

# SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 复合体参与贾第虫无义介导的 mRNA 降解激活

王 美<sup>1)</sup>, 吕 佳<sup>1)</sup>, 石文鑫<sup>1)</sup>, 柴杨丽<sup>1)</sup>, 文建凡<sup>2)</sup>, 张西臣<sup>3)</sup>, 柴宝峰<sup>1)</sup>\*

(<sup>1)</sup>山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006; (<sup>2)</sup>中国科学院

昆明动物研究所, 遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明 650223; (<sup>3)</sup>吉林大学动物医学学院预防兽医学系, 长春 130062)

**摘要** 无义介导的 mRNA 降解(NMD)是一种重要的真核生物 mRNA 质量监控途径。NMD 可识别并降解含有提前终止密码子(PTC)的异常 mRNA(PTC-mRNA)。但 NMD 途径对 PTC-mRNA 的识别和降解机制尚无阐明。蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)是一种寄生性的原生动植物,进化上处于真核生物基部,对其 NMD 途径的研究有利于了解 NMD 途径的机制与进化。本研究通过双分子荧光互补实验、酵母双杂交实验和体外 pull-down 实验,分析了贾第虫的 UPF1 (GIUPF1)、SMG1 (GISMG1)和肽链释放因子(GleRF1、GleRF3)之间的相互作用关系。结果表明,贾第虫的肽链释放因子都能够与 GIUPF1 发生相互作用,且 GIUPF1 的 CH 结构域与 GleRF3 能够形成较稳定的复合体,而 GISMG1 的激酶结构域 PIKK 能与 UPF1 的 C 端和 N 端结构域相互作用。进一步研究证实,GISMG1 的 PIKK 结构域能使 GIUPF1 两种截短体 GIUPF1 (1~500 aa)和 GIUPF1 (501~1 304 aa)发生磷酸化修饰,说明 GIUPF1 的 N 端和 C 端均有 GISMG1 的磷酸化位点。进一步分析证实,T111 是 GIUPF1 上的 1 个磷酸化位点。我们的研究表明,贾第虫 NMD 途径起始阶段,首先在 mRNA 的 PTC 处的核糖体上形成 SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 (SURF)复合体,并且 GISMG1 磷酸化修饰 GIUPF1,由此激活 NMD 途径,可能招募 XRN1 和 SKI7d 等酶参与无义 mRNA 的降解。

**关键词** 蓝氏贾第虫;无义介导的 mRNA 降解;UPF1;SMG1;磷酸化修饰

**中图分类号** Q786

## SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 Complex Is Involved in the Nonsense-mediated mRNA Decay in Protozoan *Giardia lamblia*

WANG Mei<sup>1)</sup>, LV Jia<sup>1)</sup>, SHI Wen-Xin<sup>1)</sup>, CHAI Yang-Li<sup>1)</sup>, WEN Jian-Fan<sup>2)</sup>,  
ZHANG Xi-Chen<sup>3)</sup>, CHAI Bao-Feng<sup>1)</sup>\*

(<sup>1)</sup>Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

(<sup>2)</sup>State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

(<sup>3)</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract** Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is an important mRNA quality-control mechanism in eukaryotes. It can identify and degrade abnormal mRNAs containing premature termination codon (PTC). However, we have known insufficiently the mechanism about recognition and degradation of PTC-mRNA in NMD pathway. *Giardia lamblia* is a kind of parasitic protozoan,

收稿日期: 2018-01-10; 修回日期: 2018-03-20; 接受日期: 2018-04-10

国家自然科学基金(No. 31772450)和山西省科技攻关项目(No. 20150313001-3)资助

\* 通讯作者 Tel: 0351-7010700; E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

Received: January 10, 2018; Revised: March 20, 2018; Accepted: April 10, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31772450) and Shanxi Scientific and Technological Project (No. 20150313001-3)

\* Corresponding author Tel: 0351-7010700; E-mail: bfchai@sxu.edu.cn

located on the root in eukaryotic evolution. The studies on NMD of *G. lamblia* are useful to understand the mechanism and evolution of NMD pathway. In this study, the interaction between GIUPF1, GISMGI and polypeptide release factors of *G. lamblia* was confirmed by using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays, yeast two hybrid assays and the in vitro pull-down experiments. The results showed that polypeptide release factors of *G. lamblia* could interact with GIUPF1, and the CH domain of GIUPF1 and GleRF3 could form a stable complex. The PIKK domain, the kinase domain of GISMGI, could also interact with both C-terminal and N-terminal domains of GIUPF1. In addition, we confirmed that the truncated UPF1 (1 – 500 aa) and UPF1 (501 – 1304 aa) could be phosphorylated by PIKK. Furthermore, we identified that T111 might be a phosphorylation site of GIUPF1. Altogether, our results showed that a SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 (SURF) complex was firstly formed on the ribosome pausing on the PTC-mRNA in *G. lamblia*, and then GISMGI phosphorylated GIUPF1 to activate the NMD pathway. Finally, RNAses such as XRN1 and SKI7 might be recruited to participate in mRNA decay process.

**Key words** *Giardia lamblia*; nonsense-mediated mRNA decay (NMD); up frameshift1 (UPF1); suppressor with morphological effect on genitalia 1 (SMG1); phosphorylation

真核细胞基因的表达过程受到精细调控与严格监督。在蛋白质翻译水平,无义介导的 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 机制能够降解含有提前终止密码子 (premature termination codon, PTC) 的 mRNA<sup>[1, 2]</sup>, 以免这些异常 mRNA 翻译出的截短型蛋白质对细胞的潜在危害<sup>[3-5]</sup>。目前,在多种真核生物中发现有 NMD 途径存在,例如,哺乳动物、酵母、线虫、果蝇和植物中<sup>[5]</sup>。此外, NMD 途径还与多种遗传性疾病和肿瘤的发病有关<sup>[6]</sup>。

目前,已知的参与 NMD 途径的蛋白质因子有 UPF (up frameshift)、SMG (suppressor with morphological effect on genitalia) 家族蛋白质、肽链释放因子 (polypeptide release factors, eRFs) 等。UPF1 是 NMD 途径的核心因子,也是其最保守的因子之一<sup>[6]</sup>,具有 5'-3' 解旋酶活性和 ATP 酶活性<sup>[7]</sup>。UPF1 蛋白在结构上包含富含 CH 结构域 (Cys-His rich domain)、RNA 解旋酶结构域,以及在其 N 端和 C 端区域有多个潜在的磷酸化 [S/T]Q 模体结构 (motif),这些模体结构大多数是保守的。有研究表明,这些磷酸化位点为 NMD 下游因子 (如 RNA 内切酶 XRN1 等) 提供了结合平台<sup>[1, 8]</sup>。高等真核生物中,SMG1 是 NMD 途径中的一种保守的激酶,可使 UPF1 磷酸化<sup>[8]</sup>。SMG1 在结构上包含几个不同的结构域,其中,PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) 是 SMG1 的激酶结构域。第一类肽链释放因子 (eRF1) 可识别终止密码子,并能与第二类肽链释放因子 (eRF3) 相互作用,参与终止密码子的识别和肽链的释放过程<sup>[9, 10]</sup>。这些蛋白质因子相互作用,在第一轮翻译的核糖体上形成 SURF

(SMG1-UPF1-eRF1/3) 复合体,与在外显子连接处形成的 EJC (exon-exon junction complex) 复合体,通过 UPF2 和 UPF3 相互作用,使 NMD 途径准确识别异常 mRNA,并对其降解<sup>[11]</sup>。而在酵母和果蝇等生物中,NMD 途径的发生不依赖于 EJC 复合体,称为“伪 3'-UTR 模型” (the faux 3'-UTR model),当翻译终止复合体停留在 PTC 处时,eRF3 由于距离 ploy (A) 结合蛋白 (PABP) 较远而不能发生相互作用,故 UPF1 与 eRF3 优先相互作用,启动了 NMD 途径。在两种模型中,SMG1 对 UPF1 的磷酸化修饰是 NMD 途径激活和 mRNA 降解的关键<sup>[12, 13]</sup>。

