染 hBMEC 后, 用 RT-qPCR 检测了棕榈酰化修饰蛋白 Yes、Fyn、Lyn、Lck 和 Fgr 的 mRNA 变化情况, Lck、Yes、Lyn、Fyn 均在 JEV 感染后的 24 h 和 48 h 表达显著上调 (图 5-26A)。Fgr 在 hBMEC 细胞系中不能检出, 据报道 Fgr 表达受限于髓系造血细胞, 在淋巴瘤细胞过度表达并持续活跃 (Shen et al 2018)。随后我们检测了 JEV 感染后, SFKs 的磷酸化程度, 在 hBMEC 和 U251 细胞中, WB 检测结果显示 JEV 感染 6 H 后 SFKs 的磷酸化水平升高。不同的是在 hBMEC 中, 磷酸化程度在 24 h 后开始下降, U251 细胞中磷酸化水平持续升高 (图 5-26B, C 左图)。使用 SFKs 磷酸化抑制剂 SU6656 (5 μ M) 分别处理 hBMEC 和 U251 后, WB 检测发现 SFK 的磷酸化被抑制的同时, JEV-E 蛋白的含量也显著下降 (图 4-1B, C 右图)。上述结果表明, Lck、Yes、Lyn 和 Fyn 在 JEV 感染后 mRNA 上调表达, 蛋白质磷酸化水平增加。

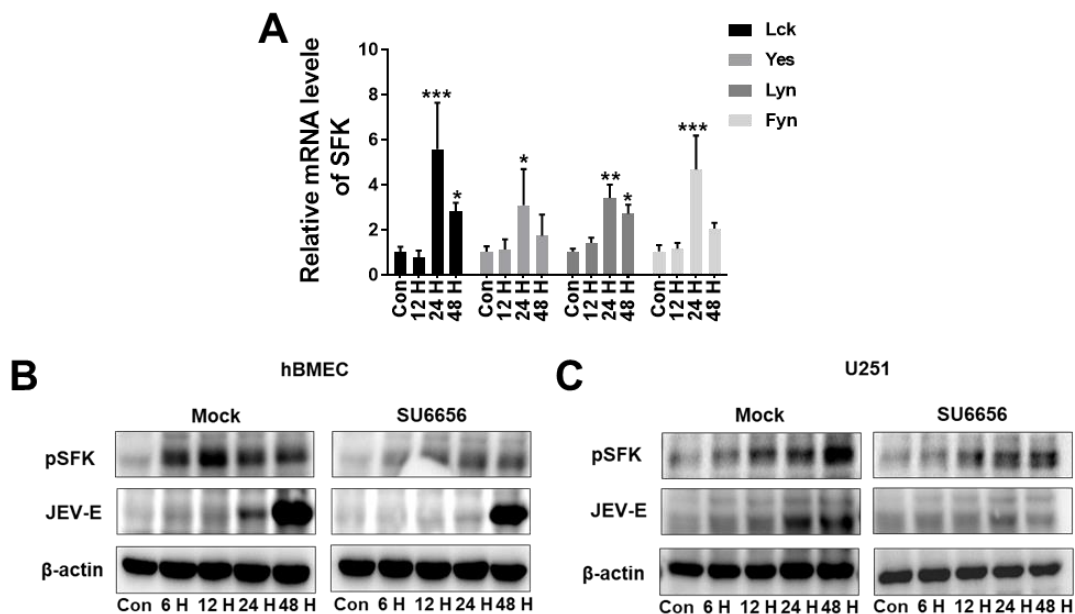


图 5-26 SFKs mRNA 表达及蛋白质磷酸化水平变化

Fig. 5-26 Changes in SFKs mRNA expression and protein phosphorylation

上述结果显示, Lck、Yes、Lyn、Fyn 在 JEV 复制过程中发挥作用。因此接下来我们使用 shRNA 技术敲低 Lck、Yes、Lyn 和 Fyn 基因 (图 5-27A), 然后使用 JEV 感染不同的敲低细胞系并在 24 h 和 48 h 检测 JEV-E 蛋白的表达差异, 敲

低 Lck 和 Yes 对 JEV 的复制有明显的抑制作用。这里可以得出结论 Lck 和 Yes 可以促进 JEV 复制。

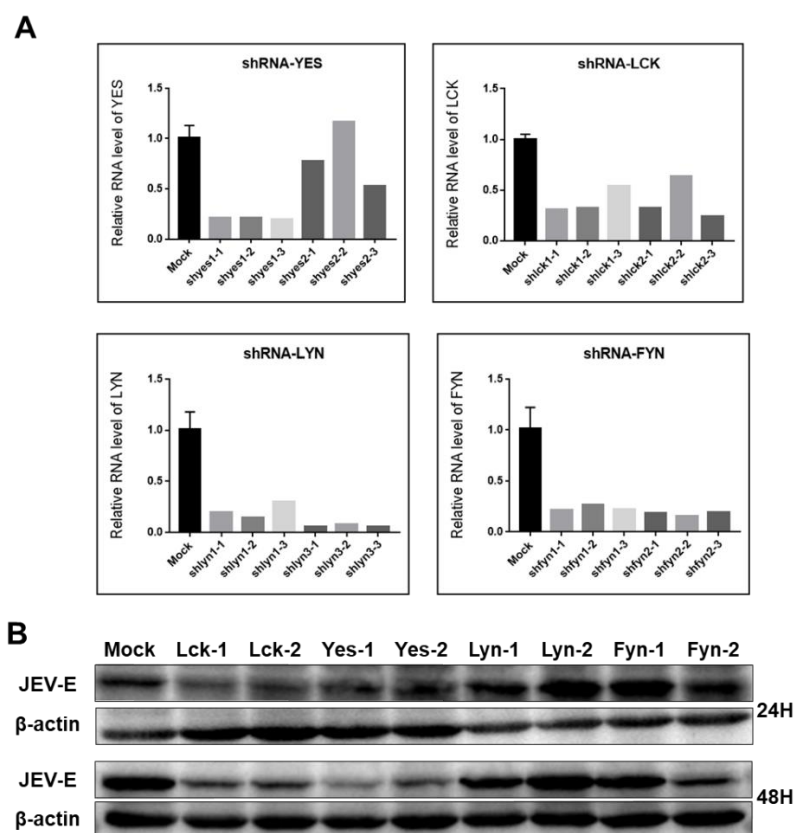


图 5-27 敲低 Lck 和 Yes 抑制 JEV 的复制

Fig. 5-27 Knockdown of Lck and Yes inhibits JEV replication

5.4.2 DHHC21 互作蛋白的提取与质量鉴定

首先我们构建过了表达 DHHC21 的过表达细胞系，我们利用 IF 与 WB 对过表达细胞系进行鉴定，在 IFA 实验中，使用 Flag 抗体对细胞进行一抗孵育，随后用 Alexa Fluor Plus 555 二抗进行标记显色，在转染细胞中可以明显观察到红色荧光（图 5-28A）。由于 DHHC21 含有跨膜结构域，因此我们选择使用室温（R-T）、37℃、50℃、60℃、75℃ 以及 100℃ 的温度梯度处理蛋白质裂解液 5 min 后，接着对处理的蛋白样品进行 SDS-PAGE 上样前，最后进行 WB 显色。结果显示高温处理过后 Flag-DHHC21 的蛋白含量在 21 KD 位置减少（图 5-28B）。

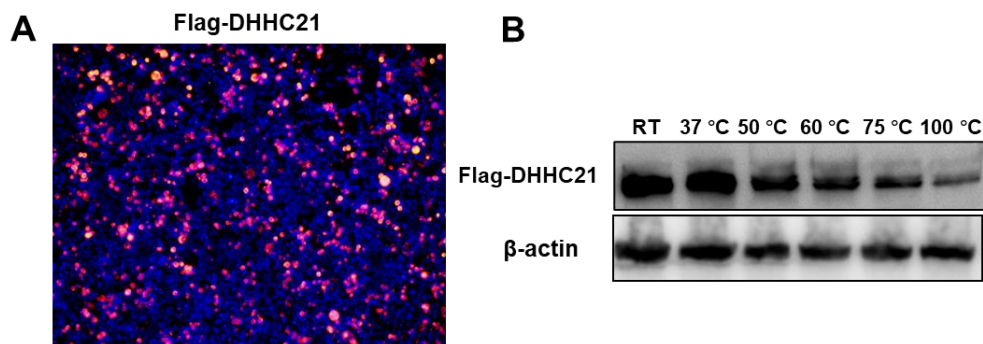


图 5-28 DHHC21 过表达细胞系的验证

Fig. 5-28 Construction of DHHC21 overexpressing cell lines

接下来使用 JEV 感染表达了 Flag-DHHC21 的细胞 24 h 后，收集细胞进行裂解收获蛋白裂解液，将蛋白裂解液与偶联 Flag 抗体的磁珠进行孵育，再通过洗脱去掉没有与 Flag-DHHC21 蛋白结合的杂蛋白，最后进行 SDS-PAGE 和 WB 鉴定最后进行质谱分析（图 5-29A）。并鉴定蛋白的质量偏差整体分布、所含的 Unique 肽段数、肽段长度分布进行鉴定，确定样品的可信度和重复性符合实验要求（图 5-29B, C, D）。

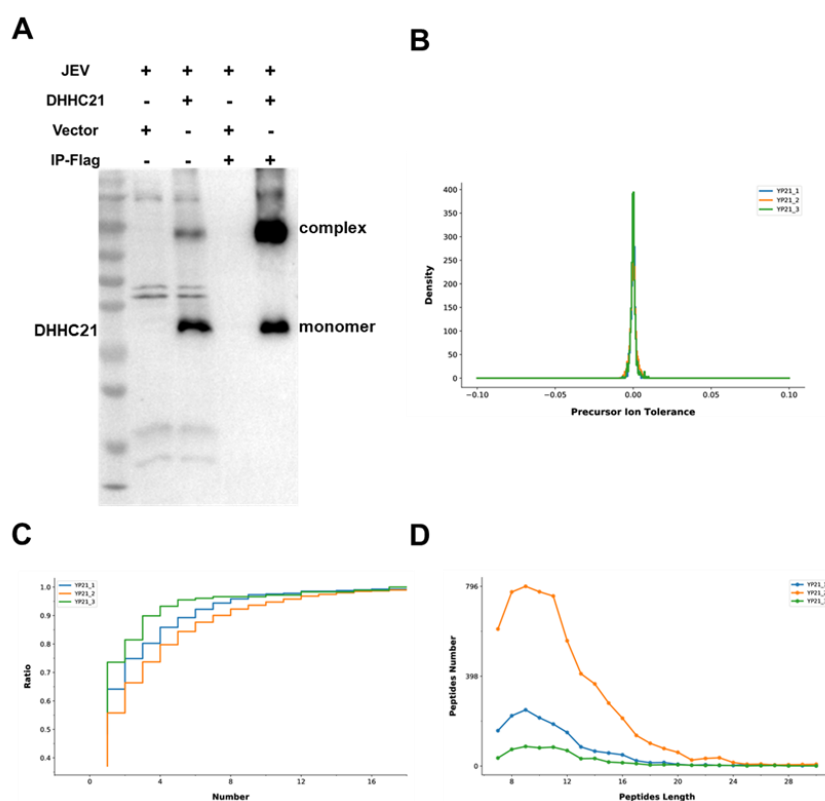


图 5-29 DHHC21 互作蛋白的质量鉴定

Fig. 5-29 Quality identification of DHHC21 interacting proteins

5.4.3 DHHC21 互作蛋白的生物信息学分析

接下来我们将质谱获得的蛋白条目进行基本功能注释包括 KEGG、EDG 和 KOG 分析。KEGG 分析中富集蛋白较多的信号通路为 Human diseases 和 Metabolism，在 Human diseases 目录下富集到大量与细菌、病毒、寄生虫有关的蛋白，其中与病毒感染有关的蛋白质最多为 117 个。此外在 GO、EDG 和 KOG 分析中存在大量与胞内蛋白转运、蛋白质折叠、锌离子结合等通路的蛋白，这些蛋白质功能与棕榈酰化修饰有关。

