蛋白质棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的作用

易李, 郑春福*

福建医科大学基础医学院免疫学系, 福州 350122

* 联系人, E-mail: zheng.alan@hotmail.com

收稿日期: 2020-03-11; 接受日期: 2020-05-09; 网络版发表日期: 2020-07-03

摘要 蛋白质棕榈酰化修饰是脂质修饰的一种, 赋予了底物蛋白更加多样化的生物学功能. 在哺乳动物细胞中, 棕榈酰化修饰主要是由ZDHHC家族介导的. 病毒入侵细胞后, 可利用宿主的棕榈酰化修饰促进自身的复制和感染. 宿主通过模式识别受体识别病原体相关分子模式诱发天然免疫应答以保护自身免受病毒的伤害并达到清除病原体的目的. 天然免疫是宿主抵抗病毒感染的第一道防线, 越来越多的研究表明, 抗病毒蛋白的棕榈酰化修饰对其发挥功能非常重要. 然而截至目前, ZDHHC家族蛋白参与病毒感染过程中的作用机制尚不完全清楚. 本文综述了ZDHHC家族蛋白棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的最新研究进展.

关键词 蛋白质翻译后修饰, 棕榈酰化, 病毒感染

蛋白质翻译后修饰是指蛋白质在翻译中或翻译后经历的一个共价加工过程. 蛋白质的翻译后修饰并非“装饰”, 而是具有调节蛋白质的活性状态、定位、折叠以及其相互作用的功能. 蛋白质翻译后修饰包括一类胞内蛋白的脂质修饰. 根据附着在蛋白质上的三种脂质形式(脂肪酸、异戊二烯和糖基化磷脂酰肌醇), 脂质修饰主要分为脂酰化、异戊烯化和糖基化磷脂酰肌醇共价结合三种形式. 而脂酰化主要包括肉豆蔻酸C14:0(N-肉豆蔻酰化)和棕榈酸C16:0(棕榈酰化)^[1]. 因为蛋白质的棕榈酰化大多数都是以脂肪酸S型连接为主, 所以棕榈酰化修饰作用常常又称作S-棕榈酰化. 除了棕榈酸C16:0是蛋白质进行S-棕榈酰化修饰最常见的脂肪酸长链, 一些长链脂酰基辅酶As, 如棕榈酸C16:1、硬脂酸C18:0、油酸C18:1也是蛋白质进行S-棕榈酰化修饰最常见的脂肪酸长链^[2].

S-棕榈酰化与N-肉豆蔻酰化、异丙烯酰化的不同

之处就在于这种修饰过程是可逆的^[3]. 这种可逆的翻译后修饰影响蛋白质的稳定性和胞内物质运输的功能^[2,4], 并且在蛋白质运输到细胞膜或者是膜上特定区域的过程中是必不可少的^[2]. 有研究发现, S-棕榈酰化修饰后蛋白质的定位影响其稳定性, 通过改变S-棕榈酰化修饰的氨基酸可促进蛋白质的泛素化修饰, 从而进行依赖泛素的蛋白酶体蛋白质降解过程^[5], 这一发现表明, 蛋白质的S-棕榈酰化可以阻断其泛素化, 也预示着棕榈酰化修饰与其他蛋白质修饰相互间的调节作用.

近年来, 研究人员利用点击化学法(链接化学、速配接组合式化学)和其他实验方法研究发现, 哺乳动物细胞中约有10%的蛋白质存在S-棕榈酰化修饰^[6], 主要包括可溶性蛋白和跨膜蛋白^[7]. 研究人员利用一种新的能纯化和鉴定棕榈酰化蛋白的蛋白质组学方法研究酵母的棕榈酰化蛋白质组特征, 并通过对突变酵母

引用格式: 易李, 郑春福. 蛋白质棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的作用. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 836–848

Yi L, Zheng C F. The roles of protein palmitoylation during viral infection (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 836–848, doi: 10.1360/SSV-2020-0083

菌株的DHHC(Asp-His-His-Cys)家族蛋白分析发现, 底物蛋白的S-棕榈酰化与酰基转移酶有关, 并且DHHC家族是一类特异性的酰基转移酶, 而S-棕榈酰化主要是由DHHC蛋白家族介导^[8]. 早在2004年, 有研究发现在哺乳动物细胞中存在24个DHHC基因^[9], 而目前已经鉴定出有23个基因同样存在于人类基因组中^[8].

1 ZDHHC的分类、结构及亚细胞定位

通过对酵母的蛋白组学筛选发现, 酵母中存在两个S-棕榈酰转移酶, 分别称之为Erf2和Akr1, Erf2可以介导酵母Ras蛋白的S-棕榈酰化修饰, 而Akr1则对酵母酪蛋白(yeast casein kinase, Yck2)激酶具有修饰作用. 此外, 还发现Erf2和Akr1均含有一个被称为DHHC结构域的共有序列. 随后, 在所有真核生物基因组数据库中均发现了大量编码DHHC结构域蛋白的基因. 这些证据表明, S-棕榈酰化修饰是由一类含有DHHC结构域的酶所催化的, 而DHHC结构域是这类酶的催化中心^[10-12]. 富含半胱氨酸的DHHC结构域是一个高度保守的基序, 它存在于多种真核生物的蛋白中^[13]. 该区域包括一个以Cys4锌指状金属离子结合位点形式存在的区域和一个复杂的Cys-His区域^[10]. 通过对酵母Akr1蛋白的DHHC结构域进行位点突变发现, Akr1的DHHC结构域关键位点突变使Akr1蛋白的S-棕榈酰化活性缺失, 这一结果表明, DHHC结构域的缺失会影响DHHC蛋白的棕榈酰转移酶活性^[12].

早在2006年, 有研究利用Clustal X技术对人类和酵母蛋白的DHHC结构域序列进行比对分析, 得出了人类DHHC蛋白与酵母蛋白的相关联系图, 23个人类DHHC蛋白被命名为DHHC1~DHHC24(不包括DHHC10)^[10]. 因为DHHC结构域含有一个Cys4锌指状金属离子结合位点, 所以DHHC蛋白又常被称为ZDHHC(zinc-finger DHHC)蛋白(后文描述采用ZDHHC蛋白). 随着研究技术的不断进步, 研究人员基于BioEdit程序的比对总结出人类ZDHHC蛋白进化树, 将ZDHHC家族蛋白命名为ZDHHC1~24(不包括ZDHHC10)^[14]. 除DHHC结构域外, 这些蛋白还包含四个或更多的跨膜结构域(transmembrane domain, TM)(DHHC结构域通常位于TM2和TM3之间)^[10]. 研究人员总结了23个ZDHHC蛋白的结构域(图1)^[14]. 另有两个特殊蛋白ZDHHC13和ZDHHC17不同于其他的

ZDHHC蛋白, 还含有锚蛋白重复域^[13].