初步研究发现,原生动物的 NMD 途径有别于高等真核生物,如四膜虫 (*Tetrahymena*)、草履虫 (*Paramecium*)、游仆虫 (*Euplotes*) 等<sup>[14, 15]</sup>,其 NMD 途径因子种类和结构上差异很大<sup>[15]</sup>。蓝氏贾第虫 (*Giardia lamblia*) 是一种寄生性的原生动物,进化上处于真核生物基部,细胞代谢功能与进化方面具有独特性,对于进化生物学研究有非常重要的价值<sup>[16, 17]</sup>。目前,已经鉴定的蓝氏贾第虫中,NMD 途径有关的因子有 GIUPF1、GleRFs、GISMGI、GIXRN1、GISKI7,称为不完全 NMD 途径 (incomplete NMD pathway)<sup>[18, 19]</sup>,但贾第虫 NMD 途径的具体机制尚无深入研究。基于此,本研究运用酵母双杂交实验与双分子荧光互补实验和体外 pull-down 实验,验证贾第虫 GIUPF1、GleRF1、GleRF3 和 GISMGI 之间的相互作用关系,并进一步分析 GIUPF1 与其他因子相互作用的位点,以及 GISMGI 对 GIUPF1 的磷酸化修饰作用,为构建贾第虫 NMD 途径的信号通路模型提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

*E. coli* DH5 $\alpha$  用于质粒的扩增与转化, *E. coli* BL21 (DE3) 用于目的蛋白质的表达和双分子荧光互补实验, AH109 用于酵母双杂交。

### 1.2 试剂

质粒提取试剂盒 (Plasmid Miniprep Kit) 和 DNA 回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 购自 OMEGA 公司; 限制性内切酶均购自 Fermentas 公司; 葡萄糖 (glucose)、DNA 担体 (鲑鱼精)、ONPG (邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖苷) 购于 Solarbio 公司; His 单克隆抗体和 GST 单克隆抗体购自 Transgene 公司; LB 培养基所用的胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、琼脂、氨苄青霉素和卡那霉素等购于上海 Sangon 公司; 异丙基硫代  $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 购于 Sigma 公司。

### 1.3 重组质粒的构建

以 *gfp* 基因为模板, 利用引物 BF913/ BF914 和 BF953/ BF954 (见 Table1), 扩增 *gfp* 基因。用 *Sac* I / *Sal* I 和 *Sma* I / *Sal* I 酶切位点, 将 *gfp* 基因分别克隆到质粒 pET-28a-cherry (160 ~ 237) 和 pQE-30-cherry (1 ~ 159) 中, 得到 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP 和 pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP 重组质粒。测序鉴定后, 用于双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 实验。以贾第虫基因组为模板, 利用引物 BF826/BF827、BF779/BF857、BF946/BF952 和 BF846/BF845, PCR 扩增 *Glupf1*、*GleRF1* 和 *GleRF3* 基因片段。分别用 *Sal* I / *Not* I、*Bam* H I / *Kpn* I 和 *Bam* H I / *Kpn* I 酶切位点, 将纯化后的 PCR 产物克隆到载体 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP 和 pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP 中, 得到重组质粒 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GIUPF1、pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF1、pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF3。利用引物 BF793/BF794、BF795/BF796、BF820/ BF821、BF847/BF844、BF793/BF889、BF890/BF794、BF890/BF907、BF908/BF794、BF820/BF821 和 BF847/BF844, 通过 PCR 扩增 *Glupf1* 及其截短体基因片段、*Glpikk*、*GleRF1*、*GleRF3*、*GLFAT* + *FRB* 和 *GIHEAT* 基因片段, 分别用 *Sma* I / *Bam* H I、*Nco* I / *Sma* I、*Nco* I / *Bam* H I、*Eco* R I / *Bam* H I、*Sma* I / *Bam* H I、*Sma* I / *Bam* H I、*Bam* H I / *Nco* I 和 *Nde* I / *Sal* I 酶切位点, 将基因片段分别克隆到酵母双杂交载体 pGADT<sub>7</sub> 和 pGBKT<sub>7</sub> 中, 获得重组质粒 pGADT<sub>7</sub>-

GIUPF1、pGBKT<sub>7</sub>-GLPIKK、pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1、pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (501 ~ 1 250 aa)、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (1 251 ~ 1 304 aa)、和 pGBKT<sub>7</sub>-GIHEAT, 测序鉴定后, 用于酵母双杂交实验。利用引物 BF746/BF887、BF888/BF747、BF946/BF947 和 BF943/BF944, 通过 PCR 扩增 *Glupf1* (1 ~ 500 aa)、*Glupf1* (501 ~ 1 304 aa)、*GleRF3* 和 *Glpikk* 基因片段, 分别用 *Bam* H I / *Not* I、*Bam* H I / *Not* I、*Bam* H I / *Eco* R I 和 *Sma* I / *Xho* I 酶切位点, 将纯化后的 PCR 产物克隆到载体 pGEX-6p-1 和 pET-28a 中, 获得重组质粒 pET-28a-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、pET-28a-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)、pGEX-6p-1-GIPIKK、pGEX-6p-1-GIPIKK、pGEX-6p-1-GIUPF1 (1 ~ 500 aa), 测序鉴定后, 用于原核基因表达实验和体外 pull-down 实验。

### 1.4 双分子荧光互补实验

将构建好的重组质粒 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GIUPF1/pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF1, pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GIUPF1/pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF3, pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GleRF1/pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF3 (阳性对照)<sup>[20, 21]</sup>, pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP/pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP (阴性对照) 组合共转化到 *E. coli* BL21 细胞, 涂布于双抗 (Amp<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>) 的 LB 固体平板培养基上。置于 37 °C 恒温生化培养箱, 倒置过夜培养, 经过 12 ~ 16 h 培养, 挑取平板上长势良好的单克隆菌落, 接种到 5 mL 液体 LB 培养基中, 放入 37 °C 恒温摇床中培养 3 h, 至菌液 A<sub>550</sub> 约为 0.6, 加入 IPTG (终浓度为 0.3 mmol/L)。诱导 4 h, 4 °C 低温处理 1.5 h。4 °C 离心收集 1 mL 菌液 (13 000 r/min, 1 min), 弃上清后, 用 1 mL 的 PBS 溶液洗涤菌体 3 次, 再用 1 mL 的无菌水洗涤菌体 3 次。稀释重悬菌液, 测定 A<sub>550</sub> 为 0.8 时, 制做临时装片, 利用 Delta Vision RT (applied precision) 对其绿色和红色荧光进行检测<sup>[22]</sup>。

### 1.5 酵母双杂交检测

酵母菌株 AH109 于 YPD 液体培养基中 30 °C 培养, 将重组质粒组合 pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1、pGADT<sub>7</sub>-



GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GIHEAT、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GIFAT + FRB、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GIPK、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GIPK、pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)/pGBKT<sub>7</sub>-GIPK 共转化酵母 AH109, 用来分析 GIUPF1 及其截短体与 GleRF1、GleRF3 和 GIPK 的相互作用关系; pGADT<sub>7</sub>-GleRF1/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3 共转化酵母 AH109 作为阳性对照。涂布 SD-Leu-Trp 平板, 将能够生长的阳性克隆进一步用 SD-Leu-Trp-His-Ade 平板进行严谨型筛选。进一步对阳性克隆进行 β-半乳糖苷酶活性分析, 以此判断 GIUPF1 及其截短体与 GleRF1、GleRF3 以及 GISM1 的相互作用。β-半乳糖苷酶活性测定时将生长在 SD-Leu-Trp 平板上的阳性克隆, 转接入 5 mL SD-Leu-Trp 液体培养基中过夜培养, 后将 2 mL 该菌液转接入 8 mL YPD 液体培养基中, 在适宜条件下培养至菌液 A<sub>600</sub> 在 0.6 时, 收集菌体并反复冻融破碎细胞, 加入含有 β-巯基乙醇的 Z 缓冲液和 ONPG 后, 在 37 °C 水浴中孵育至液体颜色变黄, A<sub>420</sub> 检测吸光值, 根据公式:

酶活单位 =  $1\,000 \times A_{420} / \text{酵母细胞培养液 } A_{600} \times \text{反应时间 (min)} \times 0.1 \times \text{稀释系数}^{[23]}$ 。单位为 Miller。

## 1.6 体外 pull-down 实验及 Western 印迹分析

将原核重组表达质粒 pET-28a-GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、pET-28a-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 转化 *E. coli* BL21 细胞, 涂布于含 Kan<sup>r</sup> 的 LB 平板上。将原核重组表达质粒 pGEX-6p-1-GIPK、pGEX-6p-1-GleRF3 转化 *E. coli* BL21 细胞, 涂布于含 Amp<sup>r</sup> 的 LB 平板上。37 °C 过夜培养。将阳性单克隆挑于 5 mL 的含有相应抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜震荡培养。同时, 转化并诱导不含外源基因的空质粒作为对照。将上述培养好的菌液转接入 500 mL 的 LB 培养液中, 震荡培养 2 h, 至菌液 A<sub>600</sub> 达到 0.4 ~ 0.6, 按 1:1 000 比例加入 IPTG, 16 °C 过夜诱导表达。离心收集菌体, 将细胞重悬于相应的缓冲液中, 冰浴超声波破碎细胞, 离心收集上清蛋白质。Pull-down 实验是将含有融合蛋白 His-GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 或 His-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 的上清与已平衡好的 Ni-NAT 柱冰浴结合 5 ~ 6 h, 用镍柱洗涤缓冲液 (20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 洗涤, 去除杂蛋白质; 然后加入含有融合蛋白

GST-GIPK 或 GST-GleRF3 的上清, 使其与已固定在 Ni-NAT 上的 His-GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 或 His-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 处于同一溶液体系中, 冰浴过夜, 用镍柱洗涤缓冲液再次洗涤, 去除杂蛋白质, 最后收集用镍柱洗脱缓冲液 (20 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑 pH 7.4) 洗脱结合在 Ni-NAT 柱上的蛋白质。用洗脱下的蛋白质溶液制备样品, 12% SDS-PAGE 和 Western 印迹分析两种蛋白质的相互作用关系。Western 印迹分析中用到的一抗为 Anti-His 抗体, 二抗为荧光二抗。用与上述相同的方法, 分析截短体 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 或 GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 与 GIPK 的相互作用关系。

## 1.7 体外磷酸化检测

将纯化的原核表达的融合蛋白 GST-GIPK、GST-GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 和 GST-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 加入体外磷酸化体系 [25 μL Tris (pH 7.5, 1 mol/L), 50 μL MgCl<sub>2</sub> (200 mmol/L), 100 μL NaCl (1 mol/L) 和超纯水], 30 °C 水浴反应 8 h<sup>[24]</sup>, 蛋白质磷酸化水平检测试剂盒 (上海 Sangon 公司) 检测反应体系中的蛋白质磷酸化水平, 分析 GISM1 的 GIPK 结构域是否能使 GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 蛋白发生磷酸化。用基因突变方法将 GIUPF1 的 N 端和 C 端可能的磷酸化位点进行突变, 利用引物 T11/T12 将 GIUPF1 的 N 端第 72 位的 Thr 变为 Ala; T13/T14 引物将 111 位的 Thr 变为 Ala; T17/T18 引物将 1 271 位的 Ser 变为 Ala。测定 GIUPF1 磷酸化水平的变化。先利用试剂盒所给磷酸化蛋白质标准品绘制标准曲线。每组实验的磷酸化水平都是经蛋白质磷酸化水平检测试剂盒反应后, A<sub>620</sub> 测得每组数据, 对应标准曲线获得待测样品磷酸化对应的值, 后根据蛋白质磷酸化水平 (N) 的计算公式: 待测样品磷酸化对应的值 (μg/mL) × 磷酸化标准蛋白质的磷酸化水平 (2.24%) × 待测磷酸化蛋白质的分子量/待测样品磷酸化蛋白质浓度 (μg/mL) × 磷的原子量 (31)。研究中所使用的引物均列于 Table1。

## 1.8 统计学方法

本文数据的统计学分析是通过软件 OriginPro 8.5 来分析酵母双杂交 β-半乳糖苷酶活性和 GIUPF1 各截短体和突变体磷酸化水平的数据, 每组数据取平均值 (average), 计量数据以均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。