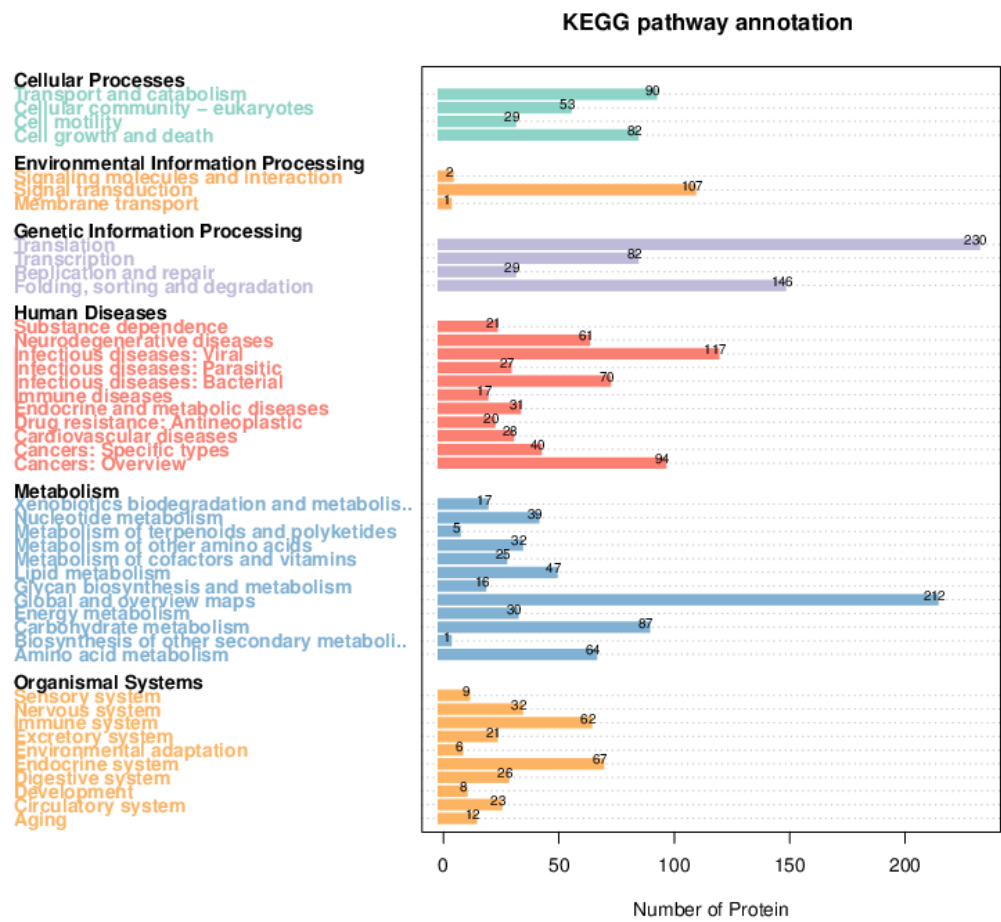


图 5-30 DHHC21 互作蛋白 KEGG 富集分析

Fig. 5-30 KEGG enrichment analysis of DHHC21 interacting protein

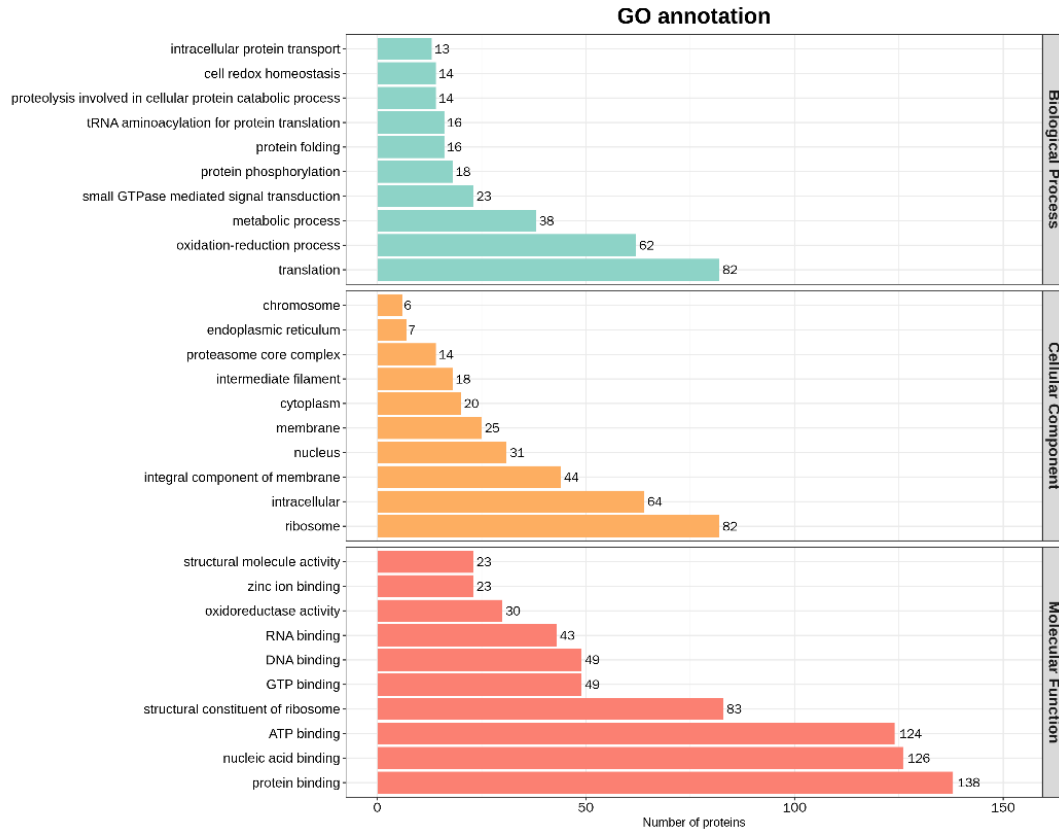


图 5-31 DHHC21 互作蛋白 EDG 富集分析

Fig. 5-31 EDG enrichment analysis of DHHC21 interacting protein

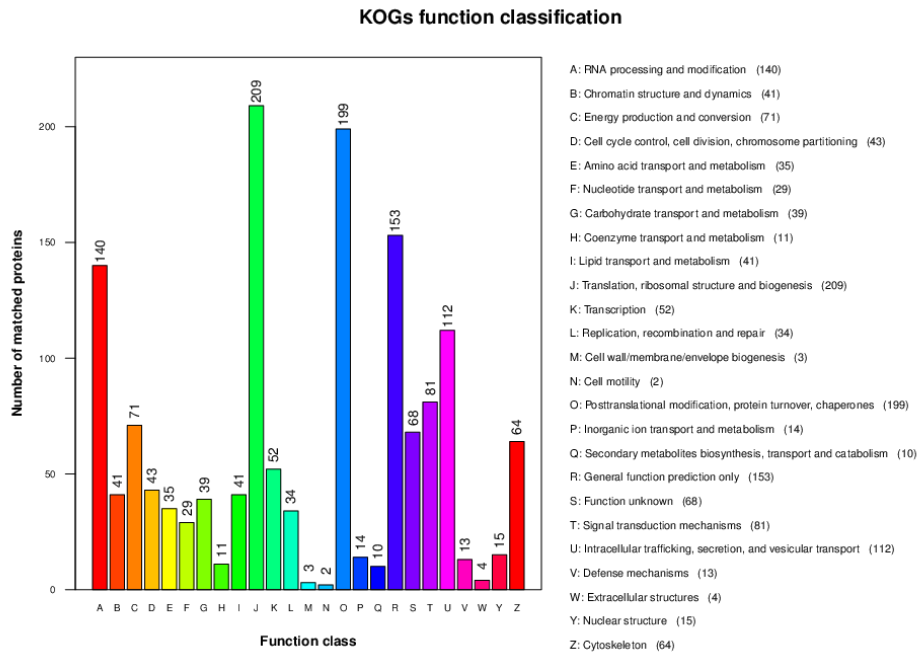


图 5-32 DHHC21 互作蛋白 KOG 注释分析

Fig. 5-32 KOG annotation analysis of DHHC21 interacting proteins

由于前期结果已经表明 DHHC21 主要在细胞质内存在，因此我们利用 Cell-PLoc2.0 对与病毒相关的 117 个蛋白进行亚细胞定位注释。发现其中 45%为核蛋白，剩余 65 个相关蛋白。我们通过 CSS-palm 6.0 对 65 个蛋白的全氨基酸序列进行棕榈酰化修饰预测，发现 29 个蛋白具有棕榈酰化位点。然后利用 String 构建 29 个蛋白的互作网络，HSPA8 位于互作网络的中心位置，HSPA8 作为一个多功能蛋白参与 JEV 复制的多个环节。虽然 CDC42 和 CDK1 也被证实与 JEV 复制有关，但他们分别是通过促进 JEV 内化和抑制一型干扰素途径增强 JEV 的复制，前期结果已经证实 2-BP 处理不影响这两个环节。

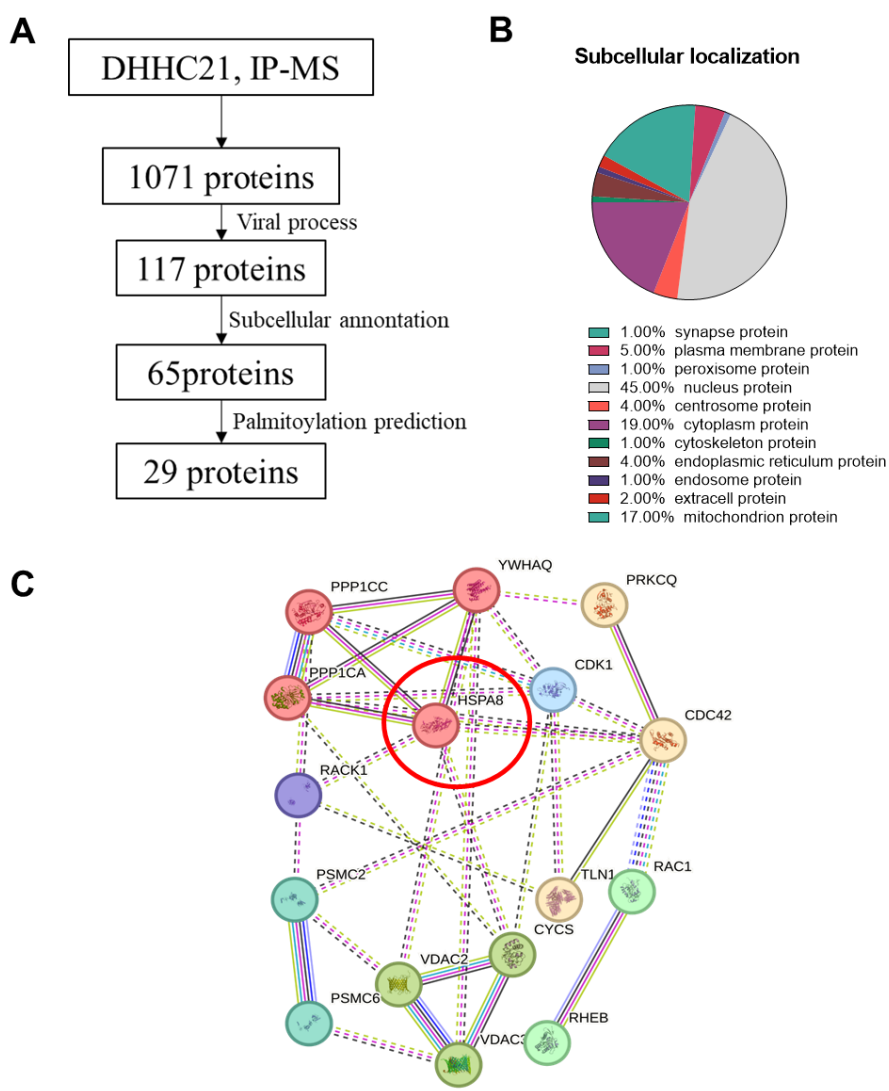


图 5-33 与病毒感染相关的蛋白质分析

Fig. 5-33 Analysis of proteins associated with viral infection

(A) DHHC21 互作蛋白分析流程示意图; (B) Cell-PLoc2.0 预测互作蛋白的细胞定位;
(C) 利用 String 进行蛋白质互作网络分析

(A) Schematic diagram of DHHC21 interacting proteins analysis process; (B) Cell-PLoc2.0 predicted the cellular localization of interacting proteins; (C) protein-protein interaction network analysis using String.

5.4.4 DHHC21 与 HSPA8 相互作用的验证

为了验证 DHHC21 与 HSPA8 是否存在相互作用, 首先我们对 DHHC21 和 HSPA8 进行分析对接预测, 用 PyMol 2.4 完成蛋白质的预处理 (删除水分子和多余配体, 添加氢原子)。选择 HSPA8 为受体蛋白, DHHC2 为配体蛋白, 使用 HDock SERVER (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) 对为 DHHC21 (Uniprot ID: Q8IVQ6) 和 HSPA8 (Uniprot ID: A0A3Q7X441)、进行蛋白质-蛋白质的分子对接。以 Docking Score、Confidence Score 和 Ligand RMSD 被作为对接的评价标准, 得分为 Docking Score: -291.75、Confidence Score: 0.9445 和 Ligand RMSD: 49.63。最后, 我们使用 Pymol 2.0 软件对对接结果进行了可视化处理 (图 5-33)。

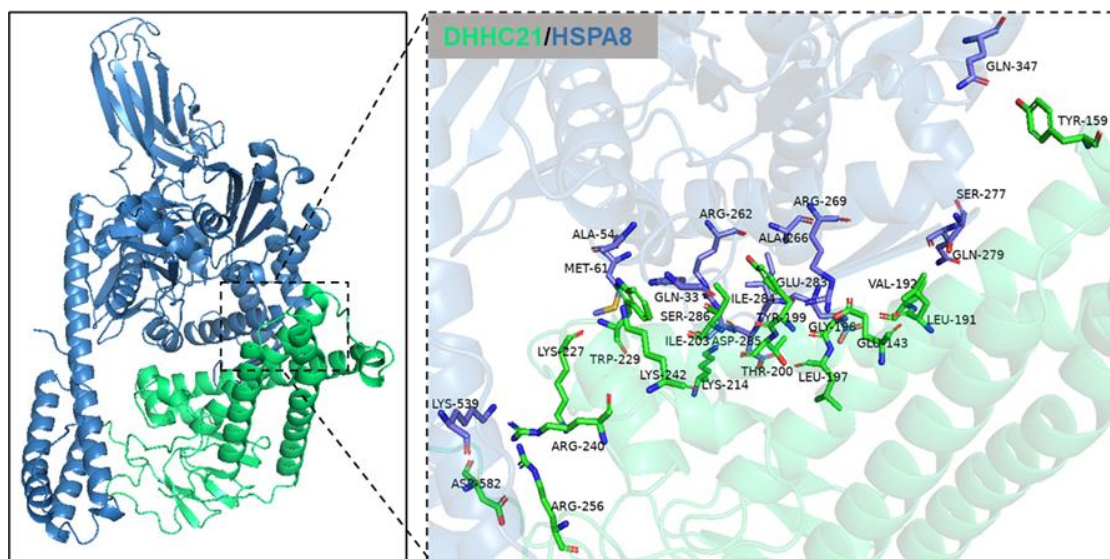


图 5-34 DHHC21 与 HSPA8 的分子对接预测

Fig. 5-33 Molecular docking prediction of the interaction between DHHC21 and HSPA8

根据上述分析结果, HSPA8 可能是 DHHC21 的下游分子参与棕榈酰化修饰对 JEV 复制的调控, 为了验证 DHHC21 与 HSPA8 的互作, 我们在 293T 细胞中同时过表达 Flag-DHHC21 和 HA-HSPA8, 在质粒转染 12 h 后, 使用 JEV 以

MOI=1 感染 24 h 收取蛋白样品。随后将裂解液分别与偶联了 Flag 和 HA 抗体的磁珠进行孵育，免疫共沉淀，随后对酸性洗脱产物进行 WB 显色分析，结果显示 HSPA8 可以与 DHHC21 共沉淀（图 5-34A, B）。随后 IFA 实验进一步证 HSPA8 与 DHHC21 在胞内共定位（图 5-34C）。以上结果说明 DHHC21 可以与 HSPA8 互作。