Ohno等人^[13]通过分子克隆技术, 克隆出所有人类ZDHHC基因(除了ZDHHC23基因, 因为当时人类ZDHHC23基因序列未知), 检测了N端融合表达His6-Myc或FLAG标签的ZDHHC蛋白在转染人胚胎肾293T(human embryonic kidney 293T, HEK293T)细胞中的亚细胞定位. 大多数人类ZDHHC蛋白定位于内质网和高尔基体, 少数ZDHHC蛋白定位于膜上. 然而随后研究发现, 某些ZDHHC蛋白呈现出不同的亚细胞定位^[15]. ZDHHC蛋白在不同细胞中呈现出不同定位, 这种差异可能是由于细胞类型差异引起的(如细胞膜表面的特异性辅助因子的表达类型或水平的不同), 也可能是超表达ZDHHC蛋白导致的不同的细胞定位. 在HEK293T细胞中转染蛋白普遍呈高表达状态, 可能会影响某些ZDHHC蛋白的转运或者是折叠过程^[13]. 例如, ZDHHC4在HEK293T细胞中超表达定位于高尔基体^[13], 而在其他细胞, 如海马神经元和大鼠嗜铬瘤分化细胞则呈现出内质网定位的特点^[15,16]. 有趣的是, 在大鼠嗜铬瘤分化细胞超表达ZDHHC4/6时, ZDHHC4/ZDHHC6 C末端5个氨基酸的缺失使得ZDHHC4 C端截短体重新定位于高尔基体, 而ZDHHC6 C端截短体却依然定位于内质网, ZDHHC6则定位于质膜和邻近但完全不同于高尔基体的细胞内隙^[16]. 这一发现提示, ZDHHC4和ZDHHC6的C末端氨基酸参与了蛋白质的定位. 此外, 这还暗示着ZDHHC6上还有其他结构域可能参与内质网的定位. S-棕榈酰化修饰的过程主要是不同种类的脂肪酸链连接到蛋白质半胱氨酸位点侧链的过程, 而长脂肪酸侧链比短脂肪酸侧链更具有细胞膜亲和性, 所以参与S-棕榈酰化修饰的脂肪酸链类型可能对蛋白质的定位和功能产生影响^[6], 也可根据ZDHHC蛋白的亚细胞定位来预测其功能. 因此, 通过免疫荧光检测所有内源性ZDHHC蛋白的亚细胞定位对未来的研究具有重要意义.

2 ZDHHC的底物特异性

在S-棕榈酰化的修饰过程中, ZDHHC蛋白与底物蛋白相互作用的特异性是一个研究难题. 目前研究人员发现了一些与ZDHHC蛋白相关性较大的底物蛋白. 例如, 亨廷顿相互作用蛋白(htt interacting protein, HIP14)与亨廷顿蛋白(Huntingtin, htt)的S-棕榈酰化修

图 1 ZDHHC蛋白结构域。ZDHHC家族蛋白均含有一个高度保守的DHHC结构域及多个跨膜结构域。此外，ZDHHC13和ZDHHC17还含有多个锚蛋白重复域(<http://www.uniprot.org>)

Figure 1 Structure domain of ZDHHC proteins. The ZDHHC family proteins all contain a highly conserved DHHC domain and multiple transmembrane domains. In addition, ZDHHC13 and ZDHHC17 also contain multiple ankyrin repeat domains(<http://www.uniprot.org>)

饰有关, htt在其第214位半胱氨酸位点发生S-棕榈酰化修饰, 其位点突变后, htt不能与HIP14相互作用, 显著降低了htt的S-棕榈酰化修饰作用^[17]. 早在2002年, 研究人员发现HIP14是一种神经元蛋白, 可与htt相互作用, 并且与ZDHHC蛋白高度相似, 因此将HIP14蛋白命名为ZDHHC17蛋白^[18]. 随后研究人员再次证明, 它是一种具有致癌作用的人类棕榈酰转移酶^[19], 并且ZDHHC17的N端锚蛋白重复域和htt的N端片段是两者相互作用的关键结构域^[20]. 另外, ZDHHC17与ZDHHC13均含有一个锚蛋白重复结构域且相似度高, 这使得ZDHHC13也可能与ZDHHC17的底物结合, 例如htt, SNAP25和cysteine-string protein(CSP)^[20,21]. 研究表明, 四个定位于高尔基体的ZDHHC蛋白(ZDHHC3/7/13/17)具有不同的底物亲和力和催化活性, 研究人员检测到ZDHHC13/17与SNAP25/CSP之间存在较强的相互作用, 却几乎检测不到ZDHHC3/7与底物SNAP25/CSP的相互作用, 然而相较于ZDHHC13/17, ZDHHC3/7却能有效介导SNAP25/CSP的S-棕榈酰化修饰^[21]. 因此, 研究人员推测细胞内存在两类ZDHHC蛋白: 一类ZDHHC蛋白底物亲和力高但催化

活性弱, 另一类ZDHHC蛋白底物亲和力低但催化活性强. 在ZDHHC蛋白修饰底物的过程中, 第一类主要负责底物结合过程, 第二类主要发挥酶活性, 这两类ZDHHC蛋白发挥协同作用, 最终介导底物蛋白的S-棕榈酰化修饰. 这也意味着研究人员难以通过单个ZDHHC基因的敲除或敲低, 发现其特异性作用底物.

目前, ZDHHC蛋白的底物特异性仍有争议. 2-溴软脂酸乙烯(2-bromopalmitate, 2-BP)是一种棕榈酸类似物, 能有效抑制棕榈酰转移酶的酶活性, 从而阻断S-棕榈酰化修饰作用^[22]. 2-BP是目前研究S-棕榈酰化最常用的一种抑制剂, 能广泛抑制胞内蛋白的S-棕榈酰化修饰, 但特异性差. ZDHHC蛋白特异性抑制剂的研制将为未来研究ZDHHC蛋白的底物特异性提供新的工具.

3 蛋白质S-棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的作用

病毒不编码棕榈酰转移酶,但在感染宿主细胞的过程中,可广泛利用宿主细胞的S-棕榈酰化机制来修饰其感染宿主细胞和自身复制所必需的蛋白。早在

1979年, 研究人员利用 $[^3\text{H}]$ -棕榈酸作为宿主细胞的代谢标记物并通过放射自显影法, 首次发现了Sindbis病毒包膜糖蛋白和水疱型口炎病毒糖蛋白G发生S-棕榈酰化修饰^[23,24]. 随着研究的不断深入, 许多其他病毒蛋白也被发现发生了S-棕榈酰化修饰.

目前研究最多的一类发生S-棕榈酰化修饰的病毒是包膜病毒. 而流感病毒和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是研究最多的包膜病毒. 脂质双分子层构成细胞膜的基本骨架, 病毒蛋白发生S-棕榈酰化修饰后, 脂肪酸链连接到病毒蛋白质上, 增强了病毒蛋白质疏水性, 使得病毒蛋白质与质膜之间的膜亲和力增加, 最终导致病毒蛋白质更容易定位到质膜的脂筏部位^[25,26]. 病毒包膜糖蛋白经过S-棕榈酰化修饰后, 可结合到宿主细胞膜从而触发细胞对病毒颗粒的内吞作用, 促进病毒与细胞膜的融合、细胞膜对病毒基因组的包裹以及病毒基因组释放至细胞质, 同时病毒蛋白的S-棕榈酰化也参与到了病毒出芽过程中新病毒颗粒的形成^[27].