Table 1 List of oligonucleotides used in this study

Lab code	Oligonucleotides sequences( 5'→3')	Purpose	Note
BF826	gcgtcgacatggagccttgtgcattgtgc	Cloning the <i>Glupf1</i> to construct pET-28a-cherry ( 160 ~ 237 ) -	<i>Sal</i> I
BF827	aggaaaaaagcggccgcctataccttagggatcacctcatcgaga	GFP-GIUPF1	<i>Not</i> I
BF746	cgcggatccatggagccttgtgcattgtgc	Cloning the <i>Glupf1</i> to construct pQE-30-cherry ( 1 ~ 159 ) -	<i>Bam</i> H I
BF842	tccccgggctataccttagggatcacctcatcgaga	GFP-GIUPF1	<i>Sma</i> I
BF830	cgcggatccgagggcagcgtttcttcaggtagactat	Cloning the <i>GIFAT</i> + <i>FRB</i> to construct pQE-30-cherry ( 1 ~	<i>Bam</i> H I
BF831	cggggtagcccggaagttcagagtgaattctgtcgta	159 ) - GFP-GIFAT + FRB	<i>Kpn</i> I
BF846	acatgcatgcatg tattatgcgtttctgctgt	Cloning the <i>Glpikk</i> to construct pQE-30-cherry ( 1 ~ 159 ) -	<i>Sph</i> I
BF845	tccccgggtccactaagaaccttcatgga	GFP-GIPIKK	<i>Sma</i> I
BF840	gcgtcgacatgtctgaggaccactttgaaaagata	Cloning the <i>GIHEAT</i> to construct pET-28a-cherry( 160 ~ 237 ) -	<i>Sal</i> I
BF841	aaggaaaaaagcggccgcacctgaagaacgctgccctct	GFP-GIHEAT	<i>Not</i> I
BF913	cgagctc atgggtgagcaagggcgag	Cloning the <i>gfp</i> to construct pET-28a-cherry( 160 ~ 237 ) -GFP	<i>Sac</i> I
BF914	acgcgtcgac ctgtacagctcgccat		<i>Sal</i> I
BF953	tccccgggg atgggtgagcaagggcgag	Cloning the <i>gfp</i> to construct pQE-30-cherry( 1 ~ 159 ) -GFP	<i>Sma</i> I
BF954	acgcgtcgac ctgtacagctcgccat		<i>Sal</i> I
BF779	cgcggatcc atgtccataaacccgatgca	Cloning the <i>GleRF1</i> to construct pQE-30-cherry ( 1 ~ 159 ) -	<i>Bam</i> H I
BF857	ggggtagcttaaatgaagtcctcgag	GFP-GleRF1	<i>Kpn</i> I
BF946	cgcggatcc atgtcgtctcaggaggtg	Cloning the <i>GleRF3</i> to construct pQE-30-cherry ( 1 ~ 159 ) -	<i>Bam</i> H I
BF952	cggggtagcc ttacttagcgggcttgac	GFP-GleRF3	<i>Kpn</i> I
BF793	tccccgggatggagccttgtgcattgtgc	Cloning the <i>Glupf1</i> to construct pGADT <sub>7</sub> -GIUPF1	<i>Sma</i> I
BF794	cgcggatccctataccttagggatcacctcatcgaga		<i>Bam</i> H I
BF795	catgccatggatg tattatgcgtttctgctgt	Cloning the <i>Glpikk</i> to construct pGBKT <sub>7</sub> -GIPIKK	<i>Nco</i> I
BF796	tccccggggccagtagtgacaccatccaatatatagttg		<i>Sma</i> I
BF820	catgccatgggagggcagcgtttcttcaggtagactat	Cloning the <i>GIFAT</i> + <i>FRB</i> to construct pGBKT <sub>7</sub> - GIFAT + FRB	<i>Nco</i> I
BF821	cgcggatcccggaagttcagagtgaattctgtcgta		<i>Bam</i> H I
BF847	ggaaattcatatgatgtctgaggaccactttgaaaagata	Cloning the <i>GIHEAT</i> to construct pGBKT <sub>7</sub> - GIHEAT	<i>Nde</i> I
BF844	gcgtcgacacctgaagaacgctgccctct		<i>Sal</i> I
BF793	tccccgggatggagccttgtgcattgtgc	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 1 ~ 500 aa ) to construct pGADT <sub>7</sub> -GIUPF1	<i>Sma</i> I
BF889	cgcggatcc gggagacgcaatgtcgggt		<i>Bam</i> H I
BF890	tccccgggatg gccttctacaagcactctcac	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 501 ~ 1 304 aa ) to construct pGADT <sub>7</sub> -	<i>Sma</i> I
BF794	cgcggatccctataccttagggatcacctcatcgaga	GIUPF1 ( 501 ~ 1 304 aa )	<i>Bam</i> H I
BF890	tccccgggatg gccttctacaagcactctcac	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 501 ~ 1 250 aa ) to construct pGADT <sub>7</sub> -	<i>Sma</i> I
BF907	cgcggatcc gcagcgttcagacc	GIUPF1 ( 501 ~ 1 250 aa )	<i>Bam</i> H I
BF908	tccccgggatg cgctgcgcctcataaatgtt	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 1 251 ~ 1 304 aa ) to construct pGADT <sub>7</sub> -	<i>Sma</i> I
BF794	cgcggatccctataccttagggatcacctcatcgaga	GIUPF1 ( 1 251 ~ 1 304 aa )	<i>Bam</i> H I
BF852	catgccatggatgtccataaacccgatgca	Cloning the <i>GleRF1</i> to construct pGBKT <sub>7</sub> -GleRF1	<i>Nco</i> I
BF853	cgcggatccttaaatgaagtcctcgag		<i>Bam</i> H I
BF824	ccggaaattcatgtctcaggaggtggtgcaagtt	Cloning the <i>GleRF3</i> to construct pGBKT <sub>7</sub> -GleRF3	<i>Eco</i> R I
BF825	cgcggatcccttacttagcgggcttgacgctaactatataccc		<i>Bam</i> H I
BF746	cgcggatccatggagccttgtgcattgtgc	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 1 ~ 500 aa ) to construct pGEX-6p-1-	<i>Bam</i> H I
BF887	aaggaaaaaagcggccgcgggagacgcaatgtcgggt	GIUPF1 ( 1 ~ 500 aa ) and pET-28a-GIUPF1 ( 1 ~ 500 aa )	<i>Not</i> I
BF888	cgcggatccatg gccttctacaagcactctcac	Cloning the <i>Glupf1</i> ( 501 ~ 1 304 aa ) to construct pET-28a-GIUPF1	<i>Bam</i> H I
BF747	aaggaaaaaagcggccgctactcttagggatcacctcatcgaga	( 501 ~ 1 304 aa ) and pGEX-6p-1-GIUPF1 ( 501 ~ 1 304 aa )	<i>Not</i> I
BF943	tccccgggg atg tattatgcgtttctgctgt	Cloning the <i>Glpikk</i> to construct pGEX-6p-1- GIPIKK	<i>Sma</i> I
BF944	ccgctcgag tcactaagaaccttcatgga		<i>Xho</i> I
BF946	cgcggatcc atgtcgtctcaggaggtg	Cloning the <i>GleRF3</i> to construct pGEX-6p-1- GleRF3	<i>Bam</i> H I
BF947	ccggaaatc cttagcgggcttgacgct		<i>Eco</i> R I
T11	tgtgagaccaagggaaataaccgctttgggcttcctcc	Generating the mutant GIUPF1 ( 1 ~ 500 aa ) S72A	
T12	gcggttaltcccttgggtctcacagtcgttacaata		
T13	tggcgtcccataatttcgcacacatagattccgcg	Generating the mutant GIUPF1 ( 1 ~ 500 aa ) T111A	
T14	cggaaattatgggacgccacgcggaggtatcatggg		
T17	attgatagtacttggcgtgcgttgattcaacattactat	Generating the mutant GIUPF1 ( 501 ~ 1 304 aa ) S1271A	
T18	cacgccaagtactactcaatggcgagagcagttgcgt		

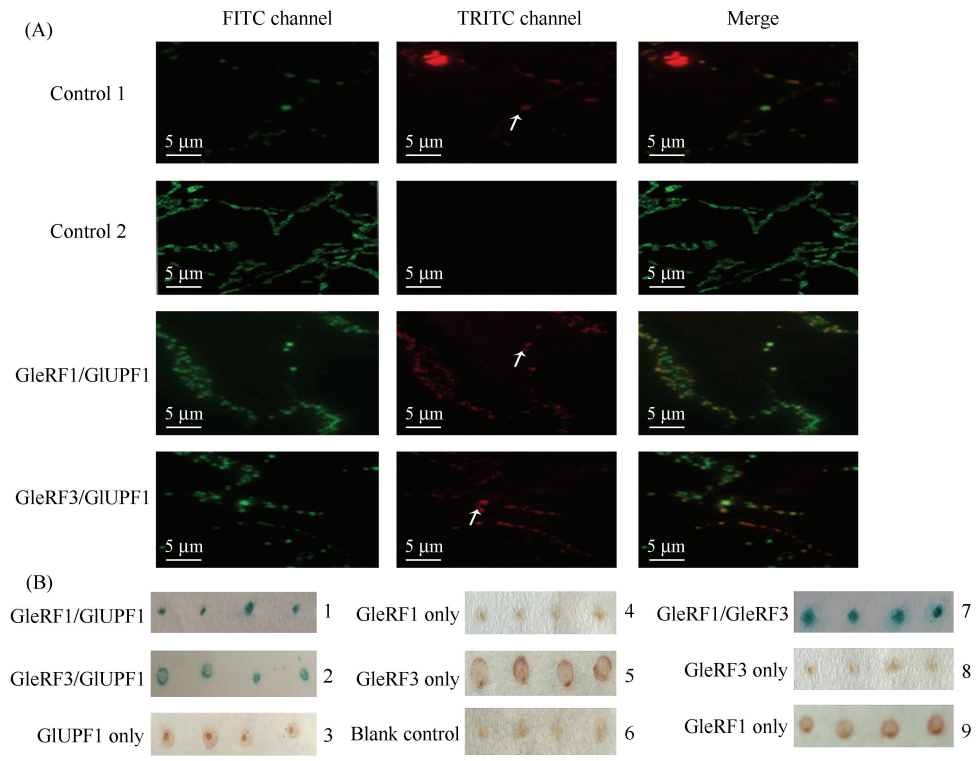
2 结果

2.1 蓝氏贾第虫 eRF1、eRF3 与 UPF1 的相互作用

为了研究贾第虫的两类肽链释放因子与 GIUPF1 之间的相互作用关系,本研究将不同组合的重组质粒 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GIUPF1/ pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF1 和 pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GIUPF1/ pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF3 转化大肠杆菌 BL21 菌株,制作临时装片,Delta Vision 检测红色和绿色荧光。结果显示,阳性对照<sup>[20, 21]</sup>检测到绿色荧光和红色荧光,且红色荧光的数量较多;阴性对照仅能检测到绿色荧光,未检测到红色荧光,说明阴性对照中无蛋白质间相互作用。

实验组 GIUPF1/GleRF1 和 GIUPF1/ GleRF3 中都可以检测到不同程度的红色荧光,说明 GIUPF1 与贾第虫两类肽链释放因子之间存在相互作用 (Fig. 1A)。