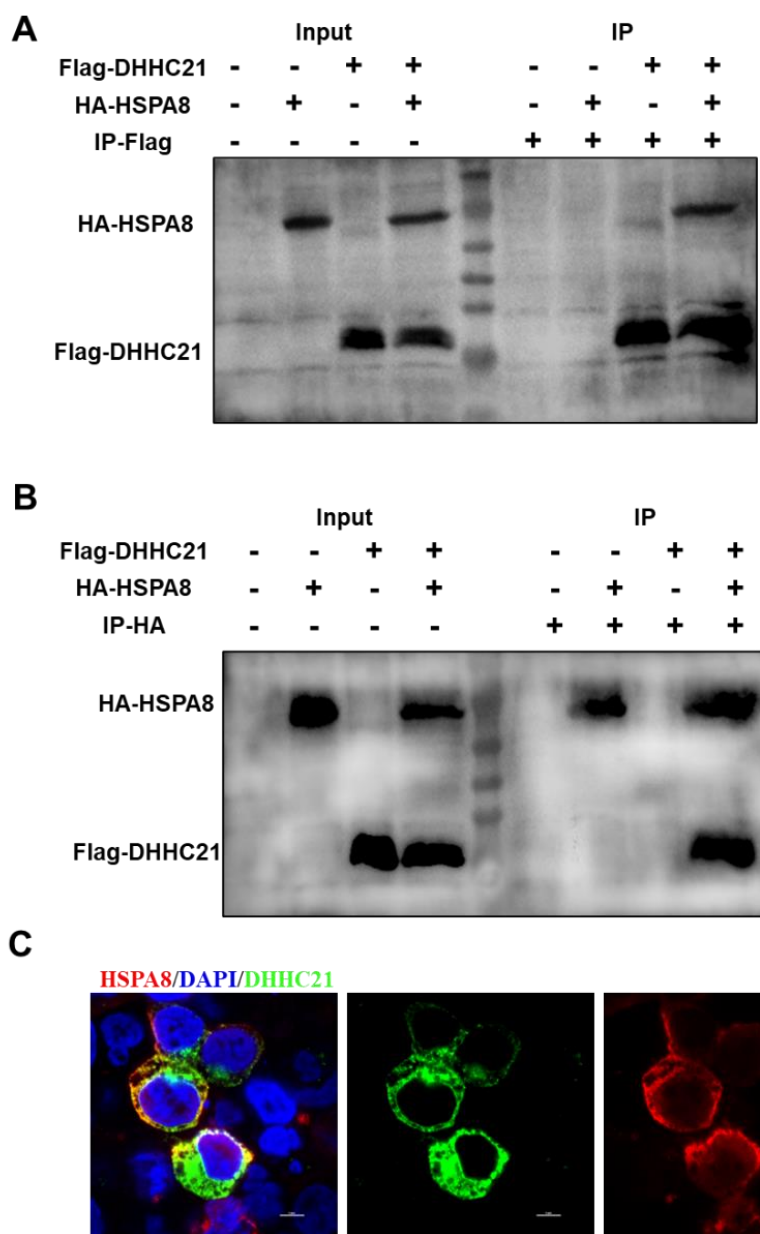


图 5-35 验证 DHHC21 与 HSPA8 互作

Fig. 5-35 Validation of DHHC21 interaction with HSPA8

CO-IP 检测 Flag-DHHC21 与 HA-HSPA8 的互作情况。(A) 偶联 Flag 抗体的磁珠进行免疫沉淀；(B) 偶联 HA 抗体的磁珠进行免疫沉淀；(C) IF 鉴定 HA-HSPA8 与 Flag-DHHC21 共定位。

CO-IP assay of Flag-DHHC21 and HA-HSPA8. (A) immunoprecipitation using magnetic beads conjugated with Flag antibody; (B) immunoprecipitation with magnetic beads conjugated with HA antibody; (C) Co-localization of HA-HSPA8 and Flag-DHHC21 was identified by IF.

5.4.5 HSPA8 棕榈酰化位点预测与鉴定

虽然在前面预测中 HSPA8 存在棕榈酰化修饰，但还没有文献报道关于 HSPA8 的棕榈酰化修饰情况，为了验证 HSPA8 是否会被棕榈酰化修饰，及其潜在的修饰位点。我们在 293T 细胞中过表达 HA-HSPA8，48 h 后收集裂解液，利用 APE 的方法标记棕榈酰化蛋白，WB 检测结果表明 HSPA8 存在棕榈酰化修饰，根据质量漂移条带显示 HSPA8 只存在一个棕榈酰化位点（图 5-35）。

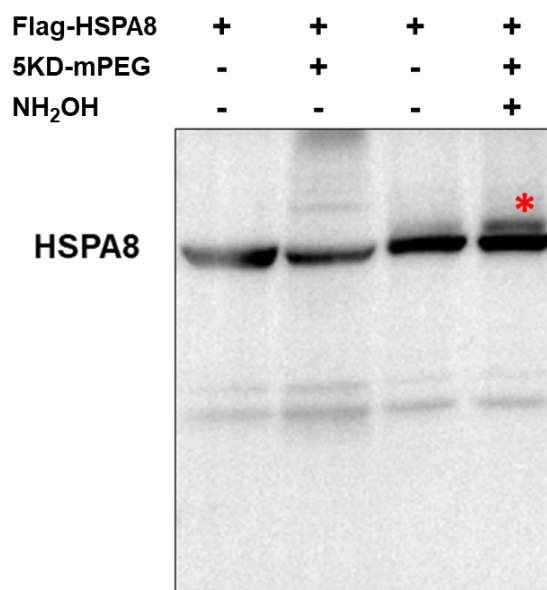


图 5-36 HSPA8 棕榈酰化修饰鉴定

Fig. 5-36 The detection of HSPA8 palmitoylation modification

为了进一步解析 HSPA8 的棕榈酰化修饰位点，我们使用棕榈酰化位点预测软件 CSS-Palm 6.0 对 HSPA8 氨基酸序列进行分析，结果显示，HSPA8 上可能存在 4 个 Cys 修饰位点，C17、C267、C574 和 C603。C17 和 C267 位点位于 HSPA8 的核酸结合区域（NBD）和 ATP 结合区域（ATPase Domain），C574 和 C603 位

点位于 C 末端的盖子区域（图 5-36A）。根据预测结果，我们分别构建了 HSPA8 的棕榈酰化位点突变体（Cys-Ala），命名为 C17A、C267A、C574 和 C603A 并使用 WB 检测载体表达情况图（图 5-36B）。

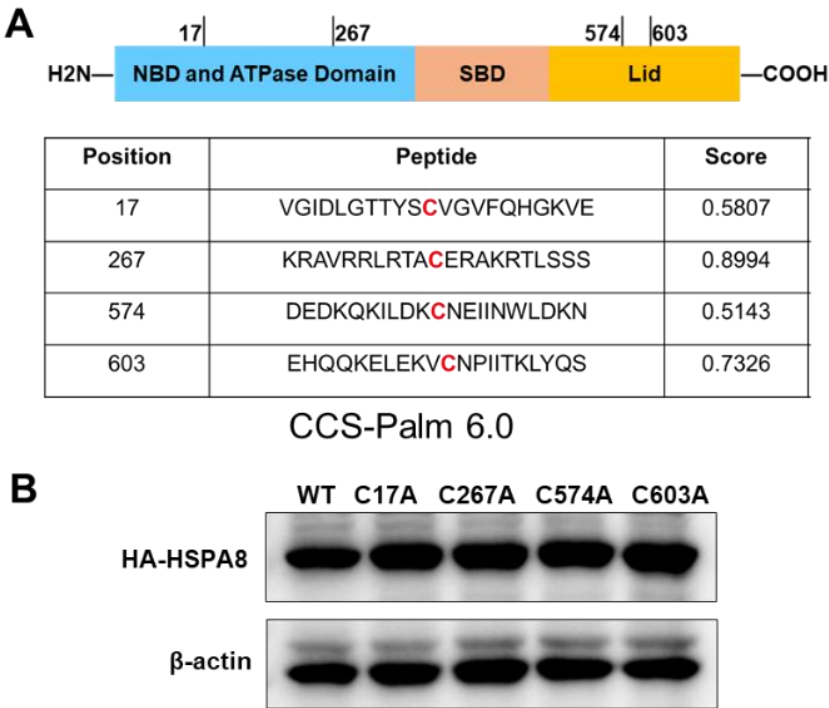


图 5-37 HSPA8 棕榈酰化位点的预测与载体构建

Fig. 5-37 Prediction of HSPA8 palmitoylation sites and construction of mutant vectors

(A) 利用 CSS-Palm6.0 对 HSPA8 进行棕榈酰化位点预测；(B) HSPA8 的棕榈酰化位点突变体构建。

(A)The palmitoylation sites of HSPA8 were predicted by CSS-Palm6.0; (B) Construction of palmitoylation site mutants of HSPA8.

棕榈酰化修饰是一种能够广泛存在的修饰，会特定蛋白质亚域的疏水性，影响蛋白质的定位、积累、分泌和功能。(Dennis and Heather 2023)。因此我们接下来探究了棕榈酰化突变是否影响 HSPA8 的亚细胞定位，首先转染 WT-HSPA8 与棕榈酰化位点突变 C17A、C267A、C574 和 C603A 质粒进入 293T 细胞。在转染 24 h 后对细胞进行固定，分别使用 HA 抗体标记 HA-HASPA8（红色），细胞膜荧光探针 DiO（绿色）标记细胞质膜。利用共聚焦显微镜观察不同棕榈酰化突变体在胞内的分布情况（图 5-37）。根据 IFA 结果显示，与转染 WT-HSPA8 相比，棕榈酰化位点突变并未影响蛋白质在亚细胞内的空间分布。

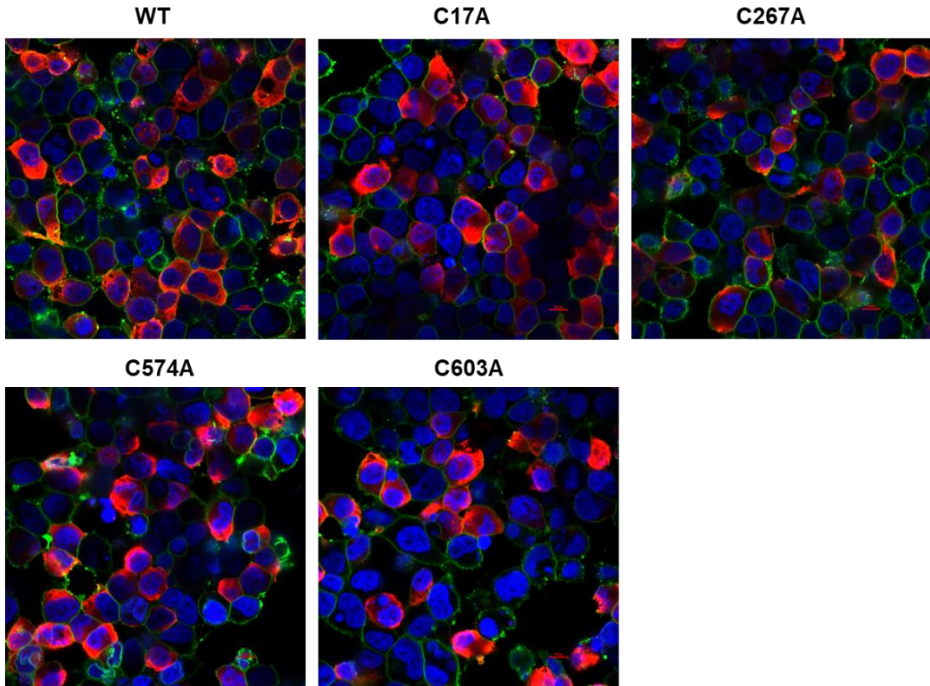


图 5-38 HSPA8 棕榈酰化突变体亚细胞分布鉴定

Fig. 5-38 Identification of subcellular distribution of HSPA8 palmitoylation mutants

最后，转染含有棕榈酰化位点突变的 HSPA8 质粒进入 293T 细胞，48 h 后收集蛋白裂解液，我们采用 APE 方法检查了不同位点突变对 HSPA8 棕榈酰化状态的影响。WB 结果显示野生型的 WT、C17A、C267A 和 C603A 均存在一条质量漂移条带，而 C574A 不存在质量漂移条带（图 5-38）。以上结果说明 HSPA8 存在棕榈酰化修饰现象，棕榈酰化修饰位点位于 574 位半胱氨酸，棕榈酰化位点突变不影响 HA-HAPS8 的亚细胞空间分布。

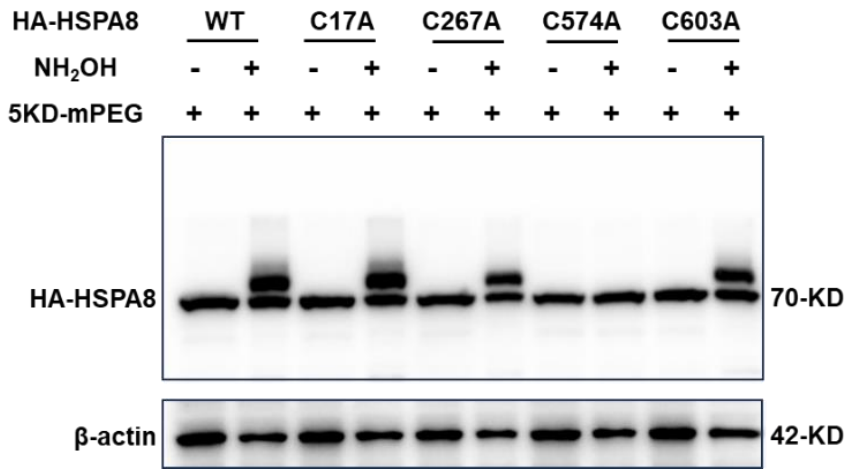


图 5-39 HSPA8 棕榈酰化位点的鉴定

Fig. 5-39 Identification of the HSPA8 palmitoylation site

5.4.6 DHHC21 促进 HSPA8 棕榈酰化修饰

上述实验已经证明了 HSPA8 可以与 DHHC21 互作，且 HSPA8 的 574 位半胱氨酸存在棕榈酰化修饰。因此接下来我们探究 DHHC21 是否可以催化 HSPA8 的棕榈酰化修饰，我们在 12 孔板中接种 293T 细胞，待细胞密度至 80% 后，同时转染 HA-HSPA8 (1ng) 和不同浓度的 Flag-DHHC21 (0.4、0.6、0.8、1.0 ng) 质粒进入 293T 细胞，在转染 48 h 后处理细胞收集裂解液，利用 APE 法对 HSPA8 棕榈酰化修饰程度进行鉴定 (图 5-39)。根据 WB 结果显示，DHHC21 可以促进 HSPA8 的棕榈酰化修饰，对 WB 条带进行灰度分析，并计算棕榈酰化的 HSPA8 蛋白含量在总 HSPA8 蛋白中的比例，发现 DHHC21 在一定范围内可以增加 HSPA8 的棕榈酰化程度，但当转染 DHHC21 浓度过高时反而会抑制 HSPA8 的棕榈酰化修饰程度。