病毒学家最早开展流感病毒的血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白的S-棕榈酰化研究, HA存在于流感病毒的包膜中. 蛋白质发生S-棕榈酰化修饰的氨基酸位点是其半胱氨酸残基. 结果表明, 甲型流感病毒的HA含有三个S-棕榈酰化位点, 有两个位于HA胞质区的尾部, 另一个位于HA跨膜结构域的羧基端^[28]. 通过对甲型流感病毒HA三个S-棕榈酰化位点的分析, Kordyukova等人^[29]发现, 位于HA胞质区尾部的两个半胱氨酸残基含有棕榈酸, 而位于HA跨膜结构域的一个半胱氨酸残基含有硬脂酸. 研究人员还发现, 在病毒感染的MDCK细胞中, 与跨膜区末端相对的乙酰半胱氨酸位置是连接棕榈酸与硬脂酸的决定性因素^[30]. 乙型流感病毒的HA含有两个S-棕榈酰化位点, 并且这两个位点均位于HA胞质区的尾部; 而丙型流感病毒HA只含有一个S-棕榈酰化位点, 这一位点与甲型和乙型流感病毒不同, 它位于HA胞质区尾部和跨膜结构域的中间^[31,32]. 早年的一些研究证据表明, HA的S-棕榈酰化修饰有助于病毒蛋白定位于膜脂筏部位、新病毒颗粒的出芽过程、病毒颗粒与膜的融合以促进病毒的侵入^[31~33]. 近年来的研究再次验证了这些结论, 研究人员利用类病毒颗粒研究了HA的S-棕榈酰化作用对膜融合的影响. 结果表明, HA的S-棕榈酰化修饰可调节膜曲率, 并促进病毒颗粒在组装过程中HA与流感病毒另一蛋白基质蛋

白(matrx protein, M1)之间的相互作用^[34]. 然而其他研究表明, 乙型流感病毒HA的S-棕榈酰化修饰对于其融合孔的形成并不重要, 却能促进融合孔的扩张^[32]. 早年研究人员并不清楚何种ZDHHC蛋白介导HA的S-棕榈酰化修饰. 最近, 研究人员利用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)文库对感染流感病毒的人宫颈癌(HeLa)细胞进行23个ZDHHC蛋白的筛选, 并利用CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein 9)技术对病毒感染的HAP1细胞(来自人慢性髓系白血病细胞系KBM-7)进行基因敲除验证, 发现ZDHHC2, 8, 15和20均能促进甲型流感病毒HA的S-棕榈酰化修饰, 但是上述四种ZDHHC蛋白并不能促进乙型和丙型流感病毒HA蛋白的S-棕榈酰化修饰, 提示不同宿主的流感病毒导致了其利用ZDHHC蛋白的差异^[35].

除HA, 流感病毒的另一离子通道(ion channel, M2)蛋白在S-棕榈酰化修饰方面研究较多. M2是流感病毒包膜上一种结构高度保守的跨膜蛋白, 在病毒颗粒的形成方面具有重要作用^[36]. 而且M2在病毒包膜上形成质子通道, 所以该蛋白又称为viroporin. M2的C末端对M2在病毒颗粒被细胞摄取时内涵体pH的调节和维持特别重要^[37], pH的改变会诱导M2的C末端构象发生改变^[38], 从而有利于病毒与内涵体的膜融合. 研究人员还发现, M2胞质尾部的亲水亲膜性螺旋结构能结合脂质, 因此推测M2的脂质结合对于其发挥作用非常重要^[36]. M2的螺旋结构可发生S-棕榈酰化修饰. M2高度保守的两亲性螺旋区域S-棕榈酰化修饰可以调节膜曲率从而促进病毒粒子与膜的分离和病毒粒子的释放^[39~41], 而这两个亲螺旋突变后会导致病毒无法进行膜分离和病毒粒子的释放^[39]. 流感病毒M2的S-棕榈酰化修饰作用有待进一步研究.

研究人员最早对流感病毒蛋白进行S-棕榈酰化修饰研究. 随着研究的不断深入和技术的不断提高, 许多病毒蛋白相继被发现也能发生S-棕榈酰化修饰. 例如, 丙型肝炎病毒的非结构蛋白NS4B蛋白^[42]和核心蛋白^[43]、严重急性呼吸综合征病毒的棘突蛋白^[44]、人类免疫缺陷病毒的包膜蛋白^[45,46]和HSV-1的刺突糖蛋白^[47~49]. 此外, 研究人员还对病毒蛋白S-棕榈酰化在感染中的作用以及宿主ZDHHC酶作为抗流感药物靶点的可能性产生了兴趣^[50]. 最近有研究表明, ZDHHC3(又被称作GODZ)介导HSV-1 UL20的S-棕榈酰化修饰,

并且在感染HSV-1的ZDHHC3^{-/-}小鼠成纤维(mouse embryonic fibroblast, MEF)细胞中, HSV-1皮层蛋白UL20和糖蛋白K(gK)的定位和表达均受影响。此外, MEF细胞中ZDHHC3蛋白的缺失还会影响gB和gC的表达以及皮层蛋白和衣壳蛋白的定位与表达^[51]。因此, 病毒蛋白的S-棕榈酰化修饰常作为研究S-棕榈酰化对不同膜蛋白功能和定位影响的模型。近年来, 基孔尼雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)蛋白的S-棕榈酰化修饰也相继被研究人员发现。CHIKV是一种依靠蚊虫传播的RNA病毒^[52]。最近研究表明, 主要由ZDHHC2和ZDHHC19介导的CHIKV非结构蛋白nsP1的S-棕榈酰化修饰在病毒基因组的复制过程是必不可少的^[53]。随后有研究再次证明, CHIKV复制复合体通过nsP1与细胞膜的相互作用锚定于细胞膜, 复合体的膜定位对CHIKV的复制过程十分重要, 而nsP1的S-棕榈酰化修饰是nsP1与细胞膜脂筏相互作用的关键驱动力, 阻断nsP1的S-棕榈酰化修饰作用会使CHIKV复制酶失活, 从而抑制病毒的复制^[54,55]。除了nsP1, CHIKV结构蛋白TF(transframe)亦可进行S-棕榈酰化修饰, 这一修饰对病毒颗粒的释放过程非常重要^[56]。这些证据表明, S-棕榈酰化可促进病毒的复制与感染, 同时为未来研究其他病毒蛋白的S-棕榈酰化修饰及寻找抗病毒药物新靶点提供科学理论依据。然而, 目前尚未不清楚其他病毒蛋白是否发生S-棕榈酰化修饰并促进病毒复制, 下文将重点介绍胞内蛋白的S-棕榈酰化修饰如何调控抗病毒天然免疫的最新进展。

4 S-棕榈酰化修饰在抗病毒天然免疫中的作用

病毒入侵机体后, S-棕榈酰化修饰不仅被病毒所“利用”以促进自身复制、装配释放过程, 还能被宿主“利用”, 通过调控天然免疫信号通路发挥抗病毒作用。天然免疫应答是宿主抵御病毒感染的第一道防线, S-棕榈酰化修饰也能被宿主利用以调控天然免疫信号通路。

4.1 S-棕榈酰化修饰在天然免疫信号通路中的作用

病原体入侵机体后, 宿主的免疫系统诱导一系列的免疫应答以保护自身机体免受病原体的伤害并清除

病原体。天然免疫是生物在长期进化中逐渐形成的, 是宿主抵御病原体入侵的第一道防线。当病毒入侵机体时, 机体通过一系列的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别病毒的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 诱导下游的信号级联反应, 最终建立起抗病毒天然免疫应答。PRRs包括Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)、C型凝集素受体、视黄酸诱导基因蛋白1(retinoic acid-inducible gene 1, RIG-I)样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)、核苷酸寡聚化结构域样受体、黑色素瘤缺乏因子2样受体以及细胞质中的DNA和RNA受体^[57]。