用酵母双杂交实验进一步证实 GIUPF1 与 GleRF1 和 GleRF3 的相互作用。将实验组质粒 pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1 和 pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1/pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3 分别共转入 AH109 酵母细胞中进行酵母双杂交。显色结果 (Fig. 1B) 显示, GIUPF1 可以与贾第虫的肽链释放因子 GleRF1、GleRF3 相互作用。以上结果说明,贾第虫 GIUPF1 与 GleRF1 或者 GleRF3 相互作用,在蛋白质合成提前终止过程中 (核糖体停留在 PTC 处),形成 SURF 复合体结构。

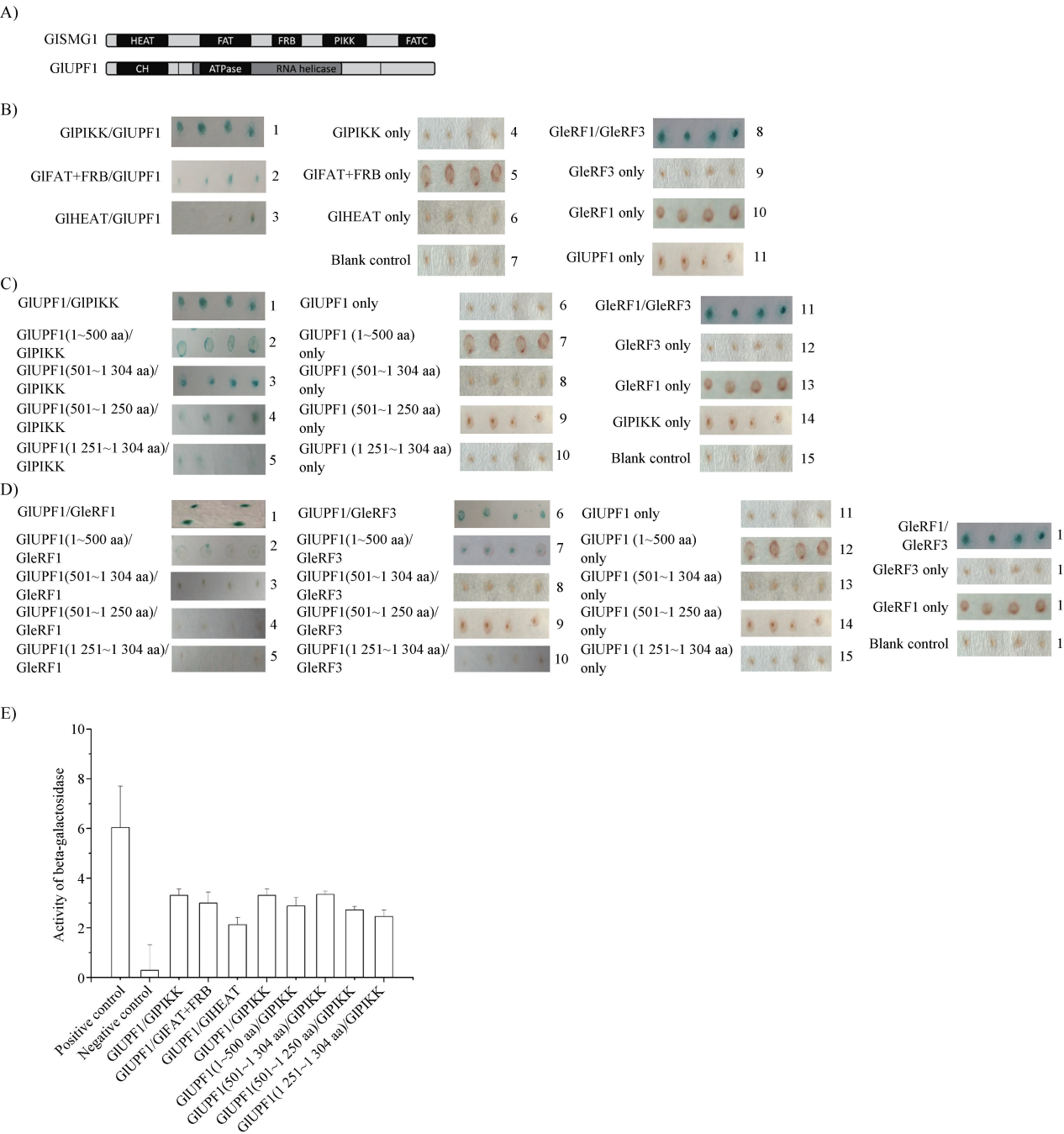


**Fig. 1 The interaction between GIUPF1 and eRFs of *G. lamblia*** (A) Interaction between GIUPF1 and eRFs of *G. lamblia* demonstrated by BiFC. Control 1: pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP-GleRF1/pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP-GleRF3 as positive control; Control 2: pET-28a-cherry (160 ~ 237)-GFP/ pQE-30-cherry (1 ~ 159)-GFP as negative control; The results of GleRF1/ GIUPF1 and GleRF3/ GIUPF1 suggested that GIUPF1 could interact with eRFs of *G. lamblia*. (B) Yeast two-hybrid confirmed interaction between GIUPF1 and GleRF1. Positive control: GleRF1/ GleRF3 (row 7); Filter assays of Yeast two-hybrid experiments. In rows 1-2, plasmids of pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1 or pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3 were co-transfected with pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 plasmids, respectively. The co-transfection in rows 3-6 and rows 8-9 was used as negative controls, where GIUPF1 represents pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1 was co-transfected with pGBKT<sub>7</sub>. GleRF1 only represents pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1 was co-transfected with pGADT<sub>7</sub>. GleRF3 only represents pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3 was co-transformed with a plasmid pGADT<sub>7</sub>. Blank control represents plasmid pGBKT<sub>7</sub> was co-transfected with pGADT<sub>7</sub>. Interaction between fusion proteins activates β-galactosidase expression, which produces a blue color by hydrolyzing X-gal

2.2 GIUPF1 与 GISMGI 存在相互作用

在哺乳动物的 NMD 途径中,翻译终止复合体

在提前终止密码子处停滞,肽链释放因子与 NMD 途径核心因子 UPF1 和 SMG1 形成 SMG1-UPF1



**Fig. 2 GIUPF1 interacts with GISMG1** (A) Schematic representation of the structure of GISMG1 and GIUPF1. (B) The interaction between domains of GISMG1 and GIUPF1. In rows 1-3, plasmids of pGBKT<sub>7</sub>-GIPIKK, pGBKT<sub>7</sub>-GIFAT + FRB and pGBKT<sub>7</sub>-GIHEAT were co-transfected with pGADT<sub>7</sub>-GIUPF1, respectively. In row 8, GleRF1/ GleRF3 served as a positive control, along with the necessary controls in rows 9-10. The designated co-transfections in rows 4-7 was performed as negative controls. Blank control represents pGBKT<sub>7</sub> was co-transfected with pGADT<sub>7</sub>. Interaction between fusion proteins activates β-galactosidase expression, which produces a blue color by hydrolyzing X-gal. (C) The interaction between truncated forms of GIUPF1 and GIPIKK. In rows 1-5, pGBKT<sub>7</sub>-GIPIKK was co-transfected with truncated forms of GIUPF1, respectively. Rows 6-10, 12-15 represent the corresponding negative controls. (D) The interaction between eRFs and truncated forms of GIUPF1. In rows 1-5, pGBKT<sub>7</sub>-GleRF1 was co-transfected with truncated forms of GIUPF1, respectively. In rows 6-10, pGBKT<sub>7</sub>-GleRF3 was co-transfected with truncated forms of GIUPF1, respectively. Rows 11-15, 17-19 represent the corresponding negative controls. (E) The activity of β-galactosidase of interaction between GIUPF1 and GIHEAT, GIFAT + FRB or GIPIKK, and the activity of β-galactosidase of interaction between GIPIKK and each truncated forms of GIUPF1. The vertical axis represents the enzyme activity (Miller) of every experimental group. The histogram shows that the activity of β-galactosidase of every experimental groups