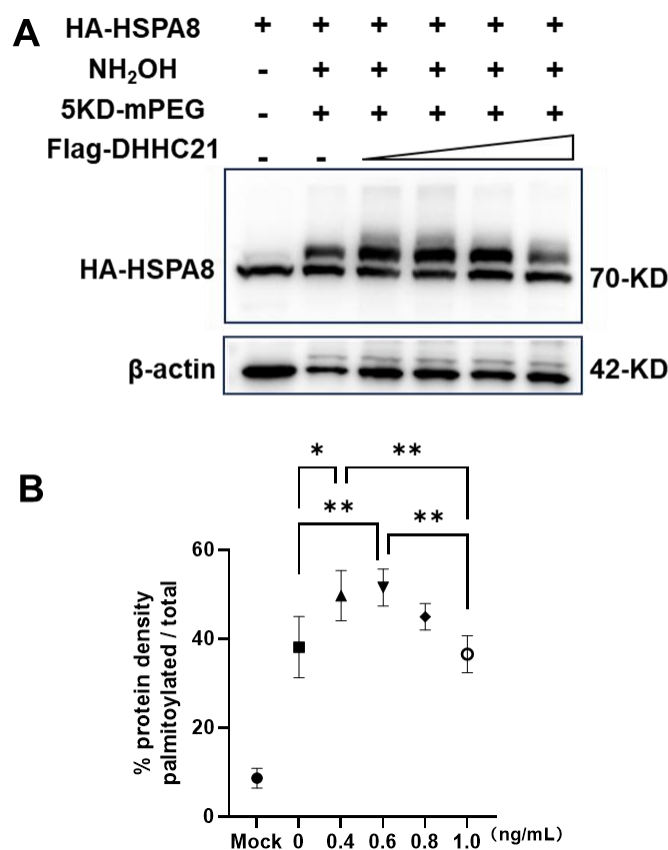


图 5-40 DHHC21 促进 HSPA8 棕榈酰化修饰

Fig. 5-40 DHHC21 enhances HSPA8 palmitoylation modification

5.4.7 棕榈酰化位点突变缩短 HSPA8 的半衰期

棕榈酰化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式，可以影响蛋白质的稳定性和功能。一些研究表明，棕榈酰化可以影响蛋白质的半衰期。在一些情况下，棕榈酰化会减慢蛋白质的降解速率，从而延长其在细胞内的寿命。接下来我们对 WT-HSPA8 与 C574A 突变体的半衰期进行检测，首先，在 293T 细胞中转染等量的 WT-HSPA8 和 C574A 突变体质粒（1ng/mL）。转染 36 H 后，向细胞培养基中加入终浓度为 50 mg/mL 的环己酮霉素（Cycloheximide, CHX），用于抑制蛋白质合成，在 CHX 处理后的每隔 2 h 取样，以研究蛋白质的降解速率。结果显示 WT-HSPA8 的蛋白质半衰期约为 10 h，HSPA8 的 C574A 突变体的蛋白质半衰期缩短至 4 h，经过统计分析表明具有差异显著性（图 5-40A, B）。

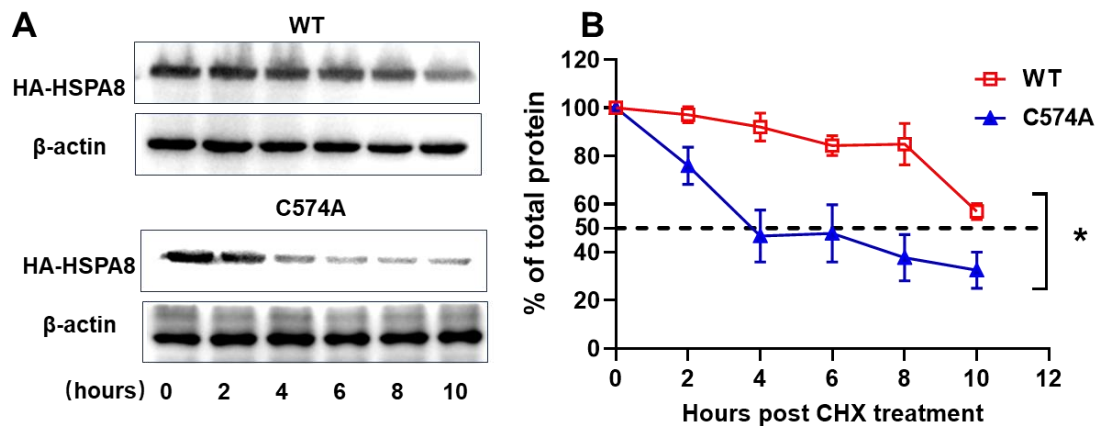


图 5-41 HSPA8 蛋白质半衰期检测

Fig. 5-41 HSPA8 protein half-life assay

5.5 讨论

JEV 作为典型的嗜神经病毒可以通过多种途径进入 CNS，进而引发病毒性脑炎，造成死亡或严重的神经系统后遗症。我们之前的研究表明，JEV 可以在 hBMEC 中建立持续感染，并且不会导致细胞病变效应，这表明 hBMEC 可能是 JEV 的潜在病毒库，有助于病毒跨越 BBB 传播并侵袭 CNS(Wang et al 2018)。而且 JEV 单独感染 hBMEC 不会导致 BBB 的渗漏，JEV 进入 CNS 后，感染胶质细胞引起大量炎症因子释放作用于 BMEC 导致 BBB 的破坏(Zhang et al 2023)。CNS 具有“免疫特权”，98% 的小分子药物和几乎 100% 的大分子药物无法穿越 BBB，因此在发生病毒性脑炎后，尚无有效的治疗方案(Pardridge et al 1991)。hBMEC 作为 BBB 的主要组成细胞，在抑制毒感染和阻止病毒通过细胞旁路穿越进入 CNS，发挥不可替代的作用。因此研究 JEV 在 hBMEC 中的研究具有重要现实意义。

棕榈酰化修饰可以调控多种疾病的发生和发展，包括病毒感染（流感病毒、SARS-CoV-2 和 HIV 等）、神经系统疾病（阿尔茨海默病、亨廷顿病和精神分裂症）和癌症(Cho and Park 2016, Yuan et al 2024)。棕榈酰化相关蛋白或酶很可能成为未来重大疾病治疗的突破点(Young et al 2012, Wu et al 2021a)。因此在本实验中探究了 hBMEC 的整体棕榈酰化修饰与 JEV 复制的关系。首先我们发现 2-BP 具有广谱抑制 JEV 复制的能力，且可以抑制内皮炎症提高攻毒小鼠的死亡率（结果 5.1）。JEV 感染后不仅改变了 hBMEC 的棕榈酰化修饰水平而且增加了细胞对棕榈酰基 PA 的吸收。通过对 JEV 感染后上调表达的 DHHCs 进行 shRNA 敲低，JEV 感染筛选，发现 DHHC21 在 JEV 复制过程中发挥主要促进作用的棕榈酰化转移酶。由于 DHHC21 具有多个底物蛋白，我们通过 IP-MS 发掘 DHHC21 互作蛋白并进行 APE 实验验证，发现 DHHC21 可以催化 HSPA8 在 C574 位点发生棕榈酰化修饰。HSPA8 作为伴侣蛋白参与了 JEV 的吸附、内化以及复制复合体形成，在 JEV 复制过程中起着重要的辅助作用，帮助病毒完成其复制周期(Zhu et al 2012b, Weng et al 2018, Yadav et al 2022)。HSPA8 的 C574 位点的棕榈酰化修饰，没有改变 HSPA8 的亚细胞定位，但是缩短了 HSPA8 的半衰期。同时检测了 DHHC21 的偏好底物 SFKs 中 Lck 和 Yes 两个蛋白磷酸化激活后，促进了

JEV 的复制。这些结果表明，JEV 可以通过调控细胞的棕榈酰化修饰，促进自身的增殖。

5.5.1 2-BP 抑制 JEV 的复制

据估计，多达 10% 的人类蛋白质可被棕榈酰化修饰调节。其中一些是与抗病毒应答有关的棕榈酰化蛋白如 STING、MyD8 和 STAT3。以及本研究涉及的 IFITM1 均需要棕榈酰化修饰才可以发挥抗病毒。但与预测相反的是在棕榈酰化广谱抑制剂 2-BP 处理 hBMEC 细胞后，JEV 的复制并没有上调，反而出现显著下调。此外有研究表明 2-BP 对多种病毒均表现出抗病毒作用如 SARS-CoV-2、MHV-A59、hCoV-OC43 以及 CHIKV 等(Liu et al , Alonso et al 2012)。在我们对 Swiss-Palm 的数据库进行 String 分析时发现多个是已被证明具有棕榈酰化修饰且与 JEV 复制相关的蛋白如 CAV1、EGFR 和 Furin (Zhao et al 2021) (Liu et al 2020) (Monson et al 2021)，其中 Furin 可以介导的多种病毒包膜糖蛋白的切割，包括疱疹病毒、冠状病毒、黄病毒、丝状病毒、正粘病毒、逆转录病毒等(Braun and Sauter 2019)。因此，整体水平的棕榈酰化抑制通常会抑制病毒的增殖。

2-BP 作为一种不能参与代谢的 PA 溴代衍生物，可用作棕榈酰化抑制剂，它无差别且不可逆地抑制所有 DHHCs 活性(Yao et al 2019, Cheng et al 2021)。同时也可以参与脂质化代谢过程中。2-BP 处理可能会影响到多个生物学过程，从而影响病毒的复制。有研究表明证明了 2-BP 能够在一定浓度下可以消耗各种细胞系的脂滴（Lipid droplets, LD）(Cho and Park 2016, Ramli et al 2020)。同时，2BP 处理显著降低了线粒体脂肪酸的含量(Dong et al 2022)。LD 是病毒复制的能量来源，它们的消耗导致病毒复制受到抑制。而且研究表明 LD 可以作为病毒的转运和组装场所，参与病毒复制的其他环节。因此 2-BP 可以通过破坏 LD 的途径抑制病毒的复制(Crawford and Desselberger 2016, Liu et al 2024)。但在我们的实验中发现，不同浓度的 PA 和 SA 处理 hBMEC 细胞后，hBMEC 中关于脂肪酸吸收，氧化利用的基因没有发生显著变化。在 JEV 感染，使用偶连荧光基团的 PA 处理 hBMEC 后没有观察到病毒与 PA 的共定位现象。同时 JEV 感染后，hBMEC 对于 PA 的吸收虽然增加，但是利用减低了，且 JEV 感染后胞内的 ATP 含量是下降的。这些结果提示 2-BP 对于 JEV 的抑制不是通过脂肪酸代谢途径。

BMEC 激活上调表达细胞粘附分子与趋化因子可以介导外周免疫细胞浸润，加剧 BBB 的破坏(Li et al 2015)。CNS 中大量的炎症因子，作用于 BMEC 引起的紧密连接蛋白的下调是导致 BBB 破坏的主要诱因(Yadav et al 2022)。因此在 JEV 感染过程中，降低 BMEC 的敏感度可以保护 BBB 的完整性。我们在实验中发现 2-BP 处理还降低了 hBMEC 的炎症反应，在 PMA 处理后可以抑制相关的炎症因子 (IL-4、6、8、1b 和 TNF- α)、趋化因子 (MCP-1) 以及细胞间黏附分子 (ICAM-1) 的上调。虽然 2-BP 被认为是一种蛋白棕榈酰化抑制剂，它可能通过抑制其他参与脂质代谢的酶，具有脱靶效应，抑制过于广泛对细胞具有细胞毒性。因此开发新的特异的棕榈酰化抑制剂可以帮助减少脱靶效应并提高治疗的针对性和安全性。这些发现提示，2-BP 处理可以抑制病毒复制和保护体外 BBB，抑制棕榈酰化修饰可能为治疗 JEV 感染提供新的思路 and 方案。

5.5.2 HSPA8 的棕榈酰化修饰影响其蛋白降解

据报道热休克蛋白 HSP90 α 可以发生棕榈酰化修饰 (Xue et al 2023)。此外 HSPA1A、HSPA9、HSPB1 和 HSPB5 均有报道称可以与脂质膜反应或具有与脂质结合的功能，这些结合过程可能与蛋白自身的脂质修饰相关(De Maio et al 2019, Dores-Silva et al 2020, Smulders et al 2020)。在对 HSPA8 的 4 个 Cys 残基反应性差异的机制探究实验中发现，质谱检测时发现，HSPA8 的 524-616 属于底物结合结构域 (substrate-binding domain, SBD α)，除了含有常规分子量为 10952 道尔顿的分子内二硫键合的 HSPA8 的 SBD α ，还存在一个 11018 道尔顿未确定的成分，在 SBD α 内 Cys 除了形成二硫键外，还具有其他结合活性(Hong et al 2023)。在我们对 IP-MS 的结果进行验证时，可以观察到 HSPA8 与 DHHC21 共定位表达，且存在相互作用，并且首次确认了 HSPA8 的 C574 位点上存在棕榈酰化修饰。在探究棕榈酰化位点对 HSPA8 的影响是发现，C754A 位点突变导致 HSPA8 的半衰期缩短，蛋白含量降低。IF 显示棕榈酰化位点突变并不影响蛋白的亚细胞定位 (结果 4.3.6 和 4.3.7)，这些结果说明，在 HSPA8 蛋白中不是通过影响其亚细胞定位进而影响蛋白质的稳定性。C574 位点位于 HSPA8 的 LID 结构域(残基 510-606)，LID 结构域的功能主要是提高 HSPA8 与客户蛋白的结合亲和力，降低交换率。研究表明，泛素连接酶 HSP70 羧基末端相互作用蛋白