(1) TLRs的S-棕榈酰化修饰。如前文所述, S-棕榈酰化修饰底物蛋白主要是细胞质中的可溶性蛋白和跨膜蛋白^[7,58]。研究人员通过对小鼠树突状细胞(dendritic cell) DC2.4和MEFs的S-棕榈酰化蛋白组学分析发现, MEFs细胞中的E3泛素连接酶NEDD4可发生S-棕榈酰化修饰。此外, 人TLRs的TLR2, TLR5和TLR10均能进行S-棕榈酰化修饰, 并且ZDHHC2, 3, 6, 7和15均能促进TLR2的S-棕榈酰化修饰作用。当TLR2的S-棕榈酰化作用被抑制时, 依赖于TLR2的促炎因子反应受到抑制^[59]。这些结果提示, 细胞膜上与信号传递有关的蛋白受到S-棕榈酰化修饰的调控。

(2) S-棕榈酰化修饰在DNA识别信号通路中的作用。近年来研究发现, 细胞质中存在一类DNA受体, 被称为环磷酸鸟苷-腺苷酸合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)。目前普遍认为, cGAS是细胞质中主要的DNA受体^[60]。cGAS除了识别外源性的DNA, 还可以识别自身异常产生的DNA。cGAS通过识别底物DNA, 催化ATP和GTP生成第二信使环二核苷酸(cyclic-GMP-AMP, cGAMP)^[61], cGAMP结合并激活定位于内质网的干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING), STING招募并激活TANK-结合激酶1(TANK-binding kinase, TBK1)和I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)进而促使干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)和转录因子(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的激活, 最终诱导I型干扰素(type I interferon, IFN-I)的产生^[62]。

在DNA识别信号通路激活过程中, STING在高尔基体上的S-棕榈酰化修饰对STING的激活非常重要。然而在使用S-棕榈酰化抑制剂2-BP后, 不影响STING从内质网转运到高尔基体上, 也不影响STING从高尔

基体转运至溶酶体进行STING的降解过程. STING的第88、91位半胱氨酸位点对于STING的S-棕榈酰化修饰非常重要, 因此STING第88/91位双突变后在DNA病毒感染情况下不能诱导IFN-I的产生. 在非洲绿猴肾成纤维细胞(emsCOS-1 cells)超表达各个ZDHHC蛋白后检测STING的S-棕榈酰化发现, 超表达ZDHHC3, ZDHHC7和ZDHHC15均定位于高尔基体上. 此外, STING的S-棕榈酰化修饰增加依赖于在emsCOS-1 cells超表达ZDHHC蛋白的酶活性. 提示超表达这些ZDHHC蛋白可促进STING的第88/91位半胱氨酸的S-棕榈酰化修饰. 然而哪个ZDHHC蛋白促进STING的S-棕榈酰化作用最强并不清楚, 可能是因为ZDHHC蛋白的底物存在重叠性^[63].

2014年, 研究人员首次发现ZDHHC1对STING信号通路存在调节作用, ZDHHC1可以促进STING二聚化形成从而激活DNA信号通路^[64]. 而且ZDHHC11同样可促进IFN-I的生成. 与野生型小鼠相比, 敲除ZDHHC11基因的小鼠在HSV-1感染状态下血清中的细胞因子水平降低, 死亡率升高. 有趣的是, ZDHHC11对DNA信号通路的作用机制不同于ZDHHC1, ZDHHC11的C端区域与STING和IRF3相互作用从而促进STING招募IRF3, 激活下游信号通路, 最终促进IFN-I的产生^[65].

研究表明, STING的异常激活与某些自身炎症性疾病有关, 例如STING相关的婴儿期发病的血管病变^[66,67], 提示STING是一个潜在的治疗靶点. 为研制STING抑制剂, 研究人员通过化合物筛选, 鉴定出两种硝基呋喃衍生物C-176和C-178. C-178可阻断STING第91位半胱氨酸的S-棕榈酰化修饰, 影响STING多聚体的形成和后续招募TBK1及TBK1的磷酸化激活, 从而抑制IFN-I的产生. 然而C-178不影响STING从内质网转运至高尔基体及STING的溶酶体降解过程, 并且C-178只对鼠STING具有抑制作用, 对人STING无抑制效果. 为解决这一难题, 研究人员根据C-176和C-178的化学结构成功研制出能够抑制人STING的H-151, H-151同样作用于STING第91位半胱氨酸位点, 抑制STING的S-棕榈酰化修饰, 从而抑制STING的多聚体. 与C-178相比, C-176具有更好的溶解性. 通过动物实验发现, C-176对小鼠无毒性, 可显著降低由STING激活诱导产生的IFN-I和白介素-6水平, 并且使用C-176后可显著改善小鼠的全身性炎症症状^[68]. 这一研究成

果为未来炎症性疾病的治疗方法提供了科学依据.

另有研究发现, HSV-2感染时产生的内源性硝基脂肪酸靶向作用于STING的第88/91位半胱氨酸和N端第16位组氨酸, 介导STING烷基化反应, 从而阻断STING的S-棕榈酰化激活作用, 最终抑制IFN-I的产生^[69]. 上述研究预示着STING的S-棕榈酰化是未来研究STING异常激活相关疾病及其治疗药物的热点内容, 也预示着S-棕榈酰化修饰在天然免疫信号通路中的调节作用有待进一步探讨.

(3) RLR信号通路中的S-棕榈酰化修饰. 除了DNA识别信号通路, S-棕榈酰化修饰在RLR信号通路中同样发挥调节作用. RNA受体主要包括RIG-I、黑色素瘤分化相关基因5(melanoma differentiation-associated gene-5, MDA5)和LGP2(laboratory of genetics and physiology 2), 存在于细胞质的RIG-I和MDA5是细胞识别病毒RNA的主要受体蛋白. RIG-I和MDA5识别病毒RNA后招募并激活线粒体抗病毒蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS), 通过激活信号通路下游的TBK1和IKK, 从而促进IRF3, IRF7和NF- κ B诱导激活IFN-I和促炎细胞因子的产生^[70]. 研究表明, Rac1(the Rho family small guanosine triphosphatase)的S-棕榈酰化修饰可以抑制E3泛素连接酶TRIM31对MAVS的泛素化激活作用, 从而负调节RLR信号通路, 然而哪一种ZDHHC蛋白发挥作用并不清楚^[71]. 所以, S-棕榈酰化修饰调控RLR信号通路的具体机制有待进一步探索.