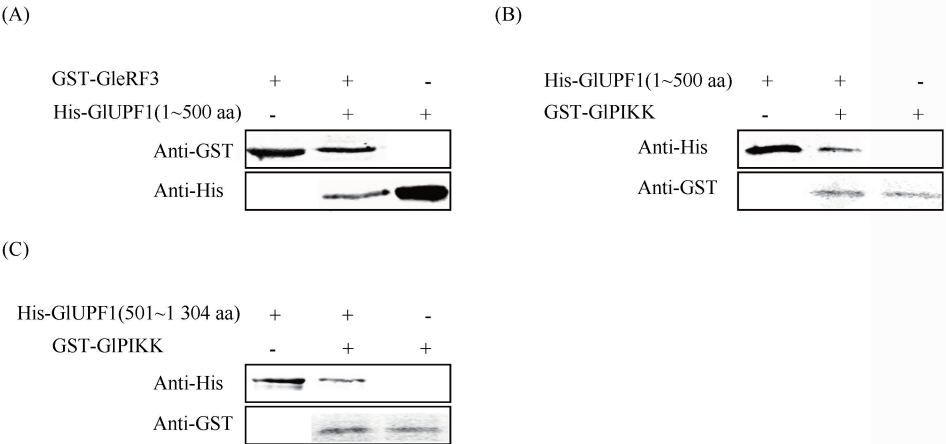
-eRF3-eRF1 复合体结构(SURF)。其中,SMG1 磷酸化修饰 UPF1,而 PIKK 是 SMG1 的主要激酶结构域。贾第虫中的 GIUPF1 与 GISMG1 的关系如何呢? 根据上述结果,进一步探讨了 GIUPF1、GISMG1 和肽链释放因子之间的相互关系。

研究发现,贾第虫的 SMG1 包含 HEAT 结构域、FAT 结构域、PIKK 结构域和 FATC 结构域 (Fig. 2A)。本文首先运用酵母双杂交方法验证 GIUPF1 是否和 GISMG1 之间存在相互作用,结果表明,GIUPF1 与 GIHEAT、GIFAT + FRB 和 GIPIKK 结构域之间都存在相互作用。计算 GIUPF1 与 GIHEAT、GIFAT + FRB 和 GIPIKK 的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。结果显示,相比 GIUPF1 与 GIHEAT 和 GIFAT + FRB 的相互作用,GIUPF1 与 GIPIKK 的相互作用强度较高 (Fig. 2B, 2E)。

另一方面,将 GIUPF1 分为 4 个截短体:GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa)、GIUPF1 (501 ~ 1 250 aa) 和 GIUPF1 (1 251 ~ 1 304 aa)。GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 包括 GIUPF1 的富含 Cys-His (CH) 结构域,GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 包括 GIUPF1 的解旋酶结构域 (helicase domain) 和 C 端区域,GIUPF1 (501 ~ 1 250 aa) 仅包括 GIUPF1 的解旋酶结构域,GIUPF1 (1 251 ~ 1 304 aa) 包括 GIUPF1 的 C 端区域 (Fig. 2A)。运用酵母双杂交的结果分析这些截短体与 GleRF1、GleRF3 以及与 GISMG1 (PIKK) 相互作用的关键位点。结果显示,GIPIKK 作为 GISMG1 的

主要激酶结构域,能与 GIUPF1 发生相互作用 (Fig. 2B and Fig. 2E),通过计算  $\beta$ -半乳糖苷酶活性发现,GIPIKK 与 GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 和 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 的作用强度比与 GIUPF1 (501 ~ 1 250 aa) 和 GIUPF1 (1 251 ~ 1 304 aa) 的强度要高 (Fig. 2C and Fig. 2E)。说明 GIPIKK 对 GIUPF1 的修饰位点主要集中在 N 端和 C 端。GleRF1 和 GleRF3 与全长 GIUPF1 都存在相互作用 (Fig. 2D)。但所有截短体 GIUPF1 与 GleRF1 的相互作用几乎消失。与此同时,GleRF3 与 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 存在相互作用,但作用强度比野生型 GIUPF1 与 GleRF3 的相互作用弱。这表明,贾第虫的肽链释放因子能与全长的 GIUPF1 形成蛋白质复合体。

体外 pull down 实验进一步证实, GleRF3 与 GIUPF1 (1 ~ 500 aa)、以及 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 和 GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 截短体蛋白质与 GIPIKK 的相互作用 (Fig. 3)。结果与酵母双杂交一致。GleRF3 可以与 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 作用,GIPIKK 也分别与 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 和 GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 相互作用。由此可以推测, GleRF1 能够与 GIUPF1 相互作用,但需要 GIUPF1 的完整分子结构。GleRF3 与 GIUPF1 的主要作用位点可能位于 GIUPF1 的 CH 结构域。GIPIKK 与 GIUPF1 相互作用,且 GIUPF1 (1 ~ 500 aa) 和 GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) 与 PIKK 的相互作用更稳定,可能为 GISMG1 磷酸化 GIUPF1 提供作用基础。

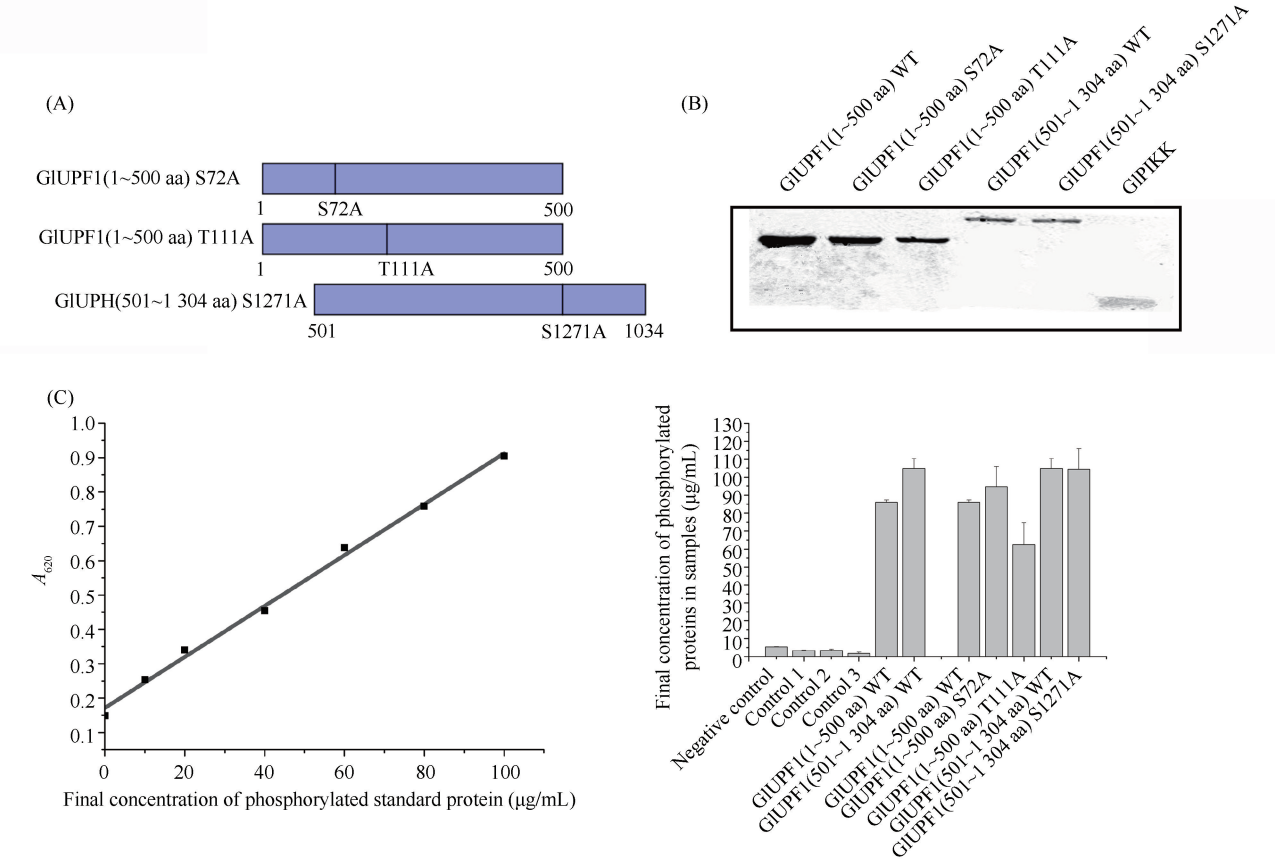


**Fig. 3 The interaction between GIUPF1 (1 ~ 500 aa) and GleRF3 and the interactions between truncated forms of GIUPF1 and GIPIKK in pull-down assays** (A) The pull-down products were analyzed by Western blot, showing that the fusion protein His-GIUPF1 (1 ~ 500 aa) was detected. (B) Western blot analysis of the interaction between His-GIUPF1 (1 ~ 500 aa) and GST-GIPIKK. (C) The pull-down products were analyzed by Western blot and the fusion protein His-GIUPF1 (501 ~ 1 304 aa) was detected