(Carboxyl terminus of HSP70 interacting protein, CHIP) 通过泛素化 HSP70/HSPA8 和 HSP90 的客户蛋白, 从而靶向这些底物蛋白进行降解, CHIP 和 HSC70 LID 结构域之间的相互作用是 HSP70/HSPA8 或 HSP70/HSPA8 结合底物蛋白泛素化的必要条件(Zhang et al 2015)。有报道称 HSP70/HSPA8 的 LID 结构域和尾部存在多种 PTMs, 如 636 位苏氨酸和 611 位酪氨酸的磷酸化修饰以及 561 位赖氨酸的甲基化修饰, 这些位点的翻译后修饰均直接影响 HSP70/HSPA8 与底物的结合效率与稳定性(Jakobsson et al 2013, Ruse et al 2008)。本研究发现 HSPA8 在 C574 位点存在的棕榈酰化修饰, 可能会影响其与客户蛋白的结合效率与稳定性, 以及影响其蛋白质的降解途径及速率。

5.5.3 DHHC21 通过多种靶蛋白促进 JEV 复制

在 JEV 感染 hBMEC 过程中, 细胞整体的蛋白质棕榈酰化修饰增加, 24 个 DHHCs 表特征变化, 通过对上调表达的 DHHCs 进行基因敲低, 发现敲低 DHHC2、6 和 21 均可以抑制 JEV 的复制, 其中敲低 DHHC21 抑制最为显著(结果 4.2.2)。根据蛋白质全氨基酸序列的同源性将 PATs 划分为 4 个亚家族, 一般情况下底物对应的 DHHCs 是有冗余的, 多个 DHHCs 可以催化同一个底物, 且具有代偿作用(Liao et al 2023, Essandoh et al 2024)。其中通过 PDZ 结合基序预测发现 DHHC3、DHHC7、DHHC16、DHHC17、DHHC20 和 DHHC21 中具有相似的功能(Barker et al 2024)。但在本实验中, 使用 shRNA 敲低 DHHC21 后没有检测到其具有相似 PDZ 结合基序 DHHCs 的基因变化, 在细胞系中敲除 DHHC21 没有代偿作用的发生。而且与 2-BP 处理情况一致, DHHC21 敲低到之后 JEV 复制下降, 这表明 DHHC21 棕榈酰化修饰的底物的 PATs 没有冗余(JEV 感染过程中), DHHC21 在促进 JEV 感染过程中发挥的作用是特异的(结果 4.2.4)。在大多数使用蛋白过表达的催化实验中可以发现多个 DHHCs 可以对同一底物进行催化, 过表达大量的蛋白可能会造成 DHHCs 亚细胞定位的改变, 导致出现错误判断(Dennis and Heather 2023)。但是真实条件下, 会发现底物与 DHHCs 在同一个细胞系中不能被同时检测到, 因此在确定 DHHCs 与底物是否存在关系时, 明确 DHHCs 与底物的组织及细胞特异性表达至关重要(Jin et al 2021)。

在本研究中发现过表达不同剂量的 DHHC21, 探究 DHHC2-1 是否对 HSPA8 具有催化作用时发现, 在较低剂量的质粒转染的情况下, DHHC21 对于 HSPA8 的棕榈酰化修饰具有促进作用, 但是当转染质粒剂量较高时, 反而会抑制 HSPA8 的棕榈酰化。棕榈酰化修饰包含两个步骤, 在第一个自棕榈酰化步骤中形成共价棕榈酰硫酯酶中间体, 第二个步骤中将棕榈酰部分从 PAT 转移到底物蛋白上(Guan and Fierke 2011, Ikushiro and Hayashi 2011)。如果在细胞内存在大量的外源 DHHCs 表达, 在经过第一个棕榈酰化修饰步骤后, 会出现棕榈酰-COA 被消耗, 难以有效转移到底物蛋白, 这也表明了 DHHCs 催化过程中复杂的调节机制。此外, 几种内皮棕榈酰化蛋白已被确定为 DHHC21 的直接底物, 包括血小板内皮细胞粘附分子 (PECAM-1)、eNOS、CAV-1、SOD1 和 Fyn, 其中许多与内皮炎症和屏障功能有关如, PECAM-1 促进白细胞跨内皮迁移, Fyn 介导内皮细胞-细胞连接的解离, eNOS 衍生的 NO 增加血管通透性(Yeste-Velasco et al 2015, Tonn Eisinger et al 2018)。在最近的一项研究中, DHHC21 敲低导致 eNOS 棕榈酰化降低和 NO 释放受损(Shu et al 2015)。在脓毒症模型和烧伤模型中, 也证实 DHHC21 可以调节内皮炎症型信号通路中的蛋白质棕榈酰化, 增强炎症反应, DHHC21 功能缺陷可以保护炎症期间的内皮损伤。此外, 还存一些棕榈酰化修饰共性的问题制约了 DHHC21 的研究, 在 DHHCs 酶的特异性活性量化存在技术上的挑战, 因此对于这些酶在不同细胞和组织中的确切作用和底物范围的了解还很有限。这些技术和模型方面的挑战使得我们对棕榈酰化过程中底物和功能的认识受到限制(Mukherjee et al 2017, Yang et al 2024)。因此, 进一步阐明内皮中在病毒感染和炎症条件下 DHHC21 对全部靶蛋白的作用, 有助于揭示病毒感染和内皮炎症的病理生理机制, 同时促进细胞靶向药物的开发。

综上所述, 本研究表明了棕榈酰化的 IFITM1 具有抗病毒和维持 BBB 稳定的双重作用, 但 JEV 通过改变 DHHCs 家族的表达模式, 可以抑制 IFITM1 的棕榈酰化修饰, 进而导致其错误定位, 失去生物学功能。但随后的实验发现, 在 JEV 感染过程中 hBMEC 的整体棕榈酰化水平升高, 2-BP 处理可以显著抑制 JEV 的复制, 表明整体的棕榈酰化修饰是有利于 JEV 复制的, 同时我们发现 JEV 的 PrM 和 NS4B 激活 ATF3 上调表达进而促进 DHHC21 转录, DHHC21 通过下游靶蛋白 HSPA8 和 SFKs 促进 JEV 复制。表明 JEV 可以通过调节宿主棕榈酰化修

饰，进行免疫逃逸和促进自身复制。这些发现为理解 JEV 复制机制与棕榈酰化修饰之间的关系提供了新的见解，有助于深入了解 JEV 感染的分子机制以及相关疾病的治疗途径。

5.6 小结

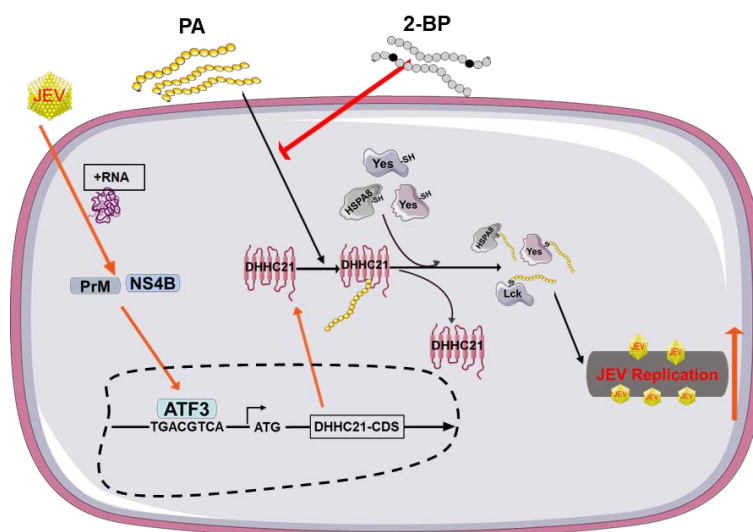


图 5-42 DHHC21 促进 JEV 增殖的机制

Fig. 5-42 Illustrates the mechanism by which DHHC21 promotes JEV proliferation.

最后，对上述研究结果做出总结，棕榈酰化抑制剂 2-BP 处理不仅可以抑制 JEV 在多种细胞中复制，而且可以减缓 hBMEC 的炎症反应，此外 2-BP 还可以缓解由 TNF- α 引起的 BBB 模型的破坏。JEV 感染不仅促进了 hBMEC 对棕榈酰基 PA 的吸收，同时上调了细胞的整体棕榈酰化修饰水平，在感染过程中棕榈酰化修饰有助于 JEV 复制。通过研究我们发现 DHHC21 是 JEV 复制过程中的关键棕榈酰化酶，敲低 DHHC21 可以抑制 JEV 的复制。JEV 的 PrM 和 NS4B 蛋白可以刺激转录因子 ATF3 上调表达，进一步激活 DHHC21 的表达。通过 IP-MS 我们鉴定了 DHHC21 的下游靶蛋白 HSPA8，并且通过 APE 实验首次表明 HSPA8 在 C574 位点存在棕榈酰化修饰，棕榈酰化位点突变导致 HSPA8 半衰期缩短，蛋白含量降低。另外 DHHC21 的偏好底物 Lck、Yes 也可以磷酸化修饰促进 JEV 的复制。

第六章 结论

- 1) 棕榈酰化修饰的 IFITM1 在 hBMEC 中具有抗病毒和稳定 BBB 的双重功能。
- 2) IFITM1 具有 C52、53 和 84 三个棕榈酰化修饰位点，棕榈酰化修饰位点对于 IFITM1 发挥正确生物学功能是必须的。
- 3) JEV 可以通过抑制 DHHC1、23 和 24 的表达，抑制 IFITM1 的棕榈酰化修饰过程，进行免疫逃逸。
- 4) 2-BP 抑制 JEV 的复制具有广谱性，且可以降低 hBMEC 的炎症反应。
- 5) HSPA8 具有 C574 一个棕榈酰化位点，C574 位点突变导致 HSPA8 半衰期缩短。
- 6) DHHC21 是 JEV 复制过程中的关键棕榈酰化修饰酶，可以通过底物蛋白 Lck、Yes 和 HSPA8 促进 JEV 复制。

参考文献

1. Adetunji SA, Smolensky D, Mitzel DN, Owens JL, Chitko-McKown CG, Cernic chiaro N, Noronha LE. In Vitro Infection Dynamics of Japanese Encephalitis Virus in Established Porcine Cell Lines. *Pathogens*, 2021, 10(11):12387
2. Akimzhanov AM, Boehning D. Rapid and transient palmitoylation of the tyrosine kinase Lck mediates Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(38): 11876-11880
3. Akimzhanov AM, Wang X, Sun J, Boehning D. T-cell receptor complex is essential for Fas signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(34): 15105-15110
4. Alonso AM, Coceres VM, De Napoli MG, Nieto Guil AF, Angel SO, Corvi MM. Protein palmitoylation inhibition by 2-bromopalmitate alters gliding, host cell invasion and parasite morphology in *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2012, 184(1): 39-43
5. Antoniewicz MR. A guide to ¹³C metabolic flux analysis for the cancer biologist. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(4): 1-13
6. Ashraf U, Ding Z, Deng S, Ye J, Cao S, Chen Z. Pathogenicity and virulence of Japanese encephalitis virus: Neuroinflammation and neuronal cell damage. *Virulence*, 2021, 12(1): 968-980
7. Bakhache W, Neyret A, Bernard E, Merits A, Briant L. Palmitoylated Cysteines in Chikungunya Virus nsP1 Are Critical for Targeting to Cholesterol-Rich Plasma Membrane Microdomains with Functional Consequences for Viral Genome Replication. *J Virol*, 2020, 94(10): e02183-19
8. Barber KW, Rinehart J. The ABCs of PTMs. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(3): 188-192
9. Barker E, Milburn A, Helassa N, Hammond D, Sanchez-Soriano N, Morgan A, Barclay J. Proximity labelling reveals effects of disease-causing mutation on the DNAJC5/cysteine string protein α interactome. *Biochem J*, 2024, 481(3): 141-160
10. Barreca V, Boussadia Z, Polignano D, Galli L, Tirelli V, Sanchez M, Falchi M, B

- ertuccini L, Iosi F, Tatti M, Sargiacomo M, Fiani ML. Metabolic labelling of a subpopulation of small extracellular vesicles using a fluorescent palmitic acid analogue. *J Extracell Vesicles*, 2023, 12(12): e12392
11. Barzon L, Palù G. Recent developments in vaccines and biological therapies against Japanese encephalitis virus. *Expert Opin Biol Ther*, 2018, 18(8): 851-864
12. RS, Yang X, Meegan JE, Overstreet JW, Yang CGY, Elliott JA, Reynolds JJ, Chab BJ, Pivetti CD, Mitchell DA, Wu MH, Deschenes RJ, Yuan SY. Palmitoyl acyltransferase DHHC21 mediates endothelial dysfunction in systemic inflammatory response syndrome. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 12823
13. Benmimoun B, Papastefanaki F, Périchon B, Segklia K, Roby N, Miriagou V, Schmitt C, Dramsi S, Matsas R, Spéder P. An original infection model identifies host lipoprotein import as a route for blood-brain barrier crossing. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6106
14. Bian P, Ye C, Zheng X, Luo C, Yang J, Li M, Wang Y, Yang J, Zhou Y, Zhang F, Lian J, Zhang Y, Jia Z, Lei Y. RIPK3 Promotes JEV Replication in Neurons via Downregulation of IFI44L. 2020, 11: 368
15. Bieerkehazhi S, Fan Y, West SJ, Tewari R, Ko J, Mills T, Boehning D, Akimzhanov AM. Ca²⁺-dependent protein acyltransferase DHHC21 controls activation of CD4⁺ T cells. *J Cell Sci*, 2022, 135(5): jcs258186
16. Bijlmakers MJ, Marsh M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(1): 32-42
17. Blanc M, David F, Abrami L, Migliozi D, Armand F, Bürgi J, van der Goot FG. SwissPalm: Protein Palmitoylation database. *F1000Res*, 2015, 4: 261
18. Braun E, Sauter D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology*, 2019, 8(8): e1073
19. Cai J, Cui J, Wang L. S-palmitoylation regulates innate immune signaling pathways: molecular mechanisms and targeted therapies. *Eur J Immunol*, 2023, 53(10): e2350476
20. Cao Y, Qiu T, Kathayat RS, Azizi S-A, Thorne AK, Ahn D, Fukata Y, Fukata M,