4.2 S-棕榈酰化修饰在IFN-I下游信号通路(JAK-STAT)中的作用

病毒感染细胞后, 激活DNA识别和RLR信号通路并诱导产生IFN-I. IFN-I是一类重要的细胞因子, 在细胞抵抗病原体感染并清除入侵病原体的过程中发挥关键作用. IFN-I通过结合细胞膜表面的I型干扰素受体(IFN- α/β receptor, IFNAR), IFNAR1和IFNAR2分别与酪氨酸激酶(Janus kinases)Tyk2和JAK1结合, 诱导下游信号分子STAT1(signal transducer and activator of transcription 1)和STAT2的磷酸化和二聚化的形成, 激活信号通路下游一系列接头蛋白, 激活JAK-STAT信号通路, 最终诱导IFN-I刺激基因(interferon-stimulated genes, ISGs)的生成. 研究发现, IFNAR1跨膜区胞质端附近的第463位半胱氨酸残基上的S-棕榈酰化是其下

游的STAT1和STAT2的磷酸化激活所必需的, 阻断IFNAR1的S-棕榈酰化时会显著抑制STAT的核易位进而影响ISGs的转录生成。然而, IFNAR1的S-棕榈酰化修饰对IFNAR1受体内吞、细胞内分布及其在细胞表面的稳定性都不是必需的, 而且IFNAR1的S-棕榈酰化修饰对IFNAR1与IFNAR2的异源二聚体也没有作用^[72], 因此, S-棕榈酰化可能通过靶向IFNAR1来影响下游JAK1或TYK2的磷酸化进而调控IFN-I信号通路。

4.3 抗病毒蛋白的S-棕榈酰化修饰

IFN-I被细胞表面的IFNAR识别后, 启动下游JAK-STAT信号通路, 诱导产生ISGs, 直接发挥抗病毒作用。下文介绍S-棕榈酰化修饰对ISGs的调控作用。

(1) IFITMs的S-棕榈酰化修饰。干扰素诱导跨膜蛋白(interferon induced transmembranes, IFITMs)是ISGs中一类重要抗病毒蛋白, 而人体内与抗感染免疫相关的IFITMs包括IFITM1, 2, 3, 它们均具有抗病毒活性^[73]。DCs是一类专职抗原提呈细胞, 可通过识别PAMPs激活天然免疫应答。然而有研究表明, IFITM2的S-棕榈酰化促使肝细胞内的IFITM2释放到胞外, IFITM2会抑制DCs IFN-I的产生^[74]。为研究S-棕榈酰化蛋白和膜相关蛋白在天然免疫中的作用, 研究人员大规模分析了小鼠DCs的S-棕榈酰化修饰蛋白组学, 发现150多种具有不同生物学功能(包括天然免疫)的S-棕榈酰化蛋白, 例如, IFITM3近膜端高度保守的半胱氨酸位点发生S-棕榈酰化修饰, 促进了其在膜室中的聚集及其抗流感病毒活性^[75,76]。然而, 通过蛋白印迹、免疫荧光和流式细胞术分析发现, S-棕榈酰化不影响IFITM3的蛋白水平、内溶酶体定位或稳定性, 而是诱导了一种类似于tetraspanins(四跨膜蛋白超家族)的积聚效应^[75]。如前所述, 在人源细胞中, S-棕榈酰化是由ZDHHC家族蛋白所介导。IFITMs在S-棕榈酰化修饰后具有抗病毒活性, 但是由哪一种ZDHHC蛋白介导修饰并不清楚。有证据表明, 即使没有病毒感染, IFITM3也可促进晚期细胞内容物转运至溶酶体进行降解, 但是对溶酶体的酶活性没有明显的影响^[77]。对IFITM3的S-棕榈酰化修饰的ZDHHC家族蛋白进行筛选发现, ZDHHC20与IFITM3在溶酶体共定位, 提示ZDHHC20介导的S-棕榈酰化修饰可能影响IFITM3的抗病毒活性。此外, 敲除ZDHHC20的细胞再敲低ZDHHC3和7, 也会下调内源性IFITM3的S-棕榈酰化修饰^[78], 提示

ZDHHC3和7也可能参与了IFITM3的S-棕榈酰化修饰, 这与前文所述的ZDHHCs蛋白家族作用底物存在重叠性结论一致。

最新研究发现, IFITM3定位于内吞囊泡, 病毒感染时内吞囊泡与胞内的病毒颗粒发生融合, 从而促进病毒颗粒转运至溶酶体降解。虽然S-棕榈酰化对IFITM3的亚细胞定位没有显著影响, 但是第72位半胱氨酸位点的S-棕榈酰化修饰对IFITM3转运流感病毒粒子至溶酶体非常重要^[77]。尽管IFITM3一共有三个S-棕榈酰化修饰半胱氨酸位点(Cys71, Cys72和Cys105)^[75,79], 但是IFITM3 Cys72位点突变会显著降低IFITM3对流感病毒的抗病毒活性, 而Cys71和Cys105位点突变后仍保留其IFITM3的抗病毒活性^[77]。另有研究表明, IFITM3的内溶酶体定位和抗病毒活性受泛素化的负调控^[79], 而IFITM3第20位酪氨酸的磷酸化修饰则阻断了IFITM3的泛素化^[80]。这些研究结果表明, IFITM3的抗病毒活性可以受到多种蛋白质修饰的调节作用^[75,76,79,80]。

(2) ZAP蛋白的S-棕榈酰化修饰。锌指抗病毒蛋白(zinc-finger antiviral protein, ZAP)又称为ADP核糖聚合酶13, 是一类RNA结合蛋白, 抑制RNA病毒基因组的翻译^[81]。为探究病毒感染时脂质修饰参与抗病毒天然免疫的作用, 研究人员对小鼠巨噬细胞样RAW264.7细胞的蛋白组进行大规模分析, 发现ZAP可发生S-法尼基酰化^[82]。ZAP可变剪接产生两种ZAP亚型, ZAP-long (ZAPL)和ZAP-short (ZAPS)。之前的研究表明, 人源ZAPL可显著抑制鼠白血病病毒和森林脑炎病毒的感染^[83], 而ZAPL和ZAPS都能抑制人类免疫缺陷病毒的感染^[83,84]。研究人员还发现, 法尼基化促进了ZAPL蛋白的膜靶向性和抗病毒活性, 蛋白质S-异戊烯化之后常会伴有S-棕榈酰化修饰以增加其膜亲和力^[1], 然而研究人员未能检测到ZAPL的S-棕榈酰化修饰^[82]。这一结果提示人源ZAPL的法尼基化和S-棕榈酰化修饰之间可能存在竞争性。

5 总结与讨论

本文总结了ZDHHC家族蛋白参与病毒感染和抗病毒天然免疫的作用靶点(表1)和S-棕榈酰化参与抗病毒天然免疫的机制图(图2)。蛋白质翻译后修饰对细胞抗病毒作用的调控一直是研究热点。近年来, 脂质S-棕

图 2 *S*-棕榈酰化参与抗病毒天然免疫的分子机制。TLR2, RLRs和cGAS可以识别PAMPs。定位于胞膜的TLR2受体可以通过MYD88诱导NF- κ B的激活。cGAS识别胞质内的DNA, 催化生成cGAMP, cGAMP激活定位于内质网的STING, STING从内质网转运至高尔基体后招募TBK1, 导致IRF3和NF- κ B磷酸化激活, 最终诱导IFN-I和促炎因子的产生。MAVS将来自于RIG-I和MDA5的RNA识别信号传递给TBK1和IKK激酶, 诱导IRF3和NF- κ B的激活, 最终诱导IFN和促炎因子的产生。IFN-I通过IFNAR受体的识别, 激活JAK-STAT信号通路, 产生ISGs, 最终建立细胞抗病毒免疫。抗病毒天然免疫信号通路的多个信号分子均可进行*S*-棕榈酰修饰。黑色粗线表示*S*-棕榈酰化发挥调节作用, 黑色虚线表示作用机制不清楚