2.3 GIUPF1 的 T111 是特异性磷酸化位点

以上结果证明蓝氏贾第虫的 GIUPF1 与 GISMGI 的 GIPIKK 结构域相互作用。二者之间的相互作用的意义何在？是否与高等真核生物一样，GISMGI 能磷酸化修饰 GIUPF1。本文利用纯化的 GIPIKK 蛋白对 GIUPF1 截短体进行体外磷酸化实验,并用蛋白质磷酸化水平检测试剂盒进行检测,分析 GIPIKK 是否能够磷酸化修饰 GIUPF1 的截短体。如 Fig. 4C 所示,GIUPF1 的 2 种截短体 GIUPF1(1 ~ 500 aa)和 GIUPF1(501 ~ 1 304 aa)均能被 PIKK 磷酸化,GIUPF1(1 ~ 500 aa)的磷酸化蛋白质浓度是 86.01  $\mu\text{g/mL}$ ,GIUPF1(501 ~ 1 304 aa)的磷酸化蛋白质浓度是 104.83  $\mu\text{g/mL}$ 。说明在贾第虫 UPF1 N 端和 C 端均有 SMG1 磷酸化修饰位点,这些磷酸化

位点可能用于招募 RNA 降解相关酶类,或者介导 UPF1 与其他蛋白质的相互作用。进一步研究 GIUPF1 的磷酸化位点。通过 NetPhos 2.0 软件对 GIUPF1 蛋白序列的磷酸化位点进行在线预测,本文选择 3 个可能的磷酸化位点(S72、T111、S1271)突变为丙氨酸(A)(Fig. 4A),检测各突变体经体外磷酸化后的磷酸化水平。结果表明,GIUPF1(1 ~ 500 aa)S72A 的磷酸化蛋白质浓度是 94.59  $\mu\text{g/mL}$ ,GIUPF1(1 ~ 500 aa)T111A 的磷酸化蛋白质浓度是 62.47  $\mu\text{g/mL}$ ,GIUPF1(501 ~ 1 304 aa)S1271A 的磷酸化蛋白质浓度是 104.41  $\mu\text{g/mL}$ 。其中,只有 GIUPF1(1 ~ 500 aa)T111A 的磷酸化蛋白质浓度明显低于野生型(Fig. 4C)。据此认为,T111 可能是 GIUPF1 的一个特异性磷酸化位点。



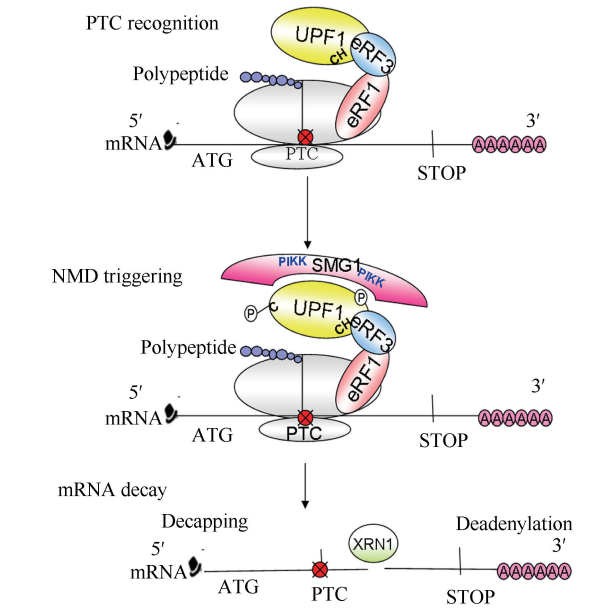
**Fig.4 T111 is the specific phosphorylation site of GIUPF1** (A) Schematic representation of GIUPF1 mutants. (B) Western blot analysis of expression of GIUPF1 truncated forms and mutants was confirmed by using anti-GST antibody. (C) Phosphorylation protein standard curve (the graph in the figure) and the concentrations of phosphorylated truncated forms of GIUPF1 and mutants. The vertical axis represents the concentrations of phosphorylated proteins in samples. The histogram shows that the concentrations of phosphorylated proteins of every experimental groups. Control 1 represents the concentration of phosphorylation when GIPIKK is exclusive sample protein. Control 2 represents the concentration of phosphorylation when only GIUPF1 (1-500 aa) is present. Control 3 represents the concentration of phosphorylation when only GIUPF1 (501-1 304 aa) is present. The concentration of phosphorylated GIUPF1 (1-500 aa) is 86.01  $\mu\text{g/mL}$ . The concentration of phosphorylated and GIUPF1 (501-1 304 aa) is 104.83  $\mu\text{g/mL}$ . The concentration of phosphorylated GIUPF1 (1-500 aa) S72A, GIUPF1(1-500 aa) T111A and GIUPF1 (501-1 304 aa) S1271A were 81.69  $\mu\text{g/mL}$ , 62.47  $\mu\text{g/mL}$  and 104.41  $\mu\text{g/mL}$ , respectively

3 讨论

无义介导的 mRNA 降解途径作为真核生物中一种重要的 mRNA 质量控制机制,对于维持细胞正常的生理活动具有重要意义。之前的研究表明,在哺乳动物等高等真核生物中,存在不同的 NMD 模型,其中 EJC 模型是比较重要的一种模型<sup>[11, 25, 26]</sup>,多发现在哺乳动物等高等真核生物中。在这些生物的基因中存在大量的内含子,所以, RNA 经过细胞内加工后,会在成熟 mRNA 上出现外显子连接复合体。因此, EJC 模型在哺乳动物的 NMD 途径中至关重要。在 EJC 模型中, SURF 结构作为一个较稳定的平台,为 NMD 途径的正常进行提供基础。进一步的研究表明,哺乳动物的 eRF1 的 C 端能结合 eRF3 和 UPF1, eRF3 的 C 端能结合 UPF1 的 CH 结构域,且 SMG1 的 PIKK 结构域主要结合和磷酸化 UPF1<sup>[11, 27]</sup>。

UPF1 与 SMG1 是 NMD 途径中高度保守的核心因子,在蓝氏贾第虫中已有发现,且 GIUPF1 和 GISM1 的分子结构与高等真核生物相似。我们推测,在贾第虫中也存在相似 SURF 结构,以激活 NMD 途径。在本研究中,贾第虫的肽链释放因子都与 GIUPF1 发生相互作用,而且 GIUPF1 的 CH 结构域主要与 GleRF3 形成较稳定的复合体。其次, GISM1 的激酶结构域 GIPIKK 也能与 GIUPF1 发生相互作用。如 Fig. 5 所示, GleRF1 和 GleRF3 在 mRNA 上与核糖体相互作用, GleRF3 与 GIUPF1 的 CH 结构域结合,发生相互作用。GleRF1 可与 GIUPF1 结合,也可通过 GleRF3 间接与 GIUPF1 相互作用。GISM1 主要通过 GIPIKK 与 GIUPF1 结合,并且使之发生磷酸化修饰,且测得在 GIUPF1 上的 1 个可能的特异性磷酸化位点是 T111,从而激活 NMD 途径。