- Rice PA, Dickinson BC. ABHD10 is an S-depalmitoylase affecting redox homeostasis through peroxiredoxin-5. *Nature Chemical Biology*, 2019a, 15(12): 1232-1240
21. Cao YQ, Yuan L, Zhao Q, Yuan JL, Miao C, Chang YF, Wen XT, Wu R, Huang XB, Wen YP, Yan QG, Huang Y, Han XF, Ma XP, Cao SJ. Hsp40 Protein DNAJB6 Interacts with Viral NS3 and Inhibits the Replication of the Japanese Encephalitis Virus. *Int J Mol Sci*, 2019b, 20(22): 5719
22. Castro-Mondragon JA, Riudavets-Puig R, Rauluseviciute I, Lemma RB, Turchi L, Blanc-Mathieu R, Lucas J, Boddie P, Khan A, Manosalva Pérez N, Fornes O, Leung TY, Aguirre A, Hammal F, Schmelter D, Baranasic D, Ballester B, Sandelin A, Lenhard B, Vandepoele K, Wasserman WW, Parcy F, Mathelier A. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D165-d173
23. Chen HW, Zhang YG, Zhang WJ, Su J, Wu H, Fu ZF, Cui M. Palmitoylation of h IFITM1 inhibits JEV infection and contributes to BBB stabilization. *Int J Biol Macromol*, 2024, : 129731
24. Chen JJ, Fan Y, Boehning D. Regulation of Dynamic Protein S-Acylation. 2021, 8: 656440
25. Cheng WX, Ren Y, Lu MM, Xu LL, Gao JG, Chen D, Kalyani FS, Lv ZY, Chen CX, Ji F, Lin HN, Jin X. Palmitoylation in Crohn's disease: Current status and future directions. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(48): 8201-8215
26. Cheng Y, Dese S, Martinez A, Worthen RJ, Joep RS, Beurel E. TNF α disrupts blood brain barrier integrity to maintain prolonged depressive-like behavior in mice. *Brain Behav Immun*, 2018, 69: 556-567
27. Chesarino NM, Hach JC, Chen JL, Zaro BW, Rajaram MV, Turner J, Schlesinger LS, Pratt MR, Hang HC, Yount JS. Chemoproteomics reveals Toll-like receptor fatty acylation. *BMC Biol*, 2014a, 12: 91
28. Chesarino NM, McMichael TM, Yount JS. Regulation of the trafficking and antiviral activity of IFITM3 by post-translational modifications. *Future Microbiol*, 201

- 4b, 9(10): 1151-1163
29. Chhatbar C, Prinz M. The roles of microglia in viral encephalitis: from sensome to therapeutic targeting. *Cellular & Molecular Immunology*, 2021, 18(2): 250-258
30. Cho E, Park M. Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 133-151
31. Chu JJH, Yang PL. c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. 2007, 104(9): 3520-3525
32. Chuang CK, Yang TH, Chen TH, Yang CF, Chen WJ. Heat shock cognate protein 70 isoform D is required for clathrin-dependent endocytosis of Japanese encephalitis virus in C6/36 cells. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 4): 793-803
33. Coronel Arrechea C, Giolito ML, García IA, Soria G, Valdez Taubas J. A novel yeast-based high-throughput method for the identification of protein palmitoylation inhibitors. *Open Biol*, 2021, 11(8): 200415
34. Crawford SE, Desselberger U. Lipid droplets form complexes with viroplasms and are crucial for rotavirus replication. *Curr Opin Virol*, 2016, 19: 11-15
35. Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai A. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology*, 2009, 385(1): 47-57
36. Das T, Hang HC. Discovery and Characterization of IFITM S-Palmitoylation. *Viruses*, 2023, 15(12): 2329
37. De I, Sadhukhan S. Emerging Roles of DHHC-mediated Protein S-palmitoylation in Physiological and Pathophysiological Context. *European Journal of Cell Biology*, 2018, 97(5): 319-338
38. Dennis K, Heather LC. Post-translational palmitoylation of metabolic proteins. *Front Physiol*, 2023, 14: 1122895
39. Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(1): 46-57
40. Dong ZB, Wang YJ, Cheng ML, Wang BJ, Lu H, Zhu HL, Liu L, Xie M. 2-Bromopalmitate decreases spinal inflammation and attenuates oxaliplatin-induced neur

- opathic pain via reducing Drp1-mediated mitochondrial dysfunction. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0275428
41. Edmonds MJ, Geary B, Doherty MK, Morgan A. Analysis of the brain palmitoyl-proteome using both acyl-biotin exchange and acyl-resin-assisted capture methods. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 3299
42. Eigenmann DE, Jähne EA, Smieško M, Hamburger M, Oufir M. Validation of an immortalized human (hBMEC) in vitro blood-brain barrier model. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(8): 2095-2107
43. Essandoh K, Teuber JP, Brody MJ. Regulation of cardiomyocyte intracellular trafficking and signal transduction by protein palmitoylation. *Biochem Soc Trans*, 2024, 52(1): 41-53
44. Fan Y, Shayahati B, Tewari R, Boehning D, Akimzhanov AM. Regulation of T cell receptor signaling by protein acyltransferase DHHC21. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(8): 6471-6478
45. Fang Y, Li XS, Zhang W, Xue JB, Wang JZ, Yin SQ, Li SG, Li XH, Zhang Y. Molecular epidemiology of mosquito-borne viruses at the China-Myanmar border: discovery of a potential epidemic focus of Japanese encephalitis. *Infect Dis Poverty*, 2021, 10(1): 57
46. Filgueira L, Lannes N. Review of Emerging Japanese Encephalitis Virus: New Aspects and Concepts about Entry into the Brain and Inter-Cellular Spreading. *Pathogens*, 2019, 8(3): 111
47. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, Rosen N, Kohn A, Twik M, Safran M, Lancet D, Cohen D. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)*, 2017, 2017: bax028
48. Forero A, Ozarkar S, Li H, Lee CH, Hemann EA, Nadsombati MS, Hendricks MR, So L, Green R, Roy CN, Sarkar SN, von Moltke J, Anderson SK, Gale M, Savan R. Differential Activation of the Transcription Factor IRF1 Underlies the Distinct Immune Responses Elicited by Type I and Type III Interferons. *Immunity*, 20

- 19, 51(3): 451-464.e456
49. Gadalla MR, Morrison E, Serebryakova MV, Han X, Wolff T, Freund C, Kordyukova L, Veit M. NS1-mediated upregulation of ZDHHC22 acyltransferase in influenza A virus infected cells. *Cell Microbiol*, 2021, 23(6): e13322
50. Gao X, Bayraktutan U. TNF- α evokes blood-brain barrier dysfunction through activation of Rho-kinase and neurokinin 1 receptor. *Immunobiology*, 2023, 228(5): 152706
51. Gauthaman A, Jacob R, Pasupati S, Rajadurai A, Doss CGP, Moorthy A. Novel peptide-based inhibitor for targeted inhibition of T cell function. *J Cell Commun Signal*, 2022, 16(3): 349-359
52. Ge X, He Z, Cao C, Xue T, Jing J, Ma R, Zhao W, Liu L, Jueraitetibaike K, Ma J, Feng Y, Qian Z, Zou Z, Chen L, Fu C, Song N, Yao B. Protein palmitoylation-mediated palmitic acid sensing causes blood-testis barrier damage via inducing ER stress. *Redox Biol*, 2022, 54: 102380
53. Gobillot TA, Humes D, Sharma A, Kikawa C, Overbaugh J. The Robust Restriction of Zika Virus by Type-I Interferon in A549 Cells Varies by Viral Lineage and Is Not Determined by IFITM3. 2020, 12(5): 503
54. Grantham ML, Wu WH, Lalime EN, Lorenzo ME, Klein SL, Pekosz A. Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein is not required for virus replication in vitro but contributes to virus virulence. *J Virol*, 2009, 83(17): 8655-8661
55. Guan X, Fierke CA. Understanding Protein Palmitoylation: Biological Significance and Enzymology. *Sci China Chem*, 2011, 54(12): 1888-1897
56. Han C, Xie Z, Lv Y, Liu D, Chen R. Direct interaction of the molecular chaperone GRP78/BiP with the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein plays a vital role in viral attachment to and infection of culture cells. *Front Immunol*, 2023, 14: 1259237
57. Hatinguais R, Willment JA, Brown GD. PAMPs of the Fungal Cell Wall and Mammalian PRRs. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2020, 425: 187-223
58. Hong Z, Gong W, Yang J, Li S, Liu Z, Perrett S, Zhang H. Exploration of the cyst

- eine reactivity of human inducible Hsp70 and cognate Hsc70. *J Biol Chem*, 2023, 299(1): 102723
59. Hu YL, Lee PI. Safety of Japanese encephalitis vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 2021, 17(11): 4259-4264
60. Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, Radoshitzky SR, Becker MM, Chiang JJ, Brass AL, Ahmed AA, Chi X, Dong L, Longobardi LE, Boltz D, Kuhn JH, Elledge SJ, Bavari S, Denison MR, Choe H, Farzan M. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog*, 2011, 7(1): e1001258
61. Hung C-Y, Tsai M-C, Wu Y-P, Wang RYL. Identification of heat-shock protein 90 beta in Japanese encephalitis virus-induced secretion proteins. 2011, 92(12): 2803-2809
62. Hwang J-R, Byeon Y, Kim D, Park S-G. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine*, 2020, 52(5): 750-761
63. Ikushiro H, Hayashi H. Mechanistic enzymology of serine palmitoyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(11): 1474-1480
64. Jeong D-W, Park J-W, Kim KS, Kim J, Huh J, Seo J, Kim YL, Cho J-Y, Lee K-W, Fukuda J, Chun Y-S. Palmitoylation-driven PHF2 ubiquitination remodels lipid metabolism through the SREBP1c axis in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6370
65. Jiang H, Zhang X, Chen X, Aramsangtienchai P, Tong Z, Lin H. Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chemical Reviews*, 2018, 118(3): 919-988
66. Jin J, Zhi X, Wang X, Meng D. Protein palmitoylation and its pathophysiological relevance. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3220-3233
67. Joe S, Salam AAA, Neogi U, N NB, Mudgal PP. Antiviral drug research for Japanese encephalitis: an updated review. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(2): 273-296

68. Kalia M, Khasa R, Sharma M, Nain M, Vratl S. Japanese encephalitis virus infects neuronal cells through a clathrin-independent endocytic mechanism. *J Virol*, 2013, 87(1): 148-162
69. Kalucka J, de Rooij L, Goveia J, Rohlenova K, Dumas SJ, Meta E, Conchinha N V, Taverna F, Teuwen LA, Veys K, García-Caballero M, Khan S, Geldhof V, Sokol L, Chen R, Treps L, Borri M, de Zeeuw P, Dubois C, Karakach TK, Falkenberg KD, Parys M, Yin X, Vinckier S, Du Y, Fenton RA, Schoonjans L, Dewerchin M, Eelen G, Thienpont B, Lin L, Bolund L, Li X, Luo Y, Carmeliet P. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell*, 2020, 180(4): 764-779.e720
70. Kao YT, Chang BL, Liang JJ, Tsai HJ, Lee YL, Lin RJ, Lin YL. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS5 interacts with mitochondrial trifunctional protein and impairs fatty acid β -oxidation. *PLoS Pathog*, 2015, 11(3): e1004750
71. Karthigeyan KP, Zhang L, Loisel DR, Haystead TAJ, Bhat M, Yount JS, Kwiec JJ. A bioorthogonal chemical reporter for fatty acid synthase-dependent protein acylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(5): 101272
72. Kathayat RS, Dickinson BC. Measuring S-Depalmitoylation Activity In Vitro and in live cells with fluorescent probes. *Methods Mol Biol*, 2019, 2009: 99-109
73. Katz ZB, Novotná L, Blount A, Lillemeier BF. A cycle of Zap70 kinase activation and release from the TCR amplifies and disperses antigenic stimuli. *Nat Immunol*, 2017, 18(1): 86-95
74. Kemmoku H, Takahashi K, Mukai K, Mori T, Hirosawa KM, Kiku F, Uchida Y, Kuchitsu Y, Nishioka Y, Sawa M, Kishimoto T, Tanaka K, Yokota Y, Arai H, Suzuki KGN, Taguchi T. Single-molecule localization microscopy reveals STING clustering at the trans-Golgi network through palmitoylation-dependent accumulation of cholesterol. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 220
75. Khasa R, Vaidya A, Vratl S, Kalia M. Membrane trafficking RNA interference screen identifies a crucial role of the clathrin endocytic pathway and ARP2/3 complex for Japanese encephalitis virus infection in HeLa cells. *J Gen Virol*, 2019, 100