Figure 2 The underlying mechanisms of *S*-palmitoylation in antiviral innate immunity. TLR2, RLRs and cGAS could recognize PAMPs. TLR2 locates at the plasma membrane and signal through MyD88 to lead the activation of NF- κ B. cGAS recognizes cytosolic DNA and subsequently catalyzes the production of cGAMP that activates STING located at the ER. Activation of STING leads to the recruitment of TBK1, which subsequently induces activation of IRF3 and NF- κ B to product IFN-I and proinflammatory factor. Activated RIG-I and MDA5 can signal through the adaptor protein MAVS to trigger TBK1 and IKK kinase which induce IRF3 and NF- κ B activation respectively, finally leading to induction of IFN-I and proinflammatory factor. After binding with IFN- α/β receptor (IFNAR1/2), IFN-I activates the JAK-STAT signaling pathway and then induces the expression of a variety of interferon-stimulated genes (ISGs) which eventually establish the antiviral immunity of cells. Multiple adaptors in the innate immunity can be modified by palmitate acid. Black solid lines indicate that *S*-palmitoylation plays roles in signaling pathway. Black dashed lines indicate unknown mechanism

桐酰化修饰在免疫应答中作用的研究取得了显著进展, 但是多数研究主要是围绕*S*-棕榈酰化如何调节适应性免疫应答, 对天然免疫应答的调节作用研究较少。因此, *S*-棕榈酰化修饰如何实现对天然免疫应答的调控将成为未来的研究热点。现有研究表明, ZDHHC蛋白能直接修饰天然免疫信号通路接头蛋白, 并且ZDHHC蛋白在进化过程中逐渐形成几大分支, 例如ZDHHC1和ZDHHC11处于同一分支, ZDHHC1和ZDHHC11相似度高, 均能作用于STING从而促进DNA识别信号通路的激活^[64,65]。因此, 推测处于同一分支的ZDHHC蛋白可能具有相似的作用底物和调节机制。

在病毒感染宿主的过程中, *S*-棕榈酰化修饰不仅

参与病毒自身的复制与感染, 同时也参与调控病毒感染诱导的抗病毒天然免疫信号通路, 宿主如何平衡这两种作用? 病毒种类众多, 目前只发现了少数病毒可以利用*S*-棕榈酰化修饰机制来促进自身的复制, 但可能并非所有病毒都利用宿主的*S*-棕榈酰化修饰机制。在病毒入侵宿主后, 病毒蛋白和机体抗病毒蛋白都能利用*S*-棕榈酰化, 但*S*-棕榈酰化的修饰机制是十分复杂的。相同的ZDHHC蛋白均能被病毒和机体利用, 但可能因为参与病毒蛋白和宿主蛋白结合所需的ZDHHC结构域的不同, 导致ZDHHC与底物蛋白结合的稳定性有所差异, 从而产生不同的作用。此外, *S*-棕榈酰化可能涉及到其他蛋白质修饰过程的调节过程。所以在病毒感染过程中, 病毒蛋白可能通过调节天然

表 1 ZDHHC家族成员参与病毒感染和天然免疫信号通路的作用靶点

Table 1 The targets of the ZDHHC family members in viral infection and innate immunity signaling pathway

蛋白名称	促进病毒种类及作用靶点	天然免疫信号通路作用靶点
ZDHHC1	未明	STING ^[64]
ZDHHC2	甲型流感病毒HA ^[35] 基孔尼雅病毒nsP1 ^[53]	TLR2 ^[59]
ZDHHC3	I型单纯疱疹病毒UL20 ^[51]	TLR2 ^[59] STING ^[63] IFITM3 ^[78]
ZDHHC4, 5	未明	未明
ZDHHC6	未明	TLR2 ^[59]
ZDHHC7	未明	TLR2 ^[59] STING ^[63] IFITM3 ^[78]
ZDHHC8	甲型流感病毒HA ^[35]	未明
ZDHHC9	未明	未明
ZDHHC11	未明	STING ^[65]
ZDHHC12, 13, 14	未明	未明
ZDHHC15	甲型流感病毒HA ^[35]	TLR2 ^[59] STING ^[63]
ZDHHC16, 17, 18	未明	未明
ZDHHC19	基孔尼雅病毒nsP1 ^[53]	未明
ZDHHC20	甲型流感病毒HA ^[35]	IFITM3 ^[78]
ZDHHC21, 22, 23, 24	未明	未明

免疫信号分子的其他蛋白质修饰,从而阻断信号分子的S-棕榈酰化修饰,并劫持S-棕榈酰化修饰机制为病毒所用。ZDHHC蛋白多达23个,而目前发现能直接参与抗病毒信号通路的ZDHHC蛋白数量较少,其他ZDHHC蛋白促进信号通路的作用可能需要中间蛋白的参与。

不同浓度的棕榈酸对病毒的作用也不相同。适中浓度棕榈酸处理的细胞病毒复制增强,但是高浓度棕榈酸处理后细胞反而会抑制病毒的复制。有研究表明,棕榈酸可诱导脂肪毒性的产生,而这一过程主要是由线粒体活性氧的过度产生和钙调节异常所介导的^[85]。细胞内的棕榈酸转化成棕榈酸辅酶A,进而促使线粒体的β-氧化过程,最终导致线粒体活性氧的产生^[86]。活性氧的过度产生会破坏内质网的氧化还原稳态进而诱导内质网应激反应最终产生更多的活性氧^[87]。此外,过度产生的活性氧会导致钙调节失衡,而过量的钙离子进入线粒体后会导致线粒体细胞色素C的释放,从而诱导细胞凋亡级联反应最终导致细胞的凋亡^[86]。所以高浓度的棕榈酸可能影响了细胞的活性和代谢过

程,诱导了宿主细胞的凋亡,阻止了病毒的复制过程;也可能是影响了病毒复制所需的宿主蛋白,从而对病毒复制产生抑制作用。

ZDHHC家族最主要的特征是所有蛋白均含有一个高度保守的DHHC结构域,DHHC结构域是ZDHHC蛋白棕榈酸转移酶的催化中心。然而近年来有研究显示,某些ZDHHC蛋白功能的发挥不依赖于其酶活性。有研究发现,超表达人ZDHHC1/11均能以不依赖于酶活性的方式分别促进HeLa细胞和HEK293T细胞抵抗RNA病毒的感染,但是敲低ZDHHC1或11的MEF细胞仍具备抵抗RNA病毒感染的能力。这提示ZDHHC蛋白是否参与天然免疫信号通路的作用取决于细胞类型和种属的特异性。另有研究发现,STING的激活需要其S-棕榈酰化修饰,在emsCOS-1 cells中超表达人ZDHHC, ZDHHC1和11均不能明显促进鼠STING的S-棕榈酰化修饰,这一研究结果与上述ZDHHC1和11对STING的作用机制是吻合的。然而人ZDHHC3/7/15蛋白能明显促进鼠STING的S-棕榈酰化修饰,并且ZDHHC3/7/15在进化树中处于同一分支,推测蛋白结

构差异比较大的ZDHHC蛋白调控STING信号通路的机制也可能不同。

S-棕榈酰化可以影响底物蛋白的定位、转运及其稳定性, 还可通过调节其他蛋白质修饰作用来影响其功能。目前对于S-棕榈酰化在天然免疫通路的调节机制尚不完全清楚。期待未来更多的研究揭示S-棕榈酰