尽管在很多高等真核生物中, EJC 结构可激活 NMD 途径,但也有研究表明,在酵母、线虫和四膜虫等一些较低等真核生物中,存在不依赖 EJC 的 NMD 激活方式,仅利用 UPF1 与 mRNA 长的 3' 非翻译区相互作用来激活 NMD 途径<sup>[1]</sup>。贾第虫被认为是早期分化的真核生物,属于双滴虫目寄生性鞭毛虫,也是一种寄生在人和某些哺乳动物肠道中的原生动物<sup>[19]</sup>。蓝氏贾第虫基因组中有较少的内含子<sup>[28]</sup>,推测在贾第虫的 mRNA 上存在较少的 EJC 结构。但本研究中证实,在贾第虫的 NMD 途径中存在 SURF 复合体,而 SURF 复合体是 EJC 模型的一个关



**Fig. 5 Suggested model of NMD activation of *G. lamblia*** First step: polypeptide release factors of *G. lamblia* interact with GIUPF1 to recognize PTC. CH domain of UPF1 and eRF3 can form a stable complex. Second step: PIKK, the kinase domain of GISM1, can also interact with C-terminal and N-terminal domain of GIUPF1 to form the SURF complex. Then, the NMD pathway is activated. Finally, some decay inducing factors, such as XRN1, can be recruited to the abnormal mRNA for the degradation of the mRNA

键平台。这些结论看似有些矛盾,但我们推测,贾第虫的有些生理过程是随着其寄主的进化而进化的。哺乳动物等高等真核生物的生理过程目前认为是高度进化的<sup>[29]</sup>,而贾第虫可能为了更好适应其本身的寄生环境,在它看似简单且进化原始的细胞中,进化出利于生存的 NMD 途径,仅有 SURF 结构来启动 NMD 途径,不需要 EJC 复合体的参与,磷酸化的 UPF1 担负招募 mRNA 降解酶(如 XRN1、SKI7)的任务,最终使无义 mRNA 得以降解。本研究结果有助于进一步理解 NMD 途径的起源和进化,揭示该通路分子机制在进化上的多样性,为进一步阐明 NMD 机制提供数据支持。

参考文献 (References)

[ 1 ] Fatscher T, Boehm V, Gehring NH. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72 (23): 4523-4544  
[ 2 ] 柴宝峰, 王美, 石文鑫, 等. 无义 mRNA 降解途径的机制与进化[J]. 山西大学学报(自然科学版) (Chai B, Wang M, Shi W, et al. Mechanism and evolution of nonsense-mediated mRNA decay [J]. J Shanxi Univ Nat Sci Ed), 2017, 40 (3): 639-644  
[ 3 ] 贾晓波, 胡剑. 无义介导的 mRNA 降解[J]. 中国生物化学与



- 分子生物学报 (Jia X, Hu J. Nonsense-mediated mRNA decay [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2012, **28**(2): 115-120
- [4] Yamashita A. Role of SMG-1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay [J]. Genes Cells, 2013, **18** (3): 161-175
- [5] Bhattacharya A, Kohrer C, Mandal D, *et al.* Nonsense suppression in archaea [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, **112** (19): 6015-6020
- [6] Kurosaki T, Li W, Hoque M, *et al.* A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation [J]. Genes Dev, 2014, **28** (17): 1900-1916
- [7] Hurt J A, Robertson A D, Burge C B. Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay [J]. Genome Res, 2013, **23** (10): 1636-1650
- [8] Chakrabarti S, Bonneau F, Schussler S, *et al.* Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5-SMG7 and SMG6 [J]. Nucleic Acids Res, 2014, **42** (14): 9447-9460
- [9] Lloyd JP, Davies B. SMG1 is an ancient nonsense-mediated mRNA decay effector [J]. Plant J, 2013, **76** (5): 800-810
- [10] Arias-Palomo E, Yamashita A, Fernandez IS, *et al.* The nonsense-mediated mRNA decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8 [J]. Genes Dev, 2011, **25** (2): 153-164
- [11] Lopez-Perrote A, Castano R, Melero R, *et al.* Human nonsense-mediated mRNA decay factor UPF2 interacts directly with eRF3 and the SURF complex [J]. Nucleic Acids Res, 2016, **44**(4): 1909-1923
- [12] Roque S, Cerciat M, Gaugue I, *et al.* Interaction between the poly(A)-binding protein Pab1 and the eukaryotic release factor eRF3 regulates translation termination but not mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. RNA, 2015, **21** (1): 124-134
- [13] Hug N, Longman D, Caceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway [J]. Nucleic Acids Res, 2016, **44** (4): 1483-1495
- [14] Contreras J, Begley V, Macias S, *et al.* An UPF3-based nonsense-mediated decay in *Paramecium* [J]. Res Microbiol, 2014, **165** (10): 841-846
- [15] Tian M, Yang W, Zhang J, *et al.* Nonsense-mediated mRNA decay in *Tetrahymena* is EJC independent and requires a protozoa-specific nuclease [J]. Nucleic Acids Res, 2017, **45** (11): 6848-6863
- [16] Feng JM, Sun J, Xin DD, *et al.* Comparative analysis of the 5S rRNA and its associated proteins reveals unique primitive rather than parasitic features in *Giardia lamblia* [J]. PLoS One, 2012, **7**(6): e36878
- [17] Hilario E, Gogarten JP. The prokaryote-to-eukaryote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits [J]. J Mol Evol, 1998, **46**(6): 703-715
- [18] Chen YH, Su LH, Huang YC, *et al.* UPF1, a conserved nonsense-mediated mRNA decay factor, regulates cyst wall protein transcripts in *Giardia lamblia* [J]. PLoS One, 2008, **3** (10): e3609
- [19] Chen YH, Su LH, Sun CH. Incomplete nonsense-mediated mRNA decay in *Giardia lamblia* [J]. Int J Parasitol, 2008, **38** (11): 1305-1317
- [20] Chai B, Li C, Yu J, *et al.* Stop codon recognition in the early-diverged protozoans *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2015, **202**(1): 15-21
- [21] Preis A, Heuer A, Barrio-Garcia C, *et al.* Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1 [J]. Cell Rep, 2014, **8**(1): 59-65
- [22] Miller KE, Kim Y, Huh WK, *et al.* Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies [J]. J Mol Biol, 2015, **427** (11): 2039-2055
- [23] 郜尽, 王海侠, 李京敬, 等. 酵母双杂交报告基因  $\beta$ -半乳糖苷酶活性测定方法的研究 [J]. 上海交通大学学报 (医学版) (Gao J, Wang H, Li J, *et al.* Study on the measure method of  $\beta$ -galactosidase activity report gene of yeast two hybrid [J]. J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci), 2009, **29**(2): 236-240
- [24] 刘斌, 宋宜, 董燕, 等. 蛋白质体外磷酸化方法的建立 [J]. 生物化学与生物物理进展 (Liu B, Song Y, Dong Y, *et al.* The standardization of p53 protein phosphorylation *in vitro* [J]. Prog Biochem Biophys), 2003, **30**(1): 112-115
- [25] Chuang TW, Lee KM, Tarn WY. Function and pathological implications of exon junction complex factor Y14 [J]. Biomolecules, 2015, **5**(2): 343-355
- [26] Fukumura K, Wakabayashi S, Kataoka N, *et al.* The exon junction complex controls the efficient and faithful splicing of a subset of transcripts involved in mitotic cell-cycle progression [J]. Int J Mol Sci, 2016, **17**(8). pii: E 1153
- [27] Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, *et al.* Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways [J]. EMBO J, 2008, **27**(5): 736-747
- [28] Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, *et al.* Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia* [J]. Science, 2007, **317**(5846): 1921-1926
- [29] Culbertson MR, Leeds PF. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution [J]. Curr Opin Genet Dev, 2003, **13**(2): 207-214