- (2): 176-186
76. Kim Y-C, Lee SE, Kim SK, Jang H-D, Hwang I, Jin S, Hong E-B, Jang K-S, Kim H-S. Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(9): 907-916
 77. Kodakandla G, Boehning DF, Akimzhanov AM, Fan Y. DHHC21 is a STIM1 protein acyltransferase. *Biophysical Journal*, 2024, 123(3): 375a
 78. Kong Y, Liu Y, Li X, Rao M, Li D, Ruan X, Li S, Jiang Z, Zhang Q. Palmitoylation landscapes across human cancers reveal a role of palmitoylation in tumorigenesis. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 826
 79. Korycka J, Łach A, Heger E, Bogusławska DM, Wolny M, Toporkiewicz M, Augoff K, Korzeniewski J, Sikorski AF. Human DHHC proteins: A spotlight on the hidden player of palmitoylation. *European Journal of Cell Biology*, 2012, 91(2): 107-117
 80. Ku HC, Cheng CF. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 556
 81. Kumar R, Mehta D, Mishra N, Nayak D, Sunil S. Role of Host-Mediated Post-Translational Modifications (PTMs) in RNA Virus Pathogenesis. 2021, 22(1): 323
 82. Kumar S, Verma A, Yadav P, Dubey SK, Azhar EI, Maitra SS, Dwivedi VD. Molecular pathogenesis of Japanese encephalitis and possible therapeutic strategies. *Arch Virol*, 2022, 167(9): 1739-1762
 83. Lei Y, Zhu J, Li H, Kong E, Lu K. Protocol to quantify palmitoylation of cysteines in budding yeast. *STAR Protoc*, 2022, 3(1): 101035
 84. Li C, Chu H, Liu X, Chiu MC, Zhao X, Wang D, Wei Y, Hou Y, Shuai H, Cai J, Chan JF, Zhou J, Yuen KY. Human coronavirus dependency on host heat shock protein 90 reveals an antiviral target. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 2663-2672
 85. Li D, Liu Y, Lu Y, Gao S, Zhang L. Palmitoylation of SARS-CoV-2 S protein is critical for S-mediated syncytia formation and virus entry. *J Med Virol*, 2022a, 94(1): 342-348
 86. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transdu*

- ction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 291
87. Li F, Wang Y, Yu L, Cao S, Wang K, Yuan J, Wang C, Wang K, Cui M, Fu ZF. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol*, 2015, 89(10): 5602-5614
88. Li W, Li F, Zhang X, Lin H-K, Xu C. Insights into the post-translational modification and its emerging role in shaping the tumor microenvironment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 422
89. Li X, Shen L, Xu Z, Liu W, Li A, Xu J. Protein Palmitoylation Modification During Viral Infection and Detection Methods of Palmitoylated Proteins. 2022b, 12:
90. Liang R, Li X, Zhu X. Deciphering the Roles of IFITM1 in Tumors. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2020, 24(4): 433-441
91. Liao D, Huang Y, Liu D, Zhang H, Shi X, Li X, Luo P. The role of s-palmitoylation in neurological diseases: implication for zDHHC family. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1342830
92. Lin DT, Conibear E. ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *Elife*, 2015, 4: e11306
93. Liu D, Cruz-Cosme R, Wu Y, Leibowitz J, Tang Q. 2-Bromopalmitate depletes lipid droplets to inhibit viral replication. *J Virol*, 2024, : e0017124
94. Liu YG, Chen Y, Wang X, Zhao P, Zhu Y, Qi Z. Ezrin is essential for the entry of Japanese encephalitis virus into the human brain microvascular endothelial cells. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1330-1341
95. Lu Y, Zheng Y, Coyaude É, Zhang C, Selvabaskaran A, Yu Y, Xu Z, Weng X, Chen JS, Meng Y, Warner N, Cheng X, Liu Y, Yao B, Hu H, Xia Z, Muise AM, Klip A, Brumell JH, Girardin SE, Ying S, Fairn GD, Raught B, Sun Q, Neculai D. Palmitoylation of NOD1 and NOD2 is required for bacterial sensing. 2019, 366(6464): 460-467
96. Lubkowska A, Pluta W, Strońska A, Lalko A. Role of Heat Shock Proteins (HSP7

- 0 and HSP90) in Viral Infection. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9366
97. Mackenzie JS, Williams DT, van den Hurk AF, Smith DW, Currie BJ. Japanese Encephalitis Virus: The Emergence of Genotype IV in Australia and Its Potential Endemicity. *Viruses*, 2022, 14(11): 2480
98. Malgapo MIP, Linder ME. Substrate recruitment by zDHHC protein acyltransferases. *Open Biol*, 2021, 11(4): 210026
99. Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol*, 2000, 74(20): 9601-9609
100. Mansfield KL, Hernández-Triana LM, Banyard AC, Fooks AR, Johnson N. Japanese encephalitis virus infection, diagnosis and control in domestic animals. *Vet Microbiol*, 2017, 201: 85-92
101. Marin EP, Derakhshan B, Lam TT, Davalos A, Sessa WC. Endothelial cell palmitoylproteomic identifies novel lipid-modified targets and potential substrates for protein acyl transferases. *Circ Res*, 2012, 110(10): 1336-1344
102. Martin BR. Nonradioactive analysis of dynamic protein palmitoylation. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, 73: 14.15.11-14.15.19
103. Martin BR, Cravatt BF. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nature Methods*, 2009, 6(2): 135-138
104. Meischel T, Fritzlar S, Villalon-Letelier F, Tessema MB, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. IFITM Proteins That Restrict the Early Stages of Respiratory Virus Infection Do Not Influence Late-Stage Replication. *J Virol*, 2021, 95(20): e0083721
105. Meng X, Templeton C, Clementi C, Veit M. The role of an amphiphilic helix and transmembrane region in the efficient acylation of the M2 protein from influenza virus. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 18928
106. Miao W, Guo J, Zhang S, Shen N, Shang X, Liu F, Lu W, Xu J, Teng J. The Effect of a Combined Ganciclovir, Methylprednisolone, and Immunoglobulin Regimen on Survival and Functional Outcomes in Patients With Japanese Encephalitis. 2

- 021, 12: 711674
107. Mohapatra S, Tripathi S, Sharma V, Basu A. Regulation of microglia-mediated inflammation by host lncRNA Gm20559 upon flaviviral infection. *Cytokine*, 2023, 172: 156383
 108. Monson EA, Crosse KM, Duan M, Chen W, O'Shea RD, Wakim LM, Carr JM, Whelan DR, Helbig KJ. Intracellular lipid droplet accumulation occurs early following viral infection and is required for an efficient interferon response. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4303
 109. Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 11932
 110. Müller MM. Post-Translational Modifications of Protein Backbones: Unique Functions, Mechanisms, and Challenges. *Biochemistry*, 2018, 57(2): 177-185
 111. Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo M, Martínez-Romero C, Barrado-Gil L, Galindo I, García-Sastre A, Alonso C. Antiviral Role of IFITM Proteins in African Swine Fever Virus Infection. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154366
 112. Nain M, Mukherjee S, Karmakar SP, Paton AW, Paton JC, Abdin MZ, Basu A, Kalia M, Vratil S. GRP78 Is an Important Host Factor for Japanese Encephalitis Virus Entry and Replication in Mammalian Cells. *J Virol*, 2017, 91(6): e02274-16
 113. Newmyer SL, Schmid SL. Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J Cell Biol*, 2001, 152(3): 607-620
 114. Ni H, Wang Y, Yao K, Wang L, Huang J, Xiao Y, Chen H, Liu B, Yang CY, Zhao J. Cyclical palmitoylation regulates TLR9 signalling and systemic autoimmunity in mice. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 1
 115. Ogony J, Choi HJ, Lui A, Cristofanilli M, Lewis-Wambi J. Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1) overexpression enhances the aggressive phenotype of SUM149 inflammatory breast cancer cells in a signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2)-dependent manner. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1):

116. Ohno Y, Kashio A, Ogata R, Ishitomi A, Yamazaki Y, Kihara A. Analysis of substrate specificity of human DHHC protein acyltransferases using a yeast expression system. 2012, 23(23): 4543-4551
117. Oliveira ARS, Cohnstaedt LW, Noronha LE, Mitzel D, McVey DS, Cernicchiaro N. Perspectives Regarding the Risk of Introduction of the Japanese Encephalitis Virus (JEV) in the United States. *Front Vet Sci*, 2020, 7: 48
118. Palacios EH, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 2004, 23(48): 7990-8000
119. Pardridge WM, Buciak JL, Friden PM. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 259(1): 66-70
120. Park SL, Huang YS, Vanlandingham DL. Re-Examining the Importance of Pigs in the Transmission of Japanese Encephalitis Virus. *Pathogens*, 2022, 11(5):
121. Paulraj PS, Rajamannar V, Renu G, Kumar A. Changing Paradigm in the epidemiology of Japanese encephalitis in India. *J Vector Borne Dis*, 2022, 59(4): 312-319
122. Pearce JC, Learoyd TP, Langendorf BJ, Logan JG. Japanese encephalitis: the vectors, ecology and potential for expansion. *J Travel Med*, 2018, 25(suppl_1): S16-S26
123. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER. DHHC-7 and -21 are palmitoyl acyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(1): 188-199
124. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol*, 2020, 5(6): 796-812
125. Prelli Bozzo C, Nchioua R, Volcic M, Koepke L, Krüger J, Schütz D, Heller S, Stürzel CM, Kmiec D, Conzelmann C, Müller J, Zech F, Braun E, Groß R, Wettstein L, Weil T, Weiß J, Diofano F, Rodríguez Alfonso AA, Wiese S, Sauter D, Münch J, Goffinet C, Catanese A, Schön M, Boeckers TM, Stenger S, Sato K, Just S, Kleger A, Sparrer KMJ, Kirchhoff F. IFITM proteins promote SARS-CoV-2 infection and are targets for virus inhibition in vitro. *Nature Communications*, 2021, 12

- (1): 4584
126. Ramadan AA, Mayilsamy K, McGill AR, Ghosh A, Giulianotti MA, Donow HM, Mohapatra SS, Mohapatra S, Chandran B, Deschenes RJ, Roy A. Identification of SARS-CoV-2 Spike Palmitoylation Inhibitors That Results in Release of Attenuated Virus with Reduced Infectivity. *Viruses*, 2022, 14(3): 531
 127. Ramazi S, Zahiri J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)*, 2021, 2021: baab012
 128. Ramli MNB, Lim YS, Koe CT, Demircioglu D, Tng W, Gonzales KAU, Tan CP, Szczerbinska I, Liang H, Soe EL, Lu Z, Ariyachet C, Yu KM, Koh SH, Yaw LP, Jumat NHB, Lim JSY, Wright G, Shabbir A, Dan YY, Ng HH, Chan YS. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids as Models of Liver Disease. *Gastroenterology*, 2020, 159(4): 1471-1486.e1412
 129. Remsberg JR, Suci RM, Zambetti NA, Hanigan TW, Firestone AJ, Inguva A, Long A, Ngo N, Lum KM, Henry CL, Richardson SK, Predovic M, Huang B, Dix MM, Howell AR, Niphakis MJ, Shannon K, Cravatt BF. ABHD17 regulation of plasma membrane palmitoylation and N-Ras-dependent cancer growth. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17(8): 856-864
 130. Ricklin ME, García-Nicolás O, Brechbühl D, Python S, Zumkehr B, Nougai A, Charrel RN, Posthaus H, Oevermann A, Summerfield A. Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 10832
 131. Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(11): 665-680
 132. Rousso I, Mixon MB, Chen BK, Kim PS. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13523-13525
 133. Sahu RC, Suthar T, Pathak A, Jain K. Interventions for the Prevention and Treatment of Japanese Encephalitis. *Current Infectious Disease Reports*, 2022, 24(11): 189-204

134. Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S, Zamoyska R. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev*, 2009, 228(1): 9-22
135. Sengupta P, Seo AY, Pasolli HA, Song YE, Johnson MC, Lippincott-Schwartz J. A lipid-based partitioning mechanism for selective incorporation of proteins into membranes of HIV particles. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(4): 452-461
136. Shao X, Xu A, Du W, Xu T, Huang Y, Xia Z, Wang W, Cai M, Zhang X, Zhang J, Cao J, Xu X, Yang B, He Q, Ying M. The palmitoyltransferase ZDHHC21 regulates oxidative phosphorylation to induce differentiation block and stemness in AM L. *Blood*, 2023, 142(4): 365-381
137. Shen K, Moroco JA, Patel RK, Shi H, Engen JR, Dorman HR, Smithgall TE. The Src family kinase Fgr is a transforming oncoprotein that functions independently of SH3-SH2 domain regulation. 2018, 11(553): eaat5916
138. Shen Y, Zheng LL, Fang CY, Xu YY, Wang C, Li JT, Lei MZ, Yin M, Lu HJ, Lei QY, Qu J. ABHD7-mediated depalmitoylation of lamin A promotes myoblast differentiation. *Cell Rep*, 2024, 43(2): 113720
139. Shi X, Li X, Xu Z, Shen L, Ding Y, Chen S, Mao L, Liu W, Xu J. ABHD16A Neg atively Regulates the Palmitoylation and Antiviral Function of IFITM Proteins. 2022, 13(6): e02289-02222
140. Shu X, Keller TCS, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 72(23): 4561-4575
141. Smyth LCD, Xu D, Okar SV, Dykstra T, Rustenhoven J, Papadopoulos Z, Bhasin K, Kim MW, Drieu A, Mamuladze T, Blackburn S, Gu X, Gaitán MI, Nair G, Storch SE, Du S, White MA, Bayguinov P, Smirnov I, Dikranian K, Reich DS, Kipnis J. Identification of direct connections between the dura and the brain. *Nature*, 2024;627(8002):165-173
142. Sobocińska J, Roszczenko-Jasińska P, Ciesielska A, Kwiatkowska K. Protein Palmitoylation and Its Role in Bacterial and Viral Infections. *Front Immunol*, 2017,