化如何平衡病毒感染时的促病毒作用与机体的抗病毒作用, 这些研究将为未来的抗病毒药物机制研究提供科学基础理论。而且, S-棕榈酰化是由23个ZDHHC蛋白介导的, 确定每一个ZDHHC蛋白在天然免疫中的作用靶点及其详尽作用机制值得进一步探索和研究。

参考文献

- 1 Resh M D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 584–590
- 2 Tabaczar S, Czogalla A, Podkalicka J, et al. Protein palmitoylation: Palmitoyltransferases and their specificity. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017, 242: 1150–1157
- 3 Magee A I, Gutierrez L, McKay I A, et al. Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J*, 1987, 6: 3353–3357
- 4 Linder M E, Deschenes R J. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 74–84
- 5 Valdez-Taubas J, Pelham H. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J*, 2005, 24: 2524–2532
- 6 Lemonidis K, Salaun C, Kouskou M, et al. Substrate selectivity in the zDHHC family of S-acyltransferases. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45: 751–758
- 7 Martin B R, Cravatt B F. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat Methods*, 2009, 6: 135–138
- 8 Roth A F, Wan J, Bailey A O, et al. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell*, 2006, 125: 1003–1013
- 9 Fukata M, Fukata Y, Adesnik H, et al. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*, 2004, 44: 987–996
- 10 Mitchell D A, Vasudevan A, Linder M E, et al. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res*, 2006, 47: 1118–1127
- 11 Lobo S, Greentree W K, Linder M E, et al. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 41268–41273
- 12 Roth A F, Feng Y, Chen L, et al. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol*, 2002, 159: 23–28
- 13 Ohno Y, Kihara A, Sano T, et al. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761: 474–483
- 14 Korycka J, Lach A, Heger E, et al. Human DHHC proteins: a spotlight on the hidden player of palmitoylation. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91: 107–117
- 15 Levy A D, Devignot V, Fukata Y, et al. Subcellular Golgi localization of stathmin family proteins is promoted by a specific set of DHHC palmitoyl transferases. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 1930–1942
- 16 Gorleku O A, Barns A M, Prescott G R, et al. Endoplasmic reticulum localization of DHHC palmitoyltransferases mediated by lysine-based sorting signals. *J Biol Chem*, 2011, 286: 39573–39584
- 17 Yanai A, Huang K, Kang R, et al. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat Neurosci*, 2006, 9: 824–831
- 18 Singaraja R R, Hadano S, Metzler M, et al. HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet*, 2002, 11: 2815–2828
- 19 Ducker C E, Stettler E M, French K J, et al. Huntingtin interacting protein 14 is an oncogenic human protein: palmitoyl acyltransferase. *Oncogene*, 2004, 23: 9230–9237
- 20 Huang K, Sanders S, Singaraja R, et al. Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity. *FASEB J*, 2009, 23: 2605–2615
- 21 Lemonidis K, Gorleku O A, Sanchez-Perez M C, et al. The Golgi S-acylation machinery comprises zDHHC enzymes with major differences in substrate affinity and S-acylation activity. *MBoC*, 2014, 25: 3870–3883
- 22 Webb Y, Hermida-Matsumoto L, Resh M D. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*, 2000, 275: 261–270
- 23 Schmidt M F G, Bracha M, Schlesinger M J. Evidence for covalent attachment of fatty acids to Sindbis virus glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci*

- USA, 1979, 76: 1687–1691
- 24 Schmidt M F G, Schlesinger M J. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell*, 1979, 17: 813–819
- 25 Rocks O, Gerauer M, Vartak N, et al. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell*, 2010, 141: 458–471
- 26 Veit M, Thaa B. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Adv Virol*, 2011, 2011: 1–14
- 27 Sobocińska J, Roszczenko-Jasińska P, Ciesielska A, et al. Protein palmitoylation and its role in bacterial and viral infections. *Front Immunol*, 2017, 8: 2003
- 28 Veit M, Kretzschmar E, Kuroda K, et al. Site-specific mutagenesis identifies three cysteine residues in the cytoplasmic tail as acylation sites of influenza virus hemagglutinin. *J Virol*, 1991, 65: 2491–2500
- 29 Kordyukova L V, Serebryakova M V, Baratova L A, et al. S-acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: Mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine. *J Virol*, 2008, 82: 9288–9292
- 30 Brett K, Kordyukova L V, Serebryakova M V, et al. Site-specific S-acylation of influenza virus hemagglutinin: the location of the acylation site relative to the membrane border is the decisive factor for attachment of stearate. *J Biol Chem*, 2014, 289: 34978–34989
- 31 Zurcher T, Luo G, Palese P. Mutations at palmitoylation sites of the influenza virus hemagglutinin affect virus formation. *J Virol*, 1994, 68: 5748–5754
- 32 Ujike M, Nakajima K, Nobusawa E. Influence of acylation sites of influenza B virus hemagglutinin on fusion pore formation and dilation. *J Virol*, 2004, 78: 11536–11543
- 33 Wagner R, Herwig A, Azzouz N, et al. Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol*, 2005, 79: 6449–6458
- 34 Chlanda P, Mekhedov E, Waters H, et al. Palmitoylation contributes to membrane curvature in Influenza A virus assembly and hemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Virol*, 2017, 91: e00947
- 35 Gadalla M R, Abrami L, Van der Goot F G, et al. Hemagglutinin of Influenza A, but not of Influenza B and C viruses is acylated by ZDHHC2, 8, 15 and 20. *Biochem J*, 2020, 477: 285–303
- 36 Rossman J S, Jing X, Leser G P, et al. Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol*, 2010, 84: 5078–5088
- 37 Huang S, Green B, Thompson M, et al. C-terminal juxtamembrane region of full-length M2 protein forms a membrane surface associated amphipathic helix. *Protein Sci*, 2015, 24: 426–429
- 38 Nguyen P A, Soto C S, Polishchuk A, et al. pH-induced conformational change of the influenza M2 protein C-terminal domain. *Biochemistry*, 2008, 47: 9934–9936
- 39 Rossman J S, Jing X, Leser G P, et al. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 2010, 142: 902–913
- 40 Schmidt N W, Mishra A, Wang J, et al. Influenza virus A M2 protein generates negative Gaussian membrane curvature necessary for budding and scission. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 13710–13719
- 41 Roberts K L, Leser G P, Ma C, et al. The amphipathic helix of influenza A virus M2 protein is required for filamentous bud formation and scission of filamentous and spherical particles. *J Virol*, 2013, 87: 9973–9982
- 42 Yu G Y, Lee K J, Gao L, et al. Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J Virol*, 2006, 80: 6013–6023
- 43 Majeau N, Fromentin R, Savard C, et al. Palmitoylation of hepatitis C virus core protein is important for virion production. *J Biol Chem*, 2009, 284: 33915–33925
- 44 Petit C M, Chouljenko V N, Iyer A, et al. Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion. *Virology*, 2007, 360: 264–274
- 45 Yang C, Spies C P, Compans R W. The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9871–9875
- 46 Rouso I, Mixon M B, Chen B K, et al. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 13523–13525
- 47 Loomis J S, Bowzard J B, Courtney R J, et al. Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 2001, 75: 12209–12219