- 8: 2003
143. Sobocińska J, Roszczenko-Jasińska P, Zaręba-Kozioł M, Hromada-Judycka A, Matveichuk OV, Traczyk G, Łukasiuk K, Kwiatkowska K. Lipopolysaccharide Upregulates Palmitoylated Enzymes of the Phosphatidylinositol Cycle: An Insight from Proteomic Studies. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(2): 233-254
 144. Sosa LDV, Petiti JP, Picech F, Chumpen S, Nicola JP, Perez P, De Paul A, Valdez-Taubas J, Gutierrez S, Torres AI. The ER α membrane pool modulates the proliferation of pituitary tumours. *J Endocrinol*, 2019, 240(2): 229-241
 145. Spence JS, He R, Hoffmann H-H, Das T, Thinon E, Rice CM, Peng T, Chandran K, Hang HC. IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(3): 259-268
 146. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54:1.30.31-31.30. 33
 147. Sun F, Xia Z, Han Y, Gao M, Wang L, Wu Y, Sabatier JM, Miao L, Cao Z. Topology, Antiviral Functional Residues and Mechanism of IFITM1. *Viruses*, 2020, 12(3): 295
 148. Sun S, Karki C, Aguilera J, Lopez Hernandez AE, Sun J, Li L. Computational Study on the Function of Palmitoylation on the Envelope Protein in SARS-CoV-2. *J Chem Theory Comput*, 2021, 17(10): 6483-6490
 149. Suskiewicz MJ. The logic of protein post-translational modifications (PTMs): Chemistry, mechanisms and evolution of protein regulation through covalent attachments. *Bioessays*, 2024: e2300178
 150. Taguwa S, Maringer K, Li X, Bernal-Rubio D, Rauch JN, Gestwicki JE, Andino R, Fernandez-Sesma A, Frydman J. Defining Hsp70 Subnetworks in Dengue Virus Replication Reveals Key Vulnerability in Flavivirus Infection. *Cell*, 2015, 163(5): 1108-1123

151. Tan Z, Zhang W, Sun J, Fu Z, Ke X, Zheng C, Zhang Y, Li P, Liu Y, Hu Q, Wang H, Zheng Z. ZIKV infection activates the IRE1-XBP1 and ATF6 pathways of unfolded protein response in neural cells. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 275
152. Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, Matsura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol*, 2010, 84(6): 2798-2807
153. Tonn Eisinger KR, Woolfrey KM, Swanson SP, Schnell SA, Meitzen J, Dell'Acqua M, Mermelstein PG. Palmitoylation of caveolin-1 is regulated by the same DHHC acyltransferases that modify steroid hormone receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(41): 15901-15911
154. Tsai FD, Wynne JP, Ahearn IM, Philips MR. Metabolic labeling of Ras with tritiated palmitate to monitor palmitoylation and depalmitoylation. *Methods Mol Biol*, 2014, 1120: 33-41
155. Turtle L, Solomon T. Japanese encephalitis — the prospects for new treatments. *Nature Reviews Neurology*, 2018, 14(5): 298-313
156. Valencia HJ, de Aguiar M, Costa MA, Mendonça DC, Reis EV, Arias NEC, Drumond BP, Bonjardim CA. Evaluation of kinase inhibitors as potential therapeutics for flavivirus infections. *Arch Virol*, 2021, 166(5): 1433-1438
157. Vannice KS, Hills SL, Schwartz LM, Barrett AD, Heffelfinger J, Hombach J, Letson GW, Solomon T, Marfin AA, Anderson K, Fischer M, Fox K, Jacobson J, Liyanage J, Marks F, Ogbuanu I, Tharmaphornpilas P, the Japanese encephalitis vaccination experts p. The future of Japanese encephalitis vaccination: expert recommendations for achieving and maintaining optimal JE control. *npj Vaccines*, 2021, 6(1): 82
158. Vostakolaie MA, Hatami-Baroogh L, Babaei G, Molavi O, Kordi S, Abdolalizadeh J. Hsp70 in cancer: A double agent in the battle between survival and death. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3420-3444
159. Wang G, Li H, Yang X, Guo T, Wang L, Zhao Z, Sun H, Hou X, Ding X, Dou C, Ma Q, Yang X, Wang Y, Wang Z, Wang L, Liu J, Wang Z, Wang H, Xie P. Guillai

- n-Barré Syndrome Associated with JEV Infection. *N Engl J Med*, 2020, 383(12): 1188-1190
160. Wang H, Chen L, Luo J, He H. NP and NS1 proteins of H5N1 virus significantly upregulated IFITM1, IFITM2, and IFITM3 in A549 cells. *Afr Health Sci*, 2019a, 19(1): 1402-1410
 161. Wang K, Wang H, Lou W, Ma L, Li Y, Zhang N, Wang C, Li F, Awais M, Cao S, She R, Fu ZF, Cui M. IP-10 Promotes Blood-Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis. *Front Immunol*, 2018, 9: 1148
 162. Wang P, Li M, Lu W, Zhang D, Hu Q, Liu Y. DC-SIGN promotes Japanese encephalitis virus transmission from dendritic cells to T cells via virological synapses. *Virol Sin*, 2017, 32(6): 495-502
 163. Wang Q, Xin X, Wang T, Wan J, Ou Y, Yang Z, Yu Q, Zhu L, Guo Y, Wu Y, Ding Z, Zhang Y, Pan Z, Tang Y, Li S, Kong L. Japanese Encephalitis Virus Induces Apoptosis and Encephalitis by Activating the PERK Pathway. *J Virol*, 2019b, 93(17): e00887-19
 164. Wang RY-L, Huang Y-R, Chong K-M, Hung C-Y, Ke Z-L, Chang R-Y. DnaJ homolog Hdj2 Facilitates Japanese Encephalitis Virus Replication. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 471
 165. Weng JR, Hua CH, Chen CH, Huang SH, Wang CY, Lin YJ, Wan L, Lin CW. Anti-apoptotic activity of Japanese encephalitis virus NS5 protein in human medulloblastoma cells treated with interferon- β . *J Microbiol Immunol Infect*, 2018, 51(4): 456-464
 166. Wilkins C, Woodward J, Lau DT, Barnes A, Joyce M, McFarlane N, McKeating JA, Tyrrell DL, Gale M, Jr. IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology*, 2013, 57(2): 461-469
 167. Winter PM, Dung NM, Loan HT, Kneen R, Wills B, Thule T, House D, White NJ, Farrar JJ, Hart CA, Solomon T. Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis. *J Infect Dis*, 2004, 190(9): 1618-1626

168. Wozniak AL, Wang X, Stieren ES, Scarbrough SG, Elferink CJ, Boehning D. Requirement of biphasic calcium release from the endoplasmic reticulum for Fas-mediated apoptosis. *J Cell Biol*, 2006, 175(5): 709-714
169. Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8(1): 217
170. Wu MJ, Shanmugam S, Welsch C, Yi M. Palmitoylation of Hepatitis C Virus NS2 Regulates Its Subcellular Localization and NS2-NS3 Autocleavage. *J Virol*, 2019, 94(1): 311
171. Wu Z, Tan R, Zhu L, Yao P, Hu Q. Protein S-Palmitoylation and Lung Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2021a, 1304: 165-186
172. Wu Z, Zhang Z, Wang X, Zhang J, Ren C, Li Y, Gao L, Liang X, Wang P, Ma C. Palmitoylation of SARS-CoV-2 S protein is essential for viral infectivity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021b, 6(1): 231
173. Xiang JY, Zhang YH, Tan ZR, Huang J, Zhao YW. Guillain-Barré syndrome associated with Japanese encephalitis virus infection in China. *Viral Immunol*, 2014, 27(8): 418-420
174. Xie M, Cheng M, Wang B, Jiao M, Yu L, Zhu H. 2-Bromopalmitate attenuates inflammatory pain by maintaining mitochondrial fission/fusion balance and function. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(1): 72-84
175. Xiong J, Yan M, Zhu S, Zheng B, Wei N, Yang L, Si Y, Cao S, Ye J. Increased Cleavage of Japanese Encephalitis Virus prM Protein Promotes Viral Replication but Attenuates Virulence. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(3): e0141722
176. Yadav P, Chakraborty P, Jha NK, Dewanjee S, Jha AK, Panda SP, Mishra PC, Dey A, Jha SK. Molecular Mechanism and Role of Japanese Encephalitis Virus Infection in Central Nervous System-Mediated Diseases. *Viruses*, 2022, 14(12): 2686
177. Yáñez DC, Ross S, Crompton T. The IFITM protein family in adaptive immunity. *Immunology*, 2020, 159(4): 365-372
178. Yang C, Hawkins KE, Doré S, Candelario-Jalil E. Neuroinflammatory mechanism

- s of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135-c153
179. Yang X, Chatterjee V, Ma Y, Zheng E, Yuan SY. Protein Palmitoylation in Leukocyte Signaling and Function. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 600368
180. Yang X, Zheng E, Ma Y, Chatterjee V, Villalba N, Breslin JW, Liu R, Wu MH, Yuan SY. DHHC21 deficiency attenuates renal dysfunction during septic injury. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11146
181. Yao H, Lan J, Li C, Shi H, Brosseau JP, Wang H, Lu H, Fang C, Zhang Y, Liang L, Zhou X, Wang C, Xue Y, Cui Y, Xu J. Inhibiting PD-L1 palmitoylation enhances T-cell immune responses against tumours. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(4): 306-317
182. Ye H, Han Y, Li P, Su Z, Huang Y. The Role of Post-Translational Modifications on the Structure and Function of Tau Protein. *J Mol Neurosci*, 2022, 72(8): 1557-1571
183. Ye J, Chen Z, Li Y, Zhao Z, He W, Zohaib A, Song Y, Deng C, Zhang B, Chen H, Cao S. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. *J Virol*, 2017, 91(8): e00039-17
184. Ye J, Zhang H, He W, Zhu B, Zhou D, Chen Z, Ashraf U, Wei Y, Liu Z, Fu ZF, Chen H, Cao S. Quantitative phosphoproteomic analysis identifies the critical role of JNK1 in neuroinflammation induced by Japanese encephalitis virus. 2016, 9(48): ra98-ra98
185. Yeste-Velasco M, Linder ME, Lu Y-J. Protein S-palmitoylation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2015, 1856(1): 107-120
186. Yin C, Yang P, Xiao Q, Sun P, Zhang X, Zhao J, Hu X, Shan C. Novel antiviral discoveries for Japanese encephalitis virus infections through reporter virus-based high-throughput screening. *J Med Virol*, 2024, 96(1): e29382
187. Young FB, Butland SL, Sanders SS, Sutton LM, Hayden MR. Putting proteins in their place: palmitoylation in Huntington disease and other neuropsychiatric disease

- ses. *Prog Neurobiol*, 2012, 97(2): 220-238
188. Yount JS, Zhang MM, Hang HC. Emerging roles for protein S-palmitoylation in immunity from chemical proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17(1): 27-33
189. Yu D, Zhao Y, Pan J, Yang X, Liang Z, Xie S, Cao R. C19orf66 Inhibits Japanese Encephalitis Virus Replication by Targeting -1 PRF and the NS3 Protein. *Virol Sin*, 2021, 36(6): 1443-1455
190. Yu F, Xie D, Ng SS, Lum CT, Cai MY, Cheung WK, Kung HF, Lin G, Wang X, Lin MC. IFITM1 promotes the metastasis of human colorectal cancer via CAV-1. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 135-143
191. Yu XZ, Levin SD, Madrenas J, Anasetti C. Lck is required for activation-induced T cell death after TCR ligation with partial agonists. *J Immunol*, 2004, 172(3): 1437-1443
192. Yuan Y, Li P, Li J, Zhao Q, Chang Y, He X. Protein lipidation in health and disease: molecular basis, physiological function and pathological implication. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 60
193. Yun SI, Lee YM. Early Events in Japanese Encephalitis Virus Infection: Viral Entry. *Pathogens*, 2018, 7(3): 68
194. Zhang B, He Y, Xu Y, Mo F, Mi T, Shen QS, Li C, Li Y, Liu J, Wu Y, Chen G, Zhu W, Qin C, Hu B, Zhou G. Differential antiviral immunity to Japanese encephalitis virus in developing cortical organoids. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(7): 719
195. Zhang F, Luo J, Teng M, Xing G, Guo J, Zhang Y. Study on the Dynamic Proliferation of JEV in BHK-21 Cells. *Intervirology*, 2021 Jan 5:1-7
196. Zhang H, Wang Y, Li K, Mehmood K, Gui R, Li J. Epidemiology of Japanese Encephalitis in China (2004-2015). *Travel Med Infect Dis*, 2019, 28: 109-110
197. Zhang M, Zhou L, Xu Y, Yang M, Xu Y, Komaniecki GP, Kosciuk T, Chen X, Lu X, Zou X, Linder ME, Lin H. A STAT3 palmitoylation cycle promotes TH17 differentiation and colitis. *Nature*, 2020a, 586(7829): 434-439
198. Zhang Q, Liu W, Zhang HM, Xie GY, Miao YR, Xia M, Guo AY. hTFtarget: A C

- omprehensive Database for Regulations of Human Transcription Factors and Their Targets. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2020b, 18(2): 120-128
199. Zhang Y-G, Chen H-W, Zhang H-X, Wang K, Su J, Chen Y-R, Wang X-R, Fu Z-F, Cui M. EGFR Activation Impairs Antiviral Activity of Interferon Signaling in Brain Microvascular Endothelial Cells During Japanese Encephalitis Virus Infection. *Front Microbiol.* 2022 Jun 30;13: 894356
200. Zhang Y, Han JC, Jing J, Liu H, Zhang H, Li ZH, Jin NY, Lu HJ. Construction and Immunogenicity of Recombinant Vaccinia Virus Vaccine Against Japanese Encephalitis and Chikungunya Viruses Infection in Mice. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2020c, 20(10): 788-796
201. Zhang YG, Zhang HX, Chen HW, Lv P, Su J, Chen YR, Fu ZF, Cui M. Type I/type III IFN and related factors regulate JEV infection and BBB endothelial integrity. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 216
202. Zhao R, Wang M, Cao J, Shen J, Zhou X, Wang D, Cao J. Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. *Life (Basel)*, 2021, 11(7): 615
203. Zhao X, Guo F, Liu F, Cuconati A, Chang J, Block TM, Guo JT. Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(18): 6756-6761
204. Zhou B, Wang Y, Yan Y, Mariscal J, Di Vizio D, Freeman MR, Yang W. Low-Background Acyl-Biotinyl Exchange Largely Eliminates the Coisolation of Non-S-Acylated Proteins and Enables Deep S-Acylproteomic Analysis. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(15): 9858-9866
205. Zhu Y-Z, Cao M-M, Wang W-B, Wang W, Ren H, Zhao P, Qi Z-T. Association of heat-shock protein 70 with lipid rafts is required for Japanese encephalitis virus infection in Huh7 cells. 2012a, 93(1): 61-71