- 48 Nozawa N, Daikoku T, Koshizuka T, et al. Subcellular localization of herpes simplex virus type 1 UL51 protein and role of palmitoylation in Golgi apparatus targeting. *J Virol*, 2003, 77: 3204–3216
- 49 Serwa R A, Abaitua F, Krause E, et al. Systems analysis of protein fatty acylation in herpes simplex virus-infected cells using chemical proteomics. *Chem Biol*, 2015, 22: 1008–1017
- 50 Veit M, Siche S. S-acylation of influenza virus proteins: Are enzymes for fatty acid attachment promising drug targets? *Vaccine*, 2015, 33: 7002–7007
- 51 Wang S, Mott K R, Cilluffo M, et al. The absence of DHHC3 affects primary and latent HSV-1 infection. *J Virol*, 2017, 92: JVI.01599–17
- 52 Weaver S C, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*, 2015, 372: 1231–1239
- 53 Zhang N, Zhao H, Zhang L. Fatty acid synthase promotes the palmitoylation of Chikungunya virus nsP1. *J Virol*, 2018, 93: e01747–18
- 54 Bakhache W, Neyret A, Bernard E, et al. 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: e02183–19
- 55 Utt A, Rausalu K, Jakobson M, et al. Design and use of Chikungunya virus replication templates utilizing mammalian and mosquito RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol*, 2019, 93: e00794–19
- 56 Yin H, Yin P, Zhao H, et al. Intraviral interactome of Chikungunya virus reveals the homo-oligomerization and palmitoylation of structural protein TF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513: 919–924
- 57 Hayward J A, Mathur A, Ngo C, et al. Cytosolic recognition of microbes and pathogens: inflammasomes in action. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2018, 82: e00015
- 58 Salaun C, Greaves J, Chamberlain L H. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol*, 2010, 191: 1229–1238
- 59 Chesarino N M, Hach J C, Chen J L, et al. Chemoproteomics reveals Toll-like receptor fatty acylation. *BMC Biol*, 2014, 12: 91
- 60 Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 2013, 339: 786–791
- 61 Wu J, Sun L, Chen X, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science*, 2013, 339: 826–830
- 62 Cai X, Chiu Y H, Chen Z J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell*, 2014, 54: 289–296
- 63 Mukai K, Konno H, Akiba T, et al. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat Commun*, 2016, 7: 11932
- 64 Zhou Q, Lin H, Wang S, et al. The ER-associated protein ZDHHC1 is a positive regulator of DNA virus-triggered, MITA/STING-dependent innate immune signaling. *Cell Host Microbe*, 2014, 16: 450–461
- 65 Liu Y, Zhou Q, Zhong L, et al. ZDHHC11 modulates innate immune response to DNA virus by mediating MITA-IRF3 association. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15: 907–916
- 66 Liu Y, Jesus A A, Marrero B, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med*, 2014, 371: 507–518
- 67 Ahn J, Barber G N. Self-DNA, STING-dependent signaling and the origins of autoinflammatory disease. *Curr Opin Immunol*, 2014, 31: 121–126
- 68 Haag S M, Gulen M F, Reymond L, et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Nature*, 2018, 559: 269–273
- 69 Hansen A L, Buchan G J, Rühl M, et al. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E7768–E7775
- 70 Ablasser A, Hur S. Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nat Immunol*, 2020, 21: 17–29
- 71 Yang S, Harding A T, Sweeney C, et al. Control of antiviral innate immune response by protein geranylgeranylation. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav7999
- 72 Claudinon J, Gonnord P, Beslard E, et al. Palmitoylation of interferon- α (IFN- α) receptor subunit IFNAR1 is required for the activation of Stat1 and Stat2 by IFN- α . *J Biol Chem*, 2009, 284: 24328–24340
- 73 Zhao X, Li J, Winkler C A, et al. IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections. *Front Microbiol*, 2018, 9: 3228
- 74 Shi Y, Du L, Lv D, et al. Exosomal interferon-induced transmembrane protein 2 transmitted to dendritic cells inhibits interferon alpha pathway activation and blocks anti-hepatitis B virus efficacy of exogenous interferon alpha. *Hepatology*, 2019, 69: 2396–2413
- 75 Yount J S, Moltedo B, Yang Y Y, et al. Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 610–614
- 76 Percher A, Ramakrishnan S, Thinon E, et al. Mass-tag labeling reveals site-specific and endogenous levels of protein S-fatty acylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 4302–4307

- 77 Spence J S, He R, Hoffmann H H, et al. IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 259–268
- 78 McMichael T M, Zhang L, Chemudupati M, et al. The palmitoyltransferase ZDHHC20 enhances interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) palmitoylation and antiviral activity. *J Biol Chem*, 2017, 292: 21517–21526
- 79 Yount J S, Karssemeijer R A, Hang H C. S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *J Biol Chem*, 2012, 287: 19631–19641
- 80 Chesarino N M, McMichael T M, Hach J C, et al. Phosphorylation of the antiviral protein interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) dually regulates its endocytosis and ubiquitination. *J Biol Chem*, 2014, 289: 11986–11992
- 81 Todorova T, Bock F J, Chang P. Poly(ADP-ribose) polymerase-13 and RNA regulation in immunity and cancer. *Trends Mol Med*, 2015, 21: 373–384
- 82 Charron G, Li M M H, MacDonald M R, et al. Prenylome profiling reveals S-farnesylation is crucial for membrane targeting and antiviral activity of ZAP long-isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 11085–11090
- 83 Kerns J A, Emerman M, Malik H S. Positive selection and increased antiviral activity associated with the PARP-containing isoform of human zinc-finger antiviral protein. *PLoS Genet*, 2008, 4: e21
- 84 Zhu Y, Chen G, Lv F, et al. Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 15834–15839
- 85 Tzeng H T, Chyuan I T, Chen W Y. Shaping of innate immune response by fatty acid metabolite palmitate. *Cells*, 2019, 8: 1633
- 86 Ly L D, Xu S, Choi S K, et al. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med*, 2017, 49: e291
- 87 Cao S S, Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxids Redox Signal*, 2014, 21: 396–413

The roles of protein palmitoylation during viral infection

YI Li & ZHENG ChunFu

Department of Immunology, the School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China

It is now generally accepted that protein palmitoylation is known as a lipid modification which enriches the functions of substrate proteins. Zinc-finger proteins containing a high conserved Asp-His-His-Cys tetrapeptide (ZDHHC) domain are a group of specific protein acyltransferases, which are responsible for the majority of palmitoylation modifications in mammalian cells. After invading into the cells, viruses employ the host palmitoylation machinery to promote their replication and infection. At the same time, pathogen-associated-molecular-patterns derived from viruses are recognized by pattern recognition receptors, which induces the innate immunity to protect the host from the invading viruses. Innate immune responses triggered by viral infection serve as the first line of host defense in detecting and eliminating invading viruses. To date, studies have shown that the palmitoylation of adaptor protein in antiviral innate signaling pathway and antiviral proteins is important for their function. However, the underlying mechanisms of ZDHHC family proteins participating in viral infection are not completely understood. This review has summarized the current understandings of palmitoylation mediated by ZDHHC family proteins during viral infection.

posttranslational modifications, palmitoylation, viral infection

doi: [10.1360/SSV-2020-0083](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0